Journal of Microbial World
Volume 16, No. 2, September 2023

Original Article

Relationship between *afl*O and *afl*Q gene expression with aflatoxin B1 by *Aspergillus* species isolated from animal feed

Nooshin Sohrabi[1], **Morteza Taghizadeh**[2]

[1]Assistant Professor,Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor,Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Aflatoxins are produced as toxic secondary metabolites by some *Aspergillus* species. Since these fungal species can contaminate food and animal feed, microbial contamination monitoring and control is important. In the current study, the correlation between expression of two aflatoxin biosynthetic pathway genes *afl*O and *afl*Q and was investigated.

Materials & Methods: Sixty-seven different isolates of aflatoxin-producing *Aspergillus* species selected and the presence. expression of *afl*O and *afl*Q gene sequences were assayed by PCR and quantitative Real-Time RT-PCR methods, respectively. In addition, the amount of aflatoxin B1 by high-performance reverse chromatography (RP-HPLC) using a fluorescent detector.

Results: Forthy one, out of 67 isolated species had both *afl*O and *afl*Q genes. Seventeen samples out of 26 (65%) had aflatoxin B1 levels higher than 5 ng/g and 6 samples (23%) produced high levels of this toxin (more than 100 ng / g) as well.

Conclusion: Considering the relative correlation between the expression of selected aflatoxin genes and AFB1 produced in feedstuffs, it seems that the investigation of other aflatoxin-producing genes can lead to a better correlation and complete the results of this study.

Keywords: *Aspergillus flavus*, aflatoxin, *afl*O, *afl*Q, Real-Time RT-PCR

Received: 12 April 2023 Revised: 10 June 2023 Accepted: 16 August 2023

Correspondence to: Nooshin Sohrabi
Tel: +98 9128031656
E-mail: Nsohrabi75@pnu.ac.ir
Journal of Microbial World 2023, 16 (2): 132 - 142
DOI:10.30495/jmw.2023.1979612.2052

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال شانزدهم شماره دوم (پیاپی ۵۵) تابستان ۱۴۰۲
صفحات ۱۴۲-۱۳۲

Original Article

ارتباط بین بیان ژن‌های aflO و aflQ با میزان آفلاتوکسین B1 از گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از خوراک دام

نوشین سهرابی[1*]، مرتضی تقی زاده [2]

[1]استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

[2]استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: آفلاتوکسین‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه سمی، توسط برخی از گونه‌های آسپرژیلوس تولید می‌شوند. از آنجا که این گونه‌های قارچی می‌توانند باعث آلودگی مواد غذایی و خوراک دام شوند، لذا ردیابی و کنترل آلاینده‌های میکروبی آن‌ها اهمیت فراوانی دارند. در مطالعه حاضر ضمن بررسی آلودگی خوراک دام، ارتباط بین میزان آفلاتوکسین B1 تولید شده توسط گونه‌های قارچ آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین و میزان بیان ژن‌های aflO و aflQ بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: تعداد ٦٧ نمونه از گونه‌های مختلف آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین جداسازی و انتخاب شدند. ضمن بررسی وجود توالی‌های مربوط به ژن‌های aflO و aflQ به‌روش PCR، میزان بیان آن‌ها به‌روش Real Time RT-PCR کمی بررسی شد. علاوه براین، میزان آفلاتوکسین B1 به‌روش کروماتوگرافی معکوس با کارآیی بالا (RP - HPLC) و با استفاده از دتکتور فلورسنت اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: درمیان ٦٧ گونه جدا شده، ٤١ نمونه دارای هر دو ژن aflO و aflQ بودند. ١٧ نمونه از ٢٦ گونه بررسی شده (٦٥ درصد) مقادیر بالاتر از ٥ نانوگرم بر گرم آفلاتوکسین B1 و ٦ نمونه (٢٣ درصد) نیز مقادیر بسیار بالایی از این توکسین (بیش از ١٠٠ نانوگرم بر گرم) را تولید کرده بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به ارتباط نسبی بین میزان بیان ژن‌های مولد آفلاتوکسین و تولید آفلاتوکسین B1 در نمونه‌های خوراک دام، به نظر می‌رسد که بررسی سایر ژن‌های مولد آفلاتوکسین می‌تواند منجر به تکمیل این مطالعه و تقویت ارتباط بین بیان ژن‌های مولد آفلاتوکسین و میزان توکسین تولید شده شود.

واژگان کلیدی: آسپرژیلوس فلاووس، آفلاتوکسین، Real-Time RT-PCR، aflO، aflQ.

دریافت مقاله: ١٤٠٢/١/٢٣ ویرایش مقاله: ١٤٠٢/٣/٢٠ پذیرش مقاله: ١٤٠٢/٥/٢٥

مقدمه

قارچ‌ها از عوامل بیولوژیک مهم آلوده کننده خوراک دام بوده و با ترشح آنزیم‌ها و متابولیت‌های مختلف می‌توانند باعث فساد و از بین بردن غلات و مواد غذایی شوند. آلودگی محصولات کشاورزی به عوامل قارچی می‌تواند با تولید متابولیت‌های سمی به نام مایکوتوکسین همراه شود که به‌عنوان خطر مهمی برای سلامتی انسان محسوب می‌شوند (١و٢).

آفلاتوکسین‌ها به‌عنوان یکی از سمی‌ترین مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که اثرات زیان باری بروی سلامت انسان و دام دارند. برخی گونه‌های جنس *آسپرژیلوس* از دسته فلاوی شامل

*) آدرس برای مکاتبه: گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
تلفن: ٠٩١٢٨٠٣١٦٥٦ پست الکترونیک: Nsohrabi75@pnu.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

آسپرژیلوس فلاووس، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس نومیوس* مولدین بالقوه آفلاتوکسین هستند. به همین دلیل، تشخیص و اندازه‌گیری زودرس و به‌موقع گونه‌های مولد آفلاتوکسین برای تائید صحت و سلامت خوراک دام و انسان مهم است (۳و٤). نکته حائز اهمیت این است که بسیاری از فاکتورهای غذایی و محیطی از قبیل دما، pH، منابع کربن و نیتروژن، فاکتورهای تنش لیپیدها و نمک‌های فلزی کم مصرف بر روی میزان آفلاتوکسین تولید شده از آسپرژیلوس‌های توکسین زا تأثیر می‌گذارند (٤).

شناسایی گونه‌های مولد آفلاتوکسین بر اساس صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی وقت‌گیر است و همیشه به نتیجه مطلوب نمی‌رسد. در این خصوص روش‌های مولکولی می‌توانند به شناسایی دقیق‌تر و آسان‌تر کمک کنند (۵و٦). برهمین اساس، تولید آفلاتوکسین و تمایز سویه‌های مولد آفلاتوکسین را می‌توان به وسیله بررسی بیان ژن‌های آفلاتوکسین و با استفاده از روش‌هایی نظیر Real time PCR: RT-PCR نیز انجام داد. با استفاده از این روش، میزان بیان ژن‌های ساختاری و تنظیمی مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین در *آسپرژیلوس فلاووس* و یا *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله مزیت‌های این روش افتراقی، حساسیت و سرعت بالای آن است (۷و۸).

بیوسنتز آفلاتوکسین مسیر پیچیده‌ای است که در آن حداقل ۱۸ مرحله آنزیمی وجود دارد و از استیل کوآ شروع می‌شود. ۲۵ ژن مختلف نظیر *aflP* (*omt*)، *aflD* (*nor 1*)، *aflO*، *aflQ* و *aflR* در این فرایند شناسایی شده‌اند که در یک ناحیه ۷۵ جفت بازی در یک سوم کروموزوم قارچ قرار گرفته‌اند (۹و۱۰و۱۱).

با توجه به اهمیت ژن‌های دخیل در سنتز آفلاتوکسین، ردیابی این ژن‌ها می‌تواند به‌عنوان یک هدف بالقوه در تشخیص گونه‌های *آسپرژیلوس* مولد آفلاتوکسین در نظر گرفته شود. برهمین اساس مطالعات مختلفی برای بررسی این ژن‌ها برای افتراق سویه‌های مولد آفلاتوکسین صورت گرفته است. محصولات آنزیمی مربوط به ژن‌های *aflO (omtB)*, *aflQ* *(ordA)* از جمله ژن‌های ساختاری هستند که دارای اهمیت خاصی در فرایند ساخت آفلاتوکسین می‌باشند و وجود آن‌ها برای این فرایند ضرورت دارد (۱۰).

با توجه به اهمیت تشخیص سریع آلودگی‌های قارچی و آفلاتوکسین تولید شده از گونه‌های *آسپرژیلوس* در خوراک دام برای مدیریت آلودگی آفلاتوکسین و رعایت بهداشت مواد غذایی، به نظر می‌رسد که بررسی ارتباط بین ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین می‌تواند در طراحی یک روش قابل اعتماد و سریع در ردیابی آلودگی‌های قارچی منجر به تولید آفلاتوکسین موثر باشد. به همین منظور دراین مطالعه با انتخاب ژن‌های *aflO* و *aflQ* از مجموعه ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین، ارتباط بین میزان بیان این ژن‌ها با سویه‌های *آسپرژیلوس* مولد آفلاتوکسین که از خوراک دام جدا شده‌اند، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ٦۷ نمونه از گونه‌های مختلف *آسپرژیلوس* مولد آفلاتوکسین که طی مطالعات قبلی از خوراک دام (ذرت) جدا شده بودند (۱۲) به‌همراه نمونه‌های استاندارد *آسپرژیلوس فلاووس* (PFCC 5004, PFCC 9643) و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (PFCC 5286 , PFCC 5018)، که از بانک زیستی قارچ‌های بیماری‌زای ایران (انستیتو پاستور ایران) تهیه شده بودند، برای انجام این مطالعه انتخاب شدند.

الف) کشت و استخراج DNA از نمونه‌های مورد مطالعه: تمامی جدایه‌های *آسپرژیلوس* ابتدا بر روی محیط سابورو دکستروز براث کشت داده شدند و به مدت ٤ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. توده‌های میسیلیومی هر نمونه پس از شستشو با *محلول* غلیظ (10x) بافر فسفات سالین (PBS) به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و از میسیلیوم‌های شسته شده، با استفاده از نیتروژن مایع پودر تهیه شد .در ادامه با استفاده از حدود ۱۰۰ میکروگرم از پودر میسیلیوم و با کیت DNeasy PlantMaxi Kit (Qiagen)، براساس دستورالعمل شرکت سازنده DNA ژنومی استخراج شد. درصد خلوص این DNA استفاده از دستگاه Nanodrop-ND1000

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) و براساس نسبت جذب نوری A280/A260 و A230/A260 محاسبه گردید.

ب) بررسی وجود ژن‌های aflO و aflQ با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): ابتدا با استفاده از واکنش PCR وجود توالی‌های مربوط به دو ژن *aflO* (*omt*B)، *aflQ* (*ord*A) و قطعه ژنی ITS در سویه‌های مورد مطالعه ارزیابی شد. ناحیه ژنی ITS به‌عنوان قطعه ژنی محسوب می‌شود که تا حدود زیادی از تغییر بین گونه‌ای و ثبات درون گونه‌ای برخوردار است و در ردیابی گونه‌های مختلف *آسپرژیلوس* مورد استفاده قرار می‌گیرد. تمامی پرایمرها با توجه به سکانس مرجع ثبت شده در بانک ژن و توسط نرم افزار OLIGO7 طراحی شدند. جدول ۱ ویژگی‌های پرایمرها و ژن‌های هدف را نشان می‌دهد.

جدول ۱: مشخصات ژن‌های هدف و پرایمرهای مورد استفاده.

ژن هدف	پرایمر	Accession number	اندازه
ITS	F: 5'- GGCTTTGTCACCCGCTCTGT -3' R: 5'- ACGACCATTATGCCAGCGTCC -3'	AF027863	٦٩١ bp
aflO (omtB)	F: 5'- TTACGATTTGATGGAGCAGG -3' R : 5'- AGGTTCTCTTGGCTACAG -3'	HM355030	١٣٣٢ (٩٥) bp
aflQ (ordA)	F: 5'- TCGCTCTGGCTTGAACACC -3' R: 5'- AACATTCTCTGCCTCATCACT -3'	Ay510451	٨٣٩ (٤٤٥) bp

هر سه ژن توسط واکنش‌های مجزا به‌همراه شرایط بهینه تکثیر شدند. برای این منظور مخلوط PCR توسط اضافه نمودن ۱۵۰ نانوگرم از الگوی DNA، Mgcl2 ۱/۵ میلی‌مولار و بافر ۱۰X PCR حاوی Kcl ۵۰ میلی‌مولار، dNTP ۱ میلی‌مولار، ۲/۵ واحد آنزیم Taq polymerase و ۰/۳ پیکومول از هر پرایمر تهیه و سپس با آب مقطر به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. چرخه حرارتی واکنش PCR برای هر ژن بهینه و اجرا گردید. این چرخه شامل واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سلسیوس در ۳ دقیقه و به دنبال آن برای ۳۵ بار سیکل واسرشتگی ۹۵ درجه سلسیوس در ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو (به‌ترتیب ٦٢ و ٥٢/٤ و ٥٧ درجه سلسیوس برای ITS و *aflO* و *aflQ*)، دمای طویل شدن رشته الگو ۷۲ درجه سلسیوس در ٤٥ ثانیه (۳۰ ثانیه در مورد *aflO*) و سپس طویل شدن نهایی ۷۲ درجه سلسیوس در ۷ دقیقه انجام شد.

محصولات PCR بر روی ژل آگاروز (۱ درصد) الکتروفورز و با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند، سپس زیر نور UV با استفاده از (Gel Doc 2000, Gel documentation system Bio –Rad, Hercules, CA) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ج) بررسی بیان ژن‌های aflO و aflQ با استفاده از روش Real Time PCR: میزان بیان ژن‌های *aflO* (*omt*B) و *aflQ* (ordA) در نمونه‌های *آسپرژیلوس* که واجد هردو ژن فوق بودند با استفاده از پرایمرهای بررسی شده در مطالعات قبلی و به وسیله روش Real-time PCR بررسی گردید.

برای این منظور ابتدا با استفاده از استاندارد مک فارلند، نسبت یکسانی از غلظت‌های قارچی تهیه و تعداد اسپورها در ۲۰ میکرولیتر شمارش گردید. سپس محتوای mRNA با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, CA, USA) و برمبنای دستورالعمل سازنده استخراج گردید و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس ذخیره شد. غلظت و خلوص RNA تخلیص شده به‌وسیله روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲٦٠ و ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه به وسیله واکنش RT-PCR کمی به روش SYBER Green و با استفاده از کیت *SuperScript® III Platinum® One*-Step qRT (Invitrogen) PCR Kits- انجام شد. در ابتدای واکنش با استفاده از پرایمر Oligo-dT و آنزیم نسخه‌برداری معکوس MMLV-RT، مولکول cDNA از روی mRNA استخراج شده، ساخته و به‌عنوان الگو برای انجام واکنش Real-Time PCR استفاده شد. برای بررسی بازده واکنش و شرایط حاکم بر آن، نمودار استاندارد رسم شد. میزان محصول توالی هدف به روش اندازه گیری نسبی بود و در آن اندازه‌گیری میزان بیان ژن مورد نظر را نسبت به ژن‌های ساختاری سلول تحت عنوان ژن کنترل داخلی (housekeeping gene) بیان می‌کنند که در این تحقیق از بتا اکتین برای این منظور استفاده شد و با استفاده از فرمول Pfaffi، نتایج به‌دست آمده بررسی گردید.

در انجام واکنش، شش میکرولیتر از RNA نمونه همراه با ۱۴ میکرولیتر Master Mix مخلوط شد. رونویسی معکوس در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر PCR با دمای واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سلسیوس در ۲ دقیقه آغاز و به تعداد ۴۰ بار با دمای دمای واسرشتگی ۹۵ درجه سلسیوس در ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها و طویل شدن رشته الگو در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در ۳۰ ثانیه انجام شد.

د) بررسی میزان تولید آفلاتوکسین B1 به روش کروماتوگرافی معکوس با کارآیی بالا (RP - HPLC): با توجه به داده‌های موجود در زمینه اندازه‌گیری آفلاتوکسین در غلات (۱۳)، در این مطالعه میزان آفلاتوکسین B1 موجود در عصاره حاصل از کشت هر کدام از سویه‌ها به روش کروماتوگرافی معکوس با کارآیی بالا (RP - HPLC) و با استفاده از دتکتور فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفت. فرایند آماده سازی و کشت نمونه‌ها بر مبنای روش معرفی شده توسط Lin Tao (۱۴) انجام گردید. برای این منظور دستگاه Agilent با شرایط ذیل تنظیم گردید. درراستای فاز متحرک از متانول، استونیتریل، آب مقطر دوبار تقطیر و اسید استیک با نسبت‌های حجمی ۲۰ درصد، ۲۰ درصد، ۵۹ درصد و ۱ درصد استفاده شد. سرعت جریان به میزان یک میلی‌لیتر بر دقیقه و طول موج آشکارساز فلوئورسانس نیز برای موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر و برای طول موج نشر ۴۳۵ نانومتر تنظیم شد. ستون مورد استفاده در این تحقیق C18 با اندازه ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر بود.

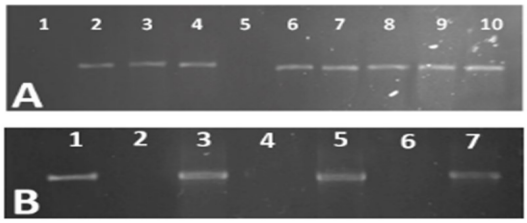
برای نمونه کنترل منفی از محیط کشت PDA (PotatoDextrose Agar) و برای نمونه مثبت نیز از آفلاتوکسین B1 استاندارد (sigma, St. Louis, MO, USA) استفاده شد. مقادیر آفلاتوکسین B1 درنتیجه مقایسه ارتفاع منحنی نمونه های مورد مطالعه با منحنی استاندارد و با احتساب ضریب رقت به دست آمد.

ه) آنالیز آماری: داده‌های به دست آمده در نرم افزار GraphPad Prism (نسخه ۹) با استفاده از آنالیز واریانس در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

در بین ۶۷ جدایه *آسپرژیلوس* انتخاب شده برای این مطالعه، سه گونه *آسپرژیلوس* شناسائی شد که شامل *آسپرژیلوس فلاووس* (۳۳ نمونه)، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (۲۹ نمونه) و *آسپرژیلوس نومیوس* (۵ نمونه) بودند که خصوصیات ماکروسکوپی ومیکروسکوپی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود، باندهای مجزای قطعات ژنی *aflO* و *aflQ* به‌ترتیب در مقیاس ۹۵ و ۴۵۵ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۱٪ مشاهده گردید وبه طور واضح الگوی متفاوتی در بین نمونه‌های مثبت ومنفی وجود داشت. از میان ۶۷ سویه ITS مثبت، ۴۱ نمونه هر دو ژن *aflO* و *aflQ* را دارا بودند. سایر جدایه‌ها الگوی متفاوتی را نشان دادند که در جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: ردیابی ژن‌های *aflO* (A) و *aflQ* (B) در DNA ژنومی استخراج شده از گونه‌های *آسپرژیلوس*، باند اختصاصی *aflO* (۹۵ جفت باز)، در خطوط ۲ تا ۴ و ۶ تا ۱۰ از شکل A، و باند اختصاصی *aflQ* (۴۴۵ جفت باز) در خطوط ۱، ۳، ۵ و ۷.

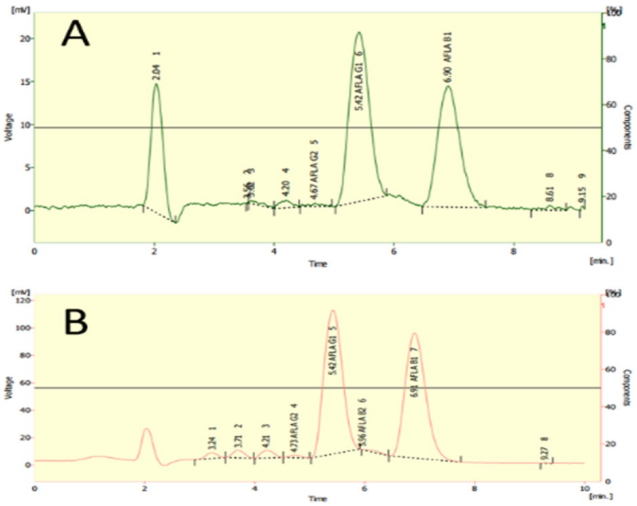
با توجه به نتایج بررسی وجود ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۲، ژن‌های درگیر در بیوسنتز آفلاتوکسین (*aflO* و *aflQ*) به میزان بالایی در نمونه‌های جداشده وجود داشتند. نتایج به‌دست آمده نشان دهنده حضور ژن *aflO* در ۶۱ نمونه (۰۴/۹۱ درصد) و ژن *aflQ* در ۴۷ نمونه (۷۰/۱۴ درصد) از ۶۷ جدایه *آسپرژیلوس* مورد بررسی بود. نکته قابل بررسی در این جدول بیان بسیار بالای ژن‌های فوق در برخی از نمونه‌های انتخابی می‌باشد. البته لازم به ذکر است که ارتباط مستقیمی بین بیان هر دو ژن مورد بررسی و قابلیت تولید آفلاتوکسین B1 مشاهده نشد. به گونه‌ای که برخی از نمونه‌های مورد مطالعه، هم‌زمان با بیان بالای *aflO* و *aflQ*، میزان بالایی از آفلاتوکسین B1 را

تولید کرده بودند در حالی که نمونه‌های دیگر، علیرغم بیان بالای ژن‌های مورد بررسی، قابلیت تولید توکسین را نداشتند و در مواردی که فقط بیان یکی از ژن‌های فوق افزایش داشته است نیز لزوما تولید آفلاتوکسین B1 افزایش نداشته است.

با توجه به بررسی میزان آفلاتوکسین B1 به روش HPLC (شکل ۲) در بین ۲۶ نمونه بررسی شده، ۱۷ نمونه (۶۵ درصد) مقادیر آفلاتوکسین B1 بالاتر از حد مجاز تحمل شده ۵ نانوگرم بر گرم (۱۵) داشتند که در بین آن‌ها ۶ نمونه (۲۳ درصد) مقادیر قابل توجهی از این توکسین (بیش از ۱۰۰ نانوگرم بر گرم) را تولید کرده بودند. تمامی نمونه‌های استاندارد مورد استفاده در این مطالعه میزان قابل توجهی از این توکسین را تولید کرده بودند (جدول ۲).

جدول ۲: اطلاعات ژن‌های *aflO* و *aflQ* و ارتباط آن‌ها با میزان آفلاتوکسین B1 از گونه‌های *آسپرژیلوس* جداشده از خوراک دام. نمونه‌های ۶۸ تا ۷۱ گونه‌های استاندارد می‌باشند.

	گونه *آسپرژیلوس*	وجود ژن (PCR)		بیان ژن (Ct-value)		میزان آفلاتوکسین B1 (ng/g)		گونه *آسپرژیلوس*	وجود ژن (PCR)		بیان ژن (Ct-value)		میزان آفلاتوکسین B1 (ng/g)
		aflO	*aflQ*	*aflO*	*aflQ*				*aflO*	*aflQ*	*aflO*	*aflQ*	
۱	*آ. فلاووس*	+	+	14.68	34.68	N.D	۳۷	*آ. فلاووس*	+	+	34.28	35.21	N.D
۲	*آ. فلاووس*	+	+	18.82	28.82	N.D	۳۸	*آ. پارازیتیکوس*	+	-	N.D	N.D	N.D
۳	*آ. فلاووس*	-	+	N.D	N.D	N.D	۳۹	*آ. فلاووس*	-	+	N.D	N.D	N.D
٤	*آ. نومیوس*	+	+	16.75	19.25	210.85	٤٠	*آ. فلاووس*	+	+	17.94	26.14	0.41
٥	*آ. فلاووس*	+	+	10.1	15.4	300	٤١	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	13.08	11.17	0.13
٦	*آ. فلاووس*	+	+	15.48	35.22	N.D	٤٢	*آ. پارازیتیکوس*	+	-	N.D	N.D	N.D
٧	*آ. فلاووس*	-	+	N.D	N.D	N.D	٤٣	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	16.17	30.27	5.6
٨	*آ. پارازیتیکوس*	-	+	N.D	N.D	N.D	٤٤	*آ. فلاووس*	+	+	16.53	34.13	5.08
٩	*آ. فلاووس*	+	+	33.83	31.22	N.D	٤٥	*آ. فلاووس*	-	+	N.D	N.D	N.D
١٠	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	20.58	29.58	6.1	٤٦	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	16.85	31.15	N.D
١١	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	28.96	32.16	8.11	٤٧	*آ. پارازیتیکوس*	-	+	N.D	N.D	N.D
١٢	*آ. پارازیتیکوس*	_	+	N.D	N.D	N.D	٤٨	*آ. فلاووس*	+	+	20.01	34.01	18.21
١٣	*آ. فلاووس*	+	-	N.D	N.D	N.D	٤٩	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	17.82	35.12	6.1
١٤	*آ. فلاووس*	+	+	22.36	33.56	N.D	٥٠	*آ. فلاووس*	+	+	25.28	33.18	0.52
١٥	*آ. نومیوس*	+	-	N.D	N.D	N.D	٥١	*آ. فلاووس*	-	+	N.D	N.D	N.D
١٦	*آ. پارازیتیکوس*	-	+	N.D	N.D	N.D	٥٢	*آ. نومیوس*	-	+	N.D	N.D	N.D
١٧	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	28.13	29.23	11.58	٥٣	*آ. فلاووس*	+	+	20.46	34.48	11.21
١٨	*آ. فلاووس*	+	-	N.D	N.D	N.D	٥٤	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	26.42	33.11	0.86
١٩	*آ. فلاووس*	+	-	N.D	N.D	N.D	٥٥	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	26.16	33.16	30.62
٢٠	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	27.83	29.23	N.D	٥٦	*آ. فلاووس*	-	+	N.D	N.D	N.D
٢١	*آ. نومیوس*	+	-	N.D	N.D	N.D	٥٧	*آ. پارازیتیکوس*	-	+	N.D	N.D	N.D
٢٢	*آ. نومیوس*	+	+	15.62	12.32	0.4	٥٨	*آ. فلاووس*	+	+	29.47	35.57	0.6
٢٣	*آ. پارازیتیکوس*	+	-	N.D	N.D	N.D	٥٩	*آ. فلاووس*	+	-	N.D	N.D	N.D
٢٤	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	36.71	33.11	N.D	٦٠	*آ. فلاووس*	+	+	30.32	34.32	12.36
٢٥	*آ. پارازیتیکوس*	+	-	N.D	N.D	N.D	٦١	*آ. فلاووس*	+	+	36.76	11.36	45.01
٢٦	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	13.77	14.17		٦٢	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	20.08	9.24	102.2
٢٧	*آ. فلاووس*	+	+	12.86	16.22	0.5	٦٣	*آ. فلاووس*	+	+	34.61	22.58	N.D
٢٨	*آ. فلاووس*	+	+	38.38	34.18	0	٦٤	*آ. فلاووس*	+	+	6.49	7.42	180
٢٩	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	19.31	21.33	N.D	٦٥	*آ. فلاووس*	-	+	N.D	N.D	N.D
٣٠	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	12.44	18.31	234	٦٦	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	7.92	11.52	0.16
٣١	*آ. فلاووس*	+	+	22.29	32.15	N.D	٦٧	*آ. پارازیتیکوس*	-	+	N.D	N.D	N.D
٣٢	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	23.31	3.58	320	٦٨	*آ. فلاووس*	+	+	9.65	12.32	707
٣٣	*آ. فلاووس*	+	+	13.32	12.38	0	٦٩	*آ. فلاووس*	+	+	9.36	16.22	245
٣٤	*آ. پارازیتیکوس*	+	-	N.D	N.D	N.D	٧٠	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	8.84	9.22	325
٣٥	*آ. پارازیتیکوس*	+	-	N.D	N.D	N.D	٧١	*آ. پارازیتیکوس*	+	+	12.58	26.12	404
٣٦	*آ. فلاووس*	+	+	25.08	31.4	N.D							



شکل ۲: کروماتوگرام آفلاتوکسین‌های تولید شده توسط سویه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* (A) و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (B).

بحث

آفلاتوکسین‌ها یکی از انواع مایکوتوکسین‌های قارچی می‌باشند که اثرات مخربی بروی سلامت انسان و دام دارند. لذا تشخیص و اندازه‌گیری زودهنگام و به موقع گونه‌های مولد آفلاتوکسین برای تائید صحت و سلامت خوراک دام و انسان مهم است (۳).

شناسایی گونه‌های *آسپرژیلوس* مولد آفلاتوکسین براساس صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی، علاوه‌بر زمان‌بر بودن، با دقت کمی نیز همراه است. در این خصوص روش‌های مولکولی می‌توانند به شناسایی دقیق‌تر و آسان‌تر کمک کنند. بر همین اساس، روش‌های مولکولی به منظور تمایز گونه‌ها در گروه *آسپرژیلوس فلاووس* به‌کارگرفته شده است (۱۶).

اولین سیستم ردیابی براساس PCR برای یک قارچ مولد مایکوتوکسین توسط Tang و همکاران (۱۹۹۳) انتشار یافت که توانست حضور *آسپرژیلوس فلاووس* را در مایع حاصل از شستشوی برونش‌ها به‌وسیله nested PCR ردیابی و توصیف کند (۱۷).

مطالعات متمرکز روی ارزیابی خواص توکسینی گونه‌های *آسپرژیلوس* دسته فلاوی با آزمون PCR توسط Geisen (۱۸) و به موازات آن توسط Shapira و همکاران (۱۹) انجام گرفت. هر دوی این پژوهش‌ها به‌عنوان نقطه شروع برای تشخیص قارچ‌های مولد آفلاتوکسین با استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR مطرح هستند. در سنجش PCR انجام گرفته توسط Geisen سه جفت پرایمر به صورت multiplex PCR به کار گرفته شد و مشخص گردید که *آسپرژیلوس سوجای* و *آسپرژیلوس اریزا* فاقد ژن ۱- nor هستند. این دو گونه اساساً مشابه *آسپرژیلوس فلاووس* هستند ولی قادر به تولید آفلاتوکسین نیستند و سایر سویه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* غیر مولد آفلاتوکسین نیز با یک یا همه جفت پرایمرهای به کار رفته باندی ایجاد نکردند. به دنبال مطالعات موجود، قابلیت هر دو آزمون PCR در این پژوهش‌ها نیز برای ردیابی قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در غلات، ذرت و همین طور انجیر به اثبات رسید (۱۸و۱۹).

در مطالعه دیگری Bu و همکاران با استفاده از روش Monochrome LightCycler PCR assay، روشی را برای شناسایی و تمایز *آسپرژیلوس فلاووس* از سایر قارچ‌های مهم از نظر پزشکی در کشت‌های خالص و در نمونه‌های بالینی، توصیف کردند. پرایمرهای به کار رفته در این آزمون، بر پایه ی توالی‌هایی از ناحیه ITS از ژن rRNA *آسپرژیلوس فلاووس* بودند (۲۰).

تولید آفلاتوکسین و تمایز سویه‌های مولد آفلاتوکسین می‌تواند به‌وسیله بیان ژن‌های آفلاتوکسین در دسته فلاوی با به کارگیری روش RT-PCR نیز امکان پذیر می‌باشد. تکنیک RT-PCR امکان آشکارسازی mRNAهای رونویسی شده به‌وسیله ژن‌های خاص را با استفاده از تکثیر PCR حدواسط‌های cDNA سنتز شده توسط رونویسی معکوس فراهم می‌کند. این روش برای ردیابی تولید آفلاتوکسین و بیان ژنی آفلاتوکسین بر پایه ژن‌های ساختاری و تنظیمی مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین در *آسپرژیلوس فلاووس* و یا *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*، با موفقیت چشمگیری همراه بوده است. از جمله مزیت‌های این سیستم افتراقی حساسیت و سرعت بالای آن است (۸و۲۱و۲۲).

در مطالعه دیگری با ردیابی بیان سه ژن *aflD*، *aflO* و *aflP* در گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* گزارش شده که بیان ژن‌های فوق با قابلیت تولید آفلاتوکسین

در این دو گونه ارتباط مستقیم دارد. در نتیجه این ژن‌ها را به عنوان ژن‌های نشانگر تولید آفلاتوکسین مطرح نمودند (۲۳).

با توجه به موارد ذکر شده، در مطالعه حاضر دو ژن *aflQ* و *aflO*، به‌عنوان یک الگو از خوشه ژنی آفلاتوکسین انتخاب گردید و حضور آن‌ها در نمونه‌های *آسپرژیلوس* جدا شده از خوراک دام بررسی شد. علاوه‌براین با استفاده از آزمون Real time -PCR و HPLC، ارتباط بین بیان ژن‌های فوق با میزان آفلاتوکسین B1 تولید شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

ژن مربوط به نواحی فاصله انداز رونویسی شونده داخلی (ITS) به‌عنوان اولین ژن در تعیین هویت *آسپرژیلوس*‌ها محسوب می‌شود که حضور آن در تمامی سویه‌های *آسپرژیلوس* تایید شده است و به همین دلیل به‌عنوان یک هدف موثر برای تجزیه و تحلیل فیلوژنیک در قارچ‌ها محسوب می‌شود (۲۴و۲۵). با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، تمامی نمونه‌های *آسپرژیلوس* مورد بررسی در این مطالعه دارای ژن ITS بودند که کاملا در تطابق با سایر مطالعات مشابه بوده است.

به منظور تعیین وجود ژن *aflQ* از تعداد ٦٧ نمونه تعداد ٤٧ جدایه مثبت گزارش شد که بیانگر حضور غالب این ژن در بیش از ٧٠/١٤ درصد از جدایه‌ها بود. هم‌چنین به‌منظور تعیین وجود ژن‌های *aflO*، یک قطعه کوچک از این ژن تکثیر گردید و از ٦٧ نمونه، تعداد ٦١ نمونه مثبت گزارش شد که بیانگر فراوانی ٩١/٠٤ درصدی این ژن در نمونه‌ها بود، در نتیجه این ژن می‌تواند کاندید بسیار خوبی برای مطالعات بیشتر در بررسی سویه‌های *آسپرژیلوس* باشد.

نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن‌های مورد بررسی نشان داد که قابلیت تولید مقادیر بالای آفلاتوکسین B1 با میزان بیان ژن‌های *aflO* و *aflQ*، مطابقت نسبی دارد. در اغلب نمونه‌هایی که میزان زیادی از آفلاتوکسین B1 را تولید کرده بودند، میزان بیان ژن‌های مورد بررسی نیز افزایش چشم‌گیری داشتند که این مورد را می‌توان به وضوح در نمونه‌های استاندارد *آسپرژیلوس فلاووس* و پارازیتیکوس مورد بررسی مشاهده نمود. در مواردی که میزان آفلاتوکسین ایجاد شده کمتر بود، ارتباط مستقیمی بین بیان ژن‌های فوق و تولید آفلاتوکسین B1 وجود نداشت و هرچه بیان ژن‌های فوق افزایش داشته، لزوما به معنای افزایش تولید آفلاتوکسین B1 نبوده است و حتی در برخی از نمونه‌های جدا شده، میزان بیان کم ژن‌های فوق با افزایش تولید آفلاتوکسین همراه بوده است.

در این مطالعه اگرچه امکان بررسی تمام نمونه‌ها از نظر توکسین‌زایی نبود اما از ٢٤ نمونه‌ای که مطالعه شد، تنها ٦ نمونه میزان توکسین بسیار زیادی داشتند که این می‌تواند بیانگر قدرت کم برخی از سویه‌های دارای ژن مولد آفلاتوکسین در تولید توکسین باشد. از جمله دلایلی که می‌توان برای این موارد ذکر کرد می‌توان به حذف یا موتاسیون احتمالی در ژن‌های مداخله گر در سنتز آفلاتوکسین و همچنین برخی شرایط فیزیولوژیک موثر بر سنتز آفلاتوکسین اشاره کرد (٢٦و٢٧).

نتیجه‌گیری

مطالعات مربوط به تعیین حساسیت RT-PCR در مورد هر دو ژن، به خوبی امکان شناسایی مقادیر بسیار جزئی از ژن‌های مولد توکسین را نشان دادند. در نتیجه می‌توان گفت که به طور کلی روش RT-PCR بسیار حساس بوده و می‌تواند در تشخیص وجود و بیان ژن‌های توکسین‌زا مفید باشد. در مجموع با توجه به آلودگی بالای قارچی در خوراک دام، با استفاده از روش معرفی شده در این مطالعه می‌توان ضمن شناسائی گونه‌های *آسپرژیلوس* مولد آفلاتوکسین، با ردیابی ژن‌های مولد آفلاتوکسین احتمال تولید مقادیر بسیار جزئی از آفلاتوکسین را در نمونه‌ها ردیابی کرد و در مراحل ابتدایی جلوی انتشار آلودگی را گرفت.

برای تکمیل نتایج این مطالعه، بررسی سایر ژن‌های مولد آفلاتوکسین نیز باید درنظر گرفته شود تا بتوان روش فوق را برمبنای مناسب ترین ژن‌های مولد آفلاتوکسین و ارتباط آن‌ها با میزان تولید آفلاتوکسین بهینه نمود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله تمامی نکات اخلاقی از جمله عدم سرقت

ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

از تمامی محققین و همکارانی شاغل در دانشگاه پیام نور و موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی که در انجام این تحقیق به ما یاری رساندند، تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Haque MA, Wang Y, Shen Z, Li X, Saleemi MK, He C. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. Microb Pathog. 2020; 142:104095. doi:10.1016/j.micpath.2020.104095
2. Liu M, Zhao L, Gong G, Zhang L, Shi L, Dai J, Han Y, Wu Y, Khalil MM, Sun L. Invited review: Remediation strategies for mycotoxin control in feed. J Anim Sci Biotechnol. 2022 ;13 (1):19. doi: 10.1186/s40104-021-00661-4.
3. Najafian M. Comparison the level of Aflatoxin in different varieties of internal and imported rice in different collection seasons and effect of cooking methods on the level of toxins. Journal of Microbial World, 2014; 6(4): 328-336. [In Persian]
4. Valencia-Quintana R, Milić M, Jakšić D, Šegvić Klarić M, Tenorio-Arvide MG, Pérez-Flores GA, Bonassi S, Sánchez-Alarcón J. Environment Changes, Aflatoxins, and Health Issues, a Review. Int J Environ Res Public Health. 2020; 17(21):7850. doi: 10.3390/ijerph17217850.
5. Sohrabi N, Taghizadeh M. Molecular identification of aflatoxigenic *Aspergillus* species in feedstuff samples. Curr Med Mycol. 2018; 4(2):1-6. doi: 10.18502/cmm.4.2.66.
6. Kim WB, Park C, Cho SY, Chun HS, Lee DG. Development of multiplex real-time PCR for rapid identification and quantitative analysis of *Aspergillus* species. PLoS One. 2020; 15 (3):e0229561. doi: 10.1371/journal.pone.0229561.
7. Degola F, Berni E, Dall'Asta C, Spotti E, Marchelli R, Ferrero I, Restivo FM. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. J Appl Microbiol. 2007; 103(2):409-17. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03256.x.
8. Mitema A, Okoth S, Rafudeen SM. The Development of a qPCR Assay to Measure *Aspergillus flavus* Biomass in Maize and the Use of a Biocontrol Strategy to Limit Aflatoxin Production. Toxins (Basel). 2019; 11(3):179. doi: 10.3390/toxins11030179.

9. Mohammadi M, Hashemi SJ, Rezaei S, Bayat M. Assessment of antifungal activity of Rosemary oil extract and its effect on AFL1 gene expression in *Aspergillus flavus* by Real-Time PCR. Journal of Microbial World, 2018; 11(1): 88-100. [In Persian]

10. Caceres I, Khoury AA, Khoury RE, Lorber S, Oswald IP, Khoury AE, Atoui A, Puel O, Bailly JD. Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. Toxins (Basel). 2020; 12 (3):150. doi: 10.3390/toxins12030150.

11. Wang W, Liang X, Li Y, Wang P, Keller NP. Genetic Regulation of Mycotoxin Biosynthesis. J Fungi (Basel). 2022; 9(1):21. doi: 10.3390/jof9010021.

12. Rahimi S, Sohrabi N, Ebrahimi MA, Tebyanian M, Taghyzadeh M, Rahimi SA. Studying the effect of aflatoxin genes Aflp and Aflq on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in the cattle feed used in industrial animal husbandries. Acta Med Mediter. 2016; 32:2091-2100.

13. Sarrafi O, Faezi Ghasemi M, Chaichi Nosrati A. Isolation and characterization of toxicogenic fungi strains from wheat and corn used in Kerman city. Journal of Microbial World, 2016; 8 (4): 330-336. [In Persian]

14. Tao L, Chung SH. Non-aflatoxigenicity of commercial *Aspergillus* oryzae strains due to genetic defects compared to aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. J Microbiol Biotechnol. 2014; 24 (8):1081-7. doi: 10.4014/jmb.1311.11011.

15. Institute of Standard and Industrial Research of Iran (ISIRI) Maximum Tolerated Limits of Mycotoxins in Foods and Feeds. National Standard No. 5925. Tehran: ISIRI; 2002.

16. Bintvihok A, Treebonmuang S, Srisakwattana K, Nuanchun W, Patthanachai K, Usawang S. A Rapid and Sensitive Detection of Aflatoxin-producing Fungus Using an Optimized Polymerase Chain Reaction (PCR). Toxicol Res. 2016; 32(1):81-7. doi: 10.5487/TR.2016.32.1.081.

17. Tang CM, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen J. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. Am Rev Respir Dis. 1993; 148(5):1313-7. doi: 10.1164/ajrccm/148.5.1313.

18. Geisen R. Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Potential Aflatoxin and Sterigmatocystin Producing Fungi. Syst Appl Microbiol. 1996; 19(3), 388-392. doi: 10.1016/ S0723-2020(96)80067-1

19. Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A, Salomon R. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. Appl Environ Microbiol. 1996 ;62(9):3270-3. doi: 10.1128/ aem.62.9.3270-3273.1996.

20. Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, Al-Mohsen I, Almodavar E, Gutierrez MI, Bhatia K. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of Candida and *Aspergillus*. J Med Microbiol. 2005; 54(Pt 3):243-248. doi: 10.1099/ jmm.0.45856-0.

21. Kim WB, Park C, Cho SY, Chun HS, Lee DG. Development of multiplex real-time PCR for rapid identification and quantitative analysis of *Aspergillus* species. PLoS One. 2020; 15 (3):e0229561. doi: 10.1371/journal.pone.0229561.

22. Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, Martín A, Córdoba JJ. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. Food Microbiol. 2012; 31 (1):89-99. doi: 10.1016/j.fm.2012.02.009.

23. Scherm B, Palomba M, Serra D, Marcello A, Migheli Q. Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus* parasiticus. Int J Food Microbiol. 2005; 98(2):201-10. doi: 10.1016/ j.ijfoodmicro.2004.06.004.

24. Douksouna Y, Masanga J, Nyerere A, Runo S, Ambang Z. Towards Managing and Controlling Aflatoxin Producers Within *Aspergillus* Species in Infested Rice Grains Collected from Local Markets in Kenya. Toxins (Basel). 2019; 11(9):544. doi: 10.3390/toxins11090544.

25. Zarrin M, Erfaninejad M. Molecular variation analysis of *Aspergillus flavus* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer rDNA region. Exp Ther Med. 2016; 12(3):1628-1632. doi: 10.3892/etm.2016.3479.

26. Abdel-Hadi A, Schmidt-Heydt M, Parra R, Geisen R, Magan N. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. J R Soc Interface. 2012; 9(69):757-67. doi: 10.1098/ rsif.2011.0482.

27. Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N, Geisen R. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. Int J Food Microbiol. 2009; 135(3):231-7. doi: 10.1016/ j.ijfoodmicro.2009.07.026.