بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۸ / شماره ۱ / سال ۱۴۰۱: ۱-۱۸ DOI: 10.22034/ijpp.2022.535268.367

CC BY

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* از مزارع بادام‌زمینی آستانه اشرفیه (استان گیلان) با تاکید بر تهیه نقشه خطر آلودگی آفلاتوکسین

رقیه زیارتی[۱]، حبیب‌اله حمزه زرقانی[۱*] و محمد مرادی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۰)

چکیده

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه بسیار سمی می‌باشند که توسط چند گونه مختلف قارچ *Aspergillus* از جمله *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus*در محصولات مختلف تولید می‌شوند. این زهرابه‌های قارچی خاصیت سرطان‌زایی دارند و تجارت جهانی بسیاری از محصولات کشاورزی را تحت تاثیر قرار می دهند. در این تحقیق فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای *A. flavus* و *A. parasiticus* از خاک و بادام‌زمینی در هفت روستای مهم تولید بادام‌زمینی در شهرستان آستانه اشرفیه مورد بررسی قرار گرفت. توانایی توکسین‌زایی جدایه‌ها، با استفاده از محیط کشت نارگیل-آگار و تغییر رنگ پرگنه‌ها در معرض بخار آمونیوم هیدروکسید بررسی شد. درمجموع ۴۸ جدایه از بخش *Flavi* شناسائی شد که شامل ۲۰ جدایه *A. flavus* و ۲۸ جدایه *A. parasiticus* بود. از بین ۴۸ جدایه‌ی مذکور ۹ جدایه غیرتوکسین‌زا و ۳۹ جدایه توکسین‌زا بودند. سایر گونه‌های آسپرژیلوس نیز شناسایی و گزارش شدند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، نقشه میانگین توکسین‌زایی هر روستا (نقشه خطر) ترسیم شد که بر این اساس، روستاهای لاکوژده، محسن‌آباد و نقره ده به ترتیب با میانگین توکسین‌زایی ۲/۵، ۲/۲۵ و ۲/۱ پرخطرترین و روستاهای پرکاپشت، نوبیجار محله و نبی دهکا با میانگین توکسین‌زایی ۱ کم‌خطرترین روستاهای کشت بادام‌زمینی آستانه اشرفیه محسوب می‌شوند. همچنین روستای دهسر با میانگین توکسین‌زایی ۱/۵ در میانه این تقسیم‌بندی قرار می‌گیرد. دورنمای این پژوهش مبتنی بر تشخیص جدایه‌های غیرتوکسین‌زای بومی آستانه اشرفیه به منظور استفاده در مهار زیستی با تکیه بر قدرت رقابتی آنها در کلونیزه کردن بادام زمینی و تهیه اطلس خطر برای کاهش خطر تولید آفلاتوکسین در بادام‌زمینی، این محصول پراهمیت استان گیلان می باشد که راه را برای افزایش تولید و صادرات این محصول هموارتر خواهد کرد.

کلیدواژه: مهار زیستی، مایکوتوکسین، ***Arachis hypogaea***، مسمومیت

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: habibzarghani@yahoo.com

۱. دانشجو کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۲. دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۳. دانشیار پژوهشی، پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران

DOI: 10.22034/ijpp.2022.535268.367

Research Article

Isolation and detection of toxigenic & atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* from peanut fields in Astaneh Ashrafieh (Guilan province) with emphasize on developing Aflatoxin Contamination Risk Map

R. Ziyarati[1], H. Hamzehzarghani[2*], and M. Moradi[3]

(Received: 10.09.2021; Accepted: 12.10.1022)

Abstract

Aflatoxins are highly toxic secondary metabolites produced by several species of Aspergillus including *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. These mycotoxins are potential carcinogens and affect the global trade of many agricultural products. In this study, the frequency of toxigenic and atoxigenic strains of *A. flavus* and *A. parasiticus* was investigated in soil and peanuts sampled across the fields located in seven important peanut production villages of Astaneh Ashrafieh county. Toxigenicity of the Aspergillus section Flavi isolates was evaluated using coconut agar (CA) medium and recording change in color of the colonies on CA medium in contact with ammonium hydroxide vapor. A total of 48 isolates of the Flavi section were identified, including 20 isolates of *A. flavus* and 28 isolates of *A. parasiticus*. Out of 48 isolates, nine were atoxigenic and 39 toxigenic. Other Aspergillus species were also identified and are reported. Risk maps were developed based on the results obtained on mean toxigenicity. Lakujdeh, Mohsenabad, and Noghredeh villages with average toxigenicity of 2.50, 2.25 and 2.10 had the highest risk scores for peanut cultivation respectively, while parkaposht, Nubijarmahale and Nabi dehka villages with mean toxigenicity of 1.00, had the lowest risk scores across Astane Ashrafieh county. Peanut fields located in Dehsar village were also classified with moderate risk scores in the middle of this risk scale with an average toxigenicity of 1.50. The outlook of this study was based on identification of atoxigenic isolates of Astaneh Ashrafieh with potential future application in biological control of toxigenic strains of section Flavi by relying on their competitive ability to colonize peanuts as well as developing risk maps to plan for reducing the risk of aflatoxin production on peanuts, an important product of Guilan province, that will pave the way for increased production and export of this product.

Keywords: Biocontrol, Mycotoxin, Arachis hypogaea, toxication

* Corresponding author's E-mail: habibzarghani@yahoo.com
1. M.Sc. Student, School of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.
2. Associate Prof. of Plant Phathol., School of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.
3. Associate Professor, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran

مقدمه

بادام‌زمینی با نام علمی *Arachis hypogaea* L. گیاهی روغنی و متعلق به تیره *Fabaceae* است که پس از سویا و پنبه‌دانه، سومین گیاه دانه‌روغنی یک‌ساله مهم دنیا محسوب می‌شود. بادام‌زمینی برای مصرف انسان، تولید روغن، استفاده در صنایع غذایی و تغذیه حیوانات کاربرد دارد (Lavkor *et al*. 2017., Torres *et al*. 2014). سطح کشت بادام‌زمینی در جهان ۲۸ میلیون هکتار است که سالانه ۴۳ میلیون تن بادام‌زمینی از این مزارع تولید می‌شود. قطب اصلی تولید بادام‌زمینی در کشور استان گیلان است که در بخش‌های مختلف آن شامل آستانه اشرفیه، لشت نشاء، بندرانزلی، تالش و صومعه‌سرا کشت می‌شود. کشت بادام‌زمینی در ایران در مساحتی در حدود سه هزار هکتار با میزان تولید حدود ۱۴ هزار تن صورت می‌پذیرد (Anonymous 2018) که به وضوح حاکی از نقش بسیار برجسته این شهرستان در تأمین بادام‌زمینی مصرفی در داخل کشور می‌باشد.

آفلاتوکسین‌ها یکی از خطرناک‌ترین زهرابه‌های قارچی برای انسان، دام و طیور هستند که در محصولات غذایی مختلف تولید می‌شوند (Asplin & Carnaghan 1961. Pitt & Hocking 2006) و غالباً توسط *Aspergillus flavus* Link و *A. parasiticus* Speare تولید می‌شوند (Goto *et al*. 1996, Palmgren & Hayes 1987).

تاکنون بیش از ۱۰ نوع ترکیبات آفلاتوکسینی گزارش‌شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها انواع B1، B2، G1، G2، M1 و M2 می‌باشند (Hatti et al. 2010). لازم به ذکر است که آفلاتوکسین‌های B1 و G1 در آلودگی‌های آفلاتوکسینی بیشتر از سایرین دیده می‌شوند و نوع B1 آن سمی‌ترین نوع برای جانوران است (Horn & Dorner 2009, Mishra & Das 2003).

مواد و روش‌های بررسی نمونه‌برداری

مزارع: نمونه‌برداری از مزارع هفت روستای کشت بادام‌زمینی شهرستان آستانه اشرفیه در زمان برداشت صورت گرفت. به جز روستای نقره ده و لاکوژده که به ترتیب چهار و دو مزرعه مورد مطالعه قرار گرفت در هر روستا از یک مزرعه نمونه‌برداری انجام شد. مزارع به‌صورت تصادفی با مساحت تقریبی یک هکتار و در روستاهایی که بیشتر از یک مزرعه مورد نمونه‌برداری قرار گرفت، حداقل فاصله مزارع از یکدیگر ۵۰۰ متر بود.

خاک: نمونه‌های خاک هر مزرعه، با استفاده از یک بیلچه سترون، از فواصل بین بوته‌های بادام‌زمینی، در نزدیکی محل غلاف‌بندی، از عمق پنج تا ده سانتی‌متر خاک در ده نقطه مزرعه به طور تصادفی جمع‌آوری شد (ده زیر نمونه). زیر نمونه‌های خاک هر مزرعه به‌خوبی با یکدیگر مخلوط و به‌صورت یک نمونه مرکب تقریبی ۵۰۰ گرمی در داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد. پس از آن نمونه‌ها بر روی کیسه‌های پلاستیکی به مدت یک تا دو روز بدون قرارگیری در معرض پرتو مستقیم خورشید در ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس خشک و پس از آن با خرد کردن کلوخه‌ها و عبور از الک با منافذ دو میلی‌متر در داخل پاکت‌های کاغذی در چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

محصول: نمونه‌برداری از پیله‌ها، هم‌زمان با نمونه‌برداری از خاک، در فاصله اندکی پیش از برداشت محصول به‌صورت تصادفی از ۱۱ مزرعه بادام‌زمینی انجام شد. رقم بادام‌زمینی تمامی مزارع از نوع NC_2 (رقم محلی گیل بادام) بود. برای انجام این کار، زمین به ۱۰ قسمت

فرضی با حداقل فاصله ۱۰ متر از یکدیگر تقسیم و از هر بخش ۲۵ پیله بادام‌زمینی جمع‌آوری شد. این ده زیر نمونه با یکدیگر به‌خوبی ترکیب تا یک نمونه واحد شامل ۲۵۰ پیله از هر مزرعه فراهم شود. برداشت پیله‌های بادام‌زمینی توسط دست انجام شد. پیله‌های صدمه‌دیده حذف و سایر پیله‌ها درون کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند. پیله‌های بادام‌زمینی پس از پنج تا هفت روز هوادهی بدون قرارگیری در معرض پرتو مستقیم خورشید، در ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس خشک و درون پاکت‌های کاغذی به چهار درجه سلسیوس منتقل شد.

جداسازی

خاک: به منظور جداسازی *Aspergillus* spp.، از روش سری رقت و محیط کشت‌های عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار و عصاره سیب‌زمینی-دکسروز-آگار همراه با اسید لاکتیک استفاده شد (Cotty *et al.* 1994, Horn *et al.* 1998). یک گرم از هر نمونه‌ی ۵۰۰ گرمی خاک الک شده توزین و در یک فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر سترون بر روی دستگاه لرزاننده[1] با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد. پس از تهیه سری‌های رقت، مقدار یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل روی محیط‌های کشت اضافه و پس از پخش کردن، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت ۳ تا ٤ روز نگهداری شد (Bhattacharjee & Baruah 2015, Fani *et al.* 2014). پرگنه‌های مشکوک به جنس *Aspergillus* بر اساس شکل ظاهری و ویژگی‌های میکروسکوپی مورد شناسایی قرار گرفتند. پس از آن هرکدام از جدایه‌ها به محیط کشت آب-آگار[2] منتقل و از روش نوک ریسه برای خالص سازی آن‌ها استفاده گردید.

محصول: به منظور جداسازی گونه‌های آسپرژیلوس از محصول، ابتدا ۲۰ پیله بادام‌زمینی به‌صورت تصادفی از هرکدام از مزارع انتخاب و پوست پیله‌ها با استفاده از دست جداسازی شدند. پس از آن بادام‌زمینی‌ها توسط هاون سترون کوبیده شد تا کاملاً به‌صورت پودر درآمده و در چهار نقطه در اطراف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی آگار و عصاره سیب‌زمینی آگار همراه با اسید لاکتیک کشت داده شد و به مدت ٤-۳ روز در ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از آن مطابق با روشی که برای خاک ارائه گردید، پرگنه‌های مشکوک به جنس *Aspergillus* شناسایی و خالص سازی شدند.

شناسایی ریخت‌شناسی گونه‌های بخش *Flavi* : به منظور شناسایی گونه‌های جنس *Aspergillus*، قطعه‌ای از میسیلیوم هرکدام از جدایه های قارچی در تشتک‌های حاوی محیط کشت عصاره مالت آگار (مرک آلمان[3]) کشت داده شد و به مدت یک هفته در ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. از حاشیه‌ی پرگنه‌های این محیط کشت بلوک‌های میسیلیومی به ابعاد ۱/۵×۱/۵ سانتی‌متر روی محیط‌های چاپک و عصاره مخمر آگار (عصاره مخمر ۵ گرم، K_2HPO_4 ۱گرم، عصاره زاپک ۱۰ گرم، ساکارز ۳۰ گرم، آگار ۱۵ گرم، آب مقطر ۱ لیتر) در ۳۷ و ۲۵ درجه سلسیوس و محیط کشت چاپک عصاره مخمر سوکروز ۲۰ درصد[4] (عصاره مخمر ۵ گرم، K_2HPO_4 ۱گرم ، عصاره زاپک ۱۰ گرم ، ساکارز ۲۰۰ گرم، آگار ۱۵ گرم، آب مقطر ۱ لیتر) در ۲۵ درجه سلسیوس کشت گردید (Klich & Pitt

[1] Shaker

[2] Water Agar (WA)

[3] Merck, Germany

[4] Czapek Yeast Agar With 20% sucrose (CYA20S)

1988*a*). از نمونه‌ها با استفاده از اسید لاکتیک بر روی لام شیشه‌ای اسلاید تهیه و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ و ٤۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. صفات میکروسکوپی و ماکروسکوپی مانند رنگ سطح و پشت پرگنه‌ها، قطر پرگنه‌ها در دماها و محیط‌های مختلف، اندازه فیالیدها، متولا، کنیدیوم‌ها، وزیکول‌ها وسایر ویژگی با استفاده از کلیدهای شناسایی *کلیچ و پیت* (۱۹۸۸) و *پیت و هوکینگ* مورد انطباق قرار گرفت (Klich & Pitt 1988*a*. Pitt & Hocking 2009).

تولید سختینه در جدایه‌ها: به منظور تعیین توانایی تولید سختینه توسط جدایه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* به‌دست‌آمده از مزارع بادام‌زمینی و تقسیم‌بندی‌ها به L (سختینه‌هایی با قطر بیشتر از ٤۰۰ میکرومتر) یا S (سختینه‌هایی با قطر کمتر از ٤۰۰ میکرومتر) از روش *فرجود* (Farjood 2008) استفاده شد. جدایه‌ها بر روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی آگار کشت داده و به مدت یک ماه در ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند و توانایی تولید سختینه و همچنین اندازه‌ی آن‌ها مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفت (Farjood 2008).

بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین با استفاده از بخار هیدروکسید آمونیوم : توانایی تولید آفلاتوکسین طبق روش سایتو و *ماچیدا* (Saito & Machida 1999) و *فنته و همکاران* (Fente *et al.* 2001) انجام پذیرفت. ابتدا جدایه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* در تشتک‌های حاوی محیط کشت نارگیل-آگار کشت و به مدت پنج روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. محیط کشت نارگیل-آگار (۲۰۰ گرم پودر نارگیل و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) به دست می آید. برای مشاهده تغییر رنگ پرگنه قارچ، تشتک‌های پتری را وارونه کرده و پس از آن یک قطره (۰/۵ میلی‌لیتر) از محلول غلیظ هیدروکسید آمونیوم (۲۷ درصد) روی سطح داخلی درب چکانده شد. پس از گذشت ۲ تا ۳۰ دقیقه، سطح پشتی پرگنه در سویه‌های مولد آفلاتوکسین از زردی به قرمز تیره، قرمز هلویی، یا صورتی تغییر رنگ داد. شدت تغییر رنگ و تمایل به قرمزی بیشتر نشان‌دهنده‌ی توانایی توکسین‌زایی شدیدتر است. جدایه‌ها بر اساس میزان شدت رنگ تولید شده و مقایسه با جدایه‌های ارسالی از پژوهشکده‌ی پسته در طیفی از بدون تغییر رنگ (عدم توانایی تولید آفلاتوکسین) تا رنگ قرمز بسیار تیره (بسیار توکسین‌زا) به ۷ گروه تقسیم بندی شدند (Saito and Machida 1999).

تهیه اطلس خطر مناطق کشت بادام زمینی در شهرستان آستانه اشرفیه: به منظور درک بهتر نواحی پرخطر کشت بادام‌زمینی، وضعیت روستاهای بادام‌زمینی کاری شهرستان آستانه اشرفیه از نظر فراوانی گونه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* توکسین‌زا و غیر توکسین‌زا و توانایی تولید آفلاتوکسین در این مناطق با تهیه نقشه های خطر بررسی گردید. بر مدلی که برای تعیین خطر در هر مزرعه استفاده گردید، خطر (R) بصورت تابعی از ٤ متغیر زیر در نظر گرفته شد

۱- فراوانی جدایه های بخش Flavi، (FIF)

۲- فراوانی جدایه های توکسین زا، (TIF)

۳- میانگین توکسین زایی (MT)

٤- فراوانی جدایه های غیرتوکسین زا (AIF)

$$R = f\{FIF \uparrow, TIF \uparrow, MT \uparrow, AIF \downarrow\}$$

متغیرهای ٤ گانه فوق از سالی به سال دیگر و از مکانی به مکان دیگر تغییر می کنند. میزان خطر با متغیرهای ۱ تا ۳ رابطه مستقیم دارد، یعنی هر چه تعداد جدایه های بخش Flavi بیشتر باشد خطر بیشتر است. به همین ترتیب هر

چه تعداد جدایه‌های توکسین زا و میانگین توکسین زائی این جدایه‌ها بیشتر باشد خطر بیشتر است. میزان خطر با متغیر ٤ رابطه معکوس دارد یعنی اگر تعداد جدایه‌های غیرتوکسین‌زا بیشتر باشد به دلیل رقابت با جدایه‌های توکسین‌زا در تصرف آشیانه یا پردازه‌های سطح بادام زمینی، احتمال آلودگی به جدایه‌های توکسین‌زا و بالتبع خطر آلودگی به آفلاتوکسین کمتر می‌شود.

مختصات هفت روستای موردمطالعه را با استفاده از گوگل مپ به دست آورده و پس از وارد نمودن مختصات نقاط در نرم‌افزار ArcGIS با استفاده از روش میان‌یابی وزن فاصله معکوس اقدام به‌رسم چهار اطلس خطر به شرح مجموع تعداد جدایه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* در هر روستا، اطلس فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا، اطلس فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا و اطلس میانگین توکسین‌زایی هر روستا شد.

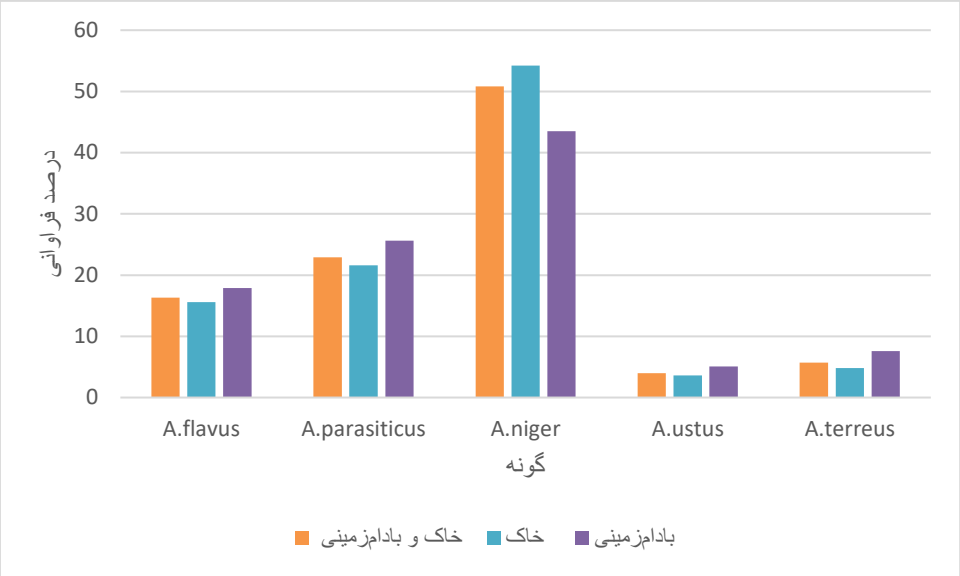
نتایج

این مطالعه در هفت روستای متعلق به شهرستان آستانه اشرفیه استان گیلان، به منظور جداسازی و شناسایی گونه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* و تعیین فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا و توکسین‌زا این دو گونه انجام پذیرفت. در مجموع تعداد ۱۱ نمونه بادام‌زمینی (مجموعاً ٤٤٠ دانه بادام‌زمینی) و ۱۱ نمونه خاک از هفت روستای مورد مطالعه جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. از نمونه‌های خاک و بادام‌زمینی در دوره قبل از برداشت، مجموعاً ۱۲۲ جدایه *Aspergillus* به دست آمد که ٤٨ جدایه متعلق به بخش *Flavi*، ٦٢ جدایه متعلق به بخش *Nigri* (*Aspergillus niger* .)، هفت جدایه متعلق به بخش *Terrei* (*Aspergillus terreus*) و پنج جدایه متعلق به بخش *Usti* (*Aspergillus ustus*) بودند. گونه‌ی غالب جمعیت بخش *Flavi*، *A. parasiticus* (۲۸ جدایه،۵۸/۳ درصد) و پس از آن گونه *A. flavus* (۲۰ جدایه،٤١/٦ درصد) بودند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میزان جداسازی قارچ‌های آسپرژیلوس از محیط کشت عصاره سیب‌زمینی همراه با اسید لاکتیک بیشتر از محیط کشت عصاره سیب‌زمینی بود. به این ترتیب از مجموع ۱۲۲ جدایه متعلق به جنس *Aspergillus*، ٤٢/٦ درصد از جدایه‌ها از محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی آگار و ۵۷/۳ درصد از جدایه‌ها از محیط کشت عصاره سیب‌زمینی آگار به همراه اسید لاکتیک جداسازی شده‌اند.

از ۱۲۲ جدایه به دست آمده، ۸۳ جدایه ازخاک و ۳۹ جدایه از بادام زمینی جداسازی شد. بیشترین آلودگی در خاک متعلق به بخش *Nigri* با ٤٥ جدایه (٥٤/٢ درصد) و پس از آن ۳۱ جدایه متعلق به اعضای بخش *Flavi* بود که ۱۸ جدایه از گونه *A. parasiticus* (۵۸ درصد) و ۱۳ جدایه از گونه *A. flavus* (٤٢ درصد) از خاک تشخیص داده شد (شکل ۱).

همینطور از ۳۹ جدایه *Aspergillus* spp. که از بادام‌زمینی جداسازی گردید، ۱۷ جدایه متعلق به بخش *Nigri* (٤٣/٥ درصد) و ۱۷ جدایه از بخش *Flavi* بود که ۱۰ جدایه متعلق به گونه *A. parasiticus* (۵۸/۸ درصد) و ۷ جدایه (٤١/١ درصد) متعلق به *A. flavus* بود (شکل ۱).

توصیف و ریخت‌شناسی گونه‌های بخش *Flavi*: به منظور توصیف گونه‌های جداسازی شده از خاک و بادام‌زمینی‌های مزارع آستانه اشرفیه، از صفات میکروسکوپی و ماکروسکوپی مطابق با کلیدهای شناسایی *کلیچ و پیت* (۱۹۸۸) و *پیت و هوکینگ* (۲۰۰۹) استفاده شد (Klich& Pitt, 1988*a* ;Pitt & Hocking, 2009). که بر اساس آن مشخص شد، ۱۲۲ جدایه به‌دست‌آمده، متعلق به پنج گونه از اعضای جنس *Aspergillus* می‌باشند.



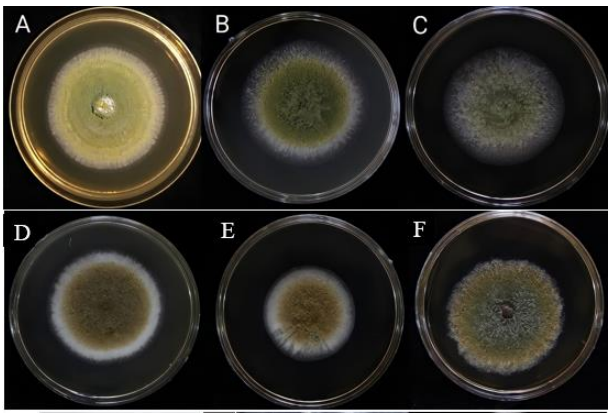
شکل ۱. فراوانی گونه‌های Aspergillus جداشده از خاک و بادام‌زمینی از مزارع آستانه اشرفیه سال ۱۳۹۷.

Fig 1. Frequency of the species of Aspergillus isolated from soil and peanuts from Astaneh Ashrafieh peanut fields in 2019.

مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus flavus*: پرگنه‌های اعضای این گونه رشد سریعی در ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس داشتند و بر روی محیط کشت‌های عصاره مالت آگار و چاپک عصاره مخمر آگار، کنیدیوم‌هایی به رنگ زرد-سبز تولید می‌نمودند. توده کنیدیوم‌ها به‌صورت معمول شعاعی دیده شد. متولا و فیالیدها بر روی وزیکول‌های کروی شکل واقع‌شده بودند. کنیدیوم‌ها کروی تاکمی بیضی‌شکل، با دیواره‌ی صاف و نسبتاً نازک و در برخی جدایه‌ها دارای تزییناتی محدود بودند (شکل۲). گاه سختینه تولید کردند که به شکل کروی تا بیضی و سفیدرنگ بوده اما به‌سرعت سخت شده و به قهوه‌ای مایل به قرمز تا سیاه تغییر رنگ دادند. قطر سختینه‌ها معمولاً بین ۳۰۰ تا ۸۰۰ میکرومتر و حتی بیشتر دیده شدند که کمتر از ٤۰۰ میکرومتر را سویه S و بیشتر از ٤۰۰ میکرومتر را سویه L می‌نامند (شکل ٤).

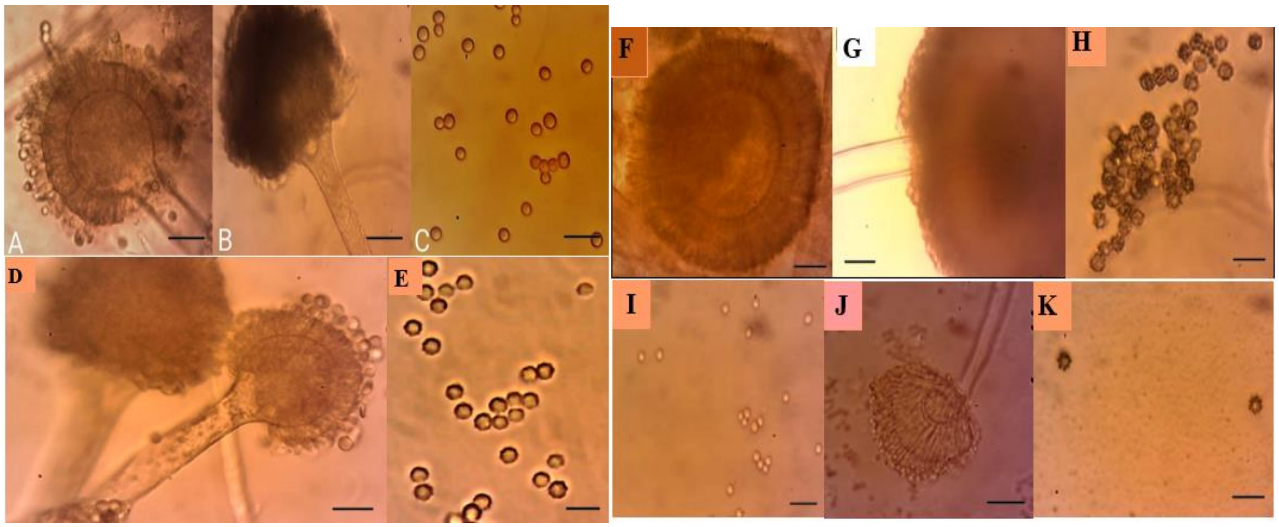
مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus parasiticus*: در جدایه‌های به‌دست‌آمده ازاین‌گونه بافت پرگنه‌ها به‌صورت مخملی با تراکم متوسط تا زیاد اغلب به رنگ زیتونی تیره تا سبز تیره دیده می‌شدند (شکل۲). در این گونه توده‌های کنیدیومی به‌صورت شعاعی مشاهده شدند. وزیکول‌های این‌گونه نسبتاً گرد تاکمی کشیده بودند. شکل کنیدیوم‌ها در این‌گونه به‌صورت گرد با دیواره‌های زبر بودند. در برخی از جدایه‌های این‌گونه سختینه تشکیل شد که رنگی بین سفید تا سیاه داشته و قطر آن‌ها به طور میانگین بین ۸۰۰-٤۰۰ میکرومتر متغیر بود (شکل۳).

تولید سختینه توسط جدایه های *A. flavus* و *A. parasiticus*: رنگ سختینه در جدایه‌های به دست آمده از گونه *A. flavus* از سیاه تا خاکستری و سفید متغیر بوده است (شکل ٤) درصد فراوانی جدایه‌های تولیدکننده‌ی سختینه در این گونه ۵۰ درصد مشاهده شد که درصد فراوانی سویه‌های تولیدکننده سختینه نوع L در *A. flavus* های به‌دست‌آمده ۹۰ درصد و فراوانی سویه‌های تولیدکننده‌ی سختینه نوع S، ۱۰ درصد بود. همچنین،



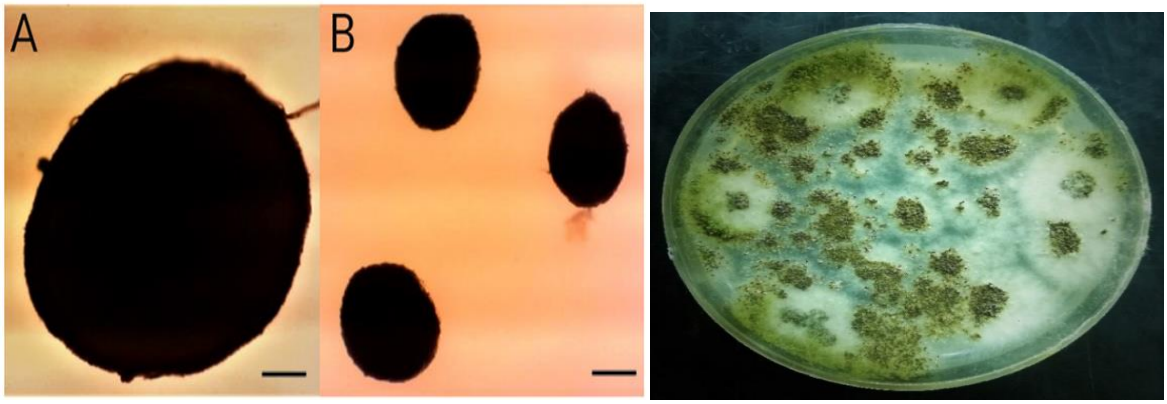
شکل ۲. ریخت‌شناسی جدایه های .Aspergillus spp بر روی محیط کشت چاپک عصاره مخمر آگار در ۲۵ درجه (تصاویر A، D، G، J، M) و ۳۷ درجه سلسیوس (تصاویر B ، E، H، K، N)، محیط کشت عصاره مالت آگار در ۲۵ درجه سلسیوس (تصاویر C، F، I، L، O). شکل های A تا C Aspergillus flavus جدایه‌ی NO.3.S.F.6، D تا E Aspergillus parasiticus جدایه‌ی LA.1.S.P.13، G تا I Aspergillus niger جدایه‌ی NO.1.S.N.1، J تا L Aspergillus terreus جدایه‌ی MA.1.P.T.1 و M تا O Aspergillus ustus جدایه‌ی NO.1.S.U.1 می باشند.

Fig 2. Morphology of isolates of Aspergillus spp. isolates on Czapek yeast extract agar at 25 ° C (images A, D, G, J, M) and at 37 ° C (images B, E, H, N, K), Malt extract agar at 25 ° C (images O, F, I, L, O). Figures A to C Aspergillus flavus isolate NO.3.S.F.6, D to E Aspergillus parasiticus isolate LA.1.S.P.13, G to I Aspergillus niger isolate NO.1.S.N.1, J to L Aspergillus terreus isolate MA.1.P.T.1 and M to O Aspergillus ustus isolate NO.1.S.U.1.



شکل ۳. ریخت‌شناسی گونه *Aspergillus flavus* جدایه‌ی NO.3.S.F.6: A: استریگما دو ردیفه (فیالید و متولا)؛ B: ساقه با دیواری زبر؛ C: کنیدیوم‌های گرد با دیواره‌ی صاف و نازک. ریخت‌شناسی گونه *Aspergillus parasiticus* جدایه‌ی LA.1.S.P.13: D: استریگما یک ردیفه؛ E:کنیدیوم‌های گرد با دیواره‌ی زبر و دارای تزیین. ریخت‌شناسی گونه *Aspergillus niger* جدایه‌ی NO.1.S.N.1: F: استریگما دو ردیفه (فیالید و متولا)؛ G: ساقه با دیواری صاف؛ H: کنیدیوم‌های گرد با دیواره‌ی زبر. ریخت‌شناسی گونه *Aspergillus terreus* جدایه‌ی MA.1.P.T.1: I: استریگما دو ردیفه همراه با متولا و فیالید نازک؛ J:کنیدیوم های گرد کوچک با دیواره‌ی صاف. ریخت‌شناسی گونه *Aspergillus ustus* جدایه‌ی NO.1.S.U.1: K: کنیدیوم‌های گرد با دیواره‌ی بسیار زبر. خط مقیاس ـ ۱۰ میکرومتر.

Fig 3. Morphology of Aspergillus flavus isolate No.3.S.F.6: A: Two-row strigma (phialide and Metula); B: Stem with rough wall; C: Round conidia with smooth and thin walls. Morphology of Aspergillus parasiticus species isolate No LA.1.S.P.13: D: Single-row strigma; E: Round conidia with rough and decorated walls. Morphology of Aspergillus niger species isolation No.1.S.N.1: F: Two-row strigma (phialide and Metula); G: Stem with smooth wall; H: Round conidia with rough walls. Morphology of Aspergillus terreus species isolate No MA.1.P.T.1: I: Two-row strigma with metola and thin phialide; J: Small round conidia with a smooth wall. Morphology of Aspergillus ustus species isolate No1.S.U.1 K: Round conidia with very rough walls Scale line _ 10 µm.



شکل ٤. تولید سختینه توسط جدایه‌های Aspergillus flavus: A: جدایه‌ی DS.1.P.F.8 با تولید سختینه بزرگ به قطر ۷۹۵ میکرومتر (سویه L)؛ B: جدایه‌ی NO.3.S.F.6 با تولید سختینه کوچک به قطر ۳٤٦ میکرومتر (سویهS)؛ C : تولید سختینه توسط گونه Aspergillus flavus جدایه‌ی DS.1.P.F.8 پس از گذشت یک ماه در ۲۵ درجه سلسیوس بر روی محیط کشت سیب‌زمینی آگار. خط مقیاس ـ ۱۰ میکرومتر

Fig 4. Sclerotia production by Aspergillus flavus isolates: A: isolate NO. DS.1.P.F.8 with large Sclerotia production diameter of 795 micrometers (L strain); B: isolate NO.3.S.F.6 with small Sclerotia production diameter of 346 micrometers (S strain); C:Sclerotia production by Aspergillus flavus isolate # DS.1.P.F.8 after one month at 25 ° C on potato agar medium, Scale = 10 µm.

شکل ۵. ریخت‌شناسی پرگنه قارچ Aspergillus flavus برروی محیط کشت نارگیل-آگار پس از گذشت پنج روز.

Fig 5. Morphology of Aspergillus flavus on coconut-agar medium after five days.

درصد فراوانی *A. parasiticus* تولیدکننده‌ی سختینه ٤۲/۸۵ درصد ارزیابی شد. در بررسی‌های به‌دست‌آمده برخی از جدایه‌ها فاقد توانایی تولید سختینه بوده‌اند.

آزمون تعیین توکسین‌زایی به روش قرار دادن جدایه‌ها در معرض بخار آمونیوم هیدروکسید: براساس شدت رنگ ایجاد شده در پشت پرگنه‌های رشد کرده برروی محیط کشت نارگیل آگار (شکل ۵) و پس از در معرض قرار گرفتن با بخار آمونیوم هیدروکسید، ۷ دامنه‌ی رنگی بر اساس شدت رنگ برای دسته‌بندی میزان توکسین‌زایی قارچ‌های گونه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* تعیین‌شده است که در شکل ٦ آورده شده است. هر چه شدت طیف رنگی به سمت قرمز پیش می‌رود توانایی تولید آفلاتوکسین قارچ نیز افزایش می‌یابد.

در بخش *Flavi* فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا ۱۸/۷۵ درصد و جدایه‌های توکسین‌زا ۸۲/۲۵ درصد بودند. فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا *A. flavus* و *A. parasiticus* در آستانه اشرفیه به ترتیب برابر با ۱۵ و ۱٤/۲ درصد بود.

فراوانی جدایه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus*

شکل ٦. ارزیابی توانایی توکسین‌زایی جدایه‌های Aspergillus بر اساس شدت رنگ کلونی، پس از قرار گرفتن در معرض بخار آمونیوم هیدروکسید. از A به G با افزایش شدت رنگ، توانایی توکسین زایی جدایه‌ها افزایش می یابد. A غیر توکسین‌زا و G بیشترین توانایی توکسین‌زایی را دارد (Saito and Machida 1999).

Fig 6. Assessing the color intensity of Aspergillus isolates colony after exposing with ammonium hydroxide vapor. From A to G, the separation of toxins increases with increasing color intensity. A is the most non-toxic and G is the most important toxin (Saito and Machida 1999)

توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا، میانگین توکسین‌زایی هر روستا و اطلاعات مربوط به آن در جدول ۱ و شکل‌های ۷، ۸، ۹ و ۱۰ نشان داده شده است. بیشترین میزان جمعیت قارچ‌های *Aspergillus* section *Flavi* متعلق به روستای نقره ده بود. از مجموع ٤٨ جدایه از مزارع بادام‌زمینی آستانه اشرفیه، ٥٦/٢٥ درصد از جدایه‌ها از خاک و بادام‌زمینی این روستا جداسازی شد.

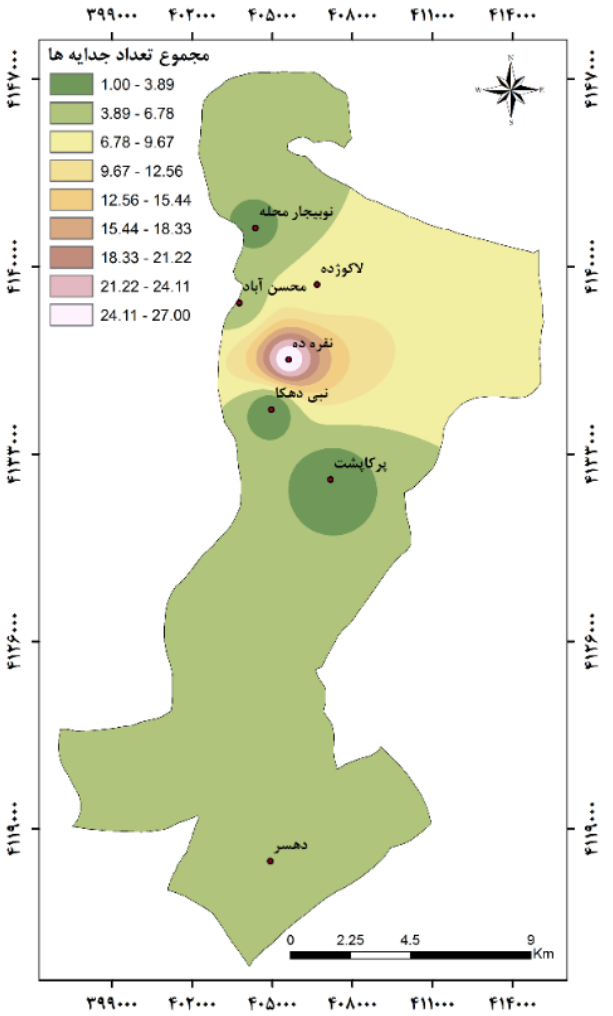
فراوانی جدایه‌های غیر توکسین‌زا در روستاهای پرکاپشت، نوبیجار محله و نقره ده به ترتیب برابر با ۵۰، ۳۳/۳۳، ۲۵/۹۲ درصد و جدایه های توکسین‌زا به ترتیب برابر با ۵۰، ٦٦/٦٦ و ٧٤/٠٧ درصد بودند. لازم به ذکر است که تمامی جدایه‌های به دست آمده از روستاهای نبی دهکا، محسن آباد، دهسر و لاکوژده توکسین‌زا بودند.

بر این اساس از ۷ طیف رنگی در نظر گرفته شده رنگ A برای جدایه های غیر توکسین‌زا با نمره‌ی توکسین‌زایی صفر در نظر گرفته شد و شش واحد نمره دهی برای جدایه‌های توکسین‌زای طیف B تا G انتخاب شد. بر طبق این روش، جدایه‌ای که بر اساس روش آزمون

جدول۱. تعداد جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای *A. flavus* و *A. parasiticus*، درصد فراوانی آن‌ها در هر روستا، امتیاز جدایه های توکسین‌زای هر مزرعه بادام زمینی و میانگین توکسین‌زایی هر روستا در شهرستان آستانه اشرفیه.

Table 1. Numbers of toxigenic and atoxigenic isolates of *A. flavus* and *A. parasiticus*, their percentage across villages, Toxigenicity score of each peanut field and Mean toxigenicity of each village in Astane Ashrafieh county.

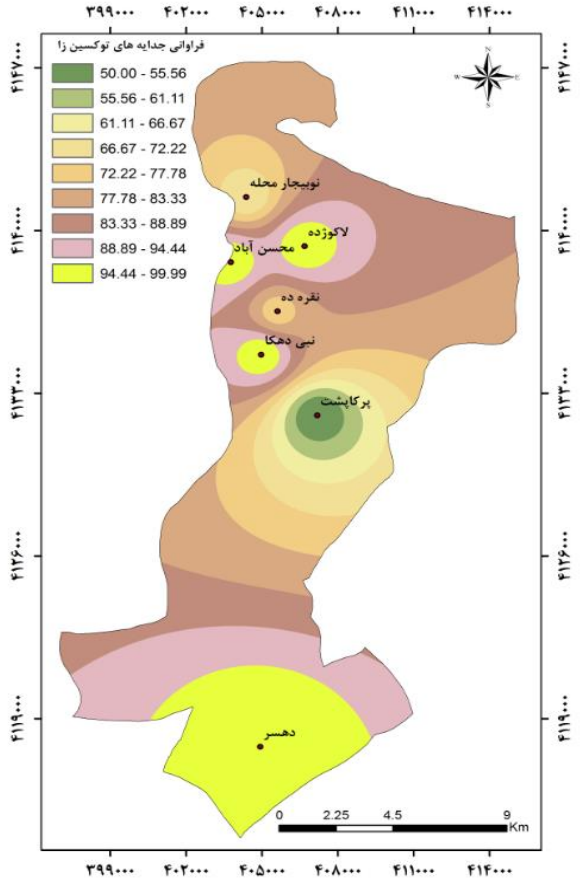
village		Counts of atoxigenic isolates	Percentage of atoxigenic isolates	counts of toxigenic isolates	Percentage of toxigenic isolates	Toxigenicity score of isolates	Mean toxigenicity
Noghrehdeh	Field1	3	25/92	5	74/07	1-3-1-1-2	2/1
Noghrehdeh	Field2	2		3		1-2-2	2/2
Noghrehdeh	Field3	1		7		3-2-2-3-1-4-5	
Noghrehdeh	Field4	1		5		2-2-1-1-3	
Parkapasht	Field1	1	50	1	50	1	1
Lakozhdeh	Field1	0	0	3	100	1-2-4	2/5
Lakozhdeh	Field2	0		4		1-3-2-5	
Nobijar Mahalle	Field1	1	33/33	2	66/66	1-1	1 2/57
Mohsenabad	Field1	0	0	4	100	1-2-3-3	2/25
Dehsar	Field1	0	0	4	100	1-1-1-3	1/50
Nabi Dehka	Field1	0	0	1	100	1	1



شکل ۷. نقشه فراوانی جدایه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* به‌دست‌آمده از مزارع بادام‌زمینی روستاهای نقره ده، پرکاپشت، دهسر، نبی دهکا، نوبیجار محله، محسن آباد و لاکوژده شهرستان آستانه اشرفیه.

Fig 7. Isolate frequency map of *A. flavus* and *A. parasiticus* isolates obtained from peanut fields in Noghrehdeh, Parkapasht, Dehsar, Nabi Dehka, Nobijar Mahalle, Mohsenabad and Lakozhdeh villages of Astane-Ashrafieh city.

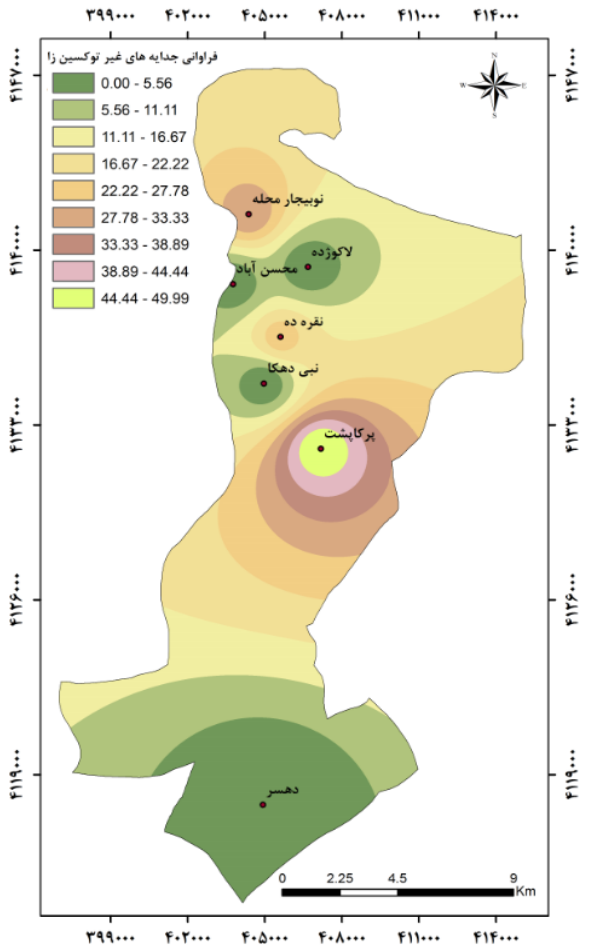
توکسین‌زایی بر روی محیط کشت نارگیل-آگار و قرارگیری پرگنه در معرض بخار آمونیوم هیدروکسید در طیف رنگی B قرار می‌گیرد دارای یک واحد قدرت توکسین‌زایی بوده و جدایه‌ای که در طیف رنگی C قرارگرفته معادل دو واحد قدرت توکسین‌زایی دارد و به



شکل ۸. نقشه فراوانی جدایه‌های توکسین‌زای *A. flavus* و *A. parasiticus* به‌دست‌آمده از مزارع بادام‌زمینی روستاهای نقره ده، پرکاپشت، دهسر، نبی دهکا، نوبیجار محله، محسن آباد و لاکوژده شهرستان آستانه اشرفیه.

Fig 8. Isolate frequency map of toxigenic isolates of *A. flavus* and *A. parasiticus* obtained from peanut fields in Noghrehdeh, Parkapasht, Dehsar, Nabi Dehka, Nobijar Mahalle, Mohsenabad and Lakozhdeh villages of Astane-Ashrafieh city.

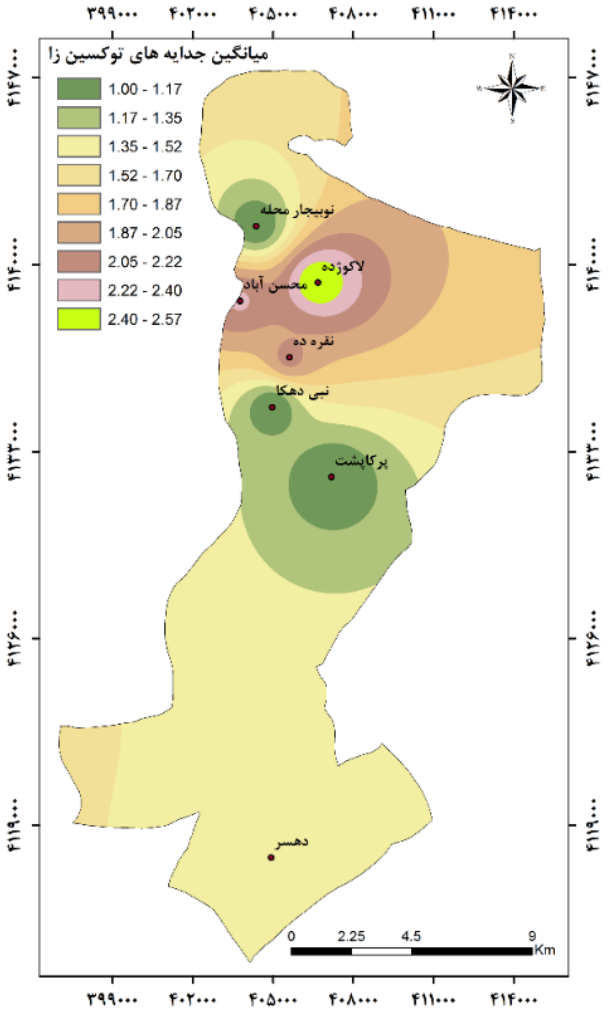
همین ترتیب تا انتها، جدایه‌ای که در طیف رنگی G قرار می‌گیرد معادل شش واحد قدرت توکسین‌زایی را شامل می‌شود. به همین منظور برای تهیه اطلس خطر تعداد واحدهای توکسین‌زایی جدایه‌های توکسین‌زا هر روستا با یکدیگر جمع و با به دست آوردن میانگین آن‌ها، میانگین توکسین‌زایی هر روستا و بالطبع آن میزان پرخطر یا کم‌خطر بودن هر روستا برای کشت بادام‌زمینی آشکار



شکل ۹: نقشه فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* و *A. parasiticus* به‌دست‌آمده از مزارع بادام‌زمینی روستاهای نقره ده، پرکاپشت، دهسر، نبی دهکا، نوبیجار محله، محسن آباد و لاکوژده شهرستان آستانه اشرفیه.

Fig 9. Isolate frequency map of non-toxigenic isolates of *A. flavus* and *A. parasiticus* obtained from peanut fields in Noghrehdeh, Parkapasht, Dehsar, Nabi Dehka, Nobijar Mahalle, Mohsenabad and Lakozhdeh villages of Astane-Ashrafieh city.

می‌شود. بر طبق این روش، روستای لاکوژده به دلیل توکسین‌زایی بالای جدایه‌های توکسین‌زای آن و با میانگین توکسین‌زایی ۲/۵ پرخطرترین منطقه کشت بادام‌زمینی در شهرستان آستانه اشرفیه محسوب می‌شود. پس از آن روستای محسن‌آباد با میانگین توکسین‌زایی ۲/۲۵ و



شکل ۱۰. نقشه خطر بر اساس میانگین توکسین‌زایی جدایه‌های توکسین‌زای *A. flavus* و *A. parasiticus* به‌دست‌آمده از مزارع بادام‌زمینی روستاهای نقره ده، پرکاپشت، دهسر، نبی دهکا، نوبیجار محله، محسن آباد و لاکوژده شهرستان آستانه اشرفیه.

Fig 10. Risk map based on the average toxigenicity of *A. flavus* and *A. parasiticus* toxigenic isolates obtained from peanut fields in Noghrehdeh, Parkapasht, Dehsar, Nabi Dehka, Nobijar Mahalle, Mohsenabad and Lakozhdeh villages of Astane-Ashrafieh city.

روستای نقره ده با میانگین توکسین‌زایی ۲/۱ به ترتیب پرخطرترین روستاهای شهرستان آستانه اشرفیه به شمار می‌روند. همچنین روستای دهسر با میانگین توکسین‌زایی ۱/۵ و روستاهای نوبیجار محله، پرکاپشت و همچنین نبی دهکا با میانگین توکسین‌زایی یک، جزو کم‌خطرترین

روستاهای این شهرستان برای کشت بادام‌زمینی به‌حساب می‌آیند. اطلاعات مربوط به درصد فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا، تعداد جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا ، امتیازدهی به جدایه‌های توکسین‌زا به‌دست‌آمده از هر روستا و میانگین توکسین‌زایی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

بحث

در این پژوهش فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای *A. flavus* و *A. Parasiticus* بومی آستانه اشرفیه به منظور استفاده در مهار زیستی و تهیه اطلس خطر به منظور اطلاع از مناطق پرخطر و کم‌خطر کشت بادام‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مطالعه انجام‌شده از هفت روستای شاخص تولیدکننده بادام‌زمینی در شهرستان آستانه اشرفیه مجموعاً ۱۱ مزرعه مورد نمونه‌برداری خاک و بادام‌زمینی قرار گرفت. معیار انتخاب تعداد مزارع هر روستا، بر اساس اهمیت و میزان تولید بادام‌زمینی بود تا با این کار فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای بومی به‌دست‌آمده از شهرستان آستانه اشرفیه افزایش یابد و اطلس خطر موردنظر جامع‌تر باشد.

جدایه‌های متعلق به اعضای جنس *Aspergillus* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی با کلید شناسایی *کلیچ و* پیت (۱۹۸۸) و *پیت و هوکینگ* (۲۰۰۹) مورد تطابق قرار گرفت و نهایتاً در ۵ گونه از جنس دسته‌بندی شدند (Klich &Pitt 1988*a*. Pitt & Hocking 2009). در طی این مطالعه ۱۲۲ جدایه قارچ *Aspergillus* spp. جداسازی شد که ۲۸ جدایه از آن متعلق به گونه *A. parasiticus* و ۲۰ جدایه متعلق به گونه *A. flavus* بود.

در پژوهش انجام‌شده ٦٤/٥٨ درصد از جدایه‌های به‌دست‌آمده بخش *Flavi* از خاک به‌دست‌آمده است که با مطالعات *محمدی و همکاران* (۲۰۰۹) که ۷۰ درصد از جدایه‌های *A. flavus* را از خاک مزارع پسته جداسازی کرده بود تطابق داشت (Mohammadi *et al*. 2009). این موضوع تأکیدی است بر این که خاک منبع اصلی آلودگی *A. flavus* و *A. parasiticus* می‌باشد.

از تمامی مزارع نمونه‌برداری شده گونه‌هایی متعلق به بخش *Flavi* و بخش *Nigri* به دست آمد که با مطالعات *هوشیار فرد و همکاران* (۲۰۱۲) و *محمدی و همکاران* (Mohammadi *et al*. 2009) مطابقت داشت (Houshiyarfard *et al*. 2012. Mohammadi *et al*. 2009).

بر اساس نتایج به دست‌آمده از هفت روستا موردبررسی در شهرستان آستانه اشرفیه، ۵۰/۸ درصد از جدایه‌ها متعلق به بخش *Nigri* بودند که بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌های به دست‌آمده از جنس *Aspergillus* داشتند که با مطالعات *چهری و همکاران*(۲۰۱۵) مطابقت داشت (Chehri *et al*. 2015).

گونه *A. parasiticus* فراوان‌ترین گونه‌ی جداشده از اعضای بخش *Flavi* از خاک و مزارع بادام‌زمینی آستانه اشرفیه بود. این گونه ازجمله تولیدکنندگان آفلاتوکسین‌های نوع G_1 ، G_2، B_1 و B_2 در بادام‌زمینی و سایر محصولات کشاورزی نظیر ذرت و پنبه‌دانه می‌باشد (Abbas *et al*. 2006). در مطالعه *هوشیار فرد و همکاران* (Houshiyarfard *et al*. 2014) در خصوص فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا و توکسین‌زا در بادام کاری‌های روستا آستانه اشرفیه با استفاده از روش‌های مختلف، گونه‌ی *A. parasiticus* با فراوانی متفاوت از بیشتر نمونه‌های مورد بررسی شامل بادام‌زمینی و خاک جداسازی شد و بیشترین جمعیت مربوط به این گونه بود که با مطالعات ما نیز تطابق داشت (Houshiyarfard *et al*.

2014).

در مشاهدات انجام‌شده ٤٥ درصد از جدایه‌های گونه *A. flavus* که سختینه تولید کردند توکسین‌زا نیز بودند و در جدایه‌های به دست‌آمده از گونه *A. parasiticus* نیز ٣٢/١٤ درصد از جدایه‌های تولیدکننده‌ی سختینه توکسین‌زا نیز می‌باشند و به نظر می‌رسد بین تولید سختینه و تولید آفلاتوکسین ارتباط و همبستگی وجود دارد که از این نظر با مطالعات میرابوالفتحی و همکاران (Mirabolfathy *et al.* 2005) همخوانی دارد.

جدایه‌های *A. flavus* به دست‌آمده از مزارع بادام‌زمینی آستانه اشرفیه دارای سختینه‌هایی در اندازه‌های متفاوت بودند و تعداد جدایه‌هایی که تولید سختینه بزرگ (L) می‌کنند ٩٠ درصد بودند که از این نظر با مطالعات *هوشیار فرد و همکاران* (٢٠١٤) در مزارع آستانه اشرفیه (Houshiyarfard *et al.* 2014) مطابقت داشت.

استفاده از محیط کشت نارگیل-آگار در تعیین توکسین زایی جدایه‌ها برخلاف سایر محیط کشت‌ها، فراوانی واقعی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا را بیشتر از حد واقعی تخمین نمی‌زند، به دلیل زمینه‌ی سفید می‌تواند تغییر رنگ‌های جزئی ناشی از توکسین‌زایی را به‌خوبی نمایش دهد و به‌راحتی در بسیاری از آزمایشگاه‌ها با امکانات محدود و سرعت‌بالا جهت غربال‌گری تعداد زیاد جدایه قابل انجام می‌باشد. مزیت دیگر محیط نارگیل آگار نسبت به سایر محیط‌ها، طبیعی‌تر بودن بستر رشد قارچ برای توکسین‌زایی می‌باشد (Fani *et al.* 2014). بر اساس پژوهش *هانگ* (Huang 2007) هر چه محیط رشد قارچ به محیط طبیعی نزدیک‌تر باشد تولید توکسین نیز بیشتر خواهد شد زیرا این قارچ‌ها اغلب مواد غذایی خود را از عصاره‌های گیاهی یا جانوری کسب می‌نمایند. محیط کشت نارگیل-آگار جهت بررسی آفلاتوکسین به میزان زیادی به محیط‌های طبیعی نزدیک است و می‌توان نتایج حاصل از آن را قابل استناد به نتایج حاصل از اندازه‌گیری آفلاتوکسین به روش های آنالیز دستگاهی نزدیک دانست (Huang 2007). بااین‌حال تشخیص قطعی جدایه‌های غیر توکسین‌زا نیاز به استفاده از روش‌های واکاوی دستگاهی و مولکولی دارد (Fani *et al.* 2014).

بر اساس نتایج به دست‌آمده و وجود جدایه‌های توکسین‌زا با میانگین توکسین‌زایی بالا در برخی از روستاها لزوم تهیه نقشه‌هایی از مناطق نمونه‌برداری برای تعیین نقاط پرخطر و کم‌خطر کشت بادام‌زمینی در آستانه اشرفیه آشکار می‌شود. پرخطر یا کم‌خطر بودن یک منطقه تابعی است از سه عامل: فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا، میانگین توکسین‌زایی و فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا که میزان خطر در یک منطقه با دو عامل اول رابطه مستقیم و با عامل سوم رابطه عکس دارد که البته عوامل محیطی نیز گاه می‌توانند با تغییر فراوانی هرکدام از عوامل شرایط را به نفع هرکدام از جدایه‌ها تغییر دهند.

بیشترین تعداد جدایه‌های قارچ *A. flavus* و *A. parasiticus* جداسازی شده از خاک و بادام‌زمینی متعلق به روستا نقره ده می‌باشد. پس از آن روستا لاکوژده، دهسر و محسن‌آباد، نوبیجار محله، پرکاپشت و درنهایت نبی دهکا به ترتیب بیشترین تعداد جدایه‌های قارچ *A. flavus* و *A. parasiticus* را دارا بودند. بررسی اطلس‌های فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و اطلس فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا نشان‌دهنده این موضوع است که از ٧ روستای موردبررسی در شهرستان آستانه اشرفیه، ٤ روستا شامل لاکوژده، دهسر، محسن‌آباد و نبی دهکا فاقد جدایه‌های غیرتوکسین‌زا بوده و ١٠٠ درصد جدایه‌ها توکسین‌زا می‌باشند که علت این امر واضح نیست. البته یک مطالعه با اندازه نمونه برداری بزرگتر لازم است تا اطمینان بیشتری از

نتایج این پژوهش به دست آید. . سطح زیر کشت بالای این روستا و کشت مداوم، می‌تواند موجبات تکامل و تنوع بیشتر جدایه‌های این قارچ‌ها نسبت به سایر روستاها را در طول زمان طولانی فراهم کرده باشد.

درصد فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا از سه روستای پرکاپشت، نوبیجار محله و نقره ده به ترتیب۵۰، ۳۳/۳ و ۲۵/۹۲ درصد می‌باشند. در روستاهای نقره ده و نوبیجار محله حدوداً دو سوم از میزان جدایه‌ها متعلق به جدایه‌های غیرتوکسین‌زا بوده که به نظر می‌رسد در این روستاها جدایه‌های غیرتوکسین‌زا تا حدودی در رقابت با جدایه-های توکسین‌زا نقش دارند و در روستا پرکاپشت به نظر می‌رسد که جدایه‌های غیرتوکسین‌زا عملکرد قابل قبولی در کنترل جدایه‌های توکسین‌زا با فراوانی ۵۰ درصدی نشان می‌دهند.

نکته قابل‌توجه در مقایسه اطلس میانگین توکسین‌زایی با سایر اطلس‌ها در این است که روستای لاکوژده اگرچه بیشترین فراوانی مربوط به جدایه توکسین‌زا در میان سایر روستاها را دارا نیست اما بر اساس تابع خطر و طبق دو عامل فراوانی جدایه توکسین‌زا، میانگین توکسین‌زایی بالا و همین‌طور عدم حضور جدایه غیرتوکسین‌زا خطرناک‌ترین روستا درمجموع مناطق موردمطالعه محسوب می‌شود. پس از آن روستای محسن‌آباد نیز به دلیل عدم حضور جدایه‌ی غیرتوکسین‌زا و بالا بودن میانگین توکسین‌زایی، منطقه پرخطری برای کشت بادام‌زمینی محسوب می‌شود.

نتایج به‌دست‌آمده از روستای نقره ده تأکیدی بر این موضوع است که چنانچه میانگین توکسین‌زایی یک قارچ بالا باشد حتی در صورت فراوانی کم جدایه‌های توکسین‌زا می‌تواند به‌شدت خطرآفرین باشد. بنابراین روستای نقره ده اگرچه دارای جدایه‌های غیرتوکسین‌زای بالایی بود اما به دلیل فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و همین‌طور بالا بودن میانگین توکسین‌زایی سومین منطقه خطر در مطالعات ما را شامل می‌شود. این موضوع می‌تواند نشان‌گر این حقیقت باشد که گونه‌های غیرتوکسین‌زا در رقابت برای اشغال بستره موفق نبوده‌اند و پیشنهاد می‌شود که علاوه بر فراوانی این جدایه‌ها بایستی توانایی آن‌ها در اشغال بستره و محصول باید در شرایط شبیه به شرایط محیطی که محصول در آن رشد می‌کند، موردبررسی قرار گیرد.

در بررسی سایر روستاها نیز، روستای پرکاپشت به دلیل حضور جدایه غیرتوکسین‌زا، و جدایه توکسین‌زا با میانگین توکسین‌زایی بسیار کم و همین‌طور روستای نبی دهکا با وجود ۱۰۰ درصد فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا به دلیل کم بودن میانگین توکسین‌زایی در جدایه‌هایشان کم‌خطرترین روستا محسوب می‌شوند. از طرف دیگر روستای نوبیجار محله که فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا نسبت به غیرتوکسین‌زا در آن دقیقاً دو برابر می‌باشد اما به دلیل میانگین توکسین‌زایی پایین جدایه‌های توکسین‌زا، این روستا نیز جزو روستاهای کم‌خطر شهرستان آستانه اشرفیه محسوب می‌شود. همچنین روستای دهسر نیز با توجه به ۱۰۰ درصد بودن فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا اما به دلیل پایین بودن میانگین توکسین‌زایی جدایه‌های آن جزو مناطق کم‌خطر شهرستان به‌حساب می‌آیند. نمونه‌برداری‌های گسترده‌تر و بررسی دلایل پایین بودن توکسین‌زایی جدایه-ها در این مناطق که مبین حذف احتمالی جدایه‌های با توکسین‌زایی بالا به دلایلی مانند نقض برازشی در فشارهای انتخاب موجود و غلبه شیفت کاهشی میانگین توکسین‌زایی جدایه‌های منطقه می‌باشد نیز پیشنهاد می-گردد.

لازم به ذکر است که در اطلس خطر، خطرناک‌ترین منطقه نمره شش و کم‌خطرترین منطقه نمره یک را دریافت می‌کند. بنابراین به طور کلی روستاهای گیلان که تا رسیدن

به میانه این طیف نمره فاصله دارند و نمی‌توانند به‌عنوان روستاهایی با پتانسیل بالای توکسین‌زایی در نظر گرفته شوند. اما با توجه به سمیت بسیار بالای زهرابه آفلاتوکسین نیازمند کاهش همین مقدار از توکسین‌زایی در روستاها نیز هستیم.

هنوز ارتباط خاصی بین موقعیت روستاها و میزان خطر و همین‌طور تفاوت بین فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای روستاها نسبت به یکدیگر مشاهده نگردید. به نظر می‌رسد یکی از دلایل آن عدم اطلاع نسبت به نقش بوم‌شناختی آفلاتوکسین باشد که ممکن است نقش حفاظتی در رقابت قارچ با سایر میکروارگانیسم‌ها را ایفا نماید (Angle & Wagner 1981).

تولید آفلاتوکسین توسط قارچ نیازمند صرف انرژی بوده که فقدان این توانایی در جدایه‌های غیرتوکسین‌زا ممکن است باعث تواناتر شدن آنها در رشد و اشغال سریع‌تر بسترها و محل‌های اکولوژیکی مشترک گردد و به‌این‌ترتیب با شیوه حذف رقابتی مهار زیستی صورت گیرد (Cotty 1994. Donner *et al*. 2008. Zanon *et al*. 2016).

دانه‌ها حتی در پیله‌ها می‌توانند موردحمله قارچ‌های تولیدکننده‌ی آفلاتوکسین قرار گیرند. مسئله آلودگی به آسپرژیلوس‌ها معمولاً ۳۰-۲۰ روز مانده به انتهای فصل رشد چنانچه گیاه دچار تنش خشکی شود و دمای خاک منطقه غلاف‌بندی به ۳۱-۲۹ درجه سلسیوس برسد، تشدید می‌شود (Zanon *et al*. 2013). بنابراین لازم است تا در بررسی‌های بعدی نقش دمای خاک به‌ویژه در ناحیه غلاف‌بندی و رطوبت مورد بررسی قرار گیرد.

پراکنش جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای بومی در روستاهای بادام‌زمینی کاری آستانه اشرفیه با استفاده از روش‌های کشتی مورد بررسی قرار گرفت که به عنوان یک تحقیق پایه‌ای در مدیریت جمعیت جدایه های توکسین‌را می باشد. به طور کلی توانایی توکسین‌زایی جدایه‌ها جمع‌آوری شده در مزارع شهرستان آستانه اشرفیه بالا نبود اما جمعیت بالای جدایه‌های توکسین‌زا می‌تواند به‌عنوان یک عامل بالقوه خطرناک در هنگام مساعد شدن شرایط محیطی برای تولید آفلاتوکسین عمل نماید که همین امر لزوم تحقیقات بیشتر را نشان می دهد.

منابع

References

Abbas, H. K., Zablotowicz, R. M., Bruns, H. A., & Abel, C. A. (2006). Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology*, *16*(5), 437–449.

Amani S., Shams-Ghahfarokhi M., Banasaz M., and Razzaghi-Abyaneh M. 2012. Mycotoxin-producing ability and chemotype diversity of *Aspergillus* Section *Flavi* from soils of peanut-growing regions in Iran. Indian journal of microbiology, 52(4), 551-556

Angle J. S. and Wagner G. H. 1981. Aflatoxin B_1 effects on soil microorganisms. Soil Biology and Biochemistry 13(5): 381–384.

Anonymous. 2018. World's top Peanut Producing Countries 2018. Retrieved from https://www.atlasbig.com/en-us/countries-peanut-production.

Asplin F. D. and Carnaghan R. B. A. 1961. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. Veterinary Record 73(1): 1215–1219.

Bhattacharjee I. and Baruah P. K. 2015. Isolation and Screening of Citric Acid Producing *Aspergillus* Spp and Optimisation of Citric Acid Production by *Aspergillus Niger* S-6. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, 9(3): 19–23.

Chehri K., Azami, E. and Mosaber A. 2015. *Aspergillus* and aflatoxin B_1 contamination of stored corn grains in Western Iran. Global Veterinaria 14(1): 39–42.

Cotty P. J. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. Phytopathology 84(11): 1270–1277.

Domsch K. H., Gams W. and Anderson T. H. 1980. Compendium of soil fungi. (Vol. 1). Academic Press (London) Ltd.

Fani S. R., Moradi M., Zamanizadeh H. R., Mirabolfathy M. and Probst C**.** 2014. A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio orchards of Iran. Entomology and Phytopathology 81(2): 179–189.

Farjood E. 2008. Investigation on Fig Infection to *Aspergillus* form species and Their Toxin Production with the emphasis on *Aspergillus flavus* (Master's thesis, University of Shiraz, Shiraz, Iran).

Fente C. A., Ordaz J. J., Vazquez B. I., Franco C. M. and Cepeda A. 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. Applied and Environmental Microbiology 67(10): 4858–4862.

Goto T., Wicklow D. T. and Ito Y. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. Applied and Environmental Microbiology 62(11): 4036–4038.

Hatti A. D., Taware S. D., Taware A. S., Pangrikar P. P., Chavan A. M. and Mukadam D. S. 2010. Genetic diversity of toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strains using ISSR markers. International Journal of Current Research 5(1): 61–66.

Horn B. W., and Dorner J. W. 2011. Evaluation of different genotypes of nontoxigenic *Aspergillus flavus* for their ability to reduce aflatoxin contamination in peanuts. Biocontrol Science and Technology 21(7): 865–876.

Horn B. W. and Dorner J. W. 2009. Effect of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on aflatoxin contamination of wounded peanut seeds inoculated with agricultural soil containing natural fungal populations. Biocontrol Science and Technology 19(3): 249–262.

Horn B. W. 2003. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. Journal of Toxicology: Toxin Reviews 22(2-3): 351–379.

Horn B. W. and Dorner J. W. 1998. Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. Mycologia 90(5): 767–776.

Houshiyarfard F. M., Rouhani H., Falahati R. M., Mahdikhani M. E. and Malekzadeh S. S. 2012. Studies on *Aspergillus* Section *Flavi* from Peanut in Iran. Journal of Nuts, 3(3): 13–20.

Houshyarfard M., Rouhani H., Falahati R. M., Malekzadeh S. S. and Mehdikhani M. E. 2014. Survey on *Aspergillus* section *Flavi* from peanut cropped-soils in Iran. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 14(9): 932–940.

Huang, Changwei, "Mechanism of intraspecific toxin inhibition in Aspergillus flavus" 2007. *LSU Master's Theses*. 4284. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/4284

Klich M. A. and Pitt J. I. 1988a. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Transactions of the British Mycological Society 91(1): 99–108.

Klich M. A. and Pitt J. I. 1988b. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, N.S.W.: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation.

Lamb M. C. and Sternitzke D. A. 2001. Cost of aflatoxin to the farmer, buying point, and sheller segments of the southeast United States peanut industry. Peanut Science 28(2): 59–63.

Lavkor I., Var I., Oztemiz S. and AlMatar M. 2017. First report of mycotoxins in second peanuts crop in Adana and Osmaniye at harvest, drying, prestorage and storage periods. In Abdulra'Uf, L. (Ed.), In aflatoxin-control, analysis, detection and health risks 193–208. London: InTech.

Leslie J. F., Bandyopadhyay R. and Visconti A. (Eds.). 2008. Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade. Centre for Agriculture and Bioscience International. UK: Cabi.

Mohammadi A. H., Banihashemi Z. and Haghdel M. 2009. Identification and prevalence of *Aspergillus* species in soils of Fars and Kerman provinces of Iran and evaluation of their aflatoxin production. Rostaniha 10(1): 8–30.

Mirabolfathy M., Moradi Ghahdarijani M. and Waliyar F. 2005. Variability in aflatoxicogenic potential and sclerotial production of *Aspergillus flavus* in pistachio of Iran. Proceedings of the 4th International Symposium of Pistachio and Almond of Iran 188–198. Tehran, Iran.

Mishra H. N. and Das C. 2003. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 43(3): 245–246.

Pitt J. I. and Hocking A. D. 2006. Mycotoxins in Australia: Biocontrol of aflatoxin in peanuts. Mycopathologia 162(3): 233–243.

Pitt J. I. and Hocking A. D. 2009. Fungi and food spoilage, (Vol. 519). New York: Springer.

Palmgren M. S. and Hayes A. W. 1987. Aflatoxins in food. In Krogh, P. (Ed.), Mycotoxins in food (food science and technology) 65–95. England: Academic Press.

Saito M. and Machida S. 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience 40(2): 205–208.

Torres A. M., Barros G. G., Palacios S. A., Chulze S. N. and Battilani P. 2014. Review on pre and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. Food Research International 62: 11–19.

Zanon M. S. A., Barros G. G. and Chulze S. N. 2016. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents to reduce aflatoxin contamination in peanuts harvested in Northern Argentina. International Journal of Food Microbiology 231(1): 63–68.

Zanon M. A., Chiotta M. L., Giaj-Merlera G., Barros G. and Chulze S. 2013. Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. International Journal of Food Microbiology 162(3): 220–225.