

مطالعه تأثیر آناستوموز ریشه‌ای بین سویه‌های تولیدکننده و غیرتولیدکننده آفلاتوکسین قارچ *Aspergillus flavus* جدا شده از پسته در کاهش تولید آفلاتوکسین و تجزیه و تحلیل هتروکاریون‌های حاصل با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR\*

## STUDY ON EFFECT OF HYPHAL ANASTOMOSIS BETWEEN AFLATOXIGENIC AND NON-AFLATOXIGENIC STRAINS OF *Aspergillus flavus* ISOLATED FROM PISTACHIO ON REDUCTION OF AFLATOXIN PRODUCTION AND ANALYSIS OF PRODUCED HETEROKARYONS USING REP-PCR

زهرا علی‌بخشی، محمد جوان‌نیکخواه\*\*، سید محمود اخوت، خلیل بردی فتوحی‌فر، الهام زمانی و کیوان غضنفری<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۲۷)

### چکیده

آلودگی پسته به آفلاتوکسین که یکی از گونه‌های قارچی مولد آن *Aspergillus flavus* می‌باشد، از جمله مواردی است که مشکلات زیادی را در تولید، مصرف و صادرات پسته به وجود می‌آورد. به منظور بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین توسط جدایه‌های *A. flavus* جدا شده از میوه پسته، تعداد ۴۶ جدایه از قارچ با استفاده از آزمون الایزا مورد آزمایش قرار گرفتند. از بین این جدایه‌ها، ۸۰/۴۴٪ تولیدکننده آفلاتوکسین و ۱۹/۵۶٪ غیرتولیدکننده آفلاتوکسین بودند. به منظور مطالعه تأثیر آناستوموز ریشه‌ای در میزان آفلاتوکسین تولید شده توسط جدایه‌ها، تلاقی بین جهش یافتگان *nit* دو جدایه تولیدکننده آفلاتوکسین (R5) با بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین و غیرتولیدکننده آفلاتوکسین (Mb2) انجام گرفت. از بین ۳۰ جدایه هتروکاریون حاصل، تنها ۱۰٪ آنها قادر به تولید آفلاتوکسین نبودند و میانگین تولید آفلاتوکسین در تمام نتاج هتروکاریون کمتر از والد تولیدکننده بود. نتایج نشان داد که آناستوموز ریشه‌ای می‌تواند در کاهش تولید آفلاتوکسین در نتاج هتروکاریون مؤثر باشد. با توجه به این ویژگی، احتمالاً بتوان از سویه‌های غیرزهرابه‌زای قارچ در طبیعت بر علیه انواع زهرابه‌زا استفاده نمود. هم‌چنین الگوی بانندی حاصل از جدایه‌های والد و هتروکاریون‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR نشان دادند که الگوی بانندی دو جدایه والد (Mb2 و R5) به غیر از باند ۵۶۶ جفت‌بازی مشابه بودند و الگوی بانندی جدایه‌های هتروکاریون نیز مشابه والد زهرابه‌زا بود.

واژه‌های کلیدی: هتروکاریون، جهش یافته *nit* انگشت نگاری DNA، الایزا، استرین، سازگاری رویشی

\*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

\*\* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jnikkxah@ut.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، دانشجویان سابق کارشناسی ارشد بیمارشناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

## مقدمه

اغذیه می‌باشد (Allameh & Razzaghi Abyaneh 2001). در کشور ایران مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی (ISIRI 2002) حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین کل در خشکبار (مغز پسته، بادام زمینی، گردو و سایر مغزها و دانه‌های خوراکی) را ۱۵ ppb تعیین نموده است. روش‌های مختلفی از جمله روش‌های کروماتوگرافی (کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا)، روش‌های ایمونوشیمیایی (الایزا، ستون ایمنی سنجی و ایمنی سنجی رادیواکتیو)، روش‌های مولکولی (واکنش زنجیره‌ای پلی مرز) و استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی برای ردیابی آفلاتوکسین به کار گرفته می‌شود (Gilbert & Anklam 2002). الایزا (ELISA) یک روش ایمونوشیمیایی نسبتاً ارزان، بی‌خطر و سریع جهت اندازه‌گیری مقادیر کم ترکیبات شیمیایی است. اخیراً برای شناسایی سریع قارچ زهرهای مختلف از کیت‌های آماده و تجاری الایزا بر اساس خصوصیات سرولوژیکی و واکنش آنتی بادی - آنتی ژن تهیه گردیده‌اند، استفاده می‌شود. در ارتباط با آفلاتوکسین‌ها نیز از کیت‌های مختلف ELISA برای ردیابی و شناسایی سریع آنها در مواد غذایی و قارچ‌های مولد استفاده می‌گردد (Zheng et al. 2006). با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی آفلاتوکسین، استفاده از روش‌های تلفیقی برای کاهش میزان آفلاتوکسین در مواد غذایی روشی بسیار مناسب به نظر می‌رسد. یکی از روش‌های مناسب برای کاهش میزان آفلاتوکسین کنترل بیولوژیک می‌باشد که در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است و میکروارگانیسم‌های زیادی مثل مخمرها، قارچ‌ها، اکتینومیسیت‌ها و باکتری‌ها به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک برای کاهش آلودگی آفلاتوکسین‌ها استفاده شده‌اند (Abbas 2005). تنوع بسیار زیادی در فنوتیپ

پسته یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی و باغی ایران است و استان کرمان دارای بیشترین سطح زیر کشت و تولید پسته در کشور می‌باشد (Panahi et al. 2002). پسته به عنوان یک محصول مهم صادراتی در طول دوره کشت و مراحل مختلف فرآوری، مورد حمله قارچ‌های گوناگون قرار می‌گیرد. از جمله این قارچ‌ها، گونه‌های مختلف *Aspergillus* هستند که علاوه بر خسارت ظاهری به میوه پسته، با تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای چون قارچ زهرها، از ارزش غذایی و صادراتی این محصول می‌کاهند. در بین قارچ زهرها، آفلاتوکسین به دلیل آثار مختلف بیوشیمیایی و بیولوژیکی بیش از همه مورد توجه است. در بین گونه‌های آسپرژیلوس گزارش شده روی پسته، دو گونه *Aspergillus flavus* Link و *A. parasiticus* Link از مهم‌ترین تولیدکنندگان آفلاتوکسین هستند (Panahi et al. 2002). آفلاتوکسین‌ها از نظر شیمیایی از مشتقات دی فورانوکومارین (Difuranocoumarin) هستند که از طریق مسیر پلی‌کتاید (Polyketide) تولید می‌شوند. تا کنون ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناسایی و گزارش شده است که عمده‌ترین این ترکیبات آفلاتوکسین‌های  $G_1$ ،  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $G_2$  هستند (Alavi 1998). از زمان کشف آفلاتوکسین‌ها در دهه 1960 تا کنون، مقررات خاصی در بسیاری از کشورها برای محافظت مصرف‌کنندگان از آثار زیان آور قارچ زهرهای موجود در مواد غذایی وضع شده است. بدون تردید، تمامی قوانین و مقررات مربوط به بهداشت مواد غذایی بایستی در راستای جلوگیری از به‌کارگیری و مصرف چنین اغذیه‌ای سوق داده شوند. این اصل کلی در برخی از کشورها با وضع مقررات خاصی تکمیل شده است که دربرگیرنده حد مجاز قارچ زهرهای خاص در

جدا شده از پسته با استفاده از روش الیزا، بررسی تأثیر آناستوموز ریشه‌ای در انتقال مواد ژنتیکی بین جدایه‌های تولیدکننده و غیرتولیدکننده آفلاتوکسین از طریق تقابل ریشه‌های آنها روی محیط غذایی چاپک و ارزیابی نتایج حاصل از آناستوموز ریشه‌ای به کمک نشانگر rep-PCR از طریق مقایسه جدایه‌های نتاج با جدایه‌های والد می‌باشد.

### روش بررسی

#### ۱- جدایه‌های *Aspergillus flavus*

چهل و شش جدایه خالص‌سازی شده *A. flavus* جدا شده از مغز پسته و پس مانده‌های فرآوری پسته از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه و در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های پسته در طی سال‌های ۱۳۸۱-۱۳۸۲ از برخی مناطق مهم پسته‌کاری استان کرمان توسط حیدریان (Heidarian 2004) جمع‌آوری شده بودند. هم‌چنین در این تحقیق شش جدایه جدا شده از بادام زمینی و دو جدایه جدا شده از کلزا برای استفاده در آزمایش سازگاری رویشی از کلکسیون مذکور تهیه گردید که این نمونه‌ها توسط زمانی (Zamani 2009) طی سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۷ جمع‌آوری شده بودند.

#### ۲- بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین و میزان سنجش

##### آن به کمک کیت ELISA

جهت سنجش تولید آفلاتوکسین از روش ELISA و از کیت AgraQuant® Total Aflatoxin Assay (Romer Labs, Singapore) استفاده شد.

*A. flavus* در مزارع و باغات کشاورزی وجود دارد و ممکن است در بین آنها جدایه‌های فاقد قدرت تولید آفلاتوکسین وجود داشته باشند (Pildain et al. 2004). مشاهده‌ها و تحقیقات منجر به این فرضیه گردیده است که می‌توان جدایه‌های فاقد قدرت تولید زهرابه را جایگزین جدایه‌های زهرابه‌زا کرد (Cole & Cotty 1990). کاتی (Cotty 1989) توانایی رقابتی بین جدایه‌های غیر زهرابه‌زا و زهرابه‌زای *A. flavus* را در بازدارندگی از تولید آفلاتوکسین در پنبه بررسی کرد و اثر مکانیسم رقابت را در این تحقیق به اثبات رساند. در حال حاضر، کنترل بیولوژیک جدایه‌های زهرابه‌زای *A. flavus* با جدایه‌های غیر زهرابه‌زا در سایر محصولات از قبیل ذرت (Brown et al. 1991)، پنبه (Bock & Cotty 1999)، بادام زمینی (Dorner et al. 2003)، برنج و گندم (Bock & Cotty 1999) در حال افزایش است. ویکلو و هورن (Wicklowsky & Horn 2007) ارتباط بین سازگاری رویشی و تولید آفلاتوکسین را در دو گونه *A. flavus* و *A. parasiticus* مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که جفت جدایه‌هایی که سازگاری رویشی قوی دارند، سطوح بالایی از آفلاتوکسین را نیز تولید می‌کنند. نشانگر مولکولی rep-PCR به میزان زیادی قابل اعتماد، تکرار پذیر و سریع بوده و قدرت تمایز آن بسیار عالی است (Louws et al. 1999) بنابراین می‌تواند برای تعیین ارتباط ژنتیکی جدایه‌ها و تأیید تبادلات ژنتیکی بین جدایه‌ها در اثر آناستوموز ریشه‌ای به کار رود. در ایران مطالعات چندانی در ارتباط با بررسی تأثیر آناستوموز ریشه‌ای در کاهش تولید آفلاتوکسین بین سویه‌های تولیدکننده و غیرتولیدکننده آفلاتوکسین دیده نمی‌شود. بنابراین هدف از این پژوهش شناسایی جدایه‌های تولیدکننده و غیرتولیدکننده آفلاتوکسین در جمعیت قارچ *A. flavus*

**۳- استحصال جهش یافتگان *nit* و تعیین تیپ فنوتیپی آنها**  
 در این آزمایش جدایه‌هایی استفاده شدند (جدول ۱) که قبلاً از نظر سازگاری رویشی در چهار گروه سازگاری رویشی (AF1-AF4) گروه‌بندی شده بودند (Heidarian 2004). بنابراین در این مطالعه جهت استحصال جهش یافتگان *nit* (nitrate non-utilizing mutant) از جدایه‌های مربوط به گروه‌های سازگاری رویشی استفاده شد. به منظور جداسازی جهش یافتگان *nit*، قرص‌های آگار واجد میسلیم به قطر سه تا پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه سه تا پنج روزه قارچ از محیط کشت PDA برداشته و به تشتک‌های هشت سانتی‌متری حاوی محیط غذایی چاپک (Czapek Dox Agar) و آب - آگار (Water Agar) واجد کلرات ۵٪ منتقل شد. ترکیب محیط کشت چاپک حاوی کلرات ۵٪، شامل ۳۰ گرم Sucrose، ۳ گرم  $\text{NaNO}_3$ ، ۰/۵ گرم KCl، ۰/۱ گرم  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ، ۰/۵ گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۱ گرم  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۵ گرم  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و ۲۵ گرم  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  در یک لیتر آب می‌باشد (Bayman & Cotty 1991) و ترکیب محیط کشت آب - آگار حاوی کلرات ۵٪، شامل ۰/۲ گرم Glucose و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب می‌باشد (Korolev & Katan 1997). تشتک‌ها در دمای  $1 \pm 28$  درجه سلسیوس و به مدت ۱۰ روز درون انکوباتور در تاریکی نگهداری شدند. ده روز پس از انتقال تشتک‌های پتری به انکوباتور، قطاع‌های (Sector) سریع‌الرشد دارای رشد اکسوتروف (رشد ضعیف با میسلیم هوایی کم) روی محیط غذایی واجد کلرات مشاهده شدند. این قطاع‌ها به محیط چاپک منتقل گردیدند و به مدت یک هفته در شرایط انکوباتور با دمای  $1 \pm 28$  درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. قطاع‌هایی که در مقایسه با

میسلیم‌های طبیعی دارای رشد غیر متراکم بوده و پرگنه گسترده و بدون میسلیم هوایی یا با میسلیم هوایی کم را تشکیل داده بودند، به عنوان جهش یافتگان *nit* در نظر گرفته شدند (Correll et al. 1987). تیپ فنوتیپی جهش یافتگان نیز بر اساس نحوه رشد آنها روی محیط چاپک حاوی منابع ازت شامل نیترات سدیم (۲ گرم در لیتر)، نیتريت سدیم (۰/۵ گرم در لیتر)، تارتارات آمونیوم (یک گرم در لیتر)، اسید اوریک (۰/۲ گرم در لیتر) و هیپوزانتین (۲/۱ گرم در لیتر) تعیین گردید (Correll et al. 1987). برای این منظور جهش یافته *nit X* هر جدایه روی محیط‌های فوق کشت و سه نوع جهش یافته *nit 1 nit 3* و *Nit M* از بین آنها شناسایی شدند.

#### ۴- تلاقی جهش یافتگان *nit* برای به دست آوردن هتروکاریون پایدار

پس از تعیین تیپ فنوتیپی جهش یافتگان و بررسی خودسازگار و یا خودناسازگار بودن آنها، برای به دست آوردن هتروکاریون پایدار بین جدایه تولیدکننده توکسین (با غلظت توکسین زیاد) و جدایه غیر تولیدکننده توکسین (با غلظت توکسین صفر)، لازم بود که جهش یافتگان این جدایه‌ها با یکدیگر تلاقی داده شوند، لازم به ذکر است که جدایه تولیدکننده توکسین (جدایه R5)، با غلظت توکسین زیاد از گروه سازگاری رویشی AF1 انتخاب گردید و به دلیل عدم مشاهده جدایه غیرتولیدکننده توکسین در گروه AF1، از جهش یافتگان جدایه‌های به دست آمده از کلزا و بادام زمینی که مقدار تولید آفلاتوکسین آنها صفر بود استفاده شد (جدول ۲). برای انجام تلاقی، قرص‌های آگار پنج میلی‌متری واجد میسلیم هر یک از جهش یافتگان به فاصله حداکثر دو سانتی‌متر از هم روی محیط چاپک قرار گرفتند و برای هر تلاقی دو تکرار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. جدایه‌های تشکیل‌دهنده گروه‌های سازگاری رویشی قارچ *Aspergillus flavus*

Table 1. The isolates of *Aspergillus flavus* used in vegetative compatibility groups

جدایه‌ها										گروه‌ها
Isolates										Groups
N9-2*	N1	P3	P6*	P8	P9	K3	K11	S48	R5	Group 1 (AF1)
			N3-2*	N19*	Z16	P10				Group 2 (AF2)
			K29	K34*	K13	K27				Group 3 (AF3)
			N18*	B11	R11					Group 4 (AF4)

\*: جدایه‌های آزمایشگر (جدایه‌ای که پایدارترین و مشخص‌ترین هتروکاریون را با بقیه جدایه‌های یک گروه ایجاد می‌کند)

\*Tester isolates (The isolate that provides the most stable heterokaryon with other isolates of a group)

جدایه‌ها قبلاً توسط حیدریان شناسایی شده بودند (Heidarian 2004).

The isolates were identified by Heidarian (2004).

جدول ۲. مشخصات جدایه‌های *Aspergillus flavus* مورد استفاده در تلاقی‌های سازگار رویشی جهت به دست آوردن نتاج هتروکاریون

Table 2. Characterizations of *Aspergillus flavus* isolates used in vegetative compatibility for obtaining of heterokaryon isolates.

جدایه	میزبان	محل جمع آوری	غلظت آفلاتوکسین (ppb)	نوع جهش یافته (nit)
Isolate	Host	Place collected	Aflatoxin rate (ppb)	Mutant nit
R5	Pistachio	Pistachio Store	8.47	nit 1
Kb24	Peanut	Astaneh Ashrafie, Guilan	0	Nit M
tb	Peanut	Astaneh Ashrafie, Guilan	0	nit 3
Kb11	Peanut	Astaneh Ashrafie, Guilan	0	nit 3
Mb2	Peanut	Minodasht, Golestan	0	nit 3
Mb9	Peanut	Minodasht, Golestan	0	nit 3
Ab9	Peanut	Astaneh Ashrafie, Guilan	0	nit 3
GuK2	Canola	Agricultural Research Center, Guilan	0	nit 3
GuK9	Canola	Agricultural Research Center, Guilan	0	nit 3

##### ۵- استحصال نتاج هتروکاریون پایدار و ارزیابی میزان

##### تولید آفلاتوکسین در آنها با استفاده از کیت ELISA

پس از تشکیل هتروکاریون پایدار بین دو جدایه تولیدکننده (R5) و غیرتولیدکننده آفلاتوکسین (Mb2)، جهت استحصال کنیدی از بخش تشکیل‌دهنده هتروکاریون پایدار (محل‌ی در نقطه تلاقی ریشه‌های جهش یافته دو جدایه که ریشه‌های دارای تیپ رشد وحشی بودند) (شکل ۱)، سوسپانسیون اسپوری تهیه شد و سوسپانسیون در سطح

تشتک‌های پتری حاوی تلاقی‌ها درون انکوباتور و در دمای  $28 \pm 1$  درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی مداوم به مدت ۲۱-۱۴ روز نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان فوق نتیجه تلاقی‌ها بررسی گردید. جهش یافتگانی که تولید هتروکاریون پایدار کرده بودند و در ناحیه تلاقی رشد وحشی داشتند، برای تهیه نتاج هتروکاریون مورد استفاده قرار گرفتند.

Corbett Research, Australia) طبق برنامه حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ثانیه و ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دو رگه سازی در ۴۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵ چرخه انجام شد.

برای مشاهده محصولات PCR، الکتروفورز با شدت ولتاژ ثابت ۸۵ ولت به مدت پنج ساعت در ژل آگارز ۱٪/۲۵ و بافر TBE 1X (0.09 M Tris, 0.09 M boric acid and 0.002 M EDTA, pH 8.0) انجام شد. سپس قطعات DNA توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند و با استفاده از دستگاه Gel-Documentation (IMAGO, B & L System) زیر نور UV از آن عکس برداری به عمل آمد. جهت تعیین وزن قطعات تکثیر شده DNA، از نشانگر اندازه DNA تحت عنوان Gene Ruler™ DNA ladder mix استفاده شد.

## نتایج

### ۱- ارزیابی تولید آفلاتوکسین به روش ELISA

نتایج آزمون الایزا پس از تعیین غلظت آفلاتوکسین کل توسط دستگاه قرائت کننده الایزا بدین ترتیب بود که از میان چهل و شش جدایه تحت بررسی، ۸۰/۴۴٪ جدایه‌ها تولیدکننده آفلاتوکسین و ۱۹/۵۶٪ جدایه‌ها غیرتولیدکننده آفلاتوکسین بودند (جدول ۳). هم‌چنین از بین ۲۱ جدایه‌ای که در چهار گروه سازگاری رویشی AF1، AF2، AF3 و AF4 شناخته شده توسط حیدریان (Heidarian 2004) قرار گرفته بودند،

آب آگار ۲٪ پخش شد. پس از شش تا نه ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ کنیدیوم جوانه زده به طور تصادفی انتخاب شدند. و به تشتک‌های پتری حاوی محیط غذایی چاپک انتقال یافتند و به عنوان نتاج هتروکاریون در نظر گرفته شدند. بررسی میزان تولید آفلاتوکسین در نتاج هتروکاریون با استفاده از کیت الایزا مطابق بند ۲ انجام گرفت. نتاج هتروکاریون از نظر تولید آفلاتوکسین کل با والد تولیدکننده آفلاتوکسین با استفاده از آزمون T یک طرفه مقایسه شدند.

### ۶- استخراج DNA و واکنش rep-PCR

جهت استخراج DNA از دو جدایه والد (R5 و Mb2) و ۳۰ نتاج هتروکاریون، از روش Rapid mini-preparation با اندکی تغییرات استفاده شد (Liu et al. 2000). DNA های استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مطالعات بعدی نگهداری شدند. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR)، از آغازگر ERIC که بر مبنای نواحی تکرار شونده DNA در ژنوم قارچ طراحی شده بود (MWG Research, Germany) استفاده شد. توالی آغازگر ERIC به صورت 1R (5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3') و 2I (5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG - 3') می‌باشد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۶/۷ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر 10X PCR buffer، ۲/۵ میکرولیتر (۶/۲۵ میلی‌مولار) MgCl<sub>2</sub>، ۲ میکرولیتر (۱ میلی‌مولار) dNTPs، ۱/۵ میکرولیتر (۷/۵ پیکومول) از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر (۵/۲ واحد) آنزیم Taq DNA Polymerase (Cinna Gen Corp, Iran)، ۰/۳ میکرولیتر DMSO و ۳ میکرولیتر (۵ نانوگرم) DNA ژنومی الگو در دستگاه ترموسایکلر

هتروکاریون ۳۰/۱۶ بود. غلظت آفلاتوکسین هشت جدایه (۲۶/۶۶٪) پایین‌تر از مقدار میانگین و غلظت آفلاتوکسین ۲۲ جدایه (۷۳/۳۳٪) بالاتر از مقدار میانگین بود. غلظت آفلاتوکسین کل تولید شده توسط نتاج هتروکاریون نسبت به والد تولید کننده آفلاتوکسین (R5) مقایسه شدند و معنی‌دار بودن اختلاف هر یک با آزمون T یکطرفه با درجه آزادی ۲۹ در سطح ۵٪ و ۱٪ بررسی شد (شکل ۲). با توجه به شکل ۲ می‌توان در یافت که از بین ۳۰ نتاج هتروکاریون، شش جدایه (۲۰٪) نسبت به والد تولید کننده آفلاتوکسین معنی‌دار شده‌اند.

### ۳- انگشت نگاری DNA جدایه‌های والد و نتاج

#### هتروکاریون تولید شده به روش rep-PCR

تکثیر قطعات DNA برای دو جدایه والد تولید کننده و غیرتولید کننده آفلاتوکسین و ۳۰ جدایه نتاج هتروکاریون حاصل از تلاقی آنها با استفاده از آغازگر ERIC انجام شد. مقایسه باندهای تولید شده توسط این آغازگر در جدایه‌های والد نشان می‌دهد که الگوی باندهای والد زهرابه‌ها و غیرزهرابه‌ها را به غیر از باندهای ۵۶۶ جفت بازی، کاملاً مشابه بودند و باندهای ۵۶۶ جفت بازی فقط در والد زهرابه‌ها وجود داشت (شکل ۳). هم‌چنین بررسی الگوی باندهای در ۳۰ جدایه نتاج هتروکاریون نشان می‌دهد که تمامی این جدایه‌ها از نظر الگوی باندهای تولید شده کاملاً مشابه والد توکسین‌زا بوده و باندهای ۵۶۶ جفت بازی را دارا هستند. وجود این باندهای DNA در نتاج می‌تواند بیانگر هتروکاریون بودن آنها باشد.

تنها سه جدایه (۱۴/۲۸٪) آفلاتوکسین تولید نکردند و این سه جدایه متعلق به گروه سازگاری رویشی AF3 بودند و ۱۸ جدایه (۸۵/۷۲٪) تولید کننده آفلاتوکسین بودند.

### ۲- استحصال نتاج هتروکاریون پایدار و ارزیابی میزان

#### تولید آفلاتوکسین در آنها به روش ELISA

استحصال جهش یافتگان *nit* برای گروه سازگاری رویشی AF1 انجام شد و در میان آنها جدایه R5 با غلظت آفلاتوکسین ۴۷/۸ ppb جهت استحصال نتاج هتروکاریون مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام تلاقی بین جدایه تولید کننده زهرابه (R5) و جدایه‌های غیر تولید کننده زهرابه به دست آمده از کلزا و بادام زمینی، تنها در یک مورد (تلاقی جدایه R5 و Mb2) نتیجه تلاقی مثبت بود و هتروکاریون تشکیل شد (شکل ۱ و جدول ۲). در بقیه موارد نتیجه تلاقی منفی بود و هتروکاریون تشکیل نشد و میسلیم‌های دو جهش یافته پس از تلاقی به رشد عادی خود ادامه داده و ناحیه پروتوتروف تشکیل ندادند (شکل ۲). دو جهش یافته تولید کننده آفلاتوکسین (R5) و غیر تولید کننده آفلاتوکسین (Mb2) که تشکیل هتروکاریون پایدار داده بودند، جهت به دست آوردن نتاج هتروکاریون مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت ۳۰ جدایه هتروکاریون به دست آمد که با نام‌های (R5Mb21- R5Mb230) مشخص شدند. نتایج حاصل از آزمون الایزا پس از تعیین غلظت آفلاتوکسین کل توسط دستگاه قرائت کننده الایزا در جدول ۴ منعکس گردیده است. با توجه به جدول ۴ می‌توان دریافت که از بین ۳۰ جدایه نتاج هتروکاریون، سه جدایه (۱۰٪) آفلاتوکسین تولید نکردند و ۲۷ جدایه دیگر تولید کننده آفلاتوکسین بودند. میانگین غلظت آفلاتوکسین کل در بین ۳۰ جدایه

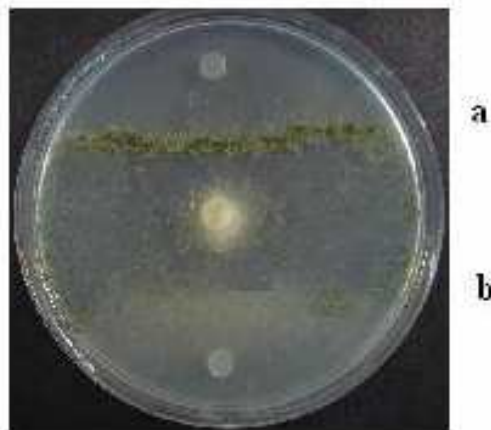
جدول ۳. غلظت آفلاتوکسین تولید شده کل در جدایه‌های *Aspergillus flavus* با استفاده از روش ELISATable 3. The rate of total aflatoxin produced by *Aspergillus flavus* isolates using ELISA method.

غلظت آفلاتوکسین (ppb)	محل جمع‌آوری	جدایه	ردیف	غلظت آفلاتوکسین (ppb)	محل جمع‌آوری	جدایه	ردیف
Aflatoxin rate (ppb)	Locality	Isolate	Row	Aflatoxin rate (ppb)	Locality	Isolate	Row
1	Bahreman	P6	24	0	Kerman	K29	1
2	Bahreman	P8	25	0	Kerman	K34	2
3	Zarand	Z16	26	0	Kerman	K13	3
4	Bahreman	N1	27	0	Zarand	Z3	4
5	Bahreman	N3-2	28	0	Bahreman	N16	5
6	Bahreman	N9-2	29	0	Kerman	K28	6
7	Bahreman	N19	30	0	Kerman	K21	7
8	Rafsanjan Market	B12	31	0	Bahreman	N6	8
9	Bahreman	P10	32	0	Kerman	K23	9
10	Bahreman	N14	33	10	Bahreman	P3	10
11	Kerman	K3	34	21	Sirjan	S48	11
12	Rafsanjan Market	B15	35	66	Pistachio Stores	R11	12
13	Rafsanjan Market	B17	36	70	Bahreman	N18	13
14	Zarand	Z35	37	70	Bahreman	P9	14
15	Sirjan	S29	38	70	Kerman	K11	15
16	Rafsanjan Market	B8	39	95	Rafsanjan Market	B11	16
17	Rafsanjan Market	B18	40	4.1	Kerman	K27	17
18	Bahreman	N9-1	41	20.1	Sirjan	S40	18
19	Pistachio Stores	R8	42	77.1	Bahreman	N5	19
20	Rafsanjan Market	B4	43	04.2	Pistachio Stores	R4	20
21	Pistachio Stores	R5*	44	13.2	Kerman	K14	21
22	Rafsanjan Market	B16	45	13.2	Bahreman	N8	22
23	Bahreman	P7	46	88.2	Rafsanjan Market	B10	23

\*: جدایه تولید کننده زهرابه به کار رفته در آزمایش سازگاری رویشی

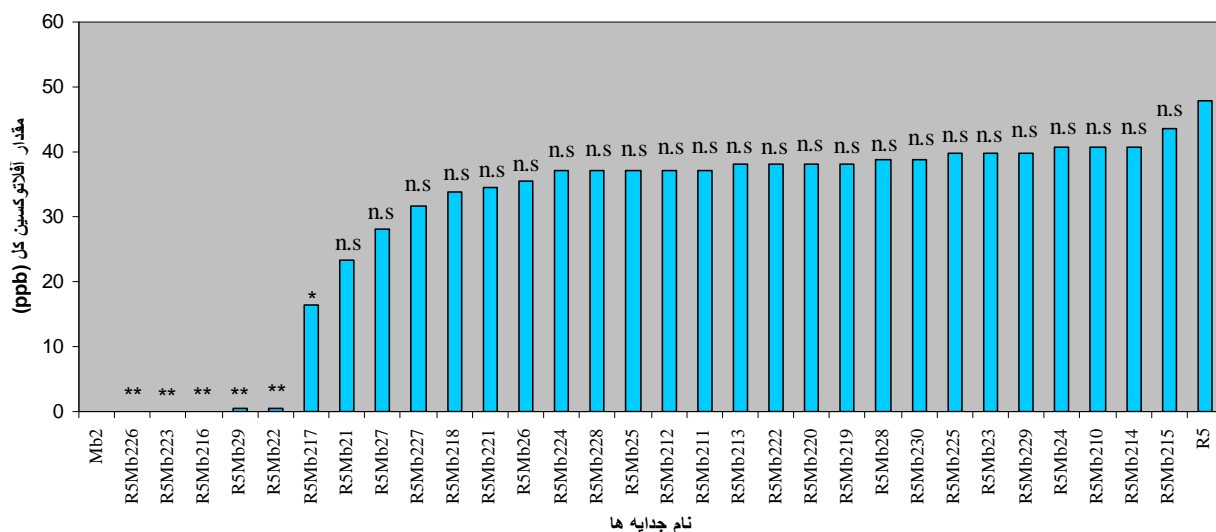
\*: Toxin producing isolate used in vegetative compatibility tests.





شکل ۱- (a) واکنش سازگار و تشکیل هتروکاریون بین دو جهش یافته R5 و Mb2 و (b) واکنش ناسازگار و عدم تشکیل هتروکاریون بین جهش یافتگان دیگر.

Fig. 1. a) Compatible reaction and heterokaryon formation between R5 and Mb2 mutants; b) incompatible reaction between the other mutants.



شکل ۲. مقایسه غلظت آفلاتوکسین تولید شده کل توسط جداییه‌های نتاج هتروکاریون نسبت به والد زهرا به زا

Fig. 2. The comparison diagram of total aflatoxin rate produced by heterokaryons than the toxic parent.

\*\* : Significant difference in  $\alpha = 1\%$

\*\* : اختلاف معنی دار در سطح  $\alpha = 1\%$

\* : Significant difference in  $\alpha = 5\%$

\* : اختلاف معنی دار در سطح  $\alpha = 5\%$

n.s = No significant difference

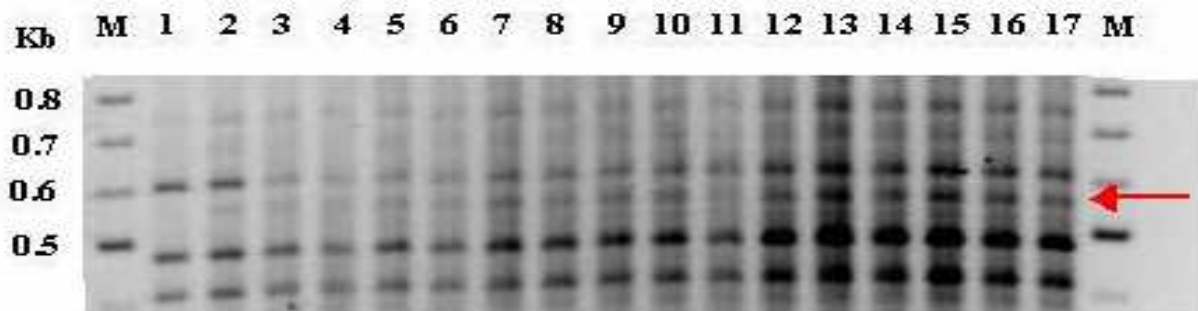
n.s = عدم اختلاف معنی دار

جدول ۴. غلظت آفلاتوکسین تولید شده کل در جدایه‌های نتاج هتروکاریون تولید شده در اثر تلاقی رویشی دو جدایه والد R5 و

Mb2 فارچ *Apergillus flavus* با استفاده از روش ELISA

Table 4. The rate of total aflatoxin produced in heterokaryons obtained from crossing parental isolates (R5 and Mb2) of the *Apergillus flavus* fungus using ELISA method.

غلظت آفلاتوکسین (ppb)	جدایه هتروکاریون	ردیف	غلظت آفلاتوکسین (ppb)	جدایه هتروکاریون	ردیف
Aflatoxin rate (ppb)	Heterokaryon isolate	Row	Aflatoxin rate (ppb)	Heterokaryon isolate	Row
0	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 16	16	4.23	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 1	1
5.16	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 17	17	56	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 2	2
8.33	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 18	18	8.39	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 3	3
1.38	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 19	19	7.40	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 4	4
1.38	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 20	20	1.37	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 5	5
6.34	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 21	21	4.35	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 6	6
1.38	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 22	22	1.28	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 7	7
0	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 23	23	9.38	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 8	8
1.37	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 24	24	51	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 9	9
8.39	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 25	25	7.40	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 10	10
0	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 26	26	1.37	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 11	11
6.31	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 27	27	1.37	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 12	12
1.37	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 28	28	38	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 13	13
8.39	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 29	29	7.40	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 14	14
9.38	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 30	30	6.43	R <sub>5</sub> Mb <sub>2</sub> 15	15



شکل ۳. الگوی بانندی تولید شده به روش rep-PCR برای جدایه‌های والد و هتروکاریون حاصل در ژل آگارز ۱/۲۵٪ با استفاده از آغازگر ERIC. شماره‌های ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به جدایه‌های والد Mb2، R5 و شماره‌های ۳ تا ۱۷ به ترتیب مربوط به جدایه‌های

هتروکاریون R<sub>5</sub>Mb<sub>2</sub>1 تا R<sub>5</sub>Mb<sub>2</sub>15 می‌باشند. M: نشانگر اندازه DNA، Gene ruler™ DNA Ladder Mix.

Fig. 3. rep-PCR patterns obtained with primer ERIC in parental and heterokaryon isolates on 1.25% agarose gel: Lane 1 and 2 refer to Mb2 and R5 parental isolates respectively, Lane 3-17 refer to R<sub>5</sub>Mb<sub>2</sub>1 to R<sub>5</sub>Mb<sub>2</sub>15 heterokaryon isolates, respectively. M= Gene ruler™ DNA Ladder Mix.

## بحث

در این مطالعه عدم تولید آفلاتوکسین در ۱۹/۵۶٪ از جدایه‌های قارچ *A. flavus* جدا شده از پسته دیده شد. به طور مشابه، رحیمی و همکاران (Rahimi et al. 2007) با بررسی تولید آفلاتوکسین در میان ۷۶ جدایه *A. flavus* مشاهده کردند که ۴۰٪ از جدایه‌ها قادر به تولید آفلاتوکسین نبودند. کلیچ و پیت (Klich & Pitt 1988) نیز گزارش کردند که از بین ۹۵ جدایه *A. flavus* ۴۱٪ از آنها تولید کننده آفلاتوکسین بودند. هم‌چنین لیسکر و همکاران (Lisker et al. 1993) بیان کردند که از بین ۲۰۰ جدایه *Aspergillus* به دست آمده از بادام زمینی در اسرائیل ۷۷٪ آفلاتوکسین تولید کردند. نسبت زیادی از جدایه‌های *A. flavus* در مزرعه آفلاتوکسین تولید نمی‌کنند (Pildain et al. 2004).

مکانیسم مولکولی عدم توانایی تولید آفلاتوکسین در قارچ *A. flavus* به خوبی شناخته نشده است (Geiser et al. 1998). فقدان یک بخش یا تمام مجموعه ژن درگیر در بیوسنتز آفلاتوکسین در جدایه‌های غیر زهرابه از *A. flavus* پدیده نادری نیست (Chang et al. 2005). همچنان که اهریچ و کاتی (Ehrlich & Cotty 2004) در مطالعات خود روی جدایه غیر زهرابه زای AF36 بیان کردند که این جدایه در ژن پلی‌کتید سنتتاز که برای بیوسنتز آفلاتوکسین ضروری است، دچار نقص می‌باشد. چانگ و همکاران (Chang et al. 2005) نیز در مورد جدایه غیر زهرابه زای NRRL21882 بیان کردند که این جدایه به طور کلی فاقد دسته ژن بیوسنتز آفلاتوکسین می‌باشد. با ملاک قرار دادن استاندارد ایران در مورد حد مجاز آفلاتوکسین کل در خشکبار (مغز پسته و ...)، از میان ۴۶ جدایه مورد بررسی در این تحقیق مقدار آفلاتوکسین شش جدایه (۱۳/۰۴٪) طبق ارزیابی کیت الایزا بالاتر از حد

مجاز (۱۵ ppb) بودند. در کل میانگین غلظت آفلاتوکسین تولید شده کل در جدایه‌های به دست آمده از پسته ۱۱/۴۱ بود که این میزان از حد مجاز تعیین شده برای ایران (۱۵ppb) کمتر می‌باشد. کاهش تولید آفلاتوکسین در پسته و سایر مواد غذایی به روش‌های غیر شیمیایی و ایمن برای انسان و محیط زیست از اهمیت زیادی برخوردار است.

در این پژوهش تأثیر آناستوموز ریشه‌ای در میزان تولید آفلاتوکسین بین دو جدایه تولیدکننده آفلاتوکسین و جدایه غیر تولیدکننده آفلاتوکسین بررسی شد. پس از تشکیل هتروکاریون پایدار بین این دو جدایه و تعیین مقدار آفلاتوکسین تولید شده در نتاج حاصل از این دو جدایه، مشخص شد که ۱۰٪ از نتاج آفلاتوکسین تولید نکردند و میانگین تولید آفلاتوکسین در تمام نتاج هتروکاریون (۳۰/۱۶) کمتر از والد تولیدکننده بود. این نتیجه می‌تواند تأثیر نسبی آناستوموز ریشه‌ای در کاهش قدرت تولید آفلاتوکسین در نتاج هتروکاریون را نشان دهد. با تشکیل هتروکاریون پروتوتروف و قرار گرفتن دو هسته متفاوت از نظر ژنتیکی در یک سیتوپلاسم، این دو هسته ممکن است به طور مشارکتی در انجام فعالیت‌های سلولی با یکدیگر همکاری کنند. و گاهی اوقات ممکن است یکی از هسته‌ها نسبت به دیگری چیره شده و یکسری از فعالیت‌های سلولی را به طور مستقل به عهده بگیرد و این حالت مشارکتی ممکن است به صورت پارازیتیسم هسته‌ای نیز ظاهر شود (Glass & Saupe 2002, Glass et al. 2000).

در تحقیق حاضر در نتاجی با غلظت آفلاتوکسین صفر ممکن است در داخل سیتوپلاسم، هسته غیرزهرابه را بر هسته زهرابه چیره شده باشد. و با توجه به این‌که

در این تحقیق، الگوی بانندی حاصل از روش مولکولی rep-PCR بین نتاج هتروکاریون پایدار و جدایه والد زهرابه را مشابه بود و هم‌چنین با جدایه والد غیرتولید کننده زهرابه به جز در باند ۵۶۶ جفت بازی مشابه بود. با توجه به این که افراد متعلق به یک گروه سازگاری از نظر بسیاری از خصوصیات مشابه هستند، تشابه الگوی بانندی DNA تکثیر شده در جدایه‌های والد دور از انتظار نیست. از آنجا که با تشکیل هتروکاریون، هسته‌های متفاوت از نظر ژنتیکی متعلق به دو جدایه والد در یک سیتوپلاسم مشترک قرار می‌گیرند، وجود باند ۵۶۶ جفت بازی در جدایه‌های هتروکاریون غیر زهرابه‌زا نشان‌دهنده وقوع تلاقی موفق و تشکیل هتروکاریون حاصل از آن توسط دو جدایه والد زهرابه‌زا و غیر زهرابه‌زا باشد. به علت حضور هسته زهرابه‌زا در کنار هسته غیر زهرابه‌زا در جدایه‌های نتاج هتروکاریون غیر زهرابه‌زا، تشکیل باند ۵۶۶ جفت بازی در الگوی بانندی آنها (نتاج) رخ می‌دهد.

در ایران مطالعه‌ای در ارتباط با تأثیر آناستوموز ریشه‌ای در کاهش میزان تولید آفلاتوکسین در قارچ مهم *A. flavus* انجام نشده و این تحقیق اولین مطالعه صورت گرفته در کشور در این ارتباط است. با این حال مطالعات بیشتر در ارتباط با تأثیر آناستوموز ریشه‌ای در کاهش میزان تولید آفلاتوکسین می‌تواند اطلاعات و راه‌حل‌های جدیدی را در مدیریت میزان تولید آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی مهم از جمله پسته، بادام زمینی، ذرت، غلات، پنبه و غیره ارائه نماید.

### سپاسگزاری

هزینه انجام این تحقیق از محل اعتبارات صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری تأمین شده و نگارندگان

غلظت آفلاتوکسین هیچ کدام از نتاج برابر با والد زهرابه‌زا نمی‌باشد، به نظر می‌رسد که هسته غیر زهرابه‌زا در نتیجه آناستوموز ریشه‌ای توانسته است هسته زهرابه‌زا را تحت تأثیر قرار دهد. گرچه دامنه این تأثیر در نتاج مختلف فرق می‌کند. شاید بتوان با مطالعه بیشتر در آینده از ویژگی سازگاری رویشی برای معرفی سوش‌های غیر زهرابه‌زای قارچ جهت کنترل انواع زهرابه‌زا در طبیعت استفاده کرد. همچنان که یکی از استراتژی‌های مدیریت آفلاتوکسین در مزارع پنبه در آریزونای آمریکا استفاده از استرین‌های غیر زهرابه‌زا است (Cotty 1994). گرچه عنوان شده که رقابت بر سر جا و مواد غذایی یکی از مکانیسم‌های اصلی جدایه‌های غیر زهرابه‌زا در کاهش میزان تولید آفلاتوکسین توسط جدایه‌های زهرابه‌زا روی گیاهان پنبه می‌باشد.

محققین معتقدند ممکن است مکانیسم‌های دیگری مانند سازگاری رویشی نیز در این امر دخیل باشند ولی نقش این مکانیسم‌ها در مقایسه با مکانیسم رقابت مبهم و کم‌رنگ است. هورن و همکاران (Horn et al. 2000) نیز ممانعت از تولید آفلاتوکسین B<sub>1</sub> را در جدایه‌های قارچ *A. parasiticus* با استفاده از جدایه‌های غیرتولیدکننده آفلاتوکسین بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که وجود سازگاری رویشی در یک جمعیت ممکن است اهمیت نسبی از نظر کنترل بیولوژیکی آلودگی آفلاتوکسینی در محصولات داشته باشد. در تحقیق حاضر هم تأثیر نسبی آناستوموز ریشه‌ای در کاهش تولید آفلاتوکسین در نتاج معلوم شد. به هر حال، نقش آناستوموز ریشه‌ای و سازگاری رویشی در کنترل بیولوژیکی آلودگی آفلاتوکسینی نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.

بر خود لازم می‌دانند که از مسئولین آن قدردانی نمایند. هم‌چنین، از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم آوردن شرایط لازم برای این تحقیق تشکر به عمل می‌آید.

#### منابع

جهت ملاحظه به صفحات (33-35) متن انگلیسی مراجعه شود.