بررسی نقش اسیدهای چرب مغز پسته در رشد *Aspergillus* section *Flavi* و تولید آفلاتوکسین در ارقام پسته ایران

مهدی محمدی مقدم[1*]، احمد شاکر اردکانی[2]، امیرحسین محمدی[3]، علیرضا برجسته[4] و حمید رضا ضیاالحق[5]

تاریخ ارسال: ۱۴۰۴/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۰۹

چکیده

امروزه آلودگی محصولات کشاورزی به زهرابه‌های قارچی، خصوصاً آفلاتوکسین‌ها، از مهم‌ترین معضلات بهداشتی محسوب می‌شود. و نگرانی جهانی در ایمنی غذایی به‌شمار می‌رود. آفلاتوکسین‌ها مهم‌ترین زهرابه‌های قارچی هستند که توسط برخی گونه‌های قارچ آسپرژیلوس تولید می‌گردد. آلودگی پسته به گونه‌های قارچ‌های بخش فلاوی و آفلاتوکسین باعث شده که صادرات آن به کشورهای اتحادیه اروپا با محدودیت روبرو گردد. یکی از راهبردهای اصلی مدیریتی مقابله با تشکیل آفلاتوکسین‌ها در محصولات کشاورزی در مرحله پیش از برداشت، ارزیابی مقاومت ارقام پسته به قارچ *Aspergillus flavus* و ارتباط آن با میزان ترکیبات شیمیایی ارقام پسته محسوب می‌گردد. به این منظور در این تحقیق، با اندازه‌گیری میزان چربی و اسیدهای چرب مغز ارقام پسته، رابطهٔ احتمالی بین میزان این ترکیبات با مقاومت مغز ارقام پسته نسبت به رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفت. چربی مغز پسته به روش سوکسیله و نوع و میزان اسیدهای چرب به روش کروماتوگرافی گازی (GC) اندازه‌گیری شد. به‌منظور بررسی ارتباط بین چربی و اسیدهای چرب مغز ارقام پسته با میزان رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین، ضریب همبستگی (r) محاسبه گردید. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین میزان رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین با میزان چربی و انواع اسیدهای چرب مغز ارقام پسته وجود ندارد. و ممکن است بسیاری از فاکتورهای شیمیایی و فیزیکی دیگر در این امر دخیل باشند.

واژه‌های کلیدی: *Aspergillus flavus*، آفلاتوکسین، پسته، رقم، ترکیبات شیمیایی، مقاومت.

۱ بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران.

۲ ایستگاه تحقیقات پسته اردکان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یزد، ایران.

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

۴ بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران.

۵ بخش تحقیقات فنی و مهندسی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران.

* نویسنده مسئول: mm.moghadam52@gmail.com

مقدمه

یکی از مهمترین چالش‌های پیش روی امنیت غذایی و سلامت جامعه انسانی وجود مایکوتوکسین ها، به ویژه آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی به خصوص خشکبار می‌باشد، که باعث وضع قوانین و مقررات سخت‌گیرانه و هزینه‌های مختلف جهت مدیریت آلودگی در سطوح مختلف از تولید تا مصرف می‌گردد (Bennett & Klich, 2003).

آفلاتوکسین ها متابولیت‌های ثانویه قارچی هستند که در بسیاری از محصولات کشاورزی و به طور عمده در ذرت و محصولات خشکباری در مراحل قبل از برداشت تولید می‌شوند؛ اما تأخیر در برداشت، عدم فرآوری مناسب، وجود میوه‌های آلوده و شرایط نامساعد انبارداری نیز می‌تواند موجب تشدید آلودگی در مراحل پس از برداشت گردد (Cotty & Jamie-Garcia, 2007; Moradi and Hokmabadi, 2011; Probst *et al*., 2007, 2010) بنابراین برای پیشگیری از آلودگی به آفلاتوکسین و آلودگی به آسپرژیلوس، مدیریت محصول در مزرعه و اطمینان از بهینه بودن شرایط نگهداری محصولات پس از برداشت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Kaminiaris & Tsitsigiannis, 2020).

در شرایط خاص دمایی و رطوبتی، میوه‌های پسته می‌تواند توسط جدایه‌های مولد آفلاتوکسین متعلق به *Aspergillus* section *Flavi* آلوده شده که نتیجه آن بیوسنتز و تجمع آفلاتوکسین در میوه پسته می‌باشد (Rushing & Selim, 2019). از میان حدود ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناخته شده، آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1 و G2 در محصولات کشاورزی گزارش شده‌اند (Torre *et al*., 2018) که دارای اثرات منفی روی سلامت انسان‌ها و حیوانات اهلی می‌باشند (Liu *et al*., 2012; Probst, 2007). آفلاتوکسین B1 سمی‌ترین و فراوان‌ترین آنها بوده که طبق تقسیم‌بندی آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان، به عنوان یک عامل سرطان‌زای گروه یک و سرکوب کننده سیستم ایمنی در انسان‌ها محسوب می‌شود (IARC, 2002; Rushing & Selim, 2019).

بدون شک تولید متابولیت‌های ثانویه یا توکسین‌ها مهمترین دلیل اهمیت *Aspergillus* section *Flavi* در کشاورزی، پزشکی و صنعت به شمار می‌رود. آفلاتوکسین، اوکراتوکسین، ورسیکلورین، استریگماتوسیستین، گلیوتوکسین، سیترینین، سیکلوپیازونیک اسید، پاتولین و سیترئوویریدین از مهمترین توکسین‌های قارچی هستند که توسط گونه‌های مختلف جنس آسپرژیلوس تولید می‌شوند (Frisvad *et al*., 2006). آفلاتوکسین، اوکراتوکسین و پاتولین از لحاظ اقتصادی از مهمترین توکسین‌های تولید شده توسط این جنس هستند (Abbas, 2005; Varga *et al*., 2003).

از میان ۳۳ گونه موجود در بخش *Flavi* جنس *Aspergillus*، ۱۸ گونه قادر به تولید آفلاتوکسین یا ماده

3-O-methylsterimatocystin به عنوان پیش ساز آفلاتوکسین می‌باشند که مهمترین آنها عبارتند از *A. flavus*، *A. sergii*، *A. parasiticus*، *A. nomius*، *A. pseudotamari*، *A. novoparasiticus* (Frisvad *et al*., 2019).

برای کنترل آلودگی قارچی امکان تیمار حرارتی و تیمار شیمیایی وجود دارد. روش‌های کنترل شیمیایی سنتی همیشه نه اقتصادی می‌باشند و نه موثر و حتی تدخین همانند سایر روش‌های کنترل شیمیایی ممکن است خطرات ناخواسته برای سلامت، ایمنی و محیط زیست داشته باشد. لذا استفاده از ارقام مقاوم در جلوگیری از رشد *A. flavus* و آفلاتوکسین ناشی از رشد آن مورد توجه قرار گرفته و تلاش‌های گسترده‌ای برای بکارگیری آنها در کنترل بیماری‌های گیاهی صورت پذیرفته است. (Brown *et al*., 2013; Cary *et al*., 2011; Nigam *et al*., 2009; Liang *et al*., 2006).

در حال حاضر ایران، آمریکا، ترکیه، یونان، سوریه و افغانستان، بزرگترین کشورهای صادر کننده پسته در دنیا محسوب می‌شوند (آمارنامه وزارت صنعت، معدن و تجارت، ۱۳۹۷). در ایران از حدود ۲/۵ میلیون هکتار سطح زیرکشت باغ‌های میوه بارور در سال ۱۳۹۸، پسته با ۱۶/۲ درصد در رتبه اول سطح زیرکشت قرار گرفته است. در کل کشور حدود ۵۱۹ هزار هکتار باغ پسته وجود دارد که از این میزان حدود ۴۰۶ هزار هکتار باغ پسته بارور و حدود ۱۱۲ هزار هکتار باغ غیربارور می‌باشند. همچنین در سال ۱۳۹۸ میزان تولید پسته ایران حدود ۳۳۷ هزار تن بوده که در مقایسه با میزان تولید پسته در سال ۱۳۹۷ (۱۷۳ هزارتن)، افزایش حدود ۵۰ درصدی را نشان می‌دهد (احمدی و همکاران، ۱۳۹۹).

ایران به عنوان مهم‌ترین مرکز تنوع ژنتیکی پسته در دنیا شناخته می‌شود، که غنی‌ترین ژرم‌پلاسم پسته دنیا را در دل خود جای داده است. در حال حاضر بیش از ۱۵۰ رقم پسته در ایران شناسایی و در کلکسیون‌های پسته در استان‌های کرمان، سمنان، قزوین و خراسان رضوی نگهداری می‌شود. با این وجود تعداد ارقام و ژنوتیپ‌هایی که هنوز شناسایی نشده، ولی در باغات پسته کشور وجود دارند، به بیش از ۱۵۰ رقم می‌رسد. به عبارتی، در حال حاضر بیش از ۳۰۰ رقم پسته در نقاط مختلف کشور مورد کشت و کار قرار می‌گیرند، که می‌توانند به عنوان یک منبع ژنتیکی منحصر به فرد در برنامه‌های اصلاحی و به نژادی مورد استفاده قرار گیرند (اسماعیل‌پور و تاج‌آبادی‌پور، ۱۳۸۴). با توجه به ارزش اقتصادی محصول پسته و تنوع ارقام پسته در کشور، بررسی مقاومت ارقام پسته ایران نسبت به رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین می‌تواند راهکارهای کاربردی برای ایجاد پایداری در تولید و صادرات این محصول ارزشمند و ارزآوری آن را ارائه نماید. از بین روش‌های مدیریت آفلاتوکسین، استفاده از ارقام مقاوم

به رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین، بسیار امیدبخش بوده است (Abbas *et al*, 2005).

در سال‌های اخیر، معضل اصلی و مهم کشور در عرصه صادرات پسته، مسأله آلودگی پسته به *A. flavus* و آفلاتوکسین بوده است. بنابراین با توجه به اهمیت موضوع، جنبه‌های مختلف موضوع آلودگی پسته به *A. flavus* و آفلاتوکسین باید به طور جدی مورد مطالعه قرار گیرد. به این منظور در این تحقیق، در ابتدا میزان مقاومت ارقام پسته به *A. flavus* و آفلاتوکسین تعیین گردید و با توجه به اینکه تفاوت در ترکیبات شیمیایی میوه ارقام مختلف پسته (به عنوان مثال میزان پروتئین و انواع اسیدهای آمینه، میزان چربی وانواع اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع، میزان ترکیبات فنولیک و .....) می‌تواند مبنای حساسیت یا مقاومت به رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین محسوب گردد، لذا در این تحقیق با اندازه‌گیری میزان چربی و انواع اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع ارقام پسته، رابطهٔ احتمالی بین میزان این ترکیبات با مقاومت مغز ارقام پسته نسبت به رشد و تولید آفلاتوکسین توسط *A. flavus* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب و جمع آوری ارقام مهم پسته کشور

با توجه به کثرت و تنوع ارقام پسته اهلی ایران که در دنیا بی‌نظیر است، ضروریست تحقیقی اساسی پیرامون مقاومت آنها به رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین انجام پذیرد، لذا در این تحقیق ارقام مهم پسته از مناطق پسته خیز کشور جمع‌آوری شد.

برای جلوگیری از آسیب دیدن پوسته رویی مغز پسته (Testa)، نمونه‌برداری در زمان برداشت پسته، از درخت انجام شد. بعد از برداشت، پسته‌های آفت زده و آنهایی که احتمال آلودگی وجود داشت، حذف گردید. سپس پوست بیرونی و نرم پسته توسط دست از پوست شاخی آن جدا گردید تا هیچ آسیبی به پوسته مغز پسته وارد نگردد. پس از آن، پسته‌ها در آفتاب خشک و رطوبت آنها به شش درصد رسانده شد و برای انجام آزمایش در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) مورد استفاده قرار گرفت. ارقام جمع‌آوری شده عبارتند از: ارقام اکبری و کله قوچی از منطقه رفسنجان، ارقام شاهپسند، عباسعلی و خنجری از منطقه دامغان و رقم پسته گرمه از منطقه فیض آباد استان خراسان رضوی.

جداسازی جدایه بومی (Native strain) توکسین‌زای *Aspergillus flavus* از مناطق پسته‌کاری رفسنجان

به منظور بررسی مقاومت ارقام پسته نسبت به رشد قارچ‌های مولد توکسین، اقدام به جداسازی یک جدایه بومی توکسین‌زا از منطقه رفسنجان، به عنوان مهمترین منطقه کشت پسته در کشور گردید. بدین منظور از مغز پسته نمونه‌برداری شد. نمونه‌های پسته به روش کشت رقتی در سطح پتری حاوی محیط کشت اختصاصی AFPA کشت گردید. پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه

سانتی‌گراد نگهداری شد. دو تا سه روز بعد از کشت، پرگنه‌های *A. flavus* شناسایی و جداسازی گردید. برای شناسایی مرفولوژیکی جدایه‌ها از ویژگی‌هایی همچون شکل، رنگ و اندازه کنیدی، کنیدیوفور، وزیکول و سلول پایه و همچنین مشخصات استریگماتا، رشد در محیط‌های کشت و دماهای مختلف استفاده گردید (Klich, 2002). با توجه به اینکه تمام جدایه‌های قارچ *A. flavus* توکسین زا نمی‌باشند، به منظور بررسی توان توکسین زایی جدایه‌ها و انتخاب یک جدایه توکسین زا، از روش غربالگری اولیه جدایه‌ها با استفاده از محیط کشت، و کشت جدایه‌ها در محیط کشت برنج و سنجش توان توکسین‌زایی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک استفاده گردید.

ارزیابی مقاومت ارقام پسته به *Aspergillus flavus* در شرایط آزمایشگاهی (KSA)

به منظور بررسی مقاومت ارقام پسته به رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین، از روش مرسوم و متداول KSA استفاده گردید. مبنای این روش، بررسی مقاومت مغز ارقام محصولات زراعی و باغی، در شرایط آزمایشگاهی به رشد و کلنیزاسیون *A. flavus* است، که روش سنجش و غربالگری سریع آزمایشگاهی در مورد ارقام محصولات مختلف به قارچ *A. flavus* می‌باشد. مغز یا دانه، مهمترین بافت مورد حمله *A. flavus* می‌باشد (Brown *et al*., 2013; Cary *et al*., 2011). قبل از انجام این آزمایش، برای اطمینان از عدم آلودگی پسته به آسپرژیلوس فلاووس، ابتدا ۴۵ گرم مغز پسته در ۳ تکرار ۱۵ گرمی انتخاب شد. نمونه ابتدا توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، ضد عفونی و سپس با آب مقطر استریل شستشو داده شد. بعد از آن، برای جذب رطوبت اولیه، مغزها به مدت ۱۰ دقیقه داخل آب مقطر غوطه‌ور شد. مغزها داخل پتری‌های استریل قرار داده شد و یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آنها اضافه گردید. برای تأمین رطوبت کافی (در حد اشباع) پتری‌های حاوی مغز پسته، داخل ظروف پلاستیکی درب‌دار که در کف آن مقداری آب مقطر ریخته شده بود، قرار داده شده و در انکوباتور در ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری شد. بعد از این مدت احتمال آلودگی مغزهای پسته به قارچ آسپرژیلوس مورد بررسی قرار گرفت. بعد از این مرحله و اطمینان از عدم آلودگی پسته‌ها، به منظور سنجش و ارزیابی مقاومت ارقام پسته به قارچ *A. flavus* در شرایط آزمایشگاهی (KSA) ابتدا جدایه بومی توکسین‌زای *A. flavus* که در مرحله قبل جداسازی شده بود، در محیط کشت MEA داخل لوله اسلنت (Slant) کشت داده شد، ۱۰-۸ روز بعد، پس از رشد و اسپورزایی قارچ، مقداری آب مقطر استریل به همراه چند قطره Tween 20 به داخل اسلنت‌ها اضافه گردید. با استفاده از لام گلبول شمار غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد. برای هر رقم پسته سه تکرار و یک شاهد در نظر گرفته شد. داخل هر پتری (حاوی ۱۵ گرم مغز پسته) یک

میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ اضافه گردید.سپس پتری‌ها در ظروف پلاستیکی قرار داده شد و در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از رشد قارچ و کلنیزه شدن سطح پسته‌ها توسط قارچ، میزان کلنیزاسیون قارچ در سطح پسته‌ها در روز هشتم مورد محاسبه قرار گرفت (Brown *et al*., 2013; Cary *et al*., 2011).

محاسبه میزان اسپورزایی قارچ در مغز ارقام پسته

برای محاسبه میزان اسپورزایی قارچ در روز هشتم، پسته‌های کلنیزه شده هر پتری با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد و در داخل یک ارلن ریخته شده و سپس به مدت ۱۲ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. در مرحله بعد، میزان اسپور موجود در آب مقطر (۱۰۰ میلی لیتر) توسط لام گلبول شمار شمارش گردید و به عنوان میزان اسپور تولید شده در اثر رشد قارچ در ۱۵ گرم مغز پسته هر پتری منظور شد.

سنجش میزان آفلاتوکسین تولید شده در مغز ارقام پسته

هشت روز بعد از تلقیح و رشد قارچ بر روی مغز ارقام پسته، برای تعیین میزان آفلاتوکسین در نمونه‌های پسته، ابتدا نمونه‌ها در آون در حرارت ۶۰ درجه سانتی-گراد خشک و سپس آسیاب شد. جهت سنجش میزان آلودگی نمونه‌ها به انواع آفلاتوکسین از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، استفاده شد.

آنالیز آفلاتوکسین نمونه‌ها با دستگاه HPLC (Waters, USA) طبق روش ذیل انجام گردید. برای آنالیز آفلاتوکسین‌ها در پسته، ابتدا نمونه‌های پسته با آب به نسبت ۱به ۳ با استفاده از دستگاه slurry به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط گردید، سپس ۳۰ گرم از نمونه slurry با ۹۰ میلی‌لیتر متانول خالص مخلوط شده و استخراج با استفاده از دستگاه آسیاب waring به مدت ۳ دقیقه انجام گردید. مایع به دست آمده با استفاده از فیلتر صاف گردیده و ۸ میلی لیتر از آن با ۴۲ میلی‌لیتر بافر فسفات مخلوط شد. برای خالص سازی نمونه از ستون‌های حاوی آنتی‌بادی بنام ستون‌های ایمونوافینیتی استفاده گردید. ابتدا برای آماده سازی ستون، ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات از ستون عبور داده شد، سپس ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره مخلوط شده با بافر فسفات از ستون عبور داده شد و مجدداً ستون با ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات شسته شد. پس از خشک کردن ستون ۵۰۰ میکرولیتر متانول با درجه خلوص کروماتوگرافی مایع از ستون عبور داده شد و پس از یک دقیقه توقف، مجدداً ۷۵۰ μl از متانول از ستون عبور داده شد. پس از جمع‌آوری کل فاز متانول ۱۷۵۰ μl آب به آن اضافه گردید و نهایتاً ۲۰۰ μl از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. برای آنالیز AF موجود در نمونه، از ترسیم منحنی کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای خالص AF استفاده گردید. بدین منظور هفت غلظت مختلف از AFB1 در محدوده غلظتی ۰/۴ ng/ml تا

۲/۷ng/ml تهیه و ۲۰۰ μl از آنها به دستگاه HPLC تزریق گردید و بر مبنای معادله خط به دست آمده، غلظت AF در نمونه‌ها محاسبه گردید. در مورد دستگاه HPLC فاز متحرک، متانول/آب به میزان ۴۰ به ۶۰ و برای مشتق سازی از برمید پتاسیم، اسید نیتریک و دستگاه کبراسل استفاده گردید. ستون مورد استفاده (partisil 5 ODS3 ساخت آمریکا) ستون کرومولیت (10cm) و قطر داخلی آن ۴/۶ میلی‌متر بود. دمای ستون در هنگام آنالیز روی ۳۵ ^{o}C تنظیم شد و سرعت جریان فاز متحرک ۲/۵ ml/min بود و آشکار ساز مورد استفاده آشکار ساز فلورسانس و طول موج برانگیختگی و نشر آن به ترتیب برابر ۳۶۵ و ۴۳۵ نانومتر بود. (استاندارد ملی ایران شماره ۵۱۹۷).

اندازه‌گیری چربی ارقام مختلف پسته

مقدار چربی پسته ارقام مختلف، براساس استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۶۲ و به روش سوکسله اندازه‌گیری گردید (بی نام، ۱۳۸۳). بر این مبنا دو تا پنج گرم پسته آسیاب شده با ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ توزین و پس از پیچیدن در کاغذ صافی در داخل کارتوش گذاشته شد. کارتوش در یک کاپ شیشه‌ای دستگاه اتوماتیک سوکسله که قبلاً به وزن ثابت رسانیده و دقیقاً توزین گردیده است، قرار داده شد، سپس ۱۵۰ میلی‌لیتر ان هگزان به آن اضافه و به دستگاه سوکسله متصل گردید. چربی نمونه با حلال ان هگزان و در دمای ۶۹ Cº (نقطه جوش ان هگزان) خارج گردید. پس از طی مدت سه الی چهار ساعت و پایان کار دستگاه، کاپ در آون با دمای۴۰ Cº تا ۶۰ Cº گذاشته شد، تا هگزان باقیمانده خارج شود. پس از یک ساعت کاپ در دسیکاتور خنک و سپس وزن گردید. مقدار درصد چربی پسته از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\%fat = \frac{(w_1 - w_2)}{w_0} \times 100$$

w_0 = وزن پسته، w_1 = وزن کاپ خالی، w_2 = وزن کاپ نهایی

تجزیه اسیدهای چرب روغن پسته استخراجی

تجزیه اسیدهای چرب لیپیدها بوسیله کروماتوگرافی گازی (GC)، ابزاری کارا در آنالیزهای مقیاس میکرو اسیدهای چرب در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف است. برای مثال در تحقیقات زیست پزشکی، داده‌های GC مربوط به اسیدهای چرب بدن انسان در انتهای دهه ۱۹۵۰ منتشر گردید (Costa *et al*., 2011). ظهور اسیدهای چرب چند غیراشباع اصلی و خصوصاً متابولیسم اسیدهای چرب ضروری با جزئیات کامل بوسیله GC قابل تفسیر است. روش‌های مکتوب جزئیات ژنتیکی روغن زیتون تاکنون با استفاده از GC انتشار یافته است و امروزه بسیاری از آزمایشگاه‌ها از GC برای آنالیز ترکیب اسید چرب مواد و بافت‌های مختلف مانند غشا سلول، میکروارگانیسم‌ها و پلاسما استفاده می‌کنند. طبق استاندارد روش‌های آنالیز AOAC برای اندازه‌گیری مقدار کل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع

و مقدار هریک از اسیدهای چرب از روش کروماتوگرافی گازی استفاده می‌شود (روش AOAC شماره ۹۹۶/۰۱).

امروزه روش‌های استریفیکاسیون، تکنیک‌های تزریق و ستون‌های آنالیز با جزئیات کامل برای تجزیه و تشخیص اسیدهای چرب شرح داده شده است. در حال حاضر آنالیز اسیدهای چرب با GC (بصورت متیل های استر) در روغن‌ها (مانند روغن ماهی و روغن زیتون)، چربی (شیر) و روغن‌های فرایند شده (مانند روغن‌های هیدروژنه و خالص شده) بعنوان یک تکنیک بسیار کارا شناخته شده است (Ruiz-Rodriguez *et al*., 2010). بر این مبنا در این تحقیق نیز برای آنالیز پروفایل اسیدهای چرب موجود در روغن پسته، از روش کروماتوگرافی گازی استفاده گردید.

تهیه متیل استرهای اسید چرب در روغن پسته

ابتدا ۱۵ قطره از روغن پسته را در لوله آزمایش ریخته و سپس به آن هفت میلی‌لیتر ان هگزان مخصوص GC و دو میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم متانولی مخصوص GC اضافه شد. سپس ۲۰ دقیقه در بن ماری ۵۰-۵۵ Cº گذاشته شد که در این مدت هر پنج دقیقه یکبار (سه بار)، به مدت یک دقیقه در دستگاه ورتکس به شدت همزده شد و در پنج دقیقه پایانی ثابت نگه داشته شد. از فاز رویی تشکیل شده در لوله آزمایش به کمک میکروسمپلر مقدار یک تا دو میکرولیتر برداشته و به دستگاه GC تزریق گردید.

کروماتوگرافی گازی (GC)

کروماتوگرافی گازی یک روش فیزیکی جداسازی مخلوط مواد است که با تبدیل نمودن به بخار یا گاز و عبور آن از یک فاز ساکن، اجزا سازنده‌اش را از یکدیگر جدا می‌کند. حاصل این جداسازی تعیین نوع و مقدار اجزا سازنده مخلوط است. این روش ساده و سریع برای تشخیص اسیدهای چرب روغن پسته در این تحقیق استفاده شد. در اینجا گاز نیتروژن (فاز متحرک) از درون ستون مویینه حاوی مواد جاذب (فاز ساکن) عبور می‌کند. گاز نیتروژن یک گاز بی اثر است که با فاز ساکن، حلال و نمونه واکنش نمی‌دهد. دما و فشار و سرعت جریان گاز درون ستون تنظیم می‌گردد. ستون بکار رفته یک ستون با قطر بسیار نازک (قطر داخلی ۰/۲۵ mm) و طول بلند (۳۰m) می‌باشد. فاز ساکن یک ماده جاذب جامد یا پوشش داده شده دارای چند پیوند با یک جامد بر روی دیواره ستون است. نمونه در فاز متحرک حل شده و از روی فاز ساکن که بصورت لایه نازک (ضخامت ۰/۲۵ mμ) بر روی ذرات جامد گسترده است، عبور می‌نماید. مقدار ۲ mμ از مخلوط متیل استر اسیدهای چرب در ابتدای لوله جاذب تزریق می‌گردد. نمونه در فاز گاز محلول است و اجزا آن برحسب ضریب توزیع خود مابین دو فاز ثابت و متحرک تقسیم می‌گردد. سپس گازهای یونش یافته به یک الکترومتر هدایت می‌شوند. گازها از نظر هدایت حرارتی متفاوت

عمل می‌کنند و در نهایت از روی آشکارساز (Detector) عبور کرده و شناسایی می‌شوند.

روش تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق، آزمایشات در سه تکرار و در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی اجرا گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 17.01 انجام شد. برای مقایسات میانگین و آزمون معنی‌دار بودن میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید. به منظور بررسی ارتباط بین رشد قارچ با ترکیبات شیمیایی مغز ارقام پسته، از آزمون همبستگی و تفسیر ضریب همبستگی (r) در سطوح یک و پنج درصد و معادلات رگرسیون استفاده گردید.

نتایج

مطالعه میزان مقاومت ارقام پسته به *Aspergillus flavus*

همان‌طوری‌که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ۸ روز بعد از مایه‌زنی، میزان رشد قارچ و کلنیزاسیون مغز پسته در ارقام مختلف متفاوت از یکدیگر بود. در بین ارقام مورد آزمایش، رقم شاه پسند کمترین میزان مقاومت و در مقابل رقم‌های خنجری و پسته گرمه بیشترین مقاومت را نسبت به رشد *A. flavus* از خود نشان دادند. میانگین درصد کلنیزاسیون *Aspergillus flavus* بر روی مغز پسته ارقام مختلف بین ۵۰/۵ تا ۷۳/۶ درصد متغیر بود. همانطوریکه نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد، تفاوت معنی‌داری در میزان رشد قارچ و کلنیزاسیون مغز پسته در ارقام عباسعلی، کله قوچی و اکبری مشاهده نگردید، و این سه رقم در یک گروه قرار گرفتند.

جدول ۱ - مقایسه میانگین درصد کلنیزاسیون *Aspergillus flavus* بر روی مغز ارقام پسته.

ارقام پسته	میانگین درصد کلونیزاسیون مغز پسته	گروه‌بندی آماری (α=٪۵)
شاه‌پسند	۷۳/۶	a
عباسعلی	۶۲/۸	b
کله‌قوچی	۶۰/۳	b
اکبری	۶۱	b
خنجری	۴۷/۱	c
پسته گرمه	۵۰/۵	c

میانگین هایی که دارای حروف مشابه می باشند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند.

جدول ۲ - نتایج تجزیه واریانس اثر رقم پسته بر رشد و کلنیزاسیون مغز پسته توسط *A. flavus*

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم پسته	۵	**۲۶۶/۹۵
خطای آزمایش	۱۲	۱۲/۶۸
ضریب تغییرات(CV)	-	۵/۹۱

نتایج میزان اسپورزایی *Aspergillus flavus* روی مغز ارقام پسته

نتایج مربوط به میزان اسپورزایی *A. flavus* روی مغز ارقام مختلف پسته در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطوریکه مشاهده می‌شود، در بین ارقام مورد آزمایش ارقام شاه پسند و پسته گرمه با ۶/۱×۱۰^۵ و ۵/۵×۱۰^۵ اسپور در میلی‌لیتر، به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان اسپور تولید شده ناشی از رشد قارچ در روی مغز پسته ارقام مختلف بودند. همانطوریکه نتایج نشان می‌دهد، ارقامی مثل شاه پسند و عباسعلی که میانگین درصد کلنیزاسیون قارچ *Aspergillus flavus* بر روی مغز پسته آنها بیشتر از سایر ارقام بود، میزان اسپور تولید شده در آنها نیز بیشتر از ارقام دیگر بود. همانطوریکه نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد، تفاوت معنی‌داری در اسپورزایی *A. flavus* روی مغز پسته ارقام خنجری و اکبری مشاهده نگردید.

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان اسپورزایی *A. flavus* روی مغز ارقام پسته.

ارقام پسته	میانگین میزان اسپورزایی قارچ *A. flavus*	گروه‌بندی آماری (α=٪۵)
شاه‌پسند	۶/۱۶۶۷ E۶	a
عباسعلی	۵/۷۶۶۷ E۶	b
کله‌قوچی	۵/۳۳۳۳ E۶	c
خنجری	۴/۵۶۶۷ E۶	d
اکبری	۴/۵۰۰۰ E۶	d
پسته گرمه	۵/۵۰۰۰ E۶	c

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه می باشند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۴ - نتایج تجزیه واریانس اثر رقم پسته بر میزان اسپورزایی *A. flavus* روی مغز ارقام پسته.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم پسته	۵	۱/۳۱۳E۱۲ **
خطای آزمایش	۱۲	۱/۷۲۲E۱۰
ضریب تغییرات (CV)	-	۲۱/۵۹

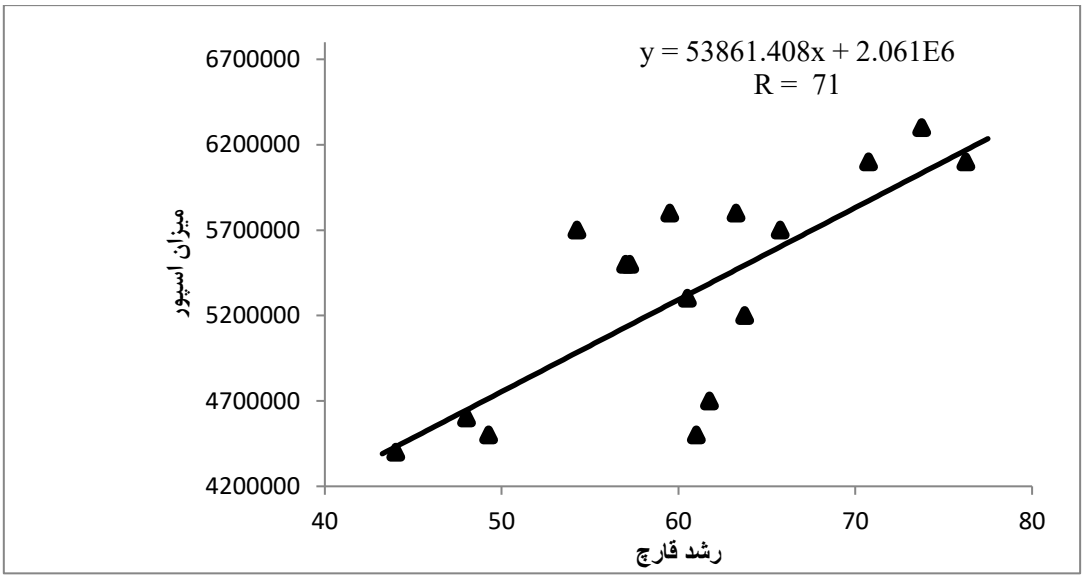
بررسی ارتباط بین میزان رشد *Aspergillu flavus* با میزان اسپورزایی قارچ روی مغز ارقام پسته

برای نشان دادن رابطه احتمالی بین میزان رشد *A. flavus* با میزان اسپورزایی قارچ روی مغز پسته ارقام مختلف، ضریب همبستگی (r) محاسبه گردید (جدول ۵). نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بین میزان رشد *A. flavus* با میزان اسپورزایی قارچ روی مغز ارقام پسته رابطه مثبت و معنی‌داری وجود دارد (r = %71). به عبارت دیگر با افزایش رشد و کلنیزاسیون قارچ *A. flavus* روی مغز پسته، میزان اسپورزایی قارچ نیز افزایش می‌یابد (شکل ۱).

جدول ۵- ضریب همبستگی بین میزان رشد *A. flavus* با میزان اسپورزایی قارچ روی مغز ارقام پسته.

زوج متغیرها	a	b	r	r^2
میزان رشد *A.flavus* × میزان اسپورزایی قارچ	۲/۰۶۱ E۶	۵۳۸۶۱/۴۰۸	۰/۷۱۵	۰/۵۱۲

* دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد.



شکل ۱- ارتباط بین میزان رشد *A. flavus* با میزان اسپورزایی قارچ روی مغز ارقام پسته.

مطالعه میزان تولید آفلاتوکسین در ارقام پسته

نتایج سنجش کمی میزان آفلاتوکسین تولید شده در مغز پسته در جدول ۶ نشان داده شده است. همانطوریکه مشاهده می‌شود هشت روز بعد از مایه‌زنی، میزان تولید آفلاتوکسین روی مغز پسته ارقام مختلف در سطح ۵٪ دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد و در بین ارقام مورد آزمایش، رقم شاه‌پسند دارای بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین بوده و در رقم پسته گرمه کمترین

میزان آفلاتوکسین تولید شده است. همانطوریکه نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد، تفاوت معنی‌داری در میزان تولید آفلاتوکسین در ارقام خنجری، کله قوچی و اکبری مشاهده نگردید و این سه رقم در یک گروه قرار گرفتند.

جدول ۶- مقایسه میانگین تولید آفلاتوکسین در مغز ارقام پسته.

ارقام پسته	میانگین میزان آفلاتوکسین (ppb)	گروه‌بندی آماری (α=٪۵)
شاه‌پسند	۱۶۰۸۲/۷	a
عباسعلی	۱۳۹۶۴/۷	b
کله‌قوچی	۱۲۲۲۸/۳	c
خنجری	۱۲۳۶۰/۳	c
اکبری	۱۲۰۳۷/۳	c
پسته گرمه	۹۹۹۳/۷	d

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس اثر رقم پسته بر تولید آفلاتوکسین در مغز ارقام پسته.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم پسته	۵	۱۲۶۶۰۰۰۰ **
خطای آزمایش	۱۲	۴۰۳۶۸۰/۵
ضریب تغییرات(CV)	-	۴/۹۷

** دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ درصد.

درصد چربی موجود در مغز ارقام پسته

درصد چربی مغز ارقام مختلف پسته به روش مرسوم و متداول سوکسله اندازه گیری شد. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین درصد چربی مغز ارقام مختلف پسته (در سطح احتمال ۰/۰۵) وجود دارد. بطوریکه بیشترین درصد چربی مربوط به رقم عباسعلی (۵۸/۳۰ ٪) و کمترین مبزان نیز مربوط به رقم کله قوچی (۵۱/۰۸٪) بود. درصد چربی ارقام مورد آزمایش بین ۵۱/۰۸ تا ۵۸/۳۰ درصد متغیر بود که این نتایج در جدول شماره ۸ نشان داده شده است.

جدول ۸- مقایسه میانگین درصد چربی موجود در مغز ارقام پسته.

ارقام پسته	میانگین درصد چربی مغز پسته	گروه‌بندی آماری (α=٪۵)
شاه‌پسند	۵۶/۹۸	b
عباسعلی	۵۸/۳۰	a
کله‌قوچی	۵۱/۰۸	d
خنجری	۵۴/۰۷	c
اکبری	۵۶/۸۷	b
پسته گرمه	۵۴/۳۷	c

*حروف مشابه بعد از میانگین‌ها در هر ستون نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین آن‌هاست (روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

جدول ۹ - نتایج تجزیه واریانس اثر رقم پسته بر درصد چربی مغز پسته ارقام مختلف.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم پسته	۵	۱۳/۹۵۵ *
خطای آزمایش	۱۲	۰/۰۶۸
ضریب تغییرات (CV)	-	۶/۷۷

* دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد.

بررسی ارتباط بین میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین با درصد چربی مغز ارقام پسته

برای نشان دادن رابطه احتمالی بین میزان رشد *A. flavus* با درصد چربی مغز ارقام پسته، ضریب همبستگی (*r*) محاسبه گردید. نتایج بررسی‌های آماری حاصل از انجام این تحقیق گویای آن است که ارتباط معنی‌داری بین درصد چربی موجود در مغز ارقام پسته با میزان رشد *A. flavus* وجود ندارد. نتایج بررسی‌های آماری همچنین نشان داد که بین درصد چربی موجود در مغز ارقام پسته با میزان تولید آفلاتوکسین در مغز این ارقام نیز، رابطه معنی‌داری وجود ندارد. به عبارت دیگر افزایش یا کاهش درصد چربی ارقام پسته نمی‌تواند مبنایی برای افزایش یا کاهش مقاومت به رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین در مغز ارقام پسته مورد آزمایش باشد (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- ضریب همبستگی بین درصد چربی مغز ارقام پسته با میزان رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین.

زوج متغیرها	a	b	r	r^2
میزان رشد قارچ × درصد چربی	۴۱/۴۶۳	۰/۳۲۱	۰/۰۹۹	۰/۰۱۰
تولید آفلاتوکسین × درصد چربی	-۹۸۲۰/۷۶۹	۴۰۴/۳۶۱	۰/۴۸۴	۰/۲۳۵

پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع مغز ارقام پسته با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی (*GC*)

در این تحقیق، برای آنالیز پروفایل اسیدهای چرب موجود در چربی پسته ارقام مورد آزمایش، از روش کروماتوگرافی گازی (*GC*) استفاده گردید. پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع مغز ارقام پسته مورد آزمایش در جدول ۱۱ نشان داده شده است.

جدول ۱۱- پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع مغز ارقام پسته با روش کروماتوگرافی گازی (*GC*)

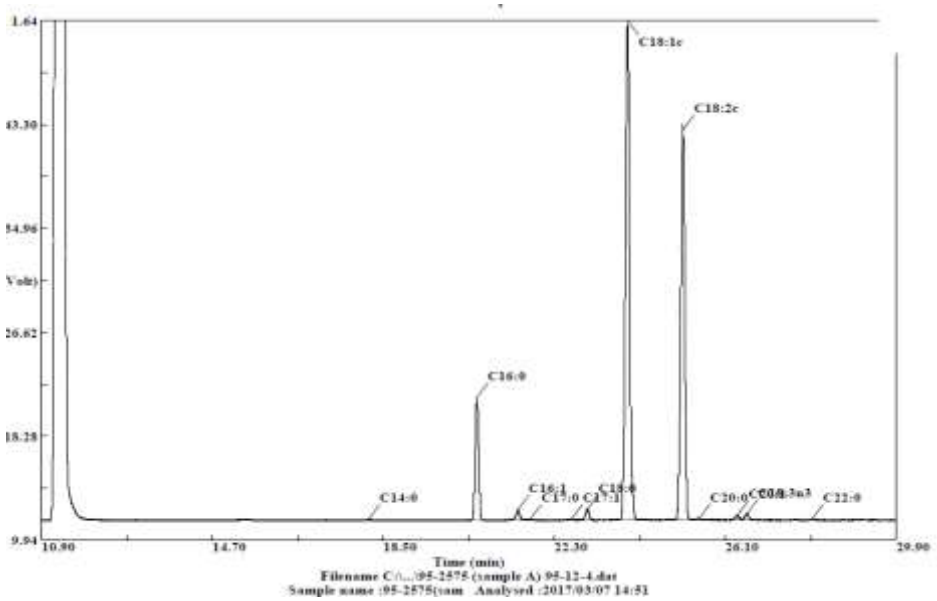
رقم	پالمیتولئیک (٪)	اولئیک (٪)	لینولئیک (٪)	لینولنیک (٪)	پالمتیک (٪)	آراشیدیک (٪)	میریستیک (٪)	استئاریک (٪)
شاه پسند	۰/۸۵ b	۵۰/۳۲ d	۳۷/۶۴ a	۰/۵۸ a	۹/۶۹ bc	۰/۱۲ a	۰/۰۹ a	۰/۹ c
عباسعلی	۱/۰۱ a	۵۸/۲۹ b	۲۸/۲۷ c	۰/۴۱ a	۱۰/۹۹ a	۰/۱۱ a	۰/۰۹ a	۰/۹۸ bc
کله قوچی	۰/۹ ab	۵۰/۰۱ d	۳۶/۷۹ a	۰/۵۱ a	۱۰/۴۵ ab	۰/۱۲ a	۰/۰۹ a	۰/۹۵ bc
خنجری	۰/۸۶ b	۵۳/۹۳ c	۳۳/۲۷ b	۰/۴۴ a	۱۰/۵۴ a	۰/۱ a	۰/۱ a	۱/۰۳ bc
اکبری	۰/۸۱ bc	۵۹/۳۱ b	۲۸/۵۸ c	۰/۴ a	۸/۹۲ c	۰/۱۴ a	۰/۱ a	۱/۱۲ b
پسته گرمه	۰/۷ c	۶۹/۰۳ a	۱۸/۲۲ d	۰/۳۲ a	۹/۲۱ c	۰/۱۴ a	۰/۱ a	۱/۹ a

*حروف مشابه بعد از میانگین‌ها در هر ستون نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین آن هاست (روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

در بین انواع اسیدهای چرب اشباع مغز ارقام پسته مورد آزمایش، اسید پالمیتیک از درصد فراوانی بیشتری برخوردار بود سایر اسیدهای چرب اشباع شامل اسید آراشیدیک، اسید استئاریک و اسید میریستیک بود. اسیدهای چرب غیر اشباع مغز ارقام پسته مورد آزمایش، شامل اسید پالمیتولئیک،اسید اولئیک،اسید لینولئیک و اسید لینولنیک بود، که در بین انواع اسیدهای چرب غیر اشباع، اسید اولئیک عمده ترین اسید چرب غیراشباع بود. دومین اسید چرب غیر اشباع عمده پس از اسید اولئیک، اسید لینولئیک بود. تحقیقات انجام شده گویای آنست که میزان اسید اولئیک رابطه عکسی با میزان اسید لینولئیک دارد به عبارتی کاهش هر یک، باعث افزایش دیگری می شود و مقدار مجموع این دو اسید چرب غیراشباع همواره ثابت است. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که از لحاظ آماری اختلاف میانگین درصد بعضی اسیدهای چرب دربین ارقام مختلف پسته معنی‌دار است.

کروماتوگرام اسیدهای چرب

شکل ۲ کروماتوگرام مربوط به ترکیب انواع اسیدهای چرب روغن یک نمونه پسته با استفاده از دستگاه GC را نشان می‌دهد. که ترتیب اسیدهای چرب در کروماتوگرام نشان داده شده بر مبنای جدا سازی زنجیره‌های اسیدهای چرب کربنی با تعداد کربن متفاوت که در زمان بازداری متفاوت شناسایی شده‌اند که از زنجیره‌های اسیدهای چرب کربنی C14 تا C22 در این کروماتوگرام نشان داده شده‌اند. زنجیره‌های با تعداد کربن کمتر (C14) به دلیل سبکی زودتر از ستون خارج شده و پیک آنها زودتر شناسایی شده است و زنجیره‌های بلندتر (تعداد کربن بیشتر) دیرتر از ستون خارج شده و زمان بازداری بیشتری داشته‌اند.



شکل ۲- کروماتوگرام مربوط به ترکیب انواع اسیدهای چرب روغن یک نمونه از ارقام پسته با استفاده از دستگاه GC.

بررسی ارتباط بین میزان رشد *A. flavus* با اسیدهای چرب مغز ارقام پسته

برای نشان دادن رابطه احتمالی بین میزان رشد *A. flavus* با درصد اسیدهای چرب (اسید پالمیتولئیک،اسید اولئیک،اسید لینولئیک، اسید لینولنیک، اسید آراشیدیک، اسید استئاریک، اسید میریستیک و اسید پالمیتیک) مغز ارقام پسته، ضریب همبستگی (r) محاسبه گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که رابطه مستقیم و معنی‌داری بین میزان رشد *A. flavus* با درصد هیچکدام از اسیدهای چرب (اشباع یا غیر اشباع) مغز ارقام پسته وجود ندارد (جدول ۱۲).

جدول ۱۲- ضریب همبستگی بین میزان اسیدهای چرب با میزان رشد *A. flavus* در مغز ارقام پسته.

زوج متغیرها	a	b	r	r^2
میزان رشد قارچ × درصد میریستیک اسید	۱۷۹/۸۷	-۱۲۷۰	۰/۷۳۶	۰/۵۴۱
میزان رشد قارچ × درصد پالمتیک اسید	-۱/۷۳۲	۶/۱۱۵	۰/۵۳۰	۰/۲۸۱
میزان رشد قارچ × درصد پالمیتولئیک اسید	۱۹/۲۵۴	۴۶/۷۴۰	۰/۵۰۵	۰/۲۵۵
میزان رشد قارچ × درصد استئاریک اسید	۷۶/۶۹۶	-۱۵/۲۴۳	۰/۶۰۷	۰/۳۶۹
میزان رشد قارچ × درصد اولئیک اسید	۱۱۲/۲۲۱	-۰/۹۳۳	۰/۷۰۴	۰/۴۹۶
میزان رشد قارچ × درصد لینولئیک اسید	۳۱/۲۲۶	۰/۹۱۹	۰/۶۹۸	۰/۴۸۷
میزان رشد قارچ × درصد آراشیدیک اسید	۸۲/۳۱۷	-۱۷۷/۶۹۲	۰/۶۰۶	۰/۳۶۷
میزان رشد قارچ × درصد لینولنیک اسید	۱۰/۹۰۷	۱۰۵/۴۰۲	۰/۸۰۲	۰/۶۴۳

بررسی ارتباط بین میزان تولید آفلاتوکسین با اسیدهای چرب مغز ارقام پسته

برای نشان دادن رابطه احتمالی بین میزان تولید آفلاتوکسین با درصد اسیدهای چرب مغز ارقام پسته، ضریب همبستگی (r) محاسبه گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که رابطه مستقیم و معنی‌داری بین میزان تولید آفلاتوکسین با درصد هیچکدام از اسیدهای چرب (اشباع یا غیر اشباع) مغز ارقام پسته وجود ندارد. به عبارت دیگر افزایش یا کاهش درصد اسیدهای چرب ارقام پسته نمی‌تواند مبنایی برای افزایش یا کاهش مقاومت به رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین در مغز ارقام پسته باشد (جدول ۱۳).

جدول ۱۳- ضریب همبستگی بین میزان اسیدهای چرب با میزان تولید آفلاتوکسین در مغز ارقام پسته.

زوج متغیرها	a	b	r	r^2
تولید آفلاتوکسین× درصد میریستیک اسید	۳۷۷۴۵/۱۰۰	-۲۶۲۸۱۳/۳۳۳	۰/۷۰۱	۰/۴۹۱
تولید آفلاتوکسین× درصد پالمتیک اسید	۴۸۲۳/۳۲۱	۷۹۸/۱۱۲	۰/۳۱۸	۰/۱۰۱
تولید آفلاتوکسین× درصد پالمیتولئیک اسید	۷۰۶۵/۲۷	۸۲۱۴/۷۸۳	۰/۵۷۷	۰/۳۳۳
تولید آفلاتوکسین× درصد استئاریک اسید	۱۷۵۲۱/۸۷۳	-۴۱۳۷/۲۴۴	۰/۷۵۸	۰/۵۷۵
تولید آفلاتوکسین× درصد اولئیک اسید	۲۴۰۸۳/۱۱۱	-۱۹۸/۹۸۴	۰/۶۹۱	۰/۴۷۷
تولید آفلاتوکسین× درصد لینولئیک اسید	۶۶۳۶/۴۶۳	۲۰۱/۶۱۰	۰/۷۰۴	۰/۴۹۶
تولید آفلاتوکسین× درصد آراشیدیک اسید	۱۸۱۰۸/۲۸۳	-۴۱۰۰۳/۴۶۲	۰/۶۴۴	۰/۴۱۴
تولید آفلاتوکسین× درصد لینولنیک اسید	۳۸۹۲/۹۵۵	۱۹۳۸۵/۱۹۰	۰/۶۷۹	۰/۴۶۱

بحث

آلودگی آفلاتوکسین پسته مشکلات عمده‌ای را در آمریکا، آسیا و آفریقا بوجود آورده است. به عنوان مثال، اتحادیه اروپا در سال ۱۹۹۷، محمولهٔ بزرگی از پسته ایران را به دلیل آلودگی بالای آفلاتوکسین بازگرداند (عقدائی، ۲۰۰۹). بنابراین با توجه به اهمیت موضوع، جنبه‌های مختلف موضوع آلودگی پسته به *A. flavus* و آفلاتوکسین باید مورد مطالعه قرار گیرد. به این منظور در این تحقیق، در ابتدا مقاومت ارقام پسته به *A. flavus* و آفلاتوکسین تعیین گردید. در ادامه با ذکر این نکته که ترکیبات شیمیایی ماده غذایی می‌تواند به عنوان یکی از مهمترین عوامل تعیین کننده در میزان رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین محسوب گردد و تفاوت در ترکیبات شیمیایی ارقام یک محصول نیز می‌تواند مبنای مقاومت آن محصول نسبت به رشد *A. flavus* محسوب گردد، لذا در این تحقیق با اندازه‌گیری میزان چربی و انواع اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع ارقام پسته، رابطهٔ احتمالی بین میزان این ترکیبات با مقاومت مغز ارقام پسته نسبت به رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین بطور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌های Menkir و همکاران نشان داد که در مقاومت ذرت به *A. flavus* و توکسین، از لحاظ آماری ارتباط مثبت و معنی‌داری بین میزبان رشد *A. flavus* و آفلاتوکسین تولیدی وجود دارد (Menkir *et al*., 2006). به احتمال زیاد، کنترل آفلاتوکسین بوسیله تلفیق

روش‌های کنترل بیولوزیک، اقدامات زراعی در مزرعه و بکار گیری ارقام مقاوم در ذرت امکان پذیر خواهد بود.

درحال حاضر با استفاده از تکنولوژی‌های نو مانند ژنومیکس و پروتئومیکس و شناسایی مکانیسم‌های مقاومت به قارچ *A. flavus* امکان دسترسی و شناسایی ارقام مقاوم و مکانیسم مقاومت به *A. flavus* به شدت افزایش یافته است (Brown *et al*., 2013). روش‌های غربالگری، بعنوان کلید شناسایی ژن‌ها و ژرم پلاسم‌های مقاوم بکار برده می‌شود (Guo *et al*., 2011; Scully *et al*., 2012; Menkir *et al*., 2008).

نتایج تحقیقات ما نشان داد که، تفاوت معنی‌داری در میزان اسپورزایی *A. flavus* روی مغز پسته ارقام مختلف وجود دارد به طوریکه در بین ارقام مورد آزمایش ارقام شاه پسند و پسته گرمه با ۶/۱×۱۰^{۵} و ۵/۵×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر، به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان اسپور تولید شده ناشی از رشد قارچ در روی مغز ارقام پسته بودند. همانطوریکه نتایج نشان می‌دهد، ارقامی مثل شاهپسند و عباسعلی که میانگین درصد کلونیزاسیون قارچ *A. flavus* بر روی مغز پسته آنها بیشتر از سایر ارقام بود، میزان اسپور تولید شده در آنها نیز بیشتر از ارقام دیگر بود. به عبارت دیگر، بین میزان رشد *A. flavus* با میزان اسپورزایی قارچ روی مغز پسته ارقام مختلف رابطه مثبت و معنی‌داری وجود دارد (r = %71). یعنی با افزایش رشد و کلنیزاسیون قارچ *A. flavus* روی مغز پسته، میزان اسپورزایی قارچ نیز افزایش می‌یابد. نتایج تحقیقات همچنین موید آنست که بین میزان تولید آفلاتوکسین با میزان اسپورزایی قارچ روی مغز پسته ارقام مختلف نیز، ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد (r = %71). که تحقیقات حاضر با نتایج Calvo و Guzman در این ارتباط مطابقت دارد.

ارتباط منطقی و معنی‌داری بین تولید مایکوتوکسین‌ها و اسپورزایی بسیاری از قارچ‌ها اثبات شده است. بعنوان مثال در قارچ *A. Parasiticus*، مواد شیمیایی مخصوصی که از اسپورزایی قارچ جلوگیری می‌کنند، از تولید آفلاتوکسین نیز ممانعت بعمل می‌آورند (Calvo *et al*., 2002). در قارچ‌های *A. Parasiticus* و *A. nidulans* نیز ممانعت شیمیایی از بیوسنتز پلی‌آمین، از اسپورزایی و تولید آفلاتوکسین جلوگیری می‌کند. مقالات زیادی منتشر شده که نشان می‌دهد موتانت‌های جنس *Aspergillus*که قادر به اسپورزایی نیستند، قادر به تولید توکسین نیز نخواهند بود.

در قارچ *A. nidulans*، اسید لینولئیک به یکسری مولکولهای اسپورزا به نام PSI فاکتورها متابولیزه می شود. Calvo و همکاران ثابت کردند که، لینولئیک اسید و هیدروپروکسی لینولئیک اسید بذر، میزان اسپورزایی غیر جنسی قارچ‌های *A. nidulans*، *A. parasiticus*، *A. flavus*

را افزایش می‌دهد. همچنین ثابت شده است که اسید لینولئیک تولید آفلاتوکسین را نیز افزایش می‌دهد.

نتایج این تحقیق نشان داد، در شرایط آزمایشگاهی (تلقیح مصنوعی مغز ارقام پسته با قارچ *A. flavus*)، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین مشاهده شد و این بر خلاف نتایج بدست آمده از تحقیق سایر محققین در روی ذرت و بادام زمینی، در شرایط مزرعه بود. این محققین معتقدند که آلودگی به قارچ و تولید آفلاتوکسین در شرایط مزرعه، در درجه اول به شرایط محیطی مختلف به خصوص استرس‌های خشکی در طی بلوغ غلاف بذر، خسارت آفات خاکزی، عوامل بیماریزای قارچی برگی و میکوفلور آنتاگونیست موجود در خاک بستگی دارد. از این رو در شرایط مزرعه ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین وجود ندارد (Latha *et al*., 2007). این نکته نیز باید در نظر گرفته شود که در بادام‌زمینی غلاف بذر در ارتباط مستقیم با خاک است و در مزارع ذرت، به خاطر تراکم بالای کشت، رطوبت نسبی بالایی برای رشد قارچ مهیا است، در حالیکه در باغات پسته، هیچکدام از این شرایط وجود ندارد. اما در شرایط آزمایشگاهی پژوهش حاضر (تلقیح مصنوعی مغز پسته توسط قارچ *A. flavus*)، احتمالاً به دلیل اینکه شرایط محیطی از جمله رطوبت و حرارت و سایر پارامترها کنترل شده است، ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین مشاهده گردید.

در اکثر نقاط جهان تحقیقات گسترده‌ای جهت تعیین نقش فاکتورهای شیمیایی و فیزیکی مواد غذایی در میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در محصولات مختلف انجام شده است، که نتایج موفقیت آمیزی نیز از آنها گزارش شده است. بیشترین مطالعات انجام شده در این زمینه درباره نقش و ارتباط ترکیبات فنولیک، قندها، پروتئین، چربی و اسیدهای چرب و... با میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در محصولات مختلف از جمله بادام زمینی، بادام، ذرت، و بقولات بوده است (Ghewande *et al*., 1993; Nigam *et al*., 2009; Pizzolitto *et al*., 2015; Samapundo *et al*., 2007; Latha *et al*., 2007; Cary *et al*., 2013; Yu *et al*., 2004; Latha *et al*., 2007; Cary *et al*., 2013).

نتایج این تحقیق گویای آنست که ارتباط معنی‌داری بین رشد قارچ و تولید توکسین با ترکیب و نوع اسیدهای چرب ارقام مختلف پسته وجود ندارد، که این نتایج با مطالعات انجام شده توسط Gradziel و همکاران بر روی ارقام بادام همخوانی دارد، در حالیکه در محصولات زراعی یکساله جون ذرت این ارتباط مشاهده نگردید. یکی از دلایل اصلی این اختلاف آن است که در محصولات باغی(پسته و بادام)، همبستگی منفی بالایی (r = %99) بین میزان اسید اولئیک و اسید لینولئیک وجود دارد.

همبستگی مشابهی در پسته و بادام نشان داد که در این محصولات آنزیم غیر اشباع کننده اسید اولئیک منحصر بفردی وجود دارد که تبدیل اسید اولئیک به اسید لینولئیک را کنترل می‌کند. اختلافات موجود در متابولیسم اسید چرب برای این گونه‌های درختی، نوع ارتباط بین ترکیب اسیدهای چرب و سطح آلودگی به قارچ *A. flavus* ، را برخلاف ارتباط موجود در گیاهان زراعی یکساله، غیر ممکن می‌سازد. زیرا مطالعات بیوشیمیایی نشان داد که برخی محصولات جانبی خاص ناشی از متابولیسم اسید چرب لینولئیک، ممکن است باعث افزایش یا توقف بیماری شوند.

مطالعات انجام شده توسط Gradziel و همکاران نشان دهنده اختلاف ژنتیکی در بین ارقام بادام آمریکا نسبت به رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین می‌باشد. مطالعات آنها نشان داد که بین تولید آفلاتوکسین و میزان چربی و اسیدهای چرب ارقام بادام، ارتباط معنی‌داری وجود ندارد و این برخلاف نتایج تحقیقات سایر محققین بود، چرا که تحقیقات انجام شده در روی ذرت (Zeringue *et al*., 1996) و بادام زمینی (Reding & Harrison, 1994) نشان داد که بین میزان انواع اسیدهای چرب موجود در مغز ذرت و بادام زمینی و میزان رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین ارتباط معنی‌دار و مثبتی وجود دارد (Gradziel *et al*., 2000). نتایج تحقیق دیگری نشان داد که اسیدهای چرب اشباع میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین را افزایش داده، در حالی که اسیدهای چرب غیر اشباع، منجر به کاهش رشد قارچ و تولید توکسین می‌شوند (Shin & Marth, 1974).

با توجه به اینکه منبع کربن و نیتروژن از شناخته شده‌ترین فاکتورهای تغذیه‌ای است که بر رشد قارچ *A. flavus* و بیوسنتز آفلاتوکسین تاثیر گذارند، و نوع منبع کربن (قندهای ساده و مرکب) و نیتروژن (انواع اسیدهای آمینه) تأثیر بسیار متفاوتی در رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین دارند، به طوریکه قندهای ساده مانند گلوکز و فروکتوز، رشد قارچ، اسپورزایی وتولید آفلاتوکسین را تحریک می‌کند. در مقابل گالاکتوز، زایلوز و لاکتوز، رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین را حمایت نمی‌کنند، و میزان رشد قارچ بسته به نوع اسید آمینه (پرولین، آسپاراژین، تریپتوفان و متیونین) نیز متفاوت است، بنابراین امری ضروریست تا با بررسی میزان و انواع قندها و اسیدهای آمینه موجود در مغز ارقام مختلف پسته، به عنوان منابع کربن و نیتروژن، رابطه احتمالی این ترکیبات با میزان رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین در روی این ارقام مورد بررسی قرار گیرد. تا با نگاهی جامع‌تر بتوان در مورد ارتباط خصوصیات فیزیولوژیکی محصولات باغی با رشد *A. flavus* اظهار نظر قطعی کرد.

منابع

1. Abbas, H. K. (2005). Aflatoxin and food safety. CRC Press, Taylor & Francis Group.
2. Aghdaei, S. F. A. (2009). Investigating Effective Factors on Iran's Pistachio Exportation. *International Journal of Marketing Studies (IJMS)*. *1*, 35-40.
3. Ahmadi K, Ebadzadeh HR, Hatami F, Mohammadnia Afrouzi Sh, Taghani RA, Yari Sh, Kalantari M. (2021). *Agricultural statistics* (2020). Volume III: Horticultural products. Ministry of Agriculture-Jahad, Deputy of Planning and Economics, Information and Communication Technology Center, 157 p.
4. Bennett, J., & Klich, M. A. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiological Reviews*, *16* (3), 497–516. Article CAS.
5. Brown, R. L., Menkir, A., Chen, Z. Y., Bhatnagar, D., Yu, J., Yao, H., & Cleveland, T. E. (2013). Breeding aflatoxin-resistant maize lines using recent advances in technologies–a review. *Food Additives & Contaminants*: *30* (8), 1382-1391.
6. Cary, J. W., Rajasekaran, K., Brown, R. L., Luo, M., Chen, Z. Y., & Bhatnagar, D. (2011). Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxins*, *3*(6), 678-696.
7. Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *66*(3), 447-459.
8. Cotty, P. J., & Jaime-Garcia, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal Of Food Microbiology*, *119*(1-2), 109-115.
9. Esmil-Pour, A., & Tajabadi-Pour, A. (2005). Study, recognition, collection, conservation, improvement and elevation of pistachio genetics resources of Iran. *Iranian Pistachio Research Institute. Final Report*, 56.
10. Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Novßkovß, A., Chen, A. J., ... & Houbraken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, *93*(1), 1-63.
11. Ghewande, M. P., Nagaraj, G., Desai, & Narayan, P. (1993). Screening S.of groundnut bold seeded genotypes for resistance to *Aspergillus flavus* seed colonization and less aflatoxin production. *Seed Science and Technology*. *21*, 45-51.
12. Gradziel, T., Mahoney, N. & Abdallah, A. (2000). Aflatoxin production among almond genotypes is not related to either kernel oil composition or *Aspergillus flavus* growth rate. *Hort Science*. *35*(5): 937-939.
13. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, & World Health Organization. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene (No. 82). World Health Organization.
14. Klich, M.A. (2002). Identification of common Aspergillus species. Central voor Schimmelcultures, Utrech, The Netherlands. Pp.116.
15. Kaminiaris, M., & Tsitsigiannis, D. (2020). Pre-harvest management strategies to control aflatoxin contamination in crops. Aflatoxins: Biochemistry, Toxicology, Public Health, *Policies and Modern Methods of Analysis*, 247-285.
16. Liu, Y., Chang, C. C. H., Marsh, G. M., & Wu, F. (2012). Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, *48*(14), 2125-2136.
17. Latha, P., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Naidu, P. H., & Reddy, P. V. (2007). Relationship between total phenols and aflatoxin production of peanut genotypes under end-of-season drought conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, *29*(6), 563-566.
18. Liang, X. Q., Luo, M., & Guo, B. Z. (2006). Resistance mechanisms to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin

contamination in peanut (*Arachis hypogaea*). *5*(1), 115-124.

19. Moradi, M., Hokmabadi, H. (2011). The Control of Mycotoxigenic Fungi in Nuts: Farm to Fork. 18 pages, in Ö. Tokusoglu & C. Hall III. (Eds): Fruit and Cereal Bioactives: Sources, Chemistry & Applications. CRC Press.
20. Mohammadi Moghaddam, M., Rezaee, S., Mohammadi, A. H., Zamanizadeh, H. R., & Moradi, M. (2020). Relationship between *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 and B2 production with phenolic and flavonoid compounds in green hull and kernels of pistachio cultivars. *Applied Entomology and Phytopathology*, *87*(2), 13-23.
21. Nigam, S. N., Waliyar, F., Aruna, R., Reddy, S. V., Kumar, P. L., Craufurd, P. Q., ... & Upadhyaya, H. D. (2009). Breeding peanut for resistance to aflatoxin contamination at ICRISAT. *Peanut Science*, *36*(1), 42-49.
22. Probst, C., Njapau, H., & Cotty, P. J. (2007). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(8), 2762-2764.
23. Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, *124*, 81-100.
24. Pizzolitto, R. P., Barberis, C. L., Dambolena, J. S., Herrera, J. M., Zunino, M. P., Magnoli, C. E., & Dalcero, A. M. (2015). Inhibitory effect of natural phenolic compounds on Aspergillus parasiticus growth. *Journal of Chemistry*, *2015*(1), 547925.
25. Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, *124*, 81-100.
26. Samapundo, S., De Meulenaer, B., Osei-Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007). Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiology*, *24*(5), 465-473.
27. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, *65*(2), 87-108.
28. Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., ... & Bennett, J. W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(3), 1253-1262.

Studying the role of pistachio kernel fatty acids in the growth of Aspergillus section Flavi and aflatoxin production in Iranian pistachio cultivars

Mehdi Mohammadi-Moghadam[1]*, Ahmad Shakerardekani[2] Amir Hossein Mohammadi[3], Alireza Barjasteh[4], Hamid Reza Ziaolhagh[5]

Abstract

Nowadays, contamination of agricultural products with fungal toxins, especially aflatoxins, is considered one of the most important public health concerns and a global issue in food safety. Aflatoxins are the most significant fungal mycotoxins produced by certain species of *Aspergillus*. Contamination of pistachios with fungi belonging to the *Aspergillus* section *Flavi* and with aflatoxins has led to restrictions on their export to European Union countries. One of the main management strategies to control aflatoxin formation in agricultural products during the pre-harvest stage is to evaluate the resistance of pistachio cultivars to *Aspergillus flavus* and its relationship with the levels of chemical compounds of pistachio varieties. To this purpose, in the present study, the possible relationship between the fat content and fatty acid composition of pistachio kernels and their resistance to the growth of aflatoxin-producing fungi was investigated. The fat content of pistachio kernels was determined using the Soxhlet extraction method, and the type and amount of fatty acids were analyzed by gas chromatography (GC). To assess the correlation between fat and fatty acid composition in pistachio kernels and the growth rate of *A. flavus* and aflatoxin production, the correlation coefficient (r) was calculated. Statistical analyses showed that there was no significant relationship between the growth rate of *A. flavus* and aflatoxin production with the fat content or fatty acid composition of pistachio kernels. It is likely that many other chemical and physical factors are also involved in this phenomenon.

Key Words: *Aspergillus flavus*, aflatoxin, pistachio, cultivar, chemical compounds, resistance.

1 Crop and Horticultural Sciences Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran.
2 Ardakan Pistachio Research Station, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Yazd Province , AREEO, Yazd, Iran.
3 Pistachio Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran.
4 Plant protection Research Department, Semnan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran.
5 Technical and Engineering Department, Semnan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran.
∗ Corresponding author: mm.moghadam52@gmail.com.