ارزیابی تأثیر میزان آنتوسیانین مغز ارقام پسته بر رشد *Aspergillus flavus* و تولید آفلاتوکسین

مهدی محمدی مقدم[1*]، احمد شاکر اردکانی[2]، طاهره پروانه[3]، معصومه حقدل[4]، مصطفی قاسمی[5]، علیرضا برجسته[6]

تاریخ ارسال: ۱۴۰۴/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۱۷

چکیده

آلودگی آفلاتوکسین‌ها در غذای انسان و خوراک دام تهدیدی برای سلامت مصرف‌کننده و فروش محصول در بازارهای جهانی است. در این پژوهش، ضمن تعیین میزان مقاومت ارقام پسته شاه‌پسند، عباسعلی، کله‌قوچی، خنجری، اکبری و پسته گرمه به آلودگی ناشی از قارچ *A. flavus* و آفلاتوکسین، ارتباط میان میزان آنتوسیانین مغز این ارقام، به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، با میزان رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. مایه‌زنی مغز ارقام پسته با غلظت ۲×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر از یک جدایه توکسین‌زای *A. flavus* صورت گرفت و غلظت آفلاتوکسین به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین شد. کمترین و بیشترین مقدار آنتوسیانین مغز پسته ارقام در محدوده بین ۵/۴۲ – ۷/۵۱ میلی گرم در ۱۰۰ گرم (وزن خشک) متغیر بود. ارقام پسته گرمه و اکبری دارای کمترین و رقم شاه‌پسند دارای بیشترین میزان کلونیزاسیون *A. flavus* و غلظت آفلاتوکسین بوده و به‌ترتیب به‌عنوان ارقام مقاوم و حساس به آلودگی ناشی *A. flavus* تعیین شدند. همچنین نتایج، اختلاف معنی‌داری بین میزان آنتوسیانین مغز ارقام پسته (در سطح آماری ۰/۰۵) را نشان داد. به‌طوری که بیشترین درصد آنتوسیانین مربوط به رقم عباسعلی (۷/۵۱ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) و کمترین مقدار نیز در رقم کله‌قوچی (۵/۴۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) مشاهده گردید. بین درصد آنتوسیانین و میزان رشد قارچ *A. flavus* در مغز ارقام پسته، و بین میزان تولید آفلاتوکسین و درصد آنتوسیانین ارتباط معنی‌داری یافت نشد.

واژه‌های کلیدی: *Aspergillus flavus*، آفلاتوکسین، مغزپسته، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، سلامت غذایی.

۱ بخش تحقیقات 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 بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران.
۴ پژوهشکده پسته کشور، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران.
۵ بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، قزوین، ایران.
۶ بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان(شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران.
* نویسنده مسئول: mostafaghasemi24@gmail.com

مقدمه

پسته یکی از محصولات اقتصادی اصلی کشورهای واقع در مناطق نیمه‌بیابانی و بیابانی خاورمیانه، آسیای مرکزی، دریای مدیترانه و ایالات‌متحده آمریکا محسوب می‌شود. تقریباً یک میلیون تن پسته در سرتاسر جهان برداشت می‌شود و حدود ۹۸/۶۴ درصد از آن فقط در پنج کشور آمریکا، ترکیه، ایران، چین و سوریه تولید شده است. در مقابل، پنج کشور دیگر آلمان، ایتالیا، هند، اسپانیا و بلژیک واردات ۵۹/۷۰ درصد را داشته‌اند (Faostat, 2020). چین، ایالات‌متحده آمریکا، ترکیه، ایران، آلمان، سوریه، اسپانیا، ویتنام، ایتالیا، هند، فرانسه و افغانستان ۷۱/۴۰ درصد از کل مصرف جهانی را تشکیل می‌دهند. آمریکا و ایران ۸۲ درصد از صادرات پسته جهان را به خود اختصاص داده‌اند و از نظر مصرف نیز رتبه اول را دارا هستند (International Nut and Dried Fruit Council, 2021). پسته حدود ۱۰ درصد از درآمد غیرنفتی ایران را با صادرات بیش از ۶۰ درصد از سهم صادرات جهانی تأمین می‌کند. بیشترین سهم تولید پسته محدود به ارقام تجاری پرمحصول مانند کرمان ایرانی است (Nezami and Gallego, 2023).

آفلاتوکسین‌ها گروهی از زهرابه‌های قارچی هستند که غالباً توسط دو گونه *A. flavus* و *A. parasiticus* تولید می‌شوند (Williams *et al*., 2004). آلودگی آفلاتوکسین‌ها در غذای انسان و خوراک دام یک تهدید بالقوه برای سلامت مصرف‌کننده و فروش محصول در بازارهای جهانی است. آفلاتوکسین‌ها هنگام تولید، برداشت، انبارداری یا فرآوری باعث آلودگی محصولات کشاورزی می‌شوند. محصولاتی مانند برنج، ذرت و انواع مغزهای خوراکی شامل پسته، فندق، بادام‌زمینی و فلفل و ادویه‌جات می‌توانند به این زهرابه‌های قارچی آلوده شوند (Williams *et al*., 2004). همچنین، امکان آلودگی شیر انسان و دام‌هایی که در معرض خطر آلودگی آفلاتوکسین‌اند، به مشتقات این زهرابه وجود دارد. حدود ۲۵ ترکیب آنالوگ از آفلاتوکسین شناسایی شده است. آفلاتوکسین نوع B_1 سمی‌ترین آفلاتوکسین‌ها بوده و آثار مرگبار آن نظیر سرطان کبد، ضعف سیستم ایمنی بدن و بروز اشکالاتی در جذب مواد غذایی در انسان ثابت گردیده است (Williams *et al*., 2004). AFB_1 توسط آژانس بین‌الملل تحقیقات سرطان در کلاس (۱) گروه‌بندی شده است (Bhatnagar *et al*., 2002, 2004, 2006). AFB1 توسط کبد از طریق سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 به متابولیت بسیار خطرناک و سرطان‌زا به‌نام AFB1-8,9-epoxide (AFBO) یا به شکل‌های کمتر جهش‌یافته مانند AFM1، AFQ1 یا AFP1 متابولیز می‌شود.

قارچ خاک‌زاد و همه‌جازی *A. flavus* به‌عنوان مشکل قبل از برداشت محصولاتی نظیر دانه ذرت، بادام‌زمینی،

پنبه، پسته، بادام و ... شناخته شده است (CAST, 2009). روش‌های زراعی متعدد به‌منظور کاهش آلودگی آفلاتوکسین از جمله استفاده از آفت‌کش‌ها برای کنترل حشرات (مرتبط با آلودگی آفلاتوکسین)، اصلاح ارقام مقاوم گیاهی در برابر آلودگی قارچی، کاشت گیاه تراریخته و استفاده از مقاومت ژنتیکی دانه در برابر حمله قارچ‌های گروه *A. flavus* در زمان بعد از برداشت در شرایط مزرعه بررسی شده‌اند. میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها، مخمرها و استرین‌های غیرمولد آفلاتوکسین *A. flavus* به‌منظور کنترل بیولوژیک جدایه‌های توکسین‌زا استفاده شدند، بنابراین امروزه روش‌های جایگزین مناسب و موثر برای کنترل آسپرژیلوس‌های توکسین‌زا در محصولات زراعی وجود دارد (Barkai-Golan and Paster, 2008). با این وجود، بحران مصرف بسیار زیاد حشره‌کش‌ها از نظر خطرات آلودگی محیطی و بالابردن هزینه‌ها، افزایش پیدا کرده است (Cleveland *et al*., 2003). سمیت‌زدایی (detoxification) آفلاتوکسین‌ها یا حذف آنها از مواد غذایی آلوده به سهولت امکان‌پذیر نمی‌باشد، لذا علاقه‌مندی به توسعه روش‌های بیوکنترل و استفاده از ارقام مقاوم در کاهش محتوای زهرابه و افزایش ایمنی محصول بوجود آمده است (Brown *et al*., 2013; Cary *et al*., 2011; Nigam *et al*., 2009; Liang *et al*., 2006). از بین تعداد زیاد روش‌های بررسی‌شده برای مدیریت آفلاتوکسین محصولات زراعی و باغی، روش استفاده از ارقام مقاوم بسیار امیدبخش بوده است. (Brown *et al*., 2013; Cary *et al*., 2011; Nigam *et al*., 2009; Liang *et al*., 2006). با توجه به اینکه تفاوت در ترکیبات شیمیایی میوه ارقام مختلف پسته (به‌عنوان مثال میزان پروتئین و انواع اسیدهای آمینه، میزان چربی وانواع اسیدهای چرب، میزان ترکیبات فنولیک، آنتوسیانین و کاروتنوئیدها و ...) می‌تواند مبنای حساسیت یا مقاومت به رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین محسوب گردد، لذا در این پژوهش با اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین، به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی، رابطهٔ احتمالی بین میزان این ترکیبات با مقاومت مغز ارقام پسته نسبت به رشد و تولید آفلاتوکسین توسط *A. flavus* مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

انتخاب و جمع‌آوری ارقام مهم پسته کشور

با توجه به کثرت و تنوع ارقام پسته اهلی ایران، در این تحقیق جمع‌آوری میوه ارقام مهم پسته از مناطق پسته‌خیز کشور انجام شد. مهمترین ارقام تجاری هر منطقه که از سطح زیر کشت بالایی در آن منطقه برخوردار بودند، گزینش شدند. این ارقام شامل ارقام اکبری و کله-قوچی از منطقه رفسنجان، ارقام شاه پسند، عباسعلی و

خنجری از منطقه دامغان و رقم پسته گرمه از منطقه فیض آباد استان خراسان رضوی بودند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. برای جلوگیری از زخمی‌شدن و آسیب‌دیدن پوسته رویی مغز پسته (Testa) و به حداقل رساندن امکان آلودگی پسته‌ها به قارچ *A. flavus* و آفلاتوکسین ناشی از رشد آن، نمونه‌برداری در زمان برداشت پسته، از روی درخت انجام شد. بعد از برداشت پسته تازه، پسته‌های آفت‌زده و میوه هایی که احتمال آلودگی داشتند، حذف شده و سپس پوست بیرونی و نرم پسته با دست از پوست شاخی آن جدا گردید تا هیچ آسیبی به پوسته مغز پسته وارد نشود. سپس پسته‌ها در شرایط مطلوب در آفتاب خشک شدند و رطوبت آنها به شش درصد رسانده شد و تا زمان انجام آزمایشات در یخچال چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جداسازی جدایه بومی توکسین‌زای *Aspergillus flavus* از مناطق پسته‌کاری رفسنجان:

به‌منظور بررسی مقاومت و غربال‌گری ارقام مختلف پسته نسبت به رشد قارچ‌های مولد توکسین، جداسازی یک جدایه بومی (Native strain) توکسین‌زا از منطقه رفسنجان، به‌عنوان مهمترین منطقه کشت پسته در کشور انجام شد. بدین منظور از مغز پسته محصول منطقه رفسنجان نمونه‌برداری شده و سپس نمونه‌های پسته به روش کشت‌رقتی روی سطح پتری‌های حاوی محیط کشت اختصاصی AFPA کشت شدند. پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شده و 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 شد (Klich, 2002). با توجه به اینکه تمام جدایه‌های قارچ *A. flavus* توکسین‌زا نمی‌باشند، به‌منظور بررسی توان توکسین‌زایی جدایه‌ها و انتخاب یک جدایه توکسین‌زا، 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 شد.

بررسی مقاومت طبیعی ارقام پسته ایران نسبت به رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین

برای بررسی مقاومت طبیعی ارقام پسته نسبت به رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین، مغز میوه شش رقم پسته تجاری کشور انتخاب شدند. به‌منظور بررسی و مطالعه مقاومت ارقام مهم پسته ایران نسبت به رشد قارچ‌های

مولد آفلاتوکسین، از روش مرسوم و متداول KSA(Kernel Screening Assay) استفاده گردید. مبنای استفاده از این روش، بررسی و سنجش مقاومت مغز یا دانه ارقام مختلف محصولات زراعی و باغی مانند ذرت، بادام-زمینی، بادام یا پسته، در شرایط آزمایشگاهی نسبت به رشد و کلنیزاسیون قارچ *A. flavus* در روی این دانه‌ها است، که یک روش سنجش و غربال‌گری سریع آزمایشگاهی در مورد ارقام محصولات مختلف به قارچ *A. flavus* می‌باشد. مغز یا دانه، مهمترین و اصلی‌ترین بافت مورد حمله قارچ *A. flavus* می‌باشد (Brown *et al*., 2013; Cary *et al*., 2011).

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

قبل از انجام این آزمایش، برای اطمینان از عدم آلودگی مغز پسته‌های ارقام مختلف به قارچ *Aspergillus flavus*، ابتدا ۴۵ گرم مغز پسته در سه تکرار ۱۵ گرمی انتخاب شد. نمونه‌های ۱۵ گرمی از مغز پسته ارقام مختلف ابتدا توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضد-عفونی و سپس با آب مقطر استریل کاملاً شستشو داده شد. بعد از آن، برای جذب رطوبت اولیه، مغزها به مدت ۱۰ دقیقه داخل آب مقطر استریل غوطه‌ور شد. در مرحله بعد مغزها از داخل آب مقطر استریل بیرون آورده شده و در 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 مرطوب، داخل ظروف پلاستیکی درب‌دار که در کف آن مقداری آب مقطر استریل ریخته شده بود، قرار داده شده و درب ظروف پلاستیکی به‌طور محکم بسته شد. این ظرف در داخل انکوباتور در درجه حرارت ۲۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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، به‌منظور سنجش و ارزیابی مقاومت ارقام پسته به قارچ *A. flavus* در شرایط آزمایشگاهی (KSA) ابتدا جدایه بومی قارچ *A. flavus* که در مرحله قبل از پسته‌های آلوده منطقه رفسنجان جداسازی شده و توان توکسین-زایی آن ثابت شده بود، بر روی محیط کشت MEA در داخل لوله اسلنت (Slant) کشت داده شد، ۸-۱۰ 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 گلبول‌شمار غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد. برای هر رقم پسته سه تکرار و یک شاهد در نظر گرفته شد و در پتری شاهد، به جای افزودن سوسپانسیون اسپور، آب‌مقطر استریل اضافه شد. داخل هر پتری (حاوی ۱۵ گرم مغز پسته) یک میلی‌لیتر

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

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 نمونه‌های پسته برای خشک شدن در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در آون قرار داده شد. پس از خشک‌شدن نمونه‌ها توسط مخلوط‌کن به‌مدت دو دقیقه با دور تند آسیاب شدند. انجام آزمایش و سنجش میزان آلودگی نمونه‌ها به انواع آفلاتوکسین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Waters, USA) طبق روش زیر انجام گردید. ابتدا نمونه‌های پسته با آب به نسبت یک به سه با استفاده از دستگاه slurry به‌مدت 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 به‌مدت سه دقیقه انجام شد. مایع به‌دست آمده با استفاده از فیلتر صاف شده و هشت میلی‌لیتر از آن با ۴۲ میلی‌لیتر بافر فسفات مخلوط شد. برای خالص‌سازی نمونه از ستون‌های حاوی آنتی‌بادی بنام ستون‌های ایمونوافینیتی استفاده گردید. ابتدا برای آماده‌سازی 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 میکرولیتر از متانول از ستون عبور داده شد. پس از جمع‌آوری کل فاز متانول ۱۷۵۰ μl آب به آن اضافه گردید و نهایتاً ۲۰۰ میکرو لیتر 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 ng/ml ۰/۴ تا ۲/۷ ng/ml تهیه و ۲۰۰ میکرو لیتر از آنها به دستگاه HPLC تزریق گردید و بر مبنای معادله خط به‌دست آمده، غلظت AF در نمونه‌ها محاسبه گردید. در مورد دستگاه HPLC فاز متحرک، متانول/آب به میزان ۴۰ به ۶۰ و برای مشتق‌سازی 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 درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و سرعت جریان فاز متحرک ml/min ۲/۵ بود و آشکارساز مورد استفاده آشکارساز فلورسانس و طول موج برانگیختگی و نشر آن به ترتیب برابر 365nm و nm435 بود. (Mohammadi Moghadam *et al*., 2020)

اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین

برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین از روش Mori و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد. به این منظور صد میلی‌گرم از مغز خشک پسته را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۹۹ به ۱) به‌طور کامل سائیده و عصاره حاصل در لوله‌های آزمایش ریخته شد. محلول مورد نظر، به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به‌مدت ۱۵دقیقه با دور ۴۰۰۰g سانتریفیوژ و جذب محلول بالایی در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از فرمول زیر بدست آمد.

$$C = \frac{\mathrm{A} \times \mathrm{V} \times \mathrm{mw} \times 100}{\varepsilon \times \mathrm{b} \times \mathrm{w}}$$

در این رابطه A جذب نمونه، V حجم عصاره به میلی لیتر، MW وزن مولکولی سیانیدین-۳-گلوکوزید (۴۴۹/۲ گرم بر مول)، ε ضریب خاموشی ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ ۲۶۹۰۰)، b = عرض کووت (یک سانتیمتر)، W وزن نمونه خشک بر حسب گرم و C = غلظت آنتوسیانین برحسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک می‌باشد.

روش تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 17.01 انجام شد. برای مقایسات میانگین و آزمون معنی‌دار بودن میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده گردید. به‌منظور 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 قارچ *Aspergillus flavus*:

نتایج نشان داد که ۸ روز بعد از مایه‌زنی، میزان رشد قارچ و کلونیزاسیون مغز پسته در ارقام مختلف متفاوت از یکدیگر بود (جدول ۱). در بین ارقام مورد آزمایش، رقم شاه‌پسند کمترین میزان مقاومت و در مقابل رقم‌های خنجری و پسته گرمه بیشترین میزان مقاومت را نسبت به رشد قارچ *A. flavus* از خود نشان دادند. میانگین

کلونیزاسیون قارچ *Aspergillus flavus* بر روی مغز پسته ارقام مختلف بین ۵۰/۵ تا ۷۳/۶ درصد متغیر بود. تفاوت معنی‌داری در میزان رشد قارچ و کلونیزاسیون مغز پسته در ارقام عباسعلی، کله‌قوچی و اکبری مشاهده نشد و از نظر آماری این سه رقم در یک گروه قرار گرفتند.

جدول ۱ - مقایسه میانگین درصد کلونیزاسیون قارچ *Aspergillus flavus* بر روی مغز پسته ارقام مختلف.

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

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

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

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

میزان تولید آفلاتوکسین در ارقام مختلف پسته

نتایج سنجش کمی میزان آفلاتوکسین تولید شده در مغزهای پسته پس از هشت روز بعد از مایه‌زنی، در سطح پنج درصد دارای تفاوت معنی‌داری بود. در بین ارقام مورد آزمایش، رقم شاه‌پسند دارای بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین و در رقم پسته گرمه کمترین میزان آفلاتوکسین تولید شده است (جدول ۳). تفاوت معنی‌داری در میزان تولید آفلاتوکسین در ارقام خنجری، کله‌قوچی و اکبری مشاهده نگردید و این سه رقم از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند.

جدول ۳- مقایسه میانگین تولید آفلاتوکسین در مغز پسته ارقام مختلف.

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 ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر رقم پسته بر تولید آفلاتوکسین در مغز پسته ارقام مختلف.

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 ۰/۰۵درصد، ** دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱درصد

میزان آنتوسیانین موجود در مغز ارقام مختلف پسته

نتایج نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین میزان آنتوسیانین مغز ارقام پسته مورد مطالعه (در سطح آماری ۰/۰۵) وجود دارد (جدول ۵). بیشترین درصد آنتوسیانین در بین ارقام مورد آزمون مربوط به رقم عباسعلی (۷/۵۱ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) و کمترین مقدار نیز در رقم کله قوچی (۵/۴۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) ثبت گردید.

جدول ۵- مقایسه میانگین آنتوسیانین (میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) مغز پسته ارقام مختلف.

ارقام پسته	آنتوسیانین مغز پسته	گروه‌بندی آماری (α=٪۵)
شاه‌پسند	۵/۵۵	cd
عباسعلی	۷/۵۱	a
کله‌قوچی	۵/۴۲	d
خنجری	۶/۰۷	b
اکبری	۵/۹۳	bc
پسته گرمه	۵/۷۷	bcd

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

جدول ۶ - نتایج تجزیه واریانس اثر رقم پسته بر میزان آنتوسیانین مغز پسته ارقام مختلف.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مریعات
رقم پسته	۵	۱/۷۱۵*
خطای آزمایش	۱۲	۰/۰۶۲
ضریب تغییرات (CV)	-	۲۱/۶۸

*معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

همبستگی بین رشد قارچ *Aspergillus flavus* و تولید آفلاتوکسین با مقدار آنتوسیانین مغز ارقام پسته

نتایج نشان داد که بین میزان آنتوسیانین و میزان رشد قارچ *A. flavus* در مغز ارقام مختلف پسته، رابطه معنی‌داری وجود ندارد. این نتایج همچنین موید آن‌است که بین میزان تولید آفلاتوکسین و میزان آنتوسیانین نیز ارتباط معنی‌داری پیدا نشد (جدول ۷).

جدول ۷ - ضریب همبستگی بین میزان آنتوسیانین با میزان رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین در مغز ارقام مختلف پسته.

زوج متغیرها	a	b	r	r^2
تولید آفلاتوکسین × میزان آنتوسیانین مغز پسته	۱۰۳۵۴/۱۴۶	۴۰۲/۷۱۷	۰/۱۴۹	۰/۰۲۲
میزان رشد قارچ × میزان آنتوسیانین مغز پسته	۵۸/۱۸۸	۰/۱۷۱	۰/۰۱۴	۰/۰۰۰۲

* دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵درصد.

بحث

اقتصادی‌ترین و مؤثرترین استراتژی برای کاهش یا حذف آلودگی به آفلاتوکسین، اصلاح و تولید ارقام مقاوم به رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین می‌باشد. تلاش‌های زیادی در برنامه‌های اصلاحی برای شناسایی ارقام مقاوم و یا حتی متحمل به رشد قارچ *A. flavus* در مرحله قبل از برداشت وجود دارد. متاسفانه تاکنون رقم یا ژرم‌پلاسمی با مقاومت بالا نسبت به رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در محصولات زراعی مانند ذرت، پنبه و بادام-زمینی و خشکبار شناسایی نشده است. اما ارقامی با مقاومت کم یا متوسط در محصول ذرت در حال آزمایش و معرفی هستند و پیشرفت‌هایی در مورد شناسایی ژن-های مقاومت به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در ذرت حاصل شده است (Chen *et al*., 2010).

ترکیبات فنلی یکی از مکانیسم‌های دفاعی غیرآنزیمی درگیاهان هستند (Vogt, 2010). فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان هستند که در تنش-های محیطی تولید آنها افزایش می‌یابد (Myung-Min *et*

al., 2009). این ترکیبات با اسکلت ساختمانی اصلی C6-C3-C6 و ایجاد متیلاسیون، گلیگوزیلاسیون و آسیلاسیون گروه‌های متنوع زیادی از جمله چالکون‌ها، فلاوون‌ها، فلاونول‌ها، آنتوسیانین‌ها و ... تولید می کنند (Vogt, 2010). آنتوسیانین‌ها گروهی از ترکیبات فلاونوئیدی بوده که مسئول رنگ بسیاری از گل‌ها، سبزیجات و میوه‌ها هستند. به علاوه، به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی که دارند مورد توجه بوده و ارزش تغذیه ای دارند (Longo *et al*., 2007). اثرات داروشناختی این رنگیزه قرمز رنگ در پایین‌آوردن شاخص‌های آتروژنیکی و کاهش سطوح تری‌گلیسریدها و اسیدهای چرب در بدن شناسایی شده است (Igarashi and Inagaki, 1991). همچنین گزارش شده است که آنتوسیانین‌ها نسبت به دیگر فلاونوئیدها در مهار سرعت رشد تومورهای سرطانی مؤثرتر و مفیدتر هستند. این رنگیزه در پوست رویی مغز سبز پسته، تجمع یافته است (Kamei *et al*., 1995). فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در تولید آنتوسیانین نقش اساسی دارد و مطالعات انجام شده روی رنگیزه‌ها در پسته نشان از تأثیر دما و نور بر فعالیت این آنزیم و تولید آنتوسیانین دارد. علاوه بر این درجه رسیدگی میوه، منطقه و نوع رقم نیز بر تولید این رنگیزه‌ها مؤثر است (Longo *et al*., 2007). مطالعات انجام‌شده، نقش اکوفیزیولوژی این ترکیبات را در حفاظت از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی نشان می‌دهد (Nicolova and Ivancheva, 2005). Arcas و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کرده‌اند، وجود غلظت بالای ترکیبات فنلی درپوست میوه، سد دفاعی مناسبی برای حمله آفات و بیماری‌ها می‌باشد. تنش‌های محیطی و حمله آفات و بیماری‌های گیاهی مختلف، مقدار ترکیبات فنلی را در سلول تغییر می‌دهند (Kliebenstein, 2004). این ترکیبات از شواهد فیزیولوژیکی ارزشمند در تعیین اختلاف واریته‌های مختلف به شمار می‌روند (Tattini *et al*., 2004). مقادیر پایین آفلاتوکسین در مغز پسته دانه‌های دارای پوست در مقایسه با دانه‌های پوست کنده شده، احتمالاً نتیجه اثر بازدارندگی پوست در حمله آفلاتوکسین است (Doster and Michailides, 1995). گزارشات متعدد، وجود ترکیبات فنلی را در پوست پسته، و مقدار بالای این ترکیب در پوست نسبت به دانه را نشان می‌دهد (Tomaino *et al*., 2010). Orazem و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند، ژنوتیپ پایه در تولید مقدار و نوع ترکیبات فنلی موثر است.

نتایج این پژوهش نشان داد که یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین موارد جهت کاهش میزان آلودگی محصول به قارچ *A. flavus* و آفلاتوکسین ناشی از رشد آن، مقاومت میزبان می‌باشد، به‌طوریکه تفاوت معنی‌داری در میزان رشد و کلنیزاسیون قارچ *A. flavus* در بین ارقام پسته

مشاهده گردید. در بین ارقام پسته مورد آزمایش رقم شاه-پسند، کمترین میزان مقاومت و در مقابل رقم‌های خنجری و پسته گرمه بیشترین میزان مقاومت را نسبت به رشد قارچ *A. flavus* از خود نشان دادند. میانگین درصد کلونیزاسیون قارچ *Aspergillus flavus* بر روی مغز پسته ارقام مختلف بین ۵۰/۵ تا ۷۳/۶ درصد متغیر بود. نتایج سنجش کمی میزان آفلاتوکسین تولید شده در مغز پسته ارقام مختلف نیز نشان داد که، اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد در میزان آفلاتوکسین در ارقام مورد آزمایش وجود دارد، به‌طوریکه در بین ارقام مورد آزمایش، رقم شاه‌پسند دارای بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین بوده، و در رقم پسته گرمه، کمترین میزان آفلاتوکسین تولید شده بود. نتایج مربوط به اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین مغز ارقام پسته گویای آن است که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین میزان آنتوسیانین مغز ارقام پسته (در سطح آماری ۰/۰۵) وجود دارد. به‌طوریکه بیشترین درصد آنتوسیانین مربوط به رقم عباسعلی (۷/۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) و کمترین مقدار نیز در رقم کله‌قوچی (۵/۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) مشاهده گردید. نتایج نشان‌دهنده آن است که بین درصد آنتوسیانین و میزان رشد قارچ *A. flavus* در مغز ارقام پسته، رابطه معنی‌داری وجود ندارد. نتایج همچنین موید آن‌است که بین میزان تولید آفلاتوکسین و درصد آنتوسیانین نیز ارتباط معنی‌داری پیدا نشد.

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) تاثیر بسیار متفاوتی در رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین دارند، به‌طوریکه قندهای ساده مانند گلوکز و فروکتوز، رشد قارچ، اسپورزایی و تولید آفلاتوکسین را تحریک می‌کند. درمقابل 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. Arcas, M. C., Botía, J. M., Ortuño, A., & Del Río, J. A. (2000). UV irradiation Alters the Levels of Flavonoids Involved in the Defence Mechanism of *Citrus aurantium* Fruits against Penicillium digitatum. *European Journal of Plant Pathology*, *106*(7). 617-622.
2. Barkai-Golan, R., & Paster, N. (2008). Mycotoxins in fruits and vegetables**.** Academic Press.
3. Bhatnagar, D., Cary, J. W., Ehrlich, K., Yu, J., & Cleveland, T. E. (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*, *162*(3), 155–166.
4. Bhatnagar, D., Payne, G. A., Cleveland, T. E., & Robens, J. F. (2004). Mycotoxins: Current issues in USA. In D. Barug, H. van Egmond, R. López-García, T. van Osenbruggen, & A. Visconti (Eds.), Meeting the mycotoxin menace (pp. 17-47). Wageningen Academic Publishers.
5. Bhatnagar, D., Yu, J., & Ehrlich, K. C. (2002). Toxins of filamentous fungi. *Chemical Immunology*, *81*, 167–206.
6. Brown, R. L., Menkir, A., Chen, Z., 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), 1-10.
7. Cary, J. W., Rajasekaran, K., Brown, R., Luo, M., Chen, Z., & Bhatnagar, D. (2011). Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxins*, *3*(6), 678-696.
8. Chen, Z.Y., Brown, R.L., Damann, K.E., & Cleveland, T.E. (2010). PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Molecular Plant Pathology*, *11*(1), 69–81.
9. CAST (Council for Agricultural Science and Technology). (2009). *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems* (CAST Task Force Report No. 139). Council for Agricultural Science and Technology.
10. Cleveland, T. E., Dowd, P. F., Desjardins, A. E., Bhatnagar, D., & Cotty, P. J. (2003). United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins. *Pest Management Science*, *59*, 629–642.
11. Doster, M.A., Michailides, T.J. (1995) The development of early split pistachio nuts and their contamination by molds, aflatoxin and insects. *Acta Horticulturea*. *419*, 359-364.
12. Faostat. (2020). FAOSTAT statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. https://www.fao.org/faostat.
13. Igarashi, K., & Inagaki, K. (1991). Effects of the major anthocyanin of wild grape (Vitis coignetiae) on serum lipid levels in rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, *55*(1), 285–287.
14. International Nut and Dried Fruit Council. (2021). Global nut and dried fruit statistics. INC.
15. Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
16. Kamei*,* H.*,* Kojima, T., Hasegawa, M., *Koide*, *T*., Umeda, *T*., Yukawa, *T*. & Terabe, K. (1995). Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigation*. *13*(6), 590-594.
17. Kliebenstein, D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant, Cell & Environment*, *27*, (*6*), 675-684,

18. Liang, X. Q., Luo, M., & Guo, B. Z. (2006). Resistance mechanisms to Aspergillus flavus infection and aflatoxin contamination in peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Pathology Journal*, *5*(1), 115-124.
19. Longo, L., *Scardino, A*., & Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *8*, 360-364.
20. Mohammadi Moghadam, 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. Mori, T., Sakurai, M., Shigeta, J., Yoshida, K., & Kondo, T. (1993). Formation of anthocyanins from cells cultured from different parts of strawberry plants. *Journal of Food Science*, *58*(4), 788-792.
22. Myung-Min, O., Carey, C. C., & Rajashekar, C. B. (2009). Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, *47*(7), 578-83.
23. Nezami, E., & Gallego, P.P. (2023). History, Phylogeny, Biodiversity, and New Computer Based Tools for Efficient Micropropagation and Conservation of Pistachio (*Pistacia* spp.) *Germplasm Plants*, *12*, 323.
24. Nigam, S. N., Waliyar, F., Aruna, R., Reddy, S. V., Kumar, P. L., Craufurd, P. Q., Diallo, A. T., Ntare, B. R., & Upadhyaya, H. D. (2009). Breeding peanut for resistance to aflatoxin contamination at ICRISAT. *Peanut Science*, *36*(1), 42-49.
25. Nikolova, M. T., & Ivancheva, S. V. (2005). Quantitative flavonoid variations of *Artemisia vulgaris* L. and *Veronica chamaedrys* L. in relation to altitude and polluted environment. *Acta Biologica Szegediensis*, *49*(3-4), 29–32.
26. Orazem, P., Stampar, F., & Hudina, M. (2011). Quality analysis of 'Redhaven' peach fruit grafted on 11 rootstocks of different genetic origin in a replant soil. *Food Chemistry*, *124*, 1691-1698.
27. Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., & Agati, G. (2004). Differential accumulation of flavonoides and hydroxycinnamates in leaves of Ligustrum vulgare under excess light and drought stress. *New Phytology*, *163*, 547–561.
28. Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C., & Saija, A. (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera L.*, variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*, *92*(9), 1115-22.

29. Vogt, T. (2010**).** Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, *3*(1), 2–20.
30. Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(5), 1106-1122.

Evaluation of the effect of anthocyanin content in the kernels of pistachio cultivars on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production

Mahdi Mohammadi Moghadam[1]*, Ahmad Shakerardekani[2], Tahereh Parvaneh[3], Masoumeh Haghdel[4], Mostafa Ghasemi[5], Alireza Barjasteh[6]

Abstract

Aflatoxin contamination in human food and animal feed poses a serious threat to consumer health and limits product marketability in global markets. In this study, in addition to determining the resistance of the pistachio cultivars Shahpasand, Abbasali, Kallehghouchi, Khanjari, Akbari, and Garmeh to contamination by *Aspergillus flavus* and aflatoxin, the relationship between the anthocyanin content of the kernels of these cultivars, as antioxidant compounds, and the growth of *A. flavus* and aflatoxin production was investigated. The experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. Pistachio kernels of the studied cultivars were inoculated with a toxigenic isolate of *Aspergillus flavus* at a concentration of 2×10^6 spores mL^{-1}, and the aflatoxin concentration was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). The anthocyanin content of pistachio kernels among the cultivars ranged from 5.42 to 7.51 mg per 100 g (dry weight). The Garmeh and Akbari cultivars exhibited the lowest levels of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin concentration, whereas the Shahpasand cultivar showed the highest levels; therefore, they were identified as the resistant and susceptible cultivars to *A. flavus* contamination, respectively. The results also indicated a significant difference among pistachio cultivars in terms of kernel anthocyanin content (at the 0.05 significance level). Accordingly, the highest anthocyanin content was observed in the Abbasali cultivar (7.51 mg per 100 g), while the lowest amount was recorded in the Kalleh-Ghouchi cultivar (5.42 mg per 100 g). No significant relationship was found between the percentage of anthocyanin and the growth of *Aspergillus flavus* in pistachio kernels, nor between aflatoxin production and anthocyanin percentage.

Key words: *Aspergillus flavus*, Aflatoxin, Pistachio kernel, Antioxidant compounds, Food safety.

1 Horticulture Crops 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 Horticulture Crops Research Department, Agriculture and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran.
4 Pistachio Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran.
5 Crop and Horticultural Sciences Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Qazvin Province, AREEO, Qazvin, Iran.
6 Department of Plant Protection, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran.
∗ Corresponding author: mm.moghadam52@gmail.com