

پراکنش سویه‌های غیر توکسین‌زای قارچ *Aspergillus flavus* در مناطق پسته‌کاری ایران*

سید رضا فانی^۱✉، محمد مرادی^۲، حمید رضا زمانی زاده^۱، منصوره میرابولفاتی^۳ و کلودیا پروبست^۴

۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران؛ ۲- مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان؛ ۳- بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران؛ ۴- دپارتمان بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه ایالتی واشنگتن، آمریکا (تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۱؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۲)

چکیده

آلودگی پسته به زهرابه قارچی آفلاتوکسین از مهم‌ترین محدودیت‌ها در مصرف و تجارت پسته در ایران و جهان است. جدایه‌های غیر توکسین‌زای قارچ *Aspergillus flavus* برای کاهش آفلاتوکسین پنبه دانه، بادام زمینی و ذرت در جهان استفاده می‌شوند و برنامه مطالعاتی وسیعی برای جایگزینی سویه‌های غیر توکسین‌زای *A. flavus* در باغات پسته دنیا در حال انجام است. به منظور پایش و بررسی چگونگی پراکنش جدایه‌های غیر توکسین‌زای *A. flavus* در باغات پسته، از خاک باغات و میوه پسته استان‌های کرمان، خراسان رضوی، قم، اصفهان، یزد، سمنان و مرکزی نمونه برداری شد. با استفاده از روش سری‌های رقت و محیط کشت AFPA، جدایه‌های مختلف متعلق به *Aspergillus section Flavi* جداسازی و خالص‌سازی شدند. جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و آغازگرهای اختصاصی در حد گونه شناسایی گردیدند. برای بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین ابتدا جدایه‌ها بر اساس تولید نور فلورسنت اطراف پرگنه در محیط‌های نارگیل آگار و YES اصلاح شده با متیل‌تاسیکلودکسترین و تغییر رنگ میسلیم در تماس با بخار آمونیاک روی محیط‌های کشت YES، PDA و نارگیل آگار غربال شدند و سپس توانایی تولید آفلاتوکسین با روش کروماتوگرافی لایه نازک اندازه‌گیری شد. از بین ۶۸۱ جدایه *Aspergillus section Flavi* به دست آمده، ۵۲۴ جدایه بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک گونه *A. flavus* تشخیص داده شدند، از بین جدایه‌های مذکور ۵۳ جدایه میوه و ۱۰ جدایه خاک قادر به تولید آفلاتوکسین نبودند. درصد جدایه‌های غیر توکسین‌زای جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور از ۶/۲ تا ۲۵ درصد متغیر بود. نتایج همچنین حاکی از آن بود که به جز محیط کشت نارگیل آگار در ترکیب با بخار آمونیاک سایر روش‌های کشت، درصد جدایه‌های غیر توکسین‌زا را بیشتر از تعداد واقعی آنها نشان می‌داد، از اینرو در آزمایشگاه‌های با امکانات محدود، استفاده از بخار آمونیاک می‌تواند به عنوان روشی کاربردی، ارزان و سریع با دقت قابل قبول جهت غربال جدایه‌های توکسین‌زا مورد استفاده قرار گیرد. **واژه‌های کلیدی:** آفلاتوکسین، بیوکنترل، کروماتوگرافی لایه نازک، *A. flavus*.

Distribution of Nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* throughout pistachio growing areas in Iran

S. R. FANI¹✉, M. MORADI², H. R. ZAMANIZADEH¹, M. MIRABOLFATHY³ and C. PROBST⁴

1- Plant Pathology Department, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran; 2- Plant Protection Department, Iranian Pistachio Research Institute, Rafsanjan, Iran; 3- Plant Pathology Research Department, Iranian Plant Protection Institute, Tehran, Iran; 4- Department of Plant Pathology, Washington State University, IAREC-Prosser, USA

Abstract

Aflatoxins are highly toxic secondary metabolites produced by various *Aspergillus* species in food and feed. Nontoxigenic strains of *A. flavus* have been used for reducing aflatoxin of several crops. To determine the frequency of atoxigenic *A. flavus* population, samples were collected from different pistachio producing areas. A serial dilution method and AFPA medium was used to isolate *Aspergillus section Flavi* isolates. The ability of the isolates to produce aflatoxins was assayed using fluorescence detection (FD) around fungal colonies under UV 366 nm and color changing of colony after ammonia vapor (AV) exposure in the primary screening. First screening stage was validated by thin layer chromatography (TLC) after rice flour inoculation. The species of *A. flavus* were identified morphologically and molecularly based on species-specific primers. Overall, 524 isolates out of 681 isolates were identified as *A. flavus*. 53 *A. flavus* isolates from nut and 10 isolates from soil did not produce any aflatoxins based on the methods used. Comparison of cultural and analytical methods showed FD methods overestimated the frequency of nontoxigenic strains while AV in combination with coconut agar medium produced similar results compare to TLC assays. The AV method can be used in the most laboratories as a practical, cheap, and rapid tool. Further efforts for assessment of competition potential of nontoxigenic strains versus toxigenic strains will be useful.

Key words: Aflatoxin, Biocontrol, Food safety, Thin layer chromatography.

*بخشی از پایان نامه دکتری نویسنده اول ارائه شده به دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

✉ Corresponding author: rezafani52@gmail.com

مقدمه

انجام شده نشان داده است که استرین‌های غیر توکسین‌زا قادر به رقابت با استرین‌های توکسین‌زا و اشغال بستر هستند و این امر باعث کاهش جمعیت استرین‌های توکسین‌زا و میزان آفلاتوکسین در محیط غذایی و خاک شده است (Cotty and Bayman, 1993). غربال‌گری جمعیت‌های بومی قارچ اسپرژیلوس از نظر تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین، توانایی سازگاری با محیط و رقابت با جمعیت‌های توکسین‌زای غالب و سایر میکروارگانیسم‌ها جهت بدست آوردن جدایه‌های غیر توکسین‌زا باید مد نظر قرار گیرد.

روش‌های مختلفی برای بررسی توانایی تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین و یا غربال‌گری مورد استفاده قرار گرفته است، که شامل کاربرد محیط‌های کشت اختصاصی، آنالیز دستگاهی و ملکولی می‌باشند (Abbas et al. 2004). استفاده از روش‌های مبتنی بر محیط‌های کشت را می‌توان به عنوان روشی سریع، ارزان و قابل کاربرد برای غربال تعداد زیادی نمونه، مخصوصاً زمانی که تجهیزات لازم یا در دسترس نباشند و یا امکان کاربرد آنها برای تعداد زیاد نمونه با توجه به هزینه بالای آنها عملی نباشد، به کار گرفته شده‌اند. اساس این روش‌ها تغییر رنگ پرگنه به رنگ صورتی یا قرمز در حضور بخار آمونیاک (Saito and Machida, 1999) و یا تولید نور فلورسنت آبی رنگ اطراف پرگنه (Davis et al. 1987; Fente et al. 2001) در جدایه‌ها با توانایی تولید آفلاتوکسین می‌باشد. این در حالی است که جدایه‌ها با عدم توانایی تولید آفلاتوکسین بدون تغییر رنگ باقی مانده یا نور فلورسنتی از خود نشان نمی‌دهند. تأیید عدم توانایی تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها نیاز به استفاده از روش‌های آنالیز دستگاهی همچون TLC و HPLC دارد (Abbas et al. 2004).

یکی از عوامل مهم در امر کنترل بیولوژیکی، بومی بودن آنتاگونیست است که تا حدود زیادی کارایی عامل بیوکنترول را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Yin et al. 2008). لذا در این تحقیق پراکنندگی و فراوانی جدایه‌های غیر توکسین‌زای *A. flavus* در

پسته با تولیدی معادل ۲۰۰۰۰۰ تن با ارزش بالای صادراتی، پس از نفت مهم‌ترین منبع درآمد ارزی کشور است (Iran Pistachio Association, 2013) و آلودگی آن به آفلاتوکسین از سال ۱۳۵۰ چالش اصلی صادرات آن بوده است (Danesh et al. 1979). آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1 و G2 عمدتاً بوسیله دو گونه قارچی *Aspergillus flavus* Link. و *Aspergillus parasiticus* Speare. تولید می‌شوند (Ito et al. 2001).

گونه‌های مختلف اسپرژیلوس به صورت خاک‌برد و هوابرد در بیشتر مناطق پسته کاری کشور سازگار شده‌اند و قادر به آلوده‌سازی مغز میوه‌های پسته‌های ترک خورده در طی تابستان و تولید آفلاتوکسین در باغ و پس از آن هستند (Moradi and Hokmabadi, 2011). روش‌های مختلفی جهت مدیریت آلودگی محصولات مختلف به اسپرژیلوس و یا آفلاتوکسین همچون راهکارهای فیزیکی، زراعی، بیولوژیکی و شیمیایی توصیه شده است، که هرکدام بسته به مکان، زمان، نوع محصول، قابلیت کاربردی بودن و کارایی، معایب و محاسن خاص خود را دارند (Barkai-Golan and Paster, 2008; Moradi and Hokmabadi, 2011). محدودیت‌های بهداشتی و قوانین و مقررات بین‌المللی مانع کاربرد روش‌های متداول در مورد پسته شده است (Seeram et al. 2006; Brans, 2011; Racicot et al. 2012).

میکروارگانیسم‌هایی از جمله باکتری‌ها، مخمرها، اکتینومیست‌ها و استرین‌های غیر توکسین‌زای *A. flavus* قادر به کنترل بیولوژیکی استرین‌های توکسین‌زا هستند (Dorner, 2004). استرین‌های غیرتوکسین‌زای قارچ *A. flavus* در سطح گسترده روی تعدادی از محصولات همچون پنبه، ذرت، بادام زمینی، پسته، بادام و انجیر در حال استفاده یا توسعه می‌باشد و به عنوان یک روش مؤثر باعث کاهش ۷۰ تا ۹۰ درصدی جمعیت استرین‌های توکسین‌زا در مزرعه و باغ شده است (Brown et al. 1991; Cotty, 1994; Dorner 2004).

گردید (Gourama and Bullerman, 1995). تشک‌های پتری در دمای °C ۳۰ به مدت ۳ تا ۷ روز در تاریکی نگهداری و کلنی‌های قارچ‌های گروه *Aspergillus section Flavi* جداسازی شدند.

۳- نگهداری جدایه‌ها: جدایه‌ها، پس از خالص سازی به روش تک اسپور، در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت (PDA; Merck, Germany) potato dextrose agar و نیز در آب مقطر سترون برای نگهداری و کار روزانه استفاده گردید (Dhingra and Sinclair, 1995).

۴- بررسی توانایی تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین در جدایه‌های قارچ *Aspergillus flavus*:

الف- غربال‌گری اولیه توسط محیط کشت: جهت تشخیص جدایه‌های توکسین‌زا و غیر توکسین‌زا از دو روش: ۱- بررسی تولید و یا عدم تولید نور فلورسنت آبی رنگ اطراف کلنی‌های ۳-۵ روزه تحت طول موج ۳۶۶ نانومتر در محیط‌های کشت yeast extract sucrose agar (YES) غنی شده با متیل‌بتاسیکلودکسترین و نارگیل آگار (CAM) (Davis et al. 1987; Fente et al. 2001) و ۲- تغییر و یا عدم تغییر رنگ پشت کلنی به رنگ صورتی یا قرمز در معرض بخار آمونیاک بعد از ۳ تا ۵ روز در محیط‌های کشت PDA، YES و CAM استفاده گردید (Saito and Machida, 1999). برای تهیه محیط کشت نارگیل آگار مقدار ۲۰۰ گرم پودر نارگیل در یک لیتر آب جوش ریخته شد، پس از ۵ دقیقه و بهم زدن در چند نوبت و زمانی که عصاره نارگیل کاملاً خارج شد، مایع حاصل از ۴ لایه پارچه ململ عبور داده شد و ۲۰ گرم پودر آگار به آن اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو سترون و به تشک‌های پتری ۹ سانتی‌متری منتقل گردید. لازم به ذکر است که جدایه‌ها با عدم تولید نور فلورسنت و یا عدم تغییر رنگ پشت کلنی به صورتی و یا قرمز غیر توکسین‌زا در نظر گرفته می‌شدند.

مناطق مختلف پسته کاری با توجه به شرایط آب و هوایی، اقلیمی و سوابق کشت پسته با استفاده از روش‌های مختلف بررسی شد.

روش بررسی

۱- نمونه برداری: از مناطق پسته‌کاری استان‌های کرمان، خراسان رضوی، قم، اصفهان، یزد، سمنان و مرکزی در طول ماه‌های تابستان نمونه برداری صورت گرفت. در باغ‌های مورد مطالعه برای جداسازی *A. flavus* از خاک، ابتدا هر باغ در جهت‌های شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز تقسیم‌بندی شد و از هر جهت جغرافیایی ۶ زیر نمونه به فواصل ۱۵-۱۰ متر از خاک باغ تا عمق ۱۰ سانتی‌متری در محل سایه‌انداز درختان پسته نمونه برداری صورت گرفت. زیر نمونه‌ها با هم مخلوط شده و نمونه مخلوط به آزمایشگاه منتقل گردید. برای نمونه برداری از میوه پسته در هر باغ، از پسته‌های ترک خورده، روی زمین ریخته شده و پسته‌های سالم روی درخت به طور جداگانه ۱۰۰۰ عدد میوه پسته از ۱۰ درخت و همچنین از مراحل مختلف فرآوری پسته شامل مرحله قبل و بعد از پوست‌گیری، بعد از شست و شو و نم‌گیری، روی میدان (هر مرحله ۱۰۰۰ عدد میوه) نمونه برداری گردید. جهت نمونه برداری از انبارها، در طول فصول پاییز و زمستان از هر انبار تعداد ۱۰۰۰ عدد پسته به وزن تقریبی یک کیلوگرم از نقاط مختلف انبار در سه تکرار برداشت شد. کلیه نمونه‌ها بعد از ثبت مشخصات در صندوق یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲- جداسازی قارچ: جهت جداسازی از خاک سه نمونه ۵۰ گرمی از هر نمونه مخلوط خاک و برای جداسازی از میوه ۱۰۰ عدد میوه پسته در ۳ تکرار به فلاسک‌های حاوی ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه با ۲۰۰ تا ۲۵۰ دور در دقیقه روی دستگاه تکان دهنده قرار داده شدند. پس از رقیق‌سازی سوسپانسیون حاصل، از رقت‌های ۱-۱۰ و ۲-۱۰ در ۴ تکرار و هر تکرار حاوی ۱۰۰ میکرولیتر روی تشک‌های پتری حاوی محیط کشت (AFPA) پخش

ب- استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک: جدایه‌های

غیرتوکسین‌زا که در غربال‌گری اولیه شناسایی شده بودند در لوله‌های آزمایش حاوی محیط PDA به صورت شیب دار کشت و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا کاملاً اسپورزایی صورت گیرد. برای بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها از بستره برنج استفاده گردید (Wei and Jong, 1986). برای استخراج آفلاتوکسین از نمونه‌های برنج در ارلن‌ها، به محتوای هر ارلن ۳ گرم کلرید سدیم و ۱۲۵ میلی‌لیتر متانول ۵۵٪ اضافه گردید. ارلن‌ها به مدت نیم ساعت شیکر و پس از آن محتوای ارلن‌ها از کاغذ صافی عبور داده شد. در مرحله بعد، ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی صاف شده به قیف جدا کننده منتقل گردید و ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم نیز به آن اضافه گردید. محتوای هر قیف جدا کننده حداقل ۳ دقیقه به شدت هم زده شد تا انتقال آفلاتوکسین به فاز کلروفرم به طور کامل انجام پذیرد. پس از جدا شدن کامل دو فاز موجود در قیف جدا کننده، لایه مربوط به فاز کلروفرمی خارج و اقدام به تبخیر حلال آن توسط سیستم تبخیر کننده دوار در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گردید تا زمانی که حجم محلول به حدود ۱ میلی‌لیتر برسد. در ادامه کار، مقدار باقیمانده به یک لوله کوچک منتقل گردید و تبخیر کامل حلال به وسیله عبور گاز نیتروژن از روی محلول تغلیظ شده انجام شد. به منظور آنالیز سم آفلاتوکسین موجود در نمونه‌ها، به هر ویال ۴۰۰ میکرولیتر حلال نقطه‌گذاری (شامل مخلوطی از هگزان، کلروفرم و استون با نسبت‌های حجمی ۹۰:۵:۵) اضافه و محتوای آن به کمک شیکر لوله‌ای شدیداً هم زده شد. سپس به کمک سرنگ مخصوص نقطه‌گذاری (Capillary dispenser)، مرحله نقطه‌گذاری نمونه‌ها بر روی صفحه سیلیکاژل (F254) TLC انجام گردید. جهت شناسایی آفلاتوکسین، بر روی هر پلیت از مخلوطی از استانداردهای آفلاتوکسین‌های گروه B و G نیز جهت نقطه‌گذاری استفاده گردید (Sigma-Aldrich, Germany). پس از آن پلیت‌ها در مخزن حاوی حلال جداسازی و ظهور شامل مخلوطی از

کلروفرم و استون با نسبت حجمی ۹۰:۱۰ و در تاریکی قرار داده شدند. پس از جداسازی اجزاء نمونه (زمانی که سطح فاز متحرک به حدود ۲-۱ سانتی‌متری انتهای فوقانی پلیت رسید، پلیت‌ها مدت کوتاهی برای تبخیر فاز متحرک در تاریکی نگهداری شدند و سپس برای بررسی تحت طول موج ۳۶۶ نانومتر اشعه فرابنفش (UV Cabinet, Camag, Switzerland) قرار گرفتند. از دستگاه چگالی‌سنج (Scanner3, Camag, Switzerland) و نرم افزار CATS3 نیز برای بررسی تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها استفاده گردید و نتایج حاصل از جداسازی نمونه‌ها با نتایج مربوط به جداسازی اجزاء مخلوط استاندارد آفلاتوکسین در خصوص تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین‌های گروه B و G مقایسه گردید (Trucksess, 2000). نمونه‌هایی که در محیط کشت غیرتوکسین‌زا تشخیص داده شده بودند، برای اطمینان جهت غیرتوکسین‌زایی ۲-۳ بار به روش TLC بررسی شد.

۵- شناسایی گونه

- **مرفولوژیکی:** برای شناسایی مرفولوژیک جدایه‌ها در سطح گونه، از ویژگی‌هایی همچون شکل، رنگ، و اندازه: کنیدیفور، کنیدی، وزیکول و سلول پایه و همچنین مشخصات استریگماتا، رشد در محیط‌های کشت و دماهای مختلف استفاده گردید (Klich, 2002).

- **بررسی مولکولی:** ۶۳ جدایه‌ی غیر توکسین‌زای حاصل از غربال‌گری جدایه‌ها با استفاده از روش‌های ذکر شده در بالا، به مدت ۴۸ ساعت در محیط PDB کشت داده شدند. میسلیوم با استفاده از پمپ خلاء و کاغذ صافی شماره ۴ از محیط کشت جداسازی گردید. توده میسلیومی در هاون‌های چینی سترون در ازت مایع ساییده و پودر گردید. جهت استخراج DNA از روش اصلاح شده CTAB (Moradi et al. 2011) استفاده گردید. کیفیت و کمیت DNA خالص شده با استفاده از سنجش‌های الکتروفورزی و اسپکتوفتومتری تعیین گردید. DNA خالص شده در بافر TE و 20°C - برای آزمایشات بعدی نگهداری شد. از آغازگرهای اختصاصی

از محیط کشت نارگیل آگار و YES اصلاح شده با متیل‌بتاسیکلودکسترین غیر توکسین‌زا تشخیص داده شدند. در حالی که بر اساس عدم تغییر رنگ پشت کلنی به رنگ صورتی یا قرمز در روش آمونیاک به ترتیب روی محیط‌های کشت YES، PDA و CAM، ۱۳۲، ۱۰۱ و ۸۲ جدایه غیر توکسین‌زا بودند. در نتایج حاصل از کاربرد روش‌ها و محیط‌های کشت مختلف غیر توکسین‌زایی این ۸۲ جدایه مشترک بود.

- تشخیص اختصاصی گونه به روش مولکولی: کاربرد

آغازگرهای اختصاصی نشان داد که از بین ۸۲ جدایه غیر توکسین‌زا تنها ۶۳ عدد از آن‌ها متعلق به گونه *A. flavus* بودند (جدول ۲). این جدایه‌ها با آغازگرهای اختصاصی گونه، فقط یک قطعه DNA به اندازه ۱۰۰bp تولید نمودند، در حالی که در ۱۹ جدایه دیگر قطعه مورد نظر تولید نگردید.

آلودگی محصولات کشاورزی و فرآورده‌های آنها به زهرابه‌های قارچی با توجه به سرطان‌زا بودن برخی از آنها و سمیت بالا برای انسان و دام مورد توجه سازمانهای بهداشت جهانی و کشورهای مختلف بوده و مقررات و قوانین ویژه‌ای برای تولید، مصرف و واردات آنها تنظیم نموده‌اند. با توجه به جایگاه صادراتی پسته و تاثیر گذاری آفات توکسین‌ها در این خصوص، استفاده از جدایه‌های غیر توکسین‌زا می‌تواند در کاهش سطوح آفات توکسین‌ها قبل و بعد از برداشت و همچنین کاربرد آن در محصولات دیگر از جایگاه ویژه‌ای برخوردار باشد.

در مطالعه حاضر فراوانی جدایه‌های غیر توکسین‌زا و توکسین‌زا در مناطق مختلف پسته‌کاری کشور با استفاده از روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. قارچ‌های گروه *A. flavus* با فراوانی متفاوت از بیشتر نمونه‌های مورد بررسی شامل میوه و خاک جداسازی شد و بیشترین جمعیت مربوط به گونه *A. flavus* بود.

گونه *A. flavus* (5' GTCGTCCCCTCTCCGG 3') FLAVIQ1: طراحی شده توسط Sardinas et al. (2011) برای شناسایی گونه استفاده گردید. واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر (Primus, MWG Biotech, UK) انجام و نتایج به صورت وجود و یا عدم وجود قطعه تکثیر شده روی ژل آگاروز در مقایسه با نشانگر DNA و همچنین جدایه استاندارد *A. flavus* بررسی شد.

نتیجه و بحث

- جدایه‌های به دست آمده: در این تحقیق فراوانی جدایه‌های غیر توکسین‌زا و توکسین‌زا در استان‌های کرمان (کرمان، رفسنجان، زرنند، سیرجان، شهرابک)، خراسان رضوی (بردسکن، خلیل آباد، فیض آباد)، اصفهان (اصفهان، آران و بیدگل)، یزد (بفرویه میبد)، سمنان (دامغان)، قم (قمرود) و مرکزی (ساوه) با استفاده از روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع تعداد ۲۰۵ نمونه میوه پسته و ۲۰ نمونه خاک از ۵ استان عمده پسته‌کاری کرمان، خراسان رضوی، اصفهان، یزد، قم، سمنان و مرکزی جمع‌آوری و جهت جداسازی قارچ‌های مورد نظر بررسی شد.

از نمونه‌های جمع‌آوری شده، با استفاده از محیط AFPA تعداد ۶۸۱ جدایه متعلق به *Aspergillus section Flavi* به دست آمد. از این تعداد جدایه، ۵۲۴ عدد براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی تحت گونه *A. flavus* شناسایی گردیدند (جدول ۱). فراوانی جدایه‌های غیر توکسین‌زا به ترتیب برای استان‌های کرمان، اصفهان، قم، خراسان رضوی، یزد، سمنان و مرکزی ۶/۲، ۱۵/۴، ۱۳، ۱۷/۶، ۲۵، ۹/۱ و ۱۱/۱ درصد متغیر بود.

- غربالگری جدایه‌های غیر توکسین‌زا: نتایج حاصل از

بررسی ۵۲۴ جدایه از نظر توانایی تولید آفات توکسین‌زا نشان داد که بر اساس عدم تولید تابش فلورسنت اطراف پرگنه‌های سه روزه جدایه‌ها به ترتیب ۱۷۵ و ۱۸۸ جدایه با استفاده

جدول ۱- تعداد، منبع و فراوانی (%) جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا از استان‌های مختلف

Table 1. Number, source and frequency of toxigenic and nontoxigenic isolates from different provinces

تعداد سویه‌های غیرتوکسین‌زا		درصد فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا Frequency of Nontoxigenic isolates	<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	استان Province
Number of nontoxigenic strains					
خاک Soil	میوه Fruit				
3	11	6.2	225	293	Kerman
2	10	15.4	78	101	Isfahan
1	2	13	23	30	Ghom
2	28	17.6	170	221	Razavi Khorasan
1	1	25	8	10	Yazd
1	0	9.1	11	14	Semnan
0	1	11.1	9	12	Markazi
10	53		524	681	Total

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* به دست آمده از استان‌های مختلف

Table 2. Characteristics of nontoxigenic isolates obtained from different provinces

توکسین‌زایی در محیط کشت CAM و روش TLC Toxigenicity in CAM and TLC	تشخیص مورفولوژیکی/مولکولی Morphological/Molecular detection	منبع جداسازی Source of isolation	محل جمع‌آوری Location	جدایه Isolate	ردیف No.
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Bardaskan	KhN46	1
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN301	2
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN302	3
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Khalilabad	KhN64	4
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Bardaskan	KhN69	5
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1061	6
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1062	7
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1091	8
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1092	9
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1096	10
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN10911	11
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN10913	12
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1106	13
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1109	14
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN11017	15
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN10811	16
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1087	17
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1121	18
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1122	19
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1129	20
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN11413	21
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN11415	22
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN11417	23
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN11510	24
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhNF12	25
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1134	26
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhN1123	27
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Feizabad	KhNF1	28
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Feizabad	KhS21	29
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Feizabad	KhS39	30
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Zarand	Kn13	31

ادامه‌ی جدول ۲- مشخصات جدایه‌های غیر توکسین‌زای *A. flavus* به دست آمده از استان‌های مختلف

Table 2 continued. Characteristics of nontoxigenic isolates obtained from different provinces

توکسین‌زایی در محیط کشت CAM و روش TLC Toxigenicity in CAM and TLC	تشخیص مورفولوژیکی/مولکولی Morphological/Molecular detection	منبع جداسازی Source of isolation	محل جمع‌آوری Location	جدایه Isolate	ردیف No.
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Kerman	Kn35	32
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Rafsanjan	Kn341	33
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Rafsanjan	Kn2181	34
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Rafsanjan	Kn880	35
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Rafsanjan	Kn176	36
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Rafsanjan	Kn303	37
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Rafsanjan	Kn150	38
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Kerman	Kn85	39
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Kerman	Kn22	40
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Kerman	Kn102	41
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Rafsanjan	KS59	42
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Shahrbabak	KS1761	43
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Rafsanjan	KS130	44
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Aranobidgol	IN221	45
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Aranobidgol	IN222	46
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Aranobidgol	IN224	47
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Aranobidgol	IN227	48
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Isfahan	IN1912	49
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Aranobidgol	IN261	50
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Isfahan	IN1911	51
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Isfahan	IN1921	52
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Aranobidgol	IN221	53
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Isfahan	IN642	54
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Aranobidgol	IS226	55
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Aranobidgol	IS221	56
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Ghomroud	QN25	57
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Ghomroud	QN502	58
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Ghomroud	QS282	59
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Yazd, Bafruye	YN3	60
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Yazd, Bafruye	YS14	61
Negative	<i>A. flavus</i>	Soil	Damghan	SS24	62
Negative	<i>A. flavus</i>	Fruit	Saveh	MN282	63

تحقیقات بیشتر در خصوص پایداری غیر توکسین‌زایی، توانایی رقابتی آنها با سایر جمعیت‌ها و استقرار تحت شرایط باغ‌های پسته دارد. بر اساس نتایج اولیه، الگوی حذف در جدایه‌های غیر توکسین‌زای بدست آمده از یک ژن تا بیشتر خوشه‌زنی متفاوت می‌باشد که این امر احتمال برگشت پذیری توکسین‌زایی را به حداقل می‌رساند. با توجه به شرایط آب و هوایی الگوی خاصی در فراوانی جدایه‌های غیر توکسین‌زا در مناطق مختلف پسته کاری کشور مشاهده نگردید. علت اصلی تفاوت بین فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیر توکسین‌زا در

نتایج همچنین نشان داد که جمعیت‌های *A. flavus* از نظر تولید آفلاتوکسین متنوع بوده و در مناطق مختلف مورد بررسی ۶/۲ تا ۲۵ درصد جدایه‌ها قادر به تولید آفلاتوکسین‌های گروه G و B نبودند.

این اولین مطالعه در خصوص پراکنش جدایه‌های غیر توکسین‌زای بومی در مناطق مختلف پسته‌کاری کشور است که تشخیص غیر توکسین‌زایی با استفاده از روش‌های مختلف انجام شده است. این جدایه‌ها می‌توانند در کاهش جمعیت سویه‌های توکسین‌زا در سطح باغ مؤثر واقع شوند، که نیاز به

در نواحی جنوبی تولید بادام زمینی فراوانی جدایه‌های L بیشتر از نواحی شمالی است (Horn and Dorner, 1999). تحقیقات انجام شده در نیجریه نیز بیانگر فراوانی متفاوت جدایه‌ها بسته به شرایط جغرافیایی و اقلیم می‌باشد (Donner *et al.* 2009). از طرف دیگر تنوع در ترکیب جمعیتی جدایه‌های این قارچ تحت تأثیر عواملی همچون غالبیت ژنتیکی، شرایط محیطی و نوع بستر غذایی می‌باشد و تنوع در تولید آفلاتوکسین به دلیل اهمیت بهداشتی و امنیت غذایی آن از همه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Bayman and Cotty, 1993).

شاید تفاوت در فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا را بتوان در سیستم تک‌کشتی پسته، نیازمندی‌های اکولوژیکی و بیولوژیکی جدایه‌ها در طبیعت، برهمکنش با سایر میکروارگانیسم‌ها و نقش آفلاتوکسین در حذف سایر میکروارگانیسم‌ها دانست. تحت شرایط آزمایشگاهی چندین مرتبه کشت مجدد *A. flavus* روی محیط‌های کشت مصنوعی باعث از دست توانایی تولید آفلاتوکسین و تغییر در ویژگی‌های ریخت‌شناسی همچون تولید میسیلیوم، اسپور و اسکلروت می‌گردد. این در حالی است که تحت شرایط طبیعی و وجود تنش‌های زنده و غیر زنده باعث حفظ توانایی تولید آفلاتوکسین و خصوصیات مرفولوژیکی تیپ وحشی می‌گردد (Horn and Dorner, 2002; Chang *et al.* 2007). تحقیقات حاکی از تأثیر آفلاتوکسین در کاهش جمعیت قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیسیت‌ها در خاک می‌باشد، که با افزودن مواد آلی به خاک این تأثیر افزایش می‌یابد (Angle and Wanger, 1981)، این موضوع نشان دهنده نقش آفلاتوکسین‌ها در توانایی رقابتی جدایه‌ها و یا گونه‌های تولیدکننده در برابر سایر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد.

برای غربال‌گری توکسین‌زایی و یا عدم آن در جدایه‌های *A. flavus* روش‌های مختلفی بر پایه سنجش میزان فلورسنت به صورت ظاهری و یا در عصاره، تغییر رنگ میسیلیوم قارچی، و جذب اشعه UV به صورت کمی یا کیفی بر پایه

باغ‌های پسته به خوبی مشخص نبود. به نظر می‌رسد یکی از دلایل آن عدم تعیین نقش اکولوژیکی آفلاتوکسین باشد و ممکن است در رقابت قارچ با سایر میکروارگانیسم‌ها آفلاتوکسین نقش حفاظتی ایفا نماید (Angle and Wanger, 1981). این موضوع نیز باید اضافه گردد که تولید آفلاتوکسین‌ها در رشد قارچ، شدت بیماری‌زایی و توانایی رقابتی در بین جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا نقشی ندارد (Donner *et al.* 2009; Donner *et al.* 2010). اشاره به این نکته حائز اهمیت است که تولید آفلاتوکسین توسط قارچ نیازمند صرف انرژی می‌باشد و از دست دادن این توانایی در جدایه‌های غیر توکسین‌زا ممکن است باعث توانا تر شدن قارچ در رشد و اشغال سریع‌تر محل‌های اکولوژیکی گردد. از طرف دیگر جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا در محل‌های اکولوژیکی مشترک وجود دارند و حذف رقابتی از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیکی می‌باشد (Cotty and Bayman, 1993; Cotty, 1994; Donner *et al.* 2009). در جنوب ایالات متحده جمعیت عمده جدایه‌های *A. flavus* به دست آمده از مزارع ذرت توکسین‌زا بودند (Cotty 1997, Horn and Dorner, 1999)، در آرژانتین کمتر از ۳۰٪ جدایه‌های *A. flavus* قادر به تولید آفلاتوکسین بودند (Vaamonde *et al.* 2003). مطالعات انجام شده روی ۸۶۴ جدایه *A. flavus* از باغ‌های پسته کالیفرنیا نشان داد که جدایه‌های غیر توکسین‌زا ۵/۸٪ فراوانی را به خود اختصاص داده‌اند (Michailides *et al.* 2007). فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* در اکثر مزارع ذرت مورد بررسی نیجریه بالاتر از سویه‌های توکسین‌زا بود بطوریکه ۵۶٪ از کل جدایه‌ها غیرتوکسین‌زا تشخیص داده شدند (Donner *et al.*, 2009)، در حالی که در مزارع ذرت کنیا ۳۳٪ از جدایه‌های *A. flavus* غیرتوکسین‌زا بودند (Probst *et al.* 2011). در این خصوص مطالعات انجام شده حاکی از یک ارتباط منفی بین عرض جغرافیایی و تولید آفلاتوکسین در محصولات مختلف می‌باشد (Cotty, 1990). در ایالات متحده

سپاسگزاری

از مسئولین و کارکنان محترم مؤسسه تحقیقات پسته کشور به لحاظ همکاری در اجرای بخشی از این تحقیق و در اختیار گذاشتن تعدادی از جدایه‌های قارچی مورد نیاز تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- ABBAS, H. K., W. T. SHIER, B. W. HORN and M. A. WEAVER, 2004. Cultural Methods for Aflatoxin Detection, *Journal of Toxicology*, 23: 295-319.
- ANGLE, J. S. and G. H. WANGER, 1981. Aflatoxin B1 effects on soil microorganisms. *Soil biology and biochemistry*, 13: 381-384.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2000. Official methods 970.45 Aflatoxins in Peanuts and Peanut Products BF Method, 14th edn. Arlington. VA 22209 USA:
- BARKAI-GOLAN, R. and N. PASTER, 2008. Mycotoxins in fruits and vegetables. Burlington, Academic Press. 395 pp.
- BRANS, H. 2011. Food and Agricultural Import Regulations and Standards Narrative, USDA Foreign Agricultural Service. Global Agriculture Information, 42 pp.
- BROWN, R. L., P. J. COTTY and T. E. CLEVELAND, 1991. Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, 54: 623-626.
- CHANG, P. K., J. R. WILKINSON, B. W. HORN, J. YU, D. BHATANGAR and T. E. Cleveland, 2007. Genes differentially expressed by *Aspergillus flavus* strains after loss of aflatoxin production by serial transfers. *Applied Microbiology Biotechnology*, 77: 917-925.
- COTTY, P. J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*, 79: 808-814.
- COTTY, P. J. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology*, 84(11): 1270-1277.
- روش‌های کشت و یا آنالیز دستگامی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مقایسه روش‌های کشت مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که به استثنای روش آمونیاک در ترکیب با محیط کشت نارگیل آگار سایر محیط‌های کشت مورد استفاده باعث تخمین بیش از فراوانی واقعی جدایه‌های غیر توکسین‌زا می‌گردند. این موضوع نشان دهنده عدم کارایی عموم روش‌های کشت برای تشخیص جدایه‌ها غیر توکسین‌زای کاذب (با توانایی تولید آفلاتوکسین پایین) و تفکیک آن‌ها از جدایه‌های غیر توکسین‌زای واقعی است. ترکیب آمونیاک با محیط کشت نارگیل آگار در مقایسه با سایر محیط‌های کشت، بعد از ۵ روز به خوبی توانست جدایه‌های غیر توکسین‌زای کاذب را مشخص نماید، که مزیت نسبی به شمار می‌رود. از مزایای دیگر محیط کشت نارگیل آگار می‌توان به زمینه سفید و روشن این محیط و تمایز رنگ بهتر پرگنه‌های توکسین‌زا، قابل کاربرد بودن در اکثر آزمایشگاه‌ها با امکانات محدود، ارزان بودن، سادگی و عدم نیاز به امکانات پیچیده آزمایشگاهی، نیروی متخصص و سرعت بالا جهت غربال‌گری توده‌ای تعداد زیاد جدایه اشاره نمود. مزیت دیگر محیط نارگیل آگار نسبت به سایر محیط‌ها طبیعی‌تر بودن بستر رشد قارچ برای توکسین‌زایی می‌باشد. جنبه‌های مختلف روش‌های کشت مورد استفاده برای بررسی توانایی تولید و یا عدم تولید توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Abbas *et al.* 2004). به هر حال تشخیص قطعی جدایه‌های غیر توکسین‌زا نیاز به استفاده از روش‌های آنالیز دستگامی با دو و یا سه بار تکرار دارد. در تحقیق حاضر بسترهایی همچون آرد پسته، ذرت و آرد برنج استفاده گردید، که در مجموع بستره آرد برنج نسبت به دو بستره دیگر با توجه به روش مورد استفاده برتری داشت. کاربرد روش کرماتوگرافی لایه نازک در بسیاری از تحقیقات در خصوص تشخیص جدایه‌های غیر توکسین‌زا جهت غربال‌گری و یا تأیید روش‌ها بر پایه محیط کشت مورد استفاده قرار گرفته است (Probst *et al.* 2011).

- COTTY, P. J. and P. BAYMAN, 1993. Competitive exclusion of a toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain. *Phytopathology*, 83(12): 1283-1287.
- COTTY, P. J. 1997. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycological Research* 101: 698-704.
- DANESH, D., H. MOJTAHEDI, R. BARNETT and A. CAMPBELL, 1979. Correlation between climatic data and aflatoxin contamination of Iranian pistachio nuts. *Phytopathology*, 69: 715-716.
- DAVIS, N. D., S. K. IYER and U. L. DIENER, 1987. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7): 1593-1595.
- DONNER, M., J. ATEHNKENG, R. A. SIKORA, R., BANDYOPADHYAY and P. J. COTTY, 2009. Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1): 37-44.
- DONNER, M., J. ATEHNKENG, R. A. SIKORA, R., BANDYOPADHYAY and P. J. COTTY, 2010. Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria. *Food Additives and Contaminants*, 27(5): 576-590.
- DORNER, J. W. 2004. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Toxicology Toxin Review*, 23: 425-450.
- FENTE, C. A., J. J. ORDAZ, B. I. VAZQUEZ, C. M. FRANCO and A. CEPEDA, 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67(10): 4858-4862.
- GOURAMA, H. and L. B. BULLERMAN, 1995. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *Journal of Food Protection*, 58: 1395-1404.
- HORN, B. W. and J. W. DORNER 2002. Effect of competition and adverse culture conditions on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* through successive generations. *Mycologia*. 9: 741-751.
- HORN, B. W. and J. W. DORNER, 1999. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied Environmental Microbiology*, 65.
- IRAN PISTACHIO ASSOCIATION, 2013. Statistical Archive from <http://www.iranpistachio.org>.
- ITO, Y., S. W. PETERSON, D. T. WICKLOW and T. GOTO, 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research*. 105(2): 233-239.
- KLICH, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Central voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; pp 116.
- MICHAILIDES, T. J., M. DOSTER, P. J. COTTY, D. MORGAN, L. BOCKLER, D. FELT and H. REYES, 2007. Aflatoxin control in pistachios: biocontrol using the atoxigenic strain AF36, survival of AF36, and EUP status. In Proceedings of the 2007 Annual Multicrop Aflatoxin/Fumonisin Elimination and Fungal Genomics Workshop. pp. 54-55.
- MORADI, M. and H. HOKMABADI, 2011. Control of Mycotoxin Bioactives in Nuts: Farm to Fork. *Fruit and Cereal Bioactives, Sources, Chemistry, and Applications*. O. Tokusoglu, Hal III, C. Turkey, CRC Press. 1: 291-315.
- MORADI, M., E. C. OERKE, U. STEINER, D. TESFAYE, K. SCHELLANDER and H. W. DEHNE, 2011. Microbiological and Sybr® Green Real-Time PCR Detection, of Major *Fusarium* Head Blight Pathogens on Wheat Ears. *Microbiology*, Vol. 79, 5: 646-654.
- PITT, J. I. and A. D. HOCKING, 2006. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*, 162(3): 233-243.
- PROBST, C., R. BANDYOPADHYAY, L. E. PROCE and P. J. COTTY, 2011. Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. *Plant Disease*, 95(2): 212-218.
- RACICOT, K., A. CRAVEN and C. Y. O. CHEN, 2012. Bleaching augments lipid peroxidation products in pistachio oil and its cytotoxicity *European Journal of*

- Lipid Science and Technology, 114(12): 1362-1372.
- SAITO, M. and S. MACHIDA, 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Mycoscience 40: 205-208.
- SARDINÁS, N., C. VÁZQUEZ, J. GIL-SERNA M. T. GONZÁLEZ-JAÉN and B. PATIÑO, 2011. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. International Journal of Food Microbiology, 145(1): 121-125.
- SEERAM, N. P., Y. ZHANG, S. M. HENNING, R. LEE, Y. NIU, G. LIN and D. HERBER, 2006. Pistachio skin phenolics are destroyed by bleaching resulting in reduced antioxidative capacities. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(19): 7036-40.
- TRUCKSESS, M. W. 2000. Natural toxins (Chapter 49), in Official Methods of Analysis, 17th Edition (Horwitz, W., ed.) Gaithersburg, MD: AOAC International, pp. 1-64.
- VAAMONDE, G., A. PATRIARCA, V. FERNANDEZ PINTO, R. COMERIO and C. Degrossi, 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. International Journal of Food Microbiology, 88(1): 79-84.
- WEI, D. and S. JONG, 1986. Production of aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* group maintained in ATCC. Mycopathologia, 93: 19-24.
- YIN, Y. N., J. H. YAN and Z. H. MA, 2008. Biological control of aflatoxin contamination of crops. Journal of Zhejiang University Science Biomedicine and Biotechnology, 9(10): 787-792.

