شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین در کشمش با استفاده از روش Multiplex PCR

محبوبه سرابی جماب [1*]، فخری شهیدی [2]، احمدرضا بهرامی [2]، سید علی مرتضوی [2]، محمدرضا نصیری [2]

[1*]- پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

۲- دانشگاه فردوسی مشهد

m.sarabi@rifst.ac.ir

چکیده: آفلاتوکسین از جمله سموم خطرناک قارچی است که دارای اثرات سمی بر سیستم عصبی، سیستم ایمنی، ایجاد جهش ژنتیکی، نقص در جنین و سرطان‌زایی می‌باشد. این سم قادر است سبب آلودگی مواد غذایی از جمله کشمش گردد. در این پژوهش، ایزوله‌های قارچی جدا شده از نمونه-های کشمش خراسان رضوی (پلویی، پیکامی و تیفی) ، با استفاده از روش مولکولی Multiplex PCR به منظور شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین ۴۵ نمونه کشمش، به لحاظ حضور DNA قارچ‌های تولید کننده آفلاتوکسین بررسی گردید. از میان ۵۰ ایزوله قارچی جدا شده از نمونه‌های کشمش، تنها دو نمونه باندهای مربوط به تکثیر ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین را نشان داد. این در حالی است که در هیچ یک از نمونه‌های کشمش باندهای مربوط به ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین مشاهده نشد. نتایج حاصل از اندازه گیری میزان آفلاتوکسین به روش HPLC نتایج روش مولکولی را تایید کرد به طوری که هیچ‌یک از نمونه‌های کشمش آلوده به سم آفلاتوکسین نبود.

واژه های کلیدی: *کشمش، آفلاتوکسین، روش مولکولی Multiplex PCR*

مقدمه:

کشمش میوه خشک‌شده انگور است که به صورت خام یا به عنوان یکی از اجزای تشکیل‌دهنده مواد غذایی در محصولاتی نظیر فراورده‌های پخت استفاده می‌شود. ایران یکی از صادر کنندگان اصلی کشمش در سال‌های اخیر محسوب می‌شود و کشمش ایران به کشورهای مختلفی صادر می‌گردد؛ ازاین رو اطمینان از کیفیت میکروبی و ایمنی این محصول از اهمیت زیادی برخوردار است. (۱و۳).

آفلاتوکسین‌ها از نقطه نظر شیمیایی مشتقات فورانو کومارین[1] محسوب می‌شوند که توسط روش پلی‌کتید[2] تولید شده و شامل دو گروه دی-فوروکومارو سیکلوپنتانن[3] (M_1 ,B_2 ,B_1) و دی‌فوروکومارو لاکتون[4] (G_1 ,G_2) می‌باشند که در گروه یک ترکیبات سرطان‌زا طبقه بندی شده‌اند. این ترکیبات هتروسیکلیک[5] وزن مولکولی پایینی داشته و براساس منشأ اولیه، و نور فلورسانسی که در حضور اشعه فرابنفش دارند به چهار گروه اصلی B_1، B_2، G_1 و G_2 تقسیم می‌شوند. آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 در طول موج ۴۲۵ نانومتر و G_1 و G_2 در طول موج ۴۵۰ نانومتر اشعه فرابنفش به ترتیب رنگ آبی و سبزـ زرد فلورسانس تولید می‌کنند (۲).

آفلاتوکسین از سموم خطرناک قارچی هستند که توسط گروهی از کپک‌ها نظیر گونه‌های جنس *آسپرژیلوس* تولید می‌شوند و قادرند سبب آلودگی مواد غذایی از جمله کشمش گردند. در انگور و فراورده‌های آن *آسپرژیلوس فلاووس*[6] عامل اصلی تولید آفلاتوکسین می‌باشد. به طور کلی این سموم دارای اثرات سمی بر سیستم عصبی، سیستم ایمنی، ایجاد جهش ژنتیکی، نقص در جنین و سرطان‌زایی می‌باشند (۱۱،۱۲و۱۴).

در این پژوهش، ایزوله‌های قارچی جدا شده از نمونه‌های کشمش خراسان رضوی (پلویی، پیکامی و تیفی)، با استفاده از روش مولکولی PCR Multiplex به منظور شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین ۴۵ نمونه کشمش، به لحاظ حضور DNA قارچ‌های تولید کننده آفلاتوکسین بررسی گردید.

مواد و روش ها:

۱- نمونه برداری

نمونه‌برداری از سه نوع کشمش پلویی، پیکامی و تیفی از شهرهای عمده تولید کننده کشمش در استان خراسان رضوی (شهرهای قوچان، کاشمر، بردسکن، خلیل آباد و مشهد) انجام گردید. کشمش‌ها به سه روش آفتابی، تیزابی و گوگردی خشک شده بودند. از هر نوع کشمش پنج نمونه انتخاب شد. نمونه‌های خریداری شده پس از بسته‌بندی در شرایط استریل تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری شدند.

۲- جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها

جداسازی ایزوله‌های قارچی با استفاده از محیط کشت PDA انجام شد. به منظور خالص‌سازی ایزوله‌های قارچی از روش سینگل اسپور[7] استفاده گردید. بدین صورت که توسط آنس سوزنی ظریف میزان کمی از اسپور قارچی به لوله محتوی آب مقطر استریل منتقل شد و سپس توسط لام توما رقت آن محاسبه گردید. پس از تهیه رقتی مناسب، قطره ای از سوسپانسیون حاصل به محیط کشت واتر آگار انتقال یافت. پس از گذشت ۱۲ الی ۲۴ ساعت، از کلنی رشد یافته بر روی محیط واترآگار، به محیط کشت PDA که قبلا در پلیت استریل ریخته و سرد شده بوده در ۳ نقطه انتقال داده شد و به مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۲۵ °C گرمخانه‌گذاری گردید (۵).

۳- استخراج DNA قارچ از کپک‌های ایزوله شده

برای استخراج DNA از کپک‌های ایزوله شده، به کمک بیستوری استریل قطعه‌ای از ایزوله خالص‌شده از محیط کشت PDA جدا گردید و به ارلن حاوی محیط کشت PDB انتقال یافت. ارلن‌ها به انکوباتور شیکردار منتقل شده و به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مدت عمل همزدن با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه انجام شد تا از تولید اسپور توسط جدایه‌ها جلوگیری شده و تنها میسلیوم آن‌ها تکثیر گردد. در پایان هفتمین روز، میسلیوم کپک‌ها با کمک کاغذ صافی واتمن در شرایط کاملاً استریل جدا شده و به پلیت استریل انتقال یافت. پس از نگهداری آن‌ها به مدت یک‌شبانه‌روز در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد، توسط دستگاه فریز درایر خشک گردید. در مرحله بعد، با کمک نیتروژن مایع نمونه خشک شده خرد و پودر یکنواختی از آن تهیه شد. سپس به میسلیوم قارچی پودر شده در ازت مایع، بافر لیز کننده (Tris۱۰۰Mm، EDTA۰/۰۵ M ، ۱٪ W/V، SDS ۰/۹ M، NaCl و $Na_2So_3$۰/۱ M) و پروتئیناز k افزوده شد. به منظور ایجاد شوک حرارتی نمونه به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی-گراد قرار گرفت. در این مدت هر ۱۰ دقیقه یکبار نمونه‌ها ورتکس شد تا لیز شدن دیواره سلولی به خوبی انجام شود. سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل به میکروتیوب جدید منتقل گردید و با کلروفرم/ایزوآمیل‌الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) استخراج گردید. پس ازآن محلول به مدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار گرفت و به دنبال آن به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل به میکروتیوب جدید منتقل و DNA با حجم مساوی از ایزوپروپانول رسوب داده شد. به منظور رسوب بهتر و ظهور کلاف DNA، به مدت ۲۴ ساعت در

---

[1] Furanocumarin
[2] Polyketide
[3] Difurocoumarocyclopentanone
[4] Difurocoumarolactone
[5] Heterocyclic
[6] *Aspergillus flavus*
[7] Single Spore

دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. رسوب حاصل به مدت ۵ دقیقه با g ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از آن شستشو با الکل ۷۰ درصد برای خشک کردن DNA انجام شد. سپس سوپرناتانت حذف شده و رسوب باقی‌مانده در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه مجدداً سوسپانس شد و تا انجام آزمایشات در ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۳). کیفیت استخراجی توسط ژل الکترفورز ۱ درصد و دستگاه نانو دراپ مورد ارزیابی قرار گرفت.

۴- استخراج DNA کپک از نمونه‌های کشمش

با توجه به آن‌که جداسازی DNA از نمونه‌های کشمش با روش فوق به سادگی مسیر نبود، به منظور استخراج DNA کپک از نمونه‌های کشمش از روشی که هانانیا[8] و همکاران در ۲۰۰۴ معرفی نمودند، استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ گرم نمونه‌کشمش خرد شده به ارلن حاوی محیط کشت PDB انتقال یافت. ارلن‌ها به مدت ۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها با کمک کاغذ صافی استریل صاف شده و به هاون چینی انتقال یافت و با کمک ازت مایع به صورت پودر یکنواختی درآمد. به منظور استخراج DNA ابتدا از بافر هموژنیزه (۰/۵ M هگزیلن گلیکول، ۱۰ Mm تریس با pH=۷/۵ ، ۱۰ Mm کلرید منیزیم، (v/v) ٪ ۰/۵ تریتون x-100، ۵ Mm بتا مرکاپتواتانول) استفاده شد. پس از مخلوط شدن کامل نمونه با بافر هموژنیزه، سانتریفوژ با g ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس پلت تشکیل شده با بافر شستشو (۱ M هگزیلن گلیکول، ۱۰ Mm تریس با pH=۷/۵ ، ۱۰ Mm کلرید منیزیم، (v/v) ٪ ۰/۵ تریتون x-100، ۵ Mm بتا مرکاپتواتانول) مخلوط و مجدداً سانتریفوژ شد. در مرحله بعد به پلت ایجاد شده بافر استخراج (۰/۳۵ M سوربیتول، ۰/۱ M تریس با pH=۷/۵ ، ۵ Mm EDTA ، ٪ ۰/۴ بی‌سولفیت سدیم) بافر لیزکننده (۰/۲ M تریس با pH=۷/۵ ، ٪۲ CTAB، ۵ Mm EDTA، ۴ M کلرید سدیم، ٪ ۱ PVP) و سارکوزیل ۵ درصد اضافه گردید. پس از انکوباسیون در دمای ۶۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، به منظور رسوب DNA، ابتدا از محلول کلروفرم/ایزوآمیل‌الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) استفاده شد و سپس به سوپرناتانت حاصل ایزوپروپانول افزوده شده و چند بار به آهستگی تکان‌داده شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس سانتریفوژ شدند. پس از خارج نمودن سوپرناتانت، DNA ترسیب شده با الکل ۸۰ درصد شستشو شد و در نهایت پس از خشک نمودن آن، با آب مقطر استریل رقیق گردید. در انتها به منظور جلوگیری از آلودگی DNA با RNA از RNase استفاده شد (۹). همچنین جهت اطمینان یافتن از استخراج DNA از نمونه‌های کشمش، نتیجه حاصل از عملیات استخراج DNA، بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید.

۵- انجام واکنش PCR به منظور شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز

شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین با استفاده از ۴ جفت آغازگر مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین و بر اساس روش Multiplex PCR انجام شد. توالی‌های آغازگرهای رفت و برگشت هر جفت در جدول ۱ لیست گردیده است (۶و۷). پس از اتمام واکنش‌ها، برای اطمینان از تکثیر بهینه قطعات مورد نظر و جهت رویت قطعات، مقدار ۵ میکرولیتر از هر محصول PCR بر روی ژل یک درصد آگارز، تحت ولتاژ ۸۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شد. کلیه مواد لازم جهت انجام واکنش PCR و مراحل آن در جداول ۳-۲ تا ۳-۵ آمده است.

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی جفت آغازگرهای مورد استفاده در شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین

نام توالی	توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای رفت و برگشت
nor1/nor2	nor1: ACCGCTACGCCGGCACTCTCGGCAC nor2: GTTGGCCGCCAGCTTCGACACTCCG
ver1/ver2	ver1: GCCGCAGGCCGCGGAGAAAGTGGT ver2: GGGGATATACTCCCGCGACACAGCC
omt1/omt2	omt1: GTGGACGGACCTAGTCCGACATCAC omt2: GTCGGCGCCACGCACTGGGTTGGGG
aflR1/aflR2	aflR1: TATCTCCCCCCGGGCATCTCCCGG aflR2: CCGTCAGACAGCCACTGGACACGG

جدول ۲: ترکیبات لازم جهت انجام واکنش PCR جهت شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین

واکنشگرها	حجم (میکرولیتر)	غلظت
آب مقطر	۳/۷۵	-
بافر	۲	۱۰ X
MgCl2	۱	۵۰ mM
DNTPs	۱	۱۰ mM
آغازگرهای رفت	۳/۵	۱۰ Pmol
آغازگرهای برگشت	۳/۵	۱۰ Pmol
الگو DNA	۱۰	-
آنزیم Taq پلیمراز	۰/۲۵	۵ u/µl
حجم نهایی	۲۵	

[8] Hanania

جدول ۳: برنامه زمانی واکنش PCR جهت شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین

نام مرحله	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	مدت زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
واسرشت سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال آغازگرها	۶۷	۳۰ ثانیه	۳۵
سنتز قطعه مورد نظر	۷۲	۳۰ ثانیه	۳۵
گسترش نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

۶- اندازه‌گیری آفلاتوکسین به روش HPLC

نمونه های کشمش با ۱/۵ برابر وزن خود با آب مخلوط شد و توسط دستگاه اسلاری به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه به شکل خمیری یکنواخت درآمد. جهت عمل استخراج ۷۵ گرم نمونه اسلاری شده (۲۵ گرم ماده خشک + ۵۰ گرم آب) با ۵ گرم نمک کلرید سدیم و ۱۲۰ میلی لیتر متانول ۱۰۰٪ کاملاً مخلوط شده و توسط کاغذ صافی ۱۱۳/۱ واتمن صاف گردید؛ ۲۰ میلی لیتر از صاف شده برداشته و با ۱۳۰ میلی لیتر بافر فسفاته با pH = ۷/۴ کاملاً مخلوط و از کاغذ صافی GFF عبور داده شد. و پس از آن ۱۰۰ میلی لیتر از صاف شده برداشته و از ستون ایمونوافینیتی دارای آنتی‌بادی ویژه آفلاتوکسین عبور داده شد. با عبور عصاره رقیق شده از ستون، سم موجود در عصاره (آنتی ژن) به آنتی بادی‌های درون ستون متصل گردید. پس از آن سم متصل شده به آنتی‌بادی در درون ستون توسط عبور متانول از داخل ستون، شسته و درون ویال جمع‌آوری و با آب رقیق گردید. تعیین مقدار آفلاتوکسین با استفاده از روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا که مجهز به مشتق‌ساز پس‌ستون، بود انجام گردید. مشتق ساز پس‌ستون، آفلاتوکسین‌ها را برمینه نموده و آن‌ها را به ترکیباتی که شدت فلورسانس بیشتری را نسبت به سموم دارند، تبدیل نمود؛ لذا پیک‌ها قابل رویت شدند. در نهایت تعیین مقدار سم از مقایسه سطح زیر منحنی و یا ارتفاع منحنی‌های استاندارد با نمونه مجهول، با احتساب ضریب رقت محاسبه گردید (۴).

نتایج و بحث:

یکی از روش‌های PCR که صرفه‌جویی در وقت، هزینه و مواد مصرفی را در برداشته و نسبت به روش‌های دیگر PCR به لحاظ سرعت در انجام کار،دقت و یکسان بودن شرایط واکنش برای آغازگرها برتری دارد، روش Multiplex PCR می‌باشد. در این روش از چند جفت آغازگر به طور همزمان استفاده می‌شود. با توجه به آن‌که ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین به خوبی شناسایی شده است، در منابع مختلف از آغازگرهای متفاوتی استفاده شده است که دسترسی به آن‌ها ساده می‌باشد. لذا در این پژوهش روش Multiplex PCR برای تشخیص قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین بر پایه آنزیم‌های حدواسط مسیر بیوسنتز آن شامل ژن کد کننده آنزیم نورسولورینیک اسید ردوکتاز[9] (*nor-1*)، ژن کد کننده ورسیکلورینا دهیدروژناز[10] (*ver-1*)، ژن کد کننده استریگماتوسیستین o-متیل ترانسفرازاز[11] (*omt-1*) و ژن تنظیمی *afl*R انجام شد. بر این اساس چهار جفت آغازگر شامل nor1/nor2، ver1/ver2، omt1/omt2، aflR1/aflR2 بود. نتایج شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین از میان ۵۰ کپک ایزوله شده حاکی از آن است که تنها دو نمونه باندهای مربوط به تکثیر ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین را نشان داد. لازم به ذکر است که به عنوان کنترل مثبت از DNA قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (ATCC 5286) استفاده گردید. تصویر ژل حاصل از الکتروفورز محصول Multiplex PCR تکثیر شده با چهار جفت آغازگر مذکور در شکل ۱ نشان داده شده است.

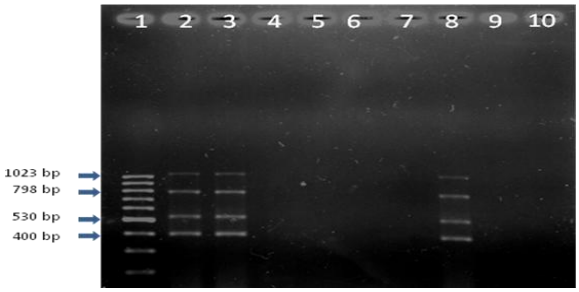
علاوه بر انجام واکنش PCR برای DNA استخراج شده از کپک‌های ایزوله‌شده، DNA استخراج شده از نمونه‌های کشمش نیز به منظور بررسی آلودگی آن‌ها به قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین به روشMultiplex PCR و با استفاده از چهار جفت آغازگر nor1/nor2، ver1/ver2، omt1/omt2، aflR1/aflR2 تکثیر گردید. نتایج نشان داد که در هیچ یک از نمونه‌های کشمش باندهای مربوطه به ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین مشاهده نشد. هرچند دو نمونه از کپک‌های ایزوله شده به عنوان تولید کننده آفلاتوکسین شناسایی شدند، به نظر می‌رسد عدم مشاهده باند از محصولات PCR حاصل از تکثیر DNA استخراج شده از نمونه‌های کشمش به دلیل کم بودن میزان DNA کپک مولّد آفلاتوکسین در نمونه-های کشمش و نیز اثر بازدارندگی ترکیبات فنلی و کربوهیدرات موجود در بافت کشمش می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیزHPLC تولید آفلاتوکسین در نمونه‌های کشمش نشان داد که هیچیک از نمونه‌های کشمش آلوده به سم آفلاتوکسین نمی‌باشند.

مانونمانی و همکاران (۲۰۰۵) از توالی ژن تنظیمی مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین (*aflR*) به منظور شناسایی قارچ‌های مولّد آفلاتوکسین به روش PCR استفاده نمودند. در این تحقیق در نمونه بادام زمینی و ذرت که به طور مصنوعی با آسپرژیلوس فلاووس آفلاتوکسین‌زا آلوده شده بودند، باند مربوط به تکثیر ژن *aflR* مشاهده شد. این در حالی است که در تصویر ژل الکتروفورز حاصل از تکثیر محصول PCR نمونه‌های فاقد قارچ تولید کننده آفلاتوکسین باندی مشاهده نشد (۱۱). نوربخش و همکاران (۲۰۰۹) نیز به منظور شناسایی قارچ‌های تولید کننده آفلاتوکسین در نمونه‌های زعفران از

[9] Norsolorinic acid reductase
[10] Versicolorina dehydrogenase
[11] Sterigmatocystin 0-methyl transfrase

روش PCR بر پایه توالی ژن تنظیمی *aflR* استفاده نمودند. نتایج نشان داد که از ۳۷ نمونه زعفران مورد آزمایش ۱۸/۹ درصد از آن آلوده به قارچهای مولّد آفلاتوکسین بود (۱۳). ارمی و همکاران (۲۰۰۷) از ۴ جفت پرایمر nor1/nor2، ver1/ver2، omt1/omt2، aflR1/aflR2 به منظور تشخیص قارچهای مولّد آفلاتوکسین پرداختند. از میان ۱۴ سویه آسپرژیلوس فلاووس مورد بررسی، در سه نمونه باندهای مربوط به تکثیر نواحی مختلف مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین مشاهده شد (۷). کرایسئو و همکاران (۲۰۰۱) نیز به منظور شناسایی سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس تولید کننده آفلاتوکسین از سویه‌های غیر تولید کننده آن از تکثیر ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین شامل *aflR*، *nor-1*، *ver-1* و *omt-A* با استفاده از ۴ جفت آغازگر استفاده نمودند. نتایج نشان داد که تنها در سویه‌های تولید کننده آفلاتوکسین هر ۴ باند مربوط به حضور ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین به طور همزمان مشاهده می‌شود؛ این در حالی است که در سویه‌های غیر تولید کننده آفلاتوکسین باندی مشاهده نشد و یا فقط یک، دو و یا سه باند بر روی ژل الکتروفورز محصول PCR مشاهده گردید (۶).

یاماناکا و همکاران (۲۰۰۷) میزان آفلاتوکسین در ۶۲ نمونه میوه خشک شده (۲۴ کشمش سیاه، ۱۹ کشمش سفید و ۱۹ انجیر خشک شده) را به روش HPLC اندازه‌گیری نمودند. آفلاتوکسین در ۱۶ درصد نمونه کشمش سفید و ۵۸ درصد نمونه انجیر خشک شده تشخیص داده شد. در هیچ یک از نمونه‌های کشمش سفید آلوده، میزان توکسین بیش از ۲ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم نبود؛ این در حالی است که میزان آلودگی یکی از نمونه‌های انجیر خشک ۱۵۰۰ میکروگرم آفلاتوکسین B_1 به ازای هر کیلوگرم به‌دست آمد. همچنین در هیچ یک از نمونه‌های کشمش سیاه آلودگی به آفلاتوکسین‌ها مشاهده نشد (۱۰). وارگا و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه‌ای که روی گروهی از مواد غذایی موجود در بازار مجارستان از جمله کشمش به منظور بررسی آلودگی مواد غذایی به توکسین‌های قارچی انجام دادند، کشمش را از آلوده‌ترین مواد غذایی به مایکوتوکسین‌ها گزارش نمودند. کشمش ایران به عنوان آلوده‌ترین کشمش در بین نمونه‌های آزمایش شده معرفی شد (۱۵). قالی و همکاران (۲۰۰۸) میزان شیوع آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین A و زرالنون را در مواد غذایی تونسی به روش الایزا اندازه‌گیری نمودند. از ۲۰۹ نمونه ماده غذایی مورد آزمایش، ۵۹/۸ درصد آلوده به اکراتوکسین A، ۵۰/۵ درصد آلوده به آفلاتوکسین‌ها و ۱۵ درصد آلوده به زرالنون بود. ادویه‌جات، میوه‌های خشک و سورگوم آلوده‌ترین مواد غذایی به آفلاتوکسین‌ها و اکراتوکسین A بودند؛ درحالی که برنج کمترین میزان آلودگی را داشت (۸).



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با چهار جفت پرایمر nor1/nor2، ver1/ver2، omt1/omt2، aflR1/aflR2 از کپک‌های ایزوله‌شده بر روی ژل آگارز یک درصد. شماره ۱ نشانگر ۱۰۰ bp، شماره ۲ و ۳ باند مربوط به محصول PCR نمونه ها، شماره ۸ کنترل مثبت، شماره ۹ کنترل منفی.

نتیجه گیری کلی:

با توجه به آن‌که توکسین‌های قارچی می‌توانند سلامت مصرف‌کننده را به خطر بیاندازند، شناسایی قارچهای مولّد این سموم از اهمیت بسزایی برخوردار خواهد بود. لذا در این پژوهش، ایزوله‌های قارچی جدا شده از نمونه‌های کشمش با استفاده از روش مولکولی PCR به منظور شناسایی قارچ-های مولّد آفلاتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از میان ۵۰ ایزوله قارچی جدا شده از نمونه‌های کشمش در محیط کشت PDA، ۲ جدایه تولید کننده آفلاتوکسین بود. همچنین ۴۵ نمونه کشمش (پلویی، پیکامی و تیفی) به لحاظ حضور DNA قارچهای تولید کننده آفلاتوکسین بررسی گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده در هیچیک از نمونه‌های کشمش، DNA قارچ مولّد آفلاتوکسین مشاهده نشد.

منابع:

۱-امیر قاسمی، ت.، ۱۳۸۱، انگور، کاشت- داشت- برداشت- فرآوری، انتشارات آیندگان، تهران.
۲-مرتضوی، ع. و ف. طباطبایی، ۱۳۷۶، توکسینهای قارچی، انتشارات دانشگاه فردوسی، مشهد.
۳-مقصودی، ش.، ۱۳۸۷، تکنولوژی انگور و فراورده‌های آن، انتشارات علم کشاورزی ایران، تهران.
۴-مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۲، مواد غذایی - اندازه گیری آفلاتوکسین های گروه B و G به طریق کروماتوگرافی مایع با کارآیی عالی و خالص‌سازی با ستون ایمونوافینیتی- روش آزمون، استاندارد شماره ۶۸۷۲، چاپ اول.
5-Choi, Y.M., K.D., Hyde, W.H., Ho, 1999, Single spore isolation of fungi, *Fungal Diversity*, 3: 29-38.
6-Criseo, G., A., Bagnara, G., Bisignano, 2001, Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing of *Aspergillus flavus* group, *Letters in Applied Microbiology*, 33: 291-295.

7-Erami, M., S.J., Hashemi, S.A., Pourbakhsh, S., Shahsavandi, S., Mohammadi, A.H., Shooshtari, Z., Jahanshiri, 2007, Application of PCR on detection of aflatoxinogenic fungi, *Archive of Razi Institute*, 62(2): 95-100.

8-Ghali, R., K., Hmaissia-khlifa, H., Ghoebel, K., Maaroufi, A., Hedili, 2008, Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods, *Food Control*, 19: 921-924.

9-Hanania, U., M., Velcheva, N., Sahar, A., Real, 2004, An improved method for isolating high-quality DNA from *Vitis vinifera* nuclei, *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 173-177.

10-Iamanaka, B.T., M.H., Taniwaki, H. C., Menezes, E.,Vicente, M.H.P., Fungaro, 2005, Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil, Food *Additives and Contaminants*, 22(12): 1258–1263.

11-Manonmani, H.K., S., Anand, A.,Chandrashekar, , E.R., Rati, 2005, Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR, *Process Biochemistry*, 40: 2859–2864.

12-Niessen, N. 2007, PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi, International *Journal of Food Microbiology*, 119: 38–46.

13-Noorbakhsh, R., A.R., Bahrami, S.A., Mortazavi, B., Forghani, M., Bahreini, 2009, PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron, *Food Science and Biotechnology*, 18(4): 1038-1041.

14-Selma, M.V., P.V., Martínez-Culebras, A., Aznar, 2008, Real-time PCR based procedures for detection and quantification of Aspergillus carbonarius in wine grapes, *International Journal of Food Microbiology*, 122: 126–134.

15-Varga, J., S., Kosube, z., Koncz, J., Teren, 2006, Mycobiota and ochratoxin A in raisins purchased in Hungary, *Acta Alimentaria*, 35(3): 289-294.