پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۰ (۳):۱۲۰-۱۰۹ (۱۴۰۰)- مقاله پژوهشی
Journal of Applied Research in Plant Protection 10(3): 109-120 (2021)-Research Article

DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.13319

غربال و ارزیابی تنوع فنوتیپکی جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *Aspergillus flavus* در باغات پسته ایران

راضیه پورحسینی [۱]، ابراهیم صداقتی [۱]✉، سید رضا فانی [۲]، ماریه ناذی [۳]، محمد مرادی [۳]

[۱] گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه ولیعصر رفسنجان (عج). کرمان، ایران. [۲] بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، 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. ✉ sedaghati@vru.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۹/۹/۲۷ بازنگری:۹۹/۱۰/۱۶ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۲

چکیده

استفاده از سویه‌های غیرتوکسین‌زای قارچ *Aspergillus flavus* به عنوان یک روش بیولوژیک مؤثر برای کاهش آفلاتوکسین در کشورهای مختلف در حال توسعه است. سویه‌های غیرتوکسین‌زا قادر به رقابت با سویه‌های توکسین‌زا و اشغال بستر هستند و این امر باعث کاهش جمعیت توکسین‌زا و میزان آفلاتوکسین در بستر غذایی می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی تنوع در جمعیت غیرتوکسین‌زای *A. flavus* از نظر ریخت شناختی بود. تعداد ۲۲۵ نمونه میوه و خاک پسته از استان‌های مختلف جمع‌آوری و برای جداسازی قارچ از روش سری‌های رقت و محیط کشت AFPA استفاده شد. برای غربال اولیه جدایه‌های غیرتوکسین‌زا از روش بخار آمونیاک در محیط کشت نارگیل آگار و برای تأیید نتایج از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) استفاده شد. تعیین گونه جدایه‌های حاصله به روش مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه FLAVIQ1/FlaQ2 انجام شد. ویژگی‌های ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی ۵۶ سویه غیرتوکسین‌زای *A. flavus* به دست آمده، با استفاده از چهار محیط کشت CYA (Czapek yeast agar)، MEA (Malt extract agar)، CY20S (Czapek yeast 20% sucrose) و CZ (Czapek) مورد مقایسه قرار گرفت. بررسی این خصوصیات، جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* را در پنج گروه قرار داد. الگوی رشد پرگنه در محیط کشت CYA25 قابلیت تفکیک خوبی در بین جدایه‌ها از خود نشان داد. نتایج نشان داد در میان جدایه‌های غیرتوکسین‌زا *A. flavus* به دست آمده از مکان‌های جغرافیایی مختلف تنوع زیادی وجود دارد که دلیل آن می‌تواند به وجود گونه‌های مختلف در کمپلکس *A. flavus* مربوط باشد.

کلمات کلیدی: ایمنی غذایی، پسته، کنترل زیستی، مایکوتوکسین، متابولیت ثانویه

Screening and evaluation of phenotypic diversity of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* in Iranaian pistachio orchards

Razieh Pourhosseini[1], Ebrahim Sedaghati[1]✉, Seyed Reza Fani[2], Marieh Nadi[3], Mohammad Moradi[3]

[1]Plant Pathology, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan. Kerman, Iran. [2]Plant Protection Research Department, Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yazd, Iran. [3]Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran. ✉sedaghati@vru.ac.ir

Received: 17 Dec 2020 Revised: 5 Jan 2021 Accepted: 2 Mar 2021

Abstract

The use of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* as an effective biological method to reduce aflatoxin is being developed in different countries. Nontoxigenic strains are able to compete with toxigenic strains by substrate occupation, which reduces the toxigenic population and the amount of aflatoxin in the substrate. The aim of study was to investigate the morphological diversity in the nontoxigenic population of *A. flavus*. To isolate nontoxigenic strains from 225 fruit and pistachio soil samples obtained from different provinces, AFPA culture medium and dilution series method were used. Primary nontoxigenicity screening was performed by ammonia vapor method in coconut agar medium and thin layer chromatography was used for result confirmation. Isolates were identified molecularly using FLAVIQ1/FlaQ2 species-specific primers. In order to identify the macromorphological and micromorphological features of 56 obtained strains, four culture media including CYA (Czapek yeast agar), MEA (malt extract agar), CY20S (Czapek yeast 20% sucrose) and CZ (Czapek) were used. Investigation of macro-micromorphological features, classified *A. flavus* strains into five groups. Colony growth pattern on CYA25 cultural media has shown good differentiation between isolates. The results showed that there is a great variety among nontoxigenic *A. flavus* isolates obtained from different agro ecological zones due to the presence of different species in the *A. flavus* complex.

Keywords: Biological Control, Food safety, Pistachio, Mycotoxin, Secondary metabolite

How to cite:
Pourhosseini R, Sedaghati E, Fani SR, Moradi M. 2021. Morphological characterization of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* in Irannian pistachio orchards. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (3): 109–120.

مقدمه

گونه *Aspergillus flavus* Link در سال ۱۸۰۹ شناسایی و نامگذاری شد (Amaike & Keller 2011). این قارچ به همراه ۳۲ گونه دیگر از جمله *A. caelatus* B.W. Horn، *A. oryzae* Ahlb.، *A. bombycis* S.W. Peterson, Yoko Ito, B.W. Horn &T. Goto، *A. lanosus* Kamal & Bhargava، *A. avenaceus* G. Sm.، *A nomius* Kurtzman, B. W. Horn، *leporis* States & M. Chr.، *A. pseudotamarii*، *A. alliaceus* Thom &Church، & Hesselt. *A. sojae*، Yoko Ito, S.W. Peterson, Wicklow & T. Goto، *A. parasiticus* Speare، Sakag. & K. Yamada و *A. tamari* Kita بخش *Flavi* را تشکیل می‌دهند (Frisvad *et al*. 2019). بر اساس مطالعات انجام شده، بخش *Flavi* در بین گروه‌های دیگر از نظر تأثیر منفی که بر روی سلامت و اقتصاد محصولات کشاورزی می‌گذارد، مهم‌تر است (Chang *et al*. 1995; Ehrlich *et al*. 2003; Moradi *et al*. 2014). گونه‌های *A. oryza* و *A. sojae* از گذشته-های دور در تولید غذاهای تخمیری در جنوب شرقی آسیا مورد استفاده قرار گرفته‌اند و در مقابل گونه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* با ترکیبات سرطان‌زا مواد غذایی را آلوده می‌کنند (Ehrlich *et al*. 2003). گونه *A. nomius* از نظر ریخت شناختی شبیه *A. flavus* است ولی مانند *A. parasiticus*، آفلاتوکسین B و G تولید می‌کند لیکن در حال حاضر تعداد گزارش‌ها در مورد آلودگی منابع غذایی با این قارچ بسیار محدود است (Chang *et al*. 1995). تولیدمثل غیرجنسی در *A. flavus* با رشد میسلیومی و تولید کنیدیوفور انجام می‌گیرد. کنیدیوفور غیرمنشعب و در انتها کمی متورم است که وزیکول را تشکیل داده و به شکل‌های مختلف کروی تا نیمه کروی دیده می‌شود. ساختار کنیدی‌زایی این قارچ به صورت دو ردیفی (دارای متولا (Metula) و فیالید (Phialid)) و یک ردیفی (دارای فیالید) است. کنیدیوم‌های بلاستیک فیالیدیک این قارچ گرد، تک سلولی و به شکل زنجیری روی سلول‌های اسپورزا (فیالیدها) قرار می‌گیرند. زنجیره‌های اسپوری ممکن است به شکل شعاعی (Radiate)، کروی (Globose) و یا ستونی (Columnar) گسترش یابد. اندازه، شکل، رنگ و تزئینات این اسپورها بسته به گونه قارچ تفاوت‌های زیادی دارد و یکی از معیارهای اصلی در طبقه‌بندی و شناسایی ریخت شناختی به حساب می‌آید (Thom & Raper 1945). در محیط کشت مصنوعی و یا اندام آلوده مجموعه کنیدیوفورها و کنیدیوم‌های این قارچ بسته به گونه‌های مختلف این جنس به رنگ سیاه، زرد و غیره ظاهر می‌شوند (Klich & Pitt 1988). کنیدی‌ها تک سلولی بوده و به اشکال کروی تا نیمه کروی هستند. دیواره کنیدی‌ها نسبتا خشن و یا ندرتا صاف هستند (Klich 2007).

پسته یکی از مهم‌ترین محصولات باغی ایران است و استان کرمان بیشترین سطح زیر کشت و تولید آن را داراست (Salehi *et al*. 2018). بخش عمده‌ای از صادرات غیرنفتی ایران به پسته تعلق دارد که درآمد ارزی قابل توجهی را نصیب کشور می‌کند (Mahmoudi & Jalali 2016). این در حالی است که آلودگی پسته به گونه‌های قارچ *Aspergillus* و مایکوتوکسین‌های تولید شده از آنان، صادرات پسته را با مشکل روبرو ساخته است (Fani *et al*. 2014a; Salehi *et al*. 2018; Moghadam *et al*. 2020). مهم‌ترین عامل تولید آفلاتوکسین‌ها، جدایه‌های متعلق به چندین گونه قارچ *Aspergillus* به ویژه *A. flavus* هستند. جنس *Aspergillus*بیش از ۲۰۰ گونه را شامل می‌گردد. گونه‌های مختلف این قارچ دارای دامنه انتشار وسیع بوده و از نواحی قطبی تا نواحی گرم حاره‌ای یافت می‌شوند. گونه‌های جنس *Aspergillus* قادر به ترشح آنزیم‌های متعددی هستند و بنابراین، می‌توانند روی انواع بی‌شماری از مواد غذایی رشد کنند. در حقیقت به سختی می‌توان یک محیط غذایی حاوی مقداری ماده آلی و مختصری رطوبت را پیدا نمود که گونه‌های *Aspergillus* نتوانند روی آن رشد کنند. بدین ترتیب گونه‌های *Aspergillus* به طرق مختلفی بر زندگی انسان تأثیر می‌گذارند (Amaike & Keller 2011). سالانه ۲۰ درصد از محصولات غذایی تولید شده در دنیا توسط سموم قارچی یا مایکوتوکسین‌ها آلوده می‌شوند که آلودگی به آفلاتوکسین‌ها در این بین سهم بیشتری دارند. خسارت ناشی از تخریب مواد غذایی و محصولات کشاورزی توسط این توکسین در ایالات متحده بیش از ۱۰۰ میلیون دلار در سال برآورد شده است (Ehrlich *et al*. 2003). در آفریقا، بیش از ۷۵۰ میلیون دلار هزینه سالانه آلودگی محصولات به آفلاتوکسین است (Gbashi *et al*. 2018). روش‌های مختلفی جهت مدیریت آلودگی محصولات مختلف به آسپرژیلوس و یا آفلاتوکسین مانند راهکارهای زراعی، مکانیکی، فیزیکی و بیولوژیک 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 & Paster 2011; Moradi & Hokmabadi 2011; Jafari Nodoushan *et al*. 2011; Moradi and Fani 2018; Rouhani *et al*. 2018; Moradi *et al*. 2020).

استفاده از استرین‌های غیرتوکسین‌زای قارچ *A. flavus* در سطح گسترده به عنوان یک روش مؤثر روی تعدادی از محصولات همچون ذرت، پنبه‌دانه، پسته، بادام زمینی، بادام و انجیر در حال استفاده یا توسعه است و باعث کاهش ۷۰ تا ۹۰ درصدی جمعیت استرین‌های توکسین‌زا در مزرعه و باغ شده است (Cotty 1994; Dorner 2004; Pitt & Hocking 2006; Savić *et al.* 2020). بیش از ۳۰ ژن به صورت خوشه‌ای با اندازه تقریبی ۷۵ کیلو باز روی کروموزوم شماره هفت قارچ، با دخالت تعداد قابل توجهی از مسیرهای آنزیمی و در یک فرآیند بسیار پیچیده ساخته شدن آفلاتوکسین را بر عهده دارند (Chang *et al.* 2005). غیرتوکسین‌زایی جدایه‌های *A. flavus* می‌تواند نتیجه جهش‌های نقطه‌ای یا حذف یک یا چند ژن از خوشه (کلاستر) ژنی مسئول تولید آفلاتوکسین باشد (Fani *et al.* 2011; Fani *et al.* 2012). تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های غیرتوکسین‌زا می‌تواند موجب تنوع فنوتیپی نیز باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی خصوصیات ریخت شناختی سویه‌های استرین‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* و بررسی اولیه تنوع آنها در محیط‌های کشت مختلف و معرفی بهترین محیط کشت برای گروه‌بندی اولیه تعداد زیادی سویه از یک گونه قارچی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

از مناطق پسته‌کاری استان‌های کرمان، خراسان رضوی، قم، اصفهان، یزد، سمنان و مرکزی در طول ماه‌های تابستان ۲۰۵ نمونه میوه و ۲۰ نمونه خاک برداشته شد و برای جداسازی قارچ‌ها به آزمایشگاه منتقل گردید.جهت جداسازی از خاک سه نمونه ۵۰ گرمی از هر نمونه مخلوط خاک و برای جداسازی از میوه ۱۰۰ عدد میوه پسته در سه تکرار به فلاسک‌های حاوی ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل رقیق شده و از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} در چهار تکرار و هر تکرار حاوی ۱۰۰ میکرولیتر روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت Aspergillus Flavus and Parasiticus Agar (AFPA) پخش گردید و تشتک‌های پتری در دمای ۳۰ °C به مدت هفت روز در تاریکی نگهداری و کلنی جدایه‌های *Aspergillus* section *Flavi* انتخاب و خالص شدند (Gourama & Bullerman 1995).

غربال‌گری اولیه جدایه‌های غیرتوکسین‌زا در محیط کشت

جهت تشخیص جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا از روش بخار آمونیاک و محیط کشت نارگیل آگار (Coconut Agar Medium; CAM) استفاده گردید. در این روش کلنی ۵-۳ روزه رشد یافته در دمای ۳۰ °C در معرض بخار آمونیاک قرار گرفته و در صورت تغییر رنگ پشت کلنی به صورتی یا قرمز به عنوان سویه توکسین‌زا و در صورت عدم تغییر رنگ به عنوان غیرتوکسین‌زا در نظر گرفته می‌شود (Saito & Machida 1999).

تأیید غیرتوکسین‌زایی جدایه‌ها با استفاده از کروماتوگرفی لایه نازک

جدایه‌های غیرتوکسین‌زایی که در غربال اولیه شناسایی شده بودند در لوله‌های آزمایش حاوی محیط سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) به صورت شیب‌دار کشت و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند تا کاملا اسپورزایی صورت گیرد. ارلن‌های حاوی ۱۰ گرم آرد برنج استریل با رطوبت ۲۵ درصد با سوسپانسیون اسپور جدایه‌های مورد نظر مایه‌زنی شد (Wei & Jong 1986). برای استخراج آفلاتوکسین از نمونه‌ها، به محتوای هر ارلن سه گرم کلرید سدیم و ۱۲۵ میلی‌لیتر متانول ۵۵ ٪ اضافه گردید. ارلن‌ها به مدت نیم ساعت در شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفته و پس از آن محتوای ارلن‌ها از کاغذ صافی عبور داده شد. در مرحله بعد، ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی صاف شده به قیف دکانتور منتقل و ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم نیز به آن اضافه گردید. محتوای هر دکانتور حداقل سه دقیقه به طور دستی و به شدت هم زده شد تا انتقال آفلاتوکسین به فاز کلروفرم به طور کامل انجام پذیرد. قیف‌های دکانتور تا زمان جداسازی کامل بطور ساکن نگهداری و لایه مربوط به فاز کلروفرم جدا و پس از تبخیر کلروفرم در دمای ۴۰ °C توسط سیستم روتاری و در زیر هود، مقدار باقی‌مانده کلروفرم به یک لوله کوچک منتقل گردید و تبخیر کامل به وسیله عبور گاز نیتروژن از روی محلول تغلیظ شده انجام شد. به منظور آنالیز سم آفلاتوکسین موجود در نمونه‌ها، ابتدا به هر ویال ۴۰۰ میکرولیتر حلال نقطه‌گذاری (شامل مخلوطی از هگزان، کلروفرم و استون با نسبت حجمی ۹۰ : ۵ : ۵) اضافه و محتوای آنها به کمک شیکر لوله‌ای شدیدا به هم زده شدند. سپس به کمک سرنگ مخصوص نقطه‌گذاری (Capillary dispenser)، مرحله نقطه‌گذاری نمونه‌ها بر روی صفحه سیلیکاژل TLC (F_{254}) انجام گردید. جهت شناسایی آفلاتوکسین‌ها، در هر پلیت مخلوطی از

استانداردهای آفلاتوکسین‌های گروه B و G نقطه‌گذاری گردید. به منظور جداسازی آفلاتوکسین‌ها، پلیت‌ها در تانک‌های حاوی حلال‌های جداسازی و ظهور شامل مخلوطی از کلروفرم و استون با نسبت حجمی ۹۰ : ۱۰ و درتاریکی 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 تبحیر فاز متحرک در تاریکی نگهداری شدند و سپس برای بررسی تحت طول موج ۳۶۶ نانومتر اشعه فرابنفش در دستگاه UV) (Cabinet, CAMAG, Switzerland قرار گرفت. نمونه‌هایی که در محیط کشت غیرتوکسین‌زا تشخیص داده شده بودند، برای اطمینان جهت غیرتوکسین‌زایی، دو بار به روش TLC مورد بررسی قرار گرفتند (Moradi *et al*. 2011).

شناسایی مولکولی گونه

استخراج DNA: جدایه‌های غیرتوکسین‌زای حاصل از غربال‌گری جدایه‌ها، به مدت ۴۸ ساعت در محیط سیب‌زمینی- دکستروز- براث (PDB) روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵°C کشت شدند. میسیلیوم تولید شده با استفاده از پمپ خلاء و کاغذ صافی (Watman®, No. 4, Sigma-Aldrich, Germany) از محیط کشت جدا شد. میسیلیوم‌ها در هاون‌های چینی سترون در ازت مایع ساییده، پودر و جهت استخراج DNA از روش اصلاح شده CTAB (Moradi 2011) استفاده گردید. DNA خالص شده در بافر TE و دمای ۲۰ °C- برای آزمایشات بعدی نگهداری شد.

استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه A. flavus: به این منظور از آغازگرهای FLAVIQ1/FlaQ2 (FLAVIQ1: 5′ GTCGTCCCCTCTCCGG 3′ / FLAQ2: 5′ CTGGAAAAAGATTGATTTGCG 3′) استفاده گردید (Sardinas *et al*. 2011). واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸/۱۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر (۵ نانوگرم) DNA ژنومی الگو، ۱ میکرولیتر (۲۰ میکرومولار) از هر یک از آغازگرها، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR buffer، ۱ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر dNTP (۱۰۰ میلی‌مولار) و ۰/۱۵ میکرولیتر (Sinaclon, Iran) Taq DNA polymerase (5 U/ µL) در دستگاه ترموسایکلر (Primus, MWG Biotech, UK) طبق برنامه حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دورگه‌سازی در ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲°C به مدت ۱/۵ دقیقه در ۳۰ چرخه و بسط نهایی در ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. بعد از تهیه ژل آگارز ۱ ٪، برای رنگ‌آمیزی DNA، ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید به ژل اضافه گردید. برای مشاهده محصول PCR الکتروفورز با شدت ولتاژ ثابت ۸۵ ولت به مدت یک ساعت در ژل آگارز و بافر TAE (هیدروکسی متیل ۲۴۲ میلی‌گرم، اسید استیک ۵۷ میلی‌لیتر، EDTA ۱۰۰ میلی‌لیتر، آب تا حجم نهایی ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) انجام گردید. با استفاده از دستگاه Gel Documentation (UVtec, Cambridge, UK)، تحت طول موج ۳۶۶ نور UV از آن عکس‌برداری شد.

نگهداری جدایه‌ها: برای نگهداری کوتاه مدت، جدایه‌های مورد بررسی روی محیط PDA شیب‌دار کشت و در دمای ۴ °C و برای طولانی مدت در لوله‌های حاوی آگار، گلیسرول و سوسپانسیون اسپور در دمای ۲۰ °C- نگهداری شدند.

گروه‌بندی ریخت شناختی جدایه‌های قارچ A. flavus

جهت گروه‌بندی بر اساس ویژگی‌های ریخت شناختی جدایه-های غیرتوکسین‌زای مورد استفاده در این تحقیق از چهار محیط کشت CYA (Czapek Yeast Agar)، MEA (Malt Extract Agar) و CY20S (Czapek Yeast 20% Sucrose) و CZ (Czapek Dox Agar)استفاده شد (Raper & Fennell 1965; Klich 2002).

عصاره غلیظ پایه برای محیط‌های چاپک (Czapek): $NaNO_3$ ۳۰ گرم، KCl ۵ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۵ گرم، $FeSO_4.7H_2O$ ۰/۱ گرم، $ZnSO_4.7H_2O$ ۰/۱ گرم، $CuSO_4.5H_2O$ ۰/۰۵ گرم، آب مقطر ۱ لیتر.

محیط CYA: عصاره مخمر ۵ گرم، K_2HPO_4 ۱ گرم، عصاره زاپک ۱۰ گرم، ساکارز ۳۰ گرم، آگار ۱۵ گرم، آب مقطر ۱ لیتر.

محیط CYA20s: عصاره مخمر ۵ گرم، K_2HPO_4 ۱ گرم، عصاره زاپک ۱۰ میلی‌لیتر، ساکارز ۲۰۰ گرم، آگار ۱۵ گرم، آب مقطر ۱ لیتر.

محیط زاپک CZ: K_2HPO_4 ۱ گرم، عصاره زاپک ۱۰ میلی‌لیتر، ساکارز ۳۰ گرم، آگار ۱۵ گرم، آب مقطر ۱ لیتر.

محیط عصاره مخمر MEA: پپتون ۱ گرم، گلوکز ۲۰ گرم، عصاره مخمر ۲۰ گرم، آگار ۱۵ گرم، آب مقطر ۱ لیتر.

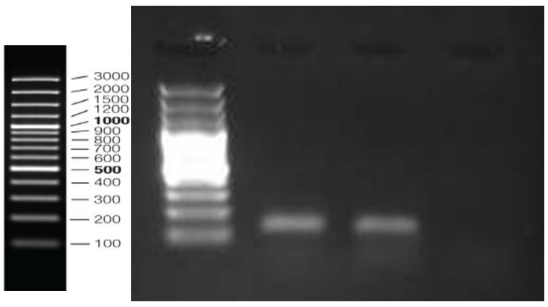
پس از جداسازی و تهیه پرگنه خالص جدایه‌ها به روش تک اسپور روی محیط آب آگار (WA)، به منظور بررسی‌های بعدی، از

پنج تشتک پتری شامل دو عدد حاوی محیط کشت CYA و سه عدد حاوی محیط‌های کشت MEA، CY20S و CZ استفاده شد. قرص‌های میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از هر جدایه، در هر تشتک پتری در سه نقطه با فاصله مساوی از هم کشت گردیدند. یکی از دو تشتک پتری حاوی محیط کشت CYA حاوی قارچ در دمای ۳۷ °C و بقیه تشتک‌ها در دمای ۲۵ °C و تاریکی مداوم قرار گرفتند. رشد قارچ در همه تشتک‌های پتری بعد از یک هفته بررسی شد. برای شناسایی، ابتدا ویژگی‌های ماکرومورفولوژیکی شامل رنگ و قطر پرگنه بعد از هفت روز، رنگ سرهای کنیدیایی، رنگ میسلیوم، وجود و یا عدم وجود ترشحات روی پرگنه، رنگ پشت پرگنه در زیر تشتک پتری، بررسی توانایی تولید سختینه و سپس ویژگی‌های میکرومورفولوژیکی شامل تشکیل حالت uniseriate (تک ردیفی، دارای فیالید) و یا biseriate (دو ردیفی، دارای فیالید و متولا)، شکل و قطر وزیکول (vesicle)، وضعیت سطح کنیدیوم از نظر صافی و زبری و نیز شیاردار و خاردار بودن آن، طول و عرض متولا، طول و عرض فیالید و وضعیت کنیدیوفور از نظر طول، رنگ و تزئینات سطحی آن بررسی شدند. لازم به ذکر است که جهت اندازه‌گیری اندام‌های میکروسکوپی قارچ از محیط کشت‌های MEA و CYA25 استفاده شد و در هریک از موارد مذکور ۵۵ نمونه اندازه گیری شد و میانگین آن‌ها به عنوان اندازه نهایی در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین رنگ پرگنه از جدول رنگ قارچ شناسی (Rayner 1970) استفاده شد. توصیف پرگنه بر اساس خصوصیات پرگنه قابل مشاهده با چشم غیر مسلح و به کمک استریومیکروسکوپ (Olympus BH2, Japan) انجام شد.

نتایج

جدایه‌های غیرتوکسین‌زا

از نمونه‌های جمع‌آوری شده، با استفاده از محیط AFPA بیش از ۵۲۰ جدایه متعلق به *Aspergillus* section *Flavi* به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید آفلاتوکسین نشان داد براساس عدم تغییر رنگ پشت کلنی به رنگ صورتی یا قرمز در بین جدایه‌های غیرتوکسین‌زا پس از در معرض قرار گرفتن بخار آمونیاک، ۸۲ جدایه روی محیط کشت CAM غیرتوکسین‌زا بودند. غیرتوکسین‌زایی این جدایه‌ها با استفاده از روش TLC به اثبات رسید. استفاده از آغازگرهای اختصاصی نشان داد از بین ۸۲ جدایه غیرتوکسین‌زا تنها ۶۳ عدد از آنها متعلق به گونه *A. flavus* بودند. این جدایه‌ها با آغازگرهای اختصاصی گونه، فقط یک قطعه DNA به اندازه ۱۰۰bp تولید نمودند، در حالی که در ۱۹ جدایه دیگرقطعه مورد نظر تولید نگردید. ۵۶ جدایه از بین جدایه‌های به دست آمده برای انجام مراحل بعدی مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱، شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR تکثیر ناحیه ITS2 rDNA در جدایه‌های *A. flavus* با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه.

Figure 1. Electrophoresis of PCR product amplification of ITS2 rDNA region in *A. flavus* isolates using species specific primer.

گروه‌بندی جدایه‌های A. flavus

گروه‌بندی مرفولوژیکی: جدایه‌های *A. flavus* به لحاظ خصوصیات ماکرومورفولوژیکی، میکرومورفولوژیکی و رنگ روی محیط کشت-های MEA، CZ، CY20S، CYA25 و CYA37 ارزیابی و در نهایت در پنج گروه قرار گرفتند. در بررسی حاضر خصوصیات مختلف میکرومورفولوژیکی بررسی و با توجه به اینکه جدایه‌های حاضر متعلق به یک گونه بودند. در بسیاری از ویژگی‌ها نتایج مشابهی را نشان دادند، لذا خصوصیاتی که موجب تفکیک جدایه‌ها از یکدیگر بود مورد توجه قرار گرفت.

مشخصات گروه ۱: ۱۲ جدایه این گروه از استان‌های یزد، کرمان، اصفهان و خراسان رضوی و همگی از میوه پسته جداسازی شد. طول کنیدیوفورها ۷۴-۲۹ میکرون، فیالیدها دو ردیفی و قطر وزیکل، کنیدیوم و اسکلروتیوم به ترتیب ۴۵-۲۰، ۶-۵/۲ و ۳۵۰-۱۲۵ میکرون بود. رنگ سرهای کنیدیوم در محیط‌های مختلف غالبا سبز روشن تا سبز مایل به زرد بود (جداول ۱، ۲ و ۳ و شکل‌های ۲ و ۳).

مشخصات گروه ۲: ۱۱ جدایه این گروه از استان‌های کرمان، اصفهان و خراسان رضوی و از میوه و خاک پسته جداسازی شد. طول کنیدیوفورها ۵۸-۳۹ میکرون، فیالیدها تک یا دو ردیفی و

قطر وزیکل، کنیدیوم و اسکلروشیوم به ترتیب ۳۸-۲۱، ۳-۲ و ۴۰۰-۳۰۰ میکرون بود. رنگ سرهای کنیدیوم در محیط‌های مختلف عمدتا سبز تیره تا سبز لیمویی بود (جداول ۱، ۲ و ۳ و شکل‌های ۲ و ۳).

مشخصات گروه ۳: شش جدایه این گروه از استان‌های کرمان و اصفهان و از میوه و خاک پسته جداسازی شد. طول کنیدیوفورها ۷۰-۴۵ میکرون، فیالیدها دوردیفی و قطر وزیکل، کنیدیوم و اسکلروشیوم به ترتیب ۴۱-۲۲، ۴-۳ و ۳۵۰-۲۰۰ میکرون بود. رنگ سرهای کنیدیوم در محیط‌های مختلف از سبز مایل به خاکستری تا سبز تیره متغیر بود (جداول ۱، ۲ و ۳ و شکل‌های ۲ و ۳).

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *Aspergillus flavus*

Table 1. Characteristics of nontoxigenic *Aspergillus flavus* isolates.

No.	ITEM code*	Location	Source	Group	No.	ITEM code	Location	Source	Group
1	16448	Yazd	Nut	1	29	16493	Kerman	Soil	3
2	16452	Kerman	Nut	1	30	16442	Khorasan R.	Nut	4
3	16454	Kerman	Nut	1	31	16447	Kerman	Nut	4
4	16456	Esfahan	Nut	1	32	16449	Yazd	Soil	4
5	16460	Esfahan	Nut	1	33	16455	Esfahan	Nut	4
6	16476	Khorasan R.**	Nut	1	34	16459	Esfahan	Soil	4
7	16480	Khorasan R.	Nut	1	35	16461	Qom	Nut	4
8	16481	Khorasan R.	Nut	1	36	16462	Esfahan	Nut	4
9	16482	Khorasan R.	Nut	1	37	16464	Esfahan	Nut	4
10	16485	Khorasan R.	Nut	1	38	16466	Khorasan R.	Nut	4
11	16491	Khorasan R.	Nut	1	39	16468	Kerman	Soil	4
12	16498	Kerman	Nut	1	40	16469	Esfahan	Nut	4
13	16443	Kerman	Nut	2	41	16471	Khorasan R.	Nut	4
14	16453	Kerman	Nut	2	42	16472	Semnan	Soil	4
15	16458	Esfahan	Soil	2	43	16473	Markazi	Nut	4
16	16470	Esfahan	Nut	2	44	16475	Khorasan R.	Nut	4
17	16474	Khorasan R.	Nut	2	45	16477	Khorasan R.	Soil	4
18	16479	Khorasan R.	Nut	2	46	16483	Khorasan R.	Nut	4
19	16484	Khorasan R.	Nut	2	47	16486	Khorasan R.	Nut	4
20	16488	Khorasan R.	Soil	2	48	16490	Khorasan R.	Nut	4
21	16489	Khorasan R.	Nut	2	49	16496	Khorasan R.	Nut	4
22	16492	Kerman	Nut	2	50	16441	Khorasan R	Nut	5
23	16495	Khorasan R.	Nut	2	51	16450	Yazd	Soil	5
24	16444	Kerman	Nut	3	52	16463	Esfahan	Nut	5
25	16445	Kerman	Nut	3	53	16467	Qom	Nut	5
26	16446	Kerman	Nut	3	54	16478	Khorasan R.	Nut	5
27	16451	Kerman	Soil	3	55	16487	Khorasan R.	Nut	5
28	16457	Esfahan	Nut	3	56	16497	Khorasan R.	Nut	5

*ITEM Microbial Culture Collection of ISPA (Institute of Sciences of Food Production), Bari, Italy.**Khorasan Razavi.

مشخصات گروه ۴: پرتعدادترین گروه با ۲۰ جدایه مربوط به این گروه از هفت استان مورد نمونه‌برداری و از میوه و خاک پسته بود. طول کنیدیوم‌بر ۵۰-۳۷ میکرون، فیالیدها دو ردیفی و قطر وزیکل، کنیدیوم و اسکلروشیوم به ترتیب ۴۳-۲۵، ۵/۲-۴ و ۳۵۰-۲۵۰

میکرون بود. رنگ سرهای کنیدیومی در اعضای این گروه در محیط‌های مختلف از سبز علفی تیره تا زردمایل به سبز متغیر بود (جداول ۱، ۲ و ۳ و شکل‌های ۲ و ۳).

مشخصات گروه ۵: هفت عضو این گروه از چهار استان خراسان رضوی، یزد، اصفهان و قم و از میوه و خاک پسته به دست آمد. طول کنیدیوم‌برها ۴۰-۲۵ میکرون، فیالیدها تک ردیفی و قطر وزیکل، کنیدیوم و اسکلروشیوم به ترتیب ۳۴-۲۲، ۶-۴/۵ و ۳۰۰-۲۰۰ میکرون بود. تنوع رنگ سرهای کنیدیومی در این گروه در محیط‌های مختلف از بقیه گروه‌ها بیشتر و از زرد مایل به سبز تا سبز زیتونی متغیر بود (جداول ۱، ۲ و ۳ و شکل‌های ۲ و ۳).

الگوی رشد و رنگ پرگنه در گروه‌های پنج‌گانه *Aspergillus flavus* غیرتوکسین‌زا در محیط‌های کشت مختلف هم در سطح رویی و هم در سطح پشتی نشان داد محیط CYA25 در تفکیک گروه‌ها کارایی بهتری نسبت به بقیه محیط‌های کشت دارد (شکل ۲ و ۳).

جدول ۲. ویژگی‌های میکرومورفولوژیکی گروه‌های غیرتوکسین‌زای *Aspergillus flavus*

Table 2. Micromorphological features of nontoxigenic groups of *Aspergillus flavus*.

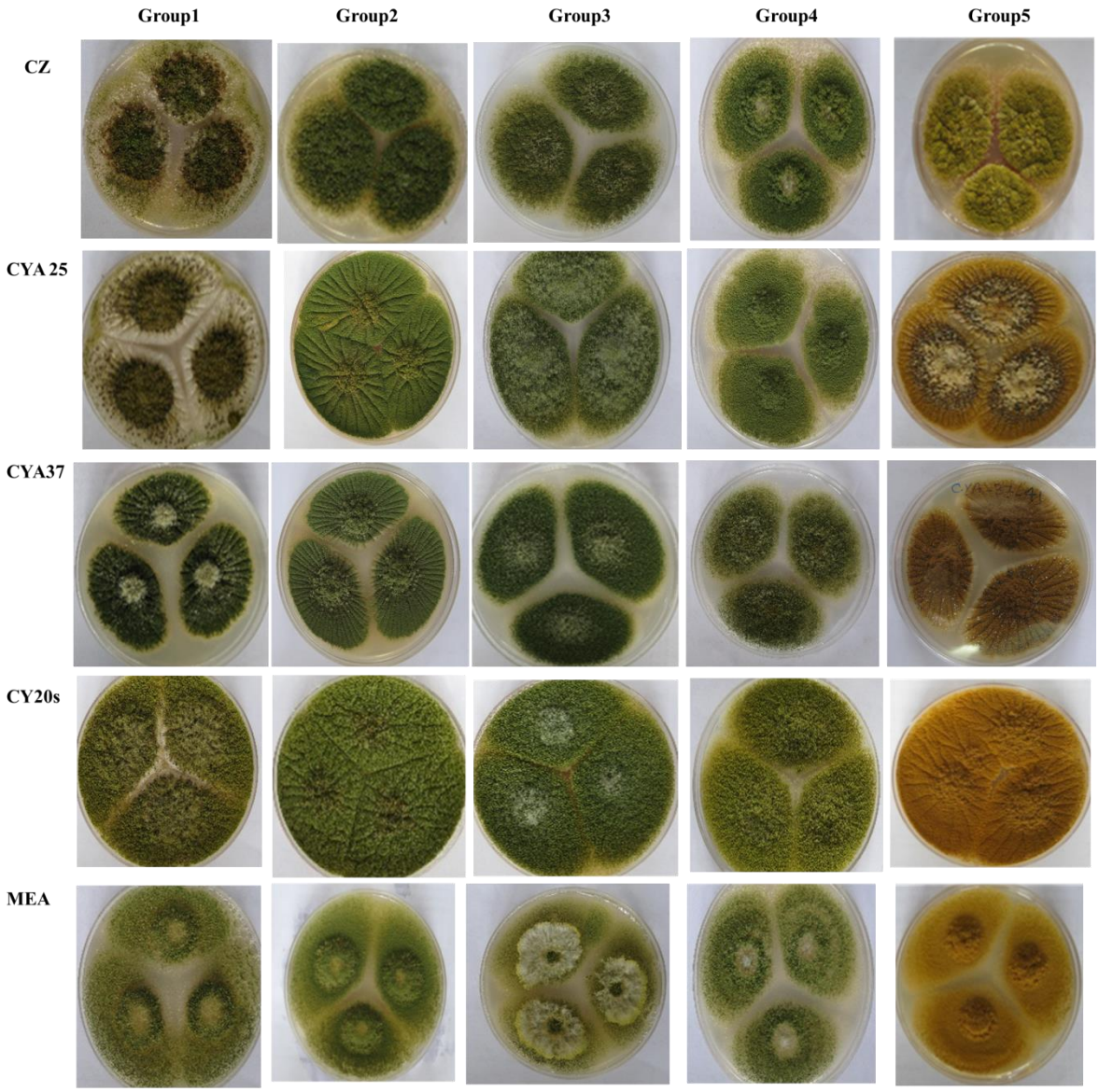
Group	Conidiophore length (µ)	Phialides	Diameter (µ)		
			Vecicle	Conidium	Sclerotium
1	29-74	Biseriate	20-45	5.2- 6	125-350
2	39-58	Uniseriate and Biseriate	21-38	2-3	300-400
3	45-70	Biseriate	22-41	3-4	200-350
4	37-50	Uniseriate	25-43	4-5.2	250-350
5	25-40	Uniseriate	22-34	4.5-6	200-300

جدول ۳. ویژگی‌های ماکرومورفولوژیکی گروه‌های غیرتوکسین‌زای *Aspergillus flavus*

Table 3. Macromorphological features of nontoxigenic groups of *Aspergillus flavus*.

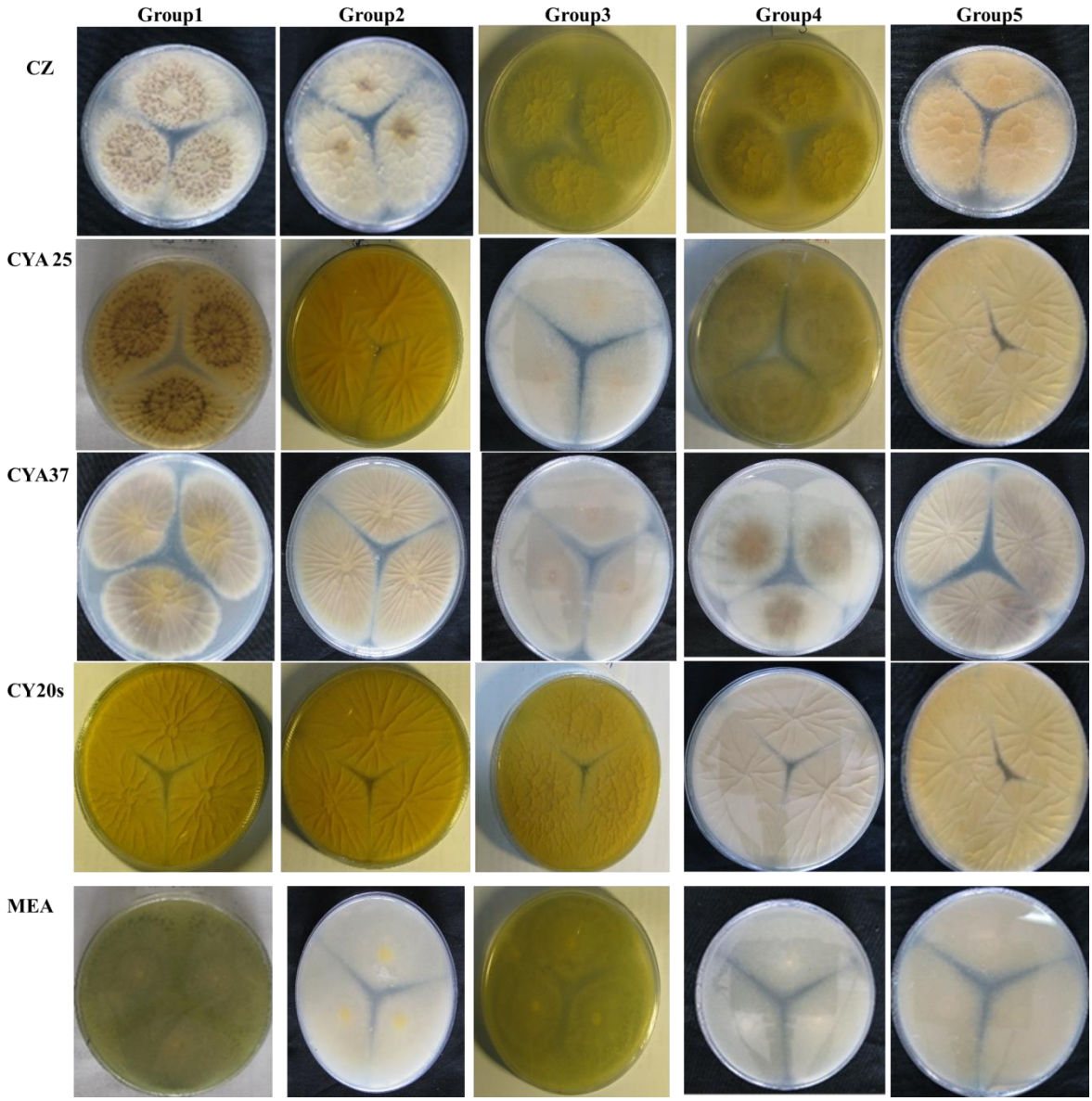
Group	Spectrum color of conidia heads in different cultures media				
	CZ	CYA25*	CYA37**	CY20S	MEA
1	Olive green	Oak green	Lemon green	Green to light olive to yellow	Green yellow
2	Dark green	Dark green	Dark herbaceous green	Lemon green	Dark green to lemon
3	Grayish green	Dark gray green	Dark green	Pistachio green	Yellowish green to grayish green
4	Dark herbaceous green	Olive green	Yellowish green	Olive green	Green yellow
5	Yellowish green to brownish olive green	Olive green	Yellowish green	Olive green	Green yellow

* CYA medium at 25 °C, ** CYA medium at 37 °C.



شکل ۲. الگوی رشد و رنگ پرگنه در گروه‌های پنجگانه *Aspergillus flavus* غیرتوکسین‌زا در محیط‌های کشت مختلف (سطح رویی).

Figure 2. Growth pattern and colony color color in five groups of nontoxigenic *Aspergillus flavus* in different culture media (upper side).



شکل ۳. الگوی رشد و رنگ پرگنه در گروه‌های پنجگانه *Aspergillus flavus* غیرتوکسین‌زا در محیط‌های کشت مختلف (سطح پایین).

Figure 3. Growth pattern and colony color color in five groups of nontoxigenic *Aspergillus flavus* in different culture media (down side).

بحث

گونه‌های مختلف *Aspergillus* به صورت خاک‌برد و هوابرد در بیشتر مناطق پسته‌کاری کشور سازگار شده‌اند و قادر به آلوده‌سازی مغز میوه‌ها و پسته‌های ترک خورده‌اند (Fani *et al.* 2014b, c; Moradi *et al.* 2015; Saghazadeh & Najmi 2018). معرفی جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* به مزارع کشاورزی و باغ‌ها برای کاهش جمعیت جدایه‌های توکسین‌زا است (Chang & Ehrlich 2011; Moradi *et al.* 2011; Uka *et al.* 2017; Mohammadi-Moghaddam *et al.* 2020). جدایه‌های غیرتوکسین‌زا قادر به رقابت با جدایه‌های آفلاتوکسین‌زا و اشغال بستر هستند، بنابراین نقش مهمی در کاهش جمعیت جدایه‌های توکسین‌زا و میزان آفلاتوکسین تولید شده از آنان در خاک و محصولات غذایی ایفا می‌کنند (Azmoun *et al.* 2017a, b). براساس مطالعات صورت گرفته، ویژگی‌های مطلوبی که پتانسیل جدایه *A. flavus* را برای استفاده به عنوان یک عامل کنترل زیستی در مزارع بهبود می‌بخشد، شامل توانایی رشد سریع، تشکیل

اسکلروت برای بقای بیشتر در خاک، کلنیزاسیون در بسترهای غذایی گیاهان میزبان و عدم توانایی در تولید آفلاتوکسین است. از طرف دیگر یک سویه غیرتوکسین‌زا برای این که کاندید مناسبی به عنوان عامل کنترل زیستی باشد از نظر زیست محیطی بایستی بی خطر نیز باشد، لذا متفاوت بودن سویه غیرتوکسین‌زا از نظر گروه سازگار رویشی با سویه‌های توکسین‌زای غالب اهمیت زیادی دارد. چالش‌های متعددی در استفاده از این راهبرد در کوتاه و بلندمدت وجود دارد. زیست شناسی جمعیت *A. flavus* به دلیل تنوع این گونه به خوبی درک نشده است، لذا توانایی ایجاد اشکال تولید مثلی هتروکاریون و بقای طولانی مدت آنها بعد از کاربرد مشخص نیست (Ehrlich 2014). استفاده از خصوصیات ریخت شناختی از گذشته تاکنون برای شناسایی گونه‌های جنس *Aspergillus* مطرح بوده است. در پژوهش حاضر نیز، ۵۶ جدایه غیرتوکسین‌زای *A. flavus* براساس وِزگی‌های ریخت شناختی بررسی شدند که منجر به قرارگیری آنها در پنج گروه از نظر خصوصیات ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی شد. از بین محیط‌های مورد استفاده محیط CYA25 در تفکیک گروه‌ها کارایی بهتر را نسبت به بقیه محیط‌های کشت از خود نشان داد.

Hedayati *et al.* (2007) گونه *A. flavus* را به عنوان یک گونه کمپلکس شامل ۲۳ گونه یا واریته از جمله دو گونه جنسی *Petromyces alliaceus* و *P. albertensis* مورد مطالعه قرار داد. از آن‌جایی که شناسایی دقیق گونه‌ها در مجموعه *A. flavus* به دلیل هم‌پوشانی ویژگی‌های ریخت شناختی و بیوشیمیایی همچنان دشوار است، در شناسایی‌های مورفولوژیکی، توصیه شده است به عنوان "مجموعه یا کمپلکس" *Aspergillus flavus* اشاره شود. برای شناسایی مولکولی در حد کمپلکسِ *A. flavus* آنالیز ترادف ITS کفایت می‌کند، اما تشخیص توصیفی *A. flavus* نیازمند آنالیز ژن‌های *بتاتوبولین*، *کالمودولین* و *آکتین* است (Samson *et al.* 2007). به هرحال به نظر نمی‌رسد شناسایی دقیق گونه‌های کمپلکس *A. flavus* استفاده کاربردی چندانی در انتخاب سویه‌های غیرتوکسین‌زایِ کارا برای کنترل زیستی جمعیت توکسین‌زا داشته باشد. آنچه که در این مورد اهمیت زیادی دارد شناسایی دقیق گروه‌های سازگار رویشی است که می‌تواند به انتخاب نژادهای بادوام در محیط زیست منجر شود (Probst *et al.* 2011).

گروه‌بندی ژنتیکی ۲۳ عدد از جدایه غیرتوکسین‌زا مورد مطالعه در این تحقیق با استفاده از شش جفت آغازگر ریزماهواره لوکوس‌های AF13، AF17، AF25، AF43، AF64 و AF66 (طراحی شده برای تفکیک گروه‌های سازگار رویشی) نشان داد این جدایه‌ها در هشت گروه مجزا قرار دارند (Azmoun 2015; Fani *et al.* 2017). مقایسه گروه‌بندی بر اساس ویژگی‌های ریخت شناختی و گروه‌بندی با این ریزماهواره‌ها در جدایه‌های مشترک در هر دو مطالعه نشان می‌دهد گروه‌بندی اعضای مختلف گروه‌های مرفولوژیک ارتباطی با گروه‌بندی ریزماهواره‌ها ندارد، به بیانی دیگر اعضایی که از نظر ریخت شناختی در یک گروه قرار گرفته‌اند، پس از واکنش PCR با ریزماهواره‌ها، الگوهای تکثیری متفاوتی از خود نشان داده و در گروه‌های مختلفی قرار گرفتند. از طرف دیگر سنجش کارایی ۵۸ جدایه غیرتوکسین‌زا (شامل ۵۶ جدایه مطالعه شده در این تحقیق) در کاهش آفلاتوکسین‌های B1 و B2 در بستر آرد برنج و محیط YES به روش HPTLC و UPLC در تقابل با سویه توکسین‌زا، آنها را در چهار گروه با کارایی ۸۰-۲ و ۹۶-۱/۵ درصد به ترتیب قرار داد. ردیابی ۸ ژن و ناحیه مجاور ژنی از خوشه ۳۳ ژنی تولید آفلاتوکسین شامل *afl*R، *est*A، *avn*A، *nor*1، *ver*1، C1، C3 و C4 نیز الگوهای متنوعی از حذف ۸-۰ ژن یا ناحیه مجاور ژنی را نشان داد (Fani *et al.* 2011; Fani *et al.* 2013; Fani 2013). مقایسه نتایج به دست آمده از گروه‌بندی کارایی جدایه و الگوهای حذف ژن نیز با گروه‌بندی مرفولوژیکی تطابق نداشتند، لذا می‌توان نتیجه گرفت تنوع در شکل اندام‌های رویشی و زایشی و الگوهای رشدی در محیط‌های مختلف کشت را نمی‌توان با گروه‌های سازگار رویشی، کارایی آنها در کنترل زیستی آفلاتوکسین و الگوهای حذف ژن مرتبط دانست و توانایی در کنترل زیستی آفلاتوکسین ارتباطی با ویژگی‌های ریخت شناختی ندارد. این نتایج بیانگر تنوع در جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* است که دلیل آن می‌تواند وجود گونه‌های مختلفی در کمپلکس *A. flavus* غیرتوکسین‌زای پسته باشد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده تحقیقات پسته کشور و که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

Amaike S, Keller NP, 2011. Aspergillus flavus. *Annual Review of Phytopathology* 49: 107–133.

Azmoun H, 2015. Genetic evaluation of vegetative compatibility groups of *Aspergillus flavus* isolates using SSR markers. M.Sc. thesis, Plant pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (in Persian with English abstract).

Azmoun H, Fani SR, Zamanizadeh HR, 2017a. Interaction of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates *in vitro*. 2nd International and 10th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran, 29-31 August, Karaj, Iran, P 1–5 (in Persian with English abstract).

Azmoun H, Fani SR, Zamanizadeh HR, 2017b. Population dynamism of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates in soil habitat. 2nd International and 10th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran, 29-31 August, Karaj, Iran, P 1–5 (in Persian with English abstract).

Barkai-Golan R, Paster N, 2011. Mycotoxins in Fruit and vegetables. Burlington, Academic Press. 395 pp.

Chang PK, Bhatnagar DC, Thomas E, Bennett JW, 1995. Sequence variability in homologs of the aflatoxin pathway gene *afl*R distinguishies species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(1):40–43.

Chang PK, Ehrlich KC, 2011. Cyclopiazonic acid biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Toxin Reviews* 30(2-3): 79–89.

Chang PK, Horn BW, Dorner JW, 2005. Sequence breakpoints in the afatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus favus* isolates, *Fungal Genetics and Biology* 42: 914–923.

Cotty PJ, 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.

Dorner JW, 2004. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Toxin Reviews* 23(2-3): 425-450.

Ehrlich KC, 2014. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Frontiers in microbiology* 5(50):1–9.

Ehrlich KC, Montalbano BG, Cotty PJ, 2003. Sequence comparison of *afl*R from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genetics and Biology* 38(1): 63–74.

Fani SR, 2013. Detection of nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to control of aflatoxin contamination of pistachio, Ph.D. thesis, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (in Persian with English abstract).

Fani SR, Javanshah J, Moradi M, 2014a. Prevalence of aflatoxin in Rafsanjan processed pistachios during 2011-12, and its relation with time of harvest. *Tolooebehdasht* 12(4):175–189 (in Persian with English abstract).

Fani SR, Moradi M, Probst C, Zamanizadeh HR, Mirabolfathy, *et al*., M., 2014b. A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio orchards of Iran. *European journal of plant pathology* 140(4): 631–642.

Fani SR, Moradi M, Probst C, Zamanizadeh HR, Mirabolfathy, *et al*., 2017. Atoxigenic Iranian *Aspergillus flavus* isolates performance for the biocontrol of aflatoxin, *1st MYCOKEY International Conference Global Mycotoxin Reduction in the Food and Feed Chain*, September 11–14, Ghent, Belgium, P.75.

Fani SR, Moradi M, Tajabadipour A, Dargahi R, Mirabolfathy M, 2014c. The role of early splitting in contamination of pistachio nuts by *Aspergillus* species and aflatoxin in Kerman province, *Food Technology and Nutrition* 11(3): 97–105 (in Persian with English abstract).

Fani R, Moradi M, Zamanizadeh H, Mirabolfathi M, Probest K, 2014d. Distribution of non-toxic strains of *Aspergillus flavus* in pistachio growing areas of Iran. *Entomology & Phytopathology*, 81(2): 179–190 (in Persian with English abstract).

Fani SR, Moradi M, Zamanizadeh HR, 2012. Partial study of aflatoxin gene cluster in nontoxigenic *Aspergillus flavus* isolates, *12th Iranian Genetic Congress*, 21-23 May, Tehran, Iran, Pp 1–5 (in Persian with English abstract).

Fani SR, Moradi M, Zamanizadeh HR, Mirabolfathy M, Probst C**,** *et al.*, 2013. Efficacy of Atoxigenic Strains of Aspergillus flavus for Aflatoxin Biocontrol in Pistachio Nuts, *ISM-MycoRed International Conference Europe 2013*, May 27–31, Martina Franca, Italy. P. 238.

Fani SR, Sedaghati E, Moradi M, Zamanizadeh H, 2011. Specific Identification of Atoxigenic Strains of *Aspergillus flavus* Isolated from Pistachio Orchards of Iran and Detection of aflD, aflR, aflJ, aflG Genes and C3 Region. *I International Symposium on Mycotoxins in Nuts and Dried Fruits* 963, 10-12 September, Damghan, Iran, Pp 95-97.

Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN, Hong SB, Nováková A, *et al*., 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology* 1(93):1–63.

Gbashi S, Madala NE, Adekoya I, Adebo O, De Saeger S, *et al*., 2018. The socio-economic impact of mycotoxin contamination in Africa. In: Njobeh PB (ed), Fungi and Mycotoxins—Their Occurrence, Impact on Health and the Economy as well as Pre- and Postharvest Management Strategies; IntechOpen: London, UK. Pp. 1–20.

Gourama H, Bullerman LB, 1995. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern foods and feeds: A review. *Journal of Food Protection* 58:1395–1404.

Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW, 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153(6):1677–1692.

Jafari Nodoushan A, Fani SR, Sajadipour SJ, Fattahi M, 2011. HACCP and its effects on aflatoxin contamination of pistachio in Yazd province. *I International Symposium on Mycotoxins in Nuts and Dried Fruits* 963, 10-12 September, Damghan, Iran, Pp 213–215.

Klich MA, 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht (CBS), Netherlands, 116 pp.

Klich MA, 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology* 8: 713–722.

Klich MA, Pitt JI, 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth scientific and industrial research organization, Division of food processing. 116 pp.

Mahmoudi A, Jalali S, 2016. Iranian pistachio export competitiveness in world markets. *Journal of Economic Research* 51(4): 951-976 (in Persian with English abstract).

Moghadam MM, Rezaee S, Mohammadi AH, Zamanizadeh HR, Moradi M, *et al*., 2020. The potential of aflatoxin production in the *Aspergillus* section *Flavi* isolates of pistachio in Iran. *Journal of Fasting & Health* 8(4): 254–263.

Moradi M, Dargahi R, Sherafati A, Fani SR, Sedaghati E, *et al.*, 2011. Screening of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates in pistachio producing areas of Iran. *I International Symposium on Mycotoxins in Nuts and Dried Fruits* 963, 10-12 September, Damghan, Iran, Pp. 91–93.

Moradi M, Fani SR, 2018. Review of Aflatoxin in Pistachio and its Control Strategies. *Plant Pathology Sciences* 7(2): 22–33 (in Persian with English abstract).

Moradi M, Fani SR, Masoumi H, 2014. Population density of *Aspergillus* species belong to section *Flavi* and *Nigri* on pistachio nut in Kerman Province, *Applied Research in Plant Protection* 3(2): 79–91 (in Persian with English abstract).

Moradi M, Hokmabadi H, 2011. Control of mycotoxin bioactives in nuts: farm to fork. In Tokusoglu, Ö (ed), Nut and cereal bioactives sources. chemistry, and applications. CRC Press, Pp. 253–273.

Moradi M, Hokmabadi H, Fani SR, 2015. A study concerned with the factors affecting the fungal growth and aflatoxin production during storage of pistachio in Kerman province, *Food Technology and Nutrition* 12(2): 83–92 (in Persian with English abstract).

Moradi M, Hokmabadi H, Mirabolfathy M, 2010. Incidence of *Aspergillus* species airborne spores in pistachio growing regions of Iran. I*nternational Journal of Nuts and Related Sciences* (1):54–64.

Moradi M, Rohani M, Fani SR, Mosavian MTH, Probst C, *et al.* 2020. Biocontrol potential of native yeast strains against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in pistachio. *Food Additives & Contaminants: Part A* 37(11): 1963–1973.

Pitt JI, Hocking AD, 2006. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia* 162(3): 233–243.

Probst C, Bandyopadhyay R, Price LE, Cotty PJ, 2011. Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. *Plant Disease* 95(2): 212–218.

Raper KB, Fennell DI, 1970. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, P. 686.

Rayner RW. 1970. A mycological color chart. Kew:. Commonwealth Mycological Institute & British Mycological Society. UK, Pp.: 34.

Rouhani M, Moradi M, Hamed-Mosavian MT, Fani SR, 2018. Efficacy of saprophytic yeasts on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Pistachio and Health Journal* 1(1): 26–30.

Saghazadeh M, Najmi B, 2018. Isolation and identification of toxin-causing fungus *Aspergillus flavus* isolated from pistachios in Rafsanjan by studying the expression of nor-1 gene involved in aflatoxin biosynthesis pathway. *Journal of Applied Biology* 8(3): 39–47 (in Persian with English abstract).

Saito M, Machida S, 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycoscience* 40: 205–208.

Salehi Z, Kheirkhah B, Masoumalinejad Z, Zinatizadeh MR, 2018. Identification of *afl*R gene in aflatoxigenic *Aspergillus* isolated from pistachio kernel of Sirjan region using molecular method. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 12(1):43–50 (in Persian with English abstract).

Samson RA, Hong S, Peterson S, Frisvad JC, Varga J, 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology* 59: 147–203.

Sardiñas N, Vázquez C, Gil-Serna J, González-Jaén MT, Patiño B, 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.

Savić Z, Dudaš T, Loc M, Grahovac M, Budakov D, *et al.*, 2020. Biological control of aflatoxin in maize grown in Serbia. *Toxins* 12(3):162.

Thom C, Raper KB, 1945. A manual of the Aspergilli. Williams and Wilkins Company, Baltimore. 373 pp.

Uka V, Moore GG, Arroyo-Manzanares N, Nebija D, De Saeger S, *et al.*, 2017. Unravelling the diversity of the cyclopiazonic acid family of mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC triple-TOF HRMS. *Toxins* 9(1): 35.

Wei D, Jong S, 1986. Production of aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* group maintained in ATCC. *Mycopathologia* 93:19–24.

© 2021 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)