

سنة الفجر



دانشگاه سهاورد

دانشکده کشاورزی

پایان نامه تحصیلی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

عنوان

بررسی اثر بازدارندگی باکتری های جدا شده از درختان پسته روی
قارچ *Aspergillus flavus* Link عامل مولد آفلاتوکسین

نگارش

سعیده احمدی تاج آبادی

استادان راهنما

دکتر علیرضا معرفت

دکتر حسین علایی

استاد مشاور

مهندس غلامرضا برادران

زمستان ۱۳۸۹

این ناچیز را اگر قدریست، تقدیم می‌نمایم به..

پدر و مادر بزرگوارم:

آنان که فروغ نگاهشان و گرمی کلامشان سرمایه‌های جاودانه زندگی‌ام هستند.
توانشان رفت تا به توانایی برسم و مویشان به سپیدی رفت تا رویم سپید بماند.

خواهر و برادران مهربانم:

آنان که وجود گرم و حضور دلپذیرشان تنها امید روزهای ناامیدی‌ام است.

تشر و قدردانی

خداوند جان آفرین را به وسعت بی کران عظمتش سپاس می گویم که توانم داد تا برگ دیگر از دفتر زندگی را با بهروزی ورق زده و به لطف بی پایان یگانه اش در آستانه راه دیگری باشم. از پدر و مادر گرامی ام، خواهر و برادران مهربانم که معنویت زندگی ام را مدیون آنان هستم صمیمانه تشکر می کنم و در برابر وجود گرامی شان زانوی ادب بر زمین می نهیم و با دلی مملو از عشق و محبت بر دستانشان بوسه می زنم. بلندای وجودشان همیشه استوار.

سپاس همه آنان را که خوشه چین معرفتشان بوده ام و آموختن را به گونه ای مدیون فضل و کرم آنان هستم. اکنون که به لطف و عنایت پروردگار متعال این پایان نامه را به اتمام رسانده ام بر خود واجب می دانم مراتب سپاس و قدردانی خویش را نثار آنانی کنم که از هیچ گونه بذل و راهنمایی های عالمانه، دقیق و مستمر خود در جلا بخشیدن به محتوای این پژوهش دریغ نرزدیدند. امید است توانایی پاس داشتن حرمت استادان راهنمای خویش جناب آقای دکتر معرفت و جناب آقای دکتر علایی که با راهنمایی های ارزنده و همفکری ها و حمایت های علمی و معنوی قوت قلبم بودند را داشته باشم. از استاد مشاور گرانقدرم، جناب آقای مهندس برادران که در طول اجرای این تحقیق همواره با سعه صدر بنده را یاری کردند، بسیار سپاسگزارم.

از همکاران عزیزم در شرکت مرجع رفسنجان و نیز سرور گرامی جناب آقای مهندس رضایی، که در امر نمونه برداری با بنده همکاری نمودند، نهایت سپاس و قدردانی را دارم. هم چنین از استادان و کارمندان محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان که در مراحل مختلف این تحقیق، یاری گر اینجانب بوده اند، کمال تشکر را دارم. هم چنین از دوستان عزیزم خانم ها مریم غلامعلی زاده، الهام حیدری راد، سارا داور و محبوبه علایی که در طی این مدت بنده را مدیون محبت های بی دریغشان کردند قدردانی می نمایم.

در پایان، از همکلاسی های عزیز و دوستان خوبم در دانشگاه زنجان و نیز دیگر عزیزانی که در انجام این پژوهش به نحوی همکاری داشتند و نامشان ذکر نگردیده است، تشکر می نمایم و از خداوند متعال توفیق روزافزون برای تمامی این عزیزان خواستارم.

سعیده احمدی تاج آبادی

اسفند ماه ۱۳۸۹

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

چکیده

فصل اول - مقدمه ۲

فصل دوم- مروری بر تحقیقات

۱-۱-۲- پسته (*Pistacia vera*) ۵

۲-۱-۲- گیاه‌شناسی پسته ۶

۳-۱-۲- نیازهای اکولوژیکی درخت پسته ۷

۴-۱-۲- تولید و صادرات پسته در ایران و جهان ۸

۱-۲-۲- زهرابه‌های قارچی ۹

۲-۲-۲- آفلاتوکسین‌ها ۱۰

۳-۲-۲- گونه‌های *Aspergillus* جدا شده از پسته ۱۱

۴-۲-۲- قارچ‌شناسی شبه جنس *Aspergillus* و شبه گونه *A. flavus* ۱۲

۵-۲-۲- زیست‌شناسی قارچ ۱۴

۱-۳-۲- روش‌های کنترل قارچ *Aspergillus flavus* ۱۶

۲-۳-۲- تاثیر میکروارگانیزم‌ها بر قارچ *Aspergillus flavus* و آفلاتوکسین ۱۸

فصل سوم- مواد و روش‌ها

۱-۱-۳- نمونه‌برداری ۲۴

۲-۱-۳- جداسازی باکتری‌ها، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها ۲۴

۳-۱-۳- جدایه قارچ ۲۶

۲-۳- بررسی مکانیسم تاثیر جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست روی قارچ در شرایط آزمایشگاه ۲۶

۱-۲-۳- بررسی تولید آنتی‌بیوتیک در محیط کشت PDA ۲۶

۲-۲-۳- بررسی تولید سیدروفور در محیط کشت King's B ۲۷

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

- ۳-۲-۳- بررسی تاثیر ترکیبات فرار ضدقارچی ۲۸
- ۴-۲-۳- بررسی تاثیر جدایه‌های باکتریایی روی *A. flavus* در محیط غذایی عصاره پسته ۲۹
- ۵-۲-۳- بررسی تاثیر جدایه‌های باکتریایی روی اسپورزایی *A. flavus* در میوه پسته ۲۹
- ۳-۳- آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست ۳۰

فصل چهارم- نتایج

- ۱-۴- نمونه برداری، جداسازی و خالص سازی جدایه‌ها ۳۱
- ۲-۴- بررسی نتایج حاصل از تولید آنتی‌بیوتیک در محیط کشت PDA ۳۵
- ۳-۴- بررسی نتایج حاصل از تولید سیدروفور در محیط کشت King's B ۳۷
- ۴-۴- بررسی نتایج تولید متابولیت‌های فرار جدایه‌های باکتریایی روی قارچ *A. flavus* ۳۹
- ۵-۴- بررسی نتایج تاثیر جدایه‌های باکتریایی روی *A. flavus* در محیط غذایی عصاره پسته ۴۱
- ۶-۴- نتایج حاصل از تاثیر جدایه‌های باکتریایی روی اسپورزایی *A. flavus* در میوه پسته ۴۲
- ۷-۴- نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست ۴۴

فصل پنجم- بحث ۴۷

پیشنهادات ۵۳

فهرست منابع ۵۴

چکیده انگلیسی

فهرست جدول‌ها

صفحه	عنوان
۳۱	جدول ۴-۱- جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه و تاریخ و محل جمع‌آوری آن‌ها
۳۸	جدول ۴-۲- مقایسه میانگین ($\pm SE$) مربوط به اثر جدایه‌های باکتریایی مورد آزمایش، روی قطر کلنی و درصد بازدارندگی از رشد، در آزمون تولید سیدروفور در شرایط کنترل شده ($\alpha = 0/05$)
۴۰	جدول ۴-۳- مقایسه میانگین ($\pm SE$) مربوط به اثر جدایه‌های باکتریایی مورد آزمایش، روی قطر کلنی و درصد بازدارندگی از رشد، در آزمون تولید ترکیبات فرار در شرایط کنترل شده ($\alpha = 0/05$)
۴۳	جدول ۴-۴- مقایسه میانگین ($\pm SE$) مربوط به اثر جدایه‌های باکتریایی مورد آزمایش، روی غلظت اسپور، در شرایط کنترل شده ($\alpha = 0/05$)
۴۵	جدول ۴-۵- خصوصیات افتراقی باکتری‌های آنتاگونیست

فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۱۶	شکل ۱-۲- ساختارهای مورفولوژیکی <i>Aspergillus</i>
۲۵	شکل ۱-۳- جداسازی نمونه‌های گیاهی با استفاده از محلول آب و توئین ۲۰ بر روی لرزاننده ۲۵
۳۵	شکل ۱-۴- بازدارندگی از رشد میسلیمی و تولید اسپور قارچ <i>A. flavus</i> توسط جدایه‌های باکتریایی ۳۵
۳۷	شکل ۲-۴- تاثیر تولید سیدروفور در کاهش رشد میسلیم قارچ <i>A. flavus</i> توسط جدایه‌های ۳۳۷ و N _{۱۳۰} ۳۷
۳۹	شکل ۳-۴- تاثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های ۳۷۰ و ۶۶ در کاهش رشد میسلیم قارچ <i>A. flavus</i> ۳۹
۴۱	شکل ۴-۴- بازدارندگی از رشد میسلیمی و تولید اسپور قارچ <i>A. flavus</i> توسط جدایه‌های باکتریایی N _{۱۳۰} و ۳۳۷ در محیط کشت عصاره پسته ۴۱
۴۲	شکل ۴-۵- تاثیر جدایه آنتاگونیست ۱۸۶ بر کاهش اسپورزایی قارچ <i>A. flavus</i> ۴۲

چکیده

آلودگی پسته به آفلاتوکسین از جمله مشکلات اصلی و مهم تولید و صادرات این محصول بشمار می‌رود. از بین روش‌های مطالعه شده جهت کاهش و یا حذف آلودگی آفلاتوکسین، کنترل بیولوژیک یکی از امیدبخش‌ترین روش‌ها به ویژه در سال‌های اخیر می‌باشد. بدین منظور ارگانسیم‌های متعددی شامل باکتری‌ها، مخمرها و جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* و *A. parasiticus* آزمایش شده‌اند. با توجه به اینکه آلودگی پسته به قارچ *A. flavus* قبل از برداشت در شرایط باغ آغاز شده و با به تأخیر انداختن برداشت، آلودگی افزایش می‌یابد، احتمال می‌رود بتوان با کاربرد جدایه‌های باکتریایی فعال با فعالیت ضدقارچی، در این دوره زمانی آلودگی محصول به آفلاتوکسین را تا حد قابل قبول کاهش داد. به این منظور طی شهریور و مهرماه ۱۳۸۸ (همزمان با برداشت محصول) و فروردین و اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ (طی فصل رشد)، از نمونه‌های میوه و برگ درختان پسته، جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شهرستان رفسنجان، تعداد ۸۴۴ جدایه باکتریایی خالص‌سازی شد. اثر بازاریابی جدایه‌های مذکور روی رشد و اسپورزایی قارچ *A. flavus* در محیط کشت PDA و محیط کشت تهیه شده از عصاره مغز پسته مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج بررسی‌ها نشان داد که از بین نمونه‌های بررسی شده، تعداد ۱۲۵ جدایه به درجات مختلف توانایی جلوگیری از اسپورزایی و رشد میسلیمی قارچ را داشتند. از بین جدایه‌های بررسی شده به‌منظور تولید سیدروفور در محیط کشت King's B، جدایه‌های ۹۵، ۶۶ و B_{۱۳} بیشترین تاثیر را در بازداری از رشد ریشه‌ای قارچ داشتند. در آزمون بررسی تاثیر ترکیبات فرار ضد قارچی در بازداری از رشد ریشه‌ای قارچ، جدایه‌های ۶۶، ۲۸۷ و ۳۷۰ بیشترین تاثیر را داشتند. همچنین نتایج حاصل از تاثیر جدایه‌های باکتریایی روی اسپورزایی *A. flavus* در میوه پسته نشان داد که جدایه ۳۳۷ بیشترین تاثیر را در بازداری از تولید اسپور داشت. در تمامی آزمون‌های انجام شده، بیشتر جدایه‌ها تاثیر قابل توجهی در کاهش اسپورزایی قارچ داشتند. گروه‌بندی و شناسایی باکتری‌های جدا شده نشان داد، شش جدایه گرم مثبت متعلق به جنس *Bacillus sp.* و ۱۹ جدایه گرم منفی متعلق به جنس *Pseudomonas sp.* می‌باشند.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، پسته، کنترل بیولوژیک، *Aspergillus flavus*

فصل اول

مقدمه

مسأله اصلی و مهم کشور در عرصه صادرات پسته در سال‌های اخیر، آلودگی این محصول به آفلاتوکسین می‌باشد. از سال ۱۹۷۱ که برخی کشورها از جمله آمریکا در ورود مواد غذایی همچون پسته از سایر کشورها به‌خاطر آلودگی به آفلاتوکسین سختگیری خاصی اعمال نمودند، در کشور ما نیز موضوع آلودگی مواد غذایی به میکوتوکسین‌ها و به‌خصوص آفلاتوکسین در پسته مورد توجه قرار گرفت و تحقیقات دامنه‌داری در این زمینه توسط مؤسسات پژوهشی آغاز گردید (ارشاد، ۱۳۵۲).

واژه میکوتوکسین (Mycotoxin) از لغت یونانی Myke به معنی قارچ و toxicum به معنی سم گرفته شده است (Andersen, ۱۹۸۴; Golinski and Wiewiwowska, ۱۹۸۷). میکوتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات سمی طبیعی هستند که توسط گونه‌های متعددی از قارچ‌ها تولید می‌گردند و موجبات مرگ و میر در انسان، حیوانات و گیاهان را فراهم می‌آورند. سالیانه مقادیر قابل توجهی از محصولات کشاورزی به ارزش میلیاردها دلار دستخوش حمله قارچ‌ها قرار گرفته و نابود می‌شوند. محصولات حاوی توکسین، کیفیت مرغوبی نداشته و به قیمت ارزان‌تری ارائه می‌گردند و از آن‌ها به عنوان کود یا سوخت باید استفاده نمود. حیوانات در صورت مسمومیت بوسیله میکوتوکسین‌ها، یا از بین خواهند رفت و یا از نظر اقتصادی دیگر بازده خوبی نخواهند داشت (Andersen, ۱۹۸۴; Bauch *et al.*, ۱۹۶۰; Golinski and Wiewiwowska, ۱۹۸۷).

در میان میکوتوکسین‌ها، گروه آفلاتوکسین از جمله مهم‌ترین آن‌هاست. آفلاتوکسین به یکی از چهار گروه میکوتوکسین (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) اشاره دارد که در محصولات مختلف توسط قارچ‌های *Aspergillus flavus* link و *Aspergillus parasiticus* Speare تولید می‌شوند. جدایه‌های *A. flavus* تنوع بسیار زیادی در تولید آفلاتوکسین دارند، اما جدایه‌های مولد توکسین به‌طور مشخص فقط B_1 و B_2 را تولید می‌کنند، در حالی‌که بیشتر جدایه‌های *A. parasiticus* به‌طور مشخص هر چهار توکسین را تولید

می‌کنند (Diener *et al.*, ۱۹۸۷). این دو قارچ تمایل ویژه‌ای برای آلودگی دانه‌های روغنی و آجیلی از خود نشان می‌دهند. بادام‌زمینی، ذرت و پسته از عمده‌ترین محصولاتی هستند که بوسیله این قارچ‌ها مورد تهاجم واقع می‌شوند. این سموم برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ در بادام‌زمینی شناسایی شده و بعدها از بسیاری از دانه‌های خوراکی مورد استفاده در غذای انسان و دام نیز جداسازی شدند. بیماری‌های ناشی از تغذیه مواد آلوده به آفلاتوکسین خطرات قابل ملاحظه‌ای را برای انسان، دام و طیور به همراه دارد (Cole *et al.*, ۱۹۸۲).

از بین روش‌های مطالعه شده برای کاهش و یا حذف آلودگی آفلاتوکسین، کنترل بیولوژیک یکی از امیدبخش‌ترین روش‌ها به‌ویژه در دوره اخیر می‌باشد. میکروارگانیسم‌های متعددی از جمله باکتری‌ها، مخمرها و جدایه‌های غیر توکسین‌زای قارچ‌های *A. parasiticus* و *A. flavus* برای کنترل آلودگی آفلاتوکسین آزمایش شده‌اند. از آنجایی که پسته‌ها پس از رسیدن و قبل از برداشت، یعنی هنگامی که هنوز روی درخت هستند، به قارچ *A. flavus* مولد آفلاتوکسین آلوده می‌شوند، با به تأخیر انداختن برداشت، باعث افزایش مقدار آلودگی به این قارچ می‌شود. بنابراین احتمال می‌رود بتوان با کاربرد جدایه‌های باکتریایی فعال، که قادر به فعالیت‌های ضد قارچی علیه *A. flavus* و تولید توکسین می‌باشند، آلودگی محصول به آفلاتوکسین و قارچ مولد آن را تا حد قابل قبول کاهش داد. بنابراین لازم دیده شد تا مطالعه‌ای پیرامون اثر بازدارندگی جدایه‌های باکتری‌های اپی‌فیت جدا شده از باغات پسته شهرستان رفسنجان، بر روی اسپورزایی و رشد میسلیمی قارچ *A. flavus* عامل مولد آفلاتوکسین انجام گیرد.

فصل دوم

مروری بر تحقیقات

۲-۱-۱- پسته (*Pistacia vera*)

پسته گیاهی است که از قرن‌ها پیش به‌عنوان یک محصول باغی در کشورهای خاورمیانه و حوزه مدیترانه مورد کشت قرار می‌گرفته و از نیم قرن گذشته به‌علت استقبال از مصرف میوه آن، به‌عنوان یک گیاه تجاری مورد توجه واقع شده است (شیبانی و همکاران، ۱۳۷۴).

پسته، میوه‌ی خندانی که در جهان دوست‌داران فراوانی دارد، از کشور ایران برخاسته است. متون تاریخی، حکایت از آن دارند که پسته، بومی خاورمیانه و به‌خصوص ایران می‌باشد و پیدایش آن را به چهار تا پنج هزار سال قبل نسبت می‌دهند. به‌علاوه، عقیده بر این است که پسته از ایران به دیگر مناطق جهان برده شده است (ابریشمی، ۱۳۷۶). برتولد^۱ - ایران شناس آمریکایی - می‌گوید که نام درخت پسته در سایر زبان‌های دنیا از نام ایرانی این درخت گرفته شده است. در فارسی قدیم، نام این درخت "Pistarcia" و در فارسی میانه، "Pistac" بوده است و بعدها به پسته تبدیل شده است (Ferguson et al., ۱۹۹۸).

رویشگاه اولیه‌ی پسته‌های خودروی خوراکی، در مناطق شمال شرقی ایران، افغانستان و ترکمنستان گزارش شده است. به‌طور کلی، جغرافیای جنگلی ایران نشان می‌دهد که درختان پسته‌ی جنگلی، به‌غیر از منطقه‌ی جنگلی شمالی (حوزه‌ی خزر) و منطقه‌ی خشک و کویر مرکزی، کم و بیش در اغلب ارتفاعات، به‌صورت پراکنده روئیده‌اند. سابقه‌ی کشت پسته در دامغان، سمنان و قزوین به قرن هفتم هجری و در استان کرمان به قرن دوازدهم هجری می‌رسد. کشت پسته در سایر نقاط ایران، سابقه ۱۵۰ تا ۲۰۰ ساله دارد. برخلاف سابقه‌ی طولانی کشت پسته در ایران، پسته‌کاری در دهه‌های اخیر توسعه‌ی

فزاینده‌ای داشته است (ابریشمی، ۱۳۷۶). در حال حاضر ایران یکی از قدیمی‌ترین و بزرگ‌ترین کشورهای تولید کننده و صادر کننده پسته در دنیا می‌باشد (شیبانی و همکاران، ۱۳۷۴).

۲-۱-۲- گیاه‌شناسی پسته

پسته از خانواده Anacardiaceae است. این خانواده، جزو جداگلب‌رگان بوده و دارای تعداد زیادی جنس است که بیشتر آن‌ها مختص مناطق نیمه‌گرمسیری می‌باشند. یکی از آن‌ها جنس *Pistacia* است. در این جنس، ۱۱ گونه وجود دارد که سه گونه‌ی آن در ایران شناسایی شده است. گونه‌های شناسایی شده در جنس پسته، به‌طور عمده به‌صورت درختچه هستند و از این ۱۱ گونه، تنها گونه‌ی پسته اهلی^۲ است که میوه‌هایش ارزش اقتصادی و خوراکی دارد و سایر گونه‌ها بیشتر به عنوان پایه و یا در اصلاح پسته مورد استفاده قرار می‌گیرند. پسته گیاهی دوپایه است و هر دو گل‌آذین‌های نر و ماده، خوشه‌ای مرکب هستند و شامل ده تا چند صدگل منفرد می‌باشند. گل‌های نر خوشه‌ای، بیضی شکل، متراکم و سبز رنگ هستند. برگ‌های قرمز رنگ در پای هر خوشه‌چه وجود دارند که این برگ‌ها به مرور کم خواهند شد. هر یک از گل‌ها دارای پرچم ولی فاقد گلبرگ است که با کاسبرگ سبز رنگ احاطه شده است. گل ماده نیز خوشه‌ای، مخروطی شکل و سبزرنگ است و هر گل، بدون گلبرگ با سه کاسبرگ و یک کللاه‌ی سه قسمتی پهن است. زمان گل‌دهی ارقام نر و ماده ممکن است یک تا دو هفته باهم تفاوت داشته باشد (Crane, ۱۹۸۵; Spiegel-Roy, ۱۹۹۱).

از نظر گیاه‌شناسی، میوه‌ی پسته در ردیف میوه‌های شفت طبقه‌بندی می‌شود. میوه‌های شفت متشکل از سه قسمت "لایه‌ی برون‌بر خارجی"، "لایه‌ی میان‌بر گوشتی" و "لایه‌ی درون‌بر سخت" هستند که درون‌بر، هسته را می‌پوشاند. تفاوت میوه‌های شفت در بخش خوراکی آن‌ها است. در پسته و بادام، هسته (مغز) به مصرف خوراکی می‌رسد، در حالی که سایر میوه‌های شفت (مانند زردآلو و هلو)، هسته‌ای سخت دارند و میان‌بر گوشتی، بخش خوراکی میوه می‌باشد (رسول‌زادگان، ۱۳۷۰).

ریشه‌زایی درخت پسته به صورت محوری و عمودی است و تا عمق بیش از دو متر داخل خاک فرو می‌رود. سیستم ریشه‌زایی عمقی، درخت را قادر می‌سازد تا به اعماق خاک نفوذ کند و از آب و مواد موجود در آن به خوبی تغذیه نماید و از این رو، درختان پسته قابلیت سازش با دوره‌های طولانی خشکی را دارند. قدرت تولید ریشه‌ی فرعی در درخت پسته، خیلی ضعیف است و هرگاه انتهای ریشه‌ی اصلی قطع شود، درخت خشک می‌شود و از بین می‌رود. طول ریشه، به‌ویژه در سال‌های اول رشد، چند برابر طول اندام هوایی است که این موضوع در ابتدای کشت به استقرار آن و تهیه‌ی آب و مواد غذایی کمک می‌کند (Crane, ۱۹۸۵; Spiegel-Roy, ۱۹۹۱).

۲-۱-۳- نیازهای اکولوژیکی درخت پسته

پسته برای تولید مطلوب کمی و کیفی محصول، نیازمند شرایط محیطی مناسب است. از نظر شرایط آب و هوایی، درخت پسته در مناطقی که دارای زمستان خیلی سرد و تابستان خیلی گرم و طولانی باشند به‌خوبی رشد می‌کند. ارتفاع مناسب کشت پسته، ۱۲۰۰ تا ۱۶۰۰ متر از سطح دریا می‌باشد. در بیشتر مناطق ایران، درخت پسته در عرض‌های جغرافیایی بین ۲۸ تا ۳۲ درجه‌ی شمالی به‌عمل می‌آید. درخت پسته در تابستان تا دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در زمستان تا دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد را تحمل می‌کند (پناهی و همکاران، ۱۳۸۱). پسته به زیادی رطوبت هوا و خاک حساس می‌باشد چرا که افزایش رطوبت نسبی به بالای ۳۵ درصد، موجب تشدید بیماری‌های قارچی و مرگ تدریجی درخت می‌گردد. از طرف دیگر، رطوبت نسبی بالای محیط، باعث اختلال در گرده‌افشانی و تشدید فعالیت قارچ ورتیسیلیوم^۳ می‌گردد.

از دیگر ویژگی‌های پسته، مقاوم بودن این درخت در مقابل خشکی و کم‌آبی است و در مناطقی که میزان بارندگی سالیانه، بیش از ۱۵۰ میلیمتر باشد می‌تواند بدون آبیاری به رشد خود ادامه دهد. پسته برای بارآوری و میوه دادن، به ۱۰۰۰ ساعت سرمای بین صفر تا هفت درجه‌ی سانتی‌گراد نیازمند می‌باشد؛ در غیر این صورت، محصول‌دهی آن غیرممکن خواهد بود. هم‌چنین ارقامی که در بهار زود گل می‌دهند، بر اثر سرمای بهاره دچار سرمازدگی می‌گردند (پناهی و همکاران، ۱۳۸۱).

از نظر شرایط خاک، پسته در هر نوع خاک زراعی قابل کشت است ولی در خاک‌های لومی یا لومی رسی عمیق با زهکشی خوب و میزان شوری پایین رشد بهتری دارد. در خاک‌های سنگین به‌علت افزایش رطوبت در منطقه‌ی فعال ریشه، احتمال ابتلا به بیماری گموز^۴ افزایش می‌یابد. در خاک‌های سنگین، رشد درخت پسته کند خواهد بود. از نظر شوری خاک و آب، پسته تا حدودی به شوری مقاوم است اما نمک‌دوست نمی‌باشد و در شوری‌های بالای خاک و آب، رشد و عملکرد آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد (حکم‌آبادی، ۱۳۸۲).

۲-۱-۴- تولید و صادرات پسته در ایران و جهان

بر اساس آمار منتشر شده از سازمان خواربار و کشاورزی^۵، تولید پسته در جهان در سال‌های اخیر افزایش قابل توجهی داشته است. از میان کشورهای تولیدکننده پسته، ایران، ایالات متحده‌ی آمریکا، ترکیه، سوریه، یونان و ایتالیا به ترتیب عمده‌ترین کشورهای تولیدکننده پسته به‌شمار می‌روند (بی‌نام، ۱۳۸۳). هم از نظر صادرات و هم از نظر اقتصادی، پسته اهمیت زیادی دارد و بعد از نفت و فرش، سومین محصول صادراتی کشور است (حکم‌آبادی، ۱۳۸۲).

در شرایط کنونی حدود ۵۵ درصد از تولید و بیش از ۶۰ درصد از صادرات جهانی پسته در اختیار ایران بوده و این محصول بخش عمده‌ای از صادرات غیرنفتی را تشکیل می‌دهد (پناهی و همکاران، ۱۳۸۱). بیش از ۴۲۰ هزار هکتار باغ پسته بارور و غیر بارور در ایران وجود دارد که در حدود ۷۰ درصد از این باغ‌ها در استان کرمان و بقیه در استان‌های یزد، خراسان، قزوین، سمنان، سیستان و بلوچستان، فارس، مرکزی و اصفهان قرار دارد. تولید محصول سالانه کشور بالغ بر ۲۰۰ هزار تن پسته خشک بوده (بی‌نام، ۱۳۸۳) و بر اساس گزارش پناهی و همکاران (۱۳۸۱)، درآمد ارزی حاصل از صادرات پسته بیش از ۴۰۰ میلیون دلار بوده است.

^۴ - Gumosis

^۵ - Food Agricultural Organization (FAO)

۲-۲-۱- زهرابه‌های قارچی^۶

واژه میکوتوکسین، از لغت یونانی Myke به معنی قارچ و toxicum به معنی سم گرفته شده است (Andersen, ۱۹۸۴; Golinski and Wiewivowska, ۱۹۸۷). میکوتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات سمی طبیعی هستند که توسط گونه‌های متعددی از قارچ‌ها تولید می‌گردند و موجبات مرگ و میر در انسان، حیوانات و گیاهان را فراهم می‌آورند. سالیانه مقادیر قابل توجهی از محصولات کشاورزی به ارزش میلیاردها دلار دستخوش حمله قارچ‌ها قرار گرفته و نابود می‌شوند. محصولات حاوی توکسین، کیفیت مرغوبی نداشته و به قیمت ارزان‌تری ارائه می‌گردند و از آن‌ها به عنوان کود یا سوخت باید استفاده نمود. حیوانات در صورت مسمومیت بوسیله میکوتوکسین‌ها، یا از بین خواهند رفت و یا از نظر اقتصادی دیگر بازده خوبی نخواهند داشت (Andersen, ۱۹۸۴; Bauch *et al.*, ۱۹۶۰).

۲-۲-۲- آفلاتوکسین‌ها^۷

در میان میکوتوکسین‌ها، گروه آفلاتوکسین از جمله مهم‌ترین آن‌هاست. از نظر شیمیایی، آفلاتوکسین‌ها از مشتقات دی‌فورانوکومارین^۸ هستند که از طریق مسیر پلی‌کتید تولید می‌شوند. تاکنون ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناسایی و گزارش شده است که از میان آن‌ها ۱۳ نوع، از آفلاتوکسین‌هایی هستند که به‌طور طبیعی تولید می‌شوند (علوی، ۱۳۷۷). عمده‌ترین این ترکیبات آفلاتوکسین‌های B_1 , B_2 , G_1 هستند که به‌صورت عمده در محصولات توسط قارچ‌های *Aspergillus flavus* Link و *A. parasiticus* Speare و *A. nomius* Kurtzman, Horn & Hesselt تولید می‌شوند. هنگامی که این ترکیبات در معرض اشعه ماوراء بنفش قرار می‌گیرند، آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 نور فلورسنت آبی و آفلاتوکسین‌های G_1 و G_2 نور فلورسنت سبز از خود ساطع می‌کنند. جدایه‌های *A. flavus* تنوع بسیار زیادی در توانایی‌شان برای تولید آفلاتوکسین دارند، اما جدایه‌های مولد توکسین به‌طور مشخص فقط B_1 و B_2 را تولید می‌کنند، در

-
- Mycotoxins
 - Aflatoxins
 - difuranocoumarin

حالی که بیشتر جدایه‌های *A. parasiticus* به طور مشخص هر چهار توکسین را تولید می‌کنند (Diener et al., ۱۹۸۷). سویه‌های توکسین ساز *A. flavus* بیشتر از *A. parasiticus* (Cotty and Bhatnagar, ۱۹۸۷; Kurtzman et al., ۱۹۹۴) در طبیعت یافت شده و در تمام نقاط دنیا در هوا، خاک و بسیاری از مواد آلی پراکنده‌اند (Bilgrami and Choudhary, ۱۹۹۳).

این دو قارچ تمایل ویژه‌ای برای آلودگی دانه‌های روغنی و آجیلی از خود نشان می‌دهند. بادام‌زمینی، ذرت و پسته از عمده‌ترین محصولات هستند که بوسیله این قارچ‌ها مورد تهاجم واقع می‌شوند. این سموم برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ در بادام‌زمینی شناسایی شده و بعدها از بسیاری از دانه‌های خوراکی مورد استفاده در غذای انسان و دام نیز جداسازی شدند. بیماری‌های ناشی از تغذیه مواد آلوده به آفلاتوکسین خطرات قابل ملاحظه‌ای را برای انسان، دام و طیور به همراه دارد (Cole et al., ۱۹۸۲).

قارچ‌های تولید کننده آفلاتوکسین در طبیعت انتشار فراوانی داشته و جزء میکوفلور طبیعی خاک می‌باشند. اما در این مورد استثناء نیز وجود دارد. اسپوره‌های *A. flavus* در هوا بیشتر از خاک پراکنده‌اند و عموماً در مناطق معتدل دنیا یافت می‌شوند. گونه *A. parasiticus* با مناطق گرم‌تر (گرمسیری و نیمه گرمسیری) آداپته شده است و بیشتر در ارتباط با خاک یافت می‌شود، بنابراین *A. parasiticus* عموماً بادام‌زمینی را آلوده می‌کند در صورتی که *A. flavus* بیشتر ذرت را آلوده می‌نماید. ویکلو و همکاران (Wicklow et al., ۲۰۰۵) گزارش کردند که اسکلرت‌های قارچ نقش اینوکوم اولیه را در ایجاد آلودگی در مزارع ذرت به‌عهده دارد (Gourama and Bullerman, ۱۹۹۵).

امروزه آفلاتوکسین فقط یک مشکل منحصر به بادام‌زمینی نیست بلکه دامنه گسترش وسیع‌تری داشته و می‌توان آن را در بسیاری از فراورده‌های غذایی ردیابی کرد. گروه *Aspergillus flavus* روی تعداد زیادی از مواد غذایی از جمله پنیر، دانه‌های آجیلی، نارگیل، بذر خشخاش، آب سیب، فراورده‌های سیب‌زمینی، نخود، لوبیا، عدس، آلو، سیب، هلو، انجیر و حتی فلفل قرمز توانایی تولید سم دارند (علوی، ۱۳۷۷).

۲-۳- گونه‌های *Aspergillus* جدا شده از پسته

پس از رسیدن محصول پسته و شکاف خوردن پوست سبز رویی، چندین نوع قارچ می‌توانند به آن حمله نمایند. در میان این قارچ‌ها، شبه گونه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* زهرابه‌ای به نام آفلاتوکسین را تولید می‌کنند. این قارچ‌ها که از گروه قارچ‌های *A. flavus* می‌باشند، ضمن رشد و نمو و تغذیه از مواد غذایی مغز پسته، زهرابه مذکور را تولید می‌نمایند که در داخل و یا روی مواد غذایی به‌جا می‌ماند. نظر به اینکه شرایط رشد و توسعه قارچ مولد آفلاتوکسین در مرحله داشت فراهم بوده و امکان گسترش آلودگی در سایر مراحل نیز وجود دارد، بنابراین بهترین و مؤثرترین روش در تولید محصول پسته سالم، رعایت توصیه‌های فنی می‌باشد (پناهی و همکاران، ۱۳۸۱).

مجتهدی و همکاران (۱۳۵۹)، گونه‌های *A. niger*، *A. flavus*، *A. tamari*، *A. fischeri* var *spinosus*، *A. terreus* Thorn، *Kita*، *A. parasiticus*، *A. ochraceus*، *A. versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi و *A. nidulans* را از پسته‌های ایران گزارش کرده‌اند. در بین این گونه‌ها، گونه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* آفلاتوکسین B₁ را تولید می‌کردند. علاوه بر این، گونه‌های *A. versicolor* و *A. nidulans* استریگماتوسیستین^۹ و گونه *A. ochraceus*، اکراتوکسین^{۱۰} تولید می‌کردند. در تحقیقات رحیمی و همکاران (۱۳۸۶) جدایه‌های *Aspergillus* جدا شده از پسته شامل گونه‌های *A. allicaceus* Link، *A. candidus*، *A. tamari*، *A. niger*، *A. flavus*، *A. niveus* Blochwitz، *A. terreus*، *A. parasiticus*، *A. unguis* و *A. wentii* برای اولین بار توسط این محققین گزارش شده‌اند.

۲-۲-۴ - قارچ شناسی شبه جنس *Aspergillus* و شبه گونه *A. flavus*

شبه‌جنس *Aspergillus* اولین بار توسط میشلی و با نام *Aspergillum* در کتاب *Nova plantarum* Genera در سال ۱۷۲۹ توصیف شد و شیلو^{۱۱} اولین فردی بود که دریافت گونه *A. flavus* تولید زهرابه

- sterigmatocistin
- ochratoxin
- Shilo