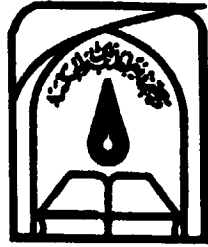


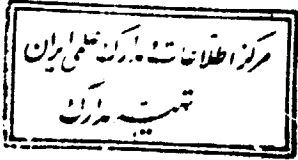
بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

٣٠٧٥٧

۱۳۷۹ / ۴ / ۲۰



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده کشاورزی



پایان نامه جهت دریافت دانشنامه کارشناسی ارشد
در رشته بیماری شناسی گیاهی

۷۵۲۲

عنوان:

ارزیابی حساسیت ارقام پسته به قارچ اسپرژیلوس فلاووس
آفلاتوکسین زا و بررسی میزان تولید آفلاتوکسین B1

تحقیق و نگارش:

مهدی محمدی مقدم

استاد راهنما:

دکتر ابراهیم محمدی گل تپه

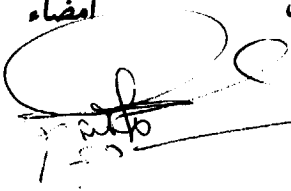
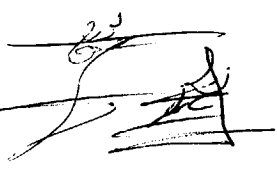
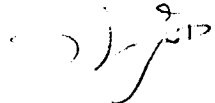
استاد مشاور:

دکتر عبدالامیر علامه

اسفند ۱۳۷۸

۳۰۷۵۷

تائیدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد :
 اعضای هیات داوران نسخه نهایی پایان نامه آقای مهدی محمدی مقدم تحت عنوان ارزیابی
 حساسیت ارقام پسته به قارچ اسپرژیلوس فلاووس آفلاتوکسین زا و بررسی میزان تولید
 آفلاتوکسین B1 را از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی
 ارشد پیشنهاد می کند.

امضاء	رتبه علمی	نام و نام خانوادگی	اعضای هیات داوران
	استادیار	دکتر ابراهیم محمدی گل تپه	۱ استاد راهنما
	دانشیار	دکتر عبدالامیر علامه	۲ استاد مشاور
	استادیار	دکتر ابراهیم پورجم	۳ نماینده شورای تحصیلات تکمیلی
	دانشیار	دکتر عزیز الله علیزاده	۴ استاد ممتحن
	استادیار	دکتر همایون افشاری آزاد	۵ استاد ممتحن

آئین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیماری شناسی گیاهی سال ۱۳۷۸ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر ابراهیم محمدی گل تپه و مشاوره آقای دکتر عبدالامیر علامه از آن دفاع شده است.

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به مرکز نشر اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصل کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶: اینجانب مهدی محمدی مقدم دانشجوی رشته بیماری شناسی گیاهی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

مهدی محمدی مقدم

امضاء

این ناچیز را اگر قدریست به

پدر بزرگوار و مادر عزیزم که

با گرمی آفتاب وجودشان و

با دریای زلال محبتشان

موجب رشد و هدایت من شدند.

همسر مهربانم که

حضور سبزش

نوید بخش فردای بهتر من است.

خواهران و برادر عزیزم که

مهربانیها و عطوفت بیکرانیشان

گذراندن دوران تحصیل را بر من آسان نمود.

تقدیم می کنم.

سپاسگذاری

شکر و سپاس فراوان خداوند را که پرتو لطف و مهر بیکرانش روشنایی بخش کلبه حیاتم بوده و خوان نعمتش میهماندار نیازهایم. ستایش پروردگار را که جهان را بر اساس علم و عدل و حکمت آفرید و به این بنده ناچیز توفیق انجام این پژوهش را ارزانی داشت.

شایسته است در ابتدا از زحمات بی دریغ استاد ارجمندم جناب آقای دکتر ابراهیم محمدی گل تپه، مدیر محترم گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس که به رغم وجود مشغله فراوان، هدایت و راهنمایی این پایان نامه را پذیرفته و همواره با رویی گشاده و اخلاقی نیکو، مرا در نیل به اهدافم یاری رساندند، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین بر خود واجب می دانم از استاد و سرور گرانقدر جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه که مشاوره این پایان نامه را عهده دار بوده و با خلقی پسندیده و علاقه و جدیت در تمام مراحل این تحقیق خالصانه مرا راهنمایی نمودند سپاسگذاری نمایم.

از استادان ارجمند، جناب آقای دکتر عزیزالله علیزاده و آقای دکتر ابراهیم پور جم که افتخار شاگردی ایشان را هر چند در دوره ای کوتاه داشتم و نیز بواسطه راهنماییهای ارزنده شان جهت پیشبرد این تحقیق کمال قدردانی را دارم.

لازم می دانم از دوست بسیار عزیز و ارجمندم جناب آقای مهندس حسین حکم آبادی به واسطه مساعی و زحمات بی دریغشان در امر مشاوره آماری و تجزیه و تحلیل داده ها تشکر و قدردانی نمایم.

از زحمات جناب آقای مهندس مرتضوی، مسئول محترم ایستگاه تحقیقات پسته دامغان که در امر نمونه برداری، مساعدت صمیمانه ای با بنده نمودند کمال تشکر و سپاس را دارم.

همچنین از آقایان، مهندس سعید ملیحی، مسئول محترم آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی و مهندس کاظمی، مسئول محترم آزمایشگاه دامپروری دانشکده کشاورزی که در طول مدت اجرای تحقیق مرا در انجام امور آزمایشگاهی یاری دادند صمیمانه تشکر می نمایم.

از زحمات آقایان، مهندس حمید عالمی، دکتر رزاقی، مهندس امینایی و مهندس مرادی به جهت راهنماییهای ارزنده علمی و همکاری در امر نمونه برداری و تهیه پاره ای از امکانات نهایت تشکر و سپاس را دارم.

همچنین از خانواده عزیز و بزرگوارم به واسطه فراهم نمودن امکانات لازم که وجود آن شرط لازم در توفیق هر امری است و نیز راهنماییهای ارزنده شان در تمام مراحل زندگی قدردانی می نمایم. از رفتار صمیمانه و دوستی خالصانه همکلاسی های خوبم آقایان رحیم احمدوند، علی سراجی، محمد علی آقاجانی، فرهاد گوهرزاده و علیرضا دادخواه به خاطر ایجاد روزهایی پر از شادمانی و خاطره، سپاسگذاری می نمایم.

در پایان از کلیه دوستان و عزیزانی که به نوعی مرا در انجام این تحقیق یاری رسانده اند سپاسگذاری و تشکر نموده و از آن جهت که مجالی برای ذکر اسامی محترمشان نیست، پوزش می طلبم.

چکیده

به منظور ارزیابی حساسیت ارقام پسته به قارچ *A. flavus* و بررسی میزان تولید آفلاتوکسین B_1 تعداد ده رقم پسته از مناطق پسته خیز کشور (رفسنجان، دامغان و قزوین) بنامهای اکبری، کله قوچی، اوحدی، احمد آقایی، کال خندان، کله بزی، شاه پسند، FAS-13-73، عباسعلی و فخری جمع آوری شد. برای انجام این تحقیق از یک جدایه قارچ *A. flavus* استفاده شد. پس از کشت جدایه بر روی محیط SLS و استخراج آفلاتوکسین از محیط کشت، با انجام کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، مشخص شد که جدایه قارچ قابلیت تولید هر دو نوع آفلاتوکسین B_1 و B_2 را دارا میباشد ولی قادر به تولید آفلاتوکسین های G_1 و G_2 نیست.

جهت ارزیابی میزان حساسیت ارقام پسته به رشد قارچ *A. flavus*، میزان کلینیزاسیون قارچ بر روی مغز پسته ها محاسبه گردید. در بین ارقام مورد آزمایش، بترتیب اکبری و کله قوچی، کمترین میزان حساسیت و احمد آقایی و اوحدی بیشترین میزان حساسیت را نسبت به قارچ از خود نشان دادند. از نظر میزان تولید آفلاتوکسین B_1 ، ارقام کال خندان و فخری دارای کمترین و شاه پسند و عباسعلی دارای بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین B_1 بودند. آزمایشات مربوط به تأثیر پوسته مغز پسته (Testa) نشان داد که این پوسته میتواند بعنوان سد مقاوم در برابر نفوذ قارچ بداخل مغز پسته عمل نماید و باعث کاهش میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در مغز پسته گردد. نتایج بررسیهای آماری نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین B_1 در مغزهای سالم و زخمی ارقام مختلف بود. با محاسبه ضریب همبستگی r مشخص شد که بین میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین B_1 در مغز پسته ارتباط معنی داری وجود دارد. بعبارت دیگر با افزایش میزان رشد قارچ *A. flavus* در روی مغز پسته، میزان آفلاتوکسین B_1 نیز افزایش می یابد.

به منظور بررسی رابطه احتمالی میزان درصد قند و چربی با میزان رشد قارچ و آفلاتوکسین B_1 ، میزان قند و چربی موجود در مغز پسته ارقام مختلف اندازه گیری شد. نتایج بررسیهای آماری نشان داد که بین میزان رشد قارچ و میزان قند و چربی موجود در مغز پسته و نیز میزان آفلاتوکسین B_1 و میزان قند و چربی ارتباط معنی داری وجود ندارد.

واژه های کلیدی: *Aspergillus flavus*، پسته، آفلاتوکسین B_1 ، حساسیت، ارقام

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
-------	------

فصل اول - کلیات

مقدمه	۱
۱-۱- تاریخچه پسته	۳
۲-۱- گیاهشناسی پسته	۲
۳-۱- ارزش غذایی مغز پسته	۴
۴-۱- مناطق پسته خیز ایران و جهان	۵
۵-۱- ارقام پسته	۵
۶-۱- تولید پسته در ایران و جهان	۹
۷-۱- وضعیت تجارت جهانی پسته	۱۱

فصل دوم - مروری بر تحقیقات انجام شده

۱-۲- تعریف و تاریخچه مایکوتوکسین ها	۱۵
۲-۲- جنبه های اقتصادی مایکوتوکسین ها	۱۶
۳-۲- تاریخچه کشف و شناسایی آفلاتوکسین	۱۷
۴-۲- بررسی انواع آفلاتوکسین ها	۱۹
۵-۲- قارچهای مولد آفلاتوکسین	۲۳
۶-۲- اثر آفلاتوکسین بر روی قارچها	۲۵
۷-۲- اثر آفلاتوکسین بر روی باکتریها	۲۵
۸-۲- اثر آفلاتوکسین بر روی انسان	۲۵
۹-۲- اثرات بیوشیمیایی آفلاتوکسین ها	۲۶
۹-۲-۱- اثر متقابل با DNA	۲۷
۹-۲-۲- جلوگیری از سنتز DNA	۲۷

- ۲۸ ۲-۹-۳- کاهش سنتز RNA
- ۲۸ ۲-۹-۴- تغییرات مرفولوژی هسته
- ۲۸ ۲-۹-۵- کاهش در بیوسنتز پروتئین
- ۲۸ ۲-۹-۶- ممانعت از سنتز چربیها
- ۲۹ ۲-۱۰-۱۰- اثرات بیولوژیکی آفلاتوکسینها
- ۲۹ ۲-۱۰-۱- جهش زایی آفلاتوکسین ها
- ۳۱ ۲-۱۰-۲- ایجاد ناهنجاریهای جنینی
- ۳۱ ۲-۱۰-۳- اثر بر روی سیستم ایمنی
- ۳۱ ۲-۱۱- حداکثر آفلاتوکسین مجاز در مواد غذایی
- ۳۲ ۲-۱۲- خصوصیات مرفولوژیکی قارچ *Aspergillus flavus*
- ۳۴ ۲-۱۳- مروری بر تحقیقات انجام گرفته در زمینه آفلاتوکسین پسته در ایران
- ۳۸ ۲-۱۴-۱- روشهای سنجش و اندازه گیری آفلاتوکسین
- ۳۸ ۲-۱۴-۱- کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)
- ۳۹ ۲-۱۴-۲- گاز کروماتوگرافی (GC)
- ۳۹ ۲-۱۴-۳- کروماتوگرافی لایه نازک با فشار زیاد (HPTLC)
- ۳۹ ۲-۱۴-۴- رادیو ایمنونواسی (RIA)
- ۴۱ ۲-۱۴-۵- الایزا (ELISA)
- ۴۱ ۲-۱۴-۶- کروماتوگرافی مایع با کاربرد عالی (HPLC)
- ۴۴ ۲-۱۵- عوامل مؤثر در تولید آفلاتوکسین
- ۴۴ ۲-۱۵-۱- خصوصیات قارچ
- ۴۵ ۲-۱۵-۲- محیط غذایی
- ۴۶ ۲-۱۵-۳- رطوبت محصول و رطوبت نسبی محیط

۴۷ ۴-۱۵-۲- حرارت و زمان
۴۸ ۵-۱۵-۲- رسیدگی بذر
۴۸ ۶-۱۵-۲- دانه های شکسته و صدمه دیده
۴۹ ۷-۱۵-۲- اکسیژن و دی اکسید کربن
۵۰ ۸-۱۵-۲- تداخل میکروبی
۵۱ ۱۶-۲- عوامل مؤثر در تولید آفلاتوکسین در محیط کشت مصنوعی
۵۱ ۱-۱۶-۲- محلول غذایی
۵۲ ۲-۱۶-۲- تهویه
۵۲ ۳-۱۶-۲- اسیدیته
۵۲ ۴-۱۶-۲- حرارت و زمان
۵۵ ۵-۱۶-۲- استریل کردن محیطهای غذایی مایع
۵۶ ۶-۱۶-۲- ترکیب غذایی

فصل سوم- مواد و روشها

۶۰ ۱-۳- انتخاب و جمع آوری ارقام مختلف پسته
۶۰ ۲-۳- جدایه قارچ
۶۲ ۳-۳- بررسی خصوصیات مرفولوژیکی جدایه قارچ <i>A.flavus</i>
۶۲ ۴-۳- بررسی خاصیت آفلاتوکسین زایی جدایه قارچ
۶۳ ۵-۳- استخراج آفلاتوکسین از محیط کشت مایع
۶۶ ۶-۳- بررسی میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در محیط کشت SLS ..
۶۶ ۷-۳- تعیین وزن خشک میسلیم
۶۸ ۸-۳- بررسی میزان حساسیت ارقام پسته به قارچ <i>A.flavus</i>

- ۳-۹- بررسی میزان تاثیر پوسته مغز پسته (Testa) در کاهش میزان کلینیزاسیون
 واسپرزیایی قارچ بر روی مغز پسته ۶۹
- ۳-۱۰- بررسی نقش احتمالی میسلیومها واسپرهای رشد کرده بر سطح مغز پسته
 در تولید آفلاتوکسین ۷۰
- ۳-۱۱- استخراج آفلاتوکسین از پسته های آلوده شده ۷۱
- ۳-۱۲- سنجش میزان آفلاتوکسین با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک ۷۵
 ۳-۱۳- اندازه گیری کمی میزان آفلاتوکسین ۸۰
- ۳-۱۴- اندازه گیری میزان قند موجود در ارقام مختلف پسته ۸۲
- ۳-۱۵- اندازه گیری میزان چربی موجود در مغز پسته ارقام مختلف ۸۳

فصل چهارم- نتایج

- ۴-۱- بررسی خصوصیات مرفولوژیکی جدایه قارچ *A.flavus* ۸۷
- ۴-۲- نتایج حاصل از مطالعه توان آفلاتوکسین زایی جدایه قارچ ۸۷
- ۴-۳- نتایج حاصل از مطالعه منحنی رشد قارچ در محیط SLS ۸۹
- ۴-۴- بررسی منحنی تولید آفلاتوکسین B1 در داخل محیط کشت SLS ۸۹
- ۴-۵- نتایج حاصل از مطالعه آلودگی احتمالی ارقام پسته به آفلاتوکسین B1 ۹۱
- ۴-۶- نتایج حاصل از مطالعه میزان حساسیت ارقام پسته به جدایه قارچ
Aspergillus flavus ۹۱
- ۴-۷- نتایج حاصل از ارزیابی تاثیر پوسته مغز پسته (Testa) در کاهش میزان رشد
 قارچ در روی مغز پسته ۹۷
- ۴-۸- نتایج مطالعه میزان اسپرزیایی قارچ بر روی مغز پسته (با پوسته سالم و پوسته
 زخمی شده) ارقام مختلف در مدت زمان ۸ روز بعد از تلقیح ۱۰۸
- ۴-۹- سنجش کمی آفلاتوکسین B1 ۱۰۹

- ۴-۱۰- نتایج مطالعه میزان تولید آفلاتوکسین B1 در ارقام مختلف پسته (با پوسته سالم) ۱۱۱
- ۴-۱۱- نتایج مطالعه میزان تولید آفلاتوکسین در ارقام مختلف پسته با پوسته زخمی ۱۱۱
- ۴-۱۲- نتایج حاصل از مطالعه درصد قند موجود در مغز ارقام مختلف پسته ۱۱۴
- ۴-۱۳- نتایج حاصل از مطالعه درصد چربی موجود در مغز ارقام مختلف پسته ۱۱۴
- ۴-۱۴- نتایج بررسی ارتباط بین میزان رشد قارچ و میزان تولید آفلاتوکسین B1 در ارقام مختلف پسته ۱۱۵
- ۴-۱۵- نتایج بررسی ارتباط بین میزان رشد قارچ و میزان قند و چربی موجود در ارقام مختلف پسته ۱۱۶
- ۴-۱۶- نتایج بررسی ارتباط بین میزان تولید آفلاتوکسین B1 با میزان قند و چربی موجود در ارقام مختلف پسته ۱۱۸
- ۴-۱۷- نتایج بررسی اختلاف میزان رشد قارچ بر روی مغز پسته با پوسته سالم و پوسته زخمی شده ارقام مختلف پسته (۵ روز بعد از تلقیح) ۱۱۸
- ۴-۱۸- نتایج بررسی اختلاف میزان تولید آفلاتوکسین B1 در پسته های با پوسته سالم و پوسته زخمی شده ارقام مختلف (۸ روز بعد از تلقیح) ۱۲۱
- ۴-۱۹- نتایج حاصل از مطالعه میزان تاثیر میسلیمهای رشد کرده در سطح مغز پسته در تولید آفلاتوکسین B1 ۱۲۴

فصل پنجم - بحث

- بحث ۱۲۸
- منابع ۱۳۲

فصل اول

کلیات

مقدمه

آفلاتوکسین ها متابولیت‌های ثانویه قارچی هستند که توسط قارچهای گروه *Aspergillus flavus* تولید میشوند. این ترکیبات بشدت سمی و سرطان زا هستند و بعنوان عوامل جهش زا در دنیا شناخته شده اند (۵۷).

این سموم برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ در بادام زمینی شناسایی شده و بعدها از بسیاری از دانه های خوراکی مورد استفاده در غذای انسان و دام نیز جدا سازی شدند. مصرف مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین ها میتواند اثرات سوء جدی را در انسان به همراه داشته باشد (۳۸).

آلودگی طیف وسیعی از محصولات غذایی انسان و دام به آفلاتوکسین ها امروزه بعنوان یک معضل اقتصادی و تهدید جدی برای سلامت بشر در دنیا شناخته شده است. از میان چهار گروه عمده آفلاتوکسین (G₂, G₁, B₂, B₁) ، آفلاتوکسین B₁ دارای بیشترین میزان سمیت در انسان و حیوانات میباشد (۶۸).

غلات و دانه های روغنی و آجیلی بادرصد کربوهیدرات و چربی بالا از مستعدترین محصولات برای آلودگی و بعنوان مناسب ترین بستر طبیعی برای قارچهای آفلاتوکسین زا در جهان شناخته شده اند (۵).

در کشور ما پسته در میان اقلام صادراتی غیر نفتی ، پس از فرش بالاترین درآمد ارزی را به خود اختصاص داده است. با توجه به اینکه بزرگترین سهم بازار پسته جهانی در اختیار ایران قرار دارد بطوریکه میزان صادرات ایران در سالهای ۱۹۹۴-۱۹۹۵ متجاوز از ۱۱۵ هزار تن و در سال ۱۹۹۶ به ۱۵۰ هزار تن بالغ گردیده است که این خود گواهی بر اهمیت فوق العاده این محصول است که نیاز مبرم به بهینه سازی بیشتر محصول در سطح تجارت جهانی دارد (۵).

معضل اصلی و مهم کشور در عرصه صادرات پسته در سالهای اخیر وجود مسئله آفلاتوکسین این محصول میباشد. لذا با توجه به اهمیت اقتصادی این محصول حیاتی در کشور برآن شدیم که به مطالعه و ارزیابی حساسیت ده رقم پسته کشور به قارچ آسپرژیلوس فلاووس آفلاتوکسین زا پرداخته و میزان تولید آفلاتوکسین B₁ را نیز در این ارقام مورد بررسی قرار دهیم. همچنین به بررسی میزان تاثیر پوسته مغز پسته (Testa) در جلوگیری از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین