Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Determination of population density of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in the last irrigation treatments before harvest in soil and fruits of pistachio trees

Amir Hossein Mohammadi
*Corresponding author. Assistant Professor, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran. E-mail address: ah-mohammadi@pri.ir

Nasser Sedaghati
Assistant Professor, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran. E-mail address: nsedaghati2010@gmail.com

Masoumeh Haghdel
Assistant Professor, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran. E-mail address: m-haghdel@pri.ir

Seyd Javad Hosseinifard
Assistant Professor, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran. E-mail address: hosseinifard@pri.ir

Mehdi Mohammadi Moghaddam
Assistant Professor, Horticultural and Crop Sciences Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran. E-mail address: mm.moghadam52@gmail.com

Abstract

Objective

Contamination of pistachio with *Aspergillus* and aflatoxin is one of the most important problems in the production and export of this valuable product. In this research, in addition to molecular identification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* and determination of the frequency of their toxigenic and nontoxigenic isolates, the population of *Aspergillus flavus* clade was measured in the soil, intact and cracked fruits of cv. Ohadi in 6 treatments of last irrigation before harvest (5, 10, 15, 20, 25, and 30 days).

Materials and methods

Isolation of *Aspergillus flavus* clade fungi from soil, intact and cracked fruits was done by serial dilution method on DRBC culture medium. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* were identified by macromorphological and molecular (calmodulin primer) features and screening of

toxigenic and nontoxigenic isolates was performed using coconut-agar medium (CAM) and thin layer chromatography (TLC). This experiment was carried out in a complete randomized block design with four replications during the years 2012 to 2014.

Results

Out of 233 collected isolates of the *Aspergillus flavus* clade, 221 and 12 isolates belonged to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, respectively. In cracked and intact fruits and soil, the frequency of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* was 86.5, 87.5, 88.7% and 80, 75, 100%, respectively. Based on the results of the combined analysis, the last irrigation treatments 30 and 25 days before harvest have the lowest and the last irrigation treatments 10 and 5 days before harvest have the highest population of *Aspergillus flavus* clade in the soil, intact and cracked fruits that showed significant difference with each other. Using manure significantly increased the population of *Aspergillus flavus* clade, so this increase in cracked, healthy fruits and soil in 2013 was 66, 83, and 114%, respectively.

Conclusions

The results of the present research showed that a reduction of the interval between the last irrigation and the time of fruit harvesting (high moisture percentage of the surface soil of the orchard) and the using manure can increase the population of *Aspergillus flavus* clade in the soil, intact and cracked pistachio fruits. Increase in the fungal population is accompanied by the frequency of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Adjusting the irrigation cycle, so that the last irrigation is 25 to 30 days before the fruit harvesting, can reduce the possibility of contamination of the pistachio kernels to *Aspergillus* and aflatoxin.

Keywords: Aflatoxin, Toxigenic isolates, Manure

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mohammadi AH, Sedaghati N, Haghdel M, Hosseinifard SJ, Mohammadi Moghaddam M (2022) Determination of population density of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in the last irrigation treatments before harvest in soil and fruits of pistachio trees. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (4), 157-180.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (4), 157-180. DOI: 10.22103/jab.2022.20091.1424

Received: October 23, 2022. Received in revised form: November 23, 2022.

Accepted: November 24, 2022. Published online: November 30, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۲۲۲۸-۶۷۰۵ شاپا الکترونیکی: ۲۲۲۸-۶۵۰۰

تعیین تراکم جمعیت *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* در تیمارهای آخرین آبیاری قبل از برداشت در خاک و میوه درختان پسته

امیرحسین محمدی

*نویسنده مسئول، پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران. رایانامه: ah-mohammadi@pri.ir

ناصر صداقتی

پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران. رایانامه: nsedaghati2010@gmail.com

معصومه حقدل

پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران. رایانامه: m-haghdel@pri.ir

سیدجواد حسینی فرد

پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران. رایانامه: hosseinifard@pri.ir

مهدی محمدی مقدم

بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی، منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران. رایانامه: mm.moghadam52@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۳

چکیده

هدف: آلودگی پسته به قارچ *Aspergillus* و آفلاتوکسین یکی از مهمترین مشکلات در تولید و صادرات این محصول با ارزش، می‌باشد. این پژوهش با هدف شناسایی دو گونه *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus*، تعیین فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای این دو گونه و جمعیت *Aspergillus flavus* clade در خاک، میوه‌های سالم و ترک‌خورده رقم اوحدی، در شش تیمار آخرین آبیاری قبل از برداشت (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روز) اجرا گردید.

مواد و روش‌ها: جداسازی قارچ‌های *Aspergillus flavus* clade از خاک، میوه‌های سالم و ترک‌خورده با روش تهیه سوسپانسیون و سری‌های رقت، روی محیط کشت DRBC انجام شد. شناسایی دو گونه *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* با استفاده از ویژگی‌های ماکرومورفولوژیکی و مولکولی (پرایمر کالمودولین) و تشخیص و غربالگری جدایه‌های توکسین‌زا با استفاده از دو روش محیط کشت نارگیل-آگار (Coconut agar medium=CAM) و کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار در طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ اجرا گردید.

نتایج: از مجموع ۲۳۳ جدایه *Aspergillus flavus* clade جمع‌آوری شده، به ترتیب ۲۲۱ و ۱۲ جدایه متعلق به دو گونه *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* بودند. در میوه‌های ترک‌خورده، سالم و خاک فراوانی جدایه‌های توکسین‌زای *A. flavus* به ترتیب ۸۶/۵، ۸۷/۵، ۸۸/۷ درصد و جدایه‌های توکسین‌زای *A. parasiticus*، ۸۰، ۷۵، ۱۰۰ درصد بود. بر اساس نتایج تجریه مرکب، تیمارهای آخرین آبیاری ۳۰ و ۲۵ روز قبل از برداشت (تیمارهای با کمترین رطوبت خاک) کمترین و تیمارهای آخرین آبیاری ۱۰ و ۵ روز قبل از برداشت (تیمارهای با بیشترین رطوبت خاک) بیشترین جمعیت *Aspergillus flavus* clade را در خاک، میوه‌های سالم و ترک خورده نشان دادند. استفاده از کود دامی جمعیت *Aspergillus flavus* clade را به طور معنی‌داری افزایش داد به طوری که این افزایش در میوه‌های ترک خورده، سالم و خاک در سال ۱۳۹۳ به ترتیب ۶۶، ۸۳ و ۱۱۴ درصد بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاهش فاصله آخرین آبیاری با زمان برداشت میوه (بالا بودن درصد رطوبت خاک سطحی باغ) و استفاده از کود دامی می‌تواند موجب افزایش جمعیت *Aspergillus flavus* clade در خاک، میوه‌های سالم و ترک‌خورده پسته گردد. با توجه به اینکه افزایش جمعیت قارچی همراه با فراوانی جدایه‌های توکسین‌زای دو گونه *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* می باشد با تنظیم دور آبیاری، به طوری که آخرین آبیاری ۲۵ تا ۳۰ روز قبل از برداشت میوه باشد، می‌توان آلودگی میوه‌های پسته به *Aspergillus* و تولید آفلاتوکسین را کاهش داد.

کلیدواژه‌ها: آفلاتوکسین، جدایه‌های توکسین‌زا، کود دامی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: محمدی امیرحسین، صداقتی ناصر، حقدل معصومه، حسینی فرد سیدجواد، محمدی مقدم مهدی (۱۴۰۱) تعیین تراکم جمعیت *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* در تیمارهای آخرین آبیاری قبل از برداشت در خاک و میوه درختان پسته. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۴)، ۱۵۷-۱۸۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

پسته اهلی با نام علمی *Pistacia vera* L. از خانواده Anacardiaceae، گیاهی دوپایه، دارای برگ‌های شانه‌ای با میوه شفت تک بذر بوده و گرده افشانی آن به وسیله باد انجام می‌گردد (Esmailpour et al. 2020). پسته از مهمترین محصولات باغبانی ایران است و سهم مهمی در صادرات غیرنفتی کشور دارد. سطح زیرکشت پسته در سال ۱۳۹۹ حدود ۵۳۴ هزار هکتار و میزان تولید آن حدود ۳۸۷ هزار تن بوده است (Ahmadi et al. 2020). کاشت این گیاه در ۲۸ استان کشور رواج داشته و استان‌های کرمان، خراسان رضوی و یزد به ترتیب با ۲۱۲، ۱۱۲ و ۵۴ هکتار بیشترین سطح زیرکشت پسته را به خود اختصاص داده‌اند (Ahmadi et al. 2020). یکی از مهمترین معضلات در تولید و صادرات این محصول، آلودگی میوه پسته به قارچ‌های آسپرژیلوس و آفلاتوکسین می‌باشد (Babaee et al. 2021; Doster & Michailides 1994a,1999) که این آلودگی تحت تاثیر عوامل مختلفی همچون ترک‌خوردگی پوست سبز میوه پسته، دور و زمان آبیاری، رطوبت محیط و میوه، عملیات زراعی در باغ، بقایای گیاهی، مواد آلی و کودهای دامی در باغ، خسارت آفات و پرندگان و انتخاب زمان برداشت می‌باشد (Moradi et al. 2004,2014؛ Moradi & Javanshah 2006; Mehrnejad & Panahi 2006; Shakerardekani et al. 2012; Moss 2004; Cotty & Jaime-Garcia, 2007; Giorni et al. 2008). با توجه به اینکه تراکم اسپور گونه‌های مختلف آسپرژیلوس در فضای باغ‌های پسته تحت تاثیر جمعیت آن در خاک و شرایط خاکی می‌باشد، بنابراین هرگونه اِعمال مدیریت در خاک، از جمله آبیاری می‌تواند جمعیت این قارچ‌ها را روی میوه درختان پسته تحت تاثیر قرار دهد (Moradi et al. 2004). مطالعات مختلف نشان داده که آبیاری نامناسب در باغ‌های پسته از فاکتورهای مهمی است که می‌تواند با تاثیر بر زودخندانی و ترک خوردگی پوست سبز پسته، آلودگی به آسپرژیلوس و آفلاتوکسین را افزایش دهد (Doster &Michailides 1995a,b; Doster et al. 2001; Sedaghati et al. 2008). زودخندانی و ترک‌خوردگی پوست سبز پسته بیشتر مربوط به مراحل اولیه آلودگی است و در زمان رشد درخت پسته اتفاق می‌افتد، اما آبیاری دیرهنگام (Cotty, 1991)، بارندگی (Cotty& Jaime-Garcia 2007) و شبنم در طول دوره‌های گرم، باعث ایجاد مرحله دوم آلودگی محصول پسته از زمان بالغ شدن تا مصرف پسته می‌گردد. از ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناخته شده، تنها آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1 و G2 در محصولات کشاورزی و از جمله پسته شناسایی شده‌اند (Torre et al. 2015; Abdallah et al. 2020; Aydin & Ulvi 2019; Ehrlich et al. 2007). از میان این آفلاتوکسین‌ها، آفلاتوکسین B1 با بیشترین سمیت (Tsakiris et al. 2013)، به‌عنوان یک متابولیت چربی‌دوست توانایی تجمع در بافت‌های کبدی و ایجاد سرطان را داشته (Bensassi et al. 2010) و در طولانی مدت می‌تواند باعث صدمه به کلیه، سلول‌های بنیادی خونساز، سیستم ایمنی و تولیدمثلی و جنین نیز گردد (Heshmati et al. 2017; Khaneghah et al. 2018, 2019; Nabizadeh et al. 2018)، در حالیکه خاصیت سرطان‌زایی سه آفلاتوکسین B2، G1 و G2 هنوز به اثبات نرسیده است

(Taghizadeh et al. 2017). در گذشته طبقه‌بندی گونه‌های آسپرژیلوس در بخش *Flavi*[1] عمدتاً بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی نظیر قطر، رنگ و بافت کلنی‌ها، اندازه و دیواره کنیدیوم‌ها و ساختار کنیدیوفورها بود (Klich 2002). مطالعات متعددی نشان داد که بسیاری از گونه‌های قرارداده شده در بخش *Flavi* تنها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی قابل تمایز نبوده و از نظر تاکسونومیکی بسیار پیچیده و ناهمگن می‌باشند (Frisvad et al. 2005; Pildain et al. 2008). بنابراین با استفاده از تاکسونومی چندفازی (استفاده از ویژگی‌های فنوتیپی، فیزیولوژی و داده‌های حاصل از ترداف ژنی و ترشحات قارچی)، اعضای این بخش به ۸ شاخه[2] با ۳۳ گونه آسپرژیلوس تقسیم بندی شد (Frisvad et al. 2019). تعدادی از گونه‌های آسپرژیلوس بخش *Flavi* قادر به تولید آفلاتوکسین، بالاخص مهمترین نوع آن، یعنی آفلاتوکسین B1 می‌باشند (Varga et al. 2011) که از بین آنها می‌توان به دو گونه *A. flavus* و *A. parasiticus* اشاره کرد که در باغ‌های پسته نیز از اهمیت زیادی برخوردارند (Doster & Michailides 1994a; Heidarian et al. 2005; Rahimi et al. 2007; Mohammadi et al. 2008). با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در زمینه تاثیر آخرین آبیاری بر جمعیت قارچهای آسپرژیلوس به خصوص گونه‌هایی با توانایی تولید آفلاتوکسین صورت نگرفته است بنابراین در تحقیق حاضر سعی شده تا جمعیت و تراکم قارچهای *A. flavus* clade در زمان‌های مختلف آخرین آبیاری قبل از برداشت پسته، در خاک، میوه‌های سالم و ترک‌خورده پسته مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به مدت سه سال در قطعه لایسیمتر ایستگاه تحقیقاتی شماره ۲ پژوهشکده پسته در رفسنجان اجرا گردید. این قطعه دارای درختان رقم اوحدی ۲۰ ساله با فاصله کاشت ۶×۱ متر، خاک با بافت شنی–لومی دارای pH و Ec به ترتیب ۸/۲ و ۳/۸ $dS\ m^{-1}$ بود. آبیاری درختان این قطعه هر ۳۳ روز یکبار انجام می‌شد. آزمایش به صورت طرح بلوک کامل تصادفی با شش تیمار آخرین آبیاری قبل از برداشت و چهار تکرار در سه سال اجرا شد. برنامه آبیاری به‌نحوی تنظیم گردید که آخرین آبیاری در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روز قبل از برداشت محصول انجام شود. کلیه عملیات باغبانی، تغذیه و مبارزه با آفات در قطعه مورد آزمایش در طول سه سال اجرای تحقیق یکسان بوده و در دیماه سال ۱۳۹۲ علاوه بر کودهای شیمیایی، کود گاوی نیز به صورت چالکود (در عمق حدود ۲۰ سانتی متری خاک) به میزان ۲۰ تن در هکتار به تیمارهای این تحقیق داده شد. برداشت محصول پسته در سه سال اجرای پروژه در هفته آخر شهریور انجام شد که در زمان برداشت، نمونه‌هایی از خاک و میوه درختان پسته جمع‌آوری شده و تراکم جمعیت قارچهای *Aspergillus flavus* clade با استفاده از محیط کشت DRBC (Dichloran rosebengal chloramphenicol agar) و روش تهیه سوسپانسیون و سری‌های رقت اندازه‌گیری گردید (Atlas 2010). تشتک‌های پتری

[1]. Section Flavi
[2]. Clade

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

حاوی محیط‌های فوق چهار روز قبل از استفاده، آماده شده و در تاریکی نگهداری شدند تا سطح آنها کاملاً خشک گردد. برای تهیه نمونه‌های خاک، در هر بلوک آزمایشی تعداد ۵ نمونه ۵۰۰ گرمی از نواحی مختلف و از سطح خاک تا عمق ۱۰ سانتی متری به صورت مجزا تهیه شده که پس از مخلوط نمودن نمونه‌ها در آزمایشگاه، از نمونه خاک مرکب سه زیرنمونه ۵۰ گرمی خاک برای هر بلوک تهیه گردید. همچنین در هر بلوک آزمایشی، ۱۲ درخت و از هر درخت نیز، پنج خوشه میوه به صورت تصادفی انتخاب و با یکدیگر مخلوط شدند. در نهایت از هر بلوک آزمایشی سه نمونه شامل ۱۰۰ عدد میوه سالم و ترک خورده (پسته‌های زودخندان و ترک‌خورده نامنظم) جدا شدند. نمونه‌های ۵۰ گرمی خاک و ۱۰۰ عددی میوه‌های سالم و ترک‌خورده به‌صورت جداگانه در ۴۵۰ میلی‌لیتر آب–پپتون ۰/۱ درصد استریل ریخته شده و به مدت یک ساعت روی شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. برای تهیه سری‌های رقت، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده به ۹ میلی‌لیتر آب–پپتون ۰/۱ درصد اضافه شد تا رقت $۱۰^{-۲}$ تهیه گردد. به همین روش رقت $۱۰^{-۳}$ و $۱۰^{-۴}$ نیز تهیه شد. از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تهیه شده در سطح تشتک‌های پتری ریخته شده و سپس با استفاده از یک میله شیشه‌ای اِل–شکل استریل به صورت یکنواخت پخش گردید. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شده و سه تا چهار روز بعد از نظر رشد کلنی قارچ‌های *Aspergillus flavus* clade مورد بررسی قرار گرفتند. با کشت جدایه‌ها به صورت سه نقطه‌ای روی محیط کشت‌های CYA (Czapek yeast autolysate agar)، CZA (Czapek Dox agar)، CYA20S (CYA+20% sucrose)، MEA 2% (Malt extract agar) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و محیط کشت CYA در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز و نگهداری در تاریکی (Samson & Frisvad 2004; Arzanlou et al. 2016)، خصوصیات ماکرومورفولوژیکی کلنی‌های قارچی مورد ارزیابی قرار گرفت (Kilch 2002).

استخراج DNA و شناسایی مولکولی جدایه‌ها: سه جدایه *A. flavus* و دو جدایه *A. parasiticus* شناسایی شده بر اساس خصوصیات ماکرومورفولوژی، به عنوان نماینده، برای شناسایی مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. جدایه‌های انتخاب شده به مدت ۴۸ ساعت در فلاسک‌های ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط عصاره سیب‌زمینی–دکستروز و روی شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. با استفاده از کاغذ صافی و قیف بوخنر استریل، توده میسیلیوم‌ها از محیط مایع جدا شده و دو مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. توده میسلیومی در ازت مایع کاملاً پودر شده و استخراج DNA با استفاده از بافر CTAB و کیت استخراج DNG ™-Plus solution (شرکت سیناکلون) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (NanoDrop Technologies, USA) اندازه‌گیری شده و تکثیر قطعه ۵۸۰ جفت بازی ژن کالمودولین (Glass & Donaldson 1995) با استفاده از پرایمرهای زیر انجام شد.

cmd 5 (5´ CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC 3´)

cmd 6 (5´ CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3´)

تکثیر DNA با استفاده از زوج آغازگرها در واکنش ۲۵ میکرولیتری از ۱۲/۵ میکرولیتر محلول آماده Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red (Ampliqon, Denmark)، نیم میکرولیتر از هر پرایمر (Metabion,Germany)

با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Göttingen, Germany) انجام شد. مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت ۱۸۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، به همراه ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و مراحل بسط و بسط نهایی به ترتیب به مدت ۶۰ و ۳۰۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. توالی یابی قطعات تکثیر شده توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شده و ویرایش آنها توسط نرم افزار Geneious (Biomatters, USA) انجام شد. توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی بلاست (BLAST) با داده‌های موجود در بانک ژن (Genbank) پایگاه NCBI مقایسه و شناسایی مولکولی گونه‌ها صورت گرفت.

شناسایی جدایه‌های توکسین‌زا با استفاده از محیط کشت: برای تشخیص و غربالگری اولیه جدایه‌های توکسین‌زا از محیط کشت نارگیل–آگار (Coconut agar medium=CAM) استفاده شد. برای تهیه این محیط کشت ۲۰۰ گرم پودر نارگیل به مدت ۵ دقیقه در آب جوش ریخته شده که عصاره حاصل با استفاده از پارچه ململ در چند نوبت صاف گردید. پس از رساندن حجم عصاره به یک لیتر و افزودن ۱۸ گرم آگار، محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع استریل گردید (Davis et al. 1987). جدایه‌های متعلق به *A. flavus* clade، به مدت ۳ روز در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت CAM و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و تاریکی کشت داده شده و پس از وارونه کردن تشتک‌های پتری، یک قطره (۲۰۰ میکرولیتر) از محلول آمونیاک ۲۵ درصد روی درب تشتک پتری گذاشته شده تا بخار آمونیاک در فضای داخلی تشتک‌های پتری پخش شود. جدایه‌های توکسین‌زا با توجه به ظهور رنگ ارغوانی در پشت کلنی‌ها شناسایی شدند (Satio & Machida,1999; Fani et al. 2014).

سنجش توان و شدت توکسین زایی جدایه ها با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک: در این مرحله جدایه‌های غیرتوکسین‌زای شناسایی شده در مرحله قبل مورد استفاده قرار گرفت. با افزودن حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط کشت PDA مایه‌زنی شده با جدایه‌های قارچی ۱۰ روزه و عبور این سوسپانسیون از پارچه ململ استریل، با استفاده از لام گلبول شمار، سوسپانسیونی با غلظت ۲×۱۰^{۵} اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس ۴ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون در فلاسک‌های ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ گرم دانه برنج خرد شده استریل کشت داده شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز در تاریکی نگهداری شد (Wei & Jong, 1986; Fani et al. 2014). پس از استخراج آفلاتوکسین نمونه‌های برنج با استفاده از کلروفرم و متانول و روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، میزان تولید آفلاتوکسین جدایه‌ها سنجیده شد (Mohammadi Moghadam et al. 2020). این آزمایش دو مرتبه انجام شد.

اندازه‌گیری رطوبت وزنی خاک و رطوبت نسبی هوا: در زمان برداشت محصول پسته در هر قطعه آزمایشی، پنج نمونه تصادفی از عمق صفر تا ۱۰ سانتی‌متری خاک انتخاب شده و هر نمونه بلافاصله و قبل از خشک شدن، وزن گردید (W_1). سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس قرار داده شده وزن آنها یادداشت گردید (W_2). در پایان

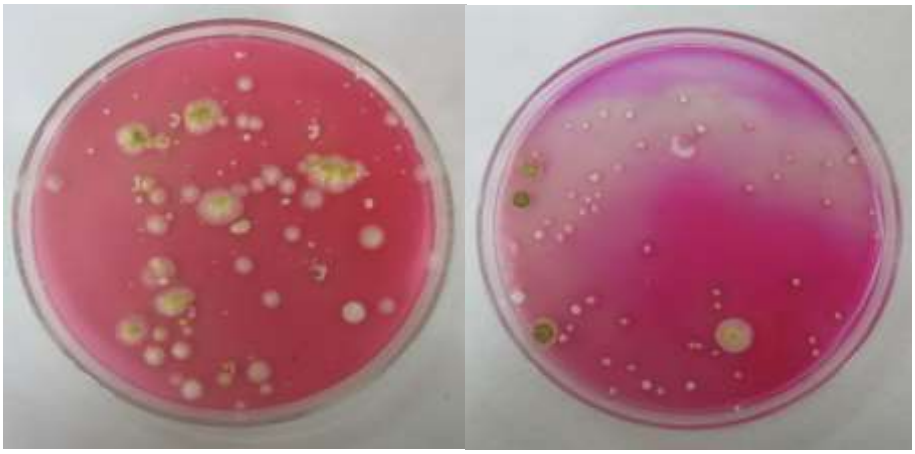
درصد رطوبت وزنی خاک (θ_m) از رابطه زیر محاسبه شد (Alizadeh 2011):

$$\theta_m = \frac{W_1 - W_2}{W_2} \times 100$$

همچنین رطوبت نسبی هوای زیر سایه انداز درخت نیز با استفاده از دیتالاگر (TES 1365) اندازه‌گیری گردید.

نتایج و بحث

در این تحقیق در مجموع ۲۳۳جدایه قارچی متعلق به *Aspergillus flavus* clade جداسازی و شناسایی گردید که رنگ کلنی آنها روی محیط کشت DRBC سبز بوده و به‌راحتی از سایر قارچ‌ها به‌خصوص *A. niger* قابل تمایز بودند (شکل ۱).

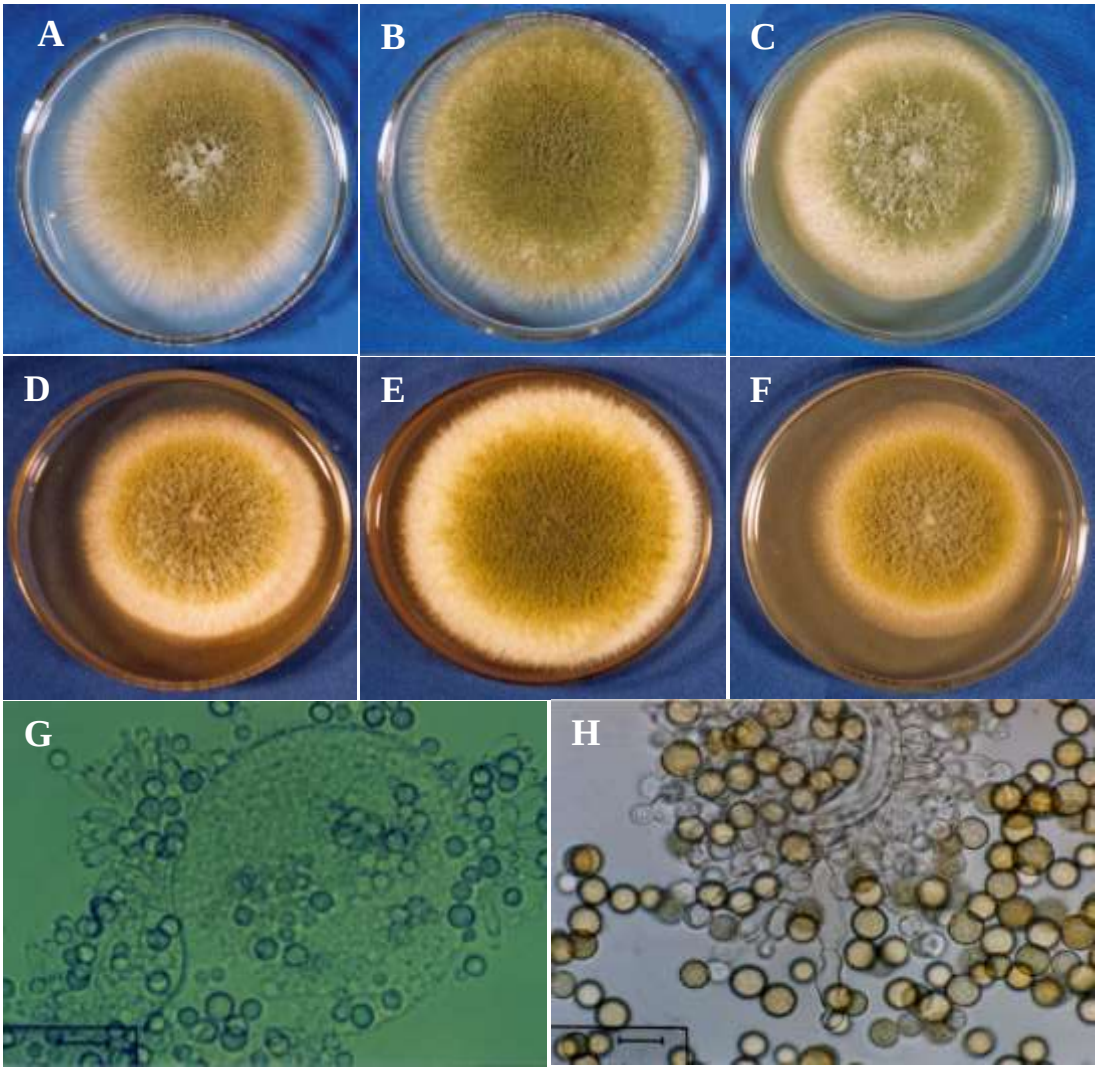


شکل ۱.کلنی‌های سبز رنگ قارچ‌های شاخه *Aspergillus flavus* روی محیط کشت DRBC

Figure 1. Green colonies of *Aspergillus* section *Flavi* on DRBC medium

در میان این جدایه‌ها، بر اساس خصوصیات ماکرومورفولوژیکی، ۲۲۱ جدایه متعلق به گونه *Aspergillus flavus* و ۱۲ جدایه متعلق گونه *A. parasiticus* شناسایی شد (جدول‌های ۱ و۲). کلنی‌های این دو گونه به رنگ سبز متمایل به زرد و با رشد نسبتاً سریع بوده که در مدت ۷ روز، قطر کلنی‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به حدود ۶۵–۷۰ میلی‌متر می‌رسید. از نظر مورفولوژیکی مهمترین وجه تمایز میان *A. flavus* با *A. parasiticus* رنگ سبز تیره‌تر کلنی‌ها و خاردار بودن کنیدیوم‌ها در *A. parasiticus* (شکل ۲) می‌باشد (Klich, 2007). شناسایی مولکولی و تکثیر ژنوم جدایه‌های انتخابی *A. flavus* و *A. parasiticus* با استفاده از پرایمرهای cmd5/cmd6 منجر به تشکیل باندهای ۵۸۰ جفت بازی گردید که دارای شباهت ۱۰۰ درصدی با نمونه‌های موجود در بانک ژن بود. بر این اساس، سه جدایه با شماره دسترسی MT882331، MT882332 و MT882333 متعلق به *A. flavus* و دو جدایه با شماره دسترسی OL355094 و OL355095 متعلق به *A. parasiticus* در بانک ژن ثبت گردیدند. گونه‌های متعلق به بخش *Flavi* از نظر بیوتکنولوژی، غذایی و سلامت انسان دارای اهمیت زیادی می‌باشند (Varga et al. 2011). تعداد قابل توجهی از این گونه‌ها به عنوان عوامل بیماریزای مهم روی محصولات کشاورزی بوده و با تولید میکوتوکسین‌هایی مانند آفلاتوکسین،

۳ نیتروپروپیونیک اسید، تنوزوئیک اسید و سیکلوپیازونیک اسید خسارت اقتصادی قابل توجهی را به محصولات کشاورزی وارد می‌نمایند (Varga et al. 2011).



شکل ۲. مقایسه پرگنه و ویژگی‌های میکروسکوپی *Aspergillus falvus* و *Aspergillus parasiticus*. A، B، C پرگنه‌های *A. flavus* و D، E، F: پرگنه‌های *A. parasiticus* روی سه محیط کشت CYA، CYA20S و MEA. G و H: کنیدیوفورها و کنیدیوم‌های *A. flavus* و *A. parasiticus*

Figure 2. Comparison of colony and microscopic characters of Aspergillus flavus and *Aspergillus parasiticus.* A,B,C colonies of *A. flavus* and D,E,F colonies of *A. parasiticus* on CYA, CYA20S and MEA media. G and H: Conidiophores and conidia of *A. flavus* and *A. parasiticus*. Scale bars: G,H=10 µm

گرچه تاکنون گونه‌های مختلفی از جنس *Aspergillus* از میوه، خاک، انبار و فضای باغ‌های پسته در ایران، آمریکا و ترکیه جداسازی و گزارش شده‌اند، اما دو گونه *A. flavus* و *A. parasiticus* به عنوان کپک‌های مولد آفلاتوکسین همواره از جایگاه ویژه‌ای در میکوفلور خاک و میوه پسته برخوردار بوده‌اند (Doster & Michailides 1994 a,b; Heidarian et al. 2005;

(Rahimi et al. 2007; Mohammadi et al. 2008; Moradi et al. 2014, 2015). گونه *A. flavus* به دلیل تولید اسپورهای کوچک فراوان و توانایی رشد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قدرت بیماریزایی در حیوانات و انسان را داشته (Varga et al., 2011) علاوه بر اینکه یکی از مهمترین قارچهای مولد آفلاتوکسین در پسته، ذرت، بادام زمینی و پنبه نیز می‌باشد (Doster & Michailides 1994a, 1995b; Kabirian et al. 2011; Georgiadou et al. 2012).

در مجموع ۳ سال، در میوه‌های ترک خورده از ۹۶ جدایه *A. flavus*، ۸۳ جدایه (۸۶/۵ درصد) توکسین‌زا و ۱۳ جدایه (۱۳/۵ درصد) غیرتوکسین‌زا بودند (جدول ۱). در میوه‌های سالم نیز در میان ۷۲ جدایه *A. flavus* شناسایی شده، ۶۳ جدایه (۸۷/۵ درصد) توکسین‌زا و ۹ جدایه (۱۲/۵ درصد) غیرتوکسین‌زا بودند. از ۵۳ جدایه جمع‌آوری شده از خاک نیز به ترتیب ۴۷ (۸۸/۷ درصد) و ۶ (۱۱/۳ درصد) جدایه، توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا بود. درصد جدایه‌های توکسین‌زای *A. parasiticus* در مجموع سه سال و در میوه‌های ترک‌خورده، سالم و خاک به ترتیب ۸۰، ۷۵، ۱۰۰ درصد و جدایه‌های غیرتوکسین‌زا، ۲۰، ۲۵ و صفر درصد بود (جدول ۲). نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد جدایه‌های غیرتوکسین‌زا در دو گونه *A. flavus* و *A. parasiticus* در مقایسه با جدایه‌های توکسین‌زا به طور قابل توجهی کمتر می‌باشد که این نتایج با نتایج سایر محققین مطابقت دارد. بررسی جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* جداشده از باغ‌های پسته استان‌های کرمان، اصفهان، قم، خراسان رضوی، یزد، سمنان و مرکزی حاکی از فراوانی این جدایه‌ها به میزان ۶/۲، ۱۵/۴، ۱۳، ۱۷/۶، ۲۵، ۹/۱ و ۱۱/۱ درصد بود (Fani et al. 2014). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که در میان ۱۲۰ جدایه *Aspergillus* section *Flavi* جمع‌آوری شده از استان‌های سمنان، خراسان رضوی، کرمان، یزد و فارس، ۱۳ جدایه (۱۰/۸ درصد) غیرتوکسین‌زا و ۱۰۷ جدایه (۸۹/۲ درصد) توکسین‌زا می‌باشند (Mohammadi moghadam et al. 2020). در باغ‌های پسته کالیفرنیا نیز از ۸۶۴ جدایه *A. flavus* جداسازی شده، ۵/۸ درصد جدایه‌ها غیرتوکسین‌زا گزارش شدند (Michailides et al. 2007). مطالعات انجام شده در محصولاتی مانند ذرت نیز فراوانی جدایه‌های توکسین‌زای *A. flavus* را حدود ۳۰ تا ۶۰ درصد گزارش می‌کند (Vaamonde et al. 2003; Donner et al. 2009; Varga et al. 2011; Probst et al. 2011). از ۵ و ۴ جدایه *A. parasiticus* جداسازی شده از میوه‌های ترک خورده و سالم، به ترتیب ۴ و ۳ جدایه توکسین‌زا بوده در حالیکه تمامی جدایه‌های جمع‌آوری شده از خاک، توکسین‌زا بودند. گونه *A. parasiticus* یکی دیگر از گونه‌های مهم در شاخه *A. flavus* است که علاوه بر پسته (Doster and Michailides 1994 a,b; Mohammadi et al. 2008; Doster et al. 2014) در سایر محصولات کشاورزی مانند بادام‌زمینی و بادام (Rodrigues et al., 2009) نیز وجود داشته اما در مقایسه با گونه *A. flavus* پراکنش کمتری دارد. تقریباً تمام جدایه‌های *A. parasiticus*، توکسین‌زا می‌باشند (Dostre and Michailides 1944b; Varga et al. 2011). به‌نظر می‌رسد که وجود سیستم تک‌کشتی پسته در استان کرمان، استفاده مداوم از کودهای دامی به عنوان یکی از منابع اصلی جمعیت قارچهای *A. flavus* clade، نوع بستره غذایی، شرایط محیطی و همچنین برهکمنش این قارچها با سایر میکروارگانیسم‌ها در تغییرات جمعیتی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا موثر می‌باشد (Fani et al. 2014a,b).

جدول ۱. فراوانی تعداد کل جدایه‌ها، جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای *Aspergillus flavus* جداشده از میوه‌های ترک‌خورده، سالم و خاک باغ پسته در مدت زمان سه سال

Table 1. Frequency of total number of isolates, toxigenic and non-toxigenic collected isolates of *Aspergillus flavus* from cracked and healthy fruits and soil for three years.

سال‌های نمونه‌برداری Year of sampling	تعداد کل جدایه‌ها Total number of isolates	تعداد (درصد) جدایه‌های توکسین‌زا Number (%) of toxigenic isolates	تعداد (درصد) جدایه‌های غیرتوکسین‌زا Number (%) of atoxigenic isolates
	Cracked fruits میوه‌های ترک‌خورده		
1392	24	21 (87.5%)	3 (12.5%)
1393	42	36 (85.7%)	6 (14.3%)
1394	30	26 (86.7%)	4 (13.3%)
مجموع ۳ سال Total of 3 years	96	83 (86.5%)	13 (13.5%)
	Intact fruits میوه‌های سالم		
1392	19	17 (89.5%)	2 (10.5%)
1393	30	26 (86.7%)	4 (13.3%)
1394	23	20 (87%)	3 (13%)
مجموع ۳ سال Total of 3 years	72	63 (87.5%)	9 (12.5%)
	Soil خاک		
1392	14	13 (92.9%)	1 (7.1%)
1393	21	18 (85.7%)	3 (14.3%)
1394	18	16 (88.9%)	2 (11.1%)
مجموع ۳ سال Total of 3 years	53	47 (88.7%)	6 (11.3%)

مقایسه کاربرد دو روش محیط نارگیل-آگار با استفاده از بخار آمونیاک (CAM+AV) و کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) برای شناسایی و تفکیک جدایه‌های غیرتوکسین‌زای دو گونه *A. flavus* و *A.parasiticus* حاکی از تطابق ۹۲/۹ و ۱۰۰ درصدی نتایج این دو روش بود (جدول‌های ۳ و۴). تنها یک جدایه *A. flavus* جداشده از میوه‌های سالم در سال ۱۳۹۲ و میوه‌های ترک‌خورده در سال ۱۳۹۳ در روش استفاده از محیط کشت CAM+AV توکسین‌زا شناخته شدند که بر اساس آزمون TLC غیرتوکسین‌زا بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از محیط کشت CAM+AV می‌تواند یک روش سریع و قابل اطمینان برای شناسایی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا باشد و نتایج آن تطابق زیادی با نتایج حاصل از روش TLC دارد که این موضوع توسط سایر محققین نیز مورد تایید قرار گرفته است (Fani et al. 2014a; Probst et al. 2011).

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۲. فراوانی تعداد کل جدایه‌ها، جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای *Aspergillus parasiticus* جداشده از میوه‌های ترک‌خورده، سالم و خاک باغ پسته در مدت زمان سه سال

Table 2. Frequency of total number of isolates, toxigenic and non-toxigenic collected isolates of *Aspergillus parasiticus* from cracked and healthy fruits and soil for three years

سال‌های نمونه‌برداری Years of sampling	تعداد کل جدایه‌ها Total number of isolates	میوه‌های ترک خورده Cracked fruits: تعداد (درصد) جدایه‌های توکسین‌زا Number (%) of toxigenic isolate	تعداد (درصد) جدایه‌های غیرتوکسین‌زا Number (%) of atoxigenic isolates
1392	1	1 (100%)	0 (0%)
1393	3	2 (66.7%)	1 (33.3 %)
1394	1	1 (100%)	0 (0%)
مجموع ۳ سال Total of 3 years	5	4 (80%)	1 (20%)
		Intact fruits میوه های سالم	
1392	1	1 (100%)	0 90%)
1393	2	1 50%)	1 (50%)
1394	1	1 (100%)	0 (0%)
مجموع ۳ سال Total of 3 years	4	3 (75%)	1 (25%)
		Soil خاک	
1392	1	1 (100%)	0 (0%)
1393	1	1 (100%)	0 (0%)
1394	1	1 (100%)	0 (0%)
مجموع ۳ سال Total of 3 years	3	3 (100%)	0 (0%)

جدول ۳. مقایسه کارایی دو روش استفاده از محیط کشت و کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) در شناسایی جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *Aspergillus flavus*

Table 3. Comparison of the efficiency of culture medium and thin layer chromatography (TLC) methods for identification non-toxigenic isolates of *Aspergillus flavus*

سال Year		CAM+AV	TLC	تطابق دو روش (٪) Agreement between two methods (%)
1392	میوه ترک‌خورده (Cracked Fruit)	3	3	100
	میوه سالم (Intact fruits)	1	2	50
	خاک (Soil)	1	1	100
1393	میوه ترک‌خورده (Cracked Fruit)	5	6	83.3
	میوه سالم (Intact fruits)	4	4	100
	خاک (Soil)	3	3	100
1394	میوه ترک‌خورده (Cracked Fruit)	4	4	100
	میوه سالم (Intact fruits)	3	3	100
	خاک (Soil)	2	2	100
جمع کل جدایه‌ها Total number of isolates		26	28	92.9

CAM+AV: coconut agar medium+Ammonium vapor, TLC: thin-layer chromatography

جدول ٤. مقایسه کارایی دو روش استفاده از محیط کشت و کروماتوگرافی با لایه نازک در شناسایی جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *Aspergillus parasiticus*

Table 4. Comparison of the efficiency of culture medium and thin layer chromatography (TLC) methods for identification non-toxigenic isolates of *Aspergillus parasiticus*

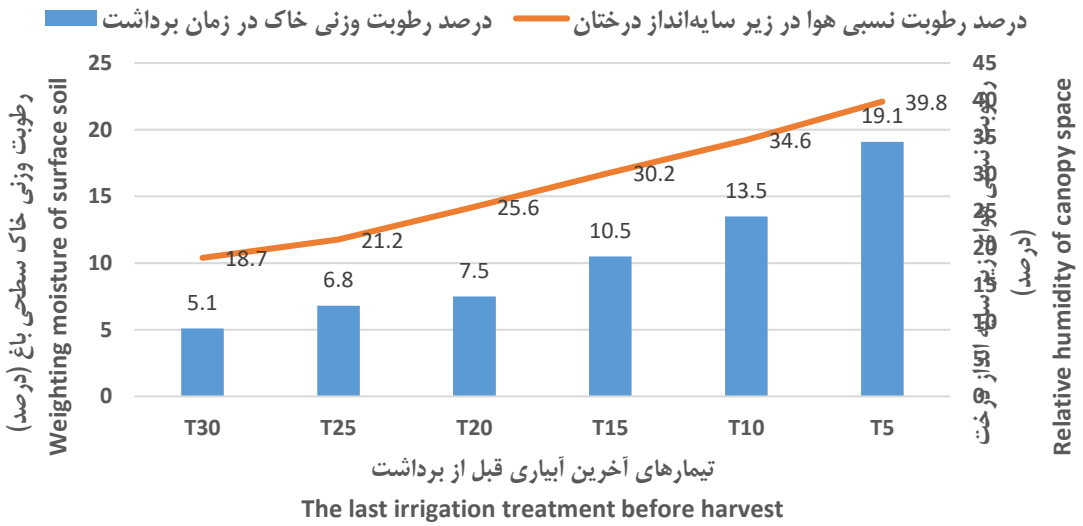
تطابق دو روش (٪) Agreement between two methods (%)	TLC	CAM+AV		سال Year
100	0	0	میوه ترک‌خورده (Cracked Fruit)	1392
100	0	0	میوه سالم (Intact fruits)	
100	0	0	خاک (Soil)	
100	1	1	میوه ترک‌خورده (Cracked Fruit)	1393
100	1	1	میوه سالم (Intact fruits)	
100	0	0	خاک (Soil)	
100	0	0	میوه ترک‌خورده (Cracked Fruit)	1394
100	0	0	میوه سالم (Intact fruits)	
100	0	0	خاک (Soil)	
100	2	2		جمع کل جدایه‌ها Total number of isolates

CAM+AV: coconut agar medium+Ammonium vapor
TLC: thin-layer chromatography

کمترین میزان رطوبت وزنی خاک در دو تیمار آخرین آبیاری ۳۰ و ۲۵ روز قبل از برداشت به ترتیب با مقادیر ۵/۱ و ۶/۸ درصد مشاهده گردید (شکل ۳). در مقابل تیمارهای آخرین آبیاری ۱۰ و ۵ روز قبل از برداشت به ترتیب دارای ۱۳/۵ و ۱۹/۱ درصد رطوبت وزنی خاک بودند که در مقایسه با دو تیمار قبلی افزایش حداقل دو برابری را نشان می‌دهد (شکل ۳). درصد رطوبت نسبی هوا نیز با نزدیک شدن زمان آخرین آبیاری با برداشت پسته افزایش نشان داد به طوریکه در تیمارهای آبیاری ۱۰ و ۵ روز قبل از برداشت محصول، در صد رطوبت نسبی فضای زیر سایه‌انداز درختان به ترتیب با ۳۶/۴ و ۴۱/۸ در صد، افزایش حداقل دو برابری نسبت به تیمارهای ۳۰ و ۲۵ روز قبل از برداشت نشان داد (شکل ۳). جمعیت قارچ‌های *A. flavus* clade در هرگرم خاک و میوه‌های سالم در طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ در جدول‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. در سال ۹۲ کمترین میزان جمعیت این قارچ‌ها در هر گرم خاک و میوه‌های سالم در تیمارهای آخرین آبیاری ۳۰، ۲۵ و ۲۰ روز قبل از برداشت مشاهده گردید در حالیکه در سال‌های ۹۳ و ۹۴ تنها تیمارهای آخرین آبیاری ۳۰ و ۲۵ روزه کمترین میزان جمعیت قارچ در خاک را نشان دادند. در هر سه سال تیمارهای آخرین آبیاری ۱۰ و ۵ روز قبل از برداشت بیشترین جمعیت قارچی را در مقایسه با سایر تیمارها نشان دادند که تنها در سال ۹۴ و در میوه‌های سالم جمعیت قارچی در تیمارهای ۱۰ و ۵ روز تفاوت معنی‌داری را با تیمار آخرین آبیاری ۱۵ روز قبل از برداشت نشان نداد (جدول ۶). در نتایج تجریه مرکب، تیمارهای آخرین آبیاری ۳۰ و ۲۵ روز قبل از برداشت کمترین و تیمارهای آخرین آبیاری ۱۰ و ۵ روز قبل از برداشت، بیشترین جمعیت قارچ‌های *A. flavus* clade در هرگرم خاک را نشان دادند که

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

اختلاف معنی‌دار با یکدیگر در سطح ۱ درصد داشتند (جدول ۵). نتایج جمعیت قارچی در میوه‌های سالم نیز مشابه نتایج خاک بوده با این تفاوت که بیشـــترین جمعیت قارچهای *A. flavus* clade در میوه‌های ســـالم در تیمارهای آبیاری ۱۵، ۱۰ و ۵ روز قبل از بردا شت م شاهده گردید (جدول ۶). افزودن کود دامی در دیماه سال ۱۳۹۲ به تیمارهای آزمایشی اثر افزایشی خود را بر جمعیت قارچهای *A. flavus* clade در خاک و میوه‌های سالم در سال های ۹۳ و ۹۴ نشان داد (جدول ۵).



شکل ۳. میانگین رطوبت وزنی خاک سطحی و رطوبت نسبی هوای زیر سایه انداز درختان در تیمارهای مختلف آخرین آبیاری قبل از برداشت

Figure 3. Mean of weighting moisture of surface soil and relative humidity of the space under the canopy of trees in different treatments of the last irrigation before harvest

جدول ۵. فراوانی زادمایه قارچهای *Aspergillus flavus* clade در هر گرم خاک

Table 5. Population of *Aspergillus flavus* clade propagules per gram of soil

تیمارها (آخرین آبیاری قبل از برداشت) Treaments (The last irrigation before harvest)	زادمایه/گرم خاک Propagule/g of soil			
	Year 1392	Year 1393	Year 1394	تجزیه مرکب سه سال Combine analyze of 3 years
30 day	370 h	666.8 efg	533.3 fgh	523.3 D
25 day	466.8 gh	733.3 ef	666.8 efg	622.3 CD
20 day	533.3 fgh	1000 d	800 e	777.8 C
15 day	666.8 efg	1533 c	1067 d	1089 B
10 day	1020 d	2467 a	1867 b	1785 A
5 day	1133 d	2602 a	2000 b	1912 A
تجزیه مرکب تیمارها Combine analyze of treatments	698.3 C	1500 A	1156 B	

میانگین‌های دارای حروف مشترک، طبق آزمون دانکن در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند.

Means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.01$)

جدول ٦. جمعیت قارچ‌های *Aspergillus flavus* clade روی میوه‌های سالم

Table 6. Population of *Aspergillus flavus* clade propagules on intact fruits

تیمارها (آخرین آبیاری قبل از برداشت) The last irrigation before harvest	زادمایه/میوه سالم Propagule/healthy fruit			
	Year 1392	Year 1393	Year 1394	تجزیه مرکب سه سال Combine analyze of 3 years
30 day	800 m	1135 ij	1000 jkl	978.3 C
25 day	866.8 lm	1267 hi	1068 jk	1067 C
20 day	933.3 klm	1655 e	1402 gh	1330 B
15 day	1467 fg	2998 bc	2867 cd	2444 A
10 day	1602 ef	3133 ab	2798 d	2511 A
5 day	1668 e	3267 a	2933 cd	2623 A
تجزیه مرکب تیمارها Combine analyze of treatments	1223 C	2243 A	2011 B	

میانگین‌های دارای حروف مشترک، طبق آزمون دانکن در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند.

Means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.01$)

جمعیت قارچی در سال ۹۳ در کلیه تیمارهای آبیاری در خاک و میوه‌های سالم به طور معنی‌داری بیشتر از سال ۹۲ بود. در سال ۹۴ جمعیت قارچی خاک در تیمارهای آبیاری ۲۰، ۱۵، ۱۰ و ۵ روز قبل از برداشت به طور معنی‌داری بیشتر از سال ۹۲ بود (جدول ۵) اما در میوه‌های سالم جمعیت قارچی در سال ۹۴ در کلیه تیمارهای آبیاری به طور معنی‌داری بیشتر از سال ۹۲ بود (جدول ۶). نتایج تجزیه مرکب نیز حاکی از اختلاف معنی‌دار جمعیت قارچی در تیمارهای مختلف آبیاری در سال‌های مختلف بود که بیشترین جمعیت قارچی به ترتیب در سال های ۹۳، ۹۴ و ۹۲ مشاهده گردید. کمترین جمعیت قارچ‌های *A. flavus* clade در میوه‌های ترک‌خورده در سال‌های ۹۲ و ۹۳ در تیمار آخرین آبیاری ۳۰ روز قبل از برداشت و در سال ۹۴ در تیمار آبیاری ۲۵ و ۳۰ روز قبل از برداشت مشاهده شد، در مقابل تیمارهای آخرین آبیاری ۱۰ و ۵ روز قبل برداشت، بیشترین جمعیت قارچی را نشان دادند (جدول ۷). تجزیه مرکب داده‌ها نیز حاکی از وجود کمترین و بیشترین جمعیت قارچ‌های *A. flavus* clade به ترتیب در تیمارهای آخرین آبیاری ۳۰ و ۲۵ روز و ۱۰ و ۵ روز قبل از برداشت بود. بیشترین جمعیت قارچ‌های *A. flavus* clade در میوه‌های ترک‌خورده در سال ۱۳۹۳ (اولین سال زراعی پس از کوددهی) و پس از آن در سال ۱۳۹۴ (دومین سال زراعی پس از کوددهی) مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار با سال ۱۳۹۲ در سطح ۱ درصد بودند. تجزیه مرکب تیمارها در سال‌های مختلف مشابه همین نتایج را نشان داد. بر اساس نتایج تحقیق حاضر بیشترین جمعیت قارچ‌های *A. flavus* clade در خاک، میوه‌های سالم و ترک‌خورده در تیمارهای آخرین آبیاری ۵ و ۱۰ روز قبل از برداشت مشاهده شد. به نظر می‌رسد که افزایش رطوبت خاک و به دنبال آن رطوبت نسبی هوای زیر سایه‌انداز عامل مهمی در افزایش جمعیت قارچ‌های *A. flavus* clade باشد. مطالعات انجام شده در مزارع پنبه نیز نشان می‌دهد که تیمارهای

آخرین آبیاری در نیمه اول تیرماه و نیمه اول مرداد در مقایسه با تیمارهای آخرین آبیاری در نیمه دوم مرداد و اواسط شهریورماه در پنبه موجب آلودگی کمتر قوزه های پنبه به آفلاتوکسین می‌گردد (Russel et al. 1976).

جدول ۷. جمعیت قارچ‌های *Aspergillus flavus* clade روی میوه‌های ترک‌خورده

Table 7. Population of *Aspergillus flavus* clade propagules on cracked fruits

زادمایه/میوه ترک خورده Propagule/healthy fruit				تیمارها (آخرین آبیاری قبل از برداشت) The last irrigation before harvest
تجزیه مرکب سه سال Combine analyze of 3 years	Year 1394	Year 1393	Year 1392	
1378 D	1402 gh	1600 fg	1133 i	30 day
1489 D	1467 fgh	1667 ef	1333 h	25 day
1811 C	1867 e	2133 d	1430 gh	20 day
2817 B	3130 c	3467 b	1855 e	15 day
3111 A	3467 b	3798 a	2067 d	10 day
3222 A	3533 b	3933 a	2198 d	5 day
	2478 B	2766 A	1669 C	تجزیه مرکب تیمارها Combine analyze of treatments

میانگین‌های دارای حروف مشترک، طبق آزمون دانکن در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند.

Means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.01$)

آبیاری می‌تواند رطوبت مورد نیاز برای کلنیزاسیون بقایای گیاهی موجود در باغ‌های پسته را فراهم نموده و موجب افزایش جمعیت آسپرژیلوس در پسته‌های ریخته شده روی زمین و یا در تماس با زمین گردد. به نظر می‌رسد که افزایش جمعیت خاکی قارچ‌های *A. flavus* clade در تیمارهای با رطوبت بیشتر خاک (آخرین آبیاری ۵ و ۱۰ روز قبل از برداشت) تاثیر مستقیمی در افزایش تراکم اسپور این قارچ‌ها در فضای باغ‌های پسته و روی میوه‌های سالم و ترک‌خورده داشته باشد (Moradi et al. 2004). بررسی تغییرات جمعیت *A. flavus* و *A. niger* در باغ‌های پسته نشان داده که جمعیت این قارچ‌ها در بهار روبه افزایش گذاشته و در شهریورماه به حداکثر میزان خود می‌رسد که حداکثر تراکم جمعیتی این قارچ‌ها همزمان با بلوغ میوه و زودخندانی و ترک‌خوردگی پوست سبز می‌باشد (Moradi et al. 2010) که این موضوع با نتایج تحقیق حاضر در رابطه با بالاتر بودن جمعیت قارچ‌های شاخه *A. flavus* در میوه‌های ترک‌خورده و سالم در مقایسه با خاک مطابقت داشت. بررسی منابع مختلف نقش زودخندانی و ترک خوردگی پوست سبز میوه پسته در آلودگی به قارچ‌های آسپرژیلوس و تولید آفلاتوکسین را نیز نشان می‌دهد (Doster & Michailides 1994a,1995b; Moradi & Hokmabadi 2011; Panahi & Khezri 2011; Fani et a. 2014b; Moradi et al. 2014). زمان ظهور و میزان پسته‌های زودخندان و ترک‌خورده در سال‌ها و مناطق مختلف تفاوت زیادی با یکدیگر دارد (Doster & Michailides, 1995b) و علاوه بر آن رقم پسته، ترکیب پایه و پیوندک و سن درختان (Moradi et al. 2017) و حتی

برنامه و سیستم آبیاری (Doster et al., 1995a,b ؛Doster and Michailides, 2001 ؛Sedaghati et al. 2008) نیز در بروز زودخندانی و ترک‌خوردگی پوست سبز موثر هستند. علاوه بر این نشان داده شده که در ارقام تجاری مانند کله قوچی، اوحدی و احمدآقایی در فاصله ۱۵ روز قبل از برداشت محصول بیشترین درصد پسته‌های زودخندان مشاهده می‌شود (Moradi et al. 2017؛ Tajabadipour et al. 2011). میوه پسته به خصوص مغز آن که یک بستره غنی از مواد غذایی می‌باشد به راحتی در معرض اسپور قارچهایی مانند آسپرژیلوس به خصوص قارچهای *A. flavus* clade قرار می‌گیرد که در فضای باغ‌های پسته پراکنده‌اند. از آنجاییکه رطوبت مغز پسته در این شرایط بین ۳۰ تا ۴۰ درصد بوده و دما نیز برای رشد قارچهای *A. flavus* clade مناسب می‌باشد این قارچها به‌راحتی روی مغزهای پسته تکثیر نموده و میزان زیادی اسپور تولید می‌کنند (Doster and Michailides, 1995a,b). همچنین استفاده از کود دامی در دیماه ۱۳۹۲ اثر معنی‌داری بر افزایش جمعیت قارچهای *A. flavus* clade در خاک، میوه‌های ترک‌خورده و سالم در طی سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ گذاشت. در تیمارهایی که رطوبت خاک در آنها بیشتر بود (تیمارهای آخرین آبیاری ۱۰ و۵ روز قبل از برداشت) استفاده از کود دامی موجب افزایش ۵۰ درصدی یا حتی بیشتر جمعیت قارچهای *A. flavus* clade در خاک قطعه مورد آزمایش گردید. استفاده از کودهای دامی در باغ‌های پسته با هدف بهبود ساختمان خاک، افزایش مواد آلی و حاصلخیزی خاک لازم بوده (Hosseinifard et al 2017) اما با توجه به نقش آنها در افزایش جمعیت قارچی توصیه می‌گردد تا از استفاده سطحی از کودهای دامی در باغ‌های پسته خودداری شود. مطالعات انجام شده در باغ‌های پسته نشان داده که کودهای گاوی، گوسفندی و مرغی حاوی مقادیر فراوان و متنوعی از قارچهای آسپرژیلوس بوده و این کودها نقش مهمی در افزایش جمعیت قارچهای آسپرژیلوس به خصوص قارچهای *A. flavus* clade دارند (Moradi et al. 2004). علاوه بر کودهای حیوانی، بقایا و زوائد پسته نظیر میوه‌های پسته ریخته شده روی زمین، گل آذین‌های نر و زائده‌های حاصل از فراوری پسته نیز می‌توانند به وسیله قارچهای آسپرژیلوس کلنیزه شده و جمعیت این قارچها را در باغ‌های پسته افزایش دهند (Moradi et al. 2004؛ Doster & Michailides, 1994b). به نظر می‌رسد که نقش علف‌های هرز در افزایش جمعیت قارچهای آسپرژیلوس چندان مهم نباشد چراکه معمولاً کنترل علف‌های هرز در باغ‌های پسته با روش های شیمیایی و یا مکانیکی انجام می‌شود (Doster & Michailides 1944b) که در تحقیق حاضر نیز کنترل علف‌های هرز به روش مکانیکی در هر سه سال صورت گرفت.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در تیمارهایی که آخرین آبیاری در آنها ۳۰ و ۲۵ روز قبل از برداشت بوده و خاک سطحی کمترین رطوبت را داشته است، کمترین میزان جمعیت قارچهای *A. flavus* clade در خاک، میوه‌های سالم و ترک‌خورده وجود دارد بنابراین به منظور کاهش آلودگی میوه‌های پسته به این قارچها و آفلاتوکسین باید به گونه‌ای عمل نمود که آخرین آبیاری حداقل ۳۰ تا ۲۵ روز تا زمان برداشت محصول پسته فاصله داشته باشد. از سوی دیگر با توجه به نتایج تحقیق حاضر که نشان می‌دهد استفاده از کود دامی می تواند منجر به افزایش قابل ملاحظه جمعیت قارچهای *A. flavus* clade در خاک و میوه گردد، توصیه می‌شود تا این کودها در عمق مناسب خاک باغ‌ها (با در نظر گرفتن بافت خاک و پراکنش ریشه‌های ریز درخت) دفن

شده و پس از استفاده از این نوع کودها در تنظیم دورهای آبیاری و تعیین زمان مناسب برداشت محصول به گونه‌ای عمل شود که حداقل میزان ترک‌خوردگی و زودخندانی در میوه‌های پسته ایجاد گردد. به این ترتیب احتمال آلودگی میوه‌های پسته (سالم و ترک‌خورده) به قارچ‌های *A. flavus* clade کاهش می‌یابد.

سپا سگزاری: از پژوه شکده پ سته به خاطر حمایت مالی در اجرای این پژوهش که ق سمتی از پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۹۲۱۰۹-۰۶-۰۶-۴۷ می‌باشد، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

احمدی کریم، عبادزاده حمیدرضا، حاتمی فرشاد و همکاران (۱۴۰۰) آمارنامه کشاورزی، جلد سوم: محصولات کشاورزی. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. ۱۵۷ صفحه.

ا سماعیل‌پور علی، امامی سیدیحیی، ب صیرت مهدی و همکاران (۱۳۹۹) پ سته ایران. انت شارات آموزش و ترویج ک شاورزی. ۴۲۴ صفحه.

حسینی‌فرد سیدجواد، بصیرت مجید، صداقتی ناصر، اخیانی احمد (۱۳۹۶) دستورالعمل مدیریت تلفیقی حاصلخیزی خاک و تغذیه درختان پسته. انتشارات موسسه تحقیقات خاک و آب. ۱۰۰ صفحه.

رحیمی پریسا، شریف‌نبی بهرام، بهار مسعود (۱۳۸۶) گونه‌های آسپرژیلوس جداشده از میوه‌های پسته و بررسی تولید آفلاتوکسین در آنها. رستنیها، ۸ (۱)، ۳۰-۴۲.

صداقتی ناصر، محمدی محمدآبادی اکبر، حسینی‌فرد سیدجواد (۱۳۸۷) بررسی اثر رژیم‌های مختلف آبیاری بر روی زودخندانی پسته رقم اوحدی. پژوهش و سازندگی، ۸۷، ۱۴-۱۵۸.

علیزاده امین (۱۳۹۰) رابطه آب و خاک و گیاه. انتشارات آستان قدس رضوی. ۴۸۴ صفحه.

فانی سیدر ضا، مرادی محمد، زمانی زاده حمیدر ضا و همکاران (۱۳۹۲) پراکنش سویه‌های غیرتوک سین‌زای قارچ *Aspergillus flavus* در مناطق پسته‌کاری ایران. آفات و بیماری‌های گیاهی، ۸۱ (۲)، ۱۷۹-۱۹۰.

مرادی محمد، ارشـــاد جعفر، میرابوالفتحی منصـــوره، پناهی بهمن (۱۳۸۳) نقش بقایای گیاهی، خاک و کودهای حیوانی روی تراکم جمعیت قارچ‌های گروه *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* در باغ‌های پســته اســتان کرمان. بیماری‌های گیاهی، ۴۰، ۲۲۱-۲۳۴.

مرادی محمد، تاج‌آبادی پور علی، فانی سیدر ضا (۱۳۹۵) زمان ت شکیل و خ صو صیات فیزیکی پ سته‌های زودخندان به عنوان منابع آلودگی به آفلاتوکسین در سه رقم تجاری پسته در استان کرمان. علوم و فناوری پسته، ۲ (۴)، ۶۰-۷۵.

مرادی محمد، حکم آبادی حسین، فانی سیدرضا (۱۳۹۳) بررسی عوامل موثر بر رشد قارچی و تولید آفلاتوکسین در انبارهای پسته استان کرمان. علوم غذایی و تغذیه، ۱۲ (۲)، ۸۳-۹۲.

References

Abdallah MF, Audenaert K, Lust L et al. (2020) Risk characterization and quantification of mycotoxins and their producing fungi in sugarcane juice: A neglected problem in a widely-consumed traditional beverage. Food Control 108, 106811.

Ahmadi K, Ebadzadeh HR, Hatami F et al. (2021) Agricultural statistics (2020). Volume III: Horticultural products. Ministry of Agriculture-Jahad, Deputy of Planning and Economics, Information and Communication Technology Center, 157 p.

Alizadeh A (2011) The relationship between water, soil and plants. Astan Quds Razavi Publications. 484 pages (In Persian).

Arzanlou M, Samadi R, Frisvad JC et al. (2016) Two novel *Aspergillus* species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran. Mycol Progress 15, 1081–1092.

Atlas RM (2010). Handbook of Microbiological Media. CRC Press, Boca Raton.

Aydin S, Ulvi M (2019) Residue levels of pesticides in nuts and risk assessment for consumers. Qual Assur Saf Crops Foods 11, 539–548.

Babaee R, Karami-Osboo R, Mirabolfathy M (2022). Evaluation of the use of Ozone, UV-C and Citric acid in reducing aflatoxins in pistachio nut. J Food Compos Anal 106, 104276.

Bensassi F, Rhouma A, Ghrab M et al. (2010) Evaluation of cultivar susceptibility and storage periods towards aflatoxin B1 contamination on pistachio nuts.Mycotoxin Res 26, 199–203.

Cotty PJ, Jaime-Garcia R (2007) Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. Int J Food Microbiol 119(1), 109-115.

Davis ND, Iyer S K, Diener UL (1987) Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. Appl Environ Microbiol 53(7), 1593–1595.

Donner M, Atehnkeng J, Sikora RA, Bandyopadhyay R, Cotty, PJ (2009) Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. Soil Biol Biochem 41(1), 37-44.

Doster MA, Cotty PJ, Michailides TJ (2014). Evaluation of the atoxigenic *Aspergillus flavus* strain AF36 in pistachio orchards. Plant Dis 98(7), 948-956.

Doster MA, Michailides TJ (1994a) *Aspergillus* molds and aflatoxins in pistachio nuts in California. Phytopathology 84(6), 583-590.

Doster MA, Michailides TJ (1994b) Development of *Aspergillus* molds in litter from pistachio trees. Plant Dis 78(4), 393-397.

Doster MA, Michailides TJ (1995a) The development of early split pistachio nuts and their contamination by molds, aflatoxins and insects. Acta Hort 419, 359-364.

Doster MA, Michailides TJ (1995b) The relationship between date of hull splitting and decay of pistachio nuts by *Aspergillus* species. Plant Dis 79, 766-769.

Doster MA, Michailides TJ (1999) Relationship between shell discoloration of pistachio nuts and incidence of fungal decay and insect infestation. Plant Dis 83(3), 259-264.

Doster MA, Michailides TJ, Goldhamer DA, Morgan DP (2001) Insufficient spring irrigation increases abnormal splitting pistachio nuts.California Agric 55(3), 27-30.

Ehrlich KC, Kobbeman K, Montalbano BG, Cotty PJ, (2007) Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. Int J Food Microbiol 114, 153–159.

Esmailpour A, Emami Y, Basirat M et al. (2020). Pistachio of Iran. Agricultural Education and Extension Press, 424p.

Fani SR, Moradi M, Probst C et al. (2014a) A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio orchards of Iran. Eur J Plant Pathol 140(4), 631-642.

Fani SR, Moradi M, Tajabadipour A et al. (2014b) The Role of Early Splitting in Contamination of Pistachio Nuts by *Aspergillus* Species and Aflatoxin in Kerman Province. J Food Tech Nutr 11 (3), 97-105.

Fani SR, Moradi M, Zamanizadeh HR et al. (2014c) Distribution of Nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* throughout pistachio growing areas in Iran. Appl Entom Phytopath 81 (2), 179-190. (In Persian)

Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN et al. (2019) Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Stud Mycol 91(1), 37-59.

Frisvad JC, Samson RA (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Stud Mycol 49, 1–173.

Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA (2005) Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. Syst Appl Microbiol 28,442–453.

Georgiadou M, Dimou A, Yanniotis S (2012) Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. Food Control 26, 580–586.

Giorni P, Battilani P, Pietri A, Magan N (2008) Effect of aw and CO_2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. Int J Food Microbiol 122(1-2), 109-113.

Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol 61(4), 1323-1330.

Heidarian R, Javan-nikkhah M, Ormaz B, Peyambari M (2005) Study of fungal contamination of pistachio seeds in Kerman Province, Iran and some new fungi for Iranian pistachio mycoflora. IV International Symposium on Pistachio and Almond. P, 180.

Heshmati A, Zohrevand T, Khaneghah AM et al. (2017) Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. Food Chem Toxicol 106, 202-208.

Hosseinifard SJ, Basirat M, Sedaghati N, Akhyani A (2018) Guidlines for integerated soil fertility and plant nutrition management of pistachio trees. Soil Water Res Institute, 100 p.

Kabirian HR, Afshari H, Mohammadi Moghadam M, Hokmabadi H (2011) Evaluation pistachio contamination to *Aspergillus flavus* in Semnan Province. J Nuts 2, 1–6.

Khaneghah AM, Fakhri Y, Gahruie HH et al. (2019) Mycotoxins in cereal-based products during 24 years (1983–2017): A global systematic review. Trends Food Sci Technol 91, 95–105.

Khaneghah AM, Fakhri Y, Raeisi S et al. (2018) Prevalence and concentration of ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products: A systematic review and meta-analysis. Food Chem Toxicol 118, 830-848.

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

Klich MA (2007) *Aspergillus flavus*:the major producer of aflatoxin. Mol Plant Pathol 8,713-722.

Mehrnejad MR, Panahi B (2006) The influence of hull cracking on aflatoxin contamination and insect infestation in pistachio nuts. Appl Entom Phytopath 73(2), 39-42.

Michailides TJ, Doster M, Cotty PJ, et al. (2007) Aflatoxin control in pistachios: biocontrol using the atoxigenic strain AF36, survival of AF36, and EUP status. In Proceedings of the 2007 Annual Multicrop Aflatoxin/Fumonisin Elemination and Fugal Genomics Workshop. pp. 54-55.

Mohammadi AH, Banihashemi Z, Haghdel M (2009) Identification and prevalence of *Aspergillus* species in soils of Fars and Kerman Provinces of Iran and evaluation of their aflatoxin production. Rostaniha 10(1), 8-30.

Mohammadi Moghadam M, Rezaee S, Mohammadi AH et al. (2020) The Potential of Aflatoxin Production in the *Aspergillus* Section *Flavi* Isolates of Pistachio in Iran. J Fast Health 8(4), 254-263.

Moradi M, Ershad D, Mirabolfathi M, Panhi B (2004) The role of plant debris, soil and manure on population density of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* groups in pistachio orchards of Kerman province. Iran J Plant Path 40, 221-234. (In Persian)

Moradi M, Fani SR, Masoumi H (2014) Population Density of *Aspergillus* Species Belong to Section Flavi and Nigri on Pistachio Nut in Kerman Province. J Appl Res Plant Prot 3 (2), 79-91. (In Persian)

Moradi M, Hokmabadi H (2011) Control of Mycotoxin Bioactives in Nuts: Farm to Fork. pp: 253-273. *In*: Fruit and Cereal Bioactives Sources, Chemistry, and Applications. Ö. Tokusoglu (ed). CRC Press.

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. J Food Tech Nutr 12 (2), 83-92. (In Persian)

Moradi M, Hokmabadi H, Mirabolfathi M (2010) Density fluctuations of two major *Aspergillus* species airborne spores in pistachio growing regions of Iran. Int J Nuts Related Sci 1, 54-64.

Moradi M, Javanshah M (2006) Distribution of aflatoxin in processed pistachio nut terminals. Acta Hort 726, 431-436.

Moradi M, Tajababdipour A, Fani SR (2017) The time of occurrence and physical characteristics of pistachio early splitting as sources of contamination with aflatoxin in three commercial cultivars of pistachio in Kerman. Pista Sci Tech 2(4), 60-75. (In Persian)

Moss M (2004) Toxigenic fungi. pp. 479-488. *In*: Food-borne pathogens, hazards, risk analysis and control. C.W. Blackburn and P.J McClure (eds.), Boca Raton: Woodhead Publishing CRC Press.

Nabizadeh S, Shariatifar N, Shokoohi E et al. (2018) Prevalence and probabilistic health risk assessment of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Iranian edible oils. Environ Sci Pollut Res 25, 35562–35570.

Panahi B, Khezri M (2011) Effect of harvesting time on nut quality of pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. Sci Hortic 129, 730–734.

Pildain MB, Frisvad JC, Vaamonde G, Cabral D, Varga J, Samson RA (2008) Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. Int J Syst Evol Microbiol 58, 725–735.

Probst C, Bandyopahyay R, Proce LE, Cotty PJ (2011) Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. Plant Dis 95, 212-218.

Rahimi P, Sharifnabi B, Bahar M (2007) *Aspergillus* species isolated from pistachio and determination of their aflatoxin production. Rostaniha 8(1), 30-42. (In Persian)

Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z, Lima N (2009) A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. Int J Food Microbiol 129, 187–193.

Russell TE, Watson TF, Ryan GF (1976) Field accumulation of aflatoxin in cottonseed as influenced by irrigation termination dates and pink bollworm infestation. Appl Environ Microbiol 31(5), 711-713.

Samson RA, Frisvad JC (2004) *Penicillium* subgenus *Penicillium*:new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. Stud Mycol 49, 1–157

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

Sedaghati N, Mohammadi Mohammadabadi A, Hosseinifard SJ (2008) The effect of irrigation regimes on occurrence of early split of pistachio (*Pistacia vera* L.) CV. Ohadi. Pajouhesh & Sazandegi 78,149-158. (In Persian)

Shakerardekani A, Karim R, Mirdamadiha F (2012) The effect of sorting on aflatoxin reduction of storage in Turkey with particular reference to aflatoxin contamination. J Sci Food Agric 27(11), 1021-1026.

Taghizadeh SF, Rezaee R, Davarynejad G et al. (2018) Risk assessment of exposure to aflatoxin B1 and ochratoxin A through consumption of different Pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars collected from four geographical regions of Iran. Environ Toxicol Pharmacol 61, 61-66.

Tajabadipour A, Afshari H, Hokmabadi H (2011). Recognition and determination of contaminated pistachios to aflatoxin in processing. J Nuts 2 (2), 27-30.

Torre LA, Bray F, Siegel RL et al. (2015) Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer J Clinicians 65, 87-108.

Tsakiris IN, Tzatzarakis MN, Alegakis AK et al. (2013) Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. Food Chem Toxicol 56, 261-265.

Vaamonde G, Patriarca A, Fernandez pinto V et al. (2003) Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. Int J Food Microbiol 88(1), 79-84.

Varga J, Frisvad JC, Samson RA (2011) Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. Stud Mycol 69, 57-80.

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

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ et al. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res 18, 6531–6535.