شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس سیاه همراه انگور و کشمش در نواحی جنوبی استان‌های آذربایجان‌شرقی و غربی

علی خدایی*[۱]، مهدی ارزنلو[۲]، اسداله بابای اهری[۲] و فرشاد درویشی[۳]

[۱] دانشجوی دکترای بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[۲] به ترتیب دانشیار و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[۳] استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه
*مسئول مکاتبه: khd_l@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۲۸

چکیده

چندین گونه از جنس آسپرژیلوس از جمله *Aspergillus niger* و گونه‌های مرتبط با آن از عوامل قارچی دخیل در پوسیدگی خوشه انگور و آلوده کننده فرآورده‌های آن به‌شمار می‌روند. این قارچها ضمن کاستن از کیفیت و کمیت انگور و فرآورده‌های آن با صدمه به حبه‌ها و تخریب آن‌ها، باعث تولید و تجمع اکراتوکسین آ می‌گردند. این تحقیق در سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ برای شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس همراه انگور و کشمش در نواحی جنوبی استان‌های آذربایجان‌شرقی و غربی شامل شهرستان‌های آذرشهر، بناب، عجب‌شیر، مراغه، ملکان و میاندوآب انجام گرفت. جداسازی و خالص‌سازی گونه‌های قارچی با استفاده از روش‌های رایج در بیماری شناسی گیاهی انجام گرفت. از مجموع ۲۳۱ نمونه، تعداد ۱٦۷ جدایه از گونه‌های آسپرژیلوس جداسازی گردید. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی کلیه جدایه‌های آسپرژیلوس در گروه گونه‌ای *A. niger* قرار گرفتند. توالی‌یابی ژن بتاتوبولین برای جدایه‌های منتخب از هر ناحیه جغرافیایی انجام گردید. بر اساس توالی ژن بتاتوبولین ۹٤ درصد جدایه‌ها متعلق به گونه *A. tubingensis* بوده و ۱/۲ درصد جدایه‌ها به گونه *A. uvarum*، ۱/۲ درصد جدایه‌ها به گونه *A. welwitschiae* و ۳/٦ درصد جدایه‌ها به گونه *A. niger* تعلق داشتند. این اولین گزارش گونه *A. uvarum* از روی انگور در ایران و اولین گزارش گونه *A. welwitschiae* از روی انگور در دنیا می‌باشد. با شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس شایع در انگور و فرآورده‌های آن در این ناحیه، اقدامات بعدی در جهت ردیابی تولید و تجمع اکراتوکسین آ در محصولات انگور میسر خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: ایران، بتاتوبولین، ریخت‌شناختی، مایکوتوکسین، شناسایی‌مولکولی

مقدمه

انگور یکی از میوه‌های مهم و قدیمی دنیا است که اهلی کردن آن برای اولین بار در منطقه‌ای که امروزه در جنوب ترکیه واقع شده است، انجام گرفته است. ایران از جمله سرزمین‌های اولیه کشت انگور در جهان به‌شمار می‌آید. بیشتر گیاه‌شناسان معتقدند که مبدا کشت انگور در آسیای صغیر، در حد فاصل دریای سیاه و دریای خزر قرار دارد و از این منطقه به کلیه دنیا گسترش یافت است.

هم‌اکنون اراضی وسیعی از قاره‌های آسیا، اروپا، امریکا و حتی قسمت‌هایی از افریقا به کشت انگور اختصاص دارد (امیرقاسمی ۱۳۸۳). در منطقه شمال‌غربی ایران، شهرستان‌های مراغه، بناب، عجب‌شیر و ملکان از موقعیت مناسب آب و هوایی برای تولید انگور برخوردار هستند.

مطابق گزارش فائو (۲۰۱٤) سطح زیر کشت انگور در دنیا در سال ۲۰۱۲ حدود هفت میلیون هکتار بوده و ایران با دارا بودن سطح زیر کشت ۲۱۵ هزار هکتار، بعد از کشورهای اسپانیا، فرانسه، ایتالیا، چین، ترکیه، ایالات متحده امریکا و آرژانتین رتبه هشتم دنیا را به خود اختصاص داده است و از نظر میزان تولید، با تولید حدود ۲۱۵۰ هزار تن انگور (۱۰ تن در هکتار) در مقام نهم دنیا قرار دارد.

آسپرژیلوس‌های سیاه گندروهای حاضر در خاک در تمامی نقاط دنیا، بویژه در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری هستند (کلیچ و پیت ۱۹۸۸، پیت و هوکینگ ۱۹۹۷). چندین گونه از این گروه در تاکستان‌ها عمومیت دارند و اغلب با پوسیدگی خوشه انگور (آمرین و همکاران ۱۹۸۰) مرتبط می‌باشند.

آسپرژیلوس‌های سیاه شایع روی انگور، هم از نظر میکرومورفولژیکی و هم از نظر پروفیل اگزترولیت‌ها[۱] متفاوت هستند، ولی برای برخی از گونه‌ها مثل *Aspergillus niger* Tiegh.، *A. tubingensis* (Schöber) Mosseray، *A. foetidus* Thom & Raper و *A. brasiliensis* Varga, Kocsubé, Tóth, Frisvad, Perrone, Susca, Meijer, Samson شناسایی صحیح آن‌ها، نیازمند داده‌های مولکولی می‌باشد. شایع‌ترین گونه‌ها عبارت هستند از گونه‌های با سلول‌های کنیدی‌زای دو ردیفی *A. carbonarius (Bainier) Thom*، *A. niger* و *A. tubingensis* و نیز گونه‌های با سلول‌های کنیدی‌زای تک ردیفی *A. japonicas* Saito، *A. aculeatus* Iizuka و گونه *A. uvarum* Perrone که فقط روی انگورهای اروپایی مشاهده شده است (پرون و همکاران ۲۰۰٦).

گونه‌های مختلف آسپرژیلوس از جمله *A. niger*، *A. aculeatus* (جارویس و ترکوئیر ۱۹۸٤) و *A. carbonarius* (گوپتا ۱۹۵٦) از عوامل دخیل در پوسیدگی خوشه انگور می‌باشند که باعث تخریب حبه‌های انگور گردیده و موجب انتشار بوی نامطبوع از آن‌ها می‌گردند. بعد از تخریب کامل، توده سیاه / قهوه‌ای رنگی از اسپورها بر روی حبه‌ها ایجاد شده و فقط پوست آن ها باقی می‌ماند (اِمِت و همکاران ۱۹۹۲). این گروه عامل پوسیدگی ثانوی غذا و گیاهان مختلف و نیز عامل تجمع توکسین‌ها نیز می‌باشند. گونه‌های تولید کننده اکراتوکسین مانند *A.niger*، *A.ochraceus* K.Wilh. و *A.carbonarious* در اغلب محصولات کشاورزی یافت می‌شوند. آن‌ها می‌توانند محصولات کشاورزی را در مراحل پیش از برداشت، پس از برداشت، موقع فرآوری و حمل و نقل آلوده نمایند (کوزاکیویک ۱۹۸۹).

رحمانی و همکاران (۱۳۹۱) شیوع گونه‌های سکشن آسپرژیلوس در این جنس را روی انگور و کشمش در نواحی مختلف استان آذربایجان‌شرقی بررسی کردند، این محققان نشان دادند که از هشت جدایه بدست آمده، چهار جدایه متعلق به *Eurotium amestelodami* L. Mangin، سه جدایه متعلق به *A. chevalieri (L. Mangin) Thom & Church*. و یک جدایه متعلق به *E. rubrum (König et al.)* Thom & Church بودند. میرابوالفتحی و کرمی اسبو (۱۳۹۱) نواحی مختلف کشت انگور در استان آذربایجان‌شرقی از جمله شهرستان‌های مراغه، بناب و ملکان را مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که سطح آلودگی انواع کشمش‌ها به گونه‌های گروه *Nigri* از جمله *A. niger* و *A. carbonarius* بالا بوده است. صداقتی و

۱ - Extrolites

همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای برای شناسایی ریخت‌شناختی گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از انگور و کشمش در بازار رفسنجان با ضد عفونی سطحی و کشت روی PDA[۱] فقط گونه‌های *Aspergillus section Nigri* شامل *A. niger, A. tubingensis* و *A. citricus* را جداسازی نمودند. رحمانی و همکاران (۲۰۱۲) شیوع گونه‌های آسپرژیلوس را در استان آذربایجان‌غربی بررسی نموده و نشان دادند که بر پایه معیار ریخت‌شناختی، گروه گونه‌ای *A. niger*، *A. flavus Link*، *A. ochraseus*، *Erotium repens* de Bary و *A. carbonarius* از تاکستان‌های آذربایجان‌غربی جداسازی شدند. قزل‌سفلو و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه شناسایی بعضی از آسپرژیلوس‌های سیاه در روی کشمش‌های مختلف در استان خراسان رضوی، *A. tubingensis*، *A. foetidus*، *A. awamori*، *A. niger*، *A. carbonarius* و *A. aculeatus* را شناسایی کردند. آبرانوسا و همکاران (۲۰۰۱) در نمونه‌های انگور رشد یافته در کشور پرتغال قارچ آسپرژیلوس را پیدا نکردند. باتیلانی و همکاران (۲۰۰۶) گونه‌های مختلف آسپرژیلوس (اغلب گروه *Nigri*) را در انگورهای کشت شده در ایتالیا گزارش نمودند.

با توجه به اینکه فرآورده‌های انگور بویژه کشمش از نظر صادرات برای کشور و منطقه از اهمیت برخوردار می‌باشند و بحث آلودگی به توکسین‌های قارچی (بویژه اکراتوکسین آ) یک فاکتور مهم در صادرات این محصول می‌باشد، لذا شناسایی و معرفی آسپرژیلوس‌های سیاه روی این محصول در منطقه از ارزش بالایی برخوردار می‌باشد. در تحقیقات قبلی شناسایی گونه‌ها بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی انجام شده است و اتکا به داده‌های ریخت‌شناختی به تنهایی برای شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس و بویژه گونه‌های کمپلکس نایجر (*Aspergillus niger* complex) ممکن است منجر به نتیجه‌گیری‌های نادرست شود. لذا تحقیق حاضر با هدف شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس روی انگور و کشمش در نواحی جنوب آذربایجان با استفاده از داده‌های مولکولی و ریخت‌شناختی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از باغات انگور و کارخانه‌های فرآوری کشمش در شهرستان‌های مورد مطالعه در سه نوبت از شهریور ماه تا آبان ماه سال ۱۳۹۰ و از شهریور ماه تا مهر ماه ۱۳۹۱ در شهرستان‌های آذرشهر، بناب، عجب‌شیر، مراغه، ملکان و میاندوآب انجام گرفت.

جداسازی جدایه‌های قارچی با استفاده از روش اتاقک مرطوب اجرا شد. برای خالص سازی جدایه‌های قارچی از روش کشت نوک‌ریسه[۲] استفاده گردید.

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچ آسپرژیلوس با استفاده از روش کلیچ و پیت (۱۹۸۸) و کلیچ (۲۰۰۲) انجام گرفت. جدایه‌های قارچی در سه نقطه از تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های کشت زاپک عصاره مخمر آگار[۳]، زاپک عصاره مخمر آگار با ۲۰٪ ساکارز[۴]، عصاره مالت آگار (مرک، آلمان)[۵]، زاپک دوکس آگار[۶] تلقیح گردیده و تشتک‌های پتری حاوی عصاره مخمر آگار در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سایر تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در داخل کیسه‌های نایلونی سر بسته و در شرایط تاریکی به‌مدت یک هفته نگه‌داری شدند. خصوصیات ماکروسکوپی جدایه‌های قارچی شامل قطر کلنی، رنگ توده اسپور، رنگ میسلیوم، رنگ پشت

۱- Potato dextrose agar

۲ - Hyphal tip culture
۳ - Czapek yeast extract agar (CYA)
۴ - Czapek extract yeast agar with 20% Succrose (CYA20S)
۵ - Malt extract agar (MEA)
۶- Czapek dox agar (CZ)

کلنی، وجود و یا فقدان ترشحات، وجود و یا فقدان رنگ‌دانه‌های قابل حل در آب و وجود و یا فقدان اسکلروت یا کلیستوتیس در جدول توصیه شده توسط کلیچ (۲۰۰۲) ثبت گردیدند.

برای ارزیابی خصوصیات میکروسکوپی جدایه‌ها، از کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت عصاره مالت آگار استفاده گردید. اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از اسید لاکتیک تهیه شده و تصاویر ساختارهای میکروسکوپی با استفاده دوربین عکاسی دیجیتال المپیوس مدل DP-25 نصب شده روی میکروسکوپ نوری المپیوس مدل BX-41 تهیه گردید. خصوصیات میکروسکوپی جدایه‌ها در جدول توصیه شده توسط کلیچ (۲۰۰۲) یادداشت شدند.

استخراج DNA

برای استخراج DNA، کلیه جدایه‌ها بر روی محیط کشت عصاره مالت آگار به‌مدت هشت روز و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی رشد داده شدند و پس از رشد کافی جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج DNA از بافت قارچ، از روش مولر و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. پس از اتمام عملیات استخراج، کمیت و کیفیت DNA استحصالی به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تایید هویت گونه‌های شناسایی شده بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی، بخشی از ژن بتاتوبولین برای جدایه‌های نماینده هر گروه ریخت‌شناختی (معیار انتخاب جدایه‌های منتخب شامل شهرستان و باغ مورد مطالعه و گروه مورفولوژیکی بوده است)، با استفاده از دو آغازگر رفت و برگشت (5′AACATGCGTGAGATTGTAAGT3′) T1 (اُ دونل و سیگلینک ۱۹۹۷) و (5′ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC3′) Bt2b (گلاس و دونالدسون ۱۹۹۵) تکثیر و توالی یابی گردید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل یک میکرولیتر (۱۵-۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر) DNA الگو، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۰/۶ میکرولیتر مخلوط dNTPs به غلظت یک میلی‌مول، ۰/۳۷۵ میکرولیتر (۱/۵ میلی‌مول) کلرید منیزیم[۱]، ۰/۲ میکرولیتر (۰/۲ پیکومول) از هرکدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۰/۵ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید[۲] و نیم واحد آنزیم Taq Polymerase بود که حجم نهایی با آب مقطر دوبار استریل به ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش با استفاده از ترموسیکلر GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) انجام گرفته و چرخه‌های حرارتی اعمال شده شامل یک واکنش واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه، ۴۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دماهای ۵۶ درجه سانتی-گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و بالاخره یک چرخه بسط نهایی به‌مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. فرآورده‌های واکنش روی ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم بروماید در بافر TAE[۳] توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل تحت نور ماورای بنفش (طول‌موج ۳۱۲ نانومتر) بررسی شدند.

توالی‌یابی و تبارزایی

محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از کیت تجاری بیگ‌دای مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده و در موسسه قارچ‌شناسی فرهنگستان علوم کشور هلند (CBS) توالی‌یابی شد و داده‌های خام توالی با استفاده از نرم افزار SeqMan (Lasergene Package , DNA Star) مورد بررسی قرار گرفت. پس از ویرایش داده‌های توالی نوکلئوتیدی، توالی‌های برآیند در فرمت فایل فاستا[۴] ذخیره

۱ - $MgCl_2$
۲ - Dimethyl sulfoxide (DMSO)
۳ - Tris acetate-EDTA
۴- FASTA

شدند. زیر هم‌چینی داده‌های توالی ایجاد شده در این تحقیق با داده‌های توالی بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega V. 5 (تامورا و همکاران ۲۰۱۱) انجام و الگوی هم‌ترازی چند گانه تعیین گردید. درخت تبارزایی برمبنای استنتاج بیژین[۱] با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.1. (رانکوئیست و هولسنبک ۲۰۰۳) ترسیم و روابط خویشاوندی جدایه‌ها بررسی شد. جهت حصول اطمینان از گروه‌بندی ایجاد شده، در نهایت پس از تکمیل تجزیه و تحلیل‌های مربوطه، درخت برآیند[۲] ۵۰ درصد همراه با مقادیر مربوطه به توزیع احتمال پسین[۳] (PP) ترسیم گردید.

نتایج

در این بررسی مجموعا ۱۴۸ نمونه انگور و ۸۳ نمونه کشمش مورد مطالعه قرار گرفتند که جزییات مربوط به منشاء جغرافیایی این نمونه‌ها در جدول ۱ قید شده است. از مجموع ۲۳۱ نمونه انگور و کشمش بررسی شده، ۱۹۲ نمونه دارای آلودگی و ۳۹ نمونه بدون آلودگی بودند. از ۱۴۸ نمونه انگور، ۱۰۸ جدایه و از تعداد ۸۳ نمونه کشمش، ۵۹ جدایه قارچی، جداسازی گردید (جدول ۲). در ۴۰ نمونه از انگور و در ۲۴ نمونه از کشمش‌ها آلودگی به قارچ آسپرژیلوس وجود نداشت. با توجه به جداول مذکور میانگین آلودگی در نمونه‌های انگور ۷۶٪ و در نمونه‌های کشمش ۸۳٪ بوده است. لازم به ذکر است که نمونه‌های کشمش در شهرستان‌های آذرشهر، عجب‌شیر و میاندوآب بررسی نگردیدند. تغییر در میزان آلودگی نمونه‌ها می‌تواند ناشی از دو دلیل عمده باشد، در مورد انگور فاصله خوشه‌ها از سطح خاک باغات که منجر به عدم آلودگی آن‌ها می‌شود. در مورد کشمش هم می‌توان به تیمار یا عدم تیمار کشمش با تیزاب و دود ناشی از سوزاندن گوگرد اشاره کرد که می‌تواند در جلوگیری از آلودگی‌های قارچی مفید باشد (جدول ۳). مطابق جدول ۳ از مجموع ۳۴ نمونه کشمش آفتابی، تنها ۱۷ نمونه (۵۰٪) دارای آلودگی قارچی بود، در حالی‌که از ۴۹ نمونه کشمش تیزابی، تعداد ۴۶ نمونه (۹۴٪) آلوده به قارچ‌ها بود و این داده‌ها تاثیر روش فرآوری کشمش را در حذف و یا عدم حذف آلودگی قارچی نمونه‌های کشمش نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از مقایسه توالی ژن بتاتوبولین جدایه‌های منتخب (۴۰ جدایه) با توالی‌های موجود در بانک ژن، هویت جدایه‌های آسپرژیلوس جداسازی شده از انگور و کشمش را تحت عنوان *A. tubingensis*، *A. welwitschiae*، *A. niger* و *A. uvarum* تایید کرد (شکل ۱). بر این اساس از مجموع ۱۶۷ جدایه آسپرژیلوس، ۱۵۷ جدایه (۹۴٪) متعلق به گونه *A. tubingensis*، شش جدایه (۳/۶٪) متعلق به گونه *A. niger*، دو جدایه (۱/۲٪) متعلق به گونه *A. uvarum* و دو جدایه (۱/۲٪) متعلق به گونه *A. welwitschiae* بودند (شکل ۲).

مشخصات گونه‌ها

***Aspergillus niger* Tiegh.**

قطر کلنی بعد از هفت روز: در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در روی زاپک عصاره مخمر آگار، هر دو بیشتر از ۸۰ میلی‌متر؛ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روی عصاره مالت آگار و زاپک دوکس آگار، به‌ترتیب ۳۴-۳۱ و ۴۶-۴۲ میلی‌متر.

اسپورزایی شدید در روی CYA کشت بعد از هفت روز؛ رنگ توده‌های کنیدیومی سیاه متمایل به قهوه‌ای، رنگ پشت کلنی: روی CYA، خاکستری متمایل به شیری؛ روی MEA، خاکستری متمایل به زرد و روی CZ، خاکستری متمایل به شیری. متولا بلند و فیالید نسبتاً کوتاه؛ کنیدیفور دو ردیفی با دیواره صاف و به‌قطر ۲۰-۱۴ میکرومتر و با وزیکول‌های کروی متمایل به بیضوی به‌قطر ۶۸-۶۱ میکرومتر؛ کنیدی‌ها کروی و به‌قطر ۵-۴ میکرومتر، قهوه‌ای، کاملا خاردار (شکل ۳).

---

۱ - Bayesian
۲ - Consensus tree
۳- Posterior probabilities

جدول ۱- تعداد و درصد نمونه‌های انگور و کشمش آلوده و غیرآلوده به تفکیک شهرستان‌های مورد مطالعه

شهرستان	انگور				کشمش				جمع			
	دارای آلودگی		بدون آلودگی		دارای آلودگی		بدون آلودگی		دارای آلودگی		بدون آلودگی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
آذرشهر	۲٤	۸۰	٦	۲۰	۰	۰	۰	۰	۲٤	۸۰	٦	۲۰
بناب	۳۰	۱۰۰	۰	۰	۳۳	۷۳	۱۵	۲۷	٦۳	۸۱	۱۵	۱۹
عجب‌شیر	۲٤	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲٤	۱۰۰	۰	۰
مراغه	۱۵	۱۰۰	۰	۰	۱۹	۹۵	۱	۵	۳٤	۹۷	۱	۳
ملکان	۲۸	۱۰۰	۰	۰	۱۱	۷۳	٤	۲۷	۳۹	۹۱	٤	۹
میاندوآب	۸	۳۸	۱۳	٦۲	۰	۰	۰	۰	۸	۳۸	۱۳	٦۲
جمع	۱۲۹	۸۷	۱۹	۱۳	٦۳	۷٦	۲۰	۲٤	۱۹۲	۸۳	۳۹	۱۷

جدول ۲- تعداد جدایه‌های *Aspergillus* جداسازی شده از انگور و کشمش به تفکیک شهرستان‌های مورد مطالعه.

شهرستان	انگور	کشمش	جمع
آذرشهر*	۲٤	۰	۲٤
بناب	۲۵	۳۰	۵۵
عجب‌شیر*	۲۱	۰	۲۱
مراغه	۱۰	۱۸	۲۸
ملکان*	۲٤	۱۱	۳۵
میاندوآب	٤	۰	٤
تعداد کل ایزوله‌ها	۱۰۸	۵۹	۱٦۷

*- نمونه‌های کشمش این نواحی مورد بررسی قرار نگرفته است.

این گونه عموماً با کلنی‌های قهوه‌ای خیلی تیره تا سیاه مشخص، سرهای کنیدیومی دو ردیفی با وزیکول‌های بزرگ، متولای نسبتا بزرگ و کنیدی‌های خاردار نامنظم خود مشخص گردیده است. *A. ficuum* (Reich.) Thom & Church و *A. tubingenssis* توسط ال‌موسالام (۱۹۸۰) مترادف با *A. niger* قرار گرفته بودند. داده‌های مولکولی نشان می‌دهد که *A. tubingensis* تاکسون جداگانه‌ای است (سامسون ۱۹۹٤).

***Aspergillus tubingensis* (Schöber) Mosseray**

قطر کلنی بعد از هفت روز: در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در روی زاپک عصاره مخمر آگار، به‌ترتیب ۱۹-۱۵ و بیشتر از ۵۰ میلی‌متر؛ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روی عصاره مالت آگار، زاپک دوکس آگار و زاپک عصاره مخمر آگار با ۲۰٪ ساکارز، به‌ترتیب ۲۱-۱۷ ، ۱۵-۱۱ و ۲٦-۱٦ میلی‌متر.

اسپورزایی شدید روی تمامی محیط‌های کشت؛ رنگ کلنی روی تمامی محیط‌ها، سفید؛ رنگ پشت کلنی: روی زاپک عصاره مخمر آگار، سفید؛ روی عصاره مالت آگار، قهوه‌ای روشن و روی زاپک دوکس آگار، قهوه‌ای تا خاکستری.

کنیدیفور دو ردیفی با وزیکول‌های کروی، به‌قطر ۵۲-۳۷ میکرومتر؛ کنیدیفور با دیواره صاف و به‌قطر ۱۹-۱۳ میکرومتر؛ کنیدی‌ها کروی و به‌قطر ۳/٦-۲/۸ میکرومتر، قهوه‌ای، خاردار (شکل ٤).

با توجه به مشخصات ریخت‌شناختی دو گونه ذکر-شده در بالا، شناسایی این گونه از گونه *A. niger* ممکن

نبوده و لازم است تا از داده‌های مولکولی برای تائید هویت آن‌ها کمک گرفته شود.

***Aspergillus uvarum* Perrone**

قطر کلنی بعد از هفت روز: در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در روی زاپک عصاره مخمر آگار، به‌ترتیب ۳۴-۱۷ و ۲۰-۱۸ میلی‌متر؛ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روی عصاره مالت آگار، زاپک دوکس آگار و زاپک عصاره مخمر آگار با ۲۰٪ ساکارز، به‌ترتیب ۱۹-۱۵، ۱۶-۱۲ و ۴۷-۴۲ میلی‌متر.

اسپورزایی شدید روی تمامی محیط‌های کشت به‌جز زاپک عصاره مخمر آگار؛ رنگ کلنی روی تمامی محیط‌ها، سفید؛ رنگ پشت کلنی روی زاپک عصاره مخمر آگار، سفید تا قهوه ای؛ روی عصاره مالت آگار، کرمی و روی زاپگ دوکس آگار، سفید.

کنیدیفور یک ردیفی با وزیکول‌های کروی تا نیم‌کروی به‌قطر ۴۶-۳۹ میکرومتر؛ کنیدیفور با دیواره صاف و به‌قطر ۱۵-۱۰ میکرومتر؛ کنیدی‌ها کروی و به‌قطر ۴-۲/۵ میکرومتر، قهوه‌ای، صاف تا کمی خاردار (شکل ۵).

***Aspergillus welwitschiae* (Bres.) Henn.**

قطر کلنی بعد از هفت روز: در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد در روی زاپک عصاره مخمر آگار، به‌ترتیب ۲۰-۱۶ و ۱۴-۱۱ میلی‌متر؛ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روی عصاره مالت آگار، زاپک دوکس آگار و زاپک عصاره مخمر آگار با ۲۰٪ ساکارز، به ترتیب ۲۴-۲۰، ۳۰-۱۳ و ۱۸-۱۶ میلی‌متر.

اسپورزایی شدید روی تمامی محیط‌های کشت به‌جز زاپک عصاره مخمر آگار؛ رنگ کلنی روی تمامی محیط‌ها سفید؛ رنگ پشت کلنی؛ روی زاپک عصاره مخمر آگار، سفید؛ روی عصاره مالت آگار، قهوه‌ای روشن و روی زاپک دوکس آگار: سفید.

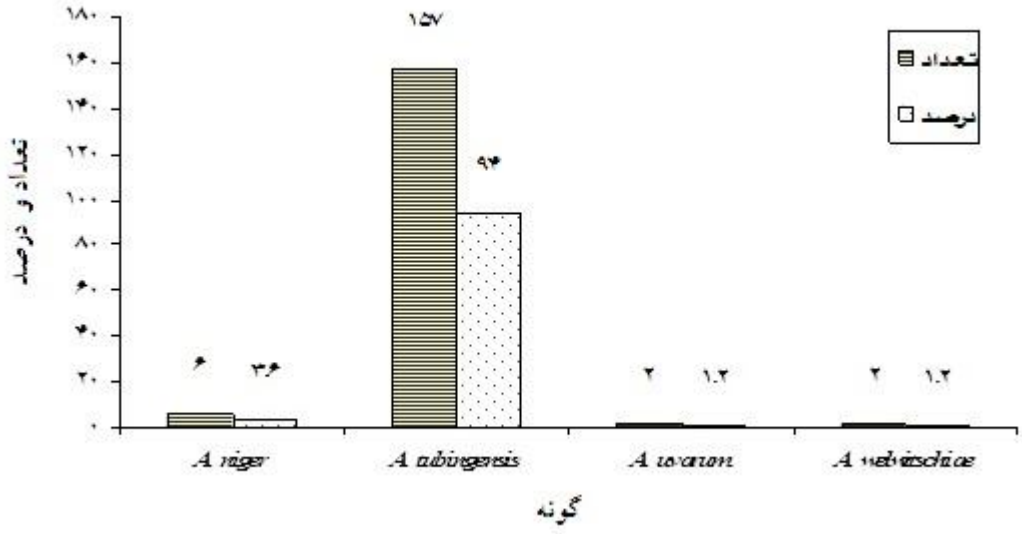
کنیدیفورها دو ردیفی با دیواره صاف تا کمی خاردار و به‌قطر ۱۵-۱۱ میکرومتر و با وزیکول‌های کروی تا بیضوی، به‌قطر ۳۸-۲۸ میکرومتر؛ کنیدی‌ها کروی و به‌قطر ۴/۳- ۳/۶ میکرومتر، قهوه‌ای، صاف تا کمی خاردار(شکل ۶).

جدول ۳- تاثیرنوع فرآوری انگور درمیزان آلودگی نمونه‌های کشمش به قارچ *Aspergillus* به تفکیک شهرستان‌های مورد مطالعه

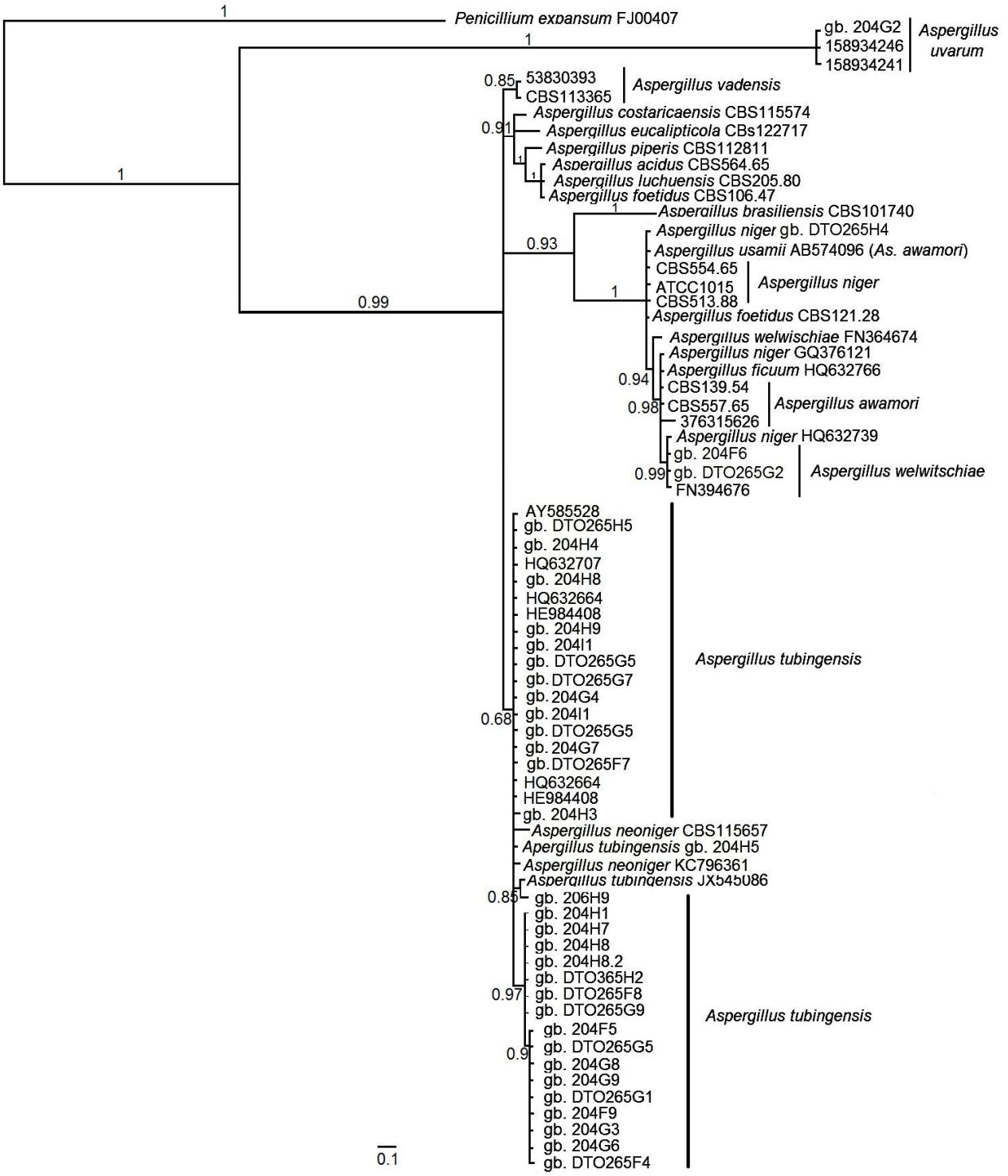
شهرستان	نوع کشمش	فرآوری	دارای آلودگی		بدون آلودگی	
			تعداد	درصد	تعداد	درصد
بناب	تیزابی	قبل	۱۹	۹۴	۱	۶
		بعد	۱۰	۹۱	۱	۹
	آفتابی	قبل	۵	۳۶	۹	۶۴
		بعد	۰	۰	۴	۱۰۰
مراغه	تیزابی	قبل	۰	۰	۰	۰
		بعد	۶	۸۶	۱	۱۴
	آفتابی	قبل	۶	۱۰۰	۰	۰
		بعد	۶	۱۰۰	۰	۰
ملکان	تیزابی	قبل	۹	۱۰۰	۰	۰
		بعد	۴	۱۰۰	۰	۰
	آفتابی	قبل	۰	۰	۲	۱۰۰
		بعد	۰	۰	۲	۱۰۰
جمع			۶۳	۷۶	۲۰	۲۴

بحث

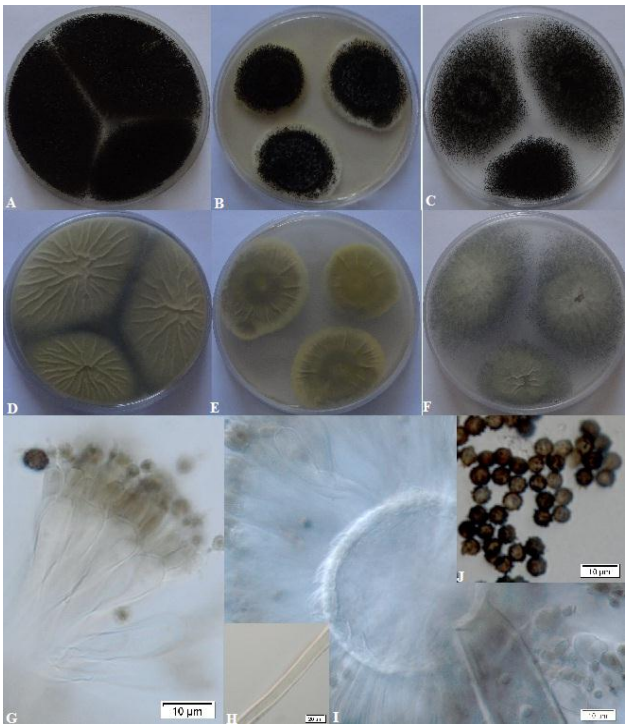
نتایج این بررسی نشان داد که آسپرژیلوس‌های سیاه در تاکستان‌های منطقه از شیوع قابل توجهی برخوردار هستند، به‌طوری‌که از مجموع ۲۳۱ نمونه انگور و کشمش، ۱۶۷ جدایه، جداسازی گردید. نتایج مشابه داده‌های این تحقیق در گزارش‌های سایر محققان که مطالعاتی را در مورد شیوع آسپرژیلوس در روی انگور، در این منطقه و یا بخشی از این منطقه انجام داده‌اند، بدست آمده است، به‌طوری‌که رحمانی و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه گونه‌های آسپرژیلوس روی انگور و کشمش در نقاط مختلف استان آذربایجان‌شرقی نشان دادند که گونه‌های *Aspergillus* section *Aspergillus* شیوع بیشتری دارند. میرابوالفتحی و کرمی اسبو (۱۳۹۱)، نواحی مختلف استان آذربایجان‌شرقی از جمله شهرستان‌های مراغه، بناب و ملکان را مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که آلودگی انواع کشمش‌ها به گونه‌های گروه *Nigri* بالا بود. صداقتی و همکاران (۲۰۱۲) بر پایه مطالعات ریخت‌شناختی نشان دادند که در حالت کلی *Aspergillus* section *Nigri*، عمومی‌ترین گونه‌های آسپرژیلوس در روی انگور و کشمش در بازار رفسنجان بودند. در مطالعه دیگری رحمانی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که بر پایه معیار ریخت‌شناختی آسپرژیلوس‌های سیاه رایج‌ترین گونه‌های قارچی در تاکستان‌های آذربایجان‌غربی بودند و نیز قزلسفلو و همکاران (۲۰۱۲) گونه‌های مختلف آسپرژیلوس‌های سیاه را در روی کشمش‌های مختلف استان خراسان رضوی جداسازی و شناسایی نمودند.



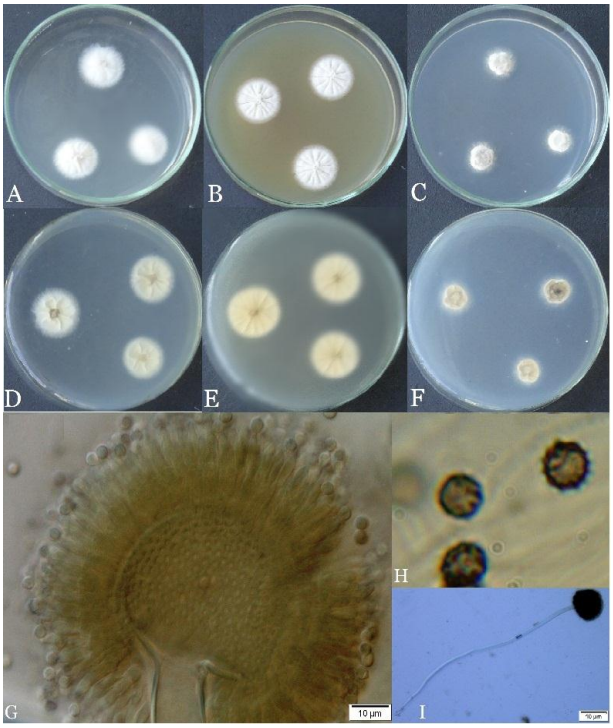
شکل ۲- تعداد و درصد گونه‌های *Aspergillus* همراه انگور و کشمش در منطقه جنوبی استان‌های آذربایجان‌شرقی و غربی.



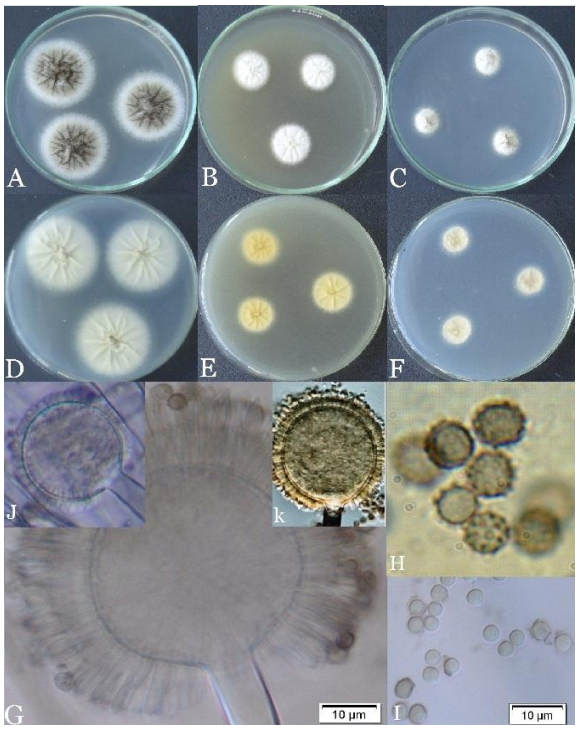
شکل ۱- درخت برآیند ۵۰ درصد همراه با مقادیر مربوطه به توزیع احتمال پسین براساس توالی ژن بتاتوبولین برای گونه‌های *Aspergillus* برمبنای استنتاج بیزین (جدایه‌های با پیشوند gb مربوط به این تحقیق می‌باشند)



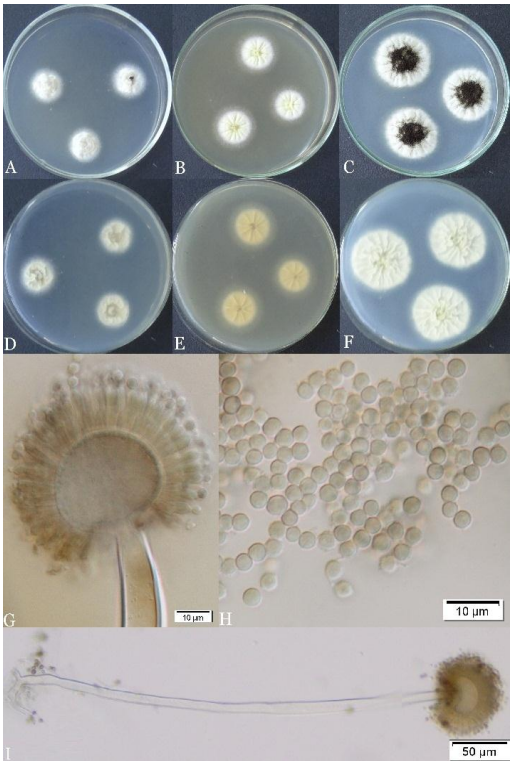
شکل ۳- کلنی‌های هفت روزه گونه *A. niger* در روی زاپک عصاره مخمر آگار (A، D)، عصاره مالت آگار (B، E)، زاپک دوکس آگار (C، F) و G-J- کنیدیفور و کنیدی‌ها



شکل ٤- کلنی‌های هفت روزه *A. tubingensis* در روی زاپک عصاره مخمر آگار (A، D)، عصاره مالت آگار (B، E)، زاپک دوکس آگار (C، F)، G-I کنیدی و کنیدیفور



شکل ۵- کلنی های هفت روزه ***A. uvarum*** در روی زاپک عصاره مخمر آگار (**A**، **D**)، عصاره مالت آگار (**E**، **B**)، زاپک دوکس آگار (**F**، **C**)، **G-K** کنیدی و کنیدیفور



شکل ٦- کلنی های هفت روزه ***A. welwitschiae*** در روی زاپک عصاره مخمر آگار (**A**، **D**)، عصاره مالت آگار (**E**، **B**)، زاپک دوکس آگار (**F**، **C**) ، **G-I** کنیدی و کنیدیفور

مطابق یافته‌های این تحقیق با وجود شیوع بالای آسپرژیلوس‌های سیاه در روی انگور و کشمش، تنوع گونه‌ای قابل توجهی در منطقه مشاهده نگردید به‌طوری‌که از بین گونه‌های آسپرژیلوس شناسایی شده در این تحقیق، بیشترین فراوانی (۹۴٪) به گونه *A. tubingensis* تعلق داشت و سه گونه دیگر جداسازی شده در این تحقیق، *A. niger*، *A. uvarum* و *A. welwitschiae* به‌ترتیب با ۳/۶، ۱/۲ و ۱/۲٪ فراوانی از فراوانی کمی برخوردار بودند. با این وجود، در مطالعه رحمانی و همکاران (۱۳۹۱) که از نظر مکان جغرافیایی با بخشی از نواحی مطالعه حاضر مطابقت دارد، سه گونه *Eurotium amestelodami*، *A. chevalieri* و *E. rubrum* از این منطقه گزارش گردیده است. هم‌چنین میرابوالفتحی و کرمی اسبو (۱۳۹۱) نشان دادند که گونه *A. niger* و *A.carbonarius* بر روی انواع کشمش‌ها در این منطقه حضور داشته ولی در یافته‌های ما درصد فراوانی گونه *A. niger* پایین بوده و جدایه‌ای از گونه *A. carbonarius* مشاهده نگردید. صداقتی و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه خود نشان دادند که گونه‌های آسپرژیلوس‌های سیاه شامل *A. tubingensis*، *A. niger* و *A. citricus* بر روی انگور و کشمش رفسنجان حضور داشتند ولی در این تحقیق گونه *A. citricus* مشاهده نگردید. رحمانی و همکاران (۲۰۱۲) نیز بر پایه معیار ریخت‌شناختی، گروه گونه‌ای *A. niger* و *A. flavus*، *A. ochraceus*، *E. repens* و *A. carbonarius* را از تاکستان‌های آذربایجان‌غربی جداسازی کردند ولی در تحقیق حاضر که از نظر جغرافیایی با بخش کوچکی از منطقه مورد مطالعه آن‌ها مطابقت دارد، به‌جز گونه *A. niger*، بقیه گونه‌ها جداسازی نگردیدند. نتایج بررسی حاضر نشان داد که از ۵۹ جدایه آسپرژیلوس جداسازی شده از کشمش، ۵۳ جدایه (۹۰٪) متعلق به گونه *A. tubingensis* و شش جدایه (۱۰٪) متعلق به گونه *A. niger* بود. با این وجود تنوع قابل توجهی از آسپرژیلوس‌های سیاه از روی کشمش‌های جمع آوری شده از نواحی مختلف استان خراسان شمالی توسط قزل‌سفلو و همکاران (۲۰۱۲) گزارش گردیده است، به طوری‌که آن‌ها گونه‌های *A. niger*، *A. awamori*، *A. carbonarius*، *A. foetidus*، *A. tubingensis* و *A. aculeatus* را از روی کشمش‌های مختلف استان خراسان رضوی شناسایی کردند.

نکته‌ای که ذکر آن ضروری به‌نظر می‌رسد این است که یافته‌های این تحقیق از تایید داده‌های مولکولی نیز برخوردار بوده ولی اغلب مطالعاتی که روی شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس همراه با انگور و کشمش در ایران صورت گرفته است، بر اساس اطلاعات ریخت‌شناختی بوده است. در مورد گونه‌های این جنس بویژه گونه‌های متعلق به گروه *Nigri* شناسایی گونه‌ها تنها بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی، ممکن است منجر به نتیجه گیری‌های نادرست شود. تا سال ۲۰۱۱ حدود ۱۵ گونه در این بخش شناسایی شده است که تفکیک این گونه‌ها بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی از هم‌دیگر ممکن نیست. به‌عنوان مثال گونه *A. neoniger* از این بخش از نظر ریخت‌شناختی شبیه *A. niger* و *A. tubingensis* بوده و یا *A. eucalypticola* با *A. tubingensis* و *A. costaricaensis* تفاوت ریخت‌شناختی ندارد (وارگا و همکاران ۲۰۱۱). بنابراین با توجه به شباهت‌های ریخت‌شناختی بالا بین گونه‌های این گروه، به‌نظر می‌رسد که برای شناسایی دقیق آن‌ها، در کنار مطالعات ریخت‌شناختی، استفاده از داده‌های توالی، پروفیل متابولیت‌های ثانویه و مارکرهای مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (به عنوان

مثال مالتی‌پلکس پی‌سی‌آر[1]) نیز ضروری باشد (فرایزود و همکاران ۲۰۰۷، گایزر و همکاران ۲۰۰۷).

بحث دیگری که در مورد آسپرژیلوس‌های سیاه مطرح می‌باشد، توکسین‌زایی آن‌ها می‌باشد و این امر بر صادرات این محصول استراتژیک مخصوصاً در منطقه مورد مطالعه تاثیر دارد، زیرا بر اساس گزارش‌های غیرمکتوب ردیابی توکسین در کشمش‌های صادراتی این منطقه، مشکلاتی را برای این محصول در بازارهای جهانی بوجود آورده است و لازم است توکسین‌زایی گونه‌های جدا شده از این محصول بررسی گردد تا مشکلات مربوط به صدور شناسنامه سلامت برای این محصول مرتفع گردد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر تامین بودجه لازم برای انجام این پژوهش، از آقای دکتر یوس هوبراکن (از موسسه قارچ‌شناسی فرهنگستان علوم کشور هلند)، از خانم مهندس مونس بخشی (دانشجوی دوره دکتری قارچ‌شناسی دانشگاه تبریز)، از آقای هاتف (کارشناس محترم آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی دانشگاه تبریز) و آقایان سیفی و خلیل‌پور (کارشناسان آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه مراغه) و آقای ابوالفضل نرمانی (دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه تبریز)، به خاطر همکاری‌های صمیمانه‌شان، ابراز می‌نمایند.

[1]- Multiplex PCR

منابع

امیرقاسمی ت، ۱۳۸۳. انگور (کاشت، داشت، برداشت، فراوری). موسسه فرهنگی نشر آیندگان.

رحمانی ر، صداقتی الف، خدایگان پ. و مرادی م، ۱۳۹۱. شناسایی گونه‌های *Aspergillus* section *Aspergillus* جدا شده از نواحی مختلف کشت انگور در استان آذربایجان‌شرقی. جلد دوم. صفحه ٤٦١. خلاصه مقاله‌های بیستمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، شیراز.

میرابوالفتحی م و کرمی اسبو ر الف، ۱۳۹۱. بررسی اکراتوکسین آ و قارچ‌های مولد آن در کشمش ایران. جلد دوم. صفحه ۲۳۱. خلاصه مقاله‌های بیستمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، شیراز.

Abrunhosa L, Paterson RRM, Kozakiewicz Z, Lima N and VenaÃncio A, 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. Letters in Applied Microbiology 32: 240-242.

Al-Musallam A, 1980. Revision of the black *Aspergillus* species. PhD thesis, Plant Pathology, Utrecht University. The Netherlands.

Amerine MA, Berg HW, Kunkee RE, Ough CS, Singleton VL and Webb AD, 1980. The Technology of Wine Making. The AVI Publishing Company Inc.

Battilani P, Giorni P, Bertuzzi T, Formenti S and Pietri A, 2006. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. International Journal of Food Microbiology 111: S53-S60.

Emeet RW, Harris AR, Taylor RH and McGechan JK, 1992. Grape diseases and vineyard protection. Pp. 232-278 in: Coomb BC & Dry PR (eds.) Viticulture, Volume 2. Practices. Winetitles, Adelitde, Australia.

Anonymous (FAO), 2014. Statistical databases. http://faostat3.fao.org.

Frisvad JC, Larsen TO, Vries R de, Meijer M, Houbraken J, Cabañes FJ, Ehrlich K and Samson RA, 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. Studies in Mycology 59: 31-37.

Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J and Samson RA, 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Studies in Mycology 59: 1-10.

Ghezel Sefloo N, Pirnia M and Karimi-Shahri M, 2012. Identification of some black *Aspergillus* from various raisins in Khorasan-E-Razavi province. Acta Hort. (ISHS) 963: 189-197.

Glass NL and Donaldson GC, 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied Environmental Microbiology 61(4):1323-1330.

Gupta SL, 1956. Occurrence of *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom causing grape rots in India. Science and Culture 22, 167-168.

Jarvis WR and Traquair JA, 1984. Bunch rot of grapes caused by *Aspergillus aculeatus*. Plant Diseases 68: 718-719.

Klich MA and Pitt JI, 1988. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. Common Wealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Food Processing.

Klich MA, 2002. Identification of common *Aspergillus* species. CBS, Utrecht, The Nethtelands.

Kozakiewicz Z, 1989. *Aspergillus* species on stored products. Mycological Papers 161: 1-188.

Moller EM, Bahnweg G, Sandermann H and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. Nucleic Acids Research 20 (22): 6115-6116.

O'Donnell K and Cigelnik E, 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution 7:103-116.

Perrone G, Mulè G, Susca A, Battilani P, Pietri A and Logrieco A, 2006. Ochratoxin A production and AFLP analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. Applied and Environmental Microbiology 72: 680-685.

Pitt JI and Hocking AD, 1997. Fungi and Food Spoilage. 2nd ed. Blackie Academic and Professional.

Rahmani R, Sedaghati E, Khodaygan P, Saberi R, and Moradi M, 2012. Prevalence of *Aspergillus* species in vineyards in West Azarbayjan Province. Acta Hort. (ISHS) 963: 87-89.

Ronquist F and Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.

Samson RA, 1994. Taxonomy-current concepts of *Aspergillus* systematics. Pp 1-22 In: Smith JE (ed.) Biotechnology Handbooks, Volume 7. Plenum Press, USA.

Sedaghati E, Rahmani R, Khodaygan P and Nadi M, 2012. Morphological Identification of *Aspergillus* species isolated from Fresh Grape and Raisin in Rafsanjan Markets. Acta Hort. (ISHS) 963: 51-53.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S. 2011. MEGA v5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G and Samson RA, 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. Studies in Mycology 69: 1-17.

Identification of black Aspergilli species on grape and raisin in Southern regions of East and West Azerbaijan Provinces

A Khodaei[*1], M Arzanlou[2], A Babai-Ahari[2] and F Darvishi[3]

[1] PhD Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.
[2] Associate Professor and Professor, respectively, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh.
* Corresponding author: **khd_l@yahoo.com**

Received: 08 Dec 2013 Accepted: 18 Jun 2014

Abstract

Several species of the genus *Aspergillus* including *Aspergillus niger* and its segregates are involved in bunch rots of grapevine as well as contamination of grapevine products worldwide. These fungal agents reduce both yield and quality of grape and its products by damaging and destroying the berries and the production and accumulation of ochratoxin A. This study was carried out in 2011 and 2012 in order to characterize black aspergilli species on grape and raisin in southern regions of East and West Azerbaijan provinces including Azarshar, Bonab, Ajabshir, Maragheh, Malekan and Miyandoab counties. The isolation and purification of fungal isolates was performed with commonly used methods in plant pathology. A total number of 167 *Aspergillus* isolates were recovered from 231 grape and raisin samples. Based on morphological characteristics, all of the isolates were identified as members of *A. niger* species complex. Sequence data for the *β- tubulin* gene were generated for the representative isolates for each geographical region. Based on the sequence data from *β- tubulin* gene, the identity of the isolates was determined as *A. tubingensis* (94%), *A. niger* (3.6%), *A. welwitschiae* (1.2%) and *A. uvarum* (1.2%). This study provides the first report on the occurrence of *A. uvarum* on grape from Iran and first report on the occurrence *A. welwitschiae* on grape in the world. With the identification of *Aspergilllus* spp. occurring of grapevines and its products in this region, it will be possible to further actions in monitoring the production and accumulation of ochratoxin A in grape vines products.

Keywords: *β-tubulin*, Iran, Molecular identification, Morphology, Mycotoxin