نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 11، شماره 1، بهار 1394، ص. 21-13

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 1, Spring 2015, p. 13-21

جداسازی و شناسایی فلور قارچی کشمش‌های عمده خراسان رضوی بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیکی و مولکولی

محبوبه سرابی جماب[1]- فخری شهیدی[2*]- احمدرضا بهرامی[3]- سید علی مرتضوی[4]- محمدرضا نصیری[5]- معصومه مهربان سنگ‌آتش[6]- مرضیه حسینی نژاد[7]

تاریخ دریافت:1391/3/8
تاریخ پذیرش:1391/7/30

چکیده

کشمش میوه خشک‌شده انگور است که به صورت خام یا به عنوان یکی از اجزای تشکیل‌دهنده مواد غذایی در محصولاتی نظیر فراورده‌های پخت استفاده می‌شود. ایران یکی از صادر کنندگان اصلی کشمش در سال‌های اخیر محسوب می‌شود و کشمش ایران به کشورهای مختلفی صادر می‌گردد؛ ازاین رو اطمینان از کیفیت میکروبی و ایمنی این محصول از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف از تحقیق حاضر بررسی فلور قارچی ارقام عمده کشمش در خراسان رضوی (پلویی، پیکامی و تیفی) است. به منظور جداسازی و شمارش فلور قارچی از چهار محیط کشت YGC، PDA، CA و DG18 استفاده گردید. نتایج آماری نشان داد که آلودگی قارچی نمونه‌های کشمش تیفی بیش از دیگر نمونه‌ها بود. همچنین روش خشک کردن تأثیر معنی‌داری در میزان آلودگی قارچی نداشت. پس از خالص‌سازی ایزوله‌های جدا شده، شناسایی اولیه جدایه‌های حاصل به روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده جنس‌های آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم به ترتیب فراوان‌ترین قارچ‌های جدا شده از نمونه‌های کشمش بودند. به منظور شناسایی جدایه‌ها در حد گونه، قطعه 600 bp از ناحیه Internal transcribed spacer 5.8SrRNA کپک‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شده و پس از تعیین توالی در بانک اطلاعاتی NCBI مورد مقایسه و شناسایی قرار گرفت. براساس نتایج بدست‌آمده نمونه‌های کشمش حاوی گونه‌های مختلفی از جنس‌های آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم، رایزوموکور، موکور، آلترناریا و کلادوسپوریوم بود که در این میان *آسپرژیلوس نیجر* نیز بیشترین درصد فراوانی را به خود اختصاص داد.

واژه‌های کلیدی: کشمش، خراسان رضوی، فلور قارچی، جداسازی و شناسایی، ویژگی‌های مورفولوژیکی و مولکولی

مقدمه

کشمش با نام علمی *ویتیس وینیفرا*[8]، از خانواده ویتاسه[9] می‌باشد. کشمش یا انگور خشک‌شده از انواع خشکبار است و مصرف آن به صورت خام یا به عنوان یکی از اجزای تشکیل‌دهنده مواد غذایی برای افزایش شیرینی و بهبود طعم به‌کار می‌رود. کشمش یکی از مغذی‌ترین میوه‌های خشک می‌باشد. فاقد چربی و کلسترول بوده و میزان سدیم آن در سطح پایینی است. کشمش مقدار زیادی از ویتامین‌ها و مواد معدنی مورد نیاز بدن شامل ویتامین‌های گروه B، آهن، پتاسیم وکلسیم را فراهم می‌کند؛ همچنین منبع خوبی از فیبر و سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها است (Amirghasemi, 2002; Maghsoudi, 2008; Tafazoli, *et al.*, 1991).

تولید کشمش در سراسر ایران از گونه‌های مختلف انگور با روش‌های گوناگون صورت می‌پذیرد. سابقه صادرات کشمش به یک قرن می‌رسد. ایران سومین صادر کننده کشمش در جهان می‌باشد و میزان صادرات آن 113632 تن گزارش شده است. استان خراسان با سطح زیر کشت 21200 هکتار انگور آبی و 6360 هکتار انگور دیم از

1- دانش‌آموخته دکتری دانشگاه فردوسی مشهد و استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
2و4- استادان گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
3- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
5- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
6- استادیار گروه کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی مشهد
7- استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
(*- نویسنده مسئول: Email: niloofar1373@yahoo.com)

8- *Vitis vinifera*
9- Vitaceae

استان‌های مهم تولید کشمش در ایران است. کشمش با توجه به امکان آلودگی به انواع قارچها در مرحله قبل از برداشت، برداشت و فرآوری پس از آن و شرایط مساعد برای رشد قارچها از جمله محصولاتی می‌باشد که مستعد تولید توکسین‌های قارچی نظیر آفلاتوکسین و اکراتوکسین است (Amirghasemi, 2002; Maghsoudi, 2008).

آفلاتوکسین و اکراتوکسین از سموم خطرناک قارچی هستند که توسط گروهی از کپک‌ها نظیر گونه‌های جنس آسپرژیلوس تولید می‌شوند و قادرند سبب آلودگی مواد غذایی از جمله کشمش گردند. در انگور و فراورده‌های آن گونه *آسپرژیلوس کربوناریوس*[1] عامل اصلی تولید سم اکراتوکسین و گونه *آسپرژیلوس فلاووس*[2] عامل اصلی تولید آفلاتوکسین می‌باشند. به طور کلی این سموم دارای اثرات سمی بر سیستم عصبی، سیستم ایمنی، ایجاد جهش ژنتیکی، نقص در جنین و سرطان‌زایی می‌باشند (Selma *et al*., 2008; Niessen, 2007). با توجه به مطالب فوق بررسی فلور کپکی کشمش به منظور شناسایی قارچهای مولد توکسین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

هدف از تحقیق حاضر، مقایسه چهار محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار[3]، ییست اکسترکت گلوکز کلرامفنیکل آگار[4]، چاپکس داکس آگار[5] و دی‌کلران گلیسرول آگار[6] در جداسازی و شمارش انواع قارچ های موجود در سه رقم عمده کشمش تولیدی در استان خراسان رضوی (پلویی، پیکامی و تیفی) و شناسایی جدایه‌های مذکور به روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیکی می‌باشد. همچنین از آنجا که شناسایی کپک‌ها در حد گونه بر اساس ویژگی‌های فنوتیپیک مشکل است، مقایسه سکانس‌های ژن Internal transcribed spacer 5.8SrRNA جهت مقایسه فیلوژنتیکی انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌برداری از سه نوع کشمش پلویی، پیکامی و تیفی از شهرهای عمده تولید کننده کشمش در استان خراسان رضوی (شهرهای قوچان، کاشمر، بردسکن، خلیل آباد و مشهد) انجام گردید. کشمش‌ها به سه روش آفتابی، تیزابی و گوگردی خشک شده بودند. از هر نوع کشمش پنج نمونه انتخاب شد. نمونه‌های خریداری شده پس از بسته‌بندی در شرایط استریل تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری شدند.

بررسی رشد کپک‌ها در محیط کشت

پس از تهیه محیط PDA، YGC، CAو DG18 و تهیه رقت‌های لازم (10^{-1} تا 10^{-3})یک میلی لیتر از نمونه مورد آزمون توسط سمپلر استریل درون پلیت استریل ریخته شد. سپس 15 میلی لیتر از محیط کشت مذکور با دمای 45 درجه سانتی‌گراد به آن اضافه شد. محیط کشت و نمونه به خوبی مخلوط شده و تا جامد شدن روی سطح صاف و خنک قرار گرفت. پس از جامد شدن محیط، پلیت‌ها به طور وارونه به مدت 7 روز در دمای 25 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. در روزهای 3، 5 و پایان دوره گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها با استفاده از دستگاه پرگنه شمار شمارش شدند (Iranian National Standard Organization, 1995).

خالص سازی قارچها

به منظور خالص‌سازی ایزوله‌های قارچی از روش سینگل اسپور[7] استفاده گردید. بدین صورت که توسط آنس سوزنی ظریف میزان کمی از اسپور قارچی به لوله محتوی آب مقطر استریل منتقل شد و سپس توسط لام توما رقت آن محاسبه گردید. پس از تهیه رقتی مناسب، قطره ای از سوسپانسیون حاصل به محیط کشت واتر آگار[8] انتقال یافت. پس از گذشت 12 الی 24 ساعت، از کلنی رشد یافته بر روی محیط واترآگار، به محیط کشت PDA که قبلا در پلیت استریل ریخته و سرد شده بوده در 3 نقطه انتقال داده شد و به مدت 5 تا 7 روز در دمای $^{\circ}C$ 25 گرمخانه‌گذاری گردید (Choi *et al*., 1999)

مشاهده ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها

با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیکی کلنی‌های قارچی خالص‌سازی شده، ابتدا تشخیص اولیه احتمالی بر روی آن‌ها صورت گرفت. سپس با استفاده از روش میکروسکوپی جزئیات ریزبینی آن‌ها تحت مطالعه قرار گرفت. بدین صورت که ابتدا به روش اسلاید کالچر[9] با استفاده از محلول لاکتو فنل کاتن بلو از میسلیوم قارچهای ایزوله‌شده لام تهیه گردید و سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری مشخصات آن‌ها ثبت گردید و با توجه به اختصاصات مورفولوژیکی ریزبینی به‌ویژه دستگاه زایشی، مورد شناسایی قرار گرفت (Harris, 1986).

استخراج DNA

برای استخراج DNA از کپک‌های ایزوله شده، به کمک بیستوری استریل قطعه‌ای از ایزوله خالص‌شده از محیط کشت PDA جدا گردید و به ارلن حاوی محیط کشت PDB انتقال یافت. ارلن‌ها

1- *Aspergillus carbonarius*
2- *Aspergillus flavus*
3- Potato Dextrose Agar (PDA)
4- Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC Agar)
5- Czapek Dox Agar (CA)
6- Dichloran Glycerol Agar (DG18)
7- Single Spore
8- Water Agar
9- Slide Culture

به انکوباتور شیکردار منتقل گردیده و به مدت 7 روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مدت عمل همزدن با سرعت 100 دور در دقیقه انجام شد تا از تولید اسپور توسط جدایه‌ها جلوگیری شده و تنها میسلیوم آن‌ها تکثیر گردد. در پایان هفتمین روز، میسلیوم کپک‌ها با کمک کاغذ صافی در شرایط کاملاً استریل جدا شده و به پلیت استریل انتقال یافت. پس از نگهداری آن‌ها به مدت یک‌شبانه‌روز در دمای 18- درجه سانتی‌گراد، توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردید.

در مرحله بعد، با کمک نیتروژن مایع نمونه خشک شده خرد و پودر یکنواختی از آن تهیه شد. سپس به میسلیوم قارچی پودر شده در ازت مایع، بافر لیز کننده (Tris100Mm، EDTA0/05 M ، W/V SDS1% ، NaCl 0/9 M و Na2So30/1 M) و پروتئیناز k افزوده شد. به منظور ایجاد شوک حرارتی نمونه به مدت یک ساعت در دمای 65 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مدت هر 10 دقیقه یکبار نمونه‌ها ورتکس شد تا لیز شدن دیواره سلولی به خوبی انجام شود. سوسپانسیون حاصل به مدت 5 دقیقه با دور g 2000 سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل به میکروتیوب جدید منتقل گردید و با کلروفرم/ایزوآمیل‌الکل (به نسبت 24 به 1) استخراج گردید. پس ازآن محلول به مدت 30 دقیقه در یخ قرار گرفت و به دنبال آن به مدت 15 دقیقه با g 2000 سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل به میکروتیوب جدید منتقل و DNA با حجم مساوی از ایزوپروپانول رسوب داده شد. به منظور رسوب بهتر و ظهور کلاف DNA، به مدت 24 ساعت در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. رسوب حاصل به مدت 5 دقیقه با g 2000 سانتریفوژ گردید. پس از آن شستشو با الکل 70 درصد برای خشک کردن DNA انجام شد. سپس سوپرناتانت حذف شده و رسوب باقی‌مانده در 100 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه مجدداً سوسپانس شد و تا انجام آزمایشات در 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Noorbakhsh *et al.*, 2009). کیفیت استخراجی توسط ژل الکترفورز 1 درصد و دستگاه نانو دراپ مورد ارزیابی قرار گرفت.

تکثیر قطعه ITS 5.8SrRNA و شناسایی کپک‌ها

تعیین توالی کپک‌های جدا شده با تکثیر قطعه 600 bp از ناحیه Internal transcribed spacer 5.8SrRNA با استفاده از جفت پرایمر ITS1/ITS4 انجام شد. آغازگر پیشرو و پسنورد به ترتیب ذیل بودند (White *et al.*, 1990).

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از ترموسایکلر انجام شد و تمام اجزاء واکنش از شرکت فرمنتاز خریداری گردید. مخلوط واکنش (20 میکرولیتر) حاوی 2 میکرولیتر بافر PCR (10X)، 1/2 میکرولیتر از مخلوط داکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات (10 میلی‌مولار)، 1/4 میکرولیتر کلرید منیزیوم (50 میلی‌مولار)، 1 میکرولیتر از هر پرایمر (10 پیکومول)، 3 میکرولیتر از DNA الگو و 0/25 میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در شرایط دمایی 1 سیکل به مدت4 دقیقه دردمای 94 درجه سانتی‌گراد و 35 سیکل با برنامه دمایی 1دقیقه در 94 درجه سانتی‌گراد، 1 دقیقه در دمای 59 درجه سانتی‌گراد و 1 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد و در نهایت 1 سیکل به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصولات PCR روی ژل الکتروفورز 1 درصد تفکیک شده و باندهای مورد نظر از روی ژل بریده شده و به میکروتیوپ‌های 2 سی‌سی انتقال گردید. استحصال مجدد DNA از ژل با استفاده از کیت استخراج از ژل Bioneer کره جنوبی (USA Bioneer, Inc. 1000 atlantic Avenue, Alameda, CA USA 94501) انجام شد. تعیین توالی قطعه تکثیر شده توسط شرکت Bioneer انجام شد. ترادف قطعات توالی شده در بانک اطلاعاتی NCBI، Blast و مورد مقایسه قرار گرفت و کپک‌ها در حد گونه شناسایی شدند.

طرح آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، از طرح پایه کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان $p < 0/05$ مقایسه شد و بر اساس آن، نمودارها بوسیله نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

بررسی نتایج شمارش کپک و مخمر

همانطور که در جدول 1، مشاهده می‌شود، در هر چهار نوع محیط کشت PDA، YGC، CAو DG18 میزان آلودگی قارچی نمونه‌های کشمش تیفی بیش از نمونه‌های کشمش پلویی و پیکامی بود. در میان سه روش خشک‌کردن، میزان آلودگی در نمونه‌های گوگردی کمتر از نمونه های آفتابی و تیزابی بود. به طوری که در محیط کشت CA شمارش کپک و مخمر نمونه‌های گوگردی به طور معنی‌داری کمتر از نمونه های خشک شده به روش آفتابی و تیزابی به‌دست آمد؛ اما در سایر محیط های کشت این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

شکل 1 تصاویری از رشد قارچها در چهار محیط کشت مختلف PDA، YGC، CAو DG18 در ارتباط با یک نمونه از کشمش‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد. با توجه به آنکه هر چهار محیط کشت مذکور تقریباً به طورمشابهی قادر به ایزولاسیون کلنی‌های قارچ از نمونه‌های کشمش بودند، استفاده از هر یک از محیط کشت‌های

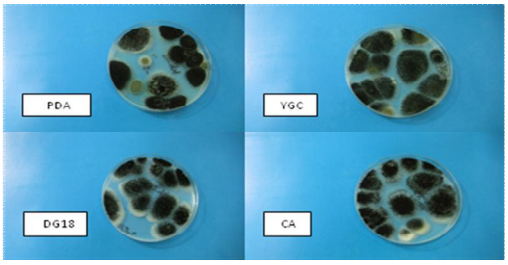
مذکور به منظور شمارش کپک و مخمر توصیه می‌شود.

جدول 1- بررسی اثر نوع کشمش و روش خشک کردن بر شمارش کپک و مخمر.

نوع کشمش	روش خشک کردن	نوع محیط کشت			
		YGC (cfu/gr)	PDA cfu/gr)	CA (cfu/gr)	DG18 (cfu/gr)
پلویی	آفتابی	2295	2787	2441	1954
	تیزابی	167/7	243/3	118/8	202/2
	گوگردی	28/20	44/66	7/760	19/80
پیکامی	آفتابی	330/6	368/2	322/4	257/5
	تیزابی	1987	1648	1552	1911
	گوگردی	21/96	56/84	147/1	220/2
تیفی	آفتابی	16000	18820	16240	13190
	تیزابی	7144	6852	6575	6571
	گوگردی	686/9	410	518/3	1387

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ های جدا شده

نتایج بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های قارچی خالص شده در محیط کشت PDA نشان داد که بیشترین آلودگی قارچی مربوط به جنس آسپرژیلوس (عمدتاً گونه های آسپرژیلوس بخش نیگری) بود. پس از آن جنس‌های پنی‌سیلیوم، آلترناریا و رایزوپوس از اهمیت بیشتری برخوردار بودند. این در حالی است که میزان آلودگی به مخمر بسیار محدود بود.



شکل 1-کپک های جداسازی شده از یک نمونه کشمش درچهار محیط کشت مختلف.

پالومبو و همکاران (2011) نشان دادند که بیشترین آلودگی نمونه‌های کشمش کالیفرنیایی متعلق به جنس آسپرژیلوس بود. آن ها همچنین با استفاده از محیط کشت‌های چاپکس ییست آگار، چاپکس ییست آگار + 20 درصد ساکاروز، مالت اکسترکت آگار و چاپکس آگار و با بررسی ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی، گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های کشمش کالیفرنیا را شناسایی نمودند (Palumbo *et al.*, 2011). القلیبی و شاطر (2004) با استفاده از دو محیط کشت چاپکس داکس آگار+ 1 درصد گلوکز و چاپکس داکس آگار+ 40 درصد ساکاروز، آلودگی قارچی برخی از میوه‌های خشک شده (کشمش، خرما و انجیر) در یمن را مورد بررسی قرار دادند. *آسپرژیلوس نیجر*[1]، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*[2]، *آسپرژیلوس اکراسئوس*[3]، *پنی‌سیلیوم چریسوژنوم*[4] و *رایزوپوس استولونیفر*[5] عمده‌ترین گونه‌های جدا شده در محیط کشت چاپکس آگار + 1 درصد گلوکز و *زیگوساکارومایسز روکسی*[6]، *آسپرژیلوس نیجر* و *پنی‌سیلیوم چریسوژنوم* گونه‌های جدا شده در محیط کشت چاپکس آگار+ 40 درصد ساکاروز بودند (Alghalibi and Shater, 2004).

کاظمی و همکاران (2009) آلودگی گندم مصرفی استان آذربایجان شرقی را به روش کشت، تهیه اسلاید کالچر و مشاهده میکروسکوپی مورد بررسی قرار دادند. بیشترین آلودگی قارچی مربوط به آلودگی نمونه‌ها با *آسپرژیلوس نیجر* (43 درصد) و سپس کپک‌هایی از جنس موکور، پنی‌سیلیوم و انواع دیگر آسپرژیلوس بود (Kazemi, *et al.*, 2009). همچنین کاظمی و همکاران (2008) عمده‌ترین آلودگی قارچی چای‌های مصرفی در شهرستان تبریز را *آسپرژیلوس نیجر* گزارش نمودند (Kazemi, *et al.*, 2008).

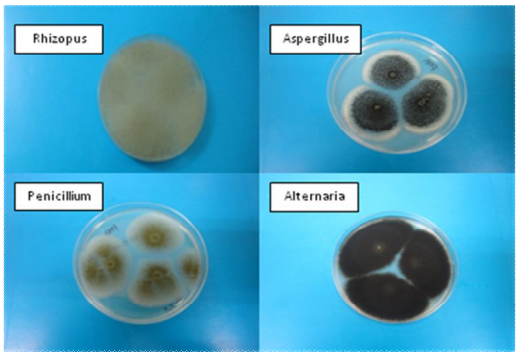
شکل 2، کلنی خالص شده چهار جنس آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، آلترناریا و رایزوپوس را نشان می‌دهد. در شکل3 ، تصاویر میکروسکوپی مربوط به چهار جنس مذکور آمده است.

توالی‌یابی کپک‌های ایزوله‌شده از نمونه‌های کشمش

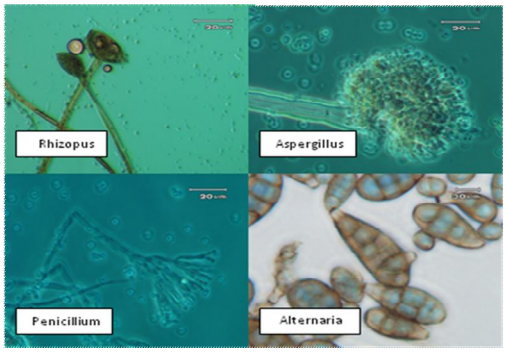
با توجه به شباهت بیش از حد برخی از گونه‌های قارچی به یکدیگر، تشخیص گونه‌ی قارچی با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی کاری دشوار بوده و این امکان وجود دارد که نتوان تمایز

1- *Aspergillus niger*
2- *Aspergillus fumigatus*
3- *Aspergillus ochraceus*
4- *Penicillium chrysogenum*
5- *Rhizopus stolonifer*
6- *Zygosaccharomyces rouxii*

میان برخی گونه‌ها را تشخیص داد.



شکل 2- قارچ های خالص شده در محیط کشت PDA از نمونه های کشمش.

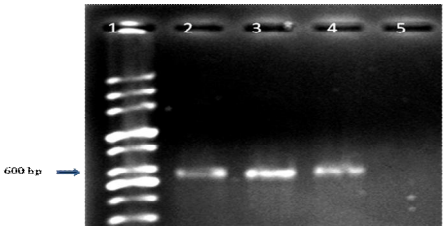


شکل 3- تصویر میکروسکوپی قارچ های ایزوله شده از نمونه های کشمش.

از سویی دیگر روش‌های مولکولی دارای قابلیت ردیابی ژنوم‌های بسیار مشابه و با تفاوت اندک بوده و در مقایسه با روش‌های شناسایی بر پایه کشت، دارای قدرت افتراقی بیشتری می‌باشد. لذا به منظور تشخیص صحیح و کامل گونه‌های کپکی موجود در نمونه‌های کشمش علاوه بر شناسایی کپک‌های جدا شده بر مبنای مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی از روش مولکولی بر پایه توالی‌یابی استفاده گردید. بدین منظور پس از کشت نمونه‌های کشمش در محیط PDA و شناسایی اولیه انواع مختلف کپک‌های رشد یافته بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی مطابق روشی که قبلا شرح داده شد، جداسازی و خالص‌سازی کپک‌های ایزوله‌شده انجام شد. بدین ترتیب 50 کپک مختلف از انواع نمونه‌های کشمش به‌دست آمد. DNA کپک‌های فوق استخراج و پس از تایید بر روی ژل الکتروفورز، به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد استفاده قرار گرفت. پس از تایید محصول واکنش PCR (قطعه bp 600) بر روی ژل الکتروفورز 1 درصد (شکل 4)، برای تعیین توالی، ارسال و در نهایت با مقایسه ترادف ژنی آن‌ها در بانک اطلاعاتی NCBI (شکل 5)، 50 کپک در حد گونه شناسایی گردید (جدول 2).

با توجه به نتایج به‌دست آمده در نمونه‌های کشمش کپک‌هایی از جنس آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم، آلترناریا، رایزوموکور، موکور و کلادوسپوریوم مشاهده گردید. 96/27 درصد از کپک‌ها متعلق به جنس آسپرژیلوس بود. گونه‌های جنس آسپرژیلوس شامل *نیجر، فلاووس، فومیگاتوس، کربوناریوس، توبینجنسیس*[1] *و اوریزه*[2] بود که در این میان *آسپرژیلوس نیجر* بیش‌ترین فراوانی را به خود اختصاص داد (77/77 درصد). گونه‌های ایزوله شده از جنس پنی‌سیلیوم شامل *بروی‌کمپکتوم*[3]، *چریسوژنوم، کروستوسوم*[4] و *سولیتوم*[5] بود که فراوان‌ترین آن‌ها *پنی‌سیلیوم چریسوژنوم* بدست آمد. *آلترناریا آلترناتا*[6]، *آلترناریا تنوسیما*[7]، *رایزوموکور وریابیلیس*[8]، *موکور روکسی*[9]، *موکور راسموسوس*[10] و *کلادوسپوریوم مالروم*[11] دیگر گونه‌ها را تشکیل دادند.

پالومبو و همکاران (2011) با استفاده از ژن β-tubulin و calmodulin گونه‌های مختلف آسپرژیلوس متعلق به بخش نیگری را توالی‌یابی نموده و آن‌ها را به لحاظ میزان خویشاوندی مورد بررسی قرار دادند (Palumbo *et al.*, 2011). پیتکارانتا و همکاران (2008) با استفاده از توالی‌یابی ناحیه internal transcribed spacer (ITS) به کمک جفت پرایمر Fun18Sf/ITS4 کپک‌های عمده همراه با گرد و غبار فضای داخل ساختمان را مورد بررسی قرار دادند.



شکل 4- محصولات PCR، (1) مارکر 100bp، (2-4) نمونه‌های محصول PCR (600 bp)، (5) کنترل منفی

نتایج نشان داد که بیشتر گونه‌های کپکی متعلق به جنس‌های کلادوسپوریوم، آلترناریا، آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم می‌باشد (Pitkäranta *et al.*, 2008). سیلوا و همکاران (2011) نیز بر اساس روش مولکولی توالی‌یابی و با استفاده از ژن β-tubulin به شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس بخش نیگری پرداختند (Silva *et al.*, 2011).

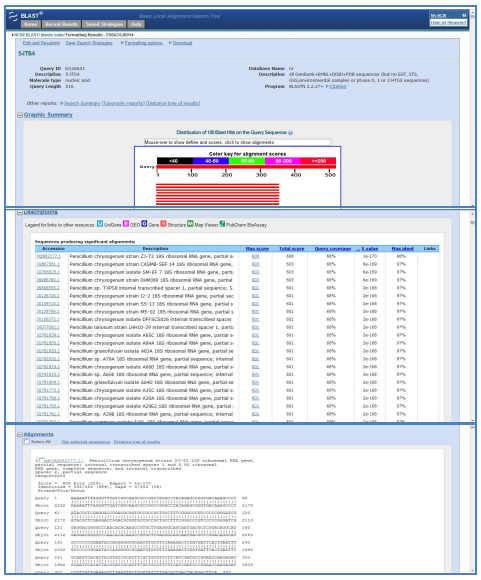
1- *Aspergillus tubingensis*
2- *Aspergillus oryzae*
3- *Penicillium brevicompactum*
4- *Penicillium crustosum*
5- *Penicillium solitum*
6- *Alternaria alternata*
7- *Alternaria tenuissima*
8- *Rhizomucor variabilis*
9- *Mucor rouxii*
10- *Mucor racemosus*
11- *Cladosporium malorum*

جدول 2- شناسایی کپک‌های ایزوله‌شده از نمونه‌های کشمش به روش توالی‌یابی

نام گونه	کد ژنتیکی	درصد تشابه	درصد ایزوله‌ها در نمونه‌های کشمش	درصد نمونه‌های کشمش آلوده به کپک
Aspergillus				
Aspergillus niger	AF108474.1	95	20/03	86/7
Aspergillus niger	HQ014699.1	95	10/25	73/3
Aspergillus niger	JNS65296.1	97	13/53	77/8
Aspergillus niger	FJ537102.1	94	15/33	86/7
Aspergillus niger	HM136829.1	96	18/63	84/4
Aspergillus flavus	HQ645940.1	98	0/74	6/7
Aspergillus flavus	JQ070072.1	97	0/93	4/4
Aspergillus flavus	EU315006.1	100	1/39	4/4
Aspergillus fumigatus	FJ214371.1	97	1/02	11/1
Aspergillus fumigatus	JQ356539.1	99	0/37	6/7
Aspergillus tubingensis	GU595290.1	98	5/59	11/1
Aspergillus tubingensis	GU595290.1	96	2/79	13/3
Aspergillus oryzae	FJ878681.1	92	1/11	4/4
Aspergillus oryzae	AB470911.1	97	0/37	6/7
Aspergillus carbonarius	JF436893.1	93	4/19	33/3
Penicillium				
Penicillium brevicompactum	HM776430.1	96	0/09	2/2
Penicillium chrysogenum	JN851002.1	96	0/37	8/8
Penicillium chrysogenum	HQ882177.1	98	0/19	6/7
Penicillium chrysogenum	EF491160.1	91	0/09	2/2
Penicillium brevicompactum	HQ654891.1	97	0/28	6/7
Penicillium crustosum	HM037943.1	97	0/19	4/4
Penicillium crustosum	JN831239.1	92	0/09	2/2
Penicillium solitum	JN642222.1	97	0/19	4/4
Alternaria				
Alternaria tenuissima	JQ417902.1	94	0/56	11/1
Alternaria alternata	JF796072.1	98	0/19	2/2
Rhizomucor				
Rhizomucor variabilis	HM623316.1	96	0/46	6/7
Rhizomucor variabilis	HQ285715.1	91	0/19	2/2
Rhizomucor variabilis	HM623316.1	97	0/28	4/4
Mucor				
Mucor rouxii	AJ278363.1	96	0/28	2/2
Mucor racemosus	JN943043.1	91	0/19	2/2
Cladosporium				
Cladosporium malorum	AY251081.2	96	0/09	2/2

نتیجه‌گیری

کشمش یکی از محصولات صادراتی ایران محسوب می‌شود؛ بنابراین توجه به کیفیت آن از اهمیت زیادی برخوردار است. این پژوهش به هدف شناسایی انواع کپک‌هایی که قابلیت رشد در کشمش را دارند انجام گردید. براساس نتایج بدست‌آمده هرچند در انواع کشمش (پلویی، پیکامی و تیفی) آلودگی به کپک مشاهده شد، نمونه‌های کشمش تیفی در مقایسه با سایر نمونه‌ها از آلودگی بیشتری برخوردار بودند. بیشترین کپک مشاهده شده نیز به جنس آسپرژیلوس و گونه نیجر تعلق داشت. البته در میان انواع گونه‌های قارچی ایزوله شده، گونه‌های تولید کننده مایکوتوکسین (*آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس کربوناریوس*) نیز شناسایی گردید. با توجه به آن‌که توکسین‌های قارچی می‌توانند سلامت مصرف‌کننده را به خطر بیاندازند، توجه به شرایط تولید و نگهداری این محصول برای جلوگیری یا کاهش آلودگی به کپک‌ها، به‌ویژه کپک‌های مولد توکسین ضروری به نظر می‌رسد



شکل 5- مراحل بلاست کردن توالی یکی از کپک‌های شناسایی شده از نمونه‌های کشمش

منابع

Alghalibi, S.M.S. and Shater, A.M. 2004. Mycoflora and mycotoxin contamination of some dried fruits in Yemen Republic. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 7(2): 19-27.

Amirghasemi, T., 2002. Grapes, Planting, Harvesting, Processing. Future Press. Tehran, 190-199.

Choi, Y.M., Hyde, K.D. and Ho, W.H. 1999. Single spore isolation of fungi. Fungal Diversity. 3: 29-38.

Harris, J.H. 1986. Modified method for fungal slide culture. Journal of Clinical Microbiology. 460-461.

Iranian National Standards Organization. 1995. Enumeration and identification of fungi (molds and yeasts) in food. Standard No. 997. The tenth edition.

Kazemi, A., Mohtadynia, J., Mahdavi, R. Vahed Jabbari, M., Ghaem Maghami, S.J., Ostad Rahimi, A.R., Rezayian, F., Zamen Milani, F., Mir Yousefi Ata, S.F. and Jafari, A., 2009. Survey of Storage Wheat Contamination to Zearalenone Producer Fusarium Sp. in East Azarbaidgjan. Journal of Zanjan University of Medical Sciences. 17(6): 53-64.

Kazemi, A., Mohtadynia, J., Rezayian, F., Zamen Milani, F., Vahed Jabbari, M., Ghaem Maghami, S.J., Mahdavi, R. and Ostad Rahimi, A.R., 2008. Survey of Fungal contamination of tea in Tabriz. Journal of Medicinal Plants. 1(29): 147-155.

Maghsoudi, S., 2008. Grape Technology and Its Products. Agricultural Science of Iran Press. Tehran, 1-165.

Niessen, L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. International Journal of Food Microbiology. 119: 38-46.

Noorbakhsh, R., Bahrami, A.R., Mortazavi, S.A., Forghani, B. and Bahreini, M. 2009. PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron. Food Science and Biotechnology. 18 (4): 1038-1041.

Palumbo, J.D., O'Keeffe, T.L., Vasquez, S.J. and Mahoney, N.E. 2011. Isolation and identification of ochratoxin A-producing Aspergillus section Nigri strains from California raisins. Letters in Applied Microbiology. 52(4): 330-336.

Pitkaranta, M., Meklin, T., Hyvarinen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Nevalainen, A. and Rintala, H. 2008. Analysis of Fungal Flora in Indoor Dust by Ribosomal DNA Sequence Analysis, Quantitative PCR, and Culture. Applied and Environmental Microbiology. 74 (1): 233-244.

Selma, M.V., Martínez-Culebras, P.V. and Aznar, A. 2008. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of Aspergillus carbonarius in wine grapes. International Journal of Food Microbiology. 122: 126-134.

Silva, D.M., Batista, L.R., Rezende, E.F., Fungaro, M.H., Sartori, D. and Alves, E. 2011. Identification of fungi of the grnus Aspergillis section Nigri using polyphasic taxonomy. Brazilizn Journal of Microbilogy. 42: 761-773.

Tafazoli, A., Hekmati, J. and Firuze, P. 1991. Grapes. Shiraz University Press. Shiraz. 1-43.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Talor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes

for phylogenetics. In PCR Protocol: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 315-322

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 1, Spring 2015, p. 13-21

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 11، شماره 1، بهار 1394، ص. 21-13

Isolation and identification of fungi from raisins varieties in Khorasane Razavi based on morphological and molecular properties

M. Sarabi Jamab[1]- F. Shahidi[2]*- A. R. Bahrami[3]- S. A. Mortazavi[4]- M. R. Nassiry[5]- M. Mehraban Sangatash[6]- M. Hosseini Nezhad[7]

Received:28-05-2012
Accepted:21-10-2012

Abstract

Raisins are dried grapes that may be eaten raw or used in cooking, baking and brewing as an ingredient. Iran is one of the major exporters of raisins in recent years and Iranian raisins are exported to many countries. It is important to ensure of microbiological quality and safety of raisins. The aim of this study was isolation and identification of mycoflora from main raisin's varieties (Poloie, Pikami & Teiphi) produced in Khorasan Razavi Province. Four types of culture medium (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC), Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek Dox Agar (CA) and Dichloran Glycerol Agar (DG18)) were used for isolation. The highest contamination was found in Teiphi raisin samples. The drying method was not effect on fungi contamination. For Fungi Identification, Macroscopic and Microscopic features were investigated. The Result showed that frequently isolated fungi were Aspergillus and Penicillium species. The fragment (600 bp) of Internal Transcribed Spacer 5.8SrRNA of isolated colonies was amplified using polymerase chain reaction for identification down to the species level. According to the results, the raisins had varius species of Aspergillus, Penicillium, Rhizomucor, Mucor, Alternaria and Cladosporium. Aspergillus niger was the most abundant fungi.

Keywords: Raisin, Fungi, Khorasan Razavi, Isolation And Identification, Morphological And Molecular Properties

1- Former Ph.D. Student, Ferdowsi University of Mashhad, and Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST)
2,4- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3- Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
5- Associated Professor, Department of Animal Science and Technology, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad
6- Assistant Professor, Food Quality and Safety Department, Food Science and Technology Research Institute, ACECR, Mashhad Branch
7- Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST)
(*-Corresponding Author Email: niloofar1373@yahoo.com)