ردیابی گونه‌های فوزاریوم مولد مایکوتوکسین با استفاده از صفات ریخت شناسی و مولکولی در دانه ذرت

نجمه جوانبخت اول[۱*]، مجتبی مرادزاده‌ی اسکندری[۲]، حمید افضلی[۲] و سید محمود اخوّت[۳]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علم و فرهنگ کاشمر.
۲- به ترتیب استادیار و مربی پژوهشی بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، مشهد.
۳- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.
* مسئول مکاتبه: n_javanbakht1@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۲۲

چکیده

قارچ فوزاریوم از بیمارگرهای عمده‌ی مزارع ذرت محسوب می‌شود که علاوه بر تقلیل کمیت و کیفیت محصول، با تولید چند نوع مایکوتوکسین از جمله فومونیزین (FUM)، موجب آلودگی مواد غذایی و تهدید سلامت انسان و دام می‌شود. در تحقیق حاضر نمونه‌برداری از دانه‌های ذرت دارای علائم بیماری قارچی موجود در سیلوهای دامداری و مرغداری‌های مختلف استان خراسان رضوی انجام گرفت. با کشت دانه های ذرت بر روی محیط کشت های PDA و WA، پس از جداسازی و خالص سازی جدایه‌های متعلق به جنس فوزاریوم، مجموعاً تعداد ۴۰ جدایه بدست آمده که با توجه به ویژگی‌های ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک آنها و مقایسه با کلیدهای شناسایی مربوطه، سه گونه *Fusarium verticillioides*، *F. graminearum* و *F. proliferatum* به ترتیب با فراوانی ۳۴، ۴ و ۲ جدایه شناسایی شدند. به منظور تأیید نتایج بدست آمده، پس از استخراج DNA جدایه‌ها و دانه‌های ذرت با استفاده از واکنش PCR و آغازگرهای اختصاصی توالی مورد نظر تکثیر شد. بعلاوه، با استفاده از واکنش PCR به همراه آغازگر اختصاصی (FUM1 F/R) ۱۵ جدایه از گونه‌ی غالب *F.verticillioides* از نظر پتانسیل تولید فومونیزین مورد بررسی قرار گرفتند. در محصولات PCR، تولید نوارهای ۱۸۳bp برای ۱۵ جدایه مزبور مشاهده گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که همه‌ی جدایه های مورد بررسی گونه‌ی *F. verticillioides* از نظر ژنتیکی از پتانسیل تولید فومونیزین برخوردار هستند، همچنین با تکنیک مبتنی بر PCR و نشانگرهای مولکولی بکار رفته در این مطالعه، شناسایی، تفکیک و ردیابی گونه‌های فوزاریوم همراه دانه‌ی ذرت مقدور می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گونه‌ی غالب، *F. verticillioides*، فومونیزین، آغازگراختصاصی.

مقدمه

واژه‌ی مایکوتوکسین (Mycotoxin) از کلمه‌ی مایکوتوکزیکوزیس مشتق گردیده که دارای ریشه‌ی یونانی می‌باشد و از دو واژه‌ی مایکس[۱] به معنی قارچ و توکسیکوم[۲] به معنی سم گرفته شده است (تارنر و همکاران ۲۰۰۹). بروز مایکوتوکسیکوزیس در انسان معضلی قدیمی است چنانکه به ارگوتیسم در بخشی ازکتاب مقدس مسیحیان اشاره شده است. مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه سمی هستند که جهت عملکرد طبیعی

[1]Mykes

[2]Toxicum

Archive of SID

www.SID.ir

سلول ضروری نمی‌باشند و در طبیعت اغلب توسط گروه-هایی از قارچ‌ها نظیر جنس‌های فوزاریوم، آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم، آلترناریا و کلاویسپس تولید میشوند. جنس فوزاریوم شامل قارچهای هیفومیست خاکزی است و اهمیت اقتصادی زیادی دارد که گونه‌های متعلق به آن طیف وسیعی از محصولات غذایی از جمله غلات مانند ذرت، گندم و جو را آلوده می‌سازند. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ذرت در سراسر جهان پوسیدگی فوزاریومی خوشه یا بلال است و حضور گونه‌های فوزاریوم در ذرت سبب بیماری‌های پوسیدگی صورتی یا پوسیدگی فوزاریومی خوشه (Fusarium ear rot) با عامل *F. verticillioides* و پوسیدگی قرمز یا پوسیدگی جیبرلایی خوشه (Gibberella ear rot) با عامل *F. graminearum* می‌گردد (مانکولد ۲۰۰۳). این بیماری به دلیل تولید مایکوتوکسین‌ها توسط گونه‌های مختلف *F. verticillioides*، *F. proliferatum* و *F.nygamai* در کاهش کیفیت ذرت و ایجاد مسمومیت در انسان و دام نقش ویژه‌ای دارد (لزلی و سومرل ۲۰۰۶). از جمله‌ی این مایکوتوکسین‌ها، فومونیزین‌ها هستند که توسط حداقل ۱۱ گونه‌ی متعلق به قارچ فوزاریوم تولید می‌شوند و *F. verticillioides* و *F. proliferatum* از جمله بیمارگرهای ذرت می‌باشند. به علت ارتباط اپیدمیولوژیک بین خوردن ذرت آلوده به فومونیزین و سرطان مری و آسیب سیستم عصبی در انسان، این مایکوتوکسین دارای اهمیت بسیاری است (هندریکز ۱۹۹۹). به علاوه میتواند باعث لکوانسفالومالاسی[1] در اسب، ورم ریه در خوک، سرطان و آسیب سیستم عصبی در موش‌های آزمایشگاهی شود (ماراساز و همکاران ۲۰۰۴). در بررسی پوسیدگی فوزاریومی بلال در سایر کشورها (زمانی و همکاران ۲۰۰۰)، ودر ایران از استان‌های خوزستان (عظیمی ۱۳۹۰)، لرستان (آشناگر و همکاران ۲۰۱۰)، اصفهان، ساری، کرمانشاه و کرج (پرچمیان و همکاران ۲۰۱۰) نیز *F. verticillioides* به عنوان گونه‌ی غالب گزارش شده است. ردیابی قارچهای مولد فومونیزین براساس ویژگی‌های ریخت شناختی جهت شناسایی دقیق جدایه‌های قارچی در سطح گونه کافی نمی‌باشد و چنین عملکردهایی نیازمند تخصص لازم در زمینه فیزیولوژی و تاکسونومی فوزاریوم هستند (لزلی و سومرل ۲۰۰۶، جورادو و همکاران ۲۰۱۰). استفاده از روشی که بتواند قارچ تولید کننده‌ی مایکوتوکسین را سریعاً شناسایی نماید، اهمیت بسزایی دارد. در این راستا تکنیک‌های PCR[2] متنوعی برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم توکسین‌زا توسعه یافته‌اند. بعضی از آنها براساس تک کپی ژن هستند که مستقیماً شامل بیوسنتز مایکوتوکسین می‌شوند. بدین منظور که شناسایی گونه‌ی مایکوتوکسین‌زا بر اساس ژن اختصاصی تولید مایکوتوکسین در آن گونه می‌باشد، در حالی که روش‌های دیگر اختصاصی گونه می‌باشند (گونزالز و همکاران ۲۰۰۴، مول و همکاران ۲۰۰۴). با توجه به اهمیت گونه‌های قارچ فوزاریوم در گیاهان بالاخص ذرت ونقش مهمی که در سلامتی حیوانات، انسان و اقتصاد جامعه دارد،در تحقیق حاضر دانه‌های ذرت در شرایط انباری از نظر آلودگی به قارچ فوزاریوم بررسی شدند و از آنجایی که ردیابی قارچها نسبت به مایکوتوکسین‌ها آسان-تر است، با بکارگیری روش‌های مولکولی از گونه‌ی متعلق به جنس فوزاریوم به عنوان اندیکاتور در جهت بررسی پتانسیل تولید توکسین استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی

طی بهمن ماه سال ۱۳۹۳ تا خرداد ماه سال ۱۳۹۴ نمونه برداری از دانه‌های ذرت دارای علائم بیماری قارچی موجود در سیلوهای دامداری و مرغداری‌های مختلف - استان خراسان رضوی انجام شد. نمونه‌ها داخل پاکت کاغذی مجزا قرار گرفتند و پس از ثبت مشخصات لازم جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. آلودگی دانه‌های ذرت با استفاده از کشت آنها روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA[3]) و آب آگار (WA[4]) تعیین گردید.

[1]Leukoencephalomalacia

[2]Polymerase Chain Reaction
[3]Potato Dextrose Agar
[4]Water Agar

Archive of SID

www.SID.ir

کشت دانه ذرت روی محیط‌های کشت PDA و WA

برای جداسازی قارچ بیمارگر ابتدا دانه‌های ذرت پس از شستشو به وسیله جریان آب به مدت سه دقیقه برای ضدعفونی سطحی در هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار داده شدند. دانه‌ها پس از شستشو با آب مقطر سترون و خشک شدن در زیر هود، در تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های کشت PDA و WA کشت گردیدند ودر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از تشکیل پرگنه‌ی قارچ عامل بیماری، پرگنه‌های تشکیل شده جهت تحریک به اسپور زایی و تولید ماکروکنیدی و میکروکنیدی به محیط کشت برگ میخک آگار[1] (CLA) دو درصد و آب آگار دو درصد منتقل شدند وتشتک‌های پتری زیر نورUV با تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک اسپور انجام شد. جدایه‌های خالص جهت نگهداری به میکروتیوب‌های حاوی ماسه سترون منتقل شدند. جهت بررسی میزان رشد، شکل و رنگ پرگنه، جدایه‌های خالص روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. برای شناسایی جدایه‌های قارچی از کلیدهای شناسایی معتبر استفاده گردید (نلسون و همکاران ۱۹۸۳، برگس و همکاران ۱۹۹۴، و لزلی و سومرل ۲۰۰۶).

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA از جدایه‌های خالص قارچ و دانه‌های ذرت که بطور طبیعی آلوده به قارچ فوزاریوم بودند، در مراحل جداگانه انجام گرفت. جهت تهیه‌ی توده‌ی میسلیوم قارچ، جدایه‌های خالص روی محیط کشت PDA به مدت ۵-۴ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، زیر نور مستقیم (نور فلئورسنت استفاده شد) نگهداری شدند (یلی- ماتیلا و همکاران ۲۰۰۴). سپس بوسیله اسکالپل ضدعفونی شده در شرایط سترون، میسلیوم‌ها از روی محیط کشت تراشیده شدند. میسلیوم‌ها و دانه‌های ذرت به طور جداگانه در هاون چینی سترون توسط نیتروژن مایع پودر گردیدند. به منظور یکسان بودن شرایط استخراج از یک کیت استخراج (Genomic DNA isolation Kit-IV, DNA DENAzist Asia) استفاده شد و مراحل انجام استخراج DNA طبق دستور شرکت سازنده انجام گرفت. جهت بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، تعداد پنج میکرولیتر از هر نمونه DNA با یک میکرولیتر بافر بارگذاری (Loading Dye, Fermentas) مخلوط شد و در ژل آگارز ۰/۸ درصد رنگ آمیزی شده با گرین ویور[2] در دستگاه الکتروفورز (Electrophoresis, PowerPac^{TM}Basic, BIO RAD, USA) تحت ولتاژ ۷۵ ولت با بافر TBE 0/5X قرار گرفت. سپس ژل در معرض نور ماوراء بنفش، در دستگاه عکسبرداری از ژل (Gel documentation, Alphalmager Mini System) قرار گرفت و نوارهای DNA روی ژل مشاهده و بررسی گردیدند.

واکنش PCR اختصاصی

در این تحقیق یک جفت آغازگر اختصاصی جنس فوزاریوم و پنج جفت آغازگر اختصاصی گونه (جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های خالص قارچ فوزاریوم) و سه جفت آغازگر اختصاصی گونه (جهت ردیابی مولکولی آلودگی فوزاریومی دانه‌های ذرت) بکار گرفته شد (جدول۱). آغازگرهای ساخت شرکت ماکروژن (Macrogen) از طریق شرکت دنازیست آسیا، تهیه شدند. فرآیند PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵میکرولیتر PCR Master Mix (2X) (Thermo SCIENTIFIC)، پنج میکرولیتر DNA به غلظت ۱۰ نانوگرم به عنوان کنترل مثبت (کنترل منفی فاقد DNA ، حاوی آب دیونیزه به مقدار پنج میکرولیتر)، از هر جفت آغازگر (Forward, Reverse) یک میکرولیتر به غلظت ۱۰ پیکومول و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز

[1]Carnation leaf-piece Agar

[2]Green Viewer

Archive of SID

www.SID.ir

افزوده شد. واکنش‌های PCR پس از بهینه سازی، در دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini^{TM}Gradient Thermal Cycler Bio Rad, USA) براساس برنامه حرارتی اختصاصی هر آغازگر صورت گرفت (جدول۲). محصول PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد (رنگ آمیزی شده با گرین ویور) با بافر TBE 0/5X در یک میدان الکتریکی با ولتاژ ۹۰ ولت در دستگاه الکتروفورز عبور داده شد. سپس ژل در معرض نور ماوراء بنفش با عکسبرداری مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت.

بررسی بالقوه تولید مایکوتوکسین

به منظور پتانسیل تولید فومونیزین، DNA ژنومی قارچ با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی (ساخت شرکت ماکروژن) مورد بررسی قرار گرفت (جدول۳). واکنش PCR اختصاصی مطابق توضیحات قبلی (با این تفاوت که برای کنترل منفی از DNA ژنومی قارچ *Aspergillus flavus* به مقدار پنج میکرولیتر و غلظت ۱۰ نانوگرم استفاده شد)، بهینه‌سازی گردید و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی حرارتی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، پنج دقیقه؛ ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، یک دقیقه؛ اتصال در دمای ۵۸ درجه‌ی سلسیوس، یک دقیقه؛ بسط در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس، یک دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس، ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

جدول۱- توالی جفت آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص جنس ***Fusarium*** و گونه‌های ***F. verticillioides***، ***F. proliferatum*** و ***F. graminearum***

آغازگر	توالی هدف	اندازه محصول PCR (pb)	گونه	منبع
	ITS			
ITS F	**Aactcccaaacccctgtgaacata**	۴۳۱	***Fusarium* genus**	**Bluhm *et al*. 2004**
ITS R	**Tttaacggcgtggccgc**			
	Calmodulin			
VER1	**Cttcctgcgatgtttctcc**	۵۷۸	***F. verticillioides***	**Mule *et al*. 2004**
VER2	**Aattggccattggtattatatatcta**			
	Calmodulin			
PRO1	**Ctttccgccaagtttcttc**	۵۸۵	***F. proliferatum***	**Mule *et al.* 2004**
PRO2	**Tgtcagtaactcgacgttgttg**			
	IGS			
Fgr-F	**Gttgatgggtaaaagtgtg**	~۵۰۰	***F. graminearum***	**Jurado *et al*. 2005**
Fgc-R	**Ctctcatataccctccg**			
	ITS			
verITS-F	**aaatcgcgttccccaaattga**	۱۷۲	***F. verticillioides***	**Visentin *et al*. 2009**
ITS4	**tcctccgcttattgatatgc**			**White *et al*. 1990**
	ITS			
proITS-R	**gcttgccgcaagggctcgc**	۳۹۰	***F. proliferatum***	**Visentin *et al*. 2009**
ITS1	**tccgtaggtgaacctgcgg**			**White *et al.* 1990**

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲- برنامه حرارتی آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص جنس ***Fusarium*** و گونه‌های ***F. verticillioides***، ***F. proliferatum*** و ***F. graminearum***

آغازگرها	واسرشت سازی اولیه	تعداد چرخه	واسرشت سازی	اتصال آغازگرها	بسط	بسط نهایی
VER1/VER2	۵ دقیقه، ۹۵	۳۵	۵۰ ثانیه، ۹۴	۵۰ ثانیه، ۵۶	۱ دقیقه، ۷۲	۷ دقیقه، ۷۲
PRO1/PRO2	۵ دقیقه، ۹۵	۳۵	۵۰ ثانیه، ۹۴	۵۰ ثانیه، ۵۶	۱ دقیقه، ۷۲	۷ دقیقه، ۷۲
verITS-F/ITS4	۲ دقیقه، ۹۴	۳۵	۱ دقیقه ، ۹۶	۱ دقیقه ، ۶۰	۴۵ ثانیه، ۷۲	۱۰ دقیقه، ۷۲
ITS1/proITS-R	۲ دقیقه، ۹۴	۳۵	۱ دقیقه ، ۹۶	۱ دقیقه ، ۶۰	۴۵ ثانیه، ۷۲	۱۰ دقیقه، ۷۲
Fgr-F/Fgc-R	۸۵ ثانیه، ۹۴	۲۵	۳۵ ثانیه، ۹۵	۳۰ ثانیه، ۵۳	۳۰ ثانیه، ۷۲	۵ دقیقه، ۷۲
ITS F/ ITS R	۵ دقیقه، ۹۴	۳۵	۱ دقیقه، ۹۴	۱ دقیقه، ۵۸	۱ دقیقه، ۷۲	۱۰ دقیقه، ۷۲

* دما در تمامی مراحل بر حسب درجه سلسیوس است.

جدول۳- توالی جفت آغازگر مورد استفاده برای تشخیص گونه فوزاریوم مولد فامونیزین

نام آغازگر	توالی	توالی هدف	اندازه محصول PCR (bp)	منبع
FUM1F	CCATCACAGTGGGACACAGT	*Fum1* gen	۱۸۳	Bluhm *et al*. 2004
FUM1R	CGTATCGTCAGCATGATGTA			

نتایج

جداسازی و شناسایی عامل بیماری

از تعداد ۲۲ نمونه دانه‌ی ذرت دارای علائم بیماری قارچی از سیلوهای دامداری و مرغداری‌های مختلف استان خراسان رضوی طی بهمن ماه سال ۱۳۹۳ تا خرداد ماه ۱۳۹۴ جمع آوری شده، در مجموع ۴۰ جدایه از جنس فوزایوم جداسازی و خالص سازی گردید. با بررسی جدایه های بدست آمده و مقایسه مشخصات ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک آنها با کلیدهای شناسایی (نلسون و همکاران ۱۹۸۳، برگس و همکاران ۱۹۹۴، و لزلی و سومرل ۲۰۰۶)، سه گونه *Fusarium verticillioides*، *F. graminearum* و *F. proliferatum* به ترتیب با فراوانی‌های ۳۴، ۴ و ۲ جدایه شناسایی شدند (جدول۴).

خصوصیات ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک گونه‌های مزبور به تفکیک به شرح زیر است:

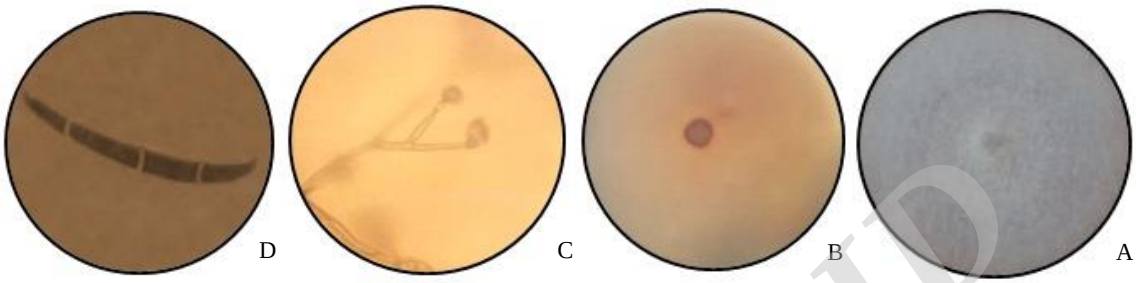
الف- گونه *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenberg

در محیط کشت PDA میزان رشد پرگنه‌ی قارچ در تاریکی با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس بعد از ۷۲ ساعت، ۳/۹- ۲/۹ سانتی متر، میسلیوم‌های هوایی پنبه‌ای و به رنگ سفید تا خاکستری، رنگ پرگنه در پشت تشتک پتری کرم تا قهوه‌ای و به سمت مرکز بنفش تا بنفش تیره رویت گردید. در محیط کشت CLA میکروکنیدی‌های فراوان چماقی، تک سلولی، در زنجیرهای طولانی و در سرهای دروغین (False-heads) بر روی فیالیدهای منفرد (Monophialide) تشکیل شدند. ماکروکنیدی‌ها اغلب طویل و کشیده، راست و معمولاً دارای ۴-۳ دیواره‌ی

Archive of SID

www.SID.ir

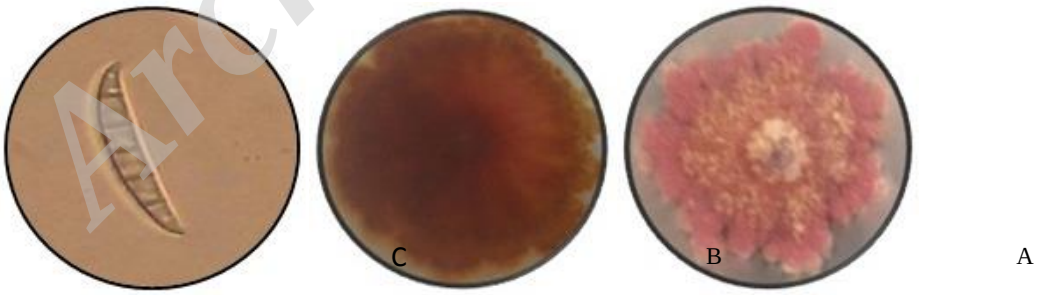
عرضی نازک بودند (شکل۱). نتایج ریخت شناختی این گونه با توصیف ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس و همکاران (۱۹۹۴)، و لزلی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه در ایران توسط مهریان (۲۰۰۰)، داوودی (۲۰۰۲)، محمدی و همکاران (۲۰۰۲)، زمانی (۲۰۰۴)، داوودی و مهریان (۲۰۰۴) و نادرپور (۲۰۰۴) از ذرت گزارش شده است.



شکل ۱- *Fusarium verticillioides*: A) رنگ پرگنه B) رنگ پشت پرگنه C) مونوفیالید D) ماکروکنیدی.

ب- گونه *Fusarium graminearum* Schewabe

در محیط کشت PDA میزان رشد پرگنه‌ی قارچ در تاریکی با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس بعد از ۷۲ ساعت، ۵/۲ سانتی متر، رنگ میسلیوم گلسرخی تیره و از پشت تشتک پتری قرمز تا قهوه‌ای تیره دیده شد. در محیط کشت CLA میکروکنیدی تولید نشد. ماکروکنیدی‌ها نسبتاً کشیده و در دو طرف کمی خمیده و دارای ۶-۵ دیواره‌ی عرضی، سلول انتهایی کمی تیز و سلول پایه آن پاشنه‌ای شکل بود. دارای اسپوردوکیوم نارنجی کمرنگ و فاقد کلامیدوسپور بود (شکل۲). نتایج ریخت شناختی این گونه با توصیف‌های ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، و برگس و همکاران (۱۹۹۴) مطابقت داشت. این گونه در ایران توسط مهریان (۲۰۰۰)، داوودی و مهریان (۲۰۰۴) و کاظمی و مومنی (۱۳۹۵) از ذرت گزارش شده است.



شکل ۲- *Fusarium graminearum*: A) رنگ پرگنه B) رنگ پشت پرگنه C) ماکروکنیدی.

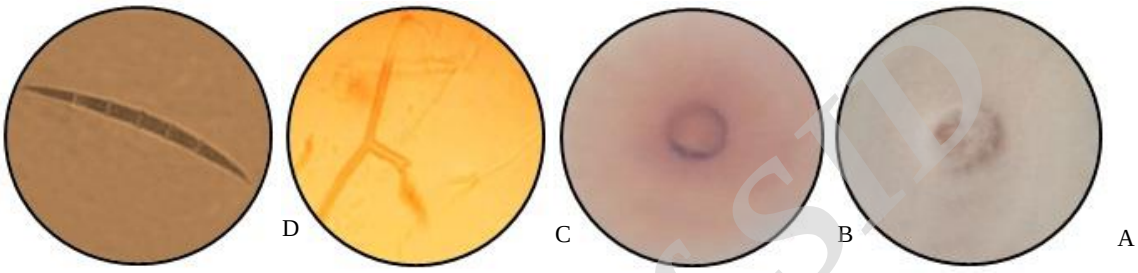
ج- گونه *Fusarium proliferatum* (Matsush) Nirenberg

در محیط کشت PDA میزان رشد پرگنه‌ی قارچ در تاریکی با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس بعد از ۷۲ ساعت، ۳/۲-۲/۹ سانتی متر، میسلیوم هوایی پنبه‌ای و متراکم به رنگ سفید تا مایل به صورتی، رنگ پرگنه از پشت پتری کرم تا قهوه‌ای و به سمت مرکز بنفش تا بنفش تیره دیده شد. رگه‌هایی به رنگ بنفش نیز رویت گردید. درمحیط کشت CLA میکروکنیدی‌های فراوان، تخم مرغی یا چماقی،

Archive of SID

www.SID.ir

تک سلولی، به صورت زنجیری و گاهی سرهای دروغین روی فیالیدهای منشعب یا سلول‌های تولید کننده‌ی کنیدی چند شاخه (Polyphialide) تشکیل شدند. ماکروکنیدی‌ها داسی تا کشیده با ۵-۳ دیواره‌ی عرضی بود. کلامیدوسپور مشاهده نشد (شکل۳). نتایج ریخت شناختی این گونه با توصیف‌های ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس و همکاران (۱۹۹۴)، و لزلی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه در ایران توسط مهریان (۲۰۰۰)، نادرپور (۲۰۰۴) و داوودی و مهریان (۲۰۰۴) از ذرت گزارش شده است.



شکل ۳- *Fusarium proliferatum*: A) رنگ پرگنه B) رنگ پشت پرگنه C) پلی‌فیالید D) ماکروکنیدی.

جدول۴- محل نمونه‌برداری و مشخصات جدایه‌ها

ردیف	کد جدایه	گونه شناسایی شده	محل جمع آوری
۱	Fj1	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – مرغداری
۲	Fj2	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – مرغداری
۳	Fj3	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۴	Fj4	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۵	Fj5	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- نقاب- مرغداری
۶	Fj6	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- نقاب- مرغداری
۷	Fj7	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۸	Fj8	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – دامداری
۹	Fj9	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – دامداری
۱۰	Fj10	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – دامداری
۱۱	Fj11	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – دامداری
۱۲	Fj12	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – مرغداری
۱۳	Fj13	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – مرغداری
۱۴	Fj14	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – مرغداری
۱۵	Fj15	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – مرغداری

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴

۱۶	Fj16	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار - (ذرت آمریکا)
۱۷	Fj17	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار - (ذرت آمریکا)
۱۸	Fj18	*F. verticilioides*	مازندران- مرغداری
۱۹	Fj19	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار – مرغداری
۲۰	Fj20	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار - مرغداری
۲۱	Fj21	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار - (ذرت برزیل)
۲۲	Fj22	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار - مرغداری
۲۳	Fj23	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار - مرغداری
۲۴	Fj24	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار - (ذرت اکراین)
۲۵	Fj25	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۲۶	Fj26	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۲۷	Fj27	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۲۸	Fj28	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۲۹	Fj29	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۳۰	Fj30	*F. graminearum*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۳۱	Fj31	*F. graminearum*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۳۲	Fj32	*F. graminearum*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۳۳	Fj33	*F. graminearum*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۳۴	Fj34	*F. proliferatum*	خراسان رضوی- جوین- دامداری
۳۵	Fj35	*F. proliferatum*	خراسان رضوی- جوین- دامداری
۳۶	Fj36	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- سبزوار - (ذرت آرژانتین)
۳۷	Fj37	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۳۸	Fj38	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد- دامداری
۳۹	Fj39	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد - مرغداری
۴۰	Fj40	*F. verticilioides*	خراسان رضوی- مشهد - مرغداری

شناسایی مولکولی جدایه‌های فوزاریوم به روش واکنش PCR اختصاصی

DNA جدایه‌ها با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی (ITS-F/ITS-R) که در جدایه‌های جنس فوزاریوم قطعه‌ای به اندازه ۴۳۱ جفت باز را تکثیر می‌کند (بلام و همکاران ۲۰۰۴)، مورد بررسی قرار گرفت. کلیه‌ی جدایه‌ها با تولید یک قطعه ۴۳۱ جفت بازی از نظر تعلق به جنس فوزاریوم مورد تایید قرار گرفتند (شکل۴)، که نتایج بدست آمده با بررسی یزید و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد. دو جفت آغازگر اختصاصی *F. proliferatum*، PRO1/PRO2 و ITS1/proITS-R قادر هستند در جدایه‌های *F. proliferatum*، قطعه‌ی DNA به ترتیب ۵۸۵ (مول و همکاران ۲۰۰۴) و ۳۹۰ (ویسنتین و همکاران ۲۰۰۹) جفت بازی را تکثیر نمایند. در این تحقیق در تمام

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه‌ها قطعه DNA به طول ۵۸۵ و ۳۹۰ جفت باز تکثیر شد (شکل۴). یک جفت آغازگر اختصاصی *F. graminearum*، Fgr-F/Fgc-R (جورادو و همکاران ۲۰۰۵) در جدایه‌هایی که با بررسی ویژگی‌های ریخت شناختی *F. graminearum* شناسایی شدند، قطعه DNA ۵۰۰~ جفت بازی را تکثیر نمود و نشان داد که جدایه‌ها متعلق به گونه *F. graminearum* می‌باشند (شکل۴).

برای ردیابی گونه *F. verticillioides* دو جفت آغازگر اختصاصی، VER1/2 و verITS-F/ITS4 استفاده شد، که در تمام جدایه‌های این گونه به ترتیب قطعه DNA به طول ۵۷۸ (مول و همکاران ۲۰۰۴) و ۱۷۲ جفت باز (ویسنتین و همکاران ۲۰۰۹) را تکثیر می‌نمایند، مطابق انتظار جدایه‌هایی که از نظر ریخت شناختی *F. verticillioides* شناسایی شدند با تکثیر قطعات DNA مزبور مورد تایید قرار گرفتند (شکل۴). نتایج بررسی‌های مولکولی این بخش از تحقیق، تأییدی بر نتایج ریخت شناختی جدایه‌ها بودند.

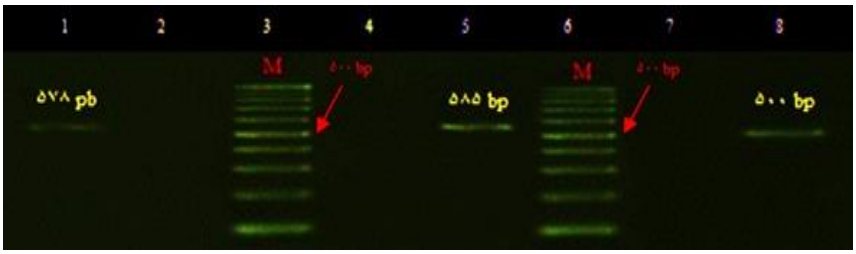
شکل۴- نمایی کلی از محصول PCR شناسایی جنس فوزاریوم و گونه‌های متعلق به آن. چاهک‌های ۱،۳،۵،۷،۱۰،۱۲به ترتیب از چپ به راست) آغازگرهای: VER1/2. PRO1/2. verITS-F/ITS4. proITS-R/ITS1. ITS F/R. Fgr-F/Fgc-R. چاهک ۱و۵) *F. verticillioides*. چاهک ۲و۶) کنترل منفی *F. verticillioides*. چاهک ۳و۷) *F. proliferatum*. چاهک ۴و۸) کنترل منفی *F. proliferatum*. چاهک ۱۰) جنس *Fusarium*. چاهک ۹) کنترل منفی جنس *Fusarium*. چاهک ۱۱و۱۲) کنترل منفی، *F. graminearum*. M) DNA سایز مارکر ۱۰۰bp (Ladder, ThermoScientific - Fermentas, Canada).

ردیابی مولکولی گونه‌های فوزاریوم در دانه‌های ذرت

نتایج حاصل از واکنش PCR اختصاصی، با تولید قطعه DNA ۵۷۸ جفت بازی متعلق به جفت آغازگر اختصاصی VER1/2 (*F. verticillioides*)، قطعه DNA ۵۸۵ جفت بازی متعلق به جفت آغازگر اختصاصی PRO1/2 (*F. proliferatum*) و قطعه DNA ۵۰۰~ جفت بازی متعلق به جفت آغازگر اختصاصی Fgr-F/Fgc-R (*F. graminearum*)، نتایج جداسازی و شناسایی گونه-های فوزاریوم از دانه‌های ذرت را تکمیل نمود (شکل ۵). نتایج بدست آمده با مطالعه‌ی، ربیعی مطلق و همکاران (۱۳۸۹) در ردیابی گونه*F. proliferatum* از بذور آلوده پیاز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به روش PCR، مطابقت دارد.

Archive of SID

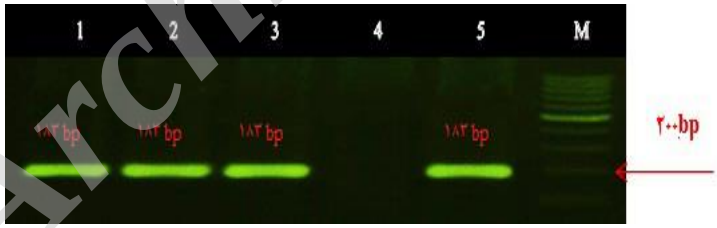
www.SID.ir



شکل۵- نمای کلی محصول **PCR** ردیابی گونه‌های فوزاریوم از دانه ذرت. چاهک ۲،۱) گونه ***F. verticillioides*** با آغازگر **VER1/2** و تکثیر نوار ۵۷۸ جفت بازی،کنترل منفی. چاهک ۴،۵) کنترل منفی، گونه ***F. proliferatum*** با آغازگر **PRO1/2** و تکثیر نوار ۵۸۵ جفت بازی. چاهک ۸،۷) کنترل منفی، گونه ***F. graminearum*** با آغازگر **Fgc-F/Fgc-R** و تکثیر نوار ۵۰۰ جفت بازی. چاهک ۳ و ۶ **DNA (M** سایز مارکر **۱۰۰bp (Ladder, ThermoScientific - Fermentas, Canada)**.

بررسی پتانسیل تولید فومونیزین در گونه *F. verticillioides*

در این تحقیق گونه‌های فوزاریوم از نظر دارا بودن پتانسیل تولید فومونیزین و یا بالعکس مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به غالب بودن جدایه‌های متعلق به گونه *F. verticillioides* کارهای مولکولی این بخش از تحقیق، بر اساس جدایه‌های متعلق به این گونه صورت گرفت. از ۳۴ جدایه بدست آمده از این گونه، تعداد ۱۵ جدایه با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی (FUM1 F/R) که در گونه‌های فوزاریوم مولد فومونیزین قطعه DNA ۱۸۳ جفت بازی را تکثیر می‌نماید و توسط بلام و همکاران (۲۰۰۴) مورد بررسی قرار گرفته است، مطابق انتظار این آغازگر توانست قطعه DNA به اندازه ۱۸۳ جفت باز را در تمام ۱۵ جدایه مورد بررسی، تولید نماید. در حالی که قطعه DNA مزبور در نمونه شاهد (*Aspergillus flavus*) مشاهده نگردید (شکل ۶).



شکل۶- محصول **PCR** بررسی پتانسیل تولید فومونیزین توسط آغازگر **FUM1 F/R** در ***F. verticillioides***. چاهک‌های ۵،۳،۲،۱) ***F. verticillioides*** دارای پتانسیل تولید فومونیزین. چاهک ۴) ***A. flavus*** فاقد پتانسیل تولید فومونیزین.**M) DNA** سایز مارکر **۱۰۰bp (Ladder, ThermoScientific - Fermentas, Canada)**.

نتیجه‌گیری و بحث

پوسیدگی فوزاریومی خوشه یا بلال یکی از متداول‌ترین بیماری‌های ذرت می‌باشد. بر اساس مطالعات انجام گرفته روی عامل این بیماری در ایران و سایر کشورها، گونه *F. verticillioides* به عنوان گونه‌ی غالب شناسایی شده است (زمانی و همکاران ۲۰۰۰، غیاصیان و همکاران ۲۰۰۴). در مطالعات قبلی شمال ایران، این گونه به عنوان قارچ بذرزاد با میزان شیوع بالا در مزارع برنج، ذرت و گندم یافت شده است (زارع و ارشاد ۱۹۹۷). با توجه به اهمیت این بیماری، نمونه‌برداری از دانه‌های ذرت دارای

Archive of SID

www.SID.ir

علائم بیماری قارچی موجود در سیلوهای دامداری و مرغداری‌های مختلف استان خراسان رضوی صورت پذیرفت. براساس بررسی‌های ریخت شناختی و مولکولی آلودگی به قارچ فوزاریوم عامل بیمارگر در تمام نمونه‌های جمع آوری شده مشاهده گردید که در این میان، *F. verticillioides* به عنوان شایع‌ترین گونه با شیوع ۸۵ درصد نسبت به دو گونه *F. graminearum* (شیوع ۱۰٪) و *F. proliferatum* (شیوع ۲٪) جداسازی و شناسایی شد. بالا بودن شیوع این قارچ بر اساس مطالعات دیگر به اثبات رسیده است. آکونا و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی شیوع گونه‌های فوزاریوم، نشان دادند که نمونه‌های ذرت مورد بررسی ۱۰۰٪ دارای آلودگی قارچی بوده و *F. verticillioides* به عنوان یکی از گونه‌های غالب بالاترین فراوانی (۷۰/۸٪) را داشته است و در برزیل نیز این میزان آلودگی در دانه‌های ذرت نیز گزارش شده است (روکا و همکاران ۲۰۰۹). از جمله بالاترین فراوانی که این گونه به خود اختصاص می‌دهد، متعلق به مطالعه‌ی اخیر عبدالفتاح و همکاران (۲۰۱۵) روی ذرت در مصر می‌باشد که بر اساس نتایج ریخت شناختی و مولکولی *F. verticillioides* با فراوانی ۹۶/۴٪ گزارش شده است. درصد غالب بودن این گونه در مطالعات مختلف، متفاوت گزارش شده ولی این مهم شایان ذکر است که نه در تمام بلکه در اکثر تحقیق‌های انجام شده روی عامل پوسیدگی فوزاریومی در ذرت، *F. verticillioides* به عنوان گونه‌ی غالب اعلام شده است.

شناسایی گونه‌های جنس فوزاریوم با استفاده از روش‌های معمول و بر اساس داده‌های ریخت شناختی به دلیل هم‌پوشانی این خصوصیات به سختی امکان پذیر است. بدین منظور بکارگیری تکنیک‌های مولکولی نظیر PCR، در جهت تشخیص نوع گونه بسیار دقیق، حساس و سریع عمل می‌نمایند (روسل و پترسون ۲۰۰۶،). دو گونه *F. verticillioides* و *F. proliferatum* به لحاظ خصوصیات ریخت شناختی بسیار مشابه هستند و تنها وجه تمایز و تفکیک آنها، سلول‌های کنیدی‌زا یا فیالیدها می‌باشد که در گونه *F. verticillioides* کنیدی‌ها از سلول‌های کنیدی‌زای دارای یک منفذ (مونوفیالید) و به ندرت دارای دو منفذ (پلی‌فیالید) تشکیل می‌گردند، در حالی که در گونه *F. proliferatum* کنیدی‌ها از پلی‌فیالیدها تشکیل می‌یابند. با توجه به خصوصیات مزبور شناسایی دقیق این گونه‌ها با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی به تنهایی کافی و دقیق نمی‌باشد و بررسی‌های مولکولی جهت شناسایی دقیق آنها ضروری می‌باشد (لزلی و سومرل ۲۰۰۶). ناحیه‌ی فاصله انداز رونویسی شونده داخلی (Internal Transcribed Specer) یکی از انواع نشانگرهای مولکولی است که در دهه‌های اخیر کاربرد بسیاری در پژوهش‌های فیلوژنی و تکنیک DNA بارکدینگ پیدا کرده است (شولتز و همکاران ۲۰۰۹) که در آن بخش کوچکی از ژنوم گیاه توالی‌یابی میشود و برای شناسایی و تعیین ارتباط بین گونه‌های مختلف یک جنس مورد استفاده قرار می‌گیرد (هولینگزورث و همکاران ۲۰۰۹). به منظور تایید نتایج شناسایی در واکنش PCR اختصاصی بخشی از توالی ناحیه ITS، IGS و توالی ژن *Calmodulin*، جایگاه‌های متعلق به جنس فوزاریوم و گونه‌های *F. verticillioides*، *F. graminearum* و *F. proliferatum* تکثیر گردید، گونه‌های مزبور شناسایی و دو گونه *F. verticillioides* و *F. proliferatum* از یکدیگر تفکیک شدند. ردیابی آلودگی فوزاریومی دانه‌های ذرت با تکثیر بخشی از توالی ناحیه IGS و توالی ژن *Calmodulin* متعلق به گونه‌های فوزاریوم همراه با ذرت (سه گونه نام‌برده) از DNA ژنومی دانه‌ی ذرت ردیابی شدند و نتایج شناسایی ریخت‌شناختی تکمیل گردید. در مطالعات دیگر، با استفاده از آغازگر اختصاصی جنس فوزاریوم مبتنی بر ناحیه ITS آلودگی فوزاریومی در خوراک دام مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته است (یزید و همکاران ۲۰۱۱)، همچنین ویسنتین و همکاران (۲۰۰۹) با توالی یابی ناحیه ITS دو گونه *F. verticillioids* و *F. proliferatum* که از نظر ریخت شناختی مشابه یکدیگر هستند را تفکیک نمودند. به علاوه

Archive of SID

www.SID.ir

در شناسایی گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی ذرت در چین، بر اساس توالی ژن *TEF-1*، کمپلکس گونه *F. graminearum* در چین سه گونه مستقل *F. graminearum*، *F. meridionale* و *F. boothii* را شامل شد (دووان و همکاران ۲۰۱۶). نتایج بدست آمده از شناسایی وردیابی مولکولی گونه‌های *F. verticillioides*، *F. proliferatum* و *F. graminearum* با نتایج مطالعات ذکر شده مطابقت دارد.

قارچ *F. verticillioides* به عنوان عامل بیمارگر ذرت پتانسیل بالایی جهت تولید فومونیزین دارد که سلامت انسان و دام را به مخاطره می‌اندازد. ردیابی قارچ‌های مولد مایکوتوکسین با روشهای سنتی کار پر زحمت و وقت-گیری می‌باشد که نیاز به تجربه در تاکسونومی قارچ‌ها و همچنین آنالیزهای شیمیایی دارد (اسرینیواسا و همکاران ۲۰۰۸، هالستنس ۲۰۰۸)، به منظور برآورده شدن این هدف روش‌های مولکولی نظیر PCR با تمرکز بر شناسایی فوزاریوم‌های عامل بیمارگر گیاه و فوزاریوم‌های توکسین-زا مورد استفاده قرار گرفته‌اند (اودانل و همکاران ۱۹۹۸، جیمنز و همکاران ۲۰۰۰). در این راستا با در نظر گرفتن گونه *F. verticillioides* به عنوان اندیکاتور، در واکنش PCR اختصاصی به همراه آغازگر اختصاصی، ژن *fum1* در این گونه ردیابی گردید. این در حالی است که ژن مورد نظر در گونه *Aspergillus flavus* که فاقد پتانسیل تولید فومونیزین می‌باشد، مطابق انتظار ردیابی نشد. با استفاده از این روش گونه‌های فوزاریوم جداسازی شده از دانه ذرت در مصر(عبد الفتاح و همکاران ۲۰۱۵) و چین (دووان و همکاران ۲۰۱۶) دارای پتانسیل تولید فومونیزین بوده‌اند. اسرینیواسا و همکاران (۲۰۰۸) نیز با تکثیر توالی ژن *fum1*، گونه‌های *F. verticillioides* مولد و غیر مولد فومونیزین را تفکیک نمودند و نتایج حاصل، پتانسیل تولید فومونیزین در تمام جدایه‌های گونه مزبور و عدم پتانسیل تولید این مایکوتوکسین در گونه *Aspergillus flavus* را نشان داد. در تحقیق حاضر کلیه‌ی جدایه‌های آزمایش شده، دارای پتانسیل تولید فومونیزین می‌باشند، که با تحقیقات فوق الذکر مطابقت دارد.

یافته‌های بدست آمده از این بررسی نشان داد که تمام نمونه‌های ذرت که در شرایط انباری قرار داشته‌اند، آلوده به گونه‌های متعلق به قارچ فوزاریوم می‌باشند که در این میان گونه *F. verticillioides* بالاترین فراوانی را به خود اختصاص داده است. از آنجایی که دانه ذرت استعداد زیادی برای جذب مایکوتوکسین‌ها به عنوان ترکیباتی سمی دارد، بنابراین آلودگی دانه‌ی ذرت به مایکوتوکسین علاوه بر اینکه اقتصاد جامعه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، تهدید قابل ملاحظه‌ای برای سلامت انسان و دام به جهت عوارض ناشی از آن می‌باشد و این مشکل به دلیل تقاضا برای افزایش غذا، افزایش پیدا خواهد کرد. استفاده از تکنیک مولکولی توسعه یافته و بررسی ارتباط پتانسیل تولید مایکوتوکسین با ویژگی‌های ژنتیکی گونه‌های متعلق به قارچ فوزاریوم در مطالعات بعدی حائز اهمیت می‌باشد.

منابع

آشناگر ل، رضایی س، درویش‌نیا م، و سیاهپوش س، ۱۳۸۹. شناسایی عوامل پوسیدگی فوزاریومی بلال در استان لرستان. صفحه ۱ خلاصه مقاله های نوزدهمین کنگره‌ی گیاهپزشکی ایران، تهران، ایران.

پرچمیان م، رهجو و، زمانی م، پیرنیا م، و ذهابی ع، ۱۳۸۹. جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچ عامل پوسیدگی فوزاریومی خوشه ذرت. صفحه ۶۲ خلاصه مقاله های نوزدهمین کنگره‌ی گیاهپزشکی ایران، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران، تهران، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

داوودی ع، ۱۳۸۱. معرفی قارچ عامل پوسیدگی طوقه ذرت در قزوین. صفحه ۸۲ خلاصه مقاله های پانزدهمین کنگره‌ی گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه، ایران.

داوودی ع، و مهریان ف، ۱۳۸۳. شناسایی عوامل بیماریزای قارچی خوشه و دانه ذرت در منطقه قزوین. صفحه ۱۱۵ خلاصه مقاله های شانزدهمین کنگره‌ی گیاهپزشکی ایران، تبریز، ایران.

ربیعی مطلق ا، فلاحتی رستگار م، روحانی ح، جعفرپور ب و جهان بخش و، ۱۳۸۹. بررسی فوزاریوم‌های بذرزاد پیاز دراستان های خراسان شمالی و رضوی. نشریه حفاظت گیاهان، جلد ۲۴، شماره ۲. صفحه‌های ۱۳۷ تا ۱۴۴.

زمانی م، ۱۳۸۳. بررسی پوسیدگی ساقه ذرت و ارزیابی تعدادی از ترکیبات با استفاده از آلودگی مصنوعی نسبت به گونه غالب. صفحه ۱۱۴ خلاصه مقاله های شانزدهمین کنگره‌ی گیاهپزشکی ایران، تبریز، ایران.

عظیمی ص، ۱۳۹۰. بررسی پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت در استان خوزستان. مجله تحقیقات غلات، جلد۱، شماره ۱. صفحه‌های ۷۵ تا ۸۳.

کاظمی ه، و مومنی ح، ۱۳۹۵. گزارش قارچ *Fusarium graminearum* و فرم جنسی آن از ذرت در منطقه دشت مغان. جلد ۱- صفحه ۱۴۸ خلاصه مقاله‌های بیست ودومین کنگره گیاهپزشکی ایران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.

محمدی ع، فرخی‌نژاد ر، و میناسیان و، ۱۳۸۱. تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *Fusarium moniliforme* جداسازی شده از نیشکر و بذور ذرت با استفاده از گروههای سازگار رویشی و تعیین ارتباط گروهها با بیماریزایی. صفحه ۱۳۵ خلاصه مقاله های پانزدهمین کنگره‌ی گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه، ایران.

مهریان ف، ۱۳۷۰. معرفی عامل بیماریزای خوشه ذرت در استان‌های مازندران و گیلان. صفحه ۲۸۹ خلاصه مقاله های چهاردهمین کنگره‌ی گیاهپزشکی ایران، اصفهان، ایران.

نادرپور م، ۱۳۸۳. مایکوفلور بذر ذرت هیبرید رقم سینگل کراس ۷۰۴ دشت مغان. صفحه ۱۲۰ خلاصه مقاله های شانزدهمین کنگره‌ی گیاهپزشکی ایران، تبریز، ایران.

Abd-El Fatah SI, Naguib MM, El-Hossiny EN, Sultan YY, Abodalam TH and Yli-Mattila T, 2015. Molecular versus Morphological Identification of *Fusarium* spp. isolated from Egyptian corn. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical 6(4): 1813-1822.

Acuna A, Maria CL, Maria CDeG and Gonzalo JD, 2005. Prevalence of *Fusarium* species of the *Liseola* section on selected Colombian animal feedstuffs and their ability to produce fumonisins. Mycopathologia 160(1):63-66.

Bluhm BM, Cousin MA and Woloshuk CP, 2004. Multiplex real-time PCR detection of fumonisin producing and trichothecene producing groups of *Fusarium* species. Journal of Food Protection 67(3): 536–543.

Burgess LW, Summerell BA, Bullock P and Backhouse D, 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. Department of Crop Science. 3rd ed. University of Sydney.

Duan C, Qin Z, Yang Zh, Li W, Sun S, Zhu Z and W X, 2016. Identification of Pathogenic *Fusarium* spp. Causing Maize Ear Rot and Potential Mycotoxin Production in China. Toxins 8(6): 1-17.

Archive of SID

www.SID.ir

Ghiasian SA, Kord-Bacheh P, Rezayat SM, Maghsood AH and Taherkhani H, 2004. Mycoflora of Iranian Maize Harvested in the Main Production Areas in 2000. Mycopathologia 158(1): 113-121.

Gonzalez-Jaen MT, Mirete S, Patino B, Lopez-Errasquin E and Covadonga V, 2004. Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin-producing strains of *Fusarium verticillioides*. European Journal of Plant Pathology 110(5): 525–532.

Halstensen AS, 2008. Species-specific fungal DNA in airborne dust as surrogate for occupational mycotoxin exposure. International Journal of Molecular Science 9(12): 2543-2558.

Hendricks K, 1999. Fumonisins and neural tube defects in south Texas. Epidemiology 10(2): 198-200.

Hollingsworth ML, Andra Clark ALEX, Forrest LL, Richardson J, Pennington R, Long DG and Hollingsworth PM, 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. Molecular Ecology Resources 9(2): 439-457.

Jimenez M, Rodrıguez S, Mateo JJ, Gil JV, Mateo R, 2000. Characterization of *Gibberella fujikuroi* complex isolates by fumonisin B1 and B2 analysis and by RAPD and restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Systematic and Applied Microbiology 23(4):546-55.

Jurado M, Marín P, Callejas C, Moretti A, Vázquez C and González-Jaén MT, 2010. Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. Food Microbiology 27(1): 50–57.

Jurado M,Vázquez C, Patiño B and González-Jaén MT, 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. Systematic and Applied Microbiology 28(6):562–568.

Leslie JF and Summerell BA, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell.

Marasas WFO, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Waes JG-v, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WCA, Allegood J, Martinez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Jr AHM, 2004. Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. Journal of Nutrition 134(4): 711-716.

Mule G, Susca A, Stea G and Moretti A, 2004. Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on *Calmodulin* gene sequences. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 230(2): 235-240.

Munkvold GP, 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. European Journal of Plant Pathology 109(7): 705-713.

Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO, 1983. *Fusarium* species an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press.

O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI, 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycology 90(3):465-93.

Rocha LO, Nakai VK, Braghini R, Reis TA, Kobashigawa E, Corrêa B, 2009. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. International Journal of Molecular Sciences 10(11): 5090–5103.

Archive of SID

www.SID.ir

Russell R, Paterson M, 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. Process Biochemistry 41(7):1467-1474.

Schultz J and Wolf M, 2009. ITS2 sequence structure analysis in phylogenetics: a how to manual for molecular systematics. Molecular Phylogenetics and Evolution 52(2): 520-523.

Sreenivasa MY, Dass RS, Raj APC and Janardhana GR, 2008. PCR method for the detection of genus *Fusarium* and fumonisin-producing isolates from freshly harvested sorghum grains grown In Karnataka, India. Journal of food safety 28(2): 247-236.

Turner NW, Subrahmanyam S and Piletsky SA, 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. Analytica Chimica Acta 632(2):168-80.

Visentin I, Tamietti G, Valentino D, Portis E, Karlovsky P, Moretti A, Cardinale F, 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. Mycological Research 113(10): 1137-1145.

White T J, Bruns T, Lee S and Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), PCR Protocols : A guide to Methods and Applications Academic Press, New York, USA.

Yazeed HAE, Hassan A, Moghaieb REA, Hamed M, and Refai M, 2011. Molecular detection of fumonisin-producing *Fusarium* species in animal feeds using polymerase chain reaction (PCR). Journal of Applied Sciences Research 7(4): 420–427.

Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Parikka P, Konstantinova P, and Gagkaeva TY, 2004. Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and north-western Russia. European Journal of Plant Pathology 110(5): 573-585.

Zamani, M., Alizadeh, A. and Choukan, R. 2000. Evaluation of resistance of selected corn lines to *Fusarium moniliforme* ear rot. Seed and Plant 15(4): 331-342.

Zare R and Ershad D, 1997. *Fusarium* species isolated from cereals in Gorgan area. Iranian Journal of Plant Pathology 33(1/2): 1-14.

Archive of SID

www.SID.ir

Detection of Mycotoxins Producing of *Fusarium* Species Using Morphological and Molecular Characteristics in Corn

N Javanbakht-Avval[1*], M Moradzadeh-Esakandari[2], H Afzali[2] and S M Okhovvat[3]

[1]Former MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Kashmar University of Science and Culture, Iran.
[2]Respectively, Assistant Professor and Instructor, Department of Plant Protection, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Khorasan-Razavi Province, Mashhad, Iran.
[3]Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
*Corresponding author: n_javanbakht1@yahoo.com

Received: 26 September 2016 Accepted:14 October 2017

Abstract

Fusarium, a phytopathogenic fungus in fields of corn, not only reduces the quality and quantity of crops but also causes food contamination and endangers people's health by producing some mycotoxins such as Fumonisin (FUM). In the present study, samples were collected from fungal disease symptoms-showing corn from different livestock and poultry storage in Khorasan-Razavi province. Having placed the corn on PDA and WA, isolates belonging to *Fusarium* genus were isolated and purified. As a result, a total of 40 isolates were obtained among which three species were identified as *Fusarium verticillioides*, *F. graminearum* and *F. proliferatum* with isolated frequencies of 34, 4 and 2, respectively. To support these results, DNA was extracted from the isolates from corn seeds and the fungal ribosomal DNA was amplified using PCR with species- specific primers. In addition, using PCR with the specific primers (FUM1 F/R) 15 isolates of *F. verticillioides*, as the prevalent species were examined for fumonisin production. The results indicated that all of the examined *F. verticllioides* isolates gave the expected fragment with 183 bp in size. Therefore, this study demonstrated that *F. verticllioides* isolates genetically have a potential for fumonisin-production. It also showed that the PCR-based technique can be used for the identification, distinction and detection of the *Fusarium* species.

Keywords: Prevalent species, *Fusarium verticillioids*, Fumonisin, Specific Primer.

Archive of SID

www.SID.ir