آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۹، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۰

بررسی گونه‌های فوزاریوم و تعیین مقدار داکسی نیوالنول در ذرت جمع‌آوری شده از منطقه مغان

***Fusarium* species and Deoxynivalenol in maize product of Moqan region**

زهرا علی‌اکبری[۱]*، منصوره میرابوالفتحی[۲]، حشمت‌اله امینیان[۱]و روح اله کرمی‌اسبو[۲]

۱- بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران

۲- آزمایشگاه تحقیقات مایکوتوکسین‌ها مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۸، تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۰)

چکیده

یکی از بیماری‌های مهم ذرت، پوسیدگی خوشه ذرت می‌باشد که توسط گونه‌های مهم فوزاریوم ایجاد می‌شود. در این بیماری دانه‌ها می‌توانند به مایکوتوکسین‌هایی از گروه تریکوتسن‌ها آلوده شوند. در طی سال‌های ۸۷- ۱۳۸۶ از مزارع ذرت منطقه مغان بازدید و تعداد ۴۰ نمونه، در مرحله برداشت و قبل از مرحله سیلو به طور تصادفی به طریقی جمع‌آوری شد تا بتواند تفاوت‌های اقلیمی و آب و هوایی نواحی مختلف منطقه را پوشش دهد. دانه‌ها از نظر آلودگی گونه‌های فوزاریوم و داکسی نیوالنول (DON) بررسی شدند. برای جداسازی گونه‌های فوزاریوم از محیط کشت‌های Nash-Snyder، PDA و Czapek استفاده شد. سپس جدایه‌های حاصل تک اسپور شده، با استفاده از محیط‌های PDA و CLA بررسی و با استفاده از منابع معتبر در سطح گونه شناسایی شدند. گونه‌های فوزاریوم جدا شده از نمونه‌های ذرت مغان و فراوانی آن‌ها عبارت بودند از: *F. verticillioides*، ۵۷/۶۵٪، *F. proliferatum*، ۳۳/۸۷٪، *F. nygamai*، ۴/۸۶٪ و *F. oxysporum*، ۳/۰۶٪. میزان DON نمونه‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و ستون‌های ایمنوافینیتی (IAC) بررسی شد. نتایج

***Corresponding author:** n.aliakbari@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

تجزیه نمونه‌ها نشان داد، آلودگی بـه DON در ۴۵٪ از کـل نمونـه‌هـا وجـود دارد آلـودگی در نمونـه‌هـای آنـالیز شـده از حـداقل ۵۹/۴ تـا حـداکثر ۵۴۲/۵۵ ng/g و میـانگین کـل آلـودگی ۹۵/۳۰ ng/g بود که این مقدار از حد مجاز تعیـین شـده بـرای ذرت در جهـان (1 ppm) کمتـر می‌باشد. برای بررسی امکان تولید DON توسط جدایه‌های فوزاریوم دانه ذرت مغان، تعـداد ۱۰ جدایه (از هر گونه دو جدایه) به عنوان نماینده انتخاب شد و میزان داکسی نیوالنول تولید شده توسط هر جدایـه پـس از یـک هفتـه در دمـای ۲۷– ۲۵ و دو هفتـه در ۱۲ درجـه سلـسیوس اندازه‌گیری شد نتایج نشان داد که جدایه‌هـای *F. nygamai*، *F. oxysporum* و *F. verticillioides*، DON تولید نکردند و دو جدایـ *F. proliferatum*، DON تولید نمود. به منظور امکان تولید DON توسط جدایـ *F. proliferatum* در ذرت، این جدایه مجدداً به بلال مایه‌زنی شد و پس از ده روز میزان DON در دانه‌های ذرت‌های مذکور ردیابی گردید. نتـایج نـشان داد کـه جدایـه اخیـر در دانه‌های ذرت می‌تواند DON تولید نماید.

واژه‌های کلیدی: داکسی نیوالنول، فوزاریوم، ذرت.

Abstract

Ear rot of corn caused by *Fusarium* species could create an overall comprehensive problem. *Fusarium* species can produce mycotoxins such as trichothecenes which threat the human's health. Cultivation of maize in Moqhan region was about 10000 hectares. Forty (5-10 Kg) samples each including 10 subsamples of corn ears collected at harvest time, kernels separated from the ears, dried and divided into two parts: one part for mycological studies and another part for toxicology studies. The media Nash-Snyder, PDA and Czapek were used for isolation, and PDA and CLA for identification. Deoxynivalenol detection and measurement of the corn samples were carried out using IAC - HPLC (High Performance Liquid Chromatography and immunoaffinity Columns). To study the potential of deoxynivalenol production of the isolates, ten isolates (two of each species) were selected as the representative of each species, the potential of DON production for each isolate was measured after one week incubation at 25-27ºC and two weeks at 12ºC alternatively. To ensure the deoxynivalenol production of the two F. *proliferatum* isolates, these isolates inoculated artificially in corn ears and after 10 days the amount of DON was detected in the grains. *Fusarium* species and the frequency of isolation were *F. verticillioides*, 47.65%;

Archive of SID

www.SID.ir

F. proliferatum, 33.873%, 15.33%; *F. nygamai*, 4.86%; *F. oxysporum* ,3.06 . Deoxynivalenol was detected in 45% of the samples. The total mean of contamination was 45% and the range of contamination was 59.4 – 542.55ng/g with the mean of 95.30. ng/g. Among the *Fusarium* species isolates two isolates of *F. proliferatum* could produce DON in artificial conditions.
Key words: deoxynivalenol, *Fusarium* species, corn.

مقدمه

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ذرت در سراسر جهان پوسیدگی خوشه می‌باشد این بیماری توسط گونه‌های فوزاریوم ایجاد می‌شود و سبب آلودگی دانه‌های ذرت به مایکوتوکسین‌های خطرناکی همچون "تریکوتسن‌ها"می‌شود بیماری‌هایی که به سبب گونه‌های فوزاریوم در خوشه‌های ذرت ایجاد می‌شوند، شامل پوسیدگی قرمز خوشه یا پوسیدگی جیبرلایی خوشه (*Gibberella* ear rot) و)پوسیدگی صورتی خوشه یا پوسیدگی فوزاریومی‌خوشه (*Fusarium* ear rot) (Munkvold, 2003) می‌باشند.

بیماری‌های فوزاریومی غیر از دانه و خوشه در بخش‌های دیگر گیاه ذرت شامل محور زیر برگ، دمبرگ و غلاف برگ نیز دیده می‌شوند و از این رو فوزاریوتوکسین‌ها می‌توانند به غیر از ساقه و دانه در قسمت‌های دیگر گیاه ذرت نیز تولید شوند (Menna *et al*., 1997) .

پوسیدگی فوزاریومی‌خوشه با عامل *Fusarium graminearum* معمولاً در آ و هوای گرم و خشک و در طول دوره دانه دهی رخ می‌دهد. وقوع پوسیدگی جیبرلایی خوشه در شرایط رطوبت بالا دمای ملایم و باران زیاد در طی دوره بلوغ و در مرحله کاکل ذرت، ایجاد می‌گردد (Sutton, 1982). اسپورهای جنسی (آسکوسپورها) قارچ عامل به وسیله باد و اسپورهای غیر جنسی (کنیدیوم‌ها توسط قطرات باران انتشار می‌یابند و گیاهان میزبان را آلوده می‌سازند (Tschanz *et al*., 1976). گونه *F. culmorum* نیز در اروپا به عنوان عامل بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Munkvold, 2003).

پوسیدگی صورتی خوشه یا پوسیدگی فوزاریومی خوشه توسط *F. verticillioides* تولید می‌شود. دانه‌های ذرت و گیاهانی که هیچ نشانه‌ای از بیماری ندارند، اغلب به این گونه آلوده می‌شوند. دانه‌ها ممکن است از راه‌های مختلفی آلوده شوند. مهم‌ترین راه، کاکل‌های

Archive of SID

www.SID.ir

ذرت می‌باشد. اسپورهای هوایی این قارچ می‌توانند به کاکل آن منتقل شوند و در آنجا اسپورها جوانه زده و کاکل ذرت را بخصوص هنگامی که سبز – قهوه‌ای هستند آلوده سازند (Abbas *et al.*, 1988).

داکسی نیوالنول (DON) از خانواده تریکوتسن‌ها است که در بسیاری از مواقع در مواد غذایی تولید می‌شود (Schollenberger *et al*., 2002; Schaafsma *et al*., 2001) این مایکوتوکسین توسط برخی از گونه‌های فوزاریوم تولید شده و به علت اثرات سمی بالا برای سلول‌ها، ایجاد اختلال در سیستم ایمنی، سرطان زایی و ایجاد عوارض کلیوی، مصرف مواد غذایی آلوده به آن سلامتی انسان و حیوانات را تهدید می‌کند. این مایکوتوکسین سبب کم اشتهایی خوک‌ها و کم شدن وزن آن‌ها می‌شود (Schaafsma *et al*., 2001). غلات از جمله ذرت، گندم و جو به DON آلوده می‌شوند. گونه‌های فوزاریوم مولد داکسی نیوالنول می‌تواند در مناطق مرطوب به خوبی رشد کرده و DON تولید نماید. منطقه مغان از جمله مناطق مهم تولید ذرت ایران می‌باشد. در این تحقیق میزان آلودگی طبیعی ذرت مغان به DON و گونه‌های فوزاریوم همراه ذرت در مرحله برداشت مشخص گردید و احتمال تولید DON توسط جدایه‌های مذکور بررسی گردید.

روش بررسی

۱- نمونه‌برداری: نمونه‌گیری به طور تصادفی و به صورت لایه‌ای انجام شد، بدین صورت که از هر ۵۰۰ هکتار ۱۰ محل به طور تصادفی انتخاب شد و۱۰ زیر نمونه یک کیلوگرمی جمع‌آوری و زیر نمونه‌ها با همدیگر مخلوط و سپس در قالب یک نمونه بررسی شدند. به طور کلی نمونه‌ها به نحو ی‌جمع‌آوری گردید که تفاوت‌های اقلیمی و آب و هوایی نواحی مختلف را بپوشاند. جمع‌آوری نمونه ضمن حرکت در مزرعه در فواصل زمانی و مکانی مناسب انجام گرفت و ذرت‌هایی که دارای علائم بیماری فوزاریومی خوشه و یا آلودگی قارچی بودند برداشته شدند (شکل ۱) بلافاصله بعد از نمونه برداری دانه‌ها از چوب بلال جدا شده و خشک گردید. ۵۰۰ گرم از هر نمونه جهت مطالعات قارچ‌شناسی در یخچال نگهدار ی و بقیه جهت پایش DON آرد شد.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- نمونه‌های آلوده ذرت

Fig 1- Infected corn samples

۲- جداسازی: بدین منظور از محیط کشت‌های Nash-Snyder و Potato Dextrose Agar استفاده شد (Nelson *et al*., 1983).

۲-۱- محیط کشت اختصاصی Nash-Snyder (Pepton PCNB Agar): محیط پایه PRA شامل مواد زیر بود:

Teraclor (حاوی ۰/۷۵ مادهٔ PCNB یک گرم، Pepton ۱۵گرم، KH_2PO_4 یک گرم، $7\ H_2O$ و $MgSO_4$ نیم گرم، Agar ۲۰ گرم، آب مقطر ۱ لیتر.

پس از اینکه محیط کشت پایه فوق در اتوکلاو سترون گردید و دمای آن به ۵۵ درجه سلسیوس رسید، یک گرم سولفات اسپرپتومایسین و ۰/۱۲ گرم سولفات نئومایسین به همراه ۱۰میلی‌لیتر آب مقطر سترون به آن اضافه شد.

۲-۲- محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA): از این محیط کشت برای جداسازی، تعیین نرخ رشد جدایه و تعیین الگوی رویش جدایه‌های فوزاریوم استفاده شد.

۳- شناسایی: برای شناسایی جدایه‌های فوزاریوم از محیط‌های کشت SNA و CLA استفاده شد (Nelson *et al*., 1983). قطر پرگنه برای تمام جدایه‌ها، در محیط PDA در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سلسیوس و در مدت ۱٤-۱۰ روز اندازه‌گیری شد. رنگ پرگنه در محیط PDA به خصوص از سطح زیرین به عنوان یک صفت در تشخیص جدایه‌ها به کار گرفته شد. به این منظور، از هر جدایه فوزاریوم رشد یافته دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر به ظروف پتری حاوی

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت PDA انتقال داده شد و در انکوباتور با شرایط استاندارد نگهداری شدند. رنگ پرگنه (Nelson *et al.*, 1983) پس از یک هفته یادداشت گردید. برای شناسایی جدایه‌ها بعد از جمع‌آوری تمام اطلاعات لازم، از منابع معتبر شناسایی، از جمله کلیدهای شناسایی فوزاریوم (Nelson *et al.*, 1983; Leslie and summerell, 2006) استفاده شد.

٤- اندازه‌گیری مایکوتوکسین داکسی نیو النول:

۴-۱- تهیه پودر ذرت: تمامی‌دانه‌های ذرت هر نمونه به کمک آسیاب تجزیه‌ای رومر (Romer) آسیاب و نمونه‌ای یکنواخت تهیه شد .

- استخراج و تصفیه داکسی نیوالنول

نمونه‌های ذرت آسیاب شده تا زمان آنالیز در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند. ۲۵ گرم از نمونه پس از هم دما شدن نمونه‌ها با محیط آزمایشگاه با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر (تکان دهنده عمودی) با سرعت ۱۵۰ تکان در دقیقه هم زده شد. محتویات هر فلاسک با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و پس از آن مجدداً با استفاده از فیلتر (GF/A glass microfibre) (Whatman International Ltd, England) صاف شد. عمل تصفیه (Clean up) و استخراج داکسی نیوالنول با استفاده از ستون‌های ایمنوافینیتی DONprep ساخت کارخانه (R-Biopharm) انجام گرفت بیست میلی‌لیتر از عصاره نمونه استخراجی از ستون عبور داده شد(سرعت عبور محلول از ستون ۱ قطره در هر ثانیه تنظیم گردید)، سپس ستون با ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه شست و شو گردید و در نهایت داکسی نیوالنول موجود در ستون با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول از ستون جدا و در ویال جمع‌آوری شد. محتوی ویال‌ها با استفاده از دستگاه تغلیظ کننده دوار (Rotary evaporator) خشک شد (Mirabolfathy and Karami Osboo, 2006). داکسی نیوالنول موجود در ویال‌ها در ۲ میلی لیترحلال فاز متحرک دستگاه HPLC (آب، استونیتریل، متانول با نسبت حجمی ۸۸:۶:۶) مجدداً حل گردید و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC فاز معکوس تزریق شد.

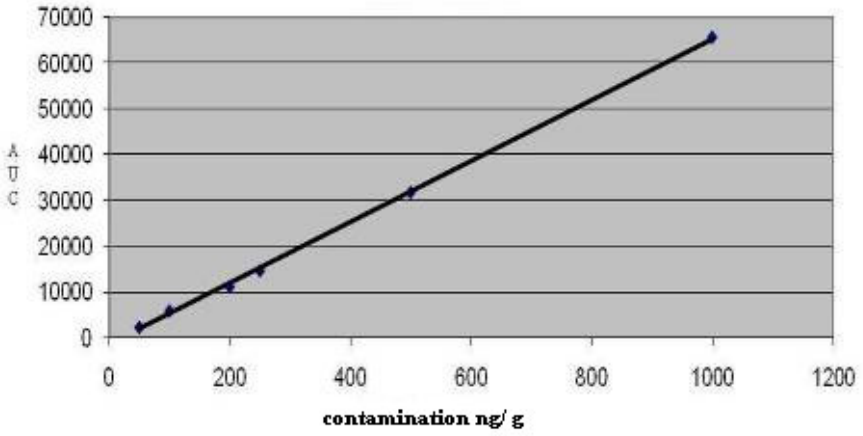
۴-۲- مشخصات دستگاه HPLC و فاز متحرک مورد استفاده: دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC) از نوع Breeze (binary HPLC pump 1525) از

Archive of SID

www.SID.ir

شرکت Waters، دتکتور ۲۴۸۷UV، تزریق کننده خودکار ۷۱۷، ستون فاز معکوس C-18 (Waters Milford, MA, USA) با ابعاد 250×3.9 mm و اندازه ذرات 4 µm استفاده شد. فاز متحرک ایزوکراتیک، آب: استو نیتریل: متانول به نسبت (6:6:88 حجمی) و سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید داکسی نیوالنول به وسیله آشکار ساز UV (UV Detector) در طول موج 222 nm ردیابی شد و میزان آن با استفاده از نرم افزار Breeze محاسبه گردید در شرایط فوق زمان بازداری داکسی نیوالنول در دقیقه ۸ تعیین گردید .

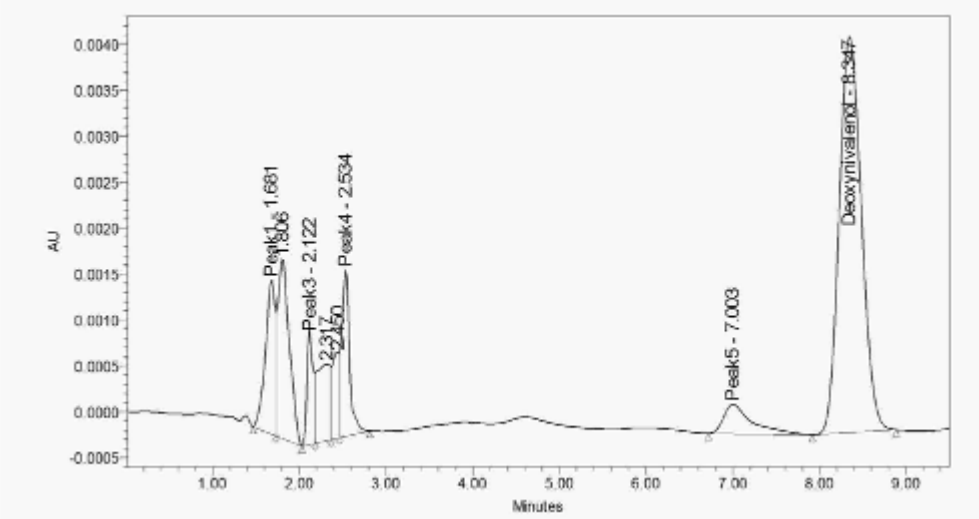
۴-۳- رسم منحنی کالیبراسیون (Calibration curve): بدین منظور از محلول‌های استاندارد با غلظت ۲۵، ۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر داکسی نیوالنول برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده و از هر غلظت ۲۰۰ میکرولیتر و دو بار به دستگاه HPLC تزریق شد. پس از تعیین سطح زیر منحنی مربوط به هر یک از استانداردهای کاری تزریق شد ه منحنی استاندارد شش نمونه استاندارد تزریق شده رسم گردید. منحنی استاندارد آزمایش برای هر روز در ابتدای آن روز ترسیم و ضریب همبستگی (Regression) آن محاسبه شد (R^2=0.999) (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی استاندارد دی اکسی نیوالنول (در محدوده ۲۵-۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)

Fig. 2. Deoxynivalenol calibration curve (25-1000 ng/ml)

www.SID.ir



شکل ۳- کروماتوگرام مربوط به استاندارد 250 ng/ml

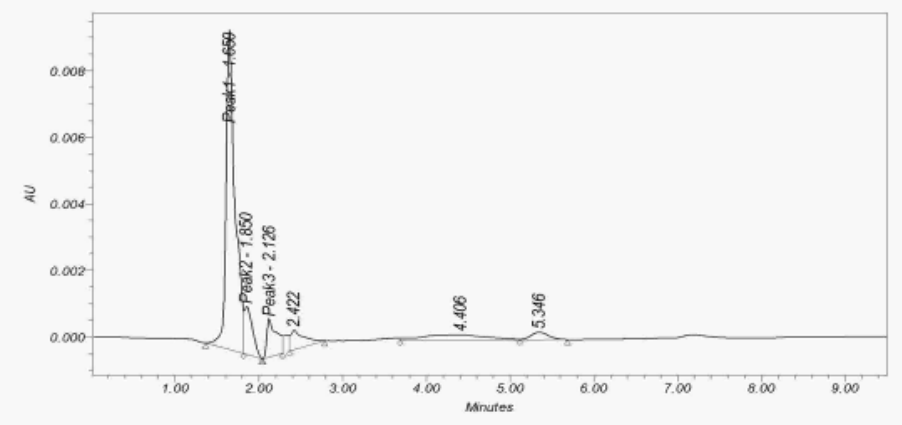
Fig 3- The Chromatogram of Deoxynivalenol standard (250 ng/ml)

نمونه‌های استخراج شده از ذرت و یا محیط کشت حاوی قارچ‌های مولد داکسی نیوالنول به دستگاه تزریق شد. از مقایسه سطح زیر منحنی نمونه با سطح زیر منحنی محلول‌های استاندارد همان روز میزان مایکوتوکسین موجود در هر نمونه اندازه‌گیری گردید.

۴-۴- آزمون صحت آزمایش: جهت تعیین صحت آزمایش از آنالیز میزان بازیافت (Recovery) استفاده شد. بدین منظور 2.5ml از محلول استاندارد ۱۰ µg/ml یا ۲۵ میکروگرم داکسی نیوالنول، به ۲۵ گرم پودر ذرت عاری از داکسی نیوالنول افزوده شد تا نمونه غنی شده با میزان (spike) ۱ ppm داکسی نیوالنول تهیه گردید. سه نمونه غنی شده در سه روز مختلف تهیه شد و تکرار پذیری آزمایش در سه روز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). برای تهیه نمونه غنی شده پس از اضافه کردن محلول استاندارد به آن زمان داده شد که داکسی نیوالنول جذب پودر ذرت گردد، پس از آن مرحله استخراج و تصفیه و سنجش داکسی نیوالنول به وسیله HPLC در نمونه‌ها انجام گردید .توجه به این که جواب‌های بدست آمده برای این سه نمونه در سه روز متفاوت نزدیک به هم و میانگین بازیافت ۹۶٪ بود صحت روش آزمایش و شرایط آن احراز شد.

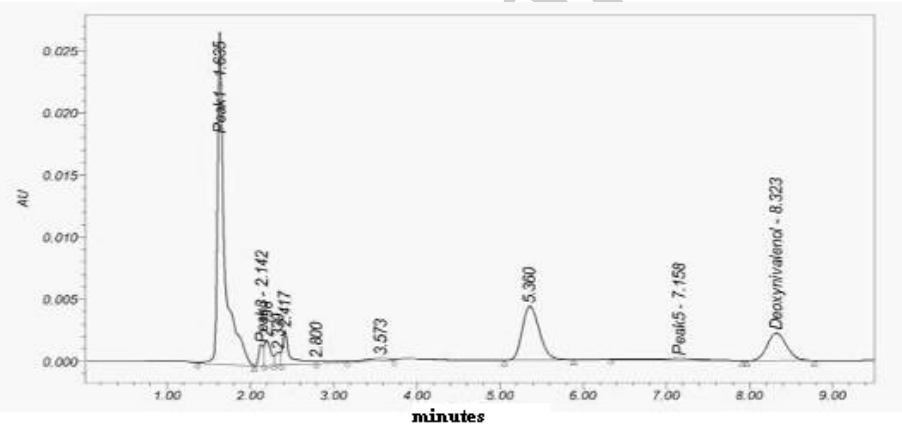
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٤- کروماتوگرام نمونه عاری از آلودگی

Fig 4- The chromatogram of the blank sample



شکل ٥- کروماتوگرام نمونه غنی شده به ppb ۱۰۰۰ داکسی نیوالنول

Fig 5- The chromatogram of 1000 ng/ml spiked sample

٤-٥- بررسی جدایه‌ها از نظر پتانسیل تولید داکسی نیوالنول: برای بررسی امکان توکسین‌زایی جدایه‌های مشکوک به گونه‌های مولد داکسی نیوالنول تعداد ۱۰ جدایه (از هر گونه دو جدایه) که از کشت قارچی حاصل از تک اسپور تهیه شده بودند به عنوان نماینده از جدایه‌های گونه‌های فوزاریوم که از دانه ذرت مغان جدا شده بودند انتخاب شدند. سپس

www.SID.ir

جدایه‌های مذکور روی آرد برنج عاری از آلودگی کشت شد و میزان داکسی نیوالنول توسط هر جدایه، اندازه‌گیری شد برای اطمینان از صحت انجام آزمایش نمونه آلوده شده مصنوعی به داکسی نیوالنول به دستگاه تزریق شد. برای انجام این آزمایش در فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری ۵ گرم آرد برنج عاری از آلودگی به همراه ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و برای ۲ روز متوالی در اتوکلاو سترون گردید سپس به هر فلاسک ۲/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور گونه قارچی مشکوک به تولید داکسی نیوالنول در زیر هود به آن افزوده شد (دو تکرار برای هر گونه در نظر گرفته شد) و در دمای ۲۷-۲۵ درجه درجه سلسیوس در تاریکی به مدت یک هفته قرار داده شد. به منظور تهیه بستری یکنواخت از قارچ فلاسک محتوی برنج و سوسپانسیون اسپور تکان داده می‌شد پس از گذشت ۳ روز تغییر رنگ در نمونه‌ها مشاهده شد فلاسک‌ها یک هفته در دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس به منظور ایجاد شوک سرمایی فلاسک‌ها به مدت دو هفته در دمای ۱۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای سنجش داکسی نیوالنول تولیدی توسط گونه‌ها از روش ذکر شده در بخش اندازه‌گیری مایکوتوکسین داکسی نیوالنول در نمونه‌های ذرت استفاده شد.

برای اطمینان از تولید داکسی نیوالنول توسط جدایه‌های *F. proliferatum*، جدایه‌های اخیر به طریق مصنوعی به بلال مایه‌زنی شد و پس از ده روز میزان DON در دانه‌های ذرتی که به طریق مصنوعی با جدایه اخیر مایه زنی شده بود ردیابی شد.

نتیجه و بحث

۱-گونه‌های فوزاریوم جدا شده از نمونه‌های ذرت: باتوجه به نتایج حاصل از این تحقیق فراوان‌ترین گونه‌های فوزاریوم جدا شده از نمونه‌های آلوده بترتیب عبارت بودند از : *Fusarium verticillioides*، *F. proliferatum*، *F. nygamai* و *F. oxysporum*.

۲- آلودگی به داکسی نیوالنول: بسیاری از گونه‌های فوزاریوم مولد توکسین به عنوان بیمارگرهای اصلی غلات محسوب می‌شوند که به عنوان مثال باعث بیماری سوختگی خوشه یا سنبله در گندم و جو و پوسیدگی خوشه و دانه در ذرت می‌شوند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- فراوانی گونه‌های فوزاریوم جدا شده از هر یک از نمونه‌های ذرت

Table 1- The frequency of *Fusarium* species isolated from each corn samples

F. oxysporum	*F. nygamai*	*F. verticioiledes*	*F. proliferatum*	samples
-	-	7	8	M001
-	-	12	6	M002
-	2	4	6	M003
	-	12	-	M004
3	-	7	5	M005
-	-	9	6	M006
-	-	12	-	M007
-	-	6	4	M008
	-	13	5	M009
-	-	5	5	M010
-	-	10	5	M011
-	-	9	3	M012
-		3	9	M013
5	-	8	5	M014
-	-	8	4	M015
-	6	4	-	M016
-	-	10	5	M017
-	-	10	-	M018
5	4	-	6	M1
-	-	10	2	M2
-	-	-	10	M3
-	-	9	5	M4
-	-	8	2	M5
-	-	9	6	M6
1	-	14	3	M7
-	-	5	5	M8
-	5	7	-	M9
	-	8	4	M10
-	-	5	5	M11
-	-	6	9	M12
-	-	8	6	M13
-	-	12	-	M14
-	-	14	6	M15
-	-	13	5	M16
-	5	5	5	M17
	-	10	7	M18
-	-	5	10	M19
6	-	-	6	M20
-	5	10	5	M21
-	-	13	5	M22
20	27	320	188	Total

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- فراوانی گونه‌های فوزاریوم جداشده از دانه‌های ذرت

Table 2 –The frequency (%)of *Fusarium* species isolated from corn kernels

***Fusarium* species**	**Frequency**
Fusarium verticillioides	57.65
F. proliferatum	33.87
F. nygamai	4.86
F. oxysporum	3.60

انتشار این گونه‌های قارچی خطرات فراوانی برای سلامت انسان و حیوانات به همراه دار د زیرا مایکوتوکسین‌های آن‌ها به عنوان متابولیت‌های سمی شناخته شده‌اند. با توجه بـه افـزایـش جهانی تجارت غلات، امکان انتقال قارچ‌ها از یک کشور به کشور دیگری وجود دارد. شـواهـد مستندی دال بر آلودگی جهانی غلات و غذای حیوانات با مایکوتوکسین‌های فوزاریوم به ویـژه تریکوتسین‌ها، زرالنون و فومانیزین‌ها وجود دارد. بنابراین تجـارت ایـن غـلات ممکـن اسـت سـهمی در پخـش جهـانی مایکوتوکـسین داشـته باشـد (Placinta *et al*., 1999). در تحقیـق حاضرآلودگی به داکسی نیوالنول در ٤٥٪ از کـل نمونـه‌هـا مـشاهده شـد (جـدول ۳). گـستره آلودگی به د اکسی نیوالنول برابر با ng/g ٥٤٢/٥٥- ٥٩/٤ و میانگین کل آلودگی ۹۵/۳۰ng/g بو د که از حد مجاز تعیین شده برای ذرت در ایران (1 ppm) کمتر می‌باشد.

۲-۱- مقایسه داکسی نیوالنول اندازه گیری شده باحد مجـاز مـصرف آن: حـد مجـا ز داکسی نیوالنول در کشور و میزان مجاز آن در جهان ۱ppm می‌باشد و این بدین معنی است کـه پایین‌تر از این میزان خطری در سلامت انسان ایجاد نکرده و این میزان آلودگی بـرای مـصر ف انسان قابل چشم پوشی است. البته میزان مصرف ماده آلوده در غذای روزانه مردم بـسیار مهـم اسـت یعنـی در جـوامعی کـه مـصرف ذرت و فـرآورده‌هـای آن بـالا اسـت، میـزان دریافـت مایکوتوکسین روزانه آن‌ها بالاتر می‌رود و خطر عـوارض ناشـی از مـصرف غـذای آلـوده بـه مایکوتوکسین هم بالاتر می‌رود ولی خوشبختانه غلظت این مایکوتوکسین در تمام نمونـه‌هـای برداشت شده و در نمونه‌های آلوده پایین‌تر از حد مجاز بود.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصله نشان داد ذرت محصول استان اردبیل (منطقه مغان) در سال ۸۶ و ۸۷ آلودگی کمی به داکسی نیوالنول داشته و احتمال خطر آن برای سلامت انسان و دام کم است.

۲-۲- بررسی جدایه‌ها از نظر پتانسیل تولید داکسی نیوالنول: نتایج مطالعات توکسیکولوژی که روی ۱۰ جدایه به عنوان نماینده از گونه‌های مختلف فوزاریوم جداسازی شده از ذرت انتخاب شده بودند نشان داد که هیچ یک از جدایه‌های *F. nygamai*، *F. oxysporum* و *F. verticillioides* تولید داکسی نیوالنول ننمودند و تنها دو جدایه از *F. proliferatum* تولید داکسی نیوالنول نمودند (جدول ۵).

جدول ۳- میزان داکسی نیوالنول اندازه گیری شده در نمونه‌های ذرت جمع آوری شده از مناطق مختلف مغان

Table 3- DON contamination (ppb) of corn samples

DON contamination (ppb)	Samples	DON contamination (ppb)	Samples
ND	M3	ND	M001
59.4	M4	2288.92	M002
ND	M5	451.43	M003
ND	M6	66.290	M004
62.3	M7	48.141	M005
ND	M8	ND	M006
237.2	M9	ND	M007
ND	M10	280.08	M008
ND	M11	ND	M009
ND	M12	ND	M010
213	M13	ND	M011
ND	M14	542.55	M012
ND	M15	ND	M013
83.3	M16	131.5	M014
ND	M17	261.4	M015
ND	M18	192	M016
ND	M19	151.2	M017
ND	M20	224.7	M018
ND	M21	ND	M1
ND	M22	156.6	M2

ND: Not Determinated

Archive of SID

www.SID.ir

این جدایه‌ها در بلال مایه زنی شده به طریق مصنوعی پس از ده روز DON تولید نمودند. میزان DON تولید شده توسط دو جدایه ۱ و ۲ *F. proliferatum* در دانه‌های بلال به ترتیب برابر با ppb ۳۰/۲ و ۳۲/٤ بود (جدول ٦).

جدول ۴- توزیع میزان آلودگی در نمونه‌های آلوده

Table 4- Distribution of DON concentration in contaminated samples

Contaminated samples (%)	**Don concentration (ppb)**
7.5	0-100
12.5	100-200
17.5	200-300
2.5	300-400
2.5	400-500
2.5	500-600

جدول ۵- پتانسیل تولید داکسی نیوالنول در جدایه‌های گونه‌های مختلف فوزاریوم روی محیط پودر برنج

Table 5 – The potential of DON production in different *Fusarium* species isolates on rice powder media

شماره نمونه Sample number	جدایه Isolate	میزان داکسی نیوالنول **(ppb)** Potential of deoxynevalenol
1	*F. oxysporum*	ND
2	*F. oxysporum*	ND
3	*F. nygamai*	ND
4	*F. nygamai*	ND
5	*F. verticillioides*	ND
6	*F. verticillioides*	ND
7	*F. proliferatum*	62.6
8	*F. proliferatum*	57.4

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٦- میزان DON (ppb) ردیابی شده در بلال‌های مایه زنی شده با جدایه‌های *F. proliferatum*

Table 6 –DON concentration detected (ppb) in the inoculated corn ears by *F. proliferatum* isolates

	Inoculated corn ears	DON concentration (ppb)
1	*F. proliferatum*	30.2
2	*F. proliferatum*	32.4

در این تحقیق در میان فوزاریوم‌های جدا شده از نمونه‌های آلوده در محصول ذرت استان اردبیل ۵۷/٦۵٪ جدایه‌ها متعلق به گونه *F. verticillioides* بود. گونه *F. proliferatum* با ویژگی فیالیدهای مجتمع و زنجیرهای طویل میکروکنیدیوم و عدم وجود کلامیدوسپور مشخص گردید. *F. nygamai* به دلیل دارا بودن کلامیدوسپور از گروه Liseola، وبه علت داشتن میکروکنیدی زنجیری از گروه Elegans جدا شد. *F. oxysporum* به علت داشتن فیالیدهای کوتاه، کلامیدوسپور و میکروکنیدیوم فراوان روی سرهای دروغی ا زسایر گونه‌ها تفکیک گردید. نتایج حاکی از آن است که وقتی شرایط دما برای *F. graminearum* مناسب نباشد، *F. verticillioides* می‌تواند کاملاً با آن رقابت کرده و مانع از رشد آن شود. شواهد حاکی از آن است که *F. verticillioides* از نظر رقابت با سایر گونه‌های فوزاریوم از خاصیت رقابتی کلونیزاسیون بالایی در ذرت برخوردار است و در مقایسه با *F. graminearum* مزیت رقابتی بالایی دارد (Stewart *et al*., 2002).

با توجه به نتایج این تحقیق و با توجه به نتایج تحقیقات گذشته در ذرت ایران (Boujari and Ershad, 1993) که حاکی از فراوانی بالای *F. verticillioides* در ذرت ایران است و از آنجا که در تحقیق حاضر نیز *F. verticillioides* گونه غالب بود، بنظر می رسد از نظر رقابت *F. verticillioides* رشد *F. graminearum* را سرکوب کرده و نهایتاً باعث پایین آمدن سطح داکسی نیوالنول شده است، همچنین *F. verticillioides* مانع از رشد *F. graminearum* شده و *F. graminearum* از دانه‌ها و پودر ذرت جداسازی نشد. البته ذکر این نکته لازم است که ممکن است در یک بستر غذایی توکسین تولید شود، اما قارچ مولد ردیابی نگردد. برعکس این مطلب

Archive of SID

www.SID.ir

نیز صادق است. در تحقیق حاضر تعدادی جدایه مشکوک به تولید داکسی نیوالنول به صورت مصنوعی روی آرد برنج پرورش داده شدند. از میان آن‌ها تنها دو جدایه تولید DON نمود، این جدایه‌ها همان *F. proliferatum* بودند. دوره رشد ذرت در ایران خرداد تا شهریور و گاهی تا اواخر آذر است این دوره از نظر دما و رطوبت برای رشد *F. verticillioides* و *F. proliferatum* مناسب‌تر است تا *F. graminearum*. گونه اخیر از لحاظ رقابتی سرعت رشد کمتری نسبت به گونه‌های *F. verticillioides*، *F. proliferatum*، *F. oxysporum* و *F. nygamai* دارد، در نتیجه از تولید داکسی نیوالنول ممانعت به عمل می‌آید. شاید یکی از علل تناقض وعدم‌جداسازی *F. graminearum* علیرغم وجود آلودگی طبیعی ذرت به داکسی نیوالنول مربوط به زمان نمونه برداری باشد، اگر زمان نمونه‌برداری در ابتدای رسیدن کاکل‌ها و قبل از حمله *F. verticillioides*، *F. proliferatum* به مزرعه انجام شود ممکن است امکان جداسازی *F. graminearum* نیز فراهم گردد.

نکته قابل توجه این است که وقوع *F. graminearum* در ذرت مغان (با توجه به مطالعه حاضر و تحقیقات گذشته که گونه‌های فوزاریوم را در مناطق مختلف ایران شناسایی کرده بودند) پایین بوده و در نتیجه باعث کم شدن میزان داکسی نیوالنول می‌شود و خطر این مایکوتوکسین را در سلامت انسان و حیوانات مرتفع می‌سازد. البته خاطر نشان می‌شود که وقوع فوزاریوم‌ها و در نتیجه میزان مایکوتوکسین تولید شده توسط آن‌ها از سالی به سال دیگر و با توجه به شرایط آب و هوایی تغییر می‌کند و پاسخ به شرایط آب و هوایی در میان گونه‌ها متفاوت است و بنابراین بهتر است که این تحقیق در سال‌های دیگر نیز متناوباً بررسی گردد. زیرا ممکن است با توجه به شرایط آب و هوایی در سال‌های مختلف نتایج تحقیقات در سال‌های دیگر با تحقیق حاضر مغایر شود. در آزمایش مایه‌زنی *F. verticillioides* و *F. graminearum* سطح داکسی نیوالنول در دانه در مقایسه با مواردی که فقط *F. graminearum* تلقیح شده، کاهش یافته است. شواهد حاکی از آن است که *F. graminearum* زمینه‌ساز ابتلا خوشه به *F. verticillioides* است. فراوانی بالای جداسازی *F. verticillioides* در ذرت تلقیح شده با *F. graminearum* این نتایج را تأیید نموده است (Stewart *et al*., 2002).

گونه‌های فوزاریوم که دانه‌های ذرت را آلوده می‌کنند خود با یکدیگر و هم چنین دیگر

Archive of SID

www.SID.ir

قارچ‌ها رقابت می‌کنند و رقابت بین این قارچ‌ها می‌تواند تأثیر واضحی بر میزان نهـایی غلظـت مایکوتوکسین داشته باشد. البته با توجه به اینکه وقوع فوزاریوم‌ها و میزان مایکوتوکـسین‌هـای آن‌ها با توجه به شرایط آب و هوایی سال به سال تغییر می‌کند، پیشنهاد می‌شود که این تحقیـق در سال‌های دیگر نیز متناوباً ادامه یابد*.

منابع

ABBAS, H. K., C. J. MIROCHA, R. A. MERONUCK, J. D. POKORNY, S. L. GOULD and T. KOMMEDAHL, 1988. Mycotoxins and *Fusarium* spp. associated with infected ears of corn in Minnesota. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1930-1933.

Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. Canadian Journal of Plant Pathology. 23: 279- 285.

BOUJARI, J. and D. ERSHAD, 1993. An Investigation on Corn - seed Mycoflora. Iranian Journal of Plant Pathology, 29: 23-35.

LESLIE, F. and B. SUMMERELL, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. 121-274.

MENNA DI, M. E., D. R. LAUREN and A. HARDACRE, 1997. Fusaria and *Fusarium* toxins in New Zealand maize plants. Mycopathologia. 139: 165-173.

MIRABOLFATHY, M. and R. KARAMI OSBOO, 2006. Monitoring of deoxynivalenol (DON) in wheat crop at Golestan province. Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress. P. 505

MUNKVOLD, G. P. 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. European Journal of Plant Pathology. 109: 705-713.

NELSON, E. T., A. Toussoun and W. F. O. Marasas, 1983. *Fusarium* Species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, 193 pages

PLACINTA, C. M., J. P. F. D MELLO and A. M. C. MAC DONALD, 1999. A review of

* **نشانی نگارندگان:** مهندس زهرا علی‌اکبری و دکتر حشمت‌اله امینیان، بخش گیاهپزشـکی دانـشکده کـشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، کرج، ایـران؛ دکتـر منـصوره میرابـوالفتحی و مهنـدس روح‌الـه کرمـی‌اسـبو، آزمایـشگاه تحقیقات مایکوتوکسین‌ها، بخش تحقیقات بیماری‌شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشـکی کـشور، صـندوق پستی ۱۴۵۴، تهران، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. Anim. Feed Sci. Techno. 78: 21-37.

SCHAAFSMA, A. W., L. TAMBURIC-ILLNIC, J. D. MILLER, D. C. HOOKER, 2001.

SCHOLLENBERGER, M., H. T. JARA, S. SUEY, W. DROCHNER, H. M. MGLLER, 2002. *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. International Journal of Food Microbiology, 72: 85- 89.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 1999. Opinion on *Fusarium* Toxins-Part 1: Deoxynivalenol (DON) (expressed on 2 December 1999). Available at http://europa.eu. intlcomm/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf

STEWART, D. W., L. M. REID, R. W. NICOL and A. W. SCHAAFSMA, 2002. A mathematical simulation of growth of *Fusarium* in maize ears after artificial inoculation. Phytopathology, 92: 534-541.

SUTTON, J. C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology. 4: 195- 209.

TSCHANZ, A. T., R. K. HORST and P. E. NELSON, 1976. The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. Mycologia 68: 327-340.

Address of the authors: Eng. Z. ALIAKBARI and Dr. H. AMINIAN, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran; Dr. M. MIRABOLFATHY and Eng. R. KARAMI OSBOO, Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box 1454, Tehran, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir