Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ۴۲، ۱۳۸۵

میزان آلودگی ذرت استان گلستان به فومانیزین B1

Fumonisin B1 contamination of Golestan corn product

منصوره میرابوالفتحی*، روح‌اله کرمی‌اسبو، حسن امینی

آزمایشگاه تحقیقات میکوتوکسینهای موسسه تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی، دانشکده بهداشت دانشگاه شهید بهشتی

دریافت ۱۳۸٤/۹/۲۳ پذیرش ۱۳۸۵/۵/۲۵

چکیده

میزان فومانیزین ذرت سال ۱۳۸۳ استان گلستان، شامل چهل و شش نمونه ذرت از زمان برداشت، پس از برداشت، پس از خشک کردن، و خروج از سیلو اندازه‌گیری شد، نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در سرد خانه C° ۵- نگهداری و سپس به کمک آسیاب تجزیه‌ای رومر (Romer) آسیاب گردیدند. استخراج فومانیزین B1 با حلال متانول: آب (۲۰:۸۰)، جداسازی اختصاصی فومانیزین B1 از سایر اجزا همراه (تصفیه) با استفاده از ستون‌های ایمونوافینتی و مشتق‌سازی با اورتوفتالدئید

* مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

(OPA) انجام شد. اندازه‌گیری فومانیزین با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) با آشکارساز فلورسانس (با طول موج تحریک ۳۳۵nm و نشرnm ٤٤٠) انجام شد، ارزیابی میزان کمی فومانیزین با تزریق نمونه‌های استاندارد µg/ml ٤٠ – ۰/۳۱۲۵ و رسم منحنی مربوطه صورت گرفت. اعتبار روش با کاربرد مواد مرجع معتبر، CRM(Certificate Reference material) تایید شد. میانگین بازیافت روش نیز با کاربرد نمونه‌های غنی شده ۹۰/۷ ٪ برآورد گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که تمامی نمونه‌ها به فومانیزین B1 آلوده بودند، دامنه میزان آلودگی ng/g ٦٨٩١ – ٢٦١ و میانگین آنng/g ٢٦٥٨/٣٥ بود. میزان آلودگی در نمونه‌های مراحل مختلف تفاوت معنی‌داری با یکدیگرنداشت.

واژه‌های کلیدی: فومانیزین، ذرت، قبل از برداشت، زمان برداشت، پس از برداشت، HPLC

مقدمه

غلات جایگاه ویژه‌ای در سبد غذائی مردم در سرتاسر جهان دارند. ذرت پس از گندم، جو و برنج یکی از مهمترین محصولات کشاورزی است که بطور مستقیم برای انسان و غیر مستقیم در خوراک دام و طیور مصرف می‌شود. میزان تولید داخلی ذرت در ایران در حدود ۲ میلیون تن و ما به التفاوت نیاز کشور سالانه معادل ۱/۵ میلیون تن از خارج وارد می‌شود. در میان عوامل بیماریزای خوشه ذرت فوزاریومها دارای اهمیت بسیاری می‌باشند. فومانیزین‌ها میکوتوکسین‌هایی هستند که عمدتا بوسیله قارچهای

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (ex *F. moniliforme* Sheldon) و *F. proliferatum* و بیشتر در ذرت و فرآورده‌های ذرت در مقادیری که سلامت انسان ودام را به مخاطره می‌اندازد تولید می‌شوند (Scudamore 1998). اولین بار فومانیزین B1, B2 از محیط کشت جدایه

www.SID.ir

Archive of SID

F.moniliforme MRC826 استخراج شد (Gelderblom *et al*. 1988). فومانیزین‌ها برخلاف اغلب مایکوتوکسین‌ها ساختار حلقوی نداشته و دارای چهار گروه کربوکسیل آزاد و یک گروه آمین می‌باشند، به‌خاطر این ساختار فیزیکی حلالیت بسیار بالایی در آب دارند و بسیار پایدار هستند که در شرایط حرارت متوسط از بین نمی‌روند، هرچند دیده شده که در واکنش با هیدروکسید کلسیم از بین میرود اما تبدیل به ماده دیگری می‌شوند که به همان اندازه خاصیت سمی دارند (Voss *et al.* 1996). تا کنون حدود ۱۱ نوع فومانیزین شناخته شده، که در آن میان فومانیزین B1 و B2 در اغلب ذرت‌های آلوده به قارچ یافت شده‌اند (Gelderblom *et al*. 1996)، فومانیزین‌ها سبب بروز سمیت‌های کبدی و کلیوی برای اکثر گونه‌های حیوانی مورد بر رسی شده، همچنین سبب التهاب مغز (leukoencephalomalacia) در اسب می‌گردند (Wilson *et al*. 1992, Caramelli *et al*. 1993)، تورم ریه خوک (Harrison *et al*.1990) ، سرطان کبد در موشها (Gelderblom *et al.* 1991) از جمله عوارض مصرف فومانیزین می‌باشد. اخیرا نیز شواهدی متقن بر سرطانزایی فومانیزین B1 در موشهای نر و ماده ارائه شده است (Gelderblom *et al*. 1996). بعلت وجود مقادیر بالای فومانیزین در محیط‌های کشت قارچی، آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان، توکسینهای *F. moniliforme* را جز مواد سرطانزای بالقوه (سرطانزاهای طبقه 2B) طبقه‌بندی نموده است (Vainio *et al*. 1993). فومانیزین B1 فراوانترین فومانیزین است و معمولا در ذرت یافت می‌شود. در انسان مصرف ذرت آلوده به فومانیزین B1 همراه سرطان مری گزارش شده است. شواهد مستند آماری گویای همراهی آلودگیهای طبیعی ذرت‌های تولیدی محلی با میزان بالای سرطان مری در منطقه ترانسکی (Transkei) در آفریقای جنوبی (Sydenham *et al* 1990, Rheeder *et al*. 1992)، *سیکسیان و لینکسیان* (Cixian & Linxian) در چین است (Chu & Li 1994)، در قسمت هایی از شمال ایتالیا جایی که بیشترین شیوع سرطان مری در اروپا از آنجا گزارش شده است، ذرت قسمتی از رژیم غذایی آنها می‌باشد که به فومانیزین‌ها آلوده می‌باشد (Visconti *et al*. 1996). در ایران گونه‌های متعدد Fusarium از بلال جدا سازی و گزارش شده است (Ershad 1995)، همچنین آلودگی ذرت استان‌های مازندران و اصفهان به فومانیزین‌ها نیز گزارش شده است (Yazdanpanah *et al.* 2000). بیشتر روش‌های

www.SID.ir

Archive of SID

کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری فومانیزین براساس کروماتوگرافی مایع تدوین گردیده‌اند، و از آنجا که فومانیزین غیر فلورسانس است، تشخیص آنالوگهای فومانیزین در غلظتهای کمتر از 10µg/g با دتکتور فلورسنت نیازمند مشتق‌سازی از گروه آمین آزاد آن به فرم دارای فلورسنت مناسب است. متداولترین روش استخراج براساس استفاده از متانول – آب و استونیتریل –آب می‌باشد، تصفیه با استفاده از ستون‌های ایمنوافینیتی (Immonoaffinity) وتشخیص و تعیین مقدار به کمک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) می‌باشد (Shephard *et al*. 1996)، در روش اخیرالذکر میزان هر یک از فومانیزین‌های مختلف به تفکیک تعیین شد. گیرالمو و همکاران روشهای مختلف استخراج و تصفیه برای تعیین فومانیزین در ذرت و فرآورده‌های آن را به منظور تحقیق در تاثیر شرایط مختلف آزمایش برای بهینه‌سازی روش آنالیز فومانیزین مقایسه نموده‌اند (Girolamo *et al*. 2001) . در تحقیق حاضر میزان فومانیزین در نمونه‌های ذرت مزارع و انبارهای ذرت استان گلستان با استفاده از ستون‌های Fumi- Test (Vicam, Watertown, MA, USA) تصفیه، با اورتوفتالدئید (Ortho- phthaldehyde)، OPA، مشتق‌سازی و با HPLC تشخیص، ردیابی و تعیین مقدار گردیده است.

روش بررسی

نمونه‌برداری

چهل و شش نمونه ذرت از مراحل قبل از برداشت، زمان برداشت، پس از برداشت، خشک کردن، ورود و خروج از سیلو مربوط به محصول ذرت سال ۱۳۸۳ استان گلستان جمع‌آوری گردید. ۲۵ نمونه از مرحله قبل از برداشت، پس از رسیدن بلال وبه ازای هر هکتار از مزرعه ده بلال، از عمده ترین مناطق تحت کشت برداشت گردید تعداد مزارع انتخاب شده بر حسب سطح زیر کشت هر منطقه معین شد. تعداد ۲۱ نمونه ۷– ۵ کیلوگرمی ذرت نیز از مراحل پس از برداشت، پس از خشک شدن، قبل از ورود به سیلو و در زمان خروج از سیلوپس از دو ماه نگهداری در

www.SID.ir

Archive of SID

انبارهای منطقه نمونه‌برداری شد، نمونه‌ها به صورت تصادفی و از قسمت‌های مختلف گونی و از هر گونی حدود ۲۰۰- ۳۰۰ گرم نمونه و به ازای هر یکصد کیلوگرم ذرت یک کیلوگرم نمونه برداشته شد. نمونه‌ها بترتیب ۸ نمونه مربوط به قبل از زمان برداشت، ۱۷ نمونه مربوط به زمان برداشت، ۴ نمونه مربوط به پس از برداشت، ۴ نمونه پس از خشک شدن با روش متعارف، ۵ نمونه قبل از ورود به سیلو و ۸ نمونه پس از خروج از سیلو بود (جدول۱).

آرد نمودن و تهیه نمونه برای اندازه‌گیری

در نمونه‌های مزرعه دانه‌ها پس از برداشت از چوب بلال جدا شده و در سردخانه°C ۵- نگهداری شد، نمونه‌های مربوط به انبارهای مختلف نیز بطور همزمان نمونه‌برداری و در سردخانه‌ای با شرایط مشابه نگهداری گردید. تمامی محتوی هر کیسه نمونه با استفاده از آسیاب رومر (Romer) با درجه آرد نرم آسیاب شد و ۵۰۰ گرم نمونه از آرد خروجی به عنوان نمونه تجزیه‌ای جهت استخراج برداشت شد (Visconti & Pascale 1998).

استخراج

پنجاه گرم نمونه آسیاب شده ذرت و ۱۰۰ ml حلال متانول : آب به نسبت ۲۰:۸۰ درون شیکر، به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد و سپس با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد، ۱۰ml از عصاره فیلتر شده با ٤٠ ml بافر PBS 0.1%Tween -20 رقیق و از فیلتر میکرو فایبر ۱ µm عبور داده شد، سپس ۱۰ ml از عصاره فیلتر شده اخیر برداشته شده و این بار از ستون ایمنوافینیتی، IAC، (VICAM TM(Fumi-test[1] با سرعت یک تا دو قطره در هر ثانیه عبور داده شد، سپس ستون با ۱۰ml بافر PBS 1x دارای ۰/۱ در صد Tween شستشو وبه دنبال آن با ۱۰ ml آب دی یونیزه شستشو شد. نهایتا فومانیزین موجود در نمونه با استفاده ازعبور ۱/۵ ml متانول HPLC grade از ستون IAC جدا ودرون و یال جمع‌آوری گردید (Duncan *et al*. 1998).

---

۱ -Vicam ,Watertown, MA, USA.
۲-Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO, USA.

www.SID.ir

Archive of SID

محلول‌های استاندارد

محلولهای استاندارد فومانیزین B1 با غلظت‌های µg/ml ۴۰, ۲۰, ۵, ۲۵/ ۱, ۳۱۲۵/. با استفاده از محلول استاندارد مادر[۲] با غلظت ۱mg/ml در حلال متانول ساخته شدند و تا هنگام تزریق به دستگاه در دمای منفی بیست درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

مشتق‌سازی

از آنجایی که فومانیزین B1 جذب UV قوی ندارد و همچنین خاصیت ذاتی فلورسانس هم ندارد برای آشکارسازی نیاز به مشتق‌سازی وجود دارد در این روش فومانیزین با ماده شیمیایی دیگری واکنش داده می‌شود تا خاصیت فلورسانس پیدا کند متداول ترین ماده‌ای که برای این منظور استفاده میشود اورتوفتالدئید (OPA) است. برای تهیه مشتق‌ساز، ابتدا ۳۲mg اورتوفتالدئید در ۸۰۰µl متانول HPLC grade حل شد و ۴ml محلول ۰/۱ مولار دی سدیم تترا بورات اضافه شد، پس از حل شدن OPA در بافر دی سدیم تترا بورات به محلول رقیق شده ۴۰ میکرو لیتر از مایع ۲- مرکاپتواتانول (2-Mercaptoethanol) اضافه شد، این ترکیب فومانیزین را فلورسنت می‌سازد (Sydenham *et al*. 1996)

دستگاه HPLC

سیستم کروماتوگرافی Shimadzu مجهز به پمپ LC-6A ، دتکتور فلورسانس RF535 در طول موج نشرnm ۴۴۰ و طول موج تحریک ۳۳۵ nm و تلفیقی C-R6A استفاده شد، نمونه‌ها با استفاده از لوپ تزریق Rheodyne7125 با حجم موثر ۱۰۰ µl تزریق شد، ستون کروماتوگرافی Shimpack CLC-C18(150×6 mm ; 5µm particle size) و فاز متحرک مورد استفاده برای جداسازی مرکب از استونیتریل: آب: اسید استیک به نسبت ۱:۵۰:۵۰ بود، جداسازی ذرات موجود در نمونه با سرعت جریان ۱/۵ ml/min و در دمای محیط انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری میزان فومانیزین

یک و نیم میلی لیتر متانول حامل فومانیزین خارج شده از ستون IAC تحت جریان نیتروژن خشک گردید، فومانیزین موجود در ویال در ۲۰۰ میکرو لیتر متانول- آب ۵۰:۵۰ حل شد. ۲۵ میکرولیتر از محلول حاصل با ۲۲۵ میکرو لیتر مشتق‌ساز مخلوط گردید و به دستگاه HPLC تزریق شد. جهت تعیین میزان بازیافت (recovery) روش، نمونه‌های فاقد آلودگی با مقادیر مشخص فومانیزین B1 آلوده و تمام مراحل فوق برای آنها انجام شد. منحنی استاندارد نیز از تزریق محلول‌های استاندارد فومانیزین B1 با مقادیر ۴۰ µg/ml – ۰/۳۱۲۵ به دستگاه HPLC و رسم منحنی در ناحیه مذکور حاصل شد. در هر روز آزمایش ابتدا منحنی کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای فومانیزین ترسیم، ضریب همبستگی و همچنین میزان بازیافت روش محاسبه شد، میزان ضریب همبستگی ۹۵/. تا ۹۹/. و بازیافت کمتر از ۸/. قابل پذیرش بود.

نتیجه

معادله منحنی استاندارد Y=243.31X+266.41وضریب هبستگی معادل R=0.999 محاسبه گردید که گویای همبستگی خطی خوبی بین مساحت سطح زیر منحنی و غلظت هر یک از نمونه‌های استاندارد مورد استفاده می‌باشد و نقاط منحنی استاندارد به خوبی همبستگی به یک خط را نشان می‌دهند. میانگین میزان بازیافت برای نمونه‌های مرجع با غلظت ٦٤٩/٥ µg/g فومانیزین B1 (Certified Reference Material) در دو تکرار برابر ۵۸۹ µg/g و میانگین در صد بازیافت نیز معادل ۹۰/۷٪ محاسبه شد. با بررسی که بر روی کروماتوگرام نمونه‌ها به عمل آمد مشخص شد که همه ۴۶ نمونه ذرت به مقادیر مختلف فومانیزین آلوده هستند (جدول ۱)، کروماتوگرام نمونه استاندارد ۱۰۰۰ ng/ g (A)، نمونه شماره ۱۷ که گویای آلودگی آن به میزان ٣١٦ ng /gمی باشد(B) و نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل فاقد فومانیزین(C) در شکل ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های ذرت بررسی شده و میزان فومانیزین موجود در هر نمونه

Table. 1. Characterisation of corn samples, included in the study, and their fumonisin content

شماره NO	کد نمونه Sample code	محل نمونه برداری Location	مرحله نمونه برداری Samplin stage	میزان فومانیزین Fumonisin B1(ng/g)
1	CHA054	Aq-Qala	at harvest	945
2	CHA053	Aq-Qala	at harvest	583
3	CHA071	Aq-Qala	at harvest	1295
4	CHA070	Aq-Qala	at harvest	2964
5	CHA067	Aq-Qala	at harvest	261
6	CHA066	Aq-Qala	at harvest	856
7	CHA072	Aq-Qala	at harvest	1396
8	CHA064	Aq-Qala	at harvest	2118
9	CHA058	Aq-Qala	at harvest	5223
10	PPDRI 1	Aq-Qala	at harvest	503
11	CHA055	Aq-Qala	at harvest	755
12	CHA046	Aq-Qala	at harvest	817
13	CHA057	Aq-Qala	at harvest	856
14	CHA050	Aq-Qala	at harvest	1426
15	CHA063	Aq-Qala	at harvest	721
16	CHA059	Aq-Qala	at harvest	803
17	CHA056	Aq-Qala	at harvest	316
18	CTA075	Aq-Qala	after silage	4066
19	CTA073	Aq-Qala	after silage	4018
20	CTA488	Aq-Qala	after silage	3822
21	CTA489	Aq-Qala	after silage	2006
22	CTA060	Aq-Qala	after silage	4058
23	CTA490	Aq-Qala	after silage	2361
24	PPDRI 2	Ali abbad	after silage	5881
25	CTA069	Aq-Qala	after silage	2856
26	CDA083	Aq-Qala	After harvest	538
27	CDA062	Aq-Qala	After harvest	6891

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. (continued)

جدول ۱- (ادامه)

28	CDA083	Aq-Qala	After harvest	468
29	CDA045	Aq-Qala	After harvest t	3990
30	PPDRI 7	Ali abbad	before silage	3308
31	CEL068	Ali abbad	before silage	4177
32	CEL082	Ali abbad	before silage	4771
33	CEL051	Ali abbad	before silage	5039
34	PPDRI	Ali abbad	before silage	4392
35	CPL078	Ali abbad	before harvest	1229
36	CPL079	Ali abbad	before harvest	5213
37	CPL076	Ali abbad	before harvest	4998
38	CPL077	Ali abbad	before harvest	3094
39	CPA044	Aq-Qala	before harvest	2721
40	CPL048	Ali abbad	before harvest	1388
41	CPA047	Aq-Qala	before harvest	1780
42	CPA052	Aq-Qala	before harvest	3415
43	CAL065	Ali abbad	after drying	5166
44	CAL049	Ali abbad	after drying	1838
45	CAL074	Ali abbad	after drying	4229
46	CAL048	Ali abbad	after drying	2733

شیوع بیماری در واحد های پرورش دام در اواخر قرن نوزده در نبراسکا توجه محققین کشاورزی را به ذرتهای آلوده به کپک مورد مصرف دامها معطوف نمود، علت وقوع بیماری به آلودگی شدید ذرتها به قارچی که با نام *F. moniliforme* Sheldon توصیف شد و سم تولید شده در آن نسبت داده شد (Sheldon 1904). قارچی که بعنوان *F. moniliforme* توصیف شده بود اکنون تحت شش گونه بیولوژیک مشخص گردیده است. سه گونه از آنها با نام‌های *F. subglutinans*(Wollenw. et Reinking) Nelson, *F. proliferatum* Matsushima, Nirenberg و *F. verticillioides* شناخته شده‌اند (Leslie 1995). برای روشن شدن تاکسونومی این جنس پیچیده و ارائه یک نام گذاری تاکسونومیکی مشترک *G. fujikuroi* تحت هشت جمعیت آمیزشی(A-H) ساماندهی شده است (Leslie 1996 and 2001, & Klittich *et al*. 1997) جدایه‌های جمعیتA که

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- میانگین میزان آلودگی ذرت به فومانیزین به تفکیک مرحله نمونه‌برداری

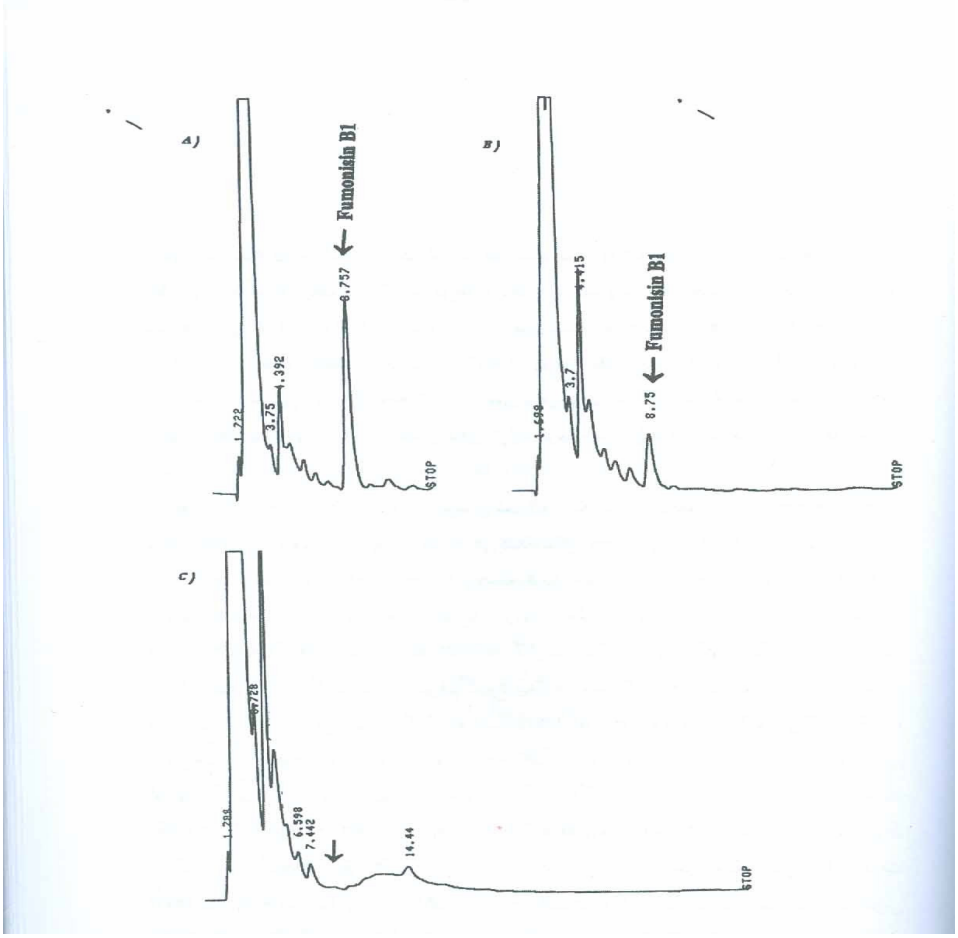
Table. 2. Mean Fumonisin content at various sampling stages

مرحله نمونه برداری	درصدنمونه ها	میانگین آلودگی (ng/g)
sampling stage	%Sample	Mean content (ng/g)
Before harvest	17.3	2979.7
At harvest	37	1284.6
After harvest	8.7	2971.8
After drying	8.7	3491.5
Before silage	11	4337.4
After silage	17.3	3633.5

اغلب همراه ذرت می‌باشد مولد فومانیزین بوده و نام آن از *F. moniliforme* به *F. verticillioides* تغییر یافته (Nirenberg 1976) .جدایه‌های جمعیت D که شامل *F.proliferatum* می‌باشند نیز مقادیر زیادی فومانیزین تولید می‌کنند. بعکس جمعیت سازگار A، اعضائ جمعیت سازگار F (آنامورف *F. verticillioides* syn. *F. moniliforme*) تولید فومانیزین نمی‌کنند (Leslie 1996) و از نظر میزبان محدود به سورگوم می‌باشند. در منابع علمی و گزارشات بیماری مربوط به سالهای ۱۹۰٤ تا ۱۹۷۰ به وضوح روشن نیست که آیا قارچهایی که به *F. verticicilliodes* ارجاع شده حقیقتا *F. subglutinans, F. proliferatum* یا *F. verticillioides* است، در این دوره *F. verticillioides* بعنوان

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ – کروماتوگرام های A) محلول استاندارد ppb ۱۰۰۰ فومانیزین B1، B) نمونـه ذرت حـاوی ۳۱٦ ppb فومانیزین B1، C) محلول مشتق ساز و حلال متانول: آب (v/v , ۵۰: ۵۰).

Fig. 1. Chromatograms of: A) standard solution of 1000 ppb FB1, B) the corn sample No. 42 containing 316 ppb FB1, C) developer solution and methanol: water (50: 50, v/v).

www.SID.ir

Archive of SID

معمولترین بیمارگر خوشه ذرت در نظر گرفته شده است (Kommedahl & Windels 1981)، لیکن بنظر می‌رسد تعداد زیادی از این آلودگی‌ها با دخالت مجموع سه گونه صورت گرفته است. علائم بیماری ناشی از این گونه‌ها از هم قابل تشخیص نیستند و عموما بعنوان پوسیدگی فوزاریومی خوشه ذرت نامیده شده‌اند. تفکیک این گونه از روی رنگ پرگنه، اندازه و شکل اسپور مشکل است. مرحله جنسی *F. verticillioides* و گونه‌های نزدیک آن معمولا *Gibberella*ست ولی بر خلاف *F. graminearum*خود بارور نیست و برای تولید فرم جنسی باید با فرم آمیزشی سازگار جفت گردد.

F. verticillioides تولید زرالنون و تریکوتسن نمی‌کند، سه گونه *F. proliferatum, F. verticillioides* و *F. subglutinans* هر سه تولید فومانیزین می‌کنند، لیکن *F. subglutinans* از این نظر ضعیف است (Abbas *et al*. 1988). *F. verticillioid*es پیوسته تولید مقادیر زیاد فومانیزین می‌کند، جدایه‌های *F. proliferatum* از این نظر متغیرند ومولد مقادیر کم تا زیاد فومانیزین هستند (Munkvold & Desjardin 1997). *F. verticillioides* از سراسر جهان و دو گونه دیگر بیشتر از مناطق معتدل جهان گزارش شده است. علیرغم شیوع بیماری پوسیدگی خوشه ذرت در کانادا فومانیزین در ذرت‌های آلوده خیلی کم گزارش شده است (Vigier *et al*. 1997). مقادیر بالای فومانیزین همراه با قارچهای *F. proliferatum* و *F. verticillioides*در ذرت تا کنون از اروپا، جمهوری خلق چین، آفریقای مرکزی و جنوبی، جنوب آمریکا و ایتالیا گزارش شده است (Kommedahl & Widhels 1981, Munkvold & Desjardins 1997, .Shephard *et al.* 1996) در ایران جداسازی *F. proliferatum* از بذر ذرت بعنوان یکی از اجزا میکو فلور بذر ذرت (Boujari & Ershad 1993) و *F. proliferatum* و*F. verticillioides* از بذر ذرت مناطق شمالی، جنوبی و غربی کشور گزارش شده است (Ghiasian *et al*. 2004). *غیاثیان* و همکاران (۲۰۰۵)جدایه‌های *F. verticillioides* و *F. moniliforme* ذرت خوزستان، مازندران، کرمانشاه و فارس را از نظر تولید فومانیزین در آزمایشگاه مطالعه نموده و هر دو گونه را مولد فومانیزین معرفی نموده‌اند. جدایه‌های یک گونه از نظر میزان تولید فومانیزین دارای تفاوت‌هایی با یکدیگر بوده‌اند، این تنوع در بین

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های یک استان و حتی یک مزرعه نیز مشاهده شده است. همه جدایه‌های *F. verticillioides* سه نوع فومانیزین B1, B2 ,B3 را بترتیب به میزان µg/g ۹۶۶۱– ۲۳۳، ۱۹۷٤–۲۵ و ۱۷۲۵– ٤۸ و همه جدایه‌های *F. proliferatum* نیز به میزان µg/g ٤۱۸۷– ۱۹۷، ۹۲۳– ۱۸ و ۱۱٤۰–۲۱ در محیط کشت تولید نموده‌اند، بیشترین میزان فومانیزین مربوط به جدایه‌های *F. verticillioides* بوده است. آلودگی طبیعی ذرت استانهای مازندران و اصفهان به فومانیزینها نیز گزارش شده است (Yazdanpanah *et al.* 2000)، در بر رسی اخیرالذکر نمونه‌های استان مازندران به مقادیر بالایی از هر سه نوع فومانیزین B2 = 190 -1175 ng/g , B3= 155 – 960 ng/g و B1=1270 – 3980 ng/g آلوده بوده است. نمونه‌های استان اصفهان آلودگی کمتری را نشان داده و تمام آنها به فومانیزین B1 به مقادیر ng/g ۱۰–۵۹۰، ۲۵٪ آنها به فومانیزین B2 با مقدار ng/g ۵۰–۷۰ و ۲۵٪ آنها به فومانیزین B3 با مقدار ng/g ۵۰–۷۵ آلوده بودند (Yazdanpanah *et al.* 2000).

در تحقیق حاضر میزان فومانیزین در ٤٦ نمونه ذرت در مراحل مختلف قبل و پس از برداشت از مزارع و انبارهای ذرت استان گلستان، پرخطرترین منطقه تولید این میکوتوکسین با سطح زیر کشت تقریبی ۶۰۰۰ هکتار به روش HPLC و استفاده از ستونهای ایمنوافینیتی پایش و تعیین مقدار گردید. این آزمایش نشان داد که ۶/۵ ٪ نمونه‌های ذرت مورد بررسی محصول سال ۱۳۸۳ استان گلستان حاوی سه برابر میزان حد توصیه شده جهانی، ng/g ۲۰۰۰، فومانیزین و ٪ ۲۳ آنها دو برابر حد فوق به فومانیزین B1 آلوده بودند. همچنین با این آزمایش مشخص شد که نمونه‌ها در تمامی مراحل قبل از برداشت، زمان برداشت، پس از برداشت، خشک کردن، قبل و بعد از سیلو به فومانیزین آلوده هستند (جدول ۲). بیشترین میزان آلودگی ng/g ۶۸۹۱ و کمترین میزان آلودگی ng/g ۲۶۱ بود. نظر به اینکه نمونه‌های مراحل مختلف بصورت تصادفی از نقاط و محموله‌های مختلف انبار گرفته شده و بررسی برروی نمونه های مشخص نشاندار در مراحل مختلف انجام نشده، از این تحقیق نمی‌توان به همبستگی مشخصی بین مراحل مختلف قبل و بعد از بر داشت با میزان فومانیزین تولید شده در ذرت پی برد.

www.SID.ir

Archive of SID

آب و هوای خشک تیر و مرداد در فصل رشد و سپس شرایط آب و هوایی بارانی در مدت تشکیل کاکل ذرت همراه با شدت بیماری است و کاکل ذرت به خصوص در هفته اول به آلودگی بسیار حساس است و رطوبت روی کاکل آنرا به آلودگی حساس می‌سازد (Munkvold *et al.* 1997b). میزان فومانیزین در دانه‌هایی که به ظاهر آلودگی قارچی داشته‌اند از ذرت‌های سالم به مراتب بیشتر بوده است، توزیع فومانیزین B1 در دانه‌های بدون علائم و دارای علائم در ۱۱٦ بلال اندازه‌گیری و مشخص شده است بیش از ۸۰–۱۰۰ در صد فومانیزین B1 در دانه‌های دارای علائم هر بلال تجمع یافته است (Desjardins *et al*. 1998).

گونه‌های فوزاریوم بقایای ذرت در خاک را بسرعت کلونیزه نموده و *F. verticillioides* و گونه‌های خویشاوند در بذر ذرت استقرار می‌یابند سپس به گیاهچه نیز منتقل می‌شود، راه‌های دیگری نیز برای آلودگی وجود دارد که منجمله آلودگی‌های ساقه، برگ و ریشه است. بعضی از این معبرها به آلودگی سیستمیک می‌رسد، دخالت استرینهای آلوده کننده سیستمیک در آلودگیهای میکوتوکسینی دانه‌ها روشن نیست. مهمترین راه ایجاد آلودگی، آلودگی از طریق کاکل ذرت با اسپورهای موجود در هوا و یا پاشش میکرو و ماکرو کنیدیومها با بارش باران و دانه‌های آسیب دیده توسط حشرات و پرندگان است (Munkvold & Desjardins 1997, Munkvold *et al*. 1997b). لاروهای *Ostrinia nubilalis* نیز ناقل *F. verticillioides* بوده و قارچ را از برگ ذرت به دانه‌ها منتقل می‌کنند (Sobek & Munkvold1999). علائم قابل رویت پوسیدگی بلال و آلودگی‌های بدون علائم در ذرتهایی که بطریق مهندسی ژنتیک مقاوم به این حشرات شده‌اند کمتر است (Munkvold *et al.* 1999,1997a). گونه‌های *F. proliferatum, F. subglutinans* و F. *verticillioides* در بقایای ذرت که احتمالا مهمترین منبع آلوده کننده بذور هستند باقی می‌مانند. ماکرو و میکروکنیدیوم‌های بقایا با بارش باران و یا با باد به قسمت‌هایی از گیاه که بالاتر از سطح زمین است پاشیده می‌شود. هنوز مشخص نشده است که آیا آلودگی ریشه بوسیله کنیدیومها و یا بوسیله میسلیوم رشد یافته در بقایای آلوده صورت می‌گیرد. شخم زدن شدت پوسیدگی بلال را کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

نمی‌دهد و این احتمالا بعلت این است که این قارچها گاه تا ۲۱ ماه یا بیشتر در بقایای آلوده باقی می‌مانند (Cotten & Munkvold1998)

آب و هوای خشک موقع پر کردن دانه و باران آخر فصل همراه با تولید فومانیزین است (Munkvold & Desjardin 1997). بنابرین آبیاری باید به نحوی انجام شود که از استرس در طی دوره بحرانی گیاه کاسته و ریسک آلودگی به فومانیزین نیز کاهش یابد. کارهای زیادی د زمینه غربال ژرم پلاسم کاملا مقاوم به *F. verticillioides* و *F. proliferatum* انجام نشده است بعلاوه غربال براساس علائم قابل مشاهده بلال ممکن است گویای عدم آلودگی دانه‌ها به ظاهر سالم به *F. verticillioides* و فومانیزین نباشد، پروسه تولید فومانیزین در ذرت مشخص نشده است، اما تا مادامیکه میزان رطوبت آن حداقل ۱۸ تا ۲۰ در صد باشد تولید فومانیزین ادامه دارد (Munkvold & Desjardin 1997)، بنابراین رطوبت دانه‌ها باید قبل از انبار به ۱۵٪ کاهش یابد. بیش از ۲٤ گونه فوزاریوم با مسائل سلامت انسان و دام همراه بوده اند و بیشتر از ۱۰۰ متابولیت ثانویه فعال توسط گونه‌های فوزاریوم تولید می‌شود و آلودگی‌های انباری منشا مزرعه‌ای دارند که در شرایط مناسب انبار به رشد خود ادامه می‌دهند (Thrane 2001). دما و رطوبت با فاکتورهای دیگری مثل فعالیت حشرات و جوندگان تغییر می‌یابد. فعالیت این موجودات در انبار میکروکلیمای مناسب رشد قارچ را تامین می‌کند که با شروع رشد قارچ آب حاصل متابولیسم برای رشد بعدی و تولید توکسین مناسب می‌شود (Thrane 2001). در هنگام برداشت کمباین‌های نامناسب سبب ایجاد شکستگی در دانه‌های ذرت می‌شوند که این گونه دانه‌ها و دانه‌های آسیب دیده با حشرات برای آلودگی به قارچ و فومانیزین پیش آماده می‌شوند. بنابرین کاربرد صحیح کمباین نه تنها از شکستگی جلوگیری می‌کند بلکه در مواردی باعث حذف دانه‌های آلوده در مزرعه نیز می‌گردد. کاربرد غربال مناسب نیز ضمن جدا کردن ذرت‌ها بر حسب وزن، ٦۰٪ فومانیزین (B1+B2) ذرتهای یک سیلوی ذخیره‌ای را کاهش داده است. چندین ژن در بیوسنتز فومانیزین دخالت دارند که همگی روی کروموزوم شماره ۱ *F. Verticillioides* قرار دارند. برای وقوع پوسیدگی خوشه ذرت که بوسیله

www.SID.ir

Archive of SID

F. verticillioides ایجاد می‌شود به میکوتوکسین نیازی نیست (Desjardin & Hohn 1997).

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقای دکتر دهقانشعار مدیر محترم پروژه ردیابی و آنالیز میکوتوکسین‌ها (FAO) و آقای دکتر یزدان‌پناه مشاور محترم پروژه که در تجهیز وانتقال فناوری به آزمایشگاه میکوتوکسین‌ها نقش ارزنده‌ای داشتند سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (114-109) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: منصوره میرابوالفتحی، روح‌اله کرمی‌اسبو و حسن امینی، آزمایشگاه تحقیقات میکوتوکسین‌های موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، دانشکده بهداشت دانشگاه شهید بهشتی

www.SID.ir