

## ردیابی گونه‌های فوزاریوم مولد مایکوتوکسین با استفاده از صفات ریخت‌شناسی و مولکولی در دانه ذرت

نجمه جوانبخت اول<sup>۱\*</sup>، مجتبی مرادزاده‌ی اسکندری<sup>۲</sup>، حمید افضلی<sup>۲</sup> و سید محمود اخوت<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی 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\\_javanbakhti@yahoo.com](mailto:n_javanbakhti@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 دانه‌های ذرت بر روی محیط کشت‌های PDA و WA، پس از جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های متعلق به جنس فوزاریوم، مجموعاً تعداد ۴۰ جدایه بدست آمده که با توجه به ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی آنها و مقایسه با کلیدهای شناسایی مربوطه، سه گونه *Fusarium verticillioides*، *F. proliferatum* و *F. graminearum* 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. به علاوه، 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 جدایه‌های 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، آغازگر اختصاصی.

### مقدمه

توکسیکوم<sup>۲</sup> به معنی سم گرفته شده است (تارنر و همکاران ۲۰۰۹). بروز مایکوتوکسیکوزیس در انسان معضلی قدیمی است چنانکه به ارگوتیسم در بخشی از کتاب مقدس مسیحیان اشاره شده است. مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه سمی هستند که جهت عملکرد طبیعی

واژه‌ی مایکوتوکسین (Mycotoxin) از کلمه‌ی مایکوتوکزیکوزیس مشتق گردیده که دارای ریشه‌ی یونانی می‌باشد و از دو واژه‌ی مایکس<sup>۱</sup> به معنی قارچ و

<sup>2</sup>Toxicum

<sup>1</sup>Mykes

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 میکوتوکسین را سریعاً شناسایی نماید، اهمیت بسزایی دارد. در این راستا تکنیک‌های PCR<sup>۲</sup> متنوعی برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم توکسین‌زا توسعه یافته‌اند. بعضی از آنها براساس تک کپی ژن هستند که مستقیماً شامل بیوسنتز میکوتوکسین می‌شوند. بدین منظور که شناسایی گونه‌ی میکوتوکسین‌زا بر اساس ژن اختصاصی تولید میکوتوکسین 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 و نقش 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 میکوتوکسین‌ها آسان‌تر 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<sup>۳</sup>) و آب آگار (WA<sup>۴</sup>) تعیین گردید.

سلول ضروری نمی‌باشند و در طبیعت اغلب توسط گروه‌هایی 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 قرمر یا پوسیدگی جیبرلایی خوشه (*Gibberella ear rot*) با عامل *F. graminearum* می‌گردد (مانکولد ۲۰۰۳). این بیماری به دلیل تولید میکوتوکسین‌ها 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 میکوتوکسین‌ها، فومونیزین‌ها هستند که توسط حداقل ۱۱ گونه‌ی متعلق به قارچ فوزاریوم تولید می‌شوند و *F. verticillioides* و *F. proliferatum* از جمله بیماریگرهای ذرت می‌باشند. به علت ارتباط اپیدمیولوژیک بین خوردن ذرت آلوده به فومونیزین و سرطان مری و آسیب سیستم عصبی در انسان، این میکوتوکسین دارای اهمیت بسیاری است (هندریکز ۱۹۹۹). به علاوه می‌تواند باعث لکوانسفالومالاسی<sup>۵</sup> 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)، و در 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

<sup>2</sup>Polymerase Chain Reaction

<sup>3</sup>Potato Dextrose Agar

<sup>4</sup>Water Agar

<sup>5</sup>Leukoencephalomalacia

شدند. میسلایوم‌ها 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<sup>۲</sup> در دستگاه الکتروفورز (Electrophoresis, PowerPac™ 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, Alphamager 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 رديابی مولکولی آلودگی فوزاریومی دانه‌های ذرت) بکار گرفته شد (جدول ۱). آغازگرهای ساخت شرکت ماکروژن (Macrogen) از طریق شرکت دنایست آسیا، تهیه شدند. فرآیند PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر 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

#### 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 و در 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<sup>۱</sup> (CLA) دو درصد و آب آگار دو درصد منتقل شدند و تشتک‌های پتری زیر نور UV 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 لزی 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 میسلایوم قارچ، جدایه‌های خالص روی محیط کشت PDA به مدت ۴-۵ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، زیر نور مستقیم (نور فلئورسنت استفاده شد) نگهداری شدند (یلی-ماتیل و همکاران ۲۰۰۴). سپس بوسیله اسکالپل ضدعفونی شده در شرایط سترون، میسلایوم‌ها از روی محیط کشت تراشیده

<sup>2</sup>Green Viewer

<sup>1</sup>Carnation leaf-piece Agar

شرکت ماکروژن) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳). 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.

افزوده شد. واکنش‌های PCR پس از بهینه‌سازی، در دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini<sup>TM</sup> Gradient Thermal Cycler Bio Rad, USA) براساس برنامه حرارتی اختصاصی هر آغازگر صورت گرفت (جدول ۲). 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

جدول ۱- توالی جفت آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص جنس *Fusarium* و گونه‌های *F. proliferatum* و *F. verticillioides*

منبع	گونه	اندازه محصول PCR (pb)	توالی هدف	آغازگر
			<b>ITS</b>	
Bluhm et al. 2004	<i>Fusarium</i> genus	۴۳۱	Aactcccaaacccctgtgaacata	ITS F
			Tttaacggcgtggccgc	ITS R
			<b>Calmodulin</b>	
Mule et al. 2004	<i>F. verticillioides</i>	۵۷۸	Cttctcgcatgtttctec	VER1
			Aattggccattggtattatatcta	VER2
			<b>Calmodulin</b>	
Mule et al. 2004	<i>F. proliferatum</i>	۵۸۵	Ctttccccaagtttcttc	PRO1
			Tgtcagtaactcgacgtgttg	PRO2
			<b>IGS</b>	
Jurado et al. 2005	<i>F. graminearum</i>	~۵۰۰	Gttgatgggtaaaagtgtg	Fgr-F
			Ctctcatataccctccg	Fgc-R
			<b>ITS</b>	
Visentin et al. 2009	<i>F. verticillioides</i>	۱۷۲	aaatcgcgttccccaaattga	verITS-F
White et al. 1990			tctcgcgttattgatatgc	ITS4
			<b>ITS</b>	
Visentin et al. 2009	<i>F. proliferatum</i>	۳۹۰	gcttgccgaaggctcgc	proITS-R
White et al. 1990			tccgtaggtgaacctgccc	ITS1

جدول ۲- برنامه حرارتی آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص جنس *Fusarium* و گونه‌های *F. proliferatum* و *F. verticillioides* و *F. graminearum*

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

\* دما در تمامی مراحل بر حسب درجه سلسیوس است.

جدول ۳- توالی جفت آغازگر مورد استفاده برای تشخیص گونه فوزاریوم مولد فامونیزین

نام آغازگر	توالی	توالی هدف	PCR اندازه محصول (bp)	منبع
FUM1F	CCATCACAGTGGGACACAGT	<i>Fum1</i> 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 فوزاریوم جداسازی و خالص سازی گردید. با بررسی جدایه‌های بدست آمده و مقایسه مشخصات ماکروسکوپیکی و میکروسکوپیکی آنها با کلیدهای شناسایی (نلسون و همکاران ۱۹۸۳، برگس و همکاران ۱۹۹۴، و لزی و سومرل ۲۰۰۶)، سه گونه *Fusarium verticillioides* و *F. proliferatum* و *F. graminearum* به ترتیب با فراوانی‌های ۳۴، ۴ و ۲ جدایه شناسایی شدند (جدول ۴).

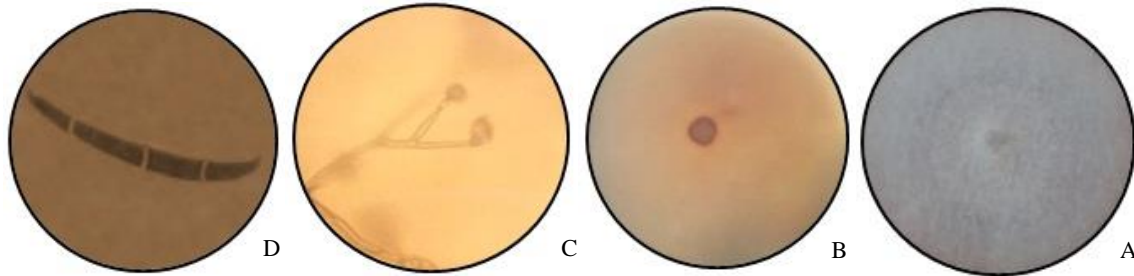
خصوصیات ماکروسکوپیکی و میکروسکوپیکی گونه‌های مزبور به تفکیک به شرح زیر است:

### 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، ۲/۹-۳/۹ سانتی متر، میسلیم‌های 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 ۳-۴ دیواره‌ی

(۲۰۰۰)، داوودی (۲۰۰۲)، محمدی و همکاران (۲۰۰۲)، زمانی (۲۰۰۴)، داوودی و مهربان (۲۰۰۴) و نادریپور (۲۰۰۴) از ذرت گزارش شده است.

عرضی نازک بودند (شکل ۱). نتایج ریخت شناختی این گونه با توصیف ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس و همکاران (۱۹۹۴)، و لزی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه در ایران توسط مهربان

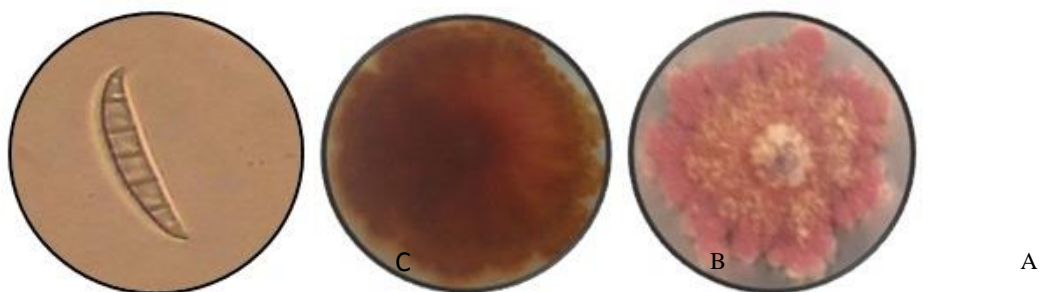


شکل ۱- *Fusarium verticillioides*: (A) رنگ پرگنه (B) رنگ پشت پرگنه (C) مونوفیالید (D) ماکروکنیدی.

سلول انتهایی کمی تیز و سلول پایه آن پاشنه‌ای شکل بود. دارای اسپوردوکیوم نارنجی کمرنگ و فاقد کلامیدوسپور بود (شکل ۲). 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 مهربان (۲۰۰۰)، داوودی و مهربان (۲۰۰۴) و کاظمی و مومنی (۱۳۹۵) از ذرت گزارش شده است.

#### 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 میسلیموم گل‌سرخ تیره و از پشت تشنگ 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 ۵-۶ دیواره‌ی عرضی،



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

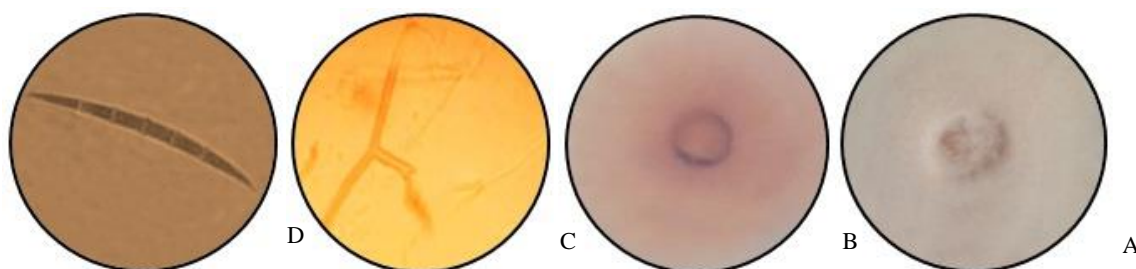
رنگ سفید تا مایل به صورتی، رنگ پرگنه از پشت پتری کرم تا قهوه‌ای و به سمت مرکز بنفش تا بنفش تیره دیده شد. رگه‌هایی به رنگ بنفش نیز رویت گردید. در محیط کشت CLA میکروکنیدی‌های فراوان، تخم مرغی یا چماقی،

#### 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، ۲/۹-۳/۲ سانتی متر، میسلیموم هوایی پنبه‌ای و متراکم به

این گونه با توصیف‌های ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس و همکاران (۱۹۹۴)، و لزی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه در ایران توسط مهریان (۲۰۰۰)، نادرپور (۲۰۰۴) و داوودی و مهریان (۲۰۰۴) از ذرت گزارش شده است.

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 ۳-۵ دیواره‌ی عرضی بود. کلامیدوسپور مشاهده نشد (شکل ۳). نتایج ریخت شناختی



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

جدول ۴- محل نمونه‌برداری و مشخصات جدایه‌ها

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

## ادامه جدول ۴

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

جنس فوزاریوم مورد تایید قرار گرفتند (شکل ۴)، 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

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



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 (شکل ۴). نتایج بررسی‌های مولکولی این بخش از تحقیق، تأییدی بر نتایج ریخت شناختی جدایه‌ها بودند.

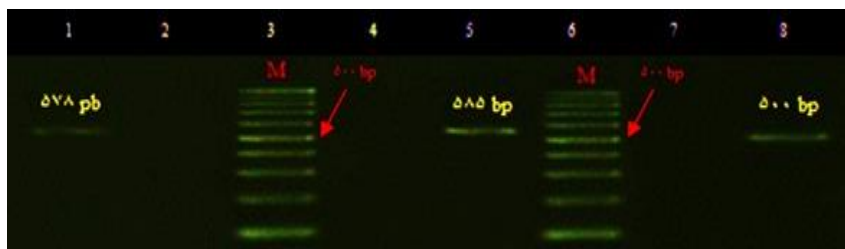
جدایه‌ها قطعه DNA به طول ۵۸۵ و ۳۹۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۴). یک جفت آغازگر اختصاصی *F. graminearum* (جورادو و همکاران ۲۰۰۵) در جدایه‌هایی که با بررسی ویژگی‌های ریخت شناختی *F. graminearum* شناسایی شدند، قطعه DNA ~۵۰۰ جفت بازی را تکثیر نمود و نشان داد که جدایه‌ها متعلق به گونه *F. graminearum* می‌باشند (شکل ۴). برای ردیابی گونه *F. verticillioides* دو جفت آغازگر اختصاصی، VER1/2 و verITS-F/ITS4 استفاده شد،



شکل ۴- نمایی کلی از محصول PCR شناسایی جنس فوزاریوم و گونه‌های متعلق به آن. چاهک‌های ۱، ۷، ۱۰، ۱۲ به ترتیب از چپ به راست) آغازگرهای: VER1/2، PRO1/2، verITS-F/ITS4، ITS F/R، .proITS-R/ITS1، .Fgr-F/Fgc-R، چاهک (۵) *F. verticillioides* (چاهک ۶ و ۲) کنترل منفی *F. verticillioides* (چاهک ۷ و ۳) *F. proliferatum* (چاهک ۸ و ۴) کنترل منفی *F. proliferatum* (چاهک ۹) کنترل منفی جنس *Fusarium* (چاهک ۱۰ و ۱) کنترل منفی، *F. graminearum* (M) DNA سایز مارکر ۱۰۰ bp (Ladder, ThermoScientific - Fermentas, Canada).

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.

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-



شکل ۵- نمای کلی محصول PCR ردیابی گونه‌های فوزاریوم از دانه ذرت. چاهک ۲۰۱) 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 (M) DNA سایز مارکر ۱۰۰bp (Ladder, ThermoScientific - Fermentas, Canada).

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).

### 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



شکل ۶- 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) فاقد پتانسیل تولید فومونیزین. DNA (M) سایز مارکر ۱۰۰bp (Ladder, ThermoScientific - Fermentas, Canada).

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

### نتیجه‌گیری و بحث

پوسیدگی فوزاریومی خوشه یا بلال یکی از متداول-ترین 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

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 Spacer) 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*، جدایه‌های متعلق به جنس فوزاریوم و گونه‌های *F. verticillioides*، *F. proliferatum* و گونه‌های مزبور شناسایی 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 توالی‌یابی ناحیه ITS دو گونه *F. verticillioides* و *F. proliferatum* که از نظر ریخت‌شناختی مشابه یکدیگر هستند را تفکیک نمودند. به علاوه

علائم بیماری قارچی موجود در سیلوهای دامداری و مرغداری‌های مختلف استان خراسان رضوی صورت پذیرفت. براساس بررسی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی آلودگی به قارچ فوزاریوم عامل بیمارگر در تمام نمونه‌های جمع‌آوری 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 ریخت‌شناختی 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 ریخت‌شناختی به دلیل هم‌پوشانی این خصوصیات به سختی امکان‌پذیر 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 ریخت‌شناختی بسیار مشابه هستند و تنها وجه تمایز و تفکیک آنها، سلول‌های کنیدی‌زا یا فیالیدها

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 کلیه 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.

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. boothii* و *F. meridionale* را شامل شد (دووان و همکاران ۲۰۱۶). نتایج بدست آمده از شناسایی وردیابی مولکولی گونه‌های *F. verticillioides*، *F. graminearum* و *F. proliferatum* 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 وقت‌گیری 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

## منابع

- آشناگر ل، رضایی س، درویش نیا 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 نهایی 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.

- داوودی ع، ۱۳۸۱. معرفی قارچ عامل پوسیدگی طوقه ذرت در قزوین. صفحه ۸۲ خلاصه مقاله های پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه، ایران.
- داوودی ع، و مهران ف، ۱۳۸۳. شناسایی عوامل بیماریزای قارچی خوشه و دانه ذرت در منطقه قزوین. صفحه ۱۱۵ خلاصه مقاله های شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تبریز، ایران.
- ربیعی مطلق ا، فلاحی رستگار م، روحانی ح، جعفرپور ب و جهان بخش و، ۱۳۸۹. بررسی فوزاریوم‌های بذرزاد پیاز در استان 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 کنگره گیاهپزشکی ایران، تبریز، ایران.
- عظیمی ص، ۱۳۹۰. بررسی پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت در استان خوزستان. مجله تحقیقات غلات، جلد ۱، 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 و دومین 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 کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه، ایران.
- مهران ف، ۱۳۷۰. معرفی عامل بیماریزای خوشه ذرت در استان‌های مازندران و گیلان. صفحه ۲۸۹ خلاصه مقاله های چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان، ایران.
- نادرپور م، ۱۳۸۳. مایکوفلور بذر ذرت هیبرید رقم سینگل کراس ۷۰۴ دشت مغان. صفحه ۱۲۰ خلاصه مقاله های شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تبریز، ایران.

Abd-El Fatah SI, Naguib MM, El-Hossiny EN, Sultan YY, Abodalalm 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. 3<sup>rd</sup> 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.

- 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-Erassquin 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. Fumonisin 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, Rodriguez 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. Fumonisin 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.

- 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.

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

N Javanbakht-Avval<sup>1\*</sup>, M Moradzadeh-Esakandari<sup>2</sup>, H Afzali<sup>2</sup> and S M Okhovvat<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Former MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Kashmar University of Science and Culture, Iran.

<sup>2</sup>Respectively, Assistant Professor and Instructor, Department of Plant Protection, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Khorasan-Razavi Province, Mashhad, Iran.

<sup>3</sup>Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

\*Corresponding author: [n\\_javanbakht1@yahoo.com](mailto: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. verticillioides* isolates gave the expected fragment with 183 bp in size. Therefore, this study demonstrated that *F. verticillioides* 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.