پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۱ (۴): ۲۷-۱۵ (۱۴۰۱)- مقاله پژوهشی

Journal of Applied Research in Plant Protection 11(4): 15–27 (2023)-Research Article

DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2022.15740

شناسایی توکسین فومونیسین B_1 در قارچ *Fusarium verticillioides* و تأثیر اسیدیته، رطوبت نسبی و نور بر تولید آن در بستره بذر ذرت

مصطفی درویش‌نیا[۱]✉، سمانه سن‌شناس[۱]، عیدی بازگیر[۱]، فاطمه درویش‌نیا[۲]

[۱] *گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.* [۲] *گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.* ✉darvishnia.m@lu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۶ بازنگری: ۱۴۰۰/۸/۱۸ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۵

چکیده

قارچ *Fusarium verticillioides* یکی از مهم‌ترین و مستعدترین قارچ‌های تولیدکننده فومونیسین‌ها است و هر ساله خسارت عمده‌ای به محصولات کشاورزی و مصرف‌کنندگان آن‌ها وارد می‌کند. تولید این توکسین‌ها به میزان زیادی تحت تأثیر عوامل محیطی می‌باشد. در این پژوهش تأثیر عوامل محیطی شامل نور (۰، ۱۲ و ۲۴ ساعت نور)، رطوبت بذر (۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۳، ۲۵، ۲۸ و ۳۰ درصد) و pH (چهار، پنج، شش و هفت) روی تولید فومونیسین B_1 قارچ *F. verticillioides* بررسی شد. بدین منظور ابتدا جدایه‌های قارچ مورد نظر از مزارع ذرت دارای علایم و نشانه‌های آلودگی جداسازی و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی شناسایی شدند. سپس فومونیسین B_1 نمونه‌ها توسط حلال‌های استونیتریل، متانول و موادی از قبیل رزین کاتیونی و آلومینیاکربن استخراج و با روش TLC و HPLC ردیابی و شناسایی شد. در نهایت تاثیر عوامل محیطی ذکر شده روی جدایه‌ای که توانایی تولید کافی توکسین فومونیسین B_1 را داشت، سنجیده شد. نتایج آزمون HPLC نشان داد که مقدار فومونیسین B_1 تولید شده توسط جدایه مورد بررسی از قارچ *F. verticillioides* در تیمارهای مختلف در محدوده ۲۰۰ الی ۵۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر است. بیشترین میزان فومونیسین B_1 تولید شده در جدایه مورد بررسی در شرایط با رطوبت ۲۸ درصد بذر ذرت، pH= ۴ و روشنایی ۲۴ ساعته به ترتیب به میزان ۴۲۴، ۴۲۲ و۵۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. بر این اساس می‌توان با کنترل شرایط محیطی در انبار و سیلو، تولید فومونیسین‌ها را به حداقل رساند.

کلمات کلیدی: فومونیسین‌ها، متابولیت ثانویه، میکوتوکسین، *Fusarium verticillioides*

Identification of *Fusarium verticillioides* fumonisin B1 mycotoxin and the effects of pH, relative humidity and light on its production on maize substrate

Mostafa Darvishnia[1]✉, Samaneh Senshenas[1], Eadi Bazgir[1], Fatemeh Darvishnia[2]

[1]*Department of Plant Protection, Faculty of Agricaltural and Resources, Lorestan University, KhorramAbad, Iran.*
[2]*Plant Breeding and Biotechnology Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*. ✉darvishnia.m@lu.ac.ir

Received: 18 Oct 2021 Revised: 9 Nov 2021 Accepted: 24 Feb 2022

Abstract

Fusarium verticillioides is one of the most important and potent fungi producing fumonisins and causes major damage to agricultural products and adverse health effects on comcumers. The production of these toxins is greatly influenced by environmental factors. In this study, the effect of environmental factors, including light duration (0, 12 and 24 h), seed moisture content (15, 18, 25, 23, 25, 28 and 30%) and pH (4, 5, 6 and 7) were evaluated on fumonisin B1 production. Towards this aim, fungal isolates were recovered from corn fields showing signs and symptoms of infection and were subjected to morphological identifiction. Fumonisin B1 was extracted using acetonitrile, methanol, cationic resin, alumina carbon, and then detected by TLC and HPLC methodes.The identity of the isolates was determined as *F. verticillioides*. The results of HPLC analysis showed that the amount of fumonisin B1 produced by *F. verticillioides* in different treatments ranged from 200 ng/ml to 520 ng/ml. The highests amount of fumonisin B1 including 424 ng/ml, 422 ng/ml and 520 ng/ml were produced in 28% corn seed moister pH: 4 and 24 hours-light treatment, respectively. Therefore, by controlling the environmental conditions in seed storage and silo, the production of fumonisins can be minimized.

Key words: Fumonisins, Secondary metabolite, Mycotoxin, *Fusarium verticillioides*

How to cite:

Darvishnia M, Senshenas S, Bazgir E, Darvishnia F, 2023. Identification of *Fusarium verticillioides* fumonisin B1 mycotoxin and the effects of pH, relative humidity and light on its production on Maize substrate. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (4): 15–27.

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی و ثانویه تولید شده توسط طیف وسیعی از قارچ‌ها روی انواع مختلفی از مواد هستند و اثرات سمی این ترکیبات روی انسان و حیوانات برای قرن‌ها شناخته شده است (Atkins & Norman 1998; Singh 2019). واژه مایکوتوکسین اولین بار در سال ۱۹۶۲ میلادی پس از اینکه حدود صد هزار بوقلمون در انگلیس در اثر یک بیماری ناشناخته مردند، رواج یافت. این بیماری ناشی از توکسین تولیدشده از قارچ *Aspergillus flavus* Link روی کنجاله بادام‌زمینی موجود در خوراک پرندگان بود. به دنبال این بحران دانشمندان احتمال دادند سایر متابولیت‌های قارچ‌ها نیز ممکن است کشنده باشند. سال‌های بین ۱۹۶۰ تا ۱۹۷۵ دوره طلایی مطالعات پیرامون توکسین‌های قارچی بود، چرا که دانشمندان پژوهش‌های وسیعی را درباره این عوامل مولد توکسین انجام دادند (Bhat *et al.* 2010). در ادامه سایر مایکوتوکسین‌ها نظیر آفلاتوکسین‌ها، فومونیسین‌ها، تریکوتسین‌ها، پاتولین و دیگر مایکوتوکسین‌ها در محصولات غذایی و خوراکی در همه نقاط جهان یافت شدند و مشخص شد که این متابولیت‌های ثانویه می‌توانند نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های حیوانات و انسان‌ها داشته باشند (Groopman & Pestka 2014, Liu *et al.* 2020).

یکی از قارچ‌های بارز در تولید توکسین گونه‌های جنس *Fusarium* می‌باشد که مایکوتوکسین‌های زیادی از جمله تریکوتسین‌ها، زیرالنون‌ها، فومونیسین‌ها، مونیلیفرمین، بئووریسین و فوزاپرولیفرین تولید می‌کند (Jestoi 2008). اگر چه تاکنون ۱۳ گونه از جنس *Fusarium* به عنوان تولید کننده فومونیسین‌ها شناخته شده‌اند، اما *F. verticillioides* Nirenbeg و *F. proliferatum* (Martin) Nirenberg مهم‌ترین گونه‌های مرتبط با آلودگی به فومونیسین‌ها ذکر شده‌اند (Marín *et al.* 2010) که عامل اصلی بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت در سراسر جهان می‌باشند (Picot *et al.* 2010). بیماری پوسیدگی بلال ذرت یکی از مهم ترین بیماری های این محصول به شمار می رود.

تاکنون ۱۵ همولوگ مختلف از فومونیسین‌ها به نام فومونیسین‌های A، B، C و P جداسازی و مشخص شده است (Braun & Wink 2018). در میان فومونیسین B، فومونیسین‌های B_1، B_2 و B_3 بیشترین فراوانی را دارند و فومونیسین B_1 سمی‌ترین شکلی است که می‌تواند با سایر اشکال فومونیسین، یعنی B_2 و B_3 وجود داشته باشد (Damiani *et al.* 2019). فومونیسین B_1 متشکل از یک دی استر با اسید پروپان-۱،۲،۳-تری کربوکسیلیک (TCA) و ۲-آمینو-۱۲،۱۶-دی‌متیل-۳،۵،۱۰،۱۴،۱۵-پنتاهیدروکسی لیکوزان است که در آن گروه هیدروکسیل (OH-) در موقعیت‌های C-14 و C-15 درگیر با گروه‌های کربوکسیل (-COOH) TCA برای تشکیل یک استر است. از طرف دیگر فومونیسین‌های B_2 و B_3 در واقع آنالوگ‌های دهیدروکسی C-5 و C-10 فومونیسین B_1 هستند (Shephard 1998).

پژوهش‌های انجام شده، نشان داده است که افزایش آلودگی مواد غذایی به مایکوتوکسین با تغییرات آب و هوایی ارتباط معنی‌داری دارد (Marroquín-Cardona *et al.* 2014). در مطالعه‌ای مشخص شده است که بارندگی کم و دمای بالا در زمان گل‌دهی و بارندگی زیاد و یا درجه حرارت بالا درست قبل از برداشت ذرت، منجر به تولید فومونیسین بیشتر می‌شود (Santiago *et al.* 2015). در مطالعه دیگری مشخص شد که افزایش رطوبت باعث افزایش رشد پرگنه قارچ‌های *F. verticillioides* و *F. proliferatum* و همچنین افزایش تولید فومونیسین شده است (Samapundo *et al.* 2005). علاوه بر رطوبت، درجه حرارت محیط نیز به عنوان عامل مؤثر در تولید فومونیسین شناخته شده است (Sanchis *et al.* 2006). همچنین مشخص شده است قارچ‌های *F. proliferatum* و *F. verticillioides* در بستر کشت ذرت، شرایط نوری و در طول موج‌های مختلف نور نسبت به شرایط تاریکی، فومونیسین بیشتری تولید می‌کنند (Fanelli *et al.* 2012).

از آنجایی که برخی از گونه‌های جنس *Fusarium* از جمله *F. verticillioides* و *F. proliferatum* در شرایط محیطی مختلف با تولید میکوتوکسین فومونیسین B_1 روی محصولات کشاورزی و مواد غذایی باعث خسارت جبران ناپذیری روی مصرف کنندگان آن می‌شود، لذا در این پژوهش ابتدا جدایه‌های گونه *F. verticillioides* از گیاهان آلوده ذرت جداسازی و شناسایی شدند، سپس توانایی تولید توکسین فومونیسین B_1 در این جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و جدایه‌ای که توانایی بالایی در تولید این توکسین داشت انتخاب گردید و سپس تأثیر عوامل محیطی از جمله نور، pH و رطوبت بذر ذرت بر میزان میکوتوکسین تولیدی سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی نمونه‌ها

نمونه‌برداری از گیاهان ذرت مشکوک به آلودگی به قارچ *Fusarium* شامل پوسیدگی، زردی و چروکیدگی و وجود لکه روی بذر ذرت از مزارع شهرستان خرم‌آباد، بخش سراب چنگایی (عرض جغرافیایی: ۳۳,۴۶۹۸۹۱ و طول جغرافیایی ۴۸,۲۶۷۳۲۲) انجام شد. نمونه‌ها جهت جداسازی و خالص‌سازی عوامل قارچی به آزمایشگاه انتقال و در یخچال نگهداری شدند. بدین منظور بافت تارهای ابریشمی، ساقه و بذرها قطعه قطعه شدند و پس از شستشو با آب مقطر و ضدعفونی سطحی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA; Merck, Germany) انتقال و سپس در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ۴۸ ساعت پرگنه‌های قارچی دارای ویژگی جنس *Fusarium* جداسازی و به تشتک پتری حاوی محیط PDA انتقال داده شدند و با استفاده از روش تک اسپور کردن و نوک‌ریسه، قارچ‌های جدا شده خالص‌سازی گردیدند. جدایه‌های خالص شده برای مطالعات بعدی در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت SNA در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی ظاهری ساختارهای غیرجنسی و کشت از جمله الگوی رشد پرگنه روی محیط PDA، رنگ میسلیوم هوایی، رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری، شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، شکل و چگونگی تشکیل آن روی سلول کنیدیوم‌زا (زنجیری یا توپ‌های اسپوری)، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، نوع سلول‌های کنیدیوم‌زا (مونوفیالید یا پلی‌فیالید) روی محیط‌های کشت مختلف (PDA، برگ میخک آگار (CLA)، SNA و KCl Agar) و در شرایط نوری و دمایی توصیه شده در منابع معتبر انجام گرفت (Nelson *et al*. 1983; Gerlach & Nirenberg 1982; Leslie & Summerell 2006).

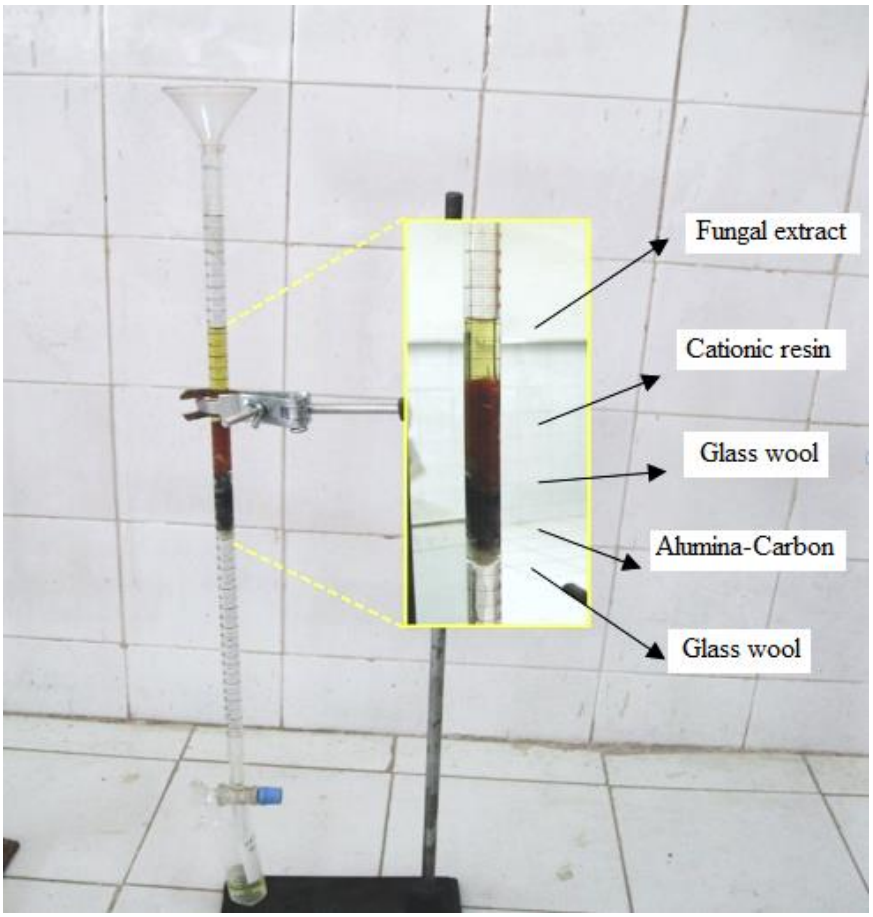
بررسی توانایی تولید توکسین فومونیسین B1 در جدایه‌ها

جدایه‌های قارچی *F. verticiloides* به منظور بررسی توانایی تولید مایکوتوکسین B_1 ابتدا روی بستره بذر ذرت مطابق روش زیر کشت داده شدند. ابتدا در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری به میزان ۱۰۰ گرم بذر ذرت ریخته شد. سپس به هر ارلن مقدار ۳۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد و درب ارلن‌ها با پنبه و فویل آلومینیومی مسدود گردید و پس از آن ظروف ارلن دو بار با فاصله ۲۴ ساعت به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع سترون شدند. پس از آن در زیر هود آزمایشگاهی و در شرایط سترون پنج عدد قرص میسلیومی به قطر یک سانتی‌متر از کشت تازه و در حال رشد فعال (سه تا چهار روزه) جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* به هر کدام از ارلن‌ها اضافه شد. ارلن‌ها در شرایط تاریکی نگهداری شدند و از روز سوم به بعد، روزی دو بار به آرامی تکان داده شدند و بعد از روز هفتم، عمل استخراج توکسین از آنها انجام گرفت. توانایی تولید و نیز کمیت‌سنجی توکسین تولید شده با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC; Thin Layer Chromatography) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC; High Performance Liquid Chromatography) سنجیده شد (Moosavian *et al*. 2018). با توجه به سریع‌تر و ارزان‌تر بودن روش TLC ارزیابی اولیه توکسین‌زایی برای همه جدایه‌ها با این روش انجام شد و سپس از جدایه‌هایی که در این روش توانایی تولید توکسین را نشان دادند و یک جدایه که توانایی تولید توکسین نشان نداد (شاهد)، برای ارزیابی کمی توکسین با روش HPLC انتخاب شدند.

استخراج توکسین فومونیسین

به منظور استخراج عصاره حاوی توکسین، ابتدا بذرهای ذرت داخل هر ارلن به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس نگهداری و سپس آسیاب شدند. به یک نمونه ۱۵ گرمی از هر نمونه آسیاب شده، ۴۸ میلی‌لیتر استونیتریل، سه میلی‌لیتر متانول و ۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و سپس روی شیکر با سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه به مدت سه ساعت تکان داده شد. مخلوط حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰ صاف گردید و عصاره حاصله در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری سترون جمع‌آوری شد. پس از آن، عصاره حاصله از ستون تصفیه حاوی رزین کاتیونی و مخلوط آلومینا-کربن عبور داده شد. بدین منظور ابتدای ستون با یک لایه پشم شیشه مسدود و روی آن یک گرم مخلوط آلومینا-کربن اضافه شد و مجددا یک لایه پشم شیشه روی مخلوط آلومینا-کربن اضافه و انتهای آن نیز مسدود شد. در مرحله بعد رزین کاتیونی که از قبل به مدت یک ساعت در آب مقطر قرار گرفته بود، روی پشم شیشه ریخته شد و در نهایت به منظور خالص‌سازی توکسین، عصاره قارچی نمونه‌ها از ستون عبور داده شد. عصاره عبور داده شده ستون اول با استفاده از ستون تصفیه دوم به ترتیب شامل

پشم‌شیشه و آلومینا-کربن و پشم‌شیشه مجدداً خالص و سپس عصاره حاصل از ستون تصفیه دوم برای تبخیر حلال به آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس منتقل گردید (شکل ۱). پس از خشک شدن عصاره استخراج‌شده، دو میلی‌لیتر محلول متانول-آب (۱۰ به ۹۰) به آن اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس دو میلی‌لیتر محلول متانول-آب (۵ به ۹۵) و دو میلی‌متر محلول استونیتریل-متانول (۳ به ۱) نیز به آن اضافه شد. به‌منظور تبخیر مجدد حلال، عصاره در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و در نهایت به عصاره خشک‌شده، دو میلی‌متر محلول متانول-آب (۵ به ۹۵) اضافه شد و عصاره استخراج‌شده نهایی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید (Davari *et al.* 2014).

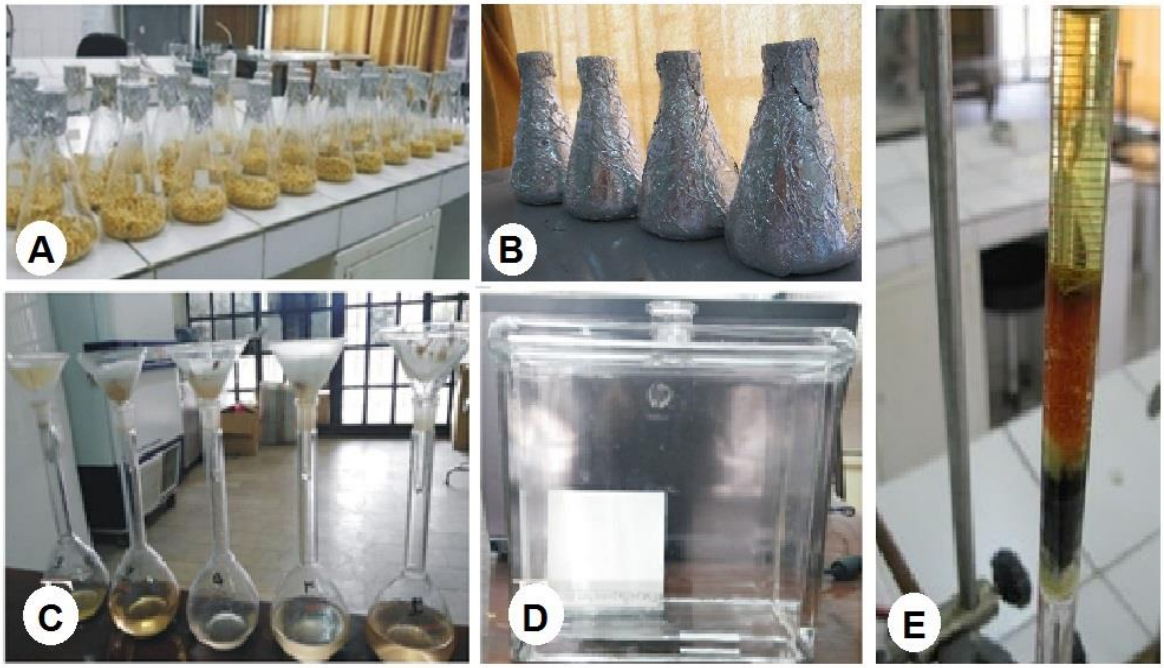


شکل ۱. ستون تصفیه رزین کاتیونی و آلومینا کرین جهت خالص‌سازی توکسین تولیدی قارچ *Fusarium verticiloides*.

Figure 1. Cationic resin and Alumina-Carbon refining column for purification of the toxin produced by *Fusarium verticiloides*.

بررسی اولیه توکسین‌زایی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography) TLC

قبل از انجام آزمایش HPLC و اجتناب از خطا در دستگاه HPLC، از روش آسان و سریع کروماتوگرافی لایه نازک برای تفکیک، جداسازی و شناسایی اولیه فومونیسین B_1 از نمونه‌های جمع‌آوری شده و تیمارهای مورد آزمایش (نور، رطوبت و pH) استفاده شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره استونیتریلی جدایه‌ها و تیمارها به همراه پنج میکرولیتر از استاندارد فومونیسین (تهیه شده از آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان) بصورت نقطه‌ای روی صفحه‌ها (TLC) لکه گذاری شد و در تانک حاوی حلال استونیتریل-آب (حجم/حجم ۱:۱) قرار داده شد (شکل ۱- F). وقتی جبهه حلال به یک سانتی‌متری انتهای صفحه رسید، صفحه‌ها از تانک حلال خارج و خشک شدند. برای ظهور فومونیسین B_1 از معرف نینهیدرین (Ninhydrin) ۰/۲ درصد در اتانول روی صفحه TLC اسپری شد. صفحه‌هایی که با نینهیدرین اسپری شده بودند در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد تا ظهور رنگ انکوبه شدند (Mohammadi Gholami 2014; Trucksess, 2001).



شکل ۲. مراحل تولید و استخراج مایکوتوکسین فومونیسین از قارچ *Fusarium verticillioides*: **A.** بذرهای ذرت اتوکلاو شده و آماده برای مایه‌زنی با جدایه‌های قارچ *F. verticillioides*، **B.** ظروف ارلن‌مایر پوشانده شده با فویل آلومینیوم برای تأمین شرایط تاریکی، **C.** صاف کردن عصاره قارچ با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰، **D.** سنجش توکسین با استفاده از تانک TLC، **E.** ستون تصفیه رزین کاتیونی و آلومینا-کربن.

Figure 2. Stages of production and extraction of fumonisin from *F. verticillioides*: **A.** Autoclaved corn seeds ready to inoculate with *F. verticillioides* strains; **B.** Erlenmeyer flasks covered with aluminium foil to provide dark conditions; **C.** Purification of the fungal filtrate with Whatman no. 40 filter paper; **D.** Assessment of toxins using TLC tanks; E. Cationic resin and Alumina-Carbon refining column.

سنجش توکسین تولید شده در جدایه‌ها به روش HPLC

بدین منظور، ۱۰ نمونه از ۲۵ نمونه (یک نمونه شاهد بدون نشان دادن لکه روی صفحه TLC) که در روش TLC توکسین‌زایی آنها اثبات شده بود و بیشترین میزان لکه‌گذاری را داشتند برای کمیت‌سنجی به روش HPLC انتخاب شدند. به این منظور، از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارساز فلورسنت با استفاده از دستگاه KNAUER بر اساس روش سیدنهام و همکاران (Sydenham *et al.* 1995) استفاده شد. عصاره به دست آمده به ستون ایمیونوافینیتی (IAC) Immunoaffinity Columns (R-Biopharm Rhone Ltd, UK) با قطر داخلی ذرات ۰/۵ میلی‌متر تزریق گردید. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر عصاره به ستون کروماتوگرافی فاز معکوس C18-Supelco Discovery به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۴/۵ میلی‌متر و قطر ذرات پنج میکرومتر متصل به دستگاه Unicam-Crystal- 200 (Brand Kinesis, UK) تزریق گردید. فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل (۲۰ درصد)، متانول (۲۰ درصد) و آب دیونیزه (۶۰ درصد) بود که با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه از ستون عبور داده شد. ردیاب از نوع فلورسانس در طول موج تحریکی ۳۶۵ نانومتر و طول موج خروجی ۴۴۵ نانومتر تنظیم گردید. به‌منظور تقویت فلورسانس فومونیسین‌ها از ستون مشتق‌ساز تولیدکننده برم PB.PB با قطر ذرات داخلی ۰/۵ میلی‌متر (R-Biopharm Rhone Ltd, UK) استفاده شد. غلظت فومونیسین B_1 در هر کدام از تیمارها و جدایه‌ها بر اساس مطابقت پیک خروجی با زمان بازداری پیک استاندارد و بر اساس غلظت نمونه استاندارد تعیین شد (Shephard 2009). سپس جدایه‌ای از *F. verticillioides* که توانایی ایده‌آل در تولید توکسین را بین سایر جدایه‌ها مورد آزمایش داشت برای بررسی اثر فاکتورهای محیطی و کشت روی بستره جهت توکسین‌زایی این قارچ مورد استفاده قرار گرفت.

نحوه اعمال تیمار pH محیط کشت بر تولید فومونیسین B_1 توسط قارچ Fusarium verticiloides

برای بررسی تأثیر pH محیط کشت روی رشد قارچ از محیط کشت مایع سیب‌زمینی-دکستروز (Potato Dexterose Broth, PDB) استفاده شد. بدین منظور ابتدا pH محیط کشت

با استفاده از KCl و NaOH روی مقادیر سه، چهار، پنج، شش و هفت تنظیم و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون گردید. به هر ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB با pHهای تنظیم شده، مقدار ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپوری به غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر در شرایط سترون و زیر هود لومینار اضافه شد. ارلن‌های تلقیح شده در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از گذشت ۱۴ روز جهت خالص‌سازی توکسین تولیدی قارچ رشد کرده در محیط PDB، ابتدا مایع قارچ مورد نظر از روی کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰ عبور داده شد. در نهایت با استفاده از ستون تصفیه حاوی رزین کاتیونی و مخلوط آلومینا-کربن و پشم شیشه توکسین‌های تولیدی خالص‌سازی شدند و سپس با استفاده از روش TLC میزان اولیه توکسین‌زایی قارچ مشخص شد و در نهایت میزان کمی آن با استفاده از روش HPLC سنجیده شد (شکل ۱).

نحوه اعمال تیمار نور محیط بر تولید فومونیسین B_1 توسط قارچ Fusarium verticiloides

برای اعمال تیمار نور، ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم بذر ذرت در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و ۲۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد و پس از بستن درب با فویل آلومینیومی، دوبار در فاصله ۲۴ ساعته در انکوباتور با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی به غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر به ارلن‌ها اضافه شد. در مرحله بعد سه تیمار شامل تاریکی مطلق، روشنایی مداوم و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی روی ارلن‌ها اعمال شد. به‌منظور فراهم آوردن شرایط تاریکی، بدنه ارلن‌ها به طور کامل با استفاده از فویل آلومینیومی پوشش داده شد همچنین برای ایجاد شرایط روشنایی از نور معمولی محیط و نور لامپ ال ای دی استفاده شد (شکل ۱-B). بعد از ۱۴ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، توکسین تولیدی استخراج و خالص‌سازی شد و سپس با استفاده از روش TLC و HPLC میزان تولید آن‌ها سنجیده شد.

نحوه اعمال تیمار رطوبت بذر ذرت بر تولید فومونیسین B_1 توسط قارچ Fusarium verticiloides

برای اعمال تیمار رطوبت، همانند روش قبل بذرهای ذرت اتوکلاو و سپس با قارچ فوزاریوم تلقیح شدند و سپس ارلن‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت بذر ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۳، ۲۵، ۲۸ و ۳۰ درصد قرار داده شدند (شکل ۱-A). میزان رطوبت بذرهای ذرت بر اساس روش استاندارد وزنی مقدار رطوبت اولیه بذرها محاسبه شد. در این روش ابتدا ارلن حاوی بذرهای مورد نظر دو بار اتوکلاو و سپس در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا رطوبت بذور تبخیر گردد. مجدداً بذور وزن شده و درصد رطوبت آن‌ها طبق معادله ۱ محاسبه گردید (ISTA 1999):

(۱) درصد رطوبت بذر = (وزن تر - وزن خشک / وزن تر) ×۱۰۰

در نهایت برای به دست آوردن نمونه‌های با رطوبت مشخص، مقدار آب مقطر مورد نیاز طبق (معادله ۲) محاسبه و به نمونه‌ها اضافه شد (Hampton & Teckrony 1995).

$$W_2 = W_1\left(\frac{M_1 - M_2}{100 - M_1}\right) \quad (۲)$$

در این فرمول، W_2: جرم آب مقطر (گرم)، W_1: جرم نمونه (گرم)، M_1: میزان رطوبت نهایی و M_2: میزان رطوبت اولیه می‌باشد. سپس بعد از ۱۴ روز توکسین تولیدی تیمارها با استفاده از ستون تصفیه آلومنیا-کرین و رزین کاتیونی استخراج و خالص‌سازی شد و در نهایت با استفاده از روش TLC میزان توکسین‌زایی اولیه و با استفاده از روش HPLC میزان تولید کمی آن‌ها سنجیده شد.

تجزیه داده‌ها

بررسی تمام فاکتورهای اعمال شده شامل رطوبت، اسیدیته و نور روی رشد قارچ *F. verticillioides* و تولید فومونیسین‌ها، در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تیمارهای مختلف با نرم افزار SAS 9.4 در سطح آماری یک درصد انجام گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد (Yazdisamadi *et al*. 2014).

نتایج

نتایج کمی فومونیسین تولید شده توسط قارچ Fusarium verticillioides

در مجموع، ۲۵ جدایه متعلق به جنس *Fusarium* از ۳۰ نمونه ذرت جمع‌آوری شده از منطقه سراب چنگایی شهرستان

خرم‌آباد به دست آمد. جدایه‌های *Fusarium* بر اساس مشخصات و معیارهای ریخت‌شناختی شناسایی شدند که در مجموع ۱۵ جدایه متعلق به *F. verticillioides* و ۱۰ جدایه متعلق به *F. proliferatum* بود.

در روش TLC از بین ۲۵ جدایه، ۹ جدایه توانایی اولیه آنها در تولید توکسین اثبات شد و این ۹ جدایه و جدایه *Fusarium proliferatum* N991 (بعنوان جدایه شاهد) که توانایی تولید توکسین در روش TLC را نشان نداده بود برای ارزیابی کمی تولید توکسین در روش HPLC استفاده شدند. نتایج HPLC تولید توکسین این ۱۰ جدایه نشان داد که به غیر از جدایه *F. proliferatum* N991 سایر جدایه‌ها پیک خروجی مشابه با پیک شاهد استاندارد فومونیزین را دارا بودند و مشخص شد که جدایه‌های مورد بررسی توکسین B_1 را تولید کرده‌اند. بررسی سطح زیر گراف میزان دقیق توکسین تولید شده توسط هر جدایه را نمایان ساخت (جدول ۱) و مشخص شد که جدایه V991 از *F. verticillioides* با تولید مقدار ۳۲۹ نانوگرم در میلی‌لیتر، بیشترین میزان توکسین فومونیسین B_1 را در بین جدایه‌های مورد بررسی تولید کرده است، از این رو به عنوان جدایه اصلی برای بررسی تاثیر عوامل محیطی بر تولید توکسین مورد استفاده قرار گرفت که نتایج آن‌ها به شرح زیر می‌باشد (جدول ۱).

تأثیر تیمار pH محیط کشت روی تولید فومونیسین B_1

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر pH محیط کشت روی میزان تولید فومونیسین B_1 در قارچ *F. verticillioides* در سطح احتمال آماری یک درصد تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۲).

جدول ۱. ارزیابی تولید توکسین فومونیسین B1 در جدایه‌های مورد بررسی به روش HPLC.

Table 1. Evalutaion of fumonisin B toxin production by *Fusarium verticillioides* isolates using HPLC.

Isolate	amount of fumonisin B1 (ngr/ml)
P991	52
P993	274
P994	115
N991	0
P992	63
O991	75
V994	120
V992	247
V991	329
V993	166

جدول ۲. تجزیه واریانس تاثیر pH در تولید توکسین فومونیسین B_1 در قارچ *Fusarium verticillioides*.

Table 2. Analysis of variance of pH effect on production of Fumonisin B_1 in *Fusarium verticillioides*.

Source of variation	df	SS	MS	F	P-value
Treatment	4	36896.4	9224.1	8.68**	0.003
Error	10	10630	1063		
Total	14				
CV (%)	16.32				

**Significant at the 1% probability levels.

هر چند جدایه مورد مطالعه در چهار pH با تولید ۴۲۲ نانوگرم در میلی‌لیتر، بیشترین مقدار فومونیسین B_1 را تولید کرد اما با میزان توکسین تولید شده در pHهای سه و پنج تفاوت معنی‌دار آماری نداشت. همچنین کمترین میزان

توکسین تولید شده در بین تیمارهای pH مربوط به تیمار هفت pH با تولید ۲۷۷ نانوگرم در میلی‌لیتر بودکه تفاوت معنی‌دار آماری با دیگر تیمارها در سطح یک درصد نشان داد (شکل ۳ A و ۴).

تأثیر تیمار رطوبت روی تولید فومونیسین B1

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تأثیر رطوبت بذر روی میزان تولید فومونیسین B_1 در قارچ *F. verticillioides* در سطح احتمال آماری یک درصد تفاوت معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳). مقایسه میانگین تاثیر رطوبت‌های مختلف روی قابلیت تولید فومونیسین B_1 در قارچ *F. verticillioides* نشان داد که بطور کلی با افزایش درصد رطوبت بذر تا ۲۸ درصد، تولید فومونیسین B_1 افزایش می‌یابد و در رطوبت ۳۰ درصد میزان تولید توکسین کاهش یافته است. میزان میانگین تولید توکسین در رطوبت‌های ۲۳، ۲۵، ۲۸ و ۳۰ درصد به ترتیب ۳۵۳، ۳۸۱، ۴۲۱ و ۳۹۳ نانوگرم در میلی‌لیتر ثبت گردید. همچنین کمترین مقدار تولید فومونیسین B_1 در رطوبت ۱۵ درصد با میانگین ۲۶۴ نانوگرم در میلی‌لیتر، ثبت گردید (شکل ۳ B و شکل ۴).

تأثیر تیمار نور روی تولید فومونسین B_1

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر نور روی میزان تولید فومونیسین B_1 در قارچ *F. verticillioides* در سطح احتمال آماری یک درصد تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۴).

جدول ۳. تجزیه واریانس تاثیر رطوبت‌های مختلف در تولید فومونیسین B_1 در قارچ *Fusarium verticillioides*.

Table 3. Analysis of variance of the effect different humidity on the production of Fumonisin B_1 in *Fusarium verticillioides*.

Source of variation	df	SS	MS	F	P-value
Treatment	6	59000.57	9833.43	**9.25****	0.0001
Error	14	14882	1063		
Total	20				
CV (%)	17.32				

**Significant at the 1% probability levels

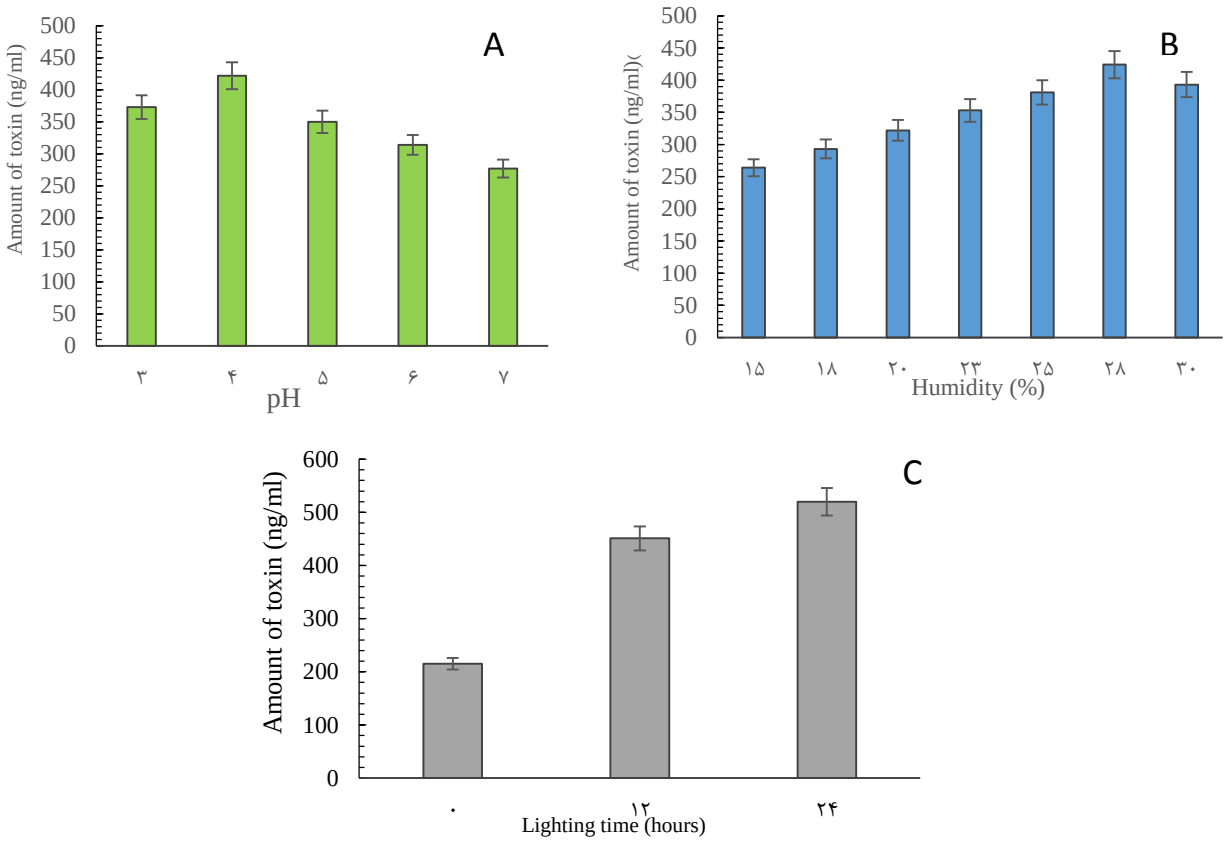
جدول ۴. تجزیه واریانس تاثیر نور در تولید فومونیسین B_1 در قارچ *Fusarium verticillioides*.

Table 4. Analysis of variance of the effect of light duration on the production of Fumonisin B_1 in *Fusarium verticillioides.*

Source of variation	df	SS	MS	F	P-value
Treatment	2	87601.81	14600.30	16.75**	0.0001
Error	6	6378	1063		
Total	8				
CV (%)	16.04				

**Significant at the 1% probability levels.

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به تاثیر نور در تولید توکسین فومونیسین B_1 قارچ *F. verticillioides* نشان داد که این قارچ در شرایط مداوم نوری (۲۴ ساعت نور) نسبت به شرایط نور متناوب (۱۲ ساعت نور) و یا شرایط تاریکی مطلق میزان توکسین بیشتری تولید می‌کند. در تیمار تناوب نوری ۱۲ ساعته و تیمار روشنایی مداوم، به ترتیب ۴۵۱ و ۵۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر ثبت گردید و با تیمار تاریکی مطلق که ۲۱۵ نانوگرم در میلی‌لیتر تولید توکسین دارد، تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال آماری یک درصد نشان داد (شکل ۳ C و شکل ۴).



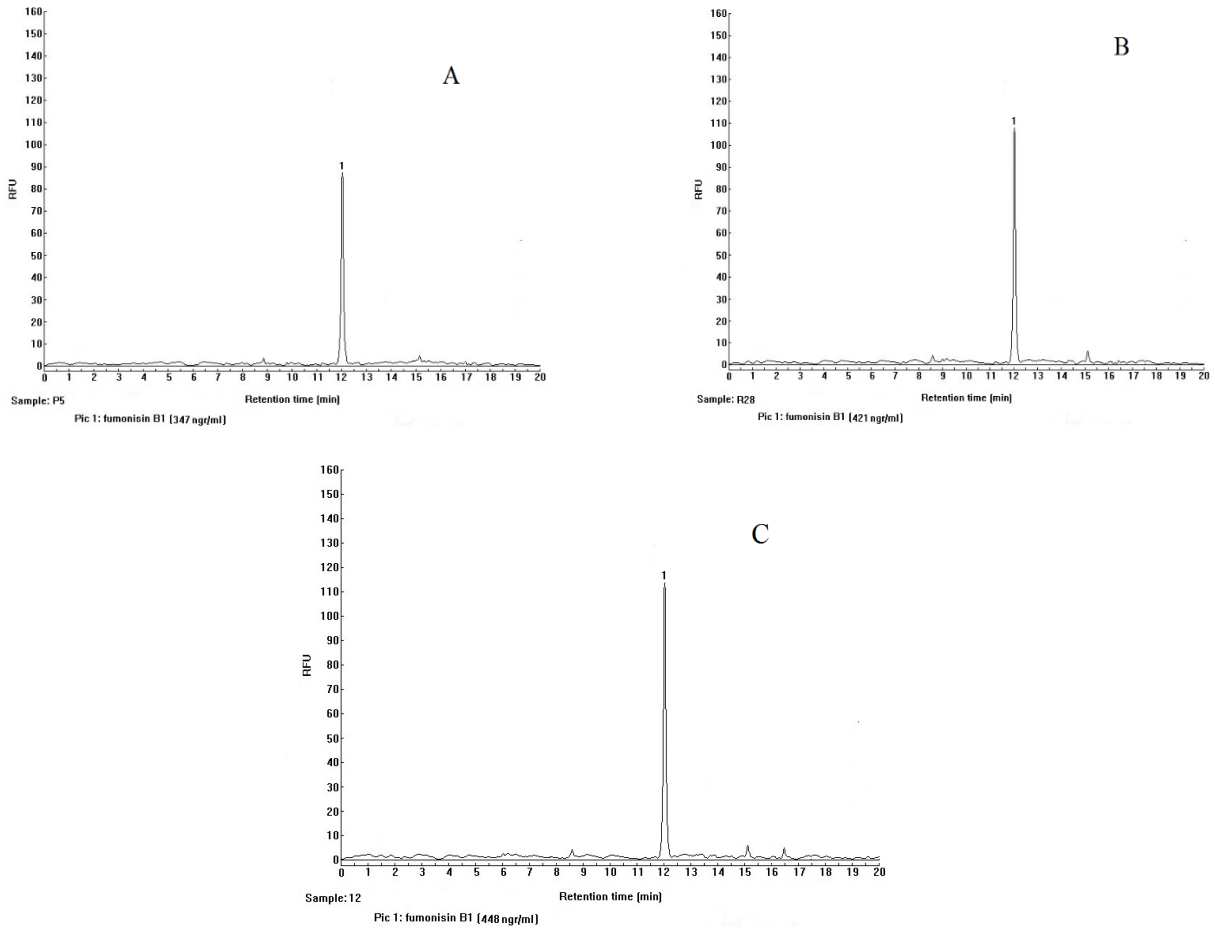
شکل ۳. مقدار فومونیسین B_1 تولید شده تحت تاثیر تیمارهای **A.** pH، **B.** درصد رطوبت، **C.** مدت زمان روشنایی در قارچ *Fusarium verticillioides*.

Figure 3. Production of fumonisin B_1 under the influence of **A.** pH, **B.** Percentage of humidity, **C.** Lighting time in *Fusarium verticillioides*.

بحث

مایکوتوکسین‌های تولید شده در فراورده‌های کشاورزی توسط قارچ‌های بیمارگر گیاهی باعث خسارات جبران ناپذیری به مصرف کنندگان این محصولات می‌شوند. عوامل محیطی مختلف شامل pH، رطوبت نسبی بذر، نور، وجود مواد شیمیایی و... تولید این مایکوتوکسین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند و برخی از این عوامل در محدوده‌های خاصی باعث افزایش و یا کاهش تولید آنها می‌شوند. از روش‌های مختلفی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی گازی (GC) همراه با آشکارساز الکترونی جذبی (ECD) یا آشکارساز انتخاب وزنی (MS)، همچنین کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) همراه با UV، آشکار ساز فلورسانس و گاهی با طیف‌سنج وزنی و روش الیزا این مایکوتوکسین‌ها قابل شناسایی و ارزیابی می‌باشند (Berger *et al.* 1999; Commissions 2001).

در پژوهش حاضر با استفاده از دو روش TLC و HPLC کیفیت و کمیت فومونیسین B_1 تولید شده توسط جدایه‌ای از قارچ *F. verticillioides* سنجیده شد. با استفاده از روش TLC بررسی اولیه وجود مایکوتوکسین در این جدایه‌ها و تیمارها مشخص و اثبات شد. روش HPLC میزان کمّی تولید فومونیسین در هر یک از جدایه‌ها و تیمارها را مشخص کرد. در اصل فومونیسین‌های تولید شده توسط قارچ *F. verticillioides* چهار نوع می‌باشند که در بین آن‌ها، فومونیسین B_1 مهمترین و بیشترین آنها است (Bryła *et al.* 2017). در پژوهش حاضر مشخص شد، بیشترین میزان تولید توکسین فومونیسین B_1 با میزان تولید ۳۲۹ و ۲۷۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب متعلق به جدایه قارچی *F. verticillioides* V991 و *Fusarium proliferatum* P993 می‌باشد. در پژوهشی روی توانایی تولید فومونیسین B_1 نیز بیان شد که قارچ *F. proliferatum* در محیط کشت مایع توانایی تولید ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر فومونیسین B_1 را دارد (Dantzer *et al.* 1996).



شکل 4. کروماتوگرام مربوط به تاثیر تیمارهای مختلف روی میزان تولید فومونیسین B_1 با روش HPLC: **A.** pH = 5، **B.** رطوبت ۲۸ درصد بذر ذرت، **C.** ۲۴ ساعت نور.

Figure 4. Chromatogram related to the effect of different treatments on the production of fumonisin B_1 by HPLC method: **A.** pH = 5, **B.** Relative humidity (28%), **C.** 24 hours of light.

در بررسی دیگری که روی ۵۸ نمونه از مواد غذایی مبتنی بر ذرت در اسپانیا انجام شد، آن‌ها با استفاده از HPLC نشان دادند که ۸۶ درصد از نمونه‌ها حاوی سطوح بالایی از فومونیسین B_1 هستند (Velluti *et al.* 2001). همچنین در ایران نیز (Mohammadi Gholami *et al.* 2012) برای نشان دادن میزان آلودگی گونه‌های *Fusarium* جدا شده از گندم و ذرت به فومونیسین B_1 از روشHPLC استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند که ۲۲ جدایه از ۵۵ جدایه فوزاریوم قادر به تولید فومونیسین B_1 هستند که مقدار این توکسین هم از ۲۳۰/۴ تا ۵۶۵ نانوگرم در میلی‌لیتر ارزیابی شد (Mohammadi Gholami *et al.* 2012). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد حدود تولید توکسین B_1 در قارچ *F. verticillioides* بین ۲۰۰ تا ۵۲۰ نانوگرم در میلی لیتر در شرایط مختلف می‌باشد.

در مطاله حاضر مشخص شد قارچ *F. verticillioides* در pH=۴ بیشترین مقدار فومونیسین‌ها را تولید می‌کند. ولی به طورکلی با کاهش و افزایش pH تولید فومونیسین‌ها کاهش می‌یابد و این کاهش فومونیسین‌ها در pHهای پایین مشهودتر است. پژوهش‌های انجام‌شده توسط Keller *et al.* (1997) نتایج این پژوهش را تأیید می‌کند، این محققین طی آزمایش‌های خود روی تولید فومونیسین‌ها نشان دادند که گونه‌های *F. proliferatum* و *F. verticillioides* بیشترین بازده تولید فومونیسین‌ها را در pH ۲ تا ۴/۵ دارد و pH بهینه برای تولید فومونیسین از ۳ تا ۳/۵ است در حالی که pH بالاتر از ۳/۵ فقط رشد قارچ را افزایش می‌دهد. همچنین در پژوهشی دیگر محققین نشان دادند که در pHهای قلیایی (۷ و ۸/۴) به دلیل بیان ژن PAC1 (Pituitary adenylate cyclase-activating

polypeptide type I receptor) در *F. verticillioides* که سرکوب کننده تولید فومونیسین است، تولید این مایکوتوکسین سرکوب می‌گردد (Flaherty *et al.* 2003). در پژوهش مشابه دیگری مشخص شد که در دامنه pH بین ۳/۵ الی ۵ بیشترین میزان تولید فومونیسین را دارد. همچنین نشان داده شده است که برای تولید مطلوب فومونیسین pH کمتر از ۳ مورد نیاز است و هیدرولیز فومونیسین B_1 در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد در pH = ۳/۵ بالا و در pH= ۷/۵ متوسط و در pH = ۵/۵ پایدارتر است و در دماهای بالاتر از ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز فومونیزین B1 در pHهای ذکر شده کاهش می‌یابد (Bryła *et al.* 2017). در پژوهشی مشابه بیان شده است هنگامی که محدوده pH محیط بین ۳ و ۴ باشد، تولید فومونیسین B_1 بیشتر می‌شود، اما در pH = ۵ تولید توکسین به مقدار قابل توجهی کاهش یافت که در این شرایط تولید اکسیژن کاهش و در نتیجه مصرف گلوکز توسط قارچ افزایش یافت که منجر به کاهش معنی‌داری در تولید فومونیسین B_1 شد (Keller *et al.* 1997). در پژوهشی با آنالیز توالی MALDI-TOF/TOF و LC-ESI-MS/MS مربوط به قارچ *F. proliferatum* پروتئین و آنزیم‌های مرتبط با تولید فومونیسین شناسایی شد و مشخص شد دو آنزیم آدنوزیل متیونین سنتاز و O-متیل ترانسفراز به القای تولید توکسین فومونیسین کمک کنند. همچنین بیان شده است که پروتئین‌های قارچ *F. proliferatum* مانند L-amino-acid اکسیداز، ایزوسیترات دهیدروژناز و سیترات لیاز در pH نامناسب از تراکم عوامل تولید کننده فومونیسین جلوگیری می‌کنند و در نتیجه تولید فومونیسین‌ها را کاهش دهند (Li *et al.* 2017).

در پژوهش حاضر رطوبت تأثیر بسزایی در تولید فومونیسین B_1 قارچ *F. verticillioides* داشت. این قارچ در رطوبت ۲۸ درصد، بیشترین تولید توکسین را نشان داد و در رطوبت‌های پایین‌تر و رطوبت بالاتر از ۲۸ درصد تولید فومونیسین‌کاهش یافت. با توجه به مشاهدات چشمی، رشد قارچ در این رطوبت بصورت محسوسی کاهش یافت که می‌توان بیان داشت کاهش رشد قارچ در این رطوبت دلیل قانع کننده‌ای بر عدم تولید فومونیسین B_1 در *F. verticillioides* در این شرایط می‌باشد. نتایج مطالعات Bailey *et al.* (1998) نیز نشان داده بود که فومونیسین B_1 معمولاً در رطوبت بین ۱۵ تا ۳۲ درصد بذر ذرت تولید می‌شود و رطوبت‌های بالاتر از ۳۲ درصد و پایین‌تر از ۱۵ درصد باعث کاهش رشد قارچ و در نتیجه مقدار تولید فومونیسین می‌شود. در پژوهش دیگر مقدار فومونیسین در بذرهای ذرت مناطق مرتفع با رطوبت نسبی ۸۶-۹۰ درصد و دمای ۱۲-۲۴ درجه سلسیوس ۴/۹۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شده است، در حالی که مقدار فومونیسین در ذرت مناطق با رطوبت نسبی ۶۸-۷۵ درصد و دمای ۱۷-۳۴ درجه سلسیوس با میانگین تولید ۴/۵۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم ثبت شده است. بنابراین روشن است که میزان فومونیسین در مناطق مرتفع‌تر با رطوبت بالا بیشتر از مناطق با رطوبت کمتر است (Atukwase *et al.* 2009, 2012). در مطالعه‌ای مشخص شد که بیان ژن FUM2 و FUM21 مرتبط با سنتز فومونیسین در قارچ *F. verticillioides* با رطوبت بذر ذرت همبستگی مثبت وجود دارد (Lazzaro *et al.* 2012). در مطالعه‌ای بیان شده است دمای گرم در طول گلدهی همراه با آب و هوای مرطوب در ماه‌های آخر قبل از برداشت همچنین وجود حداقل ۲۰ درصد رطوبت در بذرهای ذرت هیبرید از عوامل کلیدی تولید فومونیسین می باشد (Herrera *et al.* 2010).

پژوهش حاضر نشان داد بهترین شرایط نوری برای تولید فومونیسین B_1، روشنایی مطلق (۲۴ ساعت روشنایی) است. تولید فومونیسین B_1 توسط قارچ *F. verticillioides* در ۲۴ ساعت روشنایی به بالاترین سطح خود می‌رسد و در تاریکی مطلق پایین‌ترین مقدار توکسین را تولید می‌کند. احتمالا نور با تاثیر روی رشد قارچ *F. verticillioides* و اثر گذاری روی چرخه متابولیت‌های ثانویه آن‌ها، باعث افزایش تولید مایکوتوکسین B_1 شده است که در نهایت با تولید این مایکوتوکسین روی مواد غذایی و محصولات کشاورزی، کمیت و کیفیت این محصولات کاهش می‌یابد. در پژوهش مشابه مشخص شده است نور یکی از عواملی است که روی تولید متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارد و در ادامه بیان شد بیوسنتز توکسین‌های قارچی *Alternaria* می‌تواند تحت نور آبی و پالس‌های نور تغییر پیدا کند (Häggblom & Niehaus 1986). در پژوهش مشابه دیگری مشخص شد تولید فومونیسین در گونه‌های *F. verticillioides*، *F. proliferatum* و *F. fujikuroi* در شرایط مختلف نوری نسبت به شرایط تاریکی افزایش داشته است که مشخص شد در شرایط نوری بیان ژن FUM1 که مرتبط با تولید فومونیسین B_1 است، بیشتر می‌باشد (Matić *et al.* 2013).

قارچ *F. verticillioides* یکی از مهم‌ترین قارچ‌های تولید کننده مایکوتوکسین می‌باشد که علاوه بر اینکه به محصولات کشاورزی خسارت مستقیم وارد می‌کند با تولید مایکوتوکسین

B_1 باعث کاهش شدید کیفیت محصول و صدمات جبران‌ناپذیر به مصرف کنندگان می‌گردد. لذا با توجه به این‌که این قارچ در شرایط نوری، رطوبت ۲۸ درصد بذر ذرت و pH = ۴ بیشترین میزان تولید توکسین فومونیسین B_1 را دارد و می‌توان با مدیریت و کنترل این شرایط در مراحل رشد گیاه (فنولوژی) و انبارداری از تولید توکسین فومونیسین B_1 تا حد مطلوبی جلوگیری بعمل آورد و در نهایت اثرات سوء و مخرب این بیمارگر گیاهی را تا حدود زیادی کاهش داد.

سپاسگزاری

از همکاری آقای مهندس سید مسلم موسویان که در انجام بعضی از آزمایشات مساعدت نمودند صمیمانه قدردانی می‌شود.

References

Atkins D, Norman J, 1998. Mycotoxins and food safety. *Nutrition & and Food Science* 98(5): 260–266.

Atukwase A, Kaaya AN, Muyanja C, 2009. Factors associated with fumonisin contamination of maize in Uganda. *Journal of the Science of Food and Agricalture* 89: 2393–2398.

Atukwase A, Muy C, Kaaya AN, 2012. Potential for fumonisin production by strains of *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from maize produced in Uganda. *Journal of Biology and Sciences* 12: 225–231.

Berger U, Oehme M, Kuhn F, 1999. Quantitative determination and structure elucidation of type Aand B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *Journal of Agricaltural Food and Chemesitry* 47, 4240–4245.

Bhat R, Rai RV, Karim A, 2010. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 57–81.

Bialey RH, Kubena LF, Harvey RB, Bukely SA, Rottinghaus GH, 1998. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Science* 77: 1623–1630.

Braun MS, Wink M, 2018. Exposure, occurrence, and chemistry of fumonisins and their cryptic derivatives. Comprehensive *Reviews in Food Science and Food Safety* 17(3):769–791.

Bryła M, Waśkiewicz A, Szymczyk K, Jędrzejczak R, 2017. Effects of pH and temperature on the stability of fumonisins in maize products. *Toxins* 9 (3): 88.

Commissions CA, 2001. Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M_1 in milk. Hauge, the Netherlands: Codex Committee on Food Additives and Contaminant 33rd Sessions. ftp. ftp. fao. Org/codex/ccfac33/fa0120e. Pdf.

Damiani T, Righetti L, Suman M, Galaverna G, Dall'Asta C, 2019. Analytical issue related to fumonisins: A matter of sample comminution? *Food Control* 95: 1–5.

Dantzer WR, Hopmans E, Clark A, Hauck C, Murphy PA, 1996. Purification of fumonisin B_1 from liquid cultures of *Fusarium proliferatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (12): 3730–3732.

Davari M, Safaie N, Darvishnia M, Didar Taleshmikaeel R, 2014. Occurrence of deoxynivalenol producing isolates of *Fusarium graminearum* species complex associated with head blight of wheat in Moghan area. *Journal of Crop Protection* 3: 113–123.

Fanelli F; Iversen A; Logrieco AF, Mulè G, 2012, Relationship between fumonisin production and fum gene expression in *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. *Food Additve & Contaminants* 30: 365–371.

Gerlach W, Nirenberg H, 1982. The genus *Fusarium*, a Pictorial Atlas. Mitt. Biol. Budestant. Lan-und Forstwirtsch. Berlin Dahlem. 209: 1–406.

Groopman JD, Pestka JJ, 2014. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology* 5 (1): 351–72.

Häggblom P, Niehaus WG, 1986. Light effects on polyketide metabolism in *Alternaria alternata*. *Experimental Mycology* 10: 252–255.

Hampton JG, TecKrony DM, 1995. Handbook of vigor test methods. The International Seed Testing Association, Zurich, 117p.

Herrera Herrara M, Conchello P, Juan T, Estopanan G, Herrara A, *et al.*, 2010. Fumonisins concentrations in maize as affected by physico-chemical, environment and agronomical conditions. *Mydica* 55: 121–126.

ISTA (International Seed Testing Association), 1999. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 27: 271–273.

Jestoi M, 2008. Emerging *Fusarium* mycotoxin fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Critical Reviews Food Science Nutrition* 48: 21–49.

Keller SE, Sullivan TM, Chirtel S, 1997. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH.

Journal of Indiain Microbiology and Biotechnology 19: 305–309.

Lazzaro I, Susca A, Mulè G, Ritieni A, Ferracane R, Marocco A, Battilani P, 2012. Effects of temperature and water activity on FUM2 and FUM21 gene expression and fumonisin B production in *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology* 134 (4): 685–695.

Leslie JF, Summerell BA, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. 1st ed, Blackwell Publishing Ltd., Hoboken, NJ, USA. 388 pp.

Li T, Gong L, Wang Y, Chen F, Gupta VK, Jian Q, Jiang Y, 2017. Proteomics analysis of *Fusarium proliferatum* under various initial pH during fumonisin production. *Journal of Proteomics* 164: 59–72.

Liu Y, Hubert J, Yamdeu G, Gong YY, Orfila C, 2020. A review of postharvest approaches to reduce fungal and mycotoxin contamination of foods. *Comperhensive Review in Food Science and Food Safety* 19: 1521–1560.

Marroquín-Cardona AG, Johnson NM, Phillips TD, Hayes AW, 2014. Mycotoxins in a changing global environment–A review. *Food and Chemical Toxicology* 69: 220–230.

Marín P, Magan N, Vázquez C, González-Jaén MT, 2010. Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene FUM1 in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *FEMS Microbiology Ecology* 73: 303–311.

Matić S, Spadaro D, Prelle A, Gullino ML, Garibaldi A, 2013. Light affects fumonisin production in strains of *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium verticillioides* isolated from rice. *International Journal of Food Microbiology* 166 (3): 515–523.

Mohammadi Gholami A, 2013. Molecular identification and study of genetic diversity of *Fusarium* species belonging to *Gibberella fujikuroi* complex with emphasis on the production of fumonisin toxin using amplified polymorphism (AFLP) methods and determination of relative sequence of TEF-1α gene. PhD thesis, Plant Pathology, Tarbiat Modares University, Iran.

Moosavian M, Darvishnia M, Khosravinia HA, 2018. Comparison of growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in different conditions of temperature, moisture and pH. *Journal of Applied Research in Plant Protection*. 6 (2): 37–47 (In Persian with English abstract).

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO, 1983. *Fusarium* Species: an Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, 193 pp.

Picot A, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Lannou C, *et al.*, 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Critical Reviews in Microbiology* 36 (3): 221–231.

Samapundo S, Devliehgere F, De Meulenaer B, Debevere J, 2005. Effect of water activity and temperature on growth and the relationship between fumonisin production and the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. *Journal of Food Protection* 68: 1054–1059.

Sanchis V, Marín S, Magan N, Ramos AJ, 2006. Ecophysiology of fumonisin producers in *Fusarium* Section *Liseola*. *Advance in Experimental Medicine Biology* 571: 115–120.

Santiago R, Cao A, Butrón A, 2015. Genetic factors involved in fumonisin accumulation in maize kernels and their implications in maize agronomic management and breeding. *Toxins* 7 (8): 3267–3296.

Singh R, 2019. Mycotoxins contamination of animal feeds and feed ingredients available in Haryana. *Livestock Research International* 7 (4): 250–254.

Shephard GS, 1998. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins**.** *Journal of Chromatography A* 815 (1): 31–39.

Shephard GS, 2009. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and bioanalytical Chemistry* 395: 1215–1224.

Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Stockenström S, Snijman PW, *et al.*, 1995. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn: AOACIUPAC collaborative study. *Journal of AOAC International* 79(3): 688–696.

Trucksess M, 2001. Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. *Mycotoxins* 54: 29–40.

Velluti A, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ, 2001. Occurrence of fumonisin B1 in Spanish corn based foods for animal and human consumption. *Food Science and Technology Intenational* 7: 433–437.

Yazdisamadi B, Rezaei AM, Valizadeh M, 2014. Statistical Designs in Agricultural Research. Second ed, Tehran University Publications, Tehran, Iran. 764 pp.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)