



شناسایی مولکولی قارچ‌های تولید کننده 8-کتو تریکوتسین همراه با بذور روناس و ردیابی ژن‌های سنتز کننده دی‌اکسی نیوالنول در آنها با استفاده از PCR

سید علیرضا اسمعیل زاده حسینی^{*1} - محمود دهقانی اشکذری² - مصطفی عابدی تیزیکی³

تاریخ دریافت: 1395/07/10

تاریخ پذیرش: 1396/06/08

چکیده

روناس (*Rubia tinctorum*) یکی از محصولات مهم زراعی با مصارف دارویی و صنعتی در استان یزد می‌باشد. به منظور شناسایی قارچ‌های همراه با بذور روناس و تولید کننده توکسین، طی سال‌های زراعی 91 لغایت 93 از بذور روناس در مناطق مهم کاشت آن در استان یزد شامل اردکان و بافق نمونه‌برداری به عمل آمد. پس از کشت و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی در محیط‌های کشت‌های سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) و برگ میخک آگار (CLA)، شناسایی تکمیلی با آغازگرهای اختصاصی هر گونه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز صورت گرفت. ردیابی قارچ‌های دارای پتانسیل تولید مایکوتوکسین 8-کتوتریکوتسین از جمله دی‌اکسی نیوالنول (DON) از طریق آغازگرهای اختصاصی ژن *Tri13* انجام شد. جهت تأیید پتانسیل تولید مایکوتوکسین DON در جدایه‌های فوزاریوم از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. در مجموع 249 جدایه قارچی از بذور روناس جداسازی شد که متعلق به شش جنس قارچی شامل فوزاریوم، اسپرژیلوس، پنسیلیوم، آلترناریا، رایزوکتونیا و رایزوپوس بودند که بیشترین فراوانی قارچ‌های جداسازی شده مربوط به فوزاریوم با 71 درصد کل جدایه‌ها بود. در بین قارچ‌های فوزاریوم، گونه‌های *F. solani* (55 جدایه) و *F. oxysporum* (41 جدایه) بیشترین فراوانی را داشتند. گونه‌های *F. poae*، *F. semitectum*، *F. equiseti* توانایی تولید دی‌اکسی نیوالنول را دارا بودند. ژن *Tri13* مؤثر در تولید دی‌اکسی نیوالنول نیز در این سه گونه ردیابی گردید و در آزمایش HPLC همه قارچ‌های فوزاریوم مورد بررسی پتانسیل تولید مایکوتوکسین مورد نظر را داشتند.

واژه‌های کلیدی: *Rubia tinctorum*، مایکوتوکسین، یزد

مقدمه

روناس بوده که در حین کاشت، گیاهچه‌ی روناس را آلوده می‌کنند و برخی به اندام‌های هوایی از جمله برگ و ساقه حمله کرده و آنها را آلوده می‌کند. برخی از این قارچ‌ها از جمله فوزاریوم، اسپرژیلوس و پنسیلیوم همراه با بذور بوده که علاوه بر آلوده کردن گیاه تولید توکسین‌های خطرناکی می‌کنند که برای سلامتی انسان و دام مضر می‌باشند (29).

تاکنون از قسمت‌های هوایی این گیاه از جمله برگ و ساقه قارچ‌های متعددی گزارش شده است (28). قارچ‌های *Septoria rubiae* و *Sporonema punctiforme* به عنوان عوامل لکه برگی روناس گزارش شده‌اند (27 و 28). همچنین گونه‌های قارچی *Pleospora chlamydospora* و *Sporonema punctiforme* از روی گونه *Rubia* sp. جداسازی شده است (28). در رابطه با قارچ‌های همراه با بذور روناس اطلاعات کمی وجود دارد. قارچ فوزاریوم یکی از فراوان‌ترین قارچ‌هایی است که در طی رشد و تکامل گیاهان اثرات مخرب و

روناس با نام علمی *Rubia tinctorum* گیاهی از تیره *Rubiaceae* می‌باشد که ریشه آن در صنایع رنگرزی کاربرد زیادی دارد. کشت این گیاه در اروپا و آسیا بیشتر معمول بوده و در زمان قدیم در ایران در مناطق تبریز، ارومیه، اراک، فارس و یزد کشت می‌شده ولی در حال حاضر کشت و کار آن عمدتاً در شهرستان‌های بافق و اردکان در استان یزد رایج است (20). عوامل متعددی از جمله بیماری‌های قارچی در حین کاشت، داشت و برداشت این محصول را آلوده می‌کنند که علاوه بر کاهش عملکرد محصول از کیفیت رنگ تولیدی نیز می‌کاهد (28 و 29). بسیاری از این قارچ‌ها همراه با بذور

1، 2 و 3- اعضای هیأت علمی مرکز تحقیقات زیست فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران
(*) - نویسنده مسئول: (Email: saesmailzadeh@iripp.ir)

های فوزاریوم و اسپرژیلوس توسط تک اسپور کردن خالص گردیده و تک اسپورها در محیط کشت‌های PDA، آب آگار (WA)، CLA و CY20S (Czapek Yeast Extract Agar with 20 sucrose) در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت ده روز انکوبه شدند. جدایه‌های فوزاریوم و اسپرژیلوس به ترتیب از طریق خصوصیات مرفولوژی کبیدی‌ها و شکل پرگنه‌ها توسط کلیدهای معتبر نلسون و همکاران (22) و کلیچ و پیت (14) شناسایی گردیدند.

استخراج DNA ژنومی

به منظور تولید میسلیوم‌های انبوه قارچ‌ها برای استخراج DNA از محیط کشت مایع PDB استفاده شد. به این منظور جدایه‌ها به مدت یک هفته بر روی محیط کشت مایع PDB کشت داده شدند و سپس با استفاده از لوپ استریل میسلیوم‌ها جمع‌آوری شده و استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام گرفت (23). کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن با استفاده از دستگاه بیوفتومتر مشخص گردید.

تشخیص مولکولی جدایه‌های فوزاریوم با آغازگرهای اختصاصی گونه

برای شناسایی تکمیلی جدایه‌های *F. equiseti* و *F. semitectum* و *F. poae* از جفت آغازگرهای اختصاصی گونه استفاده شد (جدول 1). واکنش PCR در حجم 25 میکرولیتر و با استفاده از ترموسایکلر (Ependrof, Germany) انجام شد. هر آزمایش شامل یک کنترل مثبت (یک واکنش PCR با DNA ژنومی گونه قارچی مورد تأیید و یک کنترل منفی (یک واکنش PCR با همه مواد واکنش بدون DNA ژنومی) بود. واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر SEM-1/2 با یک برنامه حرارتی شامل یک مرحله 5 دقیقه‌ای در 94 °C و سپس 30 چرخه متوالی شامل برنامه زمانی: 94 °C برای 30 ثانیه، 57 °C برای 30 ثانیه و 72 °C برای 60 ثانیه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای 72 °C برای 5 دقیقه انجام گرفت. برنامه حرارتی واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر FeqF/R شامل یک مرحله 5 دقیقه‌ای در 94 °C و سپس 25 چرخه متوالی شامل برنامه زمانی: 94 °C برای 1/5 دقیقه، 64 °C برای 1/5 دقیقه و 72 °C برای 2 دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای 72 °C برای 5 دقیقه انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش PCR برای جفت آغازگر FpoF/R و SEM-1/2 شامل یک مرحله 5 دقیقه‌ای در 94 °C و سپس 40 چرخه متوالی شامل برنامه زمانی: 94 °C برای 1 دقیقه، 58 °C برای 1 دقیقه و 72 °C برای 2 دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای 72 °C برای 5 دقیقه انجام گرفت. سپس محصولات PCR به طور جداگانه بر روی ژل 1/2 درصد آگارز الکتروفورز شدند. جدایه‌های استاندارد (کنترل مثبت) گونه‌های *F.*

جبران‌ناپذیری را به آنها وارد می‌سازد. این قارچ تولید متابولیت‌های ثانوی مهلکی بنام مایکوتوکسین می‌کند که برای سلامتی انسان و دام مضر هستند. به دلیل مصرف توکسین‌های تریکوتسین، مایکوتوکسیکوزهای شدید در انسان و حیوانات رخ می‌دهد و از علائم آنها می‌توان به بی‌اشتهایی، تهوع و گرفتگی ماهیچه‌ها اشاره کرد (30). همچنین در صورت مصرف زیاد این توکسین‌ها، سرطان‌های گوارشی مختلفی ایجاد می‌شود (16 و 26). تریکوتسین‌ها به دو کلاس A و B تقسیم می‌شوند که در کلاس B توکسین‌های قارچی مهم و خطرناکی نسبت به کلاس A قرار دارند. تریکوتسین‌های کلاس B دارای گروه کتو در موقعیت کربن 8 حلقه تریکوتسین می‌باشند و به این دلیل بنام گروه 8-کتو تریکوتسین‌ها¹ نیز معروفند (7 و 12). از تریکوتسین‌های نوع B می‌توان به نیوالنول (NIV)، دی اکسی نیوالنول (DON) و مشتقات استیلی آنها مانند 4-استیل نیوالنول (4-AcNIV)، 3-استیل دی اکسی نیوالنول (3-AcDON) و 15-استیل دی اکسی نیوالنول (15-AcDON) اشاره کرد (15). روناس ممکن است توسط بسیاری از قارچ‌های بیمارگر آلوده شود که منجر به خسارت کمی و کیفی به این محصول شوند. خسارت کمی از طریق کاهش وزن خشک ریشه و خسارت کیفی نیز به دلیل تولید توکسین‌های مختلف توسط قارچ‌های آلوده کننده می‌باشد که به دلیل تجمع مایکوتوکسین در ریشه‌ها می‌تواند برای مصرف کننده خطرناک باشد. تا کنون مطالعات زیادی در زمینه‌ی مایکوفلور بذور گیاه روناس صورت نگرفته است و احتمال داده می‌شود قارچ‌های همراه با بذور روناس در کاهش قوه‌ی نامیه، آلودگی گیاهچه و در نهایت خسارت کمی و کیفی به محصول مؤثر باشند. لذا این تحقیق به منظور بررسی و شناسایی قارچ‌های همراه بذور روناس و همچنین شناسایی قارچ‌های تولید کننده‌ی توکسین از جمله فوزاریوم انجام شد.

موارد و روش‌ها

نمونه‌برداری و کشت جدایه‌های قارچی

در طی سال‌های زراعی 91 تا 93 از بذور روناس در مناطق مهم کاشت روناس در استان یزد از جمله اردکان و بافق نمونه‌برداری به عمل آمد. برای این کار در هر منطقه 5 مزرعه به طور تصادفی انتخاب و از هر مزرعه 1 کیلوگرم بذر جمع‌آوری و داخل پاکت‌های استریل به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه بذور با هیپوکلریت سدیم 0/5% به مدت یک دقیقه ضد عفونی سطحی شدند. بعد از قرار دادن در هیپوکلریت سدیم، بذور دو مرتبه داخل آب مقطر شستشو شده و سپس با کاغذ صافی خشک گردیدند. سپس داخل محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) قرار داده شدند و برای مدت یک هفته در دمای 25 درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردیدند. جدایه

تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد تهیه گردید. PCR برای انجام واکنش *F. poae* و *F. semitectum equiesti* به ترتیب با کدهای FQ021، FSM440 و FPO110 از مرکز

جدول 1- آغازگرهای اختصاصی گونه و ژن موثر در تولید DON
Table 1- Species-specific primers and gene involved in DON production

منبع مورد استفاده (Reference)	توالی (Sequence)	اندازه قطعه (bp)	آغازگر (Primer)
12	F- GGCCTGCCGATGCGTC R- CGATACTGAAACCGACCTC	990	Feq-F Feq-R
12	F- CGCACGTATAGATGGACAAG R- CAGCGCACCCCTCAGAGC	400	Fps-F Fpo-R
12	F- TCTCTTCTCTCATCTCAGGCTTTCA R- TCGCGTGCTACCCCTAAACTTTT	270	SEM-1 SEM2
30	F- TACGTGAAACATTGTTGGC R- GGTGTCCCAGGATCTGCG	240	Tri13F Tri13R

F: آغازگر رفت، R: آغازگر برگشت

آماده‌سازی، استخراج و تصفیه نمونه‌ها جهت آنالیز توکسین تریکوتسین

برای آنالیز توکسین در جدایه‌های مورد بررسی، ابتدا 50 گرم شلتوک برنج به مدت دو ساعت خیسانده شد و سپس 30 میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و به فاصله 24 ساعت دو بار و هر بار به مدت 20 دقیقه اتوکلاو گردید. سپس به هر ارلن چند قرص 5 میلی‌متری از کشت شش روزه جدایه قارچ منتقل شد و ارلن‌ها به مدت شش هفته در انکوباتور 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این مدت شلتوک‌های آلوده در دمای 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت خشک شدند و سپس برنج‌های آلوده آسیاب شده و پودر حاصله به منظور استخراج توکسین مورد استفاده قرار گرفت (10).

برای استخراج عصاره، ابتدا از هر نمونه 10 گرم پودر آسیاب شده توزین شد. سپس 100 میلی‌لیتر حلال استخراج (استونیتریل 84%) به نمونه‌ها اضافه شد. برای اختلاط حلال استخراج با نمونه‌ها به مدت 3 دقیقه از دستگاه بلندر با سرعت بالا استفاده گردید. پس از این اختلاط، برای صاف کردن عصاره از کاغذ صافی معمولی استفاده شد و مقدار 8 میلی‌لیتر از این عصاره صاف شده برای تخلیص با ستون SPE¹ برداشته شد.

ابتدا آماده‌سازی ستون FSPEDON با ایجاد فشار مثبت برای فشرده شدن بهتر ستون انجام گرفت. سپس 5 میلی‌لیتر از عصاره صاف شده از ستون SPE (2-1 قطره در ثانیه یا 3-2 میلی‌لیتر در دقیقه) عبور داده شد. به محض ورود آخرین قسمت عصاره، ستون SPE با 2 میلی‌لیتر از استونیتریل 84 درصد شستشو داده شد و سپس

تعیین تیپ شیمیایی دی اکسی نیوالنول (DON) با استفاده از ردیابی ژن *Tri13*

جهت تعیین تیپ شیمیایی دی اکسی نیوالنول (DON) در گونه‌های *F. poae*، *F. semitectum*، *F. equiesti* از جفت آغازگر Tri13F/Tri13R استفاده شد. این جفت آغازگر در جدایه‌های تولیدکننده DON تولید قطعات 240 جفت بازی می‌کند (جدول 1). برنامه حرارتی آغازگر Tri13F/R برای انجام واکنش PCR شامل: یک مرحله 5 دقیقه‌ای در دمای 94 °C برای آغاز واکنش PCR و سپس 30 چرخه که هر چرخه شامل سه مرحله واسرشت‌سازی در دمای 94 °C برای 30 ثانیه، مرحله اتصال در دمای 57 °C برای 30 ثانیه و مرحله بسط در دمای 72 °C برای 60 ثانیه انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در دمای 72 °C برای 5 دقیقه در نظر گرفته شد. پس از انجام PCR، محصولات PCR به طور جداگانه بر روی ژل 1/2 درصد آگارز الکتروفورز شدند. رنگ‌آمیزی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید صورت گرفت و سپس عکس‌برداری تحت نور UV در دستگاه ژل داک (Bio-RAD, USA) انجام شد.

بررسی پتانسیل تولید دی اکسی نیوالنول (DON) در گونه‌های فوزاریوم

برای تعیین نوع 8-کتوتریکوتسین تولیدی در گونه‌های فوزاریوم مورد نظر و ارتباط آنها با ژن تکثیر شده *Tri13* به روش PCR، از 12 جدایه به عنوان نماینده گونه‌های *F. poae*، *F. semitectum*، *F. equiesti* برای ردیابی و استخراج مایکوتوکسین به وسیله دستگاه HPLC استفاده شد.

1- Solid phase extraction clean- up

به گونه *A. flavus* (جدایه 28) بود و گونه‌های *A. flavus* (10 جدایه) و *A. fumigatus* (7 جدایه) کمترین فراوانی را داشتند. بقیه گونه‌های جداسازی شده شامل *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.*، *Rhizoctonia solani* و *Rhizopus spp.* بودند که کمترین فراوانی را در بین قارچ‌های جداسازی شده داشتند که در واقع این قارچ‌ها 10 درصد از کل قارچ‌ها را تشکیل می‌دادند.

تشخیص مولکولی جدایه‌های فوزاریوم تولیدکننده

مایکوتوکسین دی اکسی نیوالنول

سه گونه فوزاریوم تولید کننده 8-کتوتریکوتسین از جمله *F. semitectum poae* و *F. equiseti* جهت تشخیص تکمیلی و تأیید نتایج حاصل از شناسایی مورفولوژیکی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر گونه انتخاب گردیدند. نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) و تولید محصول و باندهای مورد انتظار برای هر گونه، شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های فوزاریوم را تأیید کرد و ثابت گردید که جدایه‌های شناسایی شده از طریق خصوصیات مورفولوژیکی گونه‌های *F. poae*، *F. semitectum* و *F. Equiseti* می‌باشند (شکل 1: a-c). گونه *F. equiseti* در واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با آغازگرهای اختصاصی قطعاتی به طول 990 جفت باز (شکل 1-a)، گونه *F. poae* قطعاتی به طول 400 جفت باز (شکل 1-b)، و گونه *F. semitectum* قطعاتی به طول 270 جفت باز (شکل 1-c) را تولید کردند.

ردیابی تیپ شیمیایی DON در جدایه‌های فوزاریوم

در این بررسی جفت آغازگر Tri13F/Tri13R برای ردیابی ژن *Tri13* و تیپ شیمیایی DON در بین جمعیت جدایه‌های *F. poae*، *F. semitectum* و *F. equiseti* استفاده شد. نتایج واکنش PCR با این آغازگر نشان داد که تیپ شیمیایی DON در جدایه‌های مورد بررسی وجود دارد. محصول PCR در جدایه‌های تولیدکننده تیپ‌های شیمیایی DON، باندهای 240 جفت بازی بود (شکل 2). از 33 جدایه بررسی شده *F. poae* (13 جدایه)، *F. semitectum* (10 جدایه) و *F. equiseti* (10 جدایه) با این جفت آغازگر، همگی به عنوان جدایه های تولیدکننده DON شناخته شدند. این نتایج نشان می‌دهد که این ژن در این گونه‌ها وجود دارد و احتمال تولید مایکوتوکسین DON در بین جمعیت جدایه‌های *F. poae*، *F. semitectum* و *F. equiseti* وجود دارد. برای اثبات پتانسیل تولید مایکوتوکسین DON، پس از کشت گونه‌های گونه‌های فوزاریوم مذکور بر روی بستر شلتوک برنج، میزان تولید این نوع مایکوتوکسین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره تخلیص شده در داخل تیوب جمع‌آوری گردید. ویال‌ها در دمای 40°C (خشک/مربوط) خشک شدند. پس از خشک کردن تیوب‌ها، 500 میلی‌لیتر حلال فاز متحرک (H₂O:MeOH= 90.5:9.5) به تیوب‌ها اضافه گردید و سپس با دستگاه ورتکس به خوبی مخلوط شدند (19). بعد از این مرحله در صورت لزوم عصاره‌ها با کاغذ صافی 0/45 میکرومتر صاف گردیدند و در نهایت 25 میکرولیتر از این عصاره تلخیص شده به دستگاه HPLC (USA) تزریق گردید.

آنالیز عصاره‌ها با دستگاه HPLC

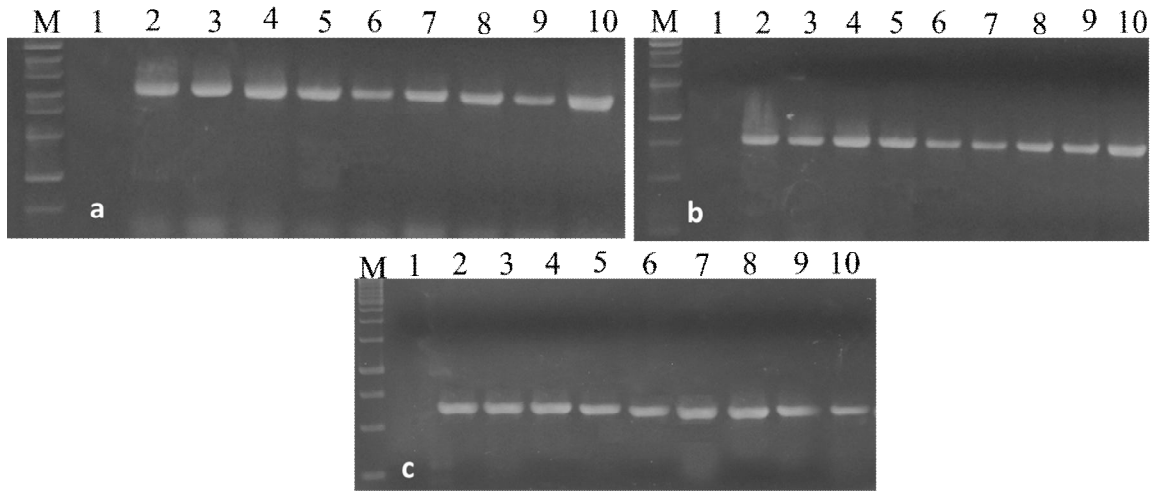
برای تعیین حضور تریکوتسین در عصاره‌ها از دستگاه HPLC (Water, USA) با ستون C18 (طول 15 سانتی‌متر، قطر ذرات 4/5 میکرومتر) و فاز متحرک متانول - آب (5 به 95)، سرعت جریان 0/5 ml/min و در دمای اتاق استفاده شد. در این خصوص ردیاب U.V با طول موج 220 نانومتر مورد استفاده قرار گرفت. از عصاره استخراج شده هر نمونه توسط لوپ تزریق با سرنگ مخصوص HPLC، 25 میکرولیتر تزریق گردید و نتایج به دست آمده و اطلاعات مربوط به سطح زیر منحنی‌های نمونه و زمان ماندگاری هر یک ثبت شد. نوع تریکوتسین‌های DON با توجه به منحنی‌های استاندارد هر یک (با غلظت 25 ppm) و زمان ماندگاری هر استاندارد مشخص گردید.

نتایج

شناسایی قارچ‌های همراه بذور روناس

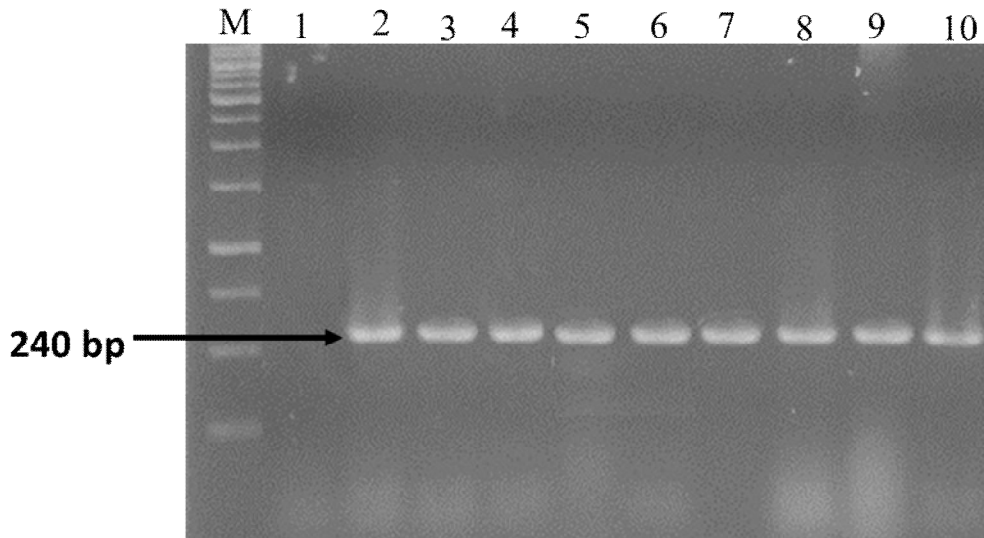
در مجموع 249 جدایه قارچی که از بذور روناس جداسازی شد متعلق به قارچ‌های *Aspergillus spp.*، *Fusarium spp.*، *Rhizoctonia solani*، *Alternaria spp.*، *Penicillium spp.* و *Rhizopus spp.* بودند. بیشترین فراوانی جدایه‌های قارچی مربوط به گونه‌های فوزاریوم (177 جدایه) بود که 71 درصد جدایه‌های قارچی را تشکیل می‌دادند. با استفاده از کلیدهای شناسایی گونه‌های فوزاریوم (22)، *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. poae*، *F. semitectum* و *F. equiseti* به عنوان گونه‌های مهم فوزاریوم جداسازی شدند که در این بین *F. solani* (55 جدایه) و *F. oxysporum* (41 جدایه) بیشترین فراوانی را دارا بودند و گونه‌های *F. equiseti* (37 جدایه)، *F. semitectum* (24 جدایه) و *F. poae* (20 جدایه) کمترین فراوانی را داشتند.

با استفاده از کلیدهای شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس (11)، آسپرژیلوس شناسایی شده بودند که 18 درصد کل گونه‌های قارچی جداسازی از بذور روناس را تشکیل می‌دادند. بیشترین فراوانی مربوط

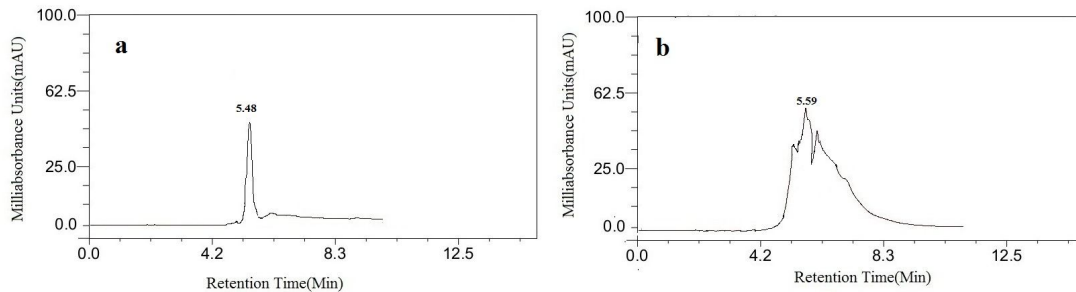


شکل 1- واکنش PCR اختصاصی گونه: (a) *F. equiseti* با آغازگر Feq-F/R (چاهک 1-10)، جدایه استاندارد (چاهک 10) و کنترل منفی (چاهک 1) *F. poae* (b) با آغازگر FpoF/R (چاهک 1-10) و جدایه استاندارد (چاهک 10) و کنترل منفی (چاهک 1)، (c) *F. semitectum* با آغازگر FEF1/2 (چاهک 1-10) و جدایه استاندارد (چاهک 10) و کنترل منفی (چاهک 1)، M (نشانهگر 100bp)

Figure 1- Species-specific PCR, a: *F. equiseti* with Feq-F/R primer (lanes 1-10), standard isolate (lane 10) and negative control (lane 1), b: *F. poae* with FpoF (lanes 1-10), standard isolate (lane 10) and negative control (lane 1), c: *F. semitectum* with FEF1/2 (lanes 1-10), standard isolate (lane 10) and negative control (lane 1), M: Size marker (100 bp)



شکل 2- باند 240 جفت بازی حاصل از PCR با استفاده از جفت آغازگر Tri13F/Tri13R در جدایه‌های *F. poae*، *F. semitectum* و *F. equiseti*. جدایه‌های دارای باند 240 جفت بازی بعنوان جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی DON می‌باشند، کنترل منفی (چاهک 1) M: نشانهگر 100 bp. Figure 2- Amplify of 240 base pairs obtained from Tri13F/Tri13R primer in *F. poae*، *F. semitectum* and *F. equiseti* isolates. Isolates contain 240 base pair are as DON producers. Negative control (Lane 1) M: Size marker (100 bp)



شکل 3- کروماتوگرام بدست آمده از مایکوتوکسین DON. (a) کروماتوگرام نمونه استاندارد DON (در زمان ماندگاری 5/48 دقیقه)، (b) کروماتوگرام بدست آمده از DON ردیابی شده (در زمان ماندگاری 5/59 دقیقه) در سه گونه فوزاریوم

Figure 3- Chromatogram of DON mycotoxin. a) Chromatogram of standard sample of DON (retention time 5.48 min), b) chromatogram of DON detected (retention time 5.59 min) in tree *Fusarium* species

ژنتیکی کد کردن آنزیم calonectrin-4-oxygenase در تمام جدایه‌ها می‌باشد (6). این آنزیم، اکسیژن را به کربن 4 در ساختار کالونکتترین (CAL) اضافه می‌کند و این فرآیند برای سمی‌تر شدن محصولات در مراحل بعدی بیوسنتز صورت می‌گیرد (4). ژن *Tri13* از کلاستر بیوسنتز تریکوتسین مسئول تبدیل DON به NIV می‌باشد و نقش تعیین کننده‌ای در آغاز شدن تولید DON-NIV دارد (3) و (17).

نتایج بررسی پتانسیل تولید مایکوتوکسین با استفاده از HPLC نشان داد که گونه‌های فوزاریوم جداسازی شده همگی پتانسیل تولید مایکوتوکسین DON را دارند. مایکوتوکسین DON در سلول‌های یوکاریوتی به DNA ی ریپوزمی متصل می‌شود و از سنتز پروتئین جلوگیری می‌کند که سبب سرکوب سیستم ایمنی می‌گردد (13). وجود سه گونه *F. equiseti*، *F. semitectum*، *F. poae* بر بذور روناس و تولید بالقوه مایکوتوکسین DON می‌تواند اثرات مخربی بر سلامتی انسان و دام داشته باشد. حسینی نژاد و همکاران (9) قارچ‌های *F. equiseti* و *F. poae* را از بذور روناس جداسازی کردند و پی بردند که این گونه‌های فوزاریوم توانایی تولید مایکوتوکسین نیوالنول (NIV) را دارند. شاکری (29) گونه‌های قارچی مختلفی از جمله *Aspergillus niger* و *Alternaria alternata*، *Septoria rubiae* از ریشه گیاه روناس در مناطق مختلف استان یزد جداسازی و شناسایی کرد. همچنین طی تحقیقات گذشته قارچ‌های *Leveillula tauricae* عامل سفیدک پودری و *Septoria sp.* عامل لکه برگ از قسمت‌های هوایی و قارچ‌های *Alternaria alternata*، *Rhizopus*، *Fusarium sp. stolonifer* و *Aspergillus niger* از ریشه‌ی روناس جدا گردیده است (28 و 29).

خانواده روناس (روبیاسه) دارای چندین جنس و گونه متنوع می‌شود که قارچ‌های متعددی از آنها گزارش شده است. گونه *F. equiseti* از خاک و ریشه گیاه صلیبک (*Crucianella maritima*) جداسازی گردیده شده است (11). پاراشورما و شیوانا

ارزیابی پتانسیل تولید تریکوتسین DON از جدایه‌های فوزاریوم مورد نظر با استفاده از روش HPLC

برای تأیید توانایی جدایه‌ها در تولید DON و بررسی ارتباط بین حضور ژن *Tri13* و تولید DON از روش HPLC استفاده شد. 12 نماینده از سه گونه فوزاریوم مذکور (*F. semitectum*، *F. poae* و *F. equiseti*) به منظور ارزیابی پتانسیل تولید تریکوتسین انتخاب شدند.

نتایج بدست آمده از HPLC نشان داد که تیپ شیمیایی DON در عصاره‌های بررسی شده وجود دارد. زمان ماندگاری برای مشاهده نقطه اوج منحنی استاندارد DON، 5/48 دقیقه ثبت شد (شکل a 3). در جدایه‌های فوزاریوم مورد بررسی، توکسین دی اکسی نیوالنول با زمان ماندگاری 5/59 دقیقه ردیابی شد (شکل b 3). نتایج بدست آمده از عصاره‌های استخراج شده توانایی تولید DON را در هر سه گونه قارچی فوزاریوم تأیید کرد و در واقع این نتایج با ردیابی تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین با استفاده از ردیابی ژن *Tri13*، مطابقت داشت. بنابراین این نتایج ثابت می‌کند که ژن‌های مذکور در جدایه‌های مورد بررسی بیان شده و نقش مهمی در تولید تیپ‌های شیمیایی DON دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این بررسی سه گونه فوزاریوم *F. poae*، *F. semitectum* و *F. equiseti* از بذور روناس جداسازی و شناسایی گردید که نتایج شناسایی مولکولی گونه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با نتایج شناسایی مرفولوژی با استفاده از کلیدهای شناسایی مطابقت داشت. نتایج تکثیر ژن *Tri13* در گونه‌های *F. poae*، *F. semitectum* و *F. equiseti* وجود این ژن‌ها را در این گونه به اثبات رساند و تولید باندهای حاصل از ژن *Tri13* با نتایج محققین دیگر مطابقت داشت (17). تکثیر این قطعه ژنی نشان‌دهنده حضور ژن *Tri13* و توانایی

مانند (21). در این بررسی علاوه بر گونه‌های فوزاریوم، گونه‌های قارچی اسپرژیلوس نیز جداسازی گردید که بررسی میکوتوکسین‌های گونه‌های دیگر قارچی از جمله اسپرژیلوس ضروری به نظر می‌رسد. این اولین گزارش جامع از قارچ‌های همراه بذور روناس از جمله قارچ‌های تولید کننده میکوتوکسین می‌باشد که نتایج نشان دهنده این است که بیشترین آلودگی بذور به قارچ‌های تولید کننده توکسین مانند فوزاریوم می‌باشد. وجود این قارچ‌ها در بذور روناس که توانایی تولید میکوتوکسین‌های مختلف را دارند می‌تواند بطور مستقیم و غیر مستقیم بر روی سلامتی و بهداشت مواد غذایی اثر بگذارد. لذا شناسایی این عوامل قارچی تولید کننده میکوتوکسین با استفاده روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی می‌تواند کمک شایانی در ردیابی، کنترل و کاهش میکوتوکسین‌ها در این گیاه صنعتی و فراورده‌های آن کند.

سپاسگزاری

این مقاله قسمتی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی اشکذر می‌باشد که با همکاری بخش تحقیقات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد وابسته به سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی انجام گردیده است.

(24)، گونه *Cladosporium cladosporioides* را به عنوان بیماری بلایت برگی از روناس هندی (*Rubia cordifolia*) جداسازی و شناسایی کردند.

مطالعات نشان داده است که گونه‌های *F. poae*، *F. semitectum* و *F. equiseti* در میزبان‌های مختلفی از جمله گندم و جو بیماری‌های پوسیدگی طوقه و ریشه و بلایت خوشه را ایجاد می‌کنند (18). این گونه‌های فوزاریوم علاوه بر تولید میکوتوکسین DON، قادر به تولید زرالنون، نیوالنون، بیوریسین (beauvericin) و دی استوکسی اسکرپینول (diacetoxyscirpenol) می‌باشند که همگی برای سلامت انسان و دام مضر می‌باشند (18). آلودگی محصولات زراعی جهان توسط میکوتوکسین‌های مختلف قارچی تا حدود 25 درصد سالانه گزارش شده است (6). تاکنون میکوتوکسین‌های 8-کتوتریکوتسین‌ها مکرراً در غلات مخصوصاً گندم در مناطق مختلف ایران گزارش شده اند. گزارش‌ها حاکی از آن است که تیپ-های شیمیایی مختلفی از جمله NIV، DON و مشتقات استیلی دی اکسی نیوالنون از جمله 3-AcDON و 15-AcDON در گندم‌های شمال کشور وجود دارند (1 و 2). 8-کتوتریکوتسین‌ها در بیماری‌زایی قارچ‌های فوزاریوم در گیاهان مؤثرند و همچنین کاهش قدرت جوانه زنی بذر، کاهش پروتئین دانه، تخریب گرانول‌های نشاسته و تأثیر در کیفیت دانه به دلیل میکوتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ‌های فوزاریوم گزارش شده است (23 و 25). قابل توجه است که این توکسین‌ها در دانه‌های انبار شده سال‌ها به صورت پایدار باقی می‌مانند.

منابع

- 1- Abedi-Tizaki M., and Sabbagh S. K. 2013. Detection of 3-Acetyldeoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol and Nivalenol-Chemotypes of *Fusarium graminearum* from Iran using specific PCR assays. *Plant Knowledge Journal*, 2(1): 38-42.
- 2- Abedi-Tizaki M., Sabbagh S. K., Mazaheri-Naeini M., and Sepehriki S. 2013. Chemotyping of *Fusarium graminearum* using *Tri13* trichothecene biosynthetic gene. *Journal of Crop Protection*, 2 (4): 487-500.
- 3- Brown D. W., McCormick S. P., Alexander N. J., Proctor R.H., and Desjardins A. E. 2002. Inactivation of a cytochrome p-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 36: 224-233.
- 4- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N. J., Proctor R. H., and Desjardins A. E. 2013. Genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 2: 121-133.
- 5- Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M. A., and Nicholson P. 2003. Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 355-367.
- 6- Charmley L.L., Trenholm H.L., Prelusky D.A., and Rosenberg A. 1995. Economic losses and decontamination. *Natural Toxicology*, 3:199-203.
- 7- Desjardins A.E., Manadhar H.K., Plattner R.D., Maragos C.M., Shrestha K., and McCormick S.P. 2000. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:1377-1383.
- 8- Eudes F., Comeau A., Rioux S., and Collin J. 2000. Phytotoxicité de huitmyco toxins associées à la fusariose de l'épi chez le blé. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22: 286-292.
- 9- Hosseininejad S.M., Abedi-Tizaki M., Esmailzadeh Hosseini S.A., Kargar F., and Sadeghi Khomartaji K. 2017. Detection of nivalenol synthesis gene in madder seeds infected by *Fusarium* species by Polymerase Chain

- Reaction (PCR). J. Shahid Sadoughi Univ Med Sci 24(12):952-962.
- 10- Jennings P., Coates M.E., Walsh K., Turner J.A., and Nicholson P. 2004. Determination of deoxynivalenol and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology*, 53: 643-652.
 - 11- Jose G., Maciá-Vicente Hans-Börje Jansson Samir K., Abdullah Enric Descals Jesus Salinas Luis V., and Lopez-Llorca. 2008. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology and Ecology* 64 (1): 90-105.
 - 12- Jurado M., Vazquez C., Patino B., and Gonzalez-Jaen M.T. 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28:562-568.
 - 13- Kalaiselvi P., Rajashree K., Bharathi Priya L., and Padma V.V. 2013. Cytoprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against deoxynivalenol-induced toxicity through anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms in HT-29 cells. *Food Chemistry and Toxicology* 56, 110-118.
 - 14- Klich M.A., and Pitt J.I. 1998. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.
 - 15- Kimura M., Tokai T., and Takahashi-Ando N. 2007. Molecular genetic studies of *Fusarium trichothecene* biosynthesis; pathways, genes and evolution. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71:2102-2123.
 - 16- Langseth W., Bernhoft A., Rundberget T.B., Kosiak T., and Gareis M. 1999. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains from Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 144: 103-113.
 - 17- Lee T., Han Y.K., Kim K.H., Yun S.H., and Lee Y.W. 2002. Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol-andnivalenol-producing chemotypes of Gibberellazeae. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2148-2154.
 - 18- Leslie J.F., and Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, IA, USA. Blackwell Professional.
 - 19- MacDonald J., Chan, D., Brereton P., Damant A., and Wood R. 2005. Determination of Deoxynivalenolin Cereals and Cereal Products by Immunoaffinity Column Chromatography with Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*, 88(4):1197-1204.
 - 20- Mirabzadeh Ardakani M. 1991. Mader. Agricultural Extension press. 18p.
 - 21- Mirocha C.J., Abbas H.K., Windels C.E., and Xie W. 1989. Variation in deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1315-1316.
 - 22- Nelson P.E., Toussoun T.A., and Marasa W.F. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. University Park, P.A., Pennsylvania State University Press.
 - 23- Nicholson P., Rezanoor H.N., Simpson D.R., and Joyce D. 1997. Differentiation and quantification of the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis* using a PCR assay. *Plant Pathology*, 46: 842-856.
 - 24- Parashurama T.R., and Shivanna MB. 2013. Occurrence of Cladosporium leaf blight on *Rubia cordifolia* in Bhadra Wildlife Sanctuary, South India. *Indian Phytopathology* 66 (3): 287-293.
 - 25- Parry D.W., Jenkinson P., and MacLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals, a review. *Plant Pathology*, 44: 207-238.
 - 26- Ryu J., Ohtsubo K., Izumiyama N., Nakamura K., Tanaka T., Yamamura H., and Ueno Y. 1988. The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 11: 38-47.
 - 27- Safavi-Someeh S.A., and Shakeri M. 2001. A new report of *Septoria rubiae-tinctorum* in Iran. *Rostaniha* 2:20-21.
 - 28- Shakeri M. 2000. Madder leaf spot in Yazd province. *Proceeding of 14th Iranian Plant Protection Congress*, Vol. 2. p. 354.
 - 29- Shakeri M. 2003. Isolation and identification of parasitic fungi and nematodes On Madder (*Rubia tinctorum*) in Yazd Province. Research project report no. 83.176. AREEO, Iran.
 - 30- Waalwijk C., Kastelein P., Vries I., and et al. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 743-754.