

Isolation and Identification of *Fusarium* Species from Maize and Wheat and Assessment of Their Ability to Produce Fumonisin B₁

Abdelnasser Mohammadi-Gholami¹, Masoomeh Shams-Ghahfarokhi^{2*}, Reza Kachuei³, Mehdi Razzaghi-Abyaneh⁴

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associated Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 4- Associated Professor, Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email shamsm@modares.ac.ir

Received: 30/Oct/2013, Accepted: 23/Nov/2013

Abstract

Objective: *Fusarium* species are prevalent contaminants of foodstuffs and agricultural crops. They produce fumonisins, which are carcinogenic mycotoxins. The present study has evaluated maize and wheat samples from ten provinces in Iran that were contaminated with *Fusarium* species. Special attention was paid to the ability of the isolates to produce fumonisin B₁ (FB₁) as a public health hazard.

Methods: We collected 32 maize and 15 wheat samples from ten provinces that were major cultivation areas. Samples surface disinfected with a 1% sodium hypochlorite solution for 2 minutes. *Fusarium* species were isolated by the flotation method on malachite green agar. Pure cultures on potato dextrose agar (PDA) were identified using a combination of macroscopic and microscopic morphological criteria. The ability of the isolates to produce FB₁ was evaluated by thin layer chromatography (TLC) and the amounts of fumonisin B₁ produced were assessed by high performance liquid chromatography (HPLC).

Results: A total of 55 *Fusarium* isolates that belonged to five species were isolated. There were 27 of the 32 maize samples (84.4%) and 11 of 15 wheat samples (73.3%) that were contaminated with *Fusarium* species. Species consisted of *F. verticillioides* (23 isolates), *F. proliferatum* (22 isolates), *F. subglutinans* (5 isolates), *F. nygamai* (4 isolates) and *F. redolens* (1 isolate) based on morphological criteria. Twenty-two of the 55 (40%) *Fusarium* isolates produced FB₁ in a total range from 230.4 to 9565 µg/ml. The highest amounts of FB₁ production were related to toxigenic isolates of *F. verticillioides* and *F. proliferatum*.

Conclusion: Results of the present work indicates a high degree of contamination of maize and wheat with *Fusarium* strains that belong to the *Gibberella fujikuroi* species complex, particularly *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. This contamination is a potential public health threat due to food spoilage and subsequent production of high levels of carcinogenic FB₁.

Keywords *Fusarium* species, Fumonisin B₁, Food contamination, Maize, Wheat

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 3, Autumn 2013, Pages: 53-64

جداسازی و شناسایی گونه‌های فوزاریوم از نمونه‌های ذرت و گندم و ارزیابی توانایی آن‌ها در تولید فومونیسین B₁

عبدالناصر محمدی غلامی^۱، معصومه شمس قهفرخی^{۲*}، رضا کچوئی^۳، مهدی رزاقی ایبانه^۴

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۲- دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
 ۴- دانشیار، گروه قارچ‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی
 Email: shamsm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۰۹/۰۲

دریافت مقاله: ۹۲/۰۸/۰۸

چکیده

هدف: گونه‌های فوزاریوم از جمله عوامل شایع آلودگی قارچی مواد غذایی و قادر به تولید سموم سرطان‌زا به‌ویژه فومونیسین هستند. در تحقیق حاضر آلودگی نمونه‌های گندم و ذرت مناطق مختلف ایران به قارچ فوزاریوم و توانایی جدایه‌های فوزاریوم جداسازی شده در تولید فومونیسین B₁ به عنوان یک سم سرطان‌زا و مخاطره‌آمیز بهداشت عمومی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های ذرت (۳۲ نمونه) و گندم (۱۵ نمونه) جمع‌آوری شده از ۱۰ استان اصلی کشور به منظور جداسازی گونه‌های فوزاریوم با استفاده از روش شناوری روی محیط کشت جامد مالاشیت سبز کشت شد و جدایه‌های جداسازی شده براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی شناسایی شدند. توانایی تولید میزان فومونیسین B₁ تولید شده توسط جدایه‌ها با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ارزیابی شد.

نتایج: تعداد ۵۵ جدایه فوزاریوم جداسازی شده متعلق به ۵ گونه فوزاریوم به‌ترتیب فراوانی شامل فوزاریوم ورتیسیلوئیدس (۲۳٪ جدایه، ۴۱/۹ درصد)، فوزاریوم پرولیفراتوم (۲۲٪ جدایه، ۴۰ درصد) فوزاریوم سابگلوئینانس (۵٪ جدایه، ۹/۱ درصد)، فوزاریوم نیگامایی (۴٪ جدایه، ۷/۳ درصد) و فوزاریوم ردولنس (۱٪ جدایه، ۱/۸ درصد) بودند. ۲۲ جدایه از ۵۵ جدایه (۴۰ درصد) قادر به تولید فومونیسین در غلظت‌های مختلف بودند که محدوده تولید سم آن‌ها از ۲۳۰/۴ تا ۹۵۶۵ میکروگرم میلی‌لیتر گزارش شد. بیشترین میزان تولید فومونیسین B₁ متعلق به گونه‌های ورتیسیلوئیدس و پرولیفراتوم بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گونه‌های مختلف فوزاریوم به‌ویژه فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم به عنوان قارچ‌های مهم آلوده‌کننده ذرت و گندم در مناطق مختلف ایران حضور دارند. این آلودگی به دلیل توانایی تولید فومونیسین B₁ به عنوان یک سم سرطان‌زا در انسان و حیوانات توسط بخش قابل توجهی از جدایه‌های مورد بررسی می‌تواند به عنوان یکی از عوامل مهم تهدیدکننده سلامتی و بهداشت عمومی مطرح باشد.

کلیدواژگان: گونه‌های فوزاریوم، فومونیسین B₁، آلودگی مواد غذایی، ذرت، گندم

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، صفحات: ۵۳-۶۴

از طریق جلوگیری از سنتز اسفنگولیپیدها و اختلال در عملکرد طبیعی سلول‌ها اعمال می‌کنند [۱۲، ۱۳].

گندم و ذرت دو محصول استراتژیک ایران با تولید سالانه ۱۳/۸ و ۲ میلیون تن هستند که در مناطق مختلف ایران به‌ویژه در نیمه غربی و شمالی کشور کشت می‌شوند. این غلات با ارزش به طور مستقیم و غیر مستقیم در زنجیره غذایی انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۴، ۱۵]. گونه‌های فوزاریوم به‌خصوص، گونه‌های متعلق به کمپلکس جیبرلا فوجیکورویی آلوده کننده‌های شایع گندم و ذرت در سراسر جهان به حساب می‌آیند [۱۶]. با وجود تحقیقات گسترده انجام گرفته روی فوزاریوم‌ها در سطح جهان، ضرورت انجام تحقیقات جدید با توجه به نقش شرایط آب و هوایی، نوع محصولات کشاورزی مورد بررسی و منطقه جغرافیایی مورد بررسی و همچنین تغییرات زمانی در وقوع و فراوانی این گروه از قارچ‌ها برای تدوین و به‌کارگیری برنامه‌های کنترلی مناسب و کارآمد اجتناب‌ناپذیر است. گزارش‌های منتشر شده در این خصوص در کشور دخالت گونه‌های فوزاریوم به‌خصوص فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم را در آلودگی محصولات کشاورزی از جمله گندم و ذرت مورد تأیید قرار داده است [۱۵، ۱۷-۱۹]. با این حال، این مطالعات اغلب در مناطق جغرافیایی محدودی از ایران انجام گرفته‌اند. به‌علاوه؛ براساس اطلاعات موجود، گزارش‌های جدید مستندی در سال‌های اخیر در این رابطه در دسترس نیست. بنابراین لزوم انجام یک مطالعه جامع در سطح کشور با در نظر گرفتن مناطق اصلی کشت صنعتی ذرت و گندم بیش از هر زمان دیگر احساس می‌شود. در تحقیق حاضر، آلودگی نمونه‌های گندم و ذرت در مناطق اصلی کشت این غلات در ایران به قارچ فوزاریوم و توانایی جدایه‌های فوزاریوم جداسازی شده در تولید فومونیسین B₁ به عنوان یک سم سرطان‌زا و مخاطره‌آمیز بهداشت عمومی بررسی شد. با توجه به ایجاد فساد قارچی و کاهش کیفیت محصولات آلوده به قارچ فوزاریوم و همچنین مخاطرات بهداشت عمومی ناشی از آلودگی این محصولات به فومونیسین به دنبال رشد سویه‌های مولد سم، نتایج به‌دست

جنس فوزاریوم (*Fusarium*) گونه‌های زیادی را شامل می‌شود، که اکثراً کپک‌های موجود در خاک یا بیماری‌زاهای (*Pathogens*) معروف گیاهی و آلوده کننده‌های مواد غذایی هستند. گونه‌های فوزاریوم طیف وسیعی از محصولات غذایی از جمله غلات مانند ذرت، گندم و جو را آلوده می‌کنند. این آلودگی یک مشکل بزرگ اقتصادی محسوب می‌شود که علاوه بر کاهش کیفیت محصولات غذایی به دلیل رشد قارچ و زیان‌های اقتصادی مربوط، به دلیل امکان تولید سموم سرطان‌زا نظیر فومونیسین (*Fumonisin*) می‌تواند مخاطرات مهم بهداشت عمومی را به دنبال داشته باشد [۱، ۲]. به‌علاوه؛ گونه‌های فوزاریوم می‌توانند به عنوان عامل انواع مختلفی از عفونت‌های انسانی شامل عفونت ناخن، قرنیه چشم، عفونت‌های جلدی ناشی از زخم‌های جراحی، سوختگی، اولسرها (*Ulcers*) عمیق و عفونت‌های منتشره در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی عمل کنند [۳، ۴].

در میان انواع مختلف طبقه‌بندی شده فوزاریوم، گونه‌های متعلق به کمپلکس جیبرلا فوجیکورویی (*Gibberella fujikuroi*) از جمله شایع‌ترین قارچ‌های بیماری‌زا گیاهی بوده که از مزارع کشاورزی سراسر جهان جدا و گزارش شده‌اند [۵-۷]. این قارچ‌ها به‌ویژه دو گونه فوزاریوم ورتیسیلوئیدس (*F. verticillioides*) و فوزاریوم پرولیفراتوم (*F. proliferatum*) از جمله عوامل اصلی تولید کننده فومونیسین‌ها هستند که علاوه بر نقش در سبب‌شناسی (*Ethiology*) لکوانسفالومالاسی (*Leukoencephalomalacia*) در اسب‌ها، ادم ریوی در خوک‌ها و سرطان کبد در موش صحرائی، ارتباط تأیید شده‌ای با وقوع سرطان کبد، کلیه و مری در انسان در کشورهای مختلف از جمله آفریقای جنوبی، چین و ایران به دنبال مصرف غذیه آلوده دارند [۸-۱۱]. فومونیسین‌ها به گروه‌های A، B، C و D تقسیم شده‌اند. در این میان، فومونیسین B₁ مهم‌ترین و خطرناک‌ترین نوع محسوب می‌شود که انواع محصولات کشاورزی مانند ذرت، گندم و برنج را آلوده می‌سازد. فومونیسین‌ها آثار سمی خود را

آمده می‌تواند ضمن ارایه یک الگوی کامل از آلودگی قارچی و مایکوتوکسینی (Mycotoxin)، به تدوین برنامه‌ها و استراتژی‌های راهبردی کنترل و پیشگیری آلودگی غلات به قارچ‌های مولد سم کمک شایانی نماید.

مواد و روش‌ها

مکان‌های نمونه‌گیری

در مجموع ۳۲ نمونه ذرت و ۱۵ نمونه گندم از ۴۷ مزرعه مختلف (۱ نمونه از هر مزرعه) در ۲۵ بخش در ۱۰ استان ایران شامل اردبیل، گلستان، همدان، کرمان، کرمانشاه، خوزستان، مازندران، قزوین، تهران و آذربایجان غربی جمع‌آوری شد. هر مزرعه براساس ابعاد به ۵ قسمت تقسیم شد و از هر قسمت ۴ نمونه به طور تصادفی نمونه‌گیری شد. نمونه‌های اولیه (Subsamples) در مورد هر مزرعه (۲۰ نمونه) در نهایت با هم مخلوط شد و یک نمونه نهایی از مخلوط به‌دست آمده برای کشت و جداسازی فوزاریوم‌ها استفاده شد.

جداسازی و شناسایی گونه‌های فوزاریوم

حدود ۲۰ گرم از هر نمونه ذرت و گندم به مدت ۲ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به طور سطحی ضد عفونی و سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. نمونه‌ها به روش فلوتاسیون (Flotation) با مالاشیت گرین (Malachite Green) کشت داده شد و به‌مدت ۲ تا ۳ هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۵]. کلونی‌های رشد یافته روی محیط پوتیتو دکستروز آگار (E-Merck) (Potato Dextrose Agar) (آلمان) کشت مجدد داده شدند. برای خالص‌سازی جدایه‌ها از همه آن‌ها کشت تک اسپور تهیه شد [۱۵]. یک قطره از سوسپانسیون روی محیط آب آگار ۲ درصد قرار داده شد. اسپورها بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جوانه زدند. تک اسپورهای جوانه زده و خالص به پلیت‌های حاوی محیط‌های پوتیتو دکستروز آگار، آگار برگ میخک (Carnation Leaf Agar) (E-Merck، آلمان) و آگار مغزی

مخصوص (Special Nutrient Agar) (E-Merck، آلمان) منتقل شدند. شناسایی گونه‌های فوزاریوم پس از جمع‌آوری اطلاعات لازم از قبیل ساختار فیالیدها (Phialides)، شکل، تعداد و اندازه کونیدیوم‌ها (Conidium)، تعداد تقسیمات عرضی و تولید ماکروکونیدیوم (Macroconidium) و توانایی تولید میکروکونیدیوم (Microconidium) و کلامیدوکونیدیوم (Chlamydoconidium) براساس کلیدهای شناسایی بورگس (Burgess) و همکاران [۲۰] و نلسون (Nelson) و همکاران [۲۱] انجام شد.

استخراج و ارزیابی تولید فومونیسین B₁

استخراج و ارزیابی تولید فومونیسین B₁ در ۳ مرحله به شرح زیر انجام گرفت:

شرایط کشت قارچ و استخراج فومونیسین B₁

برای ارزیابی تولید فومونیسین B₁ همه جدایه‌های فوزاریوم جداسازی شده در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع القا کننده فومونیسین B₁ شامل ۲ درصد فروکتوز، ۰/۰۵ درصد عصاره مالت، ۰/۱ درصد عصاره مخمر، ۰/۱ درصد پپتون، ۰/۱ درصد فسفات دی هیدروژن پتاسیم، ۰/۰۳ درصد سولفات منیزیم آبدار، ۰/۰۳ درصد کلرید پتاسیم، ۰/۰۰۵ درصد سولفات روی آبدار و ۰/۰۰۱ درصد سولفات مس آبدار که در یک لیتر آب مقطر حل شده بود کشت داده شد. سوسپانسیون اسپور از کشت ۷ روزه عوامل قارچی روی محیط پوتیتو دکستروز آگار با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۰/۱ درصد توین ۸۰ (Tween 80) تهیه شد و پس از شمارش به میزان ۱۰^۶ اسپور در میلی‌لیتر از محیط‌های کشت مایع تلقیح شد. ارلن‌های کشت داده شده به‌مدت ۲۱ روز در شرایط ثابت و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از این مدت با استفاده از فیلتراسیون با کاغذ صافی واتمن (Whatman) شماره ۱، میسلیم‌های (Mycelium) قارچی از محیط‌های کشت جدا

جداسازی و شناسایی گونه‌های مولد سم و غیر مولد سم قارچ فوزاریوم

میکرولیتر معرف O-فتالدئید (OPA: O-phthaldialdehyde) (شامل ۴۰ میلی‌گرم OPA در ۱ میلی‌لیتر اتانل، ۵ میلی‌لیتر سدیم تترابورات سدیم ۰/۱ مولار و ۵۰ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانل) مشتق‌گیری شد تا با آشکارساز فلورسنت قابل شناسایی باشد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر عصاره مشتق‌گیری شده با OPA به ستون HPLC فاز معکوس (TSKgel ODS-80TS, TOSOH BIOSCIENCE) (4.6 mm ID × 15.0 cm ژاپن) به عنوان فاز ثابت تزریق شد. از فاز متحرک شامل سدیم دی‌هیدروژن فسفات ۰/۱ مولار- متانل (حجمی/ حجمی، ۲۰ به ۸۰) pH آن با اسید فسفریک ۳/۳۵ تنظیم شد) با شدت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. تحریک و انتشار به ترتیب در طول موج ۳۳۵ و ۴۳۰ نانومتر صورت گرفت. غلظت نمونه‌های مورد بررسی با توجه به مقایسه سطح زیر منحنی آن‌ها با سطح زیر منحنی غلظت‌های مشخص (۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم) استاندارد فومونیسین B₁ (CAS 116355-83-0) (Sigma-Aldrich، آمریکا) اندازه‌گیری شد.

نتایج

نتایج جداسازی و شناسایی گونه‌های فوزاریوم

در مجموع ۵۵ جدایه متعلق به ۵ گونه از جنس فوزاریوم از ۳۲ نمونه ذرت و ۱۵ نمونه گندم جدا شد. ۲۷ نمونه از ۳۲ نمونه ذرت (۸۴/۴ درصد) و ۱۱ نمونه از ۱۵ نمونه گندم (۷۳/۳ درصد) به گونه‌های فوزاریوم آلوده بودند. از ۵۵ جدایه به‌دست آمده ۴۲ جدایه از ذرت و ۱۳ جدایه از گندم جدا شدند. جدایه‌های فوزاریوم براساس مشخصات و معیارهای ریخت‌شناختی (Morphologic) شناسایی که در مجموع ۲۳ جدایه به عنوان فوزاریوم ورتیسیلوئیدس، ۲۲ جدایه فوزایوم پرولیفراتوم، ۵ جدایه فوزاریوم سابگلوتینانس (*F. subglutinans*)، ۴ جدایه فوزاریوم نیگامایی (*F. nygamai*) و یک جدایه فوزاریوم ردولنس (*F. redolens*) گزارش شدند. پراکندگی جدایه‌های فوزاریوم براساس محل جداسازی در جدول ۱ ذکر گردیده است.

شدند. فومونیسین B₁ موجود در فیلترای کشت قارچ با استفاده از حلال اتیل استات استخراج و عصاره‌های اتیل استاتی توسط روتاری مدل (EYELA N-1000، ژاپن) خشک و تغلیظ شد. عصاره‌های تغلیظ شده در ۰/۵ میلی‌لیتر حلال استونیتریل- آب (حجمی/ حجمی ۱:۱) حل شد. استاندارد فومونیسین B₁ نیز در ۱ میلی‌لیتر استونیتریل- آب (حجمی/ حجمی ۱:۱) حل و غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از آن تهیه شد.

تجزیه و تحلیل کیفی فومونیسین B₁ با استفاده

از روش کروماتوگرافی لایه نازک

برای شناسایی اولیه فومونیسین B₁ از روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography: TLC) استفاده شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره استونیتریلی نمونه‌ها به همراه ۵ میکرولیتر از استاندارد فومونیسین به صورت نقطه‌ای روی پلیت‌های (Aluminum sheet, silica gel 60F254) (E. Merck، آلمان) TLC لکه‌گذاری شد و در تانک حاوی حلال استونیتریل- آب (حجمی/ حجمی ۱:۱) قرار گرفت. وقتی جبهه حلال به ۱ سانتی‌متری انتهای پلیت رسید، پلیت‌ها از تانک حلال خارج و خشک شد. برای ظهور فومونیسین B₁ از معرف نینهدرین (Ninhydrin) (۰/۲ درصد در اتانل) به عنوان اسپری استفاده شد. پلیت‌هایی که با نینهدرین اسپری شد در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد تا ظهور رنگ انکوبه شد (رنگ معمولاً کمتر از ۱۵ دقیقه ظاهر می‌شود).

سنجش کمی فومونیسین B₁ با استفاده از روش

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

برای تعیین مقدار فومونیسین B₁ از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-Performance Liquid Chromatography: HPLC) با آشکارساز فلورسنت با استفاده از دستگاه KNAUER براساس روش سیدنهام (Sydenham) با اندکی تغییرات استفاده شد [۲۲]. مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های استونیتریلی با ۲۵۰

جدول ۱ حضور، پراکندگی جغرافیایی و توانایی تولید فومونیسین B₁ در گونه‌های فوزاریوم جداسازی شده از نمونه‌های گندم و ذرت

شماره جدایه	منبع جداسازی	محل جمع‌آوری	جدایه‌های شناسایی شده	بررسی کیفی تولید فومونیسین B ₁ (TLC)	بررسی کمی تولید فومونیسین B ₁ به وسیله HPLC (میکروگرم در لیتر)
۱	گندم	کردستان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۲	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۳	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۴	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۵	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	+	۵۱۰۳/۴ ± ۵۵۰/۲
۶	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	+	۱۹۳۰ ± ۲۰۲/۴
۷	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	+	۹۵۶۵ ± ۹۸۹/۸
۸	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۹	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	+	۷۳۳۵ ± ۸۹۴/۳
۱۰	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	+	۶۸۵۳/۸ ± ۷۳۶/۳
۱۱	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	+	۶۵۰۸/۲ ± ۶۸۵/۹
۱۲	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۱۳	ذرت	قزوین	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۱۴	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۱۵	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۱۶	ذرت	قزوین	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۱۷	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۱۸	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۱۹	ذرت	خوزستان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	+	۱۸۸۰/۸ ± ۱۹۵/۹
۲۰	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۲۱	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	+	۱۵۶۰/۱ ± ۱۶۱/۶
۲۲	گندم	تهران	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۲۳	ذرت	همدان	فوزاریوم ورتیسیلونیدس	-	غیر قابل تشخیص
۲۴	ذرت	خوزستان	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۱۳۳۲/۷ ± ۱۳۸/۸
۲۵	ذرت	خوزستان	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۱۳۳۴/۴ ± ۱۴۷/۹
۲۶	گندم	اردبیل	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۱۸۰۸/۸ ± ۱۷۵
۲۷	گندم	همدان	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۱۷۰۹/۳ ± ۱۹۵/۵
۲۸	گندم	مازندران	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۱۷۲۵ ± ۱۸۳/۱
۲۹	گندم	آذربایجان غربی	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۳۰	ذرت	خوزستان	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۱۶۸۱/۸ ± ۱۷۵/۳
۳۱	گندم	کرمانشاه	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۳۲	ذرت	قزوین	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۲۲۵۰/۶ ± ۲۲۶
۳۳	ذرت	قزوین	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۳۴	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۳۵	ذرت	قزوین	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۲۲۰۰/۳ ± ۲۲۱/۳
۳۶	ذرت	همدان	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۳۷	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۳۸	ذرت	قزوین	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۳۹	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۴۰	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۴۱	ذرت	خوزستان	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۴۲	گندم	مازندران	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۴۳	گندم	کردستان	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۳۷۸۲/۵ ± ۳۹۱/۱
۴۴	گندم	تهران	فوزاریوم پرولیفراتوم	-	غیر قابل تشخیص
۴۵	گندم	کردستان	فوزاریوم پرولیفراتوم	+	۵۲۳۰/۵ ± ۵۴۳/۷
۴۶	ذرت	تهران	فوزاریوم سابگلوتینانس	-	غیر قابل تشخیص
۴۷	گندم	تهران	فوزاریوم سابگلوتینانس	-	غیر قابل تشخیص
۴۸	ذرت	قزوین	فوزاریوم سابگلوتینانس	+	۲۲۵۳ ± ۲۲۵/۱
۴۹	ذرت	همدان	فوزاریوم سابگلوتینانس	+	۱۷۵۱/۶ ± ۱۷۸/۳
۵۰	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم سابگلوتینانس	+	۲۳۳۵/۸ ± ۲۴۵/۵
۵۱	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم نیگامایی	+	۲۳۰/۴ ± ۲۴/۴
۵۲	گندم	گرگان	فوزاریوم ردولنس	-	غیر قابل تشخیص
۵۳	ذرت	کرمانشاه	فوزاریوم نیگامایی	-	غیر قابل تشخیص
۵۴	ذرت	گرگان	فوزاریوم نیگامایی	-	غیر قابل تشخیص
۵۵	ذرت	قزوین	فوزاریوم نیگامایی	-	غیر قابل تشخیص

جداسازی و شناسایی گونه‌های مولد سم و غیر مولد سم قارچ فوزاریوم

توکسین از ۲۳۰/۴ تا ۹۵۶۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ارزیابی شد. جدایه‌هایی که قادر به تولید فومونیسین B₁ بودند شامل فوزاریوم ورتیسیلوئیدس (۸ جدایه، ۱۴/۵ درصد)، فوزایوم پرولیفراتوم (۱۰ جدایه، ۱۸/۲ درصد)، فوزاریوم سابگلوتینانس (۴ جدایه، ۵/۵ درصد) و فوزاریوم نیگامایی (۱ جدایه، ۱/۸ درصد) بودند. بقیه جدایه‌ها از جمله فوزاریوم ردولنس قادر به تولید مقادیر قابل شناسایی فومونیسین B₁ با به‌کارگیری روش HPLC نبودند (جدول ۱). جدایه‌های فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزایوم پرولیفراتوم قادر به تولید غلظت‌های مختلف از فومونیسین B₁ بودند که محدوده آن‌ها به‌ترتیب از ۱۵۶۰/۱ تا ۹۵۶۵ (میانگین ۵۱۴۰/۳) و از ۱۳۳۲/۷ تا ۵۲۳۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. بالاترین میانگین تولید فومونیسین B₁ توسط فوزاریوم ورتیسیلوئیدس جداسازی شده از کرمانشاه و به دنبال آن از همدان بود در حالی که بالاترین میانگین تولید فومونیسین B₁ توسط فوزایوم پرولیفراتوم مربوط به استان کردستان گزارش شد.

بحث

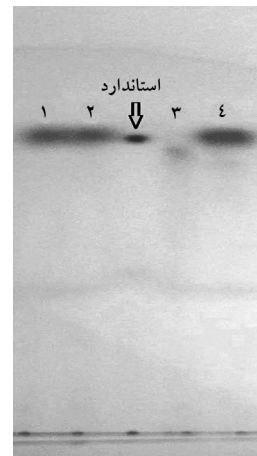
در این مطالعه ۵۵ جدایه فوزاریوم که از گندم و ذرت مناطق مختلف ایران با استفاده از مشخصات ریخت‌شناختی شناسایی و توانایی تولید فومونیسین B₁ در آن‌ها نیز بررسی شد. از ۵۵ جدایه شناسایی شده، فوزاریوم ورتیسیلوئیدس شایع‌ترین گونه با شیوع ۴۱/۹ (۲۳ از ۵۵ جدایه) و به دنبال آن فوزاریوم پرولیفراتوم با شیوع ۴۰ درصد (۲۲ از ۵۵ جدایه) گزارش شد. بالا بودن شیوع این دو گونه توسط سایر محققین به دنبال مطالعات انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان جهان گزارش شده است [۱۸، ۱۹، ۲۳].

در سال ۲۰۰۵ قیاصیان و همکاران شایع‌ترین گونه فوزاریوم جدا شده از نمونه‌های ذرت را فوزاریوم ورتیسیلوئیدس با وقوع ۸۳ درصد گزارش نمودند [۱۸]. رهجو و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی نمونه‌های ذرت از مناطق مختلف جغرافیایی ایران وقوع فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم

نتایج تجزیه و تحلیل کیفی تولید فومونیسین B₁

با استفاده از روش TLC

تولید فومونیسین B₁ توسط جدایه‌های فوزاریوم در محیط کشت مایع به دنبال اسپری کردن محلول اتانلی ۰/۲ درصد نینهدرین روی پلتهای TLC نمونه‌گذاری شده با عصاره‌های فیلترای کشت جدایه‌ها در مقایسه با غلظت ۵ میکروگرم استاندارد انجام گرفت. حضور فومونیسین B₁ با ظهور لکه‌های بنفش مایل به قرمز روی پلتهای که میزان حرکت یکسانی با نمونه استاندارد سم داشتند تأیید شد (شکل ۱). جدایه‌های مولد سم (ستون‌های ۱، ۲ و ۴) در کنار یک جدایه غیر مولد سم (ستون ۳) و استاندارد فومونیسین B₁ (FB₁) نشان داده شده‌اند.



شکل ۱ تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) فومونیسین B₁: جدایه‌های مولد سم (ستون‌های ۱، ۲ و ۴) در کنار یک جدایه غیر مولد سم (ستون ۳) و استاندارد فومونیسین B₁ (FB₁) نشان داده شده‌اند.

نتایج سنجش کمی فومونیسین B₁ با استفاده از

روش HPLC

تجزیه و تحلیل کمی فیلترای کشت کلیه جدایه‌های جداسازی شده اعم از مثبت یا منفی در آزمون TLC با استفاده از روش HPLC نشان داد که ۲۲ جدایه از ۵۵ جدایه (۴۰ درصد) قادر به تولید فومونیسین B₁ بودند و محدوده تولید

به ترتیب ۶۹/۶ درصد و ۲۶/۷ درصد گزارش کردند [۱۹]. چهری و همکاران در سال ۲۰۱۰ آلودگی نمونه‌های گندم جمع‌آوری شده را ۵۸ درصد و گونه‌های غالب جدا شده از آن را بعد از فوزاریوم گرامیناروم (*F. graminearum*)، فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم گزارش نمودند [۱۷]. در سال ۲۰۱۱ عابدی تیزکانی نشان داد که در بین گونه‌های فوزاریوم جدا شده از نمونه‌های ذرت استان گلستان، بالاترین درصد وقوع مربوط به گونه‌های فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم است [۲۴]. در سال ۲۰۰۷ علی‌اکبری و همکاران در بررسی نمونه‌های ذرت در شمال ایران وقوع فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم را به ترتیب ۶۰/۴۱ و ۱۳/۳۹ درصد گزارش کردند [۲۵]. در سال ۲۰۰۵ فندوهان (Fandohan) و همکاران فراوانی گونه‌های فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم در نمونه‌های ذرت را به ترتیب برابر ۶۸ و ۳۱ درصد گزارش نمودند [۲۶]. همچنین آکونا (Acuna) و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که نمونه‌های ذرت و گندم مورد بررسی به ترتیب ۱۰۰ و ۴۰ درصد آلودگی قارچی داشتند و گونه‌های غالب این مطالعه فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم با فراوانی ۷۰/۸ و ۲۵ درصد بودند [۲۷].

در تحقیق حاضر بیشترین میزان آلودگی گندم و ذرت به فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم به ترتیب مربوط به استان‌های همدان و کرمانشاه بود. سایر جدایه‌های شناسایی شده شامل فوزاریوم سابگلوتینانس، فوزاریوم نیگامای و فوزاریوم ردولنس بودند. تحقیق حاضر اولین گزارش به دست آمده از حضور فوزاریوم ردولنس از ایران است که از نمونه گندم استان گلستان جدا شده است. فوزاریوم ردولنس شبیه به فوزاریوم اگزیسپوروم (*F. oxysporum*) بوده و تنها با تفاوتی که در اندازه ماکروکونیدی دیده می‌شود، این دو گونه از هم تفریق داده می‌شوند. براساس این مطالعات فوزاریوم ردولنس به عنوان گروه خواهری کمپلکس فوزاریوم اگزیسپوروم در نظر گرفته شده است. فوزاریوم ردولنس یک بیماری‌زا مهم

محصولات کشاورزی بوده که باعث پوسیدگی ریشه نخود و لوبیا، ضایعات نکروتیک (Necrotic) در سویا و پژمردگی و پوسیدگی عدس می‌شود [۲۸]. تمام جدایه‌های جدا شده به جز فوزاریوم ردولنس متعلق به کمپلکس جیبرلا فوجیکورویی بوده که باعث بیماری‌های مختلف در انسان و همچنین محصولات کشاورزی نظیر ذرت و گندم می‌شوند. شایع‌ترین گونه‌های متعلق به این کمپلکس فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم هستند.

در مطالعه حاضر توانایی تولید فومونیسین B₁، شایع‌ترین میکوتوکسین کمپلکس جیبرلا فوجیکورویی در جدایه‌های جدا شده از گندم و ذرت مناطق جغرافیایی مختلف ایران نیز بررسی شد. ۲۲ جدایه از فوزاریوم شامل فوزاریوم ورتیسیلوئیدس (۸ جدایه)، فوزاریوم پرولیفراتوم (۱۰ جدایه)، فوزاریوم سابگلوتینانس (۳ جدایه) و فوزاریوم نیگامای (یک جدایه)، فومونیسین B₁ را در سطوح مختلف تولید کردند که محدوده آن‌ها از ۲۳۰/۴ تا ۹۵۶۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. محدوده تولید فومونیسین B₁ در جدایه‌های جداسازی شده فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم به ترتیب از ۱۵۶۰/۱ تا ۹۵۶۵ و ۱۳۳۲/۷ تا ۵۲۳۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. این سطح تولید فومونیسین با مطالعات انجام شده در ایران و کشورهای دیگر مطابقت دارد [۸، ۱۷، ۱۸، ۲۹].

از سایر جدایه‌های مولد می‌توان به فوزاریوم سابگلوتینانس اشاره کرد که از میزبان‌های مختلف مانند ذرت، انبه، کاج و سورگوم (*Sorghum*) در دنیا جدا شده است. این قارچ اغلب با پوسیدگی ساقه و بلال ذرت همراه است. در مطالعاتی که در سال‌های ۲۰۱۰ و ۱۹۹۵ به ترتیب در مجارستان و تایوان انجام شده است حدود ۶۶-۱۰۰ درصد جدایه‌های فوزاریوم ورتیسیلوئیدس قادر به تولید فومونیسین B₁ بودند [۳۰، ۳۱]. در کلمبیا جدایه‌های فوزاریوم ورتیسیلوئیدس و فوزاریوم پرولیفراتوم به ترتیب ۹۷ و ۹۱ درصد قادر به تولید فومونیسین B₁ بودند که محدوده آن از ۵/۶ تا ۲۵۸۴۶/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است [۲۷]. در تحقیق حاضر بالاترین

جداسازی و شناسایی گونه‌های مولد سم و غیر مولد سم قارچ فوزاریوم

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نمایانگر آلودگی نمونه‌های ذرت و گندم مناطق مختلف ایران به انواع گونه‌های فوزاریوم است. این آلودگی نه تنها از نظر آسیب‌های اقتصادی ناشی از فساد قارچی این محصولات استراتژیک ملی حایز اهمیت است، بلکه به دلیل توانایی درصد قابل توجهی از جدایه‌های جداسازی شده در تولید سطوح بالای فومونیسین B₁ به عنوان یک سم قارچی سرطان‌زا می‌تواند به عنوان تهدید بالقوه برای سلامت انسان و حیوانات مطرح باشد. این نتایج لزوم انجام مطالعات اپیدمیولوژیک گسترده در خصوص وقوع، پراکندگی و تنوع ژنتیکی و اجدادی این قارچ‌ها را با هدف تدوین و به‌کارگیری استراتژی‌های مناسب و مؤثر در کنترل آلودگی قارچی و مایکوتوکسینی اغذیه انسانی و دامی و محصولات کشاورزی آشکار می‌سازد.

تشکر و قدردانی

نتایج تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه دکترای تخصصی قارچ‌شناسی پزشکی بوده است که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از پرسنل محترم بخش‌های قارچ‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس و انستیتو پاستور ایران که در انجام این مطالعه همکاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

میزان تولید سم مربوط به جدایه فوزازیوم ورتیسیلوئیدس جداسازی شده از همدان با میزان ۹۵۶۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در رابطه با سایر سویه‌های متعلق به این گونه محدود تولید فومونیسین B₁ از ۱۵۶۰/۱ تا ۹۵۶۵ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود و میانگین آن‌ها ۵۰۸۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. در تحقیقات مربوط به سایر نقاط جهان بالاترین میزان تولید فومونیسین B₁ مربوط به این جدایه قابل مقایسه با نمونه‌های جدا شده از آفریقای جنوبی، بنین، چین و آرژانتین است که میزان آن‌ها از ۸۱۶۰ تا ۱۷۹۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بوده است [۲۶]. در بین جدایه‌های فوزاریوم ساگلوتینانس جداسازی شده در تحقیق حاضر، تنها ۳ جدایه قادر به تولید فومونیسین B₁ بودند که محدود آن‌ها از ۱۷۵۱ تا ۲۳۳۵/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. فوزاریوم ساگلوتینانس متعلق به کمپلکس جییرلا فوجیکوروی بوده و براساس مطالعات انجام شده در محیط‌های کشت اغلب فومونیسین B₁ تولید نمی‌کند. این گونه از نظر ریخت‌شناختی بسیار به فوزازیوم ورتیسیلوئیدس شبیه است [۲۹، ۳۲]. فوزازیوم نیگامایی نیز بیماری‌زا ذرت بوده و بعضی از سویه‌های آن قادر به تولید فومونیسین B₁ در غلظت‌های مختلف هستند [۳۲]. در تحقیق حاضر یک جدایه فوزاریوم نیگامایی شناسایی شده قادر به تولید فومونیسین B₁ در غلظت ۲۳۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

منابع

- [1] Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ. *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, University Park, 1993; p: 157-168.
- [2] Leslie J, Summerell BA. *The Fusarium Laboratory Manual*. Chapter 11: Practical Approaches to Identification. Blackwell Publishing, Ames, IA. 2006; p: 101-110.
- [3] Jensen TG, Gahrn-Hansen B, Arendrup M, Bruun B. *Fusarium fungaemia* in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(6): 499-501.
- [4] Jain PK, Gupta VK, Misra AK, Gaur E, Bajpai V, Issar S. Current Status of *Fusarium* Infection in Human and Animal. *Asian J Anim Vet Adv* 2011; 6(3): 201-27.
- [5] Atukwase A, Kaaya AN, Muyanja C, Vismer H, Rheeder JP. Diversity of *Gibberella*

- fujikuroi* species complex isolated from maize produced in Uganda. *Int J Plant Pathol* 2012; 3(1): 1-13.
- [6] Goswami RS, Kistler HC. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Pathol* 2004; 5(6): 515-25.
- [7] Kvas M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Divers* 2009; 34: 1-21.
- [8] Falcão VC, Ono MA, de Ávila Miguel T, Vizoni E, Hirooka EY, Ono EY. *Fusarium verticillioides*: evaluation of fumonisin production and effect of fungicides on in vitro inhibition of mycelial growth. *Mycopathologia* 2011; 171(1): 77-84.
- [9] Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GS, Vanschalkwyk DJ. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 1992; 82(3): 353-7.
- [10] Ueno Y, Iijima K, Wang SD, Sugiura Y, Sekijima M, Tanaka T, Chen C, Yu SZ. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food Chem Toxicol* 1997; 35(12): 1143-50.
- [11] Alizadeh AM, Rohandel G, Roudbarmohammadi S, Roudbary M, Sohanaki H, Ghiasian SA, Taherkhani A, Semnani S, Aghasi M. Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(6): 2625-8.
- [12] Jurjevic Z, Wilson DM, Wilson JP, Geiser DM, Juba JH, Mubatanhema W, Widstrom NW, Rains GC. *Fusarium* species of the *Gibberella fujikuroi* complex and fumonisin contamination of pearl millet and corn in Georgia, USA. *Mycopathologia* 2005; 159(3): 401-6.
- [13] Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH Jr. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* 1991; 266(22): 14486-90.
- [14] FAO GIEWS Country Briefs on Iran. Above average wheat production forecast in 2012; Available at: <http://www.fao.org/giews/countrybrief/country.jsp?code=IRN>.
- [15] Kachuei R, Yadegari MH, Rezaie S, Allameh A, Safaie N, Zaini F, Khanezad Yazdi F. Investigation of stored wheat mycoflora, reporting the *Fusarium cf. langsethiae* in three provinces of Iran during 2007. *Ann Microbiol* 2009; 59(2): 383-90.
- [16] Trung TS, Tabuc C, Bailly S, Querin A, Guerre P, Bailly JDF. Fungal mycoflora and contamination of maize from Vietnam with aflatoxin B1 and Fumonisin B1. *World Mycotax J* 2008; 1: 87-94.
- [17] Chehri K, Tamadoni Jahromi S, Reddy KRN, Abbasi S, Salleh B. Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. *Toxins* 2010; 2(12): 2816-23.
- [18] Ghiasian SA, Rezayat SM, Kord-Bacheh P, Maghsood AH, Yazdanpanah H, Shephard GS, van der Westhuizen L, Vismer HF, Marasas WF. Fumonisin production by *Fusarium*

- species isolated from freshly harvested corn in Iran. *Mycopathologia* 2005; 159(1): 31-40.
- [19] Rahjoo V, Zad J, Javan-Nikkhah M, Mirzadi Gohari A, Okhovvat SM, Bihamta MR, Razzaghian J, Klemsdal SS. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *J Plant Pathol* 2008; 90(3): 463-8.
- [20] Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. Fusarium Research Laboratory, Department of Crop Science, University of Sydney and Royal Botanic Gardens. 1994; p: 133.
- [21] Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press. 1993; p: 193.
- [22] Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Stockenström S, Snijman PW, Van Schalkwyk DJ. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. *J AOAC Int* 1995; 79: 688-96.
- [23] Leslie JF, Doe FJ, Plattner RD, Shackelford DD, Jonz J. Fumonisin B1 production and vegetative compatibility of strains from *Gibberella fujikuroi* mating population 'A' (*Fusarium moniliforme*). *Mycopathologia* 1992; 117(1-2): 37-45.
- [24] Abedi-Tizaki M, Sabbagh SK. Fungi associated with harvested corn grains of Golestan province in Iran. *Ann Biol Res* 2011; 2(5): 681-8.
- [25] Aliakbari F, Mirabolfathy M, Emami M, Mazhar SF, Karami-Osboo R. Natural occurrence of *Fusarium* species in maize kernels at Golestan Province in Northern Iran. *Asian J Plant Sci* 2007; 6: 1276-81.
- [26] Fandohan P, Gnonlonfin B, Hell K, Marasas WF, Wingfield MJ. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. *Int J Food Microbiol* 2005; 99(2): 173-83.
- [27] Acuña A, Lozano MC, García MC, Diaz GJ. Prevalence of *Fusarium* species of the *Liseola* section on selected Colombian animal feedstuffs and their ability to produce fumonisins. *Mycopathologia* 2005; 160(1): 63-6.
- [28] Jimenez-Fernandez D, Navas-Cortes JA, Montes-Borrego M, Jimenez-Diaz RM, Landa BB. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of *Fusarium* yellows in chickpea. *Plant Dis* 2011; 95(7): 860-70.
- [29] Leslie JF, Zeller KA, Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Ritieni A. Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(4): 2254-62.
- [30] Tseng TC, Lee KL, Deng TS, Liu CY, Huang JW. Production of fumonisins by *Fusarium* species of Taiwan. *Mycopathologia* 1995; 130(2): 117-21.
- [31] Szecsi A, Szekeres A, Bartok T, Oros G, Bartok M, Mesterhazy A. Fumonisin B1-4-producing capacity of Hungarian *Fusarium verticillioides* isolates. *World Mycotox J* 2010; 3: 67-76.
- [32] Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD,

Desjardins AE. Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in

section Liseola and by some related species. Appl Environ Microbiol 1992; 58(3): 984-9.