فصلنامه گیاه‌پزشکی
(دانشگاه آزاد اسلامی شیراز)
جلد ۶، شماره ۴، سال ۱۳۹۳ (۳۷۵-۳۶۵)

بهینه‌سازی استخراج آران‌ای دو رشته‌ای ویروسی از برخی گونه‌های *Fusarium*

داود کولیوند[۱*]، مهدی داوری[۲]، نعمت سخندان بشیر[۳]، مهدی ارزنلو[۳]

۱. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

اغلب ویروس‌های آلوده‌کننده‌ی قارچ‌های بیمارگر گیاهی که تا کنون گزارش شده‌اند، دارای ژنوم آران-ای دو رشته‌ای (Double Strand RNA,dsRNA) می‌باشند. این نوع ویروس‌ها با توجه به خاصیت کم‌آزاری به عنوان یکی از عوامل کنترل بیولوژیکی قارچ‌ها مطرح هستند. در این تحقیق، هشت جدایه متعلق به پنج گونه *Fusarium* شامل *F. graminearum* s. str. (lin. 7)، *F. culmorum*، *F. tricinctum*، *F. proloferatum* و *F. incarnatum* برای وجود dsRNA مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به وجود پروتکل‌های متفاوت برای استخراج dsRNA که اغلب دارای مراحل پیچیده و استفاده از مواد خطرناک و سرطان‌زا می باشند، در روش مذکور از فنول و کلروفورم استفاده نشد و ضمن استفاده از میزان بافت کمتر، مدت زمان استخراج آران‌ای دورشته‌ای نسبت به سایر روش‌ها کاهش پیدا کرد. نهایتاً در چهار جدایه *Fusarium* پس از استخراج و الکتروفورز، وجود آران‌ای دو رشته‌ای مشخص شد و نتایج حاصله نشان داد روش مذکور یک روش مناسب و کارآمد برای استخراج dsRNA از بافت قارچی می‌باشد. همچنین در این تحقیق وجود آر.ان.ای دو رشته‌ای در گونه *F. incarnatum* (*F. semitectum*) برای اولین بار گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، کم‌آزاری، سوختگی فوزاریومی سنبله گندم، استخراج، dsRNA

---

[*]مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: koolivand@znu.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۱۹

مقدمه

ویروس‌های دارای ژنوم آران‌ای دو رشته‌ای، اغلب انگل اجباری مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای هستند که معمولاً سبب تغییرات فنوتیپی و سنتز متابولیت‌های ثانویه، تغییرات سیتولوژیکی اندام‌های سلولی، اسپورزایی، تولید پیگمانت‌ها و تغییر فعالیت‌های آنزیمی می‌شوند و یا اینکه بر بیماری‌زایی گونه‌های بیماری‌زا اثر کاهشی داشته و به عنوان خاصیت کم‌آزاری از آن یاد می‌شود و اغلب آلودگی‌هایی که توسط آنها ایجاد می‌شود پایدار و بدون علائم است (Chu *et al.*, 2002, 2004; Refos *et al.*, 2013; Pearson *et al.*, 2009). سه جنس معمول از ویروس‌های قارچی (Mycovirus)، Mitovirus، Partitivirus وTotivirus شناسایی شده است (King *et al.*, 2012). گونه‌های جنس Mitovirus دارای آران‌ای بدون پوشش می‌باشند و درون میتوکندری وجود دارند که اندازه ژنوم آنها ۲/۳ تا ۳/۵ کیلو جفت باز است و اعضای خانواده Totiviridae ویروس‌های حاوی dsRNA هستند که دارای ژنوم خطی ۴/۶ تا ۷ کیلوجفت باز می‌باشند و همچنین اعضای جنس Partitivirus دارای ژنوم دو قطعه‌ای dsRNA هستند که اندازه آن‌ها ۱/۴ تا ۳ کیلوجفت باز است (Kwon *et al.*, 2007; King *et al.*, 2012).

از طرفی جنس *Fusarium* با طیف میزبانی بسیار وسیع در انواع گیاهان از جمله گندم، جو، یولاف، برنج، ذرت، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و حبوبات، بیماری‌های مختلفی را از قبیل سوختگی سنبله، پوسیدگی ریشه و طوقه و انواع پژمردگی ایجاد می‌کند (Leslie & Summerell, 2006). همچنین برخی از گونه‌های فوزاریوم زهرابه‌های قارچی (Mycotoxins) خطرناک متعددی مانند تریکوتسین‌ها تولید می‌کنند که برای انسان، دام و گیاهان بسیار مضر هستند (Bottalico & Perrone, 2002). بیماری سوختگی سنبله (Fusarium Head Blight) گندم و جو یکی از بیماری‌های مهم گندم و سایر غلات دانه‌ریز در مناطق مرطوب و نیمه-مرطوب ایران و جهان به شمار می‌رود و در سال‌های اخیر، همه‌گیری‌های شدید این بیماری منجر به افت شدید محصول ناشی از کاهش مستقیم عملکرد و آلودگی بذور در کشورهای مختلف از جمله ایران به زهرابه‌های قارچی شده است . گونه *Fusarium graminearum* (فرم جنسی *Gibberella zeae*) گونه غالب در ایجاد این بیماری شناخته شده است (Zhang *et al.*, 2012; Davari *et al.*, 2012) و برخی گونه‌های دیگر از جمله *F. tricinctum*، *F.culmorum* و *F. proliferatum* نیز در ایجاد این بیماری و نیز سایر بیماری‌های غلات مانند پوسیدگی ریشه و طوقه گندم و جو و پوسیدگی بلال ذرت دخیل‌اند (Leslie & Summerell, 2006). برخی گونه‌های فوزاریوم زهرابه‌های قارچی متعدد از جمله انواع تریکوتسین‌ها را تولید می‌کنند که در بین آنها داکسی‌نیوالنول (DON) اهمیت بیشتری دارد. گونه *F. incarnatum* که در منابع فارسی اغلب به عنوان *F. semitectum* معروف است، یکی از گونه‌های غالب روی غلات،

سورگوم و ارزن می‌باشد و به عنوان گونه غالب در گل‌آذین‌های علف‌های هرز استان اردبیل نیز شناخته شده است (Davari *et al.*, 2014). در چند دهه اخیر، برخی گونه‌های فوزاریوم به عنوان بیمارگر انسان نیز شناخته شده‌اند (Gorscak *et al.*, 2007).

تاکنون وجود ویروس‌های قارچی در گونه‌های متعدد قارچی متعلق به گروه‌های مختلف تاکسونومیکی گزارش شده است و از جنس *Fusarium* گونه‌های مختلف دارای آر ان ای دو رشته‌ای گزارش نموده‌اند (Chu *et al.*, 2002, 2004; Hashemi *et al.*, 2004; Sharzei *et al.*, 2007). Aminian *et al.* (2011) با بررسی ۳۳ جدایه *F. graminearum* آلودگی dsRNA را در ۱۲ جدایه به دست آوردند.

جداسازی مولکول‌های آران‌ای دو رشته‌ای برای اولین بار به طریق جداسازی آران‌ای محلول از آران‌ای ریبوزومی روی یک ستون سلولزی با استفاده از بافرهای مختلف و مقدار متنوع اتانول انجام گرفته است. برای استخراج dsRNA پروتکل‌های متنوعی وجود دارد، اما معمولاً برای استخراج dsRNA از قارچ‌های رشته‌ای و گیاهان از روش (Morris & Doddes 1979) استفاده می‌شود که شامل استخراج اسید نوکلئیک با استفاده از فنول و کلروفورم و در پی آن جداسازی و تفکیک انواع اسید نوکلئیک توسط سلولز در ستون کروماتوگرافی با استفاده از غلظت‌های مختلف اتانول می‌باشد. سایر روش‌های شناخته شده، استفاده از کلرید لیتیم و کلرید کلسیم هستند. یک روش سریع دیگر با استفاده از گوانیدیوم تیوسیانات توسعه یافته است که قادر به جداسازی dsRNA وDNA از یک نمونه می‌باشد (Delye & Corio-Costet 1998). اغلب روش‌های ذکر شده، زمان‌بر و هزینه‌بر هستند و علاوه براین موادی مانند فنول ممکن است سرطان‌زا باشند و یا مواد سمی داشته باشند. با این وجود تکنیک استخراج dsRNA بدون استفاده از فنول و کلروفورم توصیف شده است (Tzanetakis & Martin 2008)، اما میزان بافت استفاده شده زیاد می‌باشد. هدف از این تحقیق، بررسی وجود dsRNA در برخی از گونه‌های فوزاریوم شناخته شده از غلات به عنوان عامل بیوکنترل و همچنین بهینه نمودن روشی ساده و سریع برای استخراج dsRNA از جدایه های قارچی مذکور و مقدار بافت قارچی کمتر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های قارچی

تعداد هشت جدایه متعلق به گونه‌های *F. graminearum*، *F. proliferatum*، *F. incarnatum* و *F. culmorum* که از سنبله‌های مبتلا به بیماری FHB و گل‌آذین گندمیان وحشی اطراف مزارع گندم استان اردبیل جداسازی و با روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی (توالی‌یابی چندژنی Multilucus Genotyping) شناسایی شده بود، برای این منظور مورد استفاده قرار

گرفت (Davari *et al.*, 2012). مشخصات این جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است. این جدایه‌ها پس از شناسایی دقیق گونه در تحقیق قبلی به مجموعه قارچی مرکز قارچ‌شناسی آکادمی علوم هلند (CBS) اهدا شده و به عنوان جدایه‌های استاندارد پذیرفته شده‌اند. جدایه‌های مذکور در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و بعد از ۵ روز سه قطعه محیط کشت حاوی قارچ به اندازه یک سانتی‌متر مربع از هر جدایه انتخاب و به محیط کشت مایع حاوی عصاره سیب‌زمینی دکستروز (Potato Dextrose Broth, PDB) منتقل شدند. همچنین نمونه مثبت آلوده (Cryphonectria parasitica) از (CNR) تهیه شد.

جدول شماره ۱- مشخصات جدایه های *Fusarium* مورد استفاده

Table 1. Properties of *Fusarium* isolates

Location	Host	Species	CBS number	dsRNA	Isolate
Parsabad Moghan	Tritichum aestivum	*F. graminearum*	CBS 131267	+	Fco2
Parsabad Moghan	Tritichum aestivum	*F. culmorum*	-	+	F47
Parsabad Moghan	Agropyrone sp.	*F. incarnatum*	CBS 131151	+	W61
Parsabad Moghan	Cynodon dactylon	*F. proliferatum*	CBS 131441	+	W98
Parsabad Moghan	Tritichum aestivum	*F. graminearum*	CBS 131006	-	T151
Parsabad Moghan	Tritichum aestivum	*F. graminearum*	CBS 131265	-	fg3
Ahar	Dactylis glomereta	*F. tricinctum*	CBS 131193	-	w116
Bilesavar Moghan	Tritichum aestivum	*F. graminearum*	CBS 130608	-	T35

استخراج dsRNA از بافت میسلیومی قارچی

برداشت بافت قارچی از کشت قارچ در محیط کشت PDB انجام گرفت. مقداری بافت قارچی درون یک لوله ۲ میلی‌لیتری قرار داده شد و توزین گردید. یک درصد وزنی پلی وینیل پلی پیرولیدین (PVPP-40) به هر لوله اضافه شد و با استفاده از نیتروژن مایع، بافت قارچی به صورت پودر در آمد، به طوری‌که وزن نهایی بافت هموژنیزه ۴۰۰ میلی گرم بود. مقدار ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۰/۰۵ مولار Tris-HCl، ۰/۰۵ مولار EDTA، ۰/۱ مولار NaCl، pH 8) و ۸۰ میکرولیتر SDS ده درصد، ۸۰ میکرولیتر ۲-بتا مرکاپتواتانول) به منظور هموژنیزه کردن به هر کدام از لوله‌ها اضافه شد. سوسپانسیون به دست آمده در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس فاز رویی جدا شد و اتانول ۱۰۰٪ به میزانی اضافه شد تا حجم نهایی اتانول به ۱۶/۵٪ رسید. محلول به دست آمده برای ستون حاوی سلولز استفاده شد.

آماده سازی ستون سلولز

تهیه ستون با استفاده از یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری و یک لوله ۲ میلی‌لیتری انجام گرفت. انتهای لوله ۱/۵ میلی‌لیتری یک شیار ضربدر مانند ایجاد شد، به طوری‌که نفوذ مایعات انجام گیرد. مقدار ۶۰۰ میکرولیتر سلولز CF-11 متعادل شده با بافر 1X STE (۱۰ میلی‌مولار تریس

اسیدی pH 8، ۱۰۰ میلی مولار NaCl pH 8، یک میلی‌مولار EDTA pH 8) حاوی ۱۶/۵٪ اتانول درون لوله ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. لوله ۱/۵ میلی‌لیتری درون لوله ۲ میلی لیتری قرار داده شد تا ستون آماده استفاده شود. پس از اینکه فاز مایع ستون از قسمت بالایی لوله خارج شد، فاز رویی جمع‌آوری شده حاصل از هموژنیزه شدن بافت قارچی که حاوی اتانول نیز بود، درون قسمت بالایی ستون ریخته شد. پس از گذشت دو دقیقه، سانتریفوژ کوتاه در ۱۰۰g به مدت دو دقیقه انجام شد و ستون دو بار با استفاده از بافرX 1X STE حاوی ۱۶/۵٪ اتانول شسته شد و پس از هر بار شستشو، سانتریفوژ کوتاه همانند مرحله قبل انجام گرفت و فاز مایع خارج شده و جمع‌آوری شده در لوله ۲ میلی‌لیتری دور ریخته شد. لوله ۲ میلی‌لیتری تعویض شد و برای آزادسازی dsRNA، ستون دو بار با استفاده از بافر 1X STE بدون اتانول شسته شد و سانتریفوژ کوتاه در ۱۰۰g به مدت دو دقیقه انجام شد و پس از هر بار شستشو محلول خارج شده جمع‌آوری شد. به منظور رسوب دادن dsRNA، هم حجم فاز مایع خارج شده از ستون ایزوپروپانول سرد و ۰/۱ حجم آن استات سدیم سه مولار (pH ۵/۲) به هر لوله اضافه شد و لوله‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه در g ۱۶۸۰۰ انجام گرفت. فاز رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل شده با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد. در نهایت، رسوب تشکیل شده بعد از خشکانیده شدن در ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه سوسپانسون شد.

به منظور حذف DNA و یا RNA احتمالی، dsRNA استخراج شده با استفاده از DNase وRNase تیمار شد.

تعیین اندازه مولکولی dsRNA استخراج شده

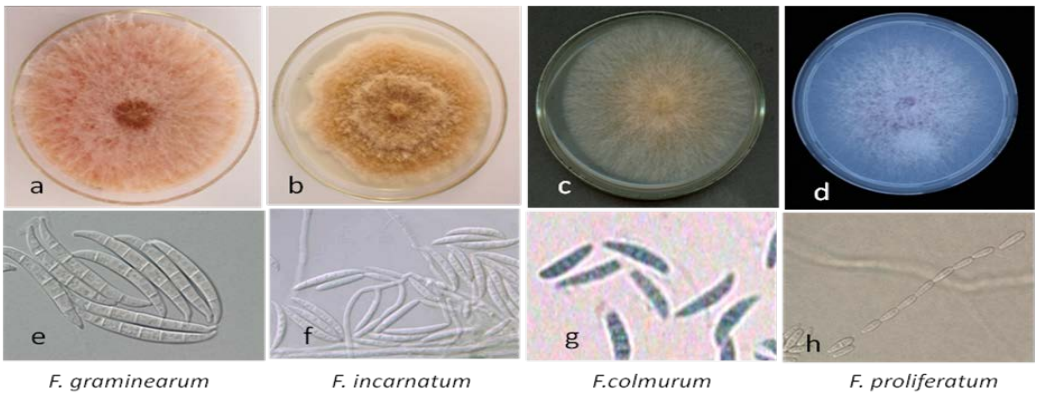
به منظور بررسی وجود یا عدم وجود، کیفیت و وزن مولکولی dsRNA از الکتروفورز افقی در ژل آگارز ۱٪ با بافر TBE در ولتاژ ۹۰ به مدت ۱/۵ ساعت استفاده گردید. سپس عکسبرداری زیر نور ماورابنفش با استفاده از دستگاه Gel documentation انجام شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق، هشت جدایه قارچی متعلق به پنج گونه فوزاریوم که از سنبله‌های گندم و گندمیان وحشی استان اردبیل جداسازی شده بودند (شکل ۱)، با استفاده از روش ذکر شده برای استخراج dsRNA مورد آزمایش قرار گرفته و در چهار جدایه فوزاریوم، وجود dsRNA با اندازه‌ای حدود ۲ کیلو جفت باز در مقایسه با نمونه شاهد مثبت محرز شد (شکل ۲).

مشخصات جدایه‌هایی که آرای دو رشته‌ای از آنها استخراج گردید

گونه *F. incarnatum* که در منابع فارسی اغلب به عنوان *F. semitectum* معروف است، یکی از گونه‌های غالب روی غلات، سورگوم و ارزن می‌باشد (Wilson *et al.*, 2002) که وجود آرای دو رشته‌ای با روش مذکور در آن مشخص شد *F. incarnatum* به عنوان گونه غالب در گل‌آذین‌های علف‌های هرز استان اردبیل شناخته شده است (Davari *et al.*, 2012). همانطور که در تصویر مشخص است مشخصات مرفولوژیکی، شکل و رنگ کلونی در گونه مورد نظر تغییرات قابل ملاحظه‌ای نداشته است (شکل ۱).



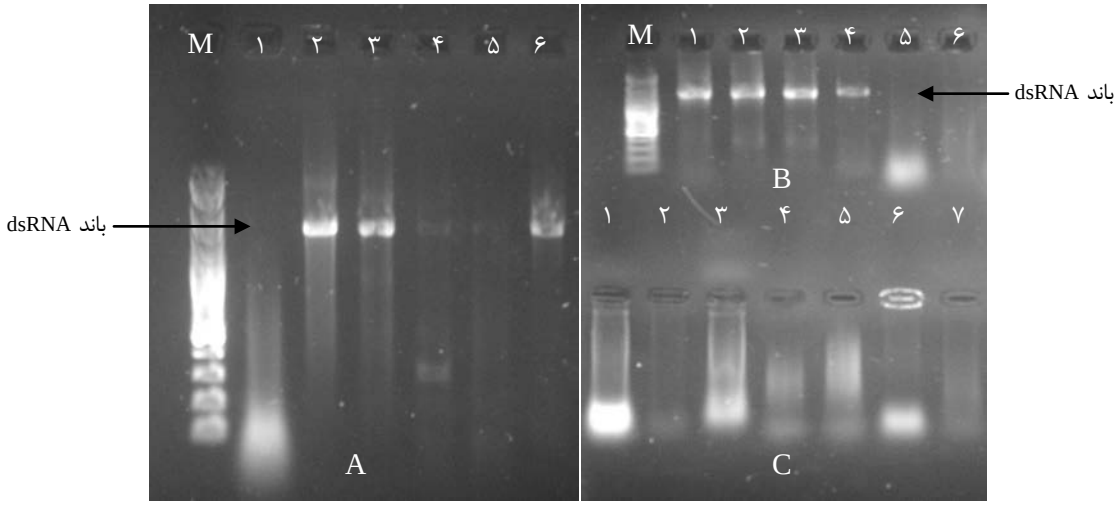
شکل ۱– a-d: پرگنه‌های رشد یافته روی PDA پس از هفت روز، e وg: ماکروکنیدی‌ها f وh: میکروکنیدی‌های زنجیری (اصلی)

Figure 1. a-d) Fungi clonies on PDA medium after 7 days, e-g) macroconidies f and h) microconidies

همانطور که قبلاً نیز ذکر شد در روش مذکور از میزان بافت قارچی کمتری نسبت به سایر پروتوکل‌های رایج استفاده شد که این امر می‌تواند در مدیریت استخراج و رشد جدایه‌های قارچی تسهیل کننده باشد. شستشوی ستون سلولز با استفاده از میزان مشخص و معین از اتانول (۱۶/۵٪) آرای‌های تک رشته‌ای را از ستون حذف می‌نماید که سایر محققین نیز از این اتانول برای شستن و حذف آرای تک رشته‌ای استفاده نموده‌اند. علاوه بر استفاده از غلظت-های مختلف اتانول برای حذف آرای تک رشته‌ای ناخواسته در نهایت فاز خارج شده از ستون قبل از الکترفورز با استفاده از آرایز و دی ان‌ایز تیمار شد تا اسیدنوکلیئیک نا مطلوب (آرای تک رشته‌ای و دی‌ان‌ای) حذف شوند.

از آنجایی‌که یکی از مشکلات عمده‌ی پروتکل‌های استخراج آرای دو رشته‌ای، استفاده از فنول و کلروفورم می‌باشد در بافرهای تهیه شده در این پژوهش سعی شد از مواد جایگزین استفاده شود. PVP-40 در بافر استخراج برای حذف مواد ملانینی در قارچ در طی هموژنیزه

نمودن بافت قارچی استفاده شد. همچنین بتامرکاپتواتانول برای برهم زدن ساختارهای پروتئینی مزاحم در استخراج اسید نوکلئیک اضافه شد (Balijja *et al.*, 2008).



شکل ۲- نتایج الکتروفوز آران‌ای دورشته ای استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪: A) استخراج مطابق روش بهینه شده بدون استفاده از سولفیت سدیم، M) مارکر GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder ۱) نمونه فاقد dsRNA ۲تا ۵) نمونه های دارای dsRNA به ترتیب Fco2 ، W98، W61،F47 ۶) شاهد مثبت *C. parasiticae* دارای آران‌ای دو رشته‌ای

B) استخراج مطابق روش بهینه شده بدون استفاده از سولفیت سدیم، M) مارکر GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder ۱تا ۴) به ترتیب، Fco2، W61، W98 و F47 ۵) نمونه فاقد dsRNA C) استخراج با استفاده از فنول کلروفورم

Figure 2. The result of electrophoresis dsRNA extracted on agarose gel 1%: a) dsRNA extraction based on optimized method without sulfite sodium, M GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder 1: dsRNA isolate free 2-5: isolates contain dsRNA, Fco2, W98, W61 and F47 6: Positive control (*C. parasiticae* infected by dsRNA)

B) dsRNA extraction based on optimized method with sulfite sodium, M GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder 1-4: Fco2, W61,W98 and F47 5: dsRNA isolate free C) dsRNA extraction by phenol and chlorophorm

در این روش جدید، مقدار مناسب آران‌ای دو رشته‌ای حاصل شد. از آران‌ای استخراج شده می‌توان برای سایر تحقیقات مولکولی استفاده نمود. روش معرفی شده در این تحقیق، روشی سریع برای استخراج آران‌ای دو رشته‌ای از تعداد زیادی نمونه قارچی به طور همزمان و استفاده از روش مذکور می‌تواند از نظر زمان، هزینه و کارایی مناسب باشد.

جدایه‌های دارای آران‌ای دو رشته از نظر شکل و مشخصات مرفولوژیکی کلونی مورد بررسی قرار گرفتند و تغییرات قابل ملاحظه‌ای از رشد کلونی‌ها و مشخصات مرفولوژیکی در مقایسه با نمونه‌های فاقد آران‌ای دو رشته‌ای مشاهده نشد (شکل ۲) که البته برخی از گزارشات نیز حاکی از تغییرات نا مشخص و نامعین این عوامل بیوکنترل روی قارچ‌ها می‌باشد اما باید توجه

داشت که گونه‌های فوزاریوم یکی از عوامل مهم و خسارت‌زا روی انواع محصولات علی الخصوص غلات می‌باشد و با توجه به سابقه کنترل عوامل قارچی توسط ویروس‌های دو رشته‌ای شناسایی دقیق‌تر و سریع گونه‌های فوزاریوم و جدایه‌های دارای آران‌ای دو رشته‌ای و بررسی رفتار آنها به مدیریت و کنترل بیماری کمک شایانی خواهد نمود.

معمولاً تفاوت مشخصی در ویژگی‌های ریخت‌شناختی پرگنه، تولید رنگدانه و مشخصات کنیدی جدایه‌های فوزاریوم دارای dsRNA و جدایه‌های فاقد آن دیده نمی‌شود اما شدت بیماریزایی و میزان تولید DON در جدایه‌های آلوده به این ژنوم‌های ویروسی کاهش می‌یابد همچنانکه در خصوص *F. graminearum* ثابت شده است (Aminian *et al.*, 2011). عدم وجود تفاوت ریخت‌شناختی در جدایه‌های همراه و فاقد dsRNA گونه *F. proliferatum* نیز نشان داده شده است (Heaton & Leslie, 2004). وجود dsRNA از گونه‌های *F. graminearum* (Chu *et al.*, 2002)، *F. poae* (Fekete *et al.* 1995; Compel *et al.* 1999)، *F. oxysporum* (Kilic and Griffin 1998)، *F. solani* (Nogawa *et al.*, 1996)، *F. culmorum* (Toth *et al.*, 2005) و *F. subglutinans* (Gupta, 1991) نیز تاکنون گزارش شده است. اما در این تحقیق وجود آر ان ای دو رشته‌ای در گونه *F. incarnatum* (*F. semitectum*) برای اولین بار گزارش می‌شود.

با توجه به اهمیت ویروس‌های قارچی در کنترل بیولوژیک گونه‌های بیماریزای فوزاریوم، روش معرفی شده در این مطالعه می‌تواند کمک شایانی در استخراج این ژنوم‌ها و توسعه تحقیقات مربوطه نماید.

منابع

Aminian, P., Alizadeh, A., Saidi A. & Safaei N. 2011. Effect of double-stranded RNAs on virulence and deoxynivalenol production of Fusarium graminearum isolates. *Journal of Plant Protection Research*, 51: 29-37

Balijja, A. Kvarnheden, A. & Turchetti, T. 2008. A non-phenol-chloroform of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological Methods*, 152: 32-37

Bottalico, A. & Perrone, G., 2002. Toxigenic Fusarium speces and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 611-624

Chu, Y. M., Jeon, J. J., Yea, S. J., Kim, Y. H., Yun, S. H., Lee, Y. W. & Kim, K. H. 2002. Double-stranded RNA mycovirus from Fusarium graminearum. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2529-2534.

Chu, Y. M., Lim, W. S., Yea, S. J., Cho, J. D., Lee, Y. W., & Kim, K. H. 2004. Complexity of dsRNA mycovirus isolated from Fusarium graminearum. *Virus Genes*, 28: 135-143.

Compel, P., Papp, I., Bibo, M., Fekete, C. & Hornok, L. 1999. Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of Fusarium poae. *Virus Genes*, 18: 49-56.

Davari, M., Wei, S. H., Babai-Ahari, A. Arzanlou, M., Waalwijk, C, van der Lee, T. A. J., Zare, R., Gerrits van den Ende, A. H. G., de Hoog, S. G. & van Diepeningen, A. D. 2012. Geographic differences in trichothecene chemotypes of Fusarium graminearum in the Northwest and North of Iran. *World Mycotoxin Journal*, 6(2): 137-150.

Davari, M., Babai-Ahari, A., Arzanlou, M., Zare, R., de Hoog, G. S. and van Diepeningen, A. D., 2014. Morphological and molecular characterization of three new Fusarium species associated with inflorescence of wild grasses for Iran. *Rostaniha*, 14(2): 124-134.

De´lye, C. & Corio-Costet, M. F. 1998. Origin of primary infections of grape by Uncinula necator: RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycological Research*, 102: 283–288

Fekete, C., Giczey, G., Papp, I., Szabo, L., & Hornok. L. 1995. High-frequency occurrence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in Fusarium poae. *FEMS Microbiology Letters*, 131: 295-299.

Gorscak, J. J., Ayres, B. D., Bhagat, N., Hammersmith, K. M., Rapuano, C.J., Cohen, E. J., Burday, M., Mirani, N., Jungkind, D. & Chu, D. S. 2007. An outbreak of *Fusarium keratitis* associated with contact lens use in the Northeastern United States. *Cornea*, 26: 1187–1194.

Gupta S. 1991. Newer evidence to demonstrate mycovirus of *Fusarium moniliform* var *.subglutinans* as causal agent of mango shoot malformation. *Journal of the Entomological Research Society*, 15 (3): 222–228

Hashemi, M., Mozafari J., Ali Zadeh, A. & Shamsbakhsh, M. 2004. dsRNAs associated with *Fusarium graminearum* isolates in iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 40:313-326.

Heaton, L. A. & Leslie, J. F. 2004. Double-stranded RNAs associated with *Fusarium proliferatum* mitochondria. *Mycological Progress*, 3: 193-198

Kilic, O. & Griffin, G. J. 1998. Effect of dsRNA-containing and dsRNA-free hypovirulent isolates of *Fusarium oxysporum* on severity of *Fusarium* seedling disease of soybean in naturally infested soil. *Plant and Soil*, 201:125-135

Kwon, S. J. 1., Lim, W. S., Park, S. H., Park, M. R. & Kim, K. H. 2007. Molecular characterization of a dsRNA mycovirus, *Fusarium graminearum* virus-DK21, which is phylogenetically related to hypoviruses but has a genome organization and gene expression strategy resembling those of plant potex-like viruses. *Molecular Cells*, 23:304-315

King, A., Lefkowitz, E., Adams, M. J. 2012. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London, UK. 1327 pp.

Leslie, J. F. & Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing.

Morris, T. J. & Dodds, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, 69: 854-858

Nogawa, M., Nakatani, A., Gonda, K., Shimosaka, M. & Okazaki. M. 1996. Replication of double-stranded RNA in mycovirus from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani*. *FEMS Microbiology Letters*, 137: 45-49

Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B. & Arthur, K. 2009. Mycovirus of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 10:115-128.

Refos, J. M., Vonk, A. G., Eadie, K., Lo-Ten-Foe, J. R., Verbrugh, H. A., van Diepeningen, A. D. & van de Sande, W. W. J. 2013. Double-Stranded RNA Mycovirus Infection of *Aspergillus fumigatus* is Not Dependent on the Genetic Make-Up of the Host. *PLoS ONE*, 8(10): e77381

Toth, B., Fonad, P., Mesterhazy, A. & Varga, J. 2005. Double-stranded RNA mycoviruses in *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* isolates. *Cereal Research Communications*, 33: 733-740

Tzanetakis, I. E. & Martin, R. R. 2008. How similar are plant and insect viruses? Strawberry latent virus: A case study. *Acta Horticulturae*,780:17–20.

Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Jin, Xu, J.S., Zheng, Y. & Feng, J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PLoS ONE*, 7(2): e31722

Plant Protection Journal
(Islamic Azad University, Shiraz Branch)
Vol. 6, No. 4, 2013 (365-375)

Optimization of double strand RNA extraction from some isolates of *Fusarium* sp.

Davoud KOOLIVAND[1], Mahdi DAVARI[2], Nemat SOKHANDAN BASHIR[3], Mahdi ARZANLOU[3]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan,Zanjan, Iran (Corresponding author, E-mail: Koolivand@znu.ac.ir)

2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardebili, Ardebil, Iran

3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

The majority of viruses infected fungi which have been reported contain double-strand RNA (dsRNA) genomes. Mycoviruses are introducing as agent of the biological control of fungi according to hypersensitive properties. In this research, eight isolates belong to Fusariumgenus include ofF. graminearum, F. culmorum, F. tricinctum, F. proliferatum and F. incarnatum survived to dsRNA infection. Due to using of hazardous material such as phenol and complicated procedure in different dsRNA extraction protocols in mentioned research phenol and chlorophorm was removed , using less tissue and dsRNA extraction time was reduced compared to other methods. Result showed that four isolates infected by dsRNA also, mentioned method has sufficient efficiency and convenient for dsRNA extraction from fungi tissue. Also, dsRNA was reported fromF. incarnatum (F. semitectum) for first time.

KeyWords: Biological Control, Hypersensitive, Fusarium Head Blight, dsRNA Extraction