

شناسایی و تشخیص ژن‌های مولد زرنون در سویه‌های *Fusarium graminearum* جدا شده از دانه‌های ذرت

عطیه مهرزاد^{۱*}، معصومه مهربان سنگ آتش^۲، سید علی مرتضوی^۳، رویا رضائیان
دلویی^۴، محمد محسن زاده^۵

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران

۲- عضو هیات علمی گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی، مشهد، ایران

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۴- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، ایران

۵- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۶)

چکیده

فوزاریوم گرامیناروم یکی از عمده‌ترین گونه‌های قارچی مولد مایکوتوکسین زرنون می‌باشد که اغلب باعث آلودگی غلاتی نظیر ذرت می‌شود. در این مطالعه با توجه به وجود مخاطرات ناشی از آلودگی غلات به کپک‌های مولد تریکوتسین‌ها برای سلامتی انسان و دام به بررسی آلودگی فوزاریوم‌های مولد زرنون در نمونه‌های ذرت مورد استفاده در خوراک دام جمع‌آوری شده از گاوداری‌های صنعتی استان خراسان رضوی پرداخته شد. در راستای ارائه‌ی یک روش ساده جهت ردیابی زرنون، پس از کشت نمونه‌ها به روش پورپلیت، جدایه‌ها به روش تک اسپور خالص شدند. DNA جدایه‌ها از طریق واکنش PCR با آغازگر (Tri5-F/R) و (Pks4-F/R) مورد آزمون قرار گرفتند. در این پژوهش ۸ جدایه فوزاریوم گرامیناروم شناسایی شد که از این تعداد طی واکنش PCR با آغازگر Tri5-F/R، در ۵ جدایه قارچی یک باند ۳۸۰ جفت بازی را تکثیر نمودند که نشان‌دهنده توانایی تولید تریکوتسین در آنها می‌باشد. نتایج حاصل از واکنش با آغازگر Pks4-F/R در ۵ جدایه فوزاریوم گرامیناروم تکثیر باندی با طول تقریبی ۲۸۰ جفت بازی، گویای وجود گونه‌های فوزاریوم گرامیناروم با توانایی تولید زرنون بود. یافته‌های این مطالعه نشان داد که این روش، ابزاری قدرتمند، ویژه و حساس در تشخیص آلودگی مواد غذایی به زرنون می‌باشد. همچنین با توجه به حضور قارچ‌های توکسین‌زا در این نمونه‌ها، انجام مطالعات تکمیلی دیگر، توجه متخصصین بهداشت عمومی و تغذیه به موضوع لازم می‌نماید.

کلید واژگان: ذرت، تریکوتسین‌ها، زرنون، فوزاریوم گرامیناروم، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

*مسئول مکاتبات: A_mehrzad1984@yahoo.com

۱- مقدمه

ذرت با نام علمی *Zea mays L* گیاهی یک‌ساله و یک‌پایه از جنس *Zea mays* جزء گروه غلات مناطق گرمسیری و معتدل محسوب می‌شود [۱،۲]. به علت موارد مصرف زیاد و کیفیت و ارزش غذایی بالا در سطح وسیعی از جهان کاشته می‌شود [۱] و به عنوان دومین غله مهم در سطح جهانی به شمار می‌رود [۲] به طوری که در آمریکا از نظر اهمیت و ارزش اقتصادی فراوان به سلطان محصولات کشاورزی معروف است [۱].

نوع و میزان مصرف ذرت در نقاط مختلف دنیا متفاوت است. سطح زیر کشت و همچنین مصرف ذرت طی سال‌های اخیر در اغلب کشورهای جهان به سرعت افزایش یافته و این نسبت از سال ۱۹۸۴ به بعد به علت اهمیت زیادی که فرآورده‌های مختلف آن در دنیای امروز دارا می‌باشند، رشد زیادتری داشته و در حال حاضر سطح زیر کشت آن به حدود ۱۴۰ میلیون هکتار و مقدار محصول آن به حدود ۴۶۸ میلیون تن در جهان بالغ گردیده و بعد از گندم و برنج در بین غلات مقام سوم را احراز نموده است. در ایران نیز ذرت طی سال زراعی ۱۳۸۰ با تولید ۶۰۰ میلیون تن و عملکرد ۴۲۹۶ کیلوگرم در هکتار، نسبت به برنج و گندم برتری نشان می‌دهد. با توجه به آمار سال‌های ۱۹۹۹-۲۰۰۰ کشورهای مهم صادرکننده ذرت دانه‌ای در جهان، آمریکا ۴۷۲۵۵ و آرژانتین ۹۷۱۵ بر حسب هزار تن و ایران هیچ گونه صادراتی ندارد و واردکننده ۱۰۸۰ هزار تن ذرت می‌باشد [۲].

با توجه به برخی تخمین‌ها سالانه بیش از ۲۵ درصد کل غلات تولیدی جهان در معرض آلودگی قارچی قرار دارند و بر اساس گزارشات سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد

1. Mycotoxine
2. Fumonisin B1
3. Deoxynivalenol
4. Zearalenon
5. Aflatoxin

(FAO) هر ساله میلیون‌ها تن مواد غذایی در اثر آلودگی با میکوتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ‌های انباری از بین می‌روند. به طوری که طی بررسی‌ای به عمل آمده روی محصولات غذایی با پایه غلاتی مانند ذرت، همچون نان، نودل، غذای کودک، غذاهای فوری و محصولات مشابه، وجود مقادیر بیش از حد مجاز میکوتوکسین‌ها گزارش شده است [۳،۴]. از بین تمام بیماری‌ها و آلودگی‌ها، آلودگی ذرت توسط میکوتوکسین‌ها^۱ به دلیل تاثیری که روی اقتصاد کشورها می‌گذارد و همچنین آسیب‌های جبران‌ناپذیری که روی سلامت انسان و حیوان دارد توجه زیادی را به خود جلب کرده است [۵،۶،۷].

در سال ۲۰۰۵، ۶۸٪ نمونه ذرت در آسیا حاوی فومونیزین B₁ بود در حالی که نمونه مثبت برای داکسی‌نیوالنول^۳ ۶۷ درصد، برای زرنون^۴ ۴۰ درصد و برای آفلاتوکسین^۵ ۱۹ درصد بوده است [۷]. سازمان غذا و کشاورزی تخمین زده است که بین ۲۵ تا ۵۰ درصد از محصولات کشاورزی در جهان توسط میکوتوکسین‌ها آلوده می‌شوند. میزان خسارت و نابودی ذرت توسط آفلاتوکسین‌ها ۲۲۵ میلیون دلار در هر سال و ۹۳۲ میلیون دلار توسط همه میکوتوکسین‌ها در آمریکا تخمین زده شده است [۵]. استرس شدید دمایی، تنش رطوبت و آسیب-دیدگی محصول توسط حشرات مهمترین عامل رشد کپک‌ها و تولید توکسین توسط آن‌ها می‌باشد [۸]. تشکیل میکوتوکسین ممکن است گیاه را در مزرعه قبل از برداشت آلوده کند و در مرحله بعد از برداشت این آلودگی ادامه پیدا کند و یا ممکن است در مرحله بعد از برداشت و نگهداری محصول، گسترش آلودگی شروع شود. میکوتوکسین‌ها در محصولات گیاهی، غذاهای فرآوری شده و غذای حیوانات اثرات اقتصادی قابل

در این بررسی استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی فوزاریوم گرامیناروم مفید گزارش شد و رابطه آشکاری بین مورفولوژی و species-specific PCR در تشخیص فوزاریوم گرامیناروم یافت شد [۱۴]. همچنین در سال ۲۰۰۲ نیز جهت شناسایی پتانسیل توکسین‌زایی در سویه‌های فوزاریوم کولموروم جدا شده از دانه‌های گندم علاوه بر انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی و اندازه‌گیری میزان توکسین تولیدی، واکنش PCR با آغازگر Tri5-Tri6 طراحی شده بر اساس نواحی IGS انجام پذیرفت. بر اساس اطلاعات بدست آمده از واکنش PCR با آغازگر Tri5-Tri6 نشان داده شد فوزاریوم کولموروم دارای پتانسیل توکسین‌زایی را در دو شاخه با توانایی بالا و با توانایی کم تولید تریکوتسین می‌توان تقسیم‌بندی نمود [۱۵].

در سال ۲۰۱۲ میلادی نیز به منظور تشخیص سریع گونه‌های فوزاریوم با هدف جلوگیری از ورود مایکوتوکسین به چرخه مواد غذایی حاصل از محصولات کشاورزی از جمله گندم، برای اولین بار اقدام به استفاده از DPCR و طراحی پروتکلی در این زمینه نمودند. این مطالعه به طور موفقیت‌آمیزی با استفاده از آغازگر اختصاصی Tri5 که مسیر بیوستز تریکوتسین‌ها را مورد هدف قرار داد، انجام شد [۱۷، ۱۶]. برای اولین بار منگ^۱ و همکاران (۲۰۱۲) موفق به طراحی روشی دقیق و سریع در تعیین فوزاریوم‌های تولیدکننده توکسین زرنون در خوراک دام شدند. این آزمون به وسیله دستگاه Real time PCR و با استفاده از آغازگر طراحی شده بر اساس ژن هدف Pks4 در حضور Fluorescent dye SYBR Green.I انجام پذیرفت [۱۸].

با توجه به موارد فوق و با توجه به اهمیت موضوع و مصرف زیاد غلات و مشتقات غذایی آن در جیره غذایی جامعه و همچنین در دامداری‌ها و مرغداری‌ها، بررسی حاضر به منظور

توجهی دارند و باعث مشکلات جدی برای سلامتی انسان و حیوان می‌شوند [۹].

زرنون یا F-2 toxin یک مایکوتوکسین استروژنیک غیراستروئیدی است که در انسان سبب عدم توازن هورمون، سرطان پستان و سرویکس در انسان و در حیوانات اهلی نازایی، کاهش باروری، کاهش وزن نوزادان، تغییر وزن غدد آدرنال، تیروئید و هیپوفیز و نیز تغییراتی در سطح سرمی هورمون‌های پروژسترون و استرادیول می‌گردد [۱۱، ۱۰]. جنس فوزاریوم از قارچ‌های هیفومیست خاکزی است که دامنه وسیعی از گیاهان از جمله ذرت را آلوده می‌کند. حداقل هفت این گونه ساپروفیت شفاف و به طور عمده فوزاریوم گرامیناروم^۱ (جیبرلا زئا^۸) و فوزاریوم کالموروم^۸ از گونه‌های مولد این توکسین به شمار رفته و تولیدکننده زرنون و سایر متابولیت‌های آن شامل آلفا و بتا زرنولها^۹ و بتا زرنالون‌ها و cis-ZEA می‌باشند [۱۲، ۱۰]. در این راستا تحقیقات زیادی در دنیا به عمل آمده است به طوری که در ابتدا به منظور شناسایی و تشخیص فوزاریوم گرامیناروم در غلات، آزمون تکثیر تصادفی DNA پلی‌مورف برای شناسایی ویژگی‌های محصولات تکثیر شده فوزاریوم گرامیناروم انجام شد. پس از کلون کردن قطعه‌های انتخاب شده و توالی‌یابی، جفت آغازگرهایی که به صورت اختصاصی نشان‌دهنده حضور فوزاریوم گرامیناروم بودند را برای انجام آزمون PCR رقابتی مورد استفاده قرار دادند [۱۳].

محققان جهت شناسایی ایزوله‌های فوزاریوم گرامیناروم تولیدکننده توکسین در غلاتی که از هند، انگلستان، نیوزلند، ایتالیا و کانادا جمع‌آوری شدند از RAPD-PCR و SCARs استفاده نمودند و همچنین مورفولوژی و تولید توکسین را تحت شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند.

6. *Fusarium graminearum*
7. *Gibberella zeae*
8. *F.culmorum*
9. α - zearalenol

برای تمامی به این منظور تست PCR برای تمامی واکنش‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از کیت AccuPower™ PCR Premix (Bioneer) و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل لب سایکلر¹² ساخت شرکت سنسکوئیست¹³ آلمان انجام شد. هر آزمایش شامل یک کنترل مثبت و حداقل یک کنترل منفی (یک واکنش PCR فاقد DNA ژنومی قارچ) بود. همچنین به منظور ارزیابی صحت عملکرد آغازگرها در هر مورد از DNA سایر گونه‌ها استفاده گردید. محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. همچنین جهت بررسی اندازه قطعات از مارکر مولکولی DNA با وزن مولکولی ۱۰۰ bp استفاده گردید.

برای شناسایی مولکولی جدایه‌های بدست آمده، DNA قارچ-ها از طریق واکنش PCR، به منظور بررسی و شناسایی پتانسیل توکسین‌زایی جدایه‌های فوزاریوم و همچنین تفکیک گونه‌های توکسین‌زا از غیر توکسین‌زای جدایه‌های شناسایی شده و همچنین شناسایی و بررسی آلودگی به قارچ‌های مولد زرنون انجام شد. همچنین مقایسه آن‌ها با نمونه کنترل (نمونه استاندارد DSM 1095 و DSM 1096 فوزاریوم گرامیناروم تولیدکننده زرنون)، جدایه‌ها به لحاظ تولید توکسین‌های فوق مورد بررسی قرار گرفت [۱۸]. به این منظور از جفت پرایمر اختصاصی Tri5-F/R جهت جداسازی فوزاریوم‌های تولیدکننده تریکوتسین استفاده گردید و در نهایت با بکار بردن پرایمر اختصاصی Pks4-F/R گونه‌های فوزاریوم گرامیناروم مولد زرنون شناسایی شدند. توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در جدول شماره ۱ آورده شده‌اند. برنامه حرارتی واکنش PCR در واکنش با آغازگرهای اختصاصی Pks4-F/R، Tri5-F/R، F/R نیز طبق جدول شماره ۲ انجام پذیرفت [۱۸، ۱۷، ۱۶].

تشخیص آلودگی نمونه‌های ذرت به فوزاریوم‌های مولد زرنون در خوراک دام جمع‌آوری شده از سطح گاوداری‌های صنعتی و غیرصنعتی استان خراسان رضوی انجام پذیرفت.

۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه پس از نمونه‌برداری تصادفی از قسمت میانی انبار ذرت مورد استفاده در گاوداری‌ها، نمونه‌های جمع‌آوری شده درون کیسه‌های پلاستیکی استریل تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از کشت نمونه‌ها به روش پورپلیت، جدایه‌ها به روش کشت تک اسپور خالص شدند. جهت شناسایی جدایه‌های فوزاریوم به دست آمده از دو محیط کشت PDA و CLA و کلیدهای معتبر شناسایی [۱۹] استفاده گردید. به منظور تهیه توده میسیلیوم، کلیه جدایه‌های فوزاریوم در محیط کشت مایع سیب‌زمینی¹¹ کشت داده شد. بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، میسیلیوم قارچ تکثیر شده با کمک کاغذ صافی در زیر هود استریل جمع‌آوری و در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. جهت استخراج DNA ابتدا نمونه‌های منجمد توسط دستگاه فریز درایر خشک گردید و سپس با کمک نیتروژن مایع، نمونه خرد و پودر یکنواختی از آن تهیه شد. استخراج DNA طبق دستور العمل از کیت AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer) انجام شد.

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس مطالعات پیشین [۱۸، ۱۷، ۱۶]، به منظور شناسایی و بررسی آلودگی قارچی مورد نظر انجام پذیرفت. رقیق‌سازی آغازگرها با آب مقطر دی‌یونیزه و بر اساس OD ارائه شده آغازگر در غلظت ۱۰ میکرومولار تهیه شد. به این منظور تست PCR

12. labcyler
13. Thermocycler Sensquest

11. Potato Dextrose Broth (PDB)

Table 1 Sequence of primer pairs in detecting contamination with Zearlonon fungi

Primer	Target species	Sequences(5' – '3')	Size (bp)
Pks4 F1	Zearlonon producers	5'- CGTCTTCGAGAAGATGACAT-3'	280
Pks4 R1		5'- TGTTCTGCAAGCACTCCGA-3'	
Tri5-F	Trichotocin producing fusarium	5'-GGGATGCTGGATTGGCG-3'	380
Tri5-R		5'-CATCACCTGAGGGTCCTTGT-3'	

Table 2 Thermal program of primers: Pks4-F/R, Tri5-F/R

Primer	Initial denaturation	cycle	denaturation	junction	Extension	Final Extension
Pks4 F1 Pks4 R1	94°C, 3min	35	94°C, 30s	60°C, 30s	72°C, 30s	72°C, 7min
Tri5-F Tri5-R	94°C, 5min	35	94°C, 30s	60°C, 45s	72°C, 30s	72°C, 7min

جداسازی گونه‌های فوزاریوم گرامیناروم مولد زرالنون در واکنش با آغازگر Pks4-F و Pks4-R1 مورد ارزیابی قرار گرفتند. تکثیر بانندی با طول تقریبی ۲۸۰ جفت بازی در الکتروفورز ژل آگارز برای محصولات واکنش با این جفت آغازگر گویای وجود گونه‌های فوزاریوم گرامیناروم با توانایی تولید زرالنون بود. همان‌گونه که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود از بین ۸ جدایه فوزاریوم گرامیناروم ۵ جدایه دارای ژن مولد زرالنون می‌باشد.

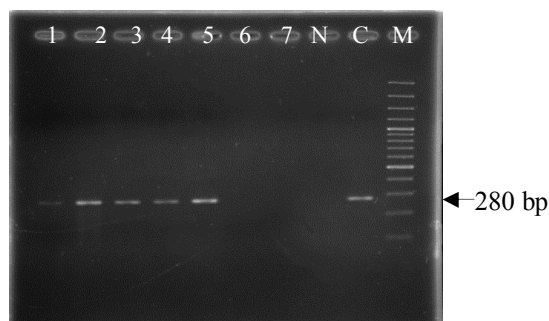


Fig 2 Agarose gel PCR products for detection of Fusarium producing zearlonone, wells: 1-5: for Zearlonon producing Fusarium isolates, 6-7 wells: *Aspergillus flavus*, *Fusarium proliferatum*, well N: negative control (without DNA), C: positive control, M: Marker bp100

۴- بحث

در این مطالعه با توجه به طول قطعه کاملاً مشابه به دست آمده در ژل آگارز با وزن پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار و مطالعات انجام شده توسط بن‌امر و همکاران^{۱۴} (۲۰۱۲) می‌توان این گونه

۳- نتایج

در این بررسی تعداد ۹۸ جدایه فارچی مشکوک به فوزاریوم از نمونه‌های ذرت جداسازی و به روش‌های میکروسکوپی و میکروسکوپی شناسایی شد، که کلیه ۹۸ جدایه به منظور شناسایی فوزاریوم‌های تولید کننده مایکوتوکسین با استفاده از آغازگر Tri5-F و Tri5-R مورد آزمون قرار گرفتند. الکتروفورز ژل آگارز برای محصولات واکنش با این جفت آغازگر نشان‌دهنده وجود ۵ جدایه با قابلیت تولید توکسین بود. طول قطعه‌ی تکثیر شده در واکنش با این آغازگر برابر با ۳۸۰ جفت باز بود (شکل ۱).

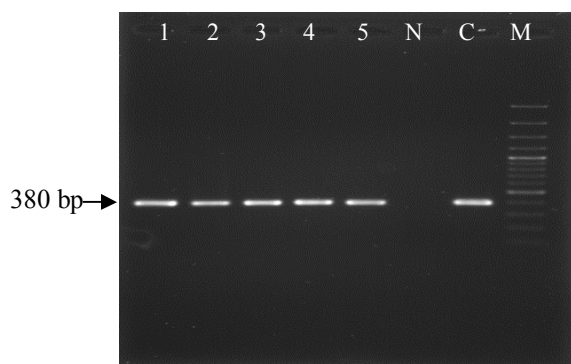


Fig 1 Agarose gel PCR products for detection of Trichotocin producing fusarium, wells: 1-5: Trichotocin producing fusarium isolates, N wells: negative control (without DNA), C: positive control, M: marker bp100

با توجه به این که *F.culmorum* و *F.graminearum* به عنوان عمده‌ترین گونه‌های مولد مایکوتوکسین زرالنون می‌باشند. در این پژوهش در نتیجه استفاده از روش‌های میکروسکوپی و میکروسکوپی از بین ۹۸ جدایه فوزاریوم، ۸ جدایه فوزاریوم گرامیناروم شناسایی شد که به منظور

تولیدکننده مایکوتوکسین‌هایی از نوع تریکوتسین می‌باشند. و در نتیجه پاسخ مثبت به آغازگر Pks4-F و Pks4- R1 کلیه‌ی جدایه‌ها مولد تریکوتسین از نوع زرالنون می‌باشند. همان‌طور که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود، نتایج آزمون انجام شده طی واکنش PCR توسط آغازگر Pks4- R1 با DNA سایر انواع گونه‌های قارچی که به منظور بررسی اختصاصی عمل نمودن این آغازگر انجام پذیرفته بود، هیچ‌گونه نتیجه‌ی مثبتی را نشان نداد، که این نتیجه نیز گویای حساسیت بالای این آغازگر در رابطه با شناسایی فوزاریوم‌های تولیدکننده زرالنون می‌باشد.

نتیجه گرفت که این مطالعه به طور موفقیت‌آمیزی با استفاده از آغازگر اختصاصی Tri5 که مسیر بیوسنتز تریکوتسین‌ها را مورد هدف قرار می‌دهد، فوزاریوم‌های تولیدکننده توکسین را شناسایی نموده است [۱۶].

نتایج بدست آمده طی آزمون PCR در واکنش با آغازگر R1 Pks4-F و Pks4- همکاران (۲۰۱۰) مطابقت کامل داشت. همچنین کلیه نمونه‌های مثبت اعلام شده در آزمون با استفاده از آغازگر Tri5- R و Tri5-F با نمونه‌های فوزاریوم گرامیناروم شناسایی شده توسط آغازگر Pks4 یکسان بود [۱۸]. این مطلب نشان دهنده آن است که ۶۲/۵ درصد فوزاریوم گرامیناروم شناسایی شده،

Table 3 PCR characterization by reaction with specific primer Pks4-F/R with DNA of various species of fungi

Species	strain	Trichothecene-producer	Pks4-F/R1
<i>Aspergillus flavus</i>	ACCC 30321	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ACCC 30797	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	ACCC 2032	-	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	DSM 840	-	-
<i>Fusarium verticilloides</i>	DSM 62264	-	-
<i>Fusarium graminearum</i> ¹	DSM 1095	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> ¹	DSM 1096	+	+
<i>Fusarium culmoreum</i> ²	DSM 62191	+	-

1DSM 1095, DSM 1096: Standard species of *Fusarium graminearum* with the ability to produce zearalenone

2DSM 62191: Standard species of *Fusarium culmoreum* without the ability to produce zearalenone

مایکوتوکسین‌ها بر روی مواد غذایی به مدت طولانی حتی بعد از پخت آن‌ها، در صورت عدم رعایت شرایط مناسب نگهداری، آلودگی دانه‌های غلات از جمله ذرت به قارچ‌ها و توکسین‌های ناشی از آن می‌تواند به راحتی اتفاق افتد. این در حالی است که در ایران قسمت عمده ذرت مورد استفاده در گاو‌داری‌ها، از سایر کشورها خریداری می‌گردد، در نتیجه نیاز به نظارت بیشتر بر روی محصولات کشاورزی استراتژیک در مبادی ورودی کشور دیده می‌شود. لذا با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه دیگر آزمون انجام مطالعات تکمیلی دیگر و اندازه‌گیری کمی مایکوتوکسین‌های حاصل از فوزاریوم‌ها در مواد غذایی، توجه به وضع مقررات بهداشتی برای تعیین حد مجاز این گروه از توکسین‌ها در مواد غذایی، اتخاذ تدابیر لازم و پیشگیرانه برای جلوگیری از بروز آلودگی‌های قارچی در مواد غذایی، توجه به اجرای روش‌های حذف

همچنین با توجه این‌که در این بررسی واکنش بر روی DNA مسیلیوم قارچ و طی یک واکنش PCR معمولی صورت گرفته است، علی‌رغم زمان لازم برای تهیه توده مسیلیوم نسبت به روش منگ و همکاران در سال ۲۰۱۰، نیاز به استفاده از دستگاه Real time PCR از بین رفته است. به طور کلی و با توجه به اینکه سرعت و دقت تشخیص آلودگی مواد غذایی به فوزاریوم و توکسین‌های تولید شده توسط آنها در مراحل ابتدایی، دارای اهمیت بالایی می‌باشد این روش در مقایسه با روش‌های متداول در تشخیص آلودگی با زرالنون به لحاظ حساسیت و دقت بالاتر و نسبتاً سریع می‌باشد.

با توجه به شرایط نامناسب مانند بالا بودن رطوبت انبارها در کشتی‌های حمل‌کننده دانه‌های وارداتی و همچنین ذرت‌های تولید شده در داخل کشور، قبل از مصرف، مدت زمانی را در انبارها نگه‌داری می‌شوند و با عنایت به بقا و پایداری

- associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 645-667.
- [10] Shier W.T., Shier A.C., Xie W., 2001, Structure activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon*, 39: 1435-1438.
- [11] Pitt J.I., Basilico JC, Abarca ML, et al. 2000, Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol.* 38: 41-6.
- [12] Pitt, J. I. 2000. Toxigeni fungi which are important. *Med. Mycol.* 38: 17-22.
- [13] Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W. and Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol. and Mol.Plant Pathol.* 53: 17-37.
- [14] Chelkowski, J., Bateman, G. L., Mirocha, C. H. J. 1999. Identification of toxigenic *Fusarium* species using PCR assays. *Phytopathology.* 147:307-311
- [15] Bakan, B., Giraud-Delville, C., Pinson, L., Richard-Molard, D., Fournier, E. and Brygoo, Y. 2002. Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of Deoxynivalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5472-5479
- [16] Ben Amar, A., Oueslati, S., Ghorbel, A. and Mliki, A. 2012. Prediction and early detection of mycotoxigenic *Fusarium culmorum* in wheat by direct PCR-based procedure. *Food Control.* 23: 506-510
- [17] Yoruk, E. and Gulruh, A. 2012. Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay. *Mycopathologia*, 173: 53-61.
- [18] Meng, K., Wang, Y., Yang, P., Luo, H., Bai, Y., Shi, P., Yuan, T., Ma, R. and Yao, B. 2010. Rapid detection and quantification of zearalenone-producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene PKS4. *Food Control.* 21: 207-211.
- [19] Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blacwell. Australia, PP. 102-111
- و یا کاهش میزان مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی و توجه متخصصین بهداشت عمومی و تغذیه به موضوع را مطرح می‌نماید.

۵- منابع

- [1] Mirhadi, M. J. 2001, Maize, Research organizations, education and agricultural extension, Tehran, PP. 5-131
- [2] Khodabandeh, N. 1990. Grains, Tehran University Press, PP. 417-430
- [3] Schollenberger, M., Suchy, S., Jara, H.T., Drochner, W. and M.H. Müller. 1999. A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*, 147: 49-57.
- [4] Kumar, R., Mishra, A. K., Dubey, N.K. and Tripathi, Y.B. 2006. Evaluation of henopodium ambrosioides as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 159-64.
- [5] Muthomi, J. W., Mureithi, B. K., Chemining'wa, G. N., Gathumbi, J. K and Mutitu, E. W. 2010. Aspergillus and aflatoxin B₁ contamination of maize and maize products from eastern and north-rift regions of Kenya. 12th KARI Biennial Conference, 8th-12th November 2010, Nairobi, Kenya.
- [6] Garcia, S., and Heredia, N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia.* 162: 255-264.
- [7] Hieu Phuong, N. 2010. Mycotoxins contamination in maize kernels in Vietnam and effects of feed additives on reducing fumonisin impacts in pigs. MSc.Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Animal Nutrition and Management, PP. 10-52
- [8] Agag, B. I. 2004. Mycotoxin in foods and feeds, 1-aflatoxin. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res.* 7: 173-206.
- [9] Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A., and Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their

Identification and detection of zearalenone-producing genes of *Fusarium graminearum* strains isolated from corn kernels

Mehrzaad, A. ^{1*}, Mehraban Sangatash, M. ², Mortazavi, S. A. ³, Rezaeian Doloei, R. ⁴, Mohsenzadeh, M. ⁵

1. Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, sabzevar, Iran
2. Food science and Technology research institute, ACER Mashhad Branch
3. Department of Food Science and Technology Ferdowsi University of Mashhad, Iran
4. Department of Agronomy and plant breeding, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
5. Department of Food hygiene and Aquaculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 2017/12/17 Accepted:2018/10/18)

Fusarium graminearum is one of the main zearalenone producing source *Fusarium* species that can contaminate cereals such as corn. Considering the health risks of contamination with trichothecenes-source fungi in cereals, in this study, contamination with zearalenone-producing *Fusarium* in corn samples collected from industrial and non-industrial farms in Razavi Khorasan Province was evaluated. In order to develop a simple method for detection of zearalenone, after cultur-ing these samples using pour plate technique, the isolates were purified through single-spore technique. All the *Fusarium graminearum* were identified by through PCR method using genus specific Tri5-F/R and Pks4-F/R as primers. 5 Of the 8 identified *Fusarium graminearum* isolates wich were tested with Tri5-F/R set of primers scored positive, and an amplicon with a size of 380 bp was obtained out of them which reveals their ability to produce trichothecenes. From these isolates, an amplicon of the size 280 bp was obtained after they scored positive with Pks4-F/R set of primers; which by itself shows the existence of *Fusarium graminearum* with the ability to produce zearalenone .These data indicate that, the developed PCR trend is a powerful, specific and sensitive tool to detect potential zearalenone contamination in food or feed production. Paying attention to the presence of toxigenic fungi on these corn samples, it is necessary to design some complementary investigation, decide health regulations and supervise their execution. Finally attention of public health and nutrition experts is essential too.

Keywords: Corn, Trichothecenes, Zearalenone, *Fusarium graminearum*, PCR

* Corresponding Author E-Mail Address: A_mehrzaad1984@yahoo.com