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

عطیه مهرزاد[1*]، معصومه مهربان سنگ آتش[2]، سید علی مرتضوی[3]، رویا رضائیان دلوئی[4]، محمد محسن‌زاده[5]

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
٤- 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: ۹٦/۰۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲٦)

چکیده

فوزاریوم گرامیناروم یکی از عمده‌ترین گونه‌های قارچی مولد مایکوتوکسین زرالنون 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 زرالنون 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 زرالنون، 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 زرالنون بود. یافته‌های این مطالعه نشان داد که این روش، ابزاری قدرتمند، ویژه و حساس در تشخیص آلودگی مواد غذایی به زرالنون 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، زرالنون، *فوزاریوم گرامیناروم*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

*مسئول مکاتبات: A_mehrzad1984@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

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 طوری‌که 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 ۱۹۸٤ به بعد به علت اهمیت زیادی که فرآورده‌های مختلف آن در دنیای امروز دارا می‌باشند، رشد زیادتری داشته و درحال حاضر سطح زیر کشت آن به حدود ۱٤۰ میلیون هکتار و مقدار محصول آن به حدود ٤٦۸ 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 ٦۰۰ میلیون تن و عملکرد ٤۲۹٦ 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 ٤۷۲۵۵ 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 (FAO) هرساله میلیون‌ها تن مواد غذائی در اثر آلودگی با مایکوتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ‌های انباری از بین می‌روند. به طوری‌که 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 مایکوتوکسین‌ها گزارش شده است [۲،۳،٤].

از بین تمام بیماری‌ها و آلودگی‌ها، آلودگی ذرت توسط مایکوتوکسین‌ها[1] 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،٦،۷].

در سال ۲۰۰۵، ٦۸٪ نمونه ذرت در آسیا حاوی فومونیزین B_1[2] بود در حالی‌که نمونه مثبت برای داکسی‌نیوالنول[3] ٦۷ درصد، برای زرالنون[4] ٤۰ درصد و برای آفلاتوکسین[5] ۱۹ درصد بوده است [۷]. سازمان غذا و کشاورزی تخمین زده است که بین ۲۵ تا ۵۰ درصد از محصولات کشاورزی در جهان توسط مایکوتوکسین‌ها آلوده می‌شوند. میزان خسارت و نابودی ذرت توسط آفلاتوکسین‌ها ۲۲۵ میلیون دلار در هر سال و ۹۳۲ میلیون دلار توسط همه مایکوتوکسین‌ها در آمریکا تخمین زده شده است [۵]. استرس شدید دمایی، تنش رطوبت و آسیب‌دیدگی محصول توسط حشرات مهمترین عامل رشد کپک‌ها و تولید توکسین توسط آن‌ها می‌باشد [۸]. تشکیل مایکوتوکسین 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. مایکوتوکسین‌ها در محصولات گیاهی، غذاهای فرآوری شده و غذای حیوانات اثرات اقتصادی قابل

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

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

زرالنون 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 ازجمله ذرت را آلوده می‌کند. حداقل هفت این گونه ساپروفیت شفاف و به طور عمده *فوزاریوم گرامیناروم*[6] (*جیبرلا زئا*[7]) و *فوزاریوم کالموروم*[8] از گونه های مولد این توکسین به شمار رفته و تولید کننده زرالنون و سایر متابولیت‌های آن شامل آلفا و بتا زرالنول‌ها[9] و بتا زرالانول‌ها و cis-ZEA می‌باشند [۱۲،۱۰]. در این راستا تحقیقات زیادی در دنیا به عمل آمده است به طوری‌که در ابتدا به منظور شناسایی و تشخیص *فوزاریوم گرامیناروم* در غلات، آزمون تکثیر تصادفی DNA پلی‌مورف برای شناسایی ویژگی‌های محصولات تکثیر شده فوراریوم 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 گرامینیاروم* 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.

در این بررسی استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی *فوزاریوم گرامینیاروم* مفید گزارش شد و رابطه آشکاری بین مورفولوژی و species-specific PCR در تشخیص *فوزاریوم گرامینیاروم* یافت شد [۱٤]. همچنین در سال ۲۰۰۲ نیز جهت شناسایی پتانسیل توکسین‌زایی در سویه‌های *فوزاریوم کولموروم* جدا شده از دانه‌های گندم علاوه‌بر 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 بیوسنتز تریکوستین‌ها را مورد هدف قرار داد، انجام شد[۱۷،۱٦]. برای اولین بار منگ[10] و همکاران (۲۰۱۲) موفق به طراحی روشی دقیق و سریع در تعیین فوزاریوم‌های تولیدکننده توکسین زرالنون 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

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

10. Meng

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

تشخیص آلودگی نمونه‌های ذرت به فوزرایوم‌های مولد زرالنون 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 فریزر۲۰- 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 میسیلوم، کلیه جدایه‌های فوزاریوم در محیط کشت مایع سیب‌زمینی[11] کشت داده شد. بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۱٤ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، میسلیوم 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،۱٦]، 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 برای تمامی به این منظور تست PCR برای تمامی واکنش‌ها در حجم ۲۵ ماکرولیتر با استفاده از کیت AccuPower™ PCR Premix (Bioneer) و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل لب سایکلر[12]ساخت شرکت سنسکوئیست[۱۳] 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 bp ۱۰۰ 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 زرالنون انجام شد. همچنین مقایسه آن‌ها با نمونه کنترل (نمونه استاندارد DSM 1095 و DSM 1096 *فوزاریوم گرامیناروم* تولید کننده زرالنون)، جدایه‌ها به لحاظ تولید توکسین‌های فوق مورد بررسی قرار گرفت [۱۸]. به این منظور از جفت پرایمر اختصاصی Tri5-F/R جهت جداسازی فوزاریوم‌های تولید-کننده تریکوتسین استفاده گردید و در نهایت با بکار بردن پرایمر اختصاصی Pks4-F/R گونه‌های *فوزاریوم گرامیناروم* مولد زرالنون 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، نیز طبق جدول شماره۲ انجام پذیرفت [۱۸،۱۷،۱٦].

11. Potato Dextrose Broth (PDB)

12. labcycler
13. Thermocycler Sensquest

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

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

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

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	94ºC, 3min	35	94ºC, 30s	60ºC, 30s	72ºC, 30s	72ºC, 7min
Tri5-F Tei5-R	94ºC, 5min	35	94ºC, 30s	60ºC, 45s	72ºC, 30s	72ºC, 7min

۳- نتایج

در این بررسی تعداد ۹۸ جدایه قارچی مشکوک به فوزاریوم از نمونه‌های ذرت جداسازی و به روش‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی شناسایی شد، که کلیه‌ی ۹۸ جدایه به منظور شناسایی فوزاریوم‌های تولید کننده مایکوتوکسین با استفاده از آغازگر Tri5- R و Tri5-F 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).

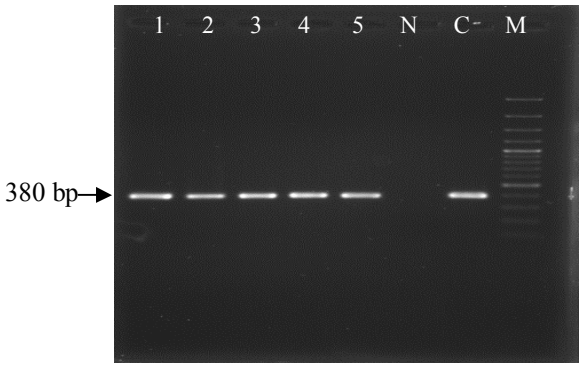

Fig 1 Agarose gel PCR products for detection of Trichotocin producing fusarium, wells: 1-5: Trichotocin producing fusarium isolates, N wells: negative control (without DNA), C: positive control, M: marker bp100

با توجه به این که *F.graminearum* و *F.culmorum* به عنوان عمده‌ترین گونه‌های مولد مایکوتوکسین زرالنون می‌باشند. در این پژوهش در نتیجه استفاده از روش‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی از بین ۹۸ جدایه فوزاریوم، ۸ جدایه *فوزاریوم گرامیناروم* شناسایی شد که به منظور جداسازی گونه‌های *فوزاریوم گرامیناروم* مولد زرالنون در واکنش با آغازگر Pks4- R1 و Pks4-F مورد ارزیابی قرار گرفتند. تکثیر باندی 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.

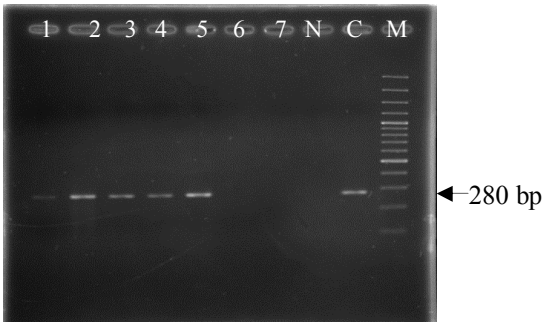

Fig 2 Agarose gel PCR products for detection of Fusarium producing zearlonone, wells: 1-5: for Zearlonon producing Fusarium isolates, 6-7 wells: *Aspergillus flavus*, *Fusarium proliferatum*, well N: negative control (without DNA), C: positive control, M: Marker bp100

٤- 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[14] (۲۰۱۲) می‌توان این گونه

14. Ben Amar et al

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

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 و Pks4-F با نتیجه حاصل از مطالعات منگ و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت کامل داشت. همچنین کلیه نمونه-های 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، تولیدکننده مایوکوتوکسین هایی از نوع تریکوتسین می‌باشند. و در نتیجه پاسخ مثبت به آغازگر Pks4- R1 و Pks4-F کلیه‌ی جدایه ها مولد تریکوتسین از نوع زرالنون می باشند. همان طور که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود، نتایج آزمون انجام شده طی واکنش PCR توسط آغازگز Pks4- R1 با DNA سایر انواع گونه‌های قارچی که به منظور بررسی اختصاصی عمل نمودن این آغارگر انجام پذیرفته بود، هیچ گونه نتیجه مبتی را نشان نداد، که این نتیجه نیز گویای حساسیت بالای این آغازگر در رابطه با شناسایی فوزاریوم‌های تولیدکننده زرالنون می‌باشد.

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**
Aspergillus flavus	ACCC 30321	−	−
Aspergillus fumigatus	ACCC 30797	−	−
Aspergillus niger	ACCC 2032	−	−
Fusarium proliferatum	DSM 840	−	−
Fusarium verticilloides	DSM 62264	−	−
Fusarium granumarum[1]	DSM 1095	+	+
Fusarium granumarum[1]	DSM 1096	+	+
Fusarium culmoreum[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

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 حمل کننده 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 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 ازوم 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 آلودگی-های قارچی در مواد غذایی، توجه به اجرای روش‌های حذف

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

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, antiaflatoxigenic 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 B_1 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 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

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

Mehrzad, 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 Aquculture, 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_mehrzad1984@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]