مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۱۲، اسفند ۱۳۹۵
صفحه:۹۶۲-۹۵۲

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.12, Feb- Mar2017
Pages:952-962

ردیابی ژن سنتزکننده توکسین نیوالنول در بذور روناس آلوده به قارچ‌های فوزاریوم با استفاده از PCR

سید محسن حسینی نژاد[۱]، مصطفی عابدی تیزکی*[۲]، سید علیرضا اسمعیل زاده حسینی[۳]، فاطمه کارگر[۴]، کمال صادقی خمارتاجی[۵]

چکیده:

مقدمه: روناس یکی از محصولات زراعی مهم است که ممکن است توسط قارچ‌های گوناگونی ازجمله قارچ‌های فوزاریوم که پتانسیل تولید مایکوتوکسین‌های مهلکی را دارند، آلوده شود. هدف از این تحقیق شناسایی مایکوتوکسین‌های تریکوتسین تولیدی توسط قارچ‌های فوزاریوم همراه بذور روناس با استفاده از روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از مناطق مختلف کشت روناس در اردکان و بافق از بذور روناس نمونه‌برداری به عمل آمد. پس از کشت و خالص‌سازی گونه‌های قارچی فوزاریوم در محیط‌های کشت اختصاصی، ردیابی قارچ‌های دارای پتانسیل تولید مایکوتوکسین تریکوتسین از جمله نیوالنول (NIV) از طریق آغازگرهای اختصاصی ژن *Tri13* با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد. جهت تایید پتانسیل تولید مایکوتوکسین NIV در گونه‌های فوزاریوم از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد.

نتایج: در این بررسی پنج گونه فوزاریوم از بذور روناس جداسازی و شناسایی شدند، که از این بین گونه‌های *F.poae* و *F. equiseti* توانایی تولید مایکوتوکسین نیوالنول را دارا بودند. وجود ژن *Tri13* در دو گونه *F. poae* و *F.equiseti* ردیابی شد که این گونه‌ها به عنوان تیپ‌های تولیدکننده NIV شناخته شدند. نتایج حاصل از HPLC نیز نشان داد که دو گونه فوزاریوم مورد بررسی، پتانسیل تولید مایکوتوکسین NIV را دارند.

نتیجه‌گیری: ژن *Tri13* در دو گونه *F. poae* و *F.equiseti* نقش مؤثری در تولید تریکوتسین نیوالنول دارد. لذا با استفاده از روش PCR می‌توان قارچ‌های دارای پتانسیل تولید مایکوتوکسین را در محصولات مختلف سریع‌تر ردیابی و شناسایی کرد.

واژه های کلیدی: روناس، بذور، فوزاریوم، نیوالنول

۱-دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی گلستان
۲،۳، ۵-بخش تحقیقات گیاه پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
۴- پزشک عمومی شبکه بهداشت و درمان ابرکوه، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
***(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۲۷۴۳۶۰۱، پست الکترونیکی:** m.abeditizaki@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۱۲ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۰**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]

مقدمه:

روناس با نام علمی *Rubiatinctorum* گیاهی است از تیره روبیاسه که از ریشه آن در صنایع رنگرزی کاربرد زیادی دارد. کشت این گیاه در اروپا و آسیا بیشتر معمول بوده و در زمان قدیم در ایران در مناطق تبریز، ارومیه، اراک، فارس و یزد کشت می‌شده است. در حال حاضر کشت و کار آن تنها در شهرستان‌های بافق و اردکان در استان یزد رایج بوده و سطح زیر کشت آن برابر ۶۸۰ هکتار است (۱).

عوامل متعددی از جمله بیماری‌های قارچی در حین کاشت، داشت و برداشت این محصول را آلوده می‌کنند که علاوه بر کاهش عملکرد محصول از کیفیت رنگ تولیدی نیز می‌کاهند (۲). بسیاری از این قارچها از جمله فوزاریوم، آسپرژیلوس و پنیسلیوم همراه با بذر بوده که علاوه بر آلوده کردن گیاه، مایکوتوکسین‌های خطرناکی تولید می‌کنند که برای سلامتی انسان و دام مضر می‌باشند (۳).

قارچ‌های فوزاریوم یکی از فراوان‌ترین قارچ هایی هستند که طی رشد و تکامل گیاهان اثرات مخرب و جبران‌ناپذیری را به آن‌ها وارد می‌سازند. این قارچها متابولیت‌های ثانوی مهلکی بنام تریکوتسین‌ها را تولید می‌کنند (۴،۳). به دلیل مصرف توکسین‌های تریکوتسین، مایکوتوکسیکوزهای شدید در انسان و حیوانات رخ می‌دهد و از علائم آن‌ها می‌توان به بی‌اشتهایی، تهوع و گرفتگی ماهیچه‌ها اشاره کرد (۱). همچنین در موارد شدید، سرطان‌های گوارشی نیز در اثر مصرف این توکسین‌ها گزارش شده است (۲). تریکوتسین‌ها به دو کلاس A و B تقسیم می‌شوند که در کلاس B توکسین‌های قارچی مهم و خطرناکی نسبت به کلاس A قرار دارند که به هریک از این مایکوتوکسین‌ها، تیپ‌های شیمیایی نیز می‌گویند. تریکوتسین‌های کلاس B دارای گروه کتو در موقعیت کربن ۸ حلقه تریکوتسین می‌باشند و به این دلیل بنام گروه ۸- کتوتریکوتسین‌ها (Keto trichothecens) نیز معروف‌اند (۵،۴). از تریکوتسین‌های نوع B می‌توان به نیوالنول (NIV: Nivaleno)، دی اکسی نیوالنول (DON: Deoxynivalenol) و مشتقات استیلی آن‌ها مانند ۴- استیل نیوالنول (4-Acetyl 4-AcNIV: Deoxy nivalenol)، ۳-استیل دی اکسی نیوالنول (3-AcDON) و ۱۵-استیل دی اکسی نیوالنول (15-AcDON) اشاره کرد (۶). ژن‌های مختلفی از خوشه ژنی مسئول سنتز تریکوتسین‌ها در قارچ‌های فوزاریوم می‌باشند. از مهم‌ترین ژن‌های سنتزکننده تریکوتسین‌های می‌توان به ژن‌های *Tri13* و *Tri7* اشاره کرد که نقش بسزایی در تولید این نوع توکسین‌ها دارند که ردیابی این ژن‌ها می‌تواند در تشخیص سریع قارچ‌های تولیدکننده مایکوتوکسین کمک شایانی بنماید (۷).

بررسی‌ها نشان داده است که تریکوتسین نیوالنول سمیت بیشتری برای انسان و دام دارد درحالی‌که تریکوتسین دی اکسی نیوالنول برای گیاه بیشتر سمی است (۵). پیشرفت تکنیک‌های مولکولی ردیابی و آنالیز تریکوتسین‌هایی مانند DON وNIV در محصولات زراعی مختلف و همچنین محصولات تولیدی برای تغذیه دام و طیور را تسهیل کرده است (۴). یکی از روش‌های مولکولی که می‌توان به تعیین تیپ‌های شیمیایی پرداخت، کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR: Polymerase chain reaction) مبتنی بر طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های سنتزکننده توکسین‌های قارچی (از جمله تریکوتسین‌ها) است که هم در کمترین زمان ممکن به ردیابی مایکوتوکسین می‌پردازد و هم هزینه‌های کمتری نسبت به روش‌های سنتی مانند روش‌های کروماتوگرافی دارد (۵). جهت ردیابی و تعیین مقادیر مایکوتوکسین‌ها از روش‌های کروماتوگرافی از جمله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی گاز مایع (GLC) و یا کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، جهت تشخیص مایکوتوکسین‌های مختلف استفاده می‌شود.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]

این تکنیک‌ها از حساسیت بسیار بالایی برخوردارند ولی با این وجود هزینه بالای مواد مصرفی و زمان بر بودن، سبب شده است تا در بعضی از موارد استفاده از این روش‌ها محدود گردد (۵).

از آنجا که مطالعات زیادی در زمینه وجود مایکوتوکسین‌های قارچی همراه بذور روناس صورت نگرفته است، لذا این تحقیق به منظور شناسایی و ردیابی مایکوتوکسین‌های تولیدی توسط قارچ‌های فوزاریوم از جمله تریکوتسین‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی صورت گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، طی سال زراعی ۹۲-۱۳۹۱ از بذور روناس در مناطق مهم کشت روناس در استان یزد از جمله اردکان نمونه‌برداری به عمل آمد و نمونه‌های آلوده داخل پاکت‌های استریل جمع آوری شده و در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه بذور با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. بعد از قرار دادن در هیپوکلریت سدیم، بذور دو مرتبه داخل آب مقطر شستشو شده و سپس با کاغذ صافی خشک گردیدند. بعد از ضدعفونی سطحی، آن‌ها داخل محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA: Potato Dextrose Agar) قرار داده شدند و برای مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردیدند. گونه‌های فوزاریو متوسط تک اسپور کردن خالص گردیده و تک اسپورها درمحیط کشت‌های PDA، آب آگار (WA: Water Agar) و برگ میخک آگار (CLA: Carnation Leaf Agar) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ده روز در سیکل ۱۲ ساعت تاریکی–روشنایی انکوباسیون شدند. لازم به ذکر است که تمامی محیط کشت‌ها از شرکت مرک خریداری گردیدند.

جهت تک اسپور کردن قارچ‌های فوزاریوم، قطعه‌ای از محیط کشت اسپوردار قارچ فوزاریوم را در لوله آزمایش محتوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و با به هم زدن آن سوسپانسیون اسپور تهیه گردید. سپس یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون را به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در داخل لوله آزمایش دیگر اضافه کرده و بعد از به همزدن و یکنواخت کردن، یک قطره از سوسپانسیون را روی یک لام گذاشته و با میکروسکوپ نوری بررسی شد و تراکم اسپور در سوسپانسیون به دست آمده مشاهده گردید. پس از تهیه سوسپانسیون، چند قطره از آن را به سطح پتری‌های حاوی محیط کشت آب ـ آگار ۲٪ منتقل و در سطح پتری پخش گردید و سپس پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت پتری‌های فوق با میکروسکوپ بررسی شدند و اسپورهای جوانه زده در شرایط استریل به پتری‌های حاوی محیط کشت PDA منتقل شدند. در نهایت گونه‌های فوزاریوم از طریق خصوصیات مرفولوژی کنیدی‌ها و شکل پرگنه‌ها توسط کلیدهای معتبر شناسایی گردیدند (۸).

به منظور تولید میسلیوم‌های انبوه قارچ‌ها برای استخراج DNA از محیط کشت مایع (PDB: Potato Dextrose Broth) استفاده شد. به این منظور قارچ‌ها به مدت یک هفته بر روی محیط کشت مایع PDB کشت داده شدند و سپس با استفاده از لوپ استریل میسلیوم‌ها جمع‌آوری شده و استخراج DNA با استفاده از تکنیک (CTAB: CetylTrimethylAmmonium Bromide) انجام گرفت (۹).

با توجه به آلوده شدن بذور به توکسین‌های تریکوتسین از جمله نیوالنول (NIV)، گونه‌های *F. equiesti* و *F.poae* به عنوان گونه‌های اصلی تولیدکننده تریکوتسین جهت تعیین تیپ‌های شیمیایی با استفاده از ردیابی ژن‌های*Tri13* انتخاب گردیدند. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتر و با استفاده از ترموسایکلر (Ependrof, Germany) انجام شد (جدول ۱). در این بررسی جفت آغازگر Tri13F/Tri13R برای تعیین تیپ‌های

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]

شیمیایی NIV در بین گونه‌های فوزاریوم مورد استفاده قرار گرفت (۷). این جفت آغازگر در گونه‌های تولیدکننده NIV تولید قطعات ۴۱۵ جفت بازی می‌کند (جدول ۲). برنامه حرارتی آغازگر Tri13F/R برای انجام واکنش PCR شامل: یک مرحله ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴°C برای آغاز واکنش PCR و سپس ۳۰ چرخه که هر چرخه شامل سه مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای۵۷°C برای ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲°C برای ۶۰ ثانیه انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C برای ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. سپس محصولات PCR به طور جداگانه بر روی ژل ۱/۲ درصد آگارز الکتروفورز شدند.

جدول ۱: میزان مواد مورد نیاز برای انجام یکواکنش زنجیره‌ای پلیمراز (حجم ۲۵µL)

اجزای واکنش PCR	غلظت مواد پایه (Stock)	غلظت نهایی
آب مقطر دو بار تقطیر	-	-
بافر PCR با ۱۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم	۱۰X	۱X
dNTP	۱۰ mM	۰/۲ mM
آغازگر Forward	۲۰ µM	۰/۴ µM
آغازگر Reverse	۲۰ µM	۰/۴µM
Taq DNA polymerase	۵ unit/µL	۰/۷۵ unit
Template DNA	۲۵ ng/µL	۲۵ ng/µL

جدول ۲: توالی آغازگر Tri13F/Tri13R

آغازگر (primer)	اندازه قطعه (bp)	توالی (sequence)
Tri13F	415	TACGTGAAACATTGTTGGC
Tri13R		GGTGTCCCAGGATCTGCG

محصولات PCR به طور جداگانه بر روی ژل ۱/۲ درصد آگارز الکتروفورز شدند. رنگ‌آمیزی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید صورت گرفت و سپس عکس‌برداری تحت نور UV در دستگاه ژل داک (Bio-RAD, USA) انجام شد.

برای تعیین نوع تریکوتسین تولیدی در گونه‌های فوزاریوم مورد نظر و ارتباط آن‌ها با ژن‌های تکثیرشده *Tri13*، با روش PCR، از ۱۲ قارچ به عنوان نماینده از گونه‌های *F. equiesti* و *F. poae* آنالیز توکسین با استفاده از دستگاه HPLC انجام گرفت.

برای آنالیز توکسین در گونه‌های مورد بررسی، ابتدا ۵۰ گرم شلتوک برنج به مدت دو ساعت خیسانده شد و سپس ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و به فاصله ۲۴ ساعت دو بار و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. سپس به هر ارلن چند قرص ۵ میلیمتری از کشت شش روزه قارچ منتقل شد و ارلن‌ها به مدت شش هفته در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این مدت

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]

شلتوک‌های آلوده در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند و سپس برنج‌های آلوده آسیاب شده و پودر حاصله به منظور استخراج توکسین مورد استفاده قرار گرفت (۱۰).

برای استخراج عصاره، ابتدا از هر نمونه ۱۰ گرم پودر آسیاب شده توزین شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال استخراج (استونیتریل ۸۴٪) به نمونه‌ها اضافه شد. برای اختلاط حلال استخراج با نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه از دستگاه بلندر با سرعت بالا استفاده گردید. پس از این اختلاط، برای صاف کردن عصاره از کاغذ صافی معمولی استفاده شد و مقدار ۸ میلی‌لیتر از این عصاره صاف شده برای تلخیص با ستون SPE: Solid Phase extraction clean- up برداشته شد.

ابتدا آماده‌سازی ستون FSPENIV با ایجاد فشار مثبت برای فشرده شدن بهتر ستون انجام گرفت. سپس ۵ میلی‌لیتر از عصاره صاف‌شده از ستون SPE (۲-۱ قطره در ثانیه یا ۳-۲ میلی‌لیتر در دقیقه) عبور داده شد. به محض ورود آخرین قسمت عصاره، ستون SPE با ۲ میلی‌لیتر از استونیتریل ۸۴٪ شستشو داده شد و سپس عصاره تخلیص شده در داخل تیوب جمع‌آوری گردید. ویال‌ها در دمای ۴۰°C (خشک/مرطوب) خشک شدند. پس از خشک کردن تیوب‌ها، ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال فاز متحرک (H_2o: MeOH= 90.5:9.5) به تیوب‌ها اضافه گردید و سپس با دستگاه ورتکس به خوبی مخلوط شدند. بعد از این مرحله در صورت لزوم عصاره‌ها با کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرومتر صاف گردیدند و در نهایت ۲۵ میکرولیتر از این عصاره تلخیص شده به دستگاه HPLC تزریق گردید (۱۱).

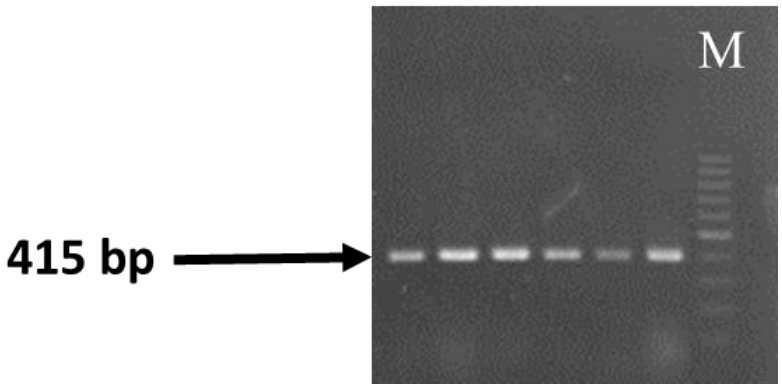
برای تعیین حضور تریکوتسین در عصاره‌ها از دستگاه HPLC (Water) با ستون C18 (طول ۱۵ سانتیمتر، قطر ذرات ۴/۵ میکرومتر) و فاز متحرک متانول-آب (۵ به ۹۵)، سرعت جریان ml/min ۰/۵ و در دمای اتاق استفاده شد. در این خصوص ردیاب U.V. با طول موج ۲۲۰ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت. از عصاره استخراج شده هر نمونه توسط لوپ تزریق با سرنگ مخصوص HPLC، ۲۵ میکرولیتر تزریق گردید و نتایج به دست آمده و اطلاعات مربوط به سطح زیر منحنی‌های نمونه و زمان ماندگاری هر یک ثبت شد. نوع تریکوتسین‌های NIV با توجه به منحنی‌های استاندارد هر یک (با غلظت ppm ۲۵) و زمان ماندگاری هر استاندارد مشخص گردید.

یافته‌ها

در این بررسی پنج گونه فوزاریوم شامل *F.solani*، *F.oxysporum*، *F. poae*، *F. semitectum* و *F. equiseti* از بذور روناس جداسازی و شناسایی شدند. از این بین، تنها گونه‌های *F. poae* و *F.equiseti* توانایی تولید تریکوتسین نیوالنول را داشتند که برای ردیابی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انتخاب شدند.

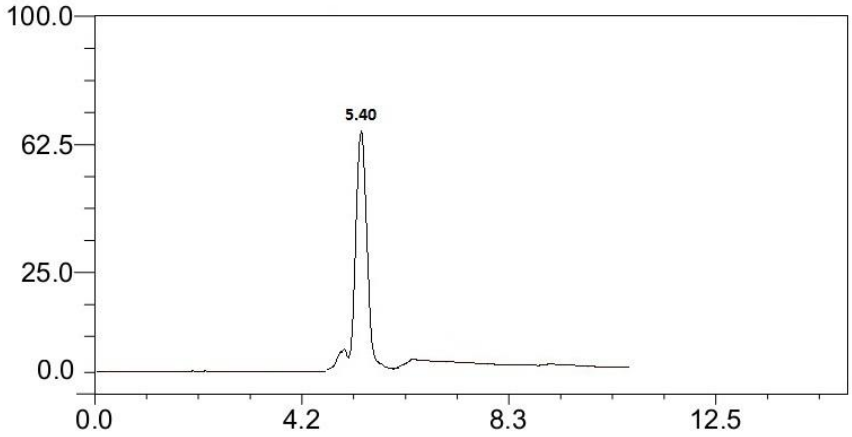
در این بررسی جفت آغازگر Tri13F/Tri13R برای ردیابی تیپ‌های شیمیایی NIV و همچنین ردیابی ژن *Tri13* در بین گونه‌های *F. poae* و *F. equiseti* استفاده شد. نتایج واکنش PCR با این آغازگر نشان داد که تیپ شیمیایی NIV در گونه‌های مورد بررسی وجود دارد. محصول PCR در گونه‌های تولیدکننده تیپ‌های شیمیاییNIV، باندهای ۴۱۵ جفت بازی بود (شکل۱). از ۳۳ نماینده این دو گونه قارچی (شامل ۲۱ گونه *F. equiseti* و ۱۲ گونه*F. poae*) بررسی‌شده با این جفت آغازگر، همگی به عنوان گونه‌های تولیدکننده NIV شناخته شدند. این نتایج نشان می‌دهدکه تیپ غالب تریکوتسین در بین جمعیت گونه‌های *F. poae* و *F.equiseti*، تیپ شیمیایی NIV است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]



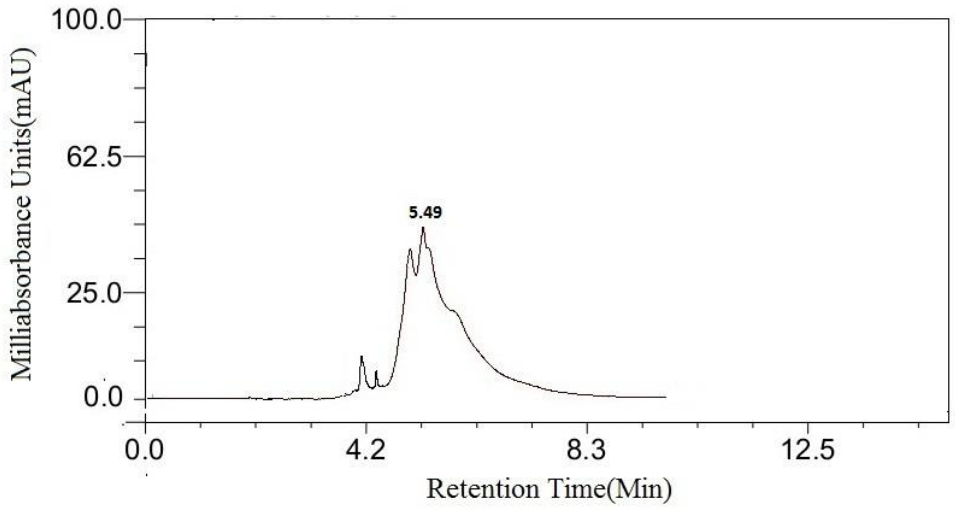
شکل ۱: باند ۴۱۵ جفت بازی حاصل از PCR با استفاده از جفت آغازگر Tri13F/Tri13R در جدایه‌های *F.poae* و *F. equiseti* جدایه‌های دارای باند ۴۱۵ جفت بازی به عنوان جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی NIV می‌باشند، M: نشانگر bp ۱۰۰ (ژل ۱/۲ درصد).

برای تأیید توانایی گونه‌ها در تولید تریکوتسین و بررسی ارتباط بین حضور ژن *Tri13* و تولید تریکوتسین از روش HPLC استفاده شد. ۱۲ نماینده قارچی از دو گونه *F. poae* و *F. equiseti* به منظور ارزیابی پتانسیل تولید تریکوتسین انتخاب شدند. نتایج به دست آمده از HPLC نشان داد که تیپ شیمیایی NIV در عصاره‌های بررسی شده وجود دارد. زمان ماندگاری برای مشاهده نقطه اوج منحنی استاندارد NIV، ۵/۴۰ دقیقه ثبت شد (نمودار ۱). در گونه‌های فوزاریوم مورد بررسی، توکسین نیوالنول با زمان ماندگاری ۵/۴۹ دقیقه ردیابی شد (نمودار ۲). نتایج به دست آمده از عصاره‌های استخراج شده توانایی تولید تریکوتسین (NIV) را در هر دو گونه *F. poae* و *F. equiseti* تأیید کرد و در واقع این نتایج با ردیابی تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین با استفاده از ردیابی ژن *Tri13*، مطابقت داشت. بنابراین این نتایج ثابت می‌کند که ژن‌های مذکور در گونه-های مورد بررسی نقش مهمی در تولید تیپ‌های شیمیایی NIV دارند.



نمودار ۱: منحنی استانداردNIV، زمان ماندگاری ۵/۴۰ دقیقه (زمان عبور از ستون ۱۵ دقیقه، جریان ml/min ۰/۵)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]



نمودار ۲: منحنی توکسین NIV ردیابی شده در دو گونه *F. poae* و *F. equiseti*، زمان ماندگاری ۵/۴۹ دقیقه (زمان عبور از ستون ۱۵ دقیقه، جریان ml/min ۰/۵)

بحث

وجود این قارچ‌های فوزاریوم در بذور روناس که توانایی تولید مایکوتوکسین‌های تریکوتسین را دارند می‌توانند به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر روی سلامتی و بهداشت مواد غذایی اثر بگذارند. یکی از متابولیت‌های تولیدی مهم در قارچ‌های فوزاریوم، مایکوتوکسین‌ها می‌باشند. بسیاری از گونه‌های فوزاریوم تولید مایکوتوکسین‌های خطرناکی می‌کنند که از طریق محصولات زراعی وارد چرخه غذایی انسان و دام می‌گردند (۱۲). گونه *F.solani* که در این بررسی نیز از بذور روناس جداسازی گردید به‌عنوان پاتوژن انسانی نیز محسوب می‌شود و بنابراین وجود چنین گونه‌ای همراه بذور روناس می‌تواند یک خطر بالقوه برای سلامت انسان و دام باشد (۸،۲).

تولید باندهای حاصل از ژن *Tri13* با نتایج محققین دیگر مطابقت داشت تکثیر این قطعه ژنی نشان‌دهنده حضور ژن*Tri13* و توانایی ژنتیکی کدکردن آنزیم calonectrin-4- oxygenase در تمام جدایه‌ها است (۷). ژن‌های سنتزکننده تریکوتسین‌ها (*Tri*) در یک خوشه یا کلاستر ژنی (حداقل ۱۰ژن) متمرکز شده‌اند که شامل: ژن‌های سنتتاز تریکوداین (*Tri5*)، اکسیژناز *P450* (*Tri11،Tri4*)، استیل ترانسفراز (*Tri7،Tri13*)، فاکتورهای نسخه‌برداری (*Tri10،Tri6*)، پمپ انتشارتوکسین (*Tri12*) و دو پروتئین فرضی ناشناخته (*Tri8، Tri9*) می‌باشند (۱۳). دیگر ژن‌های استیل ترانسفراز مانند *Tri101* در این خوشه‌ژنی به صورت ناپیوسته هستند. تریکوتسین‌ها در یک مسیر پیچیده‌ای که شامل اکسیژناسیون، ایزومراسیون و استریفیکاسیون است، سنتز می‌شوند. بر اساس تقسیم‌بندی گروه شیمیایی سسکویی‌ترپن، تریکوتسین‌ها دارای یک اسکلت مشتق شده از فارنزیل پیروفسفات می‌باشند. در مسیر بیوسنتز تریکوتسین‌ها اولین حد واسطی که مورد شناسایی قرار گرفته است، تریکوداین است که نقش مهمی در آغاز شدن مسیر سنتز تریکوتسین‌ها دارد (۷). قابل توجه است تریکوداین توسط ژن *Tri5* سنتز می‌گردد و سبب شروع چرخه تولید تریکوتسین در این قارچ‌ها می‌گردد. ژن *Tri13* از کلاستر بیوسنتز تریکوتسین مسئول تبدیل DON به NIV است و نقش تعیین‌کننده‌ای در آغاز تولید DON-

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]

NIV دارد (۱۳). این آنزیم، اکسیژن را به کربن-۴ در ساختار کالونکترین (CAL) اضافه می‌کند و این فرآیند برای سمی‌تر شدن محصولات در مراحل بعدی بیوسنتز صورت می‌گیرد (۶).

در این بررسی گونه‌های فوزاریوم جداسازی شده همگی پتانسیل تولید مایکوتوکسین را دارا هستند که اثرات مخربی بر روی رشد گیاه، تولید و کیفیت رنگ در روناس و سلامتی انسان و دام دارند. در این بین گونه‌های *F. Poae* و *F. equiseti* توانایی تولید مایکوتوکسین تریکوتسیناز جمله نیوالنول (NIV) را دارا هستند (۵). در این مطالعه همچنین برای تایید روش مولکولی ردیابی ژن‌های سنتزکننده نیوالنولاز روش بیوشیمیایی کروماتوگرافی HPLC استفاده گردید که مبین وجود مایکوتوکسین نیوالنول در بذور روناس بود.

تاکنون این نوع توکسین‌ها مکرراً در غلات مخصوصاً گندم در مناطق مختلف ایران گزارش شده‌اند. گزارش‌ها حاکی از آن است که تیپ‌های شیمیایی مختلفی از جمله NIV، DON و مشتقات استیلی دی اکسی نیوالنول از جمله 3-AcDON و 15-AcDON در گندم‌های شمال کشور وجود دارند (۱۵،۱۴). طبق آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) سالانه حدود ۲۵ درصد محصولات زراعی جهان توسط مایکوتوکسین‌های مختلف قارچی آلوده می‌شوند (۱۶). تریکوتسین‌ها در بیماری‌زایی قارچ‌های فوزاریوم در گیاهان مؤثرند و همچنین با جلوگیری از سنتز پروتئین در سلول‌های یوکاریوتیکی برای سلامتی انسان و حیوانات مضر می‌باشند (۵،۶،۳). کاهش قدرت جوانه‌زنی بذر، کاهش پروتئین دانه، تخریب گرانول‌های نشاسته و تأثیر در کیفیت دانه به دلیل مایکوتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ‌های فوزاریوم گزارش شده است (۱۷). قابل توجه است که این توکسین‌ها در دانه‌های انبارشده سال‌ها به صورت پایدار باقی می‌مانند (۱۸،۱۵)؛ بنابراین شناسایی این عوامل و توکسین تولیدی آن‌ها می‌تواند کمک شایانی به سلامتی انسان و دام و تولید فراورده‌های عاری از سموم قارچی کند (۱۹،۲۰،۲۱). همچنین در این بررسی گونه‌های مختلفی از فوزاریوم جداسازی گردید که آن‌ها نیز پتانسیل تولید مایکوتوکسین را دارند لذا باید مطالعاتی درباره وجود توکسین‌های دیگر گونه‌های فوزاریوم در بذور روناس صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

این اولین گزارش از قارچ‌های تولیدکننده تریکوتسین همراه بذور روناس است. با توجه به وجود توکسین نیوالنول در بذور روناس و سمی بودن این نوع توکسین برای انسان و دام، باید اقدامات پیشگیرانه جهت کنترل این عوامل قارچی و در نتیجه کاهش توکسین‌های تولیدی در مناطق مختلف کشت روناس صورت گیرد.

References

1- Department of Planning and Economy of Ministry of Agriculture. ***Agriculture statistics of Yazd***. Tehran: The Publications Office of Statistics and Information Technology; 2004.p.186

2- Namjouyan M, Shojaee H, Rezaee A. ***The final report of review and study of compare madder seed production and root madder and determine the best time for their harvesting in different climatic conditions of Fars state***. Scientific and industrial research organization of Iran. Industrial Research Institute of Fars 1999.

3- Charmley LL, Trenholm HL, Prelusky DA and Rosenberg A. ***Economic losses and decontamination.*** Natural Toxicology 1995; 3:199-203.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]

4- Kimura M, Tokai T, Takahashi-Ando N. ***Molecular genetic studies of Fusarium trichothecene biosynthesis; pathways, genes and evolution***. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 2007; 71: 2102-2123.

5- Lee T, Han YK, Kim KH, Yun SH, Lee YW. ***Tri13and Tri7determine deoxynivalenol-and nivalenol-producing chemotypes of Gibberellazeae.*** Applied andEnvironmental Microbiology 2002; 68: 2148-2154.

6- Brown DW, McCormick SP, Alexander NJ, Proctor RH, Desjardins AE. ***Genetic andbiochemical approach to study trichothecene diversity in Fusariumsporotrichioides and Fusariumgraminearum.*** Fungal Genetics and Biology 2001 32(2): 121-133.

7- Chandler EA, Simpson DR, Thomsett MA, Nicholson P. ***Development of PCR assays to Tri7and Tri13trichothecene biosynthetic genes and characterisation of chemotypes of Fusariumgraminearum, Fusariumculmorum and Fusariumcerealis***. Physiological and Molecular Plant Pathology. 2003; 62: 355-367.

8- Nelson P.E, Toussoun T.A, Marasa W.F.O. ***Fusarium Species: An IllustratedManual for Identification.*** University Park, P.A, Pennsylvania State University Press 1983.

9- Nicholson P, Rezanoor HN, Simpson DR, Joyce D. ***Differentiation and quantification of the cereal eyespot fungi TapesiayallundaeandTapesiaacuformisusing a PCR assay***. Plant Pathology. 1997; 46: 842-856.

10-Jennings P, Coates M E, Walsh K, TurnerJA, Nicholson P. ***Determination ofdeoxynivalenol-and nivalenol-producingchemotypes ofFusariumgraminearum isolated from wheat crops in England andWales.*** Plant Pathology 2004; 53: 643-652.

11-MacDonaldJ, ChanD, BreretonP, Damant A, Wood R. ***Determination of Deoxynivalenol in Cereals and Cereal Products by Immunoaffinity Column Chromatography with Liquid Chromatography***. Journal of AOAC International 2005; 88(4):1197-1204.

12-Waalwijk C, Kastelein P, Vries I, Kerényi Z, Lee T, Hesselink T, et al. ***Major changes in Fusarium spp. in wheat in the Netherlands***. European Journal of Plant Pathology 2003; 109: 743-754.

13-Brown DW, McCormick SP, Alexander NJ, Proctor RH, Desjardins AE. ***Inactivation of acytochrome p-450 is a determinant of trichothecene diversity in Fusarium species.*** Fungal Genetics and Biology 2002; 36: 224-233.

14-Abedi-Tizaki M, Sabbagh SK. ***Detection of 3-Acetyldeoxynivalenol, 15- Acetyldeoxynivalenol and Nivalenol-Chemotypes of Fusariumgraminearum of Iran using specific PCR assays***. Plant Knowledge Journal 2013a; 2(1): 38-42.

15-Abedi-Tizaki M, Sabbagh SK, Mazaheri –Naeini M, Sepehrikia S. ***Chemotyping of Fusariumgraminearum using Tri13 trichothecene biosynthetic gene***. Journal of Crop Protection. 2013b; 2(4): 487-500.

16-Eudes F, Comeau A, Rioux S, Collin J. ***Phytotoxicité de huitmycotoxinesassociées à lafusariose de l'épi chez le blé***. Canadian Journal of Plant Pathology 2000; 22: 286-292.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]

17-Parry DW, Jenkinson P, MacLeod L. ***Fusariumear blight (scab) in small grain cereals-areview***. Plant Pathology 1995; 44: 207-238.

18-Mirocha CJ, Abbas HK, Windels CE, Xie W. ***Variation in deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone production by Fusariumgraminearumisolates***. Applied and Environmental Microbiology 1989; 55: 1315-1316.

19-Ryu J, Ohtsubo K, Izumiyama N, Nakamura K, TanakaT, Yamamura H, et al. ***The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice***. Fundamental and Applied Toxicology 1988; 11: 38-47.

20-Jurado M, Vazquez C, Patino B , Gonzalez-Jaen MT. ***PCR detection assays for the trichothecene-producing species Fusariumgraminearum, Fusariumculmorum, Fusariumpoae,FusariumequisetiandFusariumsporotrichioides***. Systematic and Applied Microbiology 2005; 28: 562–568.

21-Desjardins AE, Manadhar HK, Plattner R.D, Maragos CM, Shrestha K,McCormick SP. ***Occurrence of Fusariumspecies and mycotoxins in Nepalesemaize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels***. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2000; 48: 1377-1383.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]

Detection of nivalenol synthesis gene in madder seeds infected by Fusarium species by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Seyyed Mohsen Hosseininejad[1], Mustafa Abedi-Tizaki[2*], Seyyed Alireza EsmailzadehHosseini[2], Fatemeh Kargar[3], Kamal Sadeghi-Khomartaji[2]

[1] Student Research Committee, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran.

[2] Plant Protection Research Department, Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yazd, Iran.

[3] General Practitioner, Abarkuh Health Network, ShahidSadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Received: 3 Dec 2015 **Accepted:** 10 Dec 2016

Abstract

Introduction: The madder is one of the most important crops. This product maybe infected by Fusarium species that produces potentially fatal mycotoxins. The purpose of this current research was to identify trichothecene mycotoxins produced by Fusarium fungi associated with madder seeds using molecular and biochemical methods.

Methods: From different regions of Ardekan and Bafgh, sampling from madder seeds was done. Culture and purification of Fusarium isolates were taken place in specific media. Detection of fungi with the ability to produce trichothecenes mycotoxins such as nivalenol (NIV) through gene-specific primers for *Tri13* by the polymerase chain reaction method (PCR) was performed. To confirm the NIV production potential, high performance liquid chromatography (HPLC) was applied.

Results:In this study, five Fusarium species were identified from madder seeds. The results showed that among Fusarium species isolated from madder seeds, from which *F. poae* and *F. equiseti* had the ability to produce NIV. The gene involved in NIV synthesis, *Tri13*, was detected in two species, *F. poae* and *F. equiseti*, so that all these isolates were identified as NIV producing type. The HPLC performance showed that all studied Fusarium species had the potential to produce NIV mycotoxin.

Conclusion: *Tri13* gene, in *F. poae* and *F. equiseti*, has a crucial role in trichothecene production. Thus, the PCR method can be used in various detections of mycotoxin-producing fungi, which have the potential mycotoxin production.

Keywords: Madder, Seeds, Fusarium, Mycotoxin

This paper should be cited as:
HosseininejadSM,Abedi-Tizaki M, EsmailzadehHosseiniSA, Kargar F, Sadeghi-KhomartajiK.**Detection of nivalenol synthesis gene in madder seeds infected by Fusarium species by PCR** J ShahidSadoughiUniv Med Sci 2017; 24(12):952-962

***Corresponding author: Tel:09132743601, email:m.abeditizaki@gmail.com**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-11-24]