Iranian Journal of Military Medicine
Vol. 14, No. 1, Spring 2012
Pages: 49-55

مجله طب نظامی
دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱
صفحات: ۵۵-۴۹

شناسایی و ردیابی ژن *Tri16* در فوزاریوم‌های مولد و غیرمولد سم T-2 به‌روش PCR

محمدعلی علیخانی[۱] *MSc*، رضا کچوئی[*] *PhD*، ناصر صفایی[۲] *PhD*، رضا گل‌محمدی[۱] *BSc*

[*]مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۱]مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۲]گروه بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: سم T-۲ سمی‌ترین تریکوتسن است و اغلب توسط *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* تولید می‌شود. این مایکوتوکسین محصولات کشاورزی و به‌ویژه غلات را آلوده نموده و می‌تواند سبب بیماری‌های شدید و حتی مرگ در انسان شود. در مسیر بیوسنتز سم T-۲ ژن *Tri ۱۶*، اسیل‌ترانسفرازی را کد می‌کند که تشکیل گروه جانبی استر را در کربن شماره ۸ کاتالیز می‌کند. هدف اصلی این مطالعه، طراحی روش مولکولی براساس ژن *Tri ۱۶* به‌منظور شناسایی فوزاریوم‌های مولد سم T-۲ بود.

روش‌ها: در این مطالعه از نوع تجربی تعداد ۱۱۱ سویه فوزاریوم (شامل ۲۲ سویه استاندارد و ۸۹ ایزوله فوزاریوم) مورد بررسی قرار گرفت. پس از خالص‌سازی سویه‌ها و تهیه کشت انبوه در محیط پُتیتودِکستروزبراث (PDB)، استخراج DNA آنها با استفاده از نیتروژن مایع و با کمک بافرهای لیزکننده و محلول‌های فنل- کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل (PCI) صورت گرفت. با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده و انتخابی براساس ژن *Tri ۱۶* و بهینه‌نمودن PCR این ژن در تمام سویه‌های مولد و غیرمولد سم T-۲ ردیابی شد.

یافته‌ها: تمام ایزوله‌های فوزاریوم مولد سم T-۲ شامل ۴ ایزوله *فوزاریوم اسپوروتریکوئیدس*، یک گونه *فوزاریوم پوئه* و یک گونه *فوزاریوم لانگستیه* محتوی قطعه ژن *Tri ۱۶* (۱۳۸۰ جفت باز) بودند.

نتیجه‌گیری: با پروتکل مولکولی طراحی‌شده براساس ژن Tri۱۶، می‌توان گونه‌های مهم مولد سم T-۲ مانند *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* و *فوزاریوم لانگستیه* را شناسایی کرد. همچنین می‌توان گونه‌هایی از فوزاریوم که به‌طور ضعیف مولد T-۲ هستند را نیز شناسایی نمود.

کلیدواژه‌ها: فوزاریوم، مایکوتوکسین T-۲، تریکوتسن، ژن *Tri ۱۶*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

Detection and tracing of *Tri16* gene in T-2 toxigenic and nontoxigenic *Fusarium* species by PCR

Alikhani M. A.[1] *MSc*, Kachuei R.[*] *PhD*, Safaei N.[2] *PhD*, Golmohammadi R.[1] *BSc*

[*]Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: T-2 mycotoxin is the most toxic trichothecene produced by Fusarium species especially *Fusarium sporotrichioides*. This species is the contaminant of cereal grains that can cause severe diseases among humans and animals and it may lead to death. *Tri16* gene encodes an acyltransferase that catalyzes the formation of ester side groups at C-8 in biosynthesis pathway of T-2 toxin. The aim of the present study was to design a molecular method for identification of *Fusarium* species based on *Tri16* gene, capable of producing T-2 toxin.

Methods: In this experimental study, the DNA of 111 T-2 producing and nonproducing Fusarium strains (including 89 *Fusarium* isolates and 22 standard *Fusarium spp.*) were evaluated. After purifying the strains and preparing the cultures in Potato Dextrose Broth (PDB), the DNA was extracted using liquid Nitrogen and lysing buffers and by Phenol, Chloroform and Isoamyl alcohol (PCI) solutions. The gene was detected in all T-2 producing and nonproducing strains using the designed and selected primers based on *Tri16* gene and PCR optimization.

Results: All T-2 toxin producing *Fusarium* strains including *Fusarium sporotrichioides* (4 species), *Fusarium langsethiae* (1 species) and *Fusarium Poae* (1 species) contained the Tri16 gene fragment (1380 bp).

Conclusion: Important T-2 toxin producing species such as *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* could be identified with the designed molecular protocol designed based on Tri16 gene. In addition, weakly T-2 producing species can be identified with this method.

Keywords: *Fusarium*, T-2 Mycotoxin, Trichothecene, *Tri16*, Polymerase Chain Reaction (PCR)

نویسنده مسئول: رضا کچوئی. تمام درخواست‌ها باید به نشانی kachueir@gmail.com فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۹۰/۵/۲۳ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۱/۸

مقدمه

تریکوتسن‌ها از نظر تنوع و گستردگی، مهم‌ترین گروه از مایکوتوکسین‌ها هستند، به‌طوری که بیش از ۱۵۰ نوع تریکوتسن شناسایی شده است [۱، ۲]. سم T-۲ یک تریکوتسن با سمیت بسیار بالاست که سمیت آن ۱۰برابر سمیت دی‌اکسی‌نیوالنول (DON) است. این توکسین ۱۰۰بار بیشتر از خردل پوست را تحت تاثیر قرار می‌دهد. همچنین مقاوم به حرارت بوده و به‌آسانی در اثر اتوکلاو از بین نمی‌رود [۱، ۳].

این مایکوتوکسین که به‌دلیل داشتن اثر سایتوتوکسیتی و سرکوب‌کنندگی سیستم ایمنی برای سلامت انسان و حیوانات مضر است، از دو جنبه اصلی اهمیت دارد:

۱- آلوده‌کننده محصولات کشاورزی به‌ویژه غلات بوده و به‌عنوان مشکل جدی بهداشت مواد غذایی مطرح است و موجب مسمومیت شدید به‌صورت حاد یا مزمن در انسان و حیوانات اهلی می‌شود و حتی ممکن است منجر به مرگ شود، به‌طوری که اپیدمی‌های متعدد آن در انسان و حیوانات گزارش شده و جان هزاران نفر را گرفته است [۲، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹]. این سم، طیفی از علایم بالینی را در بیمار مسموم ایجاد می‌کند که مهم‌ترین آن الوکیای سمی گوارشی (ATA) است. این بیماری در انسان، بسیار وخیم و حاد و در اکثر موارد کشنده است. مهم‌ترین علایم این بیماری شامل لکوپنی شدید، خونریزی‌های متعدد زیرپوستی، ضایعات نکروتیک، تحلیل و تخلیه مغز استخوان، نکروز پوستی، آلودگی خون به توکسین و علایم گوارشی اعم از تهوع، استفراغ، درد شکم، اسهال و غیره است [۹].

۲- این سم به‌عنوان عامل و سلاح بیولوژیک مطرح است. گزارشات مستندی مبنی بر استفاده از این عامل به‌صورت سلاح بیولوژیک (باران زرد) توسط شوروی سابق طی سال‌های ۱۹۷۴ تا ۱۹۸۱ در لائوس، کامبوج و افغانستان و دیگر جنگ‌ها مانند جنگ ایالات متحده و ویتنام وجود دارد که باعث توجه بین‌المللی شده است. گزارشات تاییدنشده‌ای نیز در استفاده از این سم در جنگ تحمیلی ایران و عراق و دیگر جنگ‌ها وجود دارد که حایز اهمیت است [۳، ۱۰].

گونه‌های فوزاریوم به‌دلیل اهمیتشان در پزشکی، بهداشت و کشاورزی از مهم‌ترین گروه‌های قارچی محسوب می‌شوند. آنها طیفی از مایکوتوکسین‌ها را تولید می‌کنند که سبب آلودگی مواد غذایی می‌شوند [۱۱]. *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* مهم‌ترین گونه فوزاریوم مولد تریکوتسن‌های گروه A به‌ویژه سم T-۲ است [۱۱]. *فوزاریوم لانگستیه*، دیگر گونه مهم مولد سم T-۲ است که طی سال‌های اخیر از شمال، مرکز و شرق اروپا گزارش شده است [۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶]. ایزوله آتیپیک *فوزاریوم لانگستیه* نیز اخیراً از ایران معرفی شده است [۱۷، ۱۸]. این مایکوتوکسین به‌ندرت توسط دیگر گونه‌های فوزاریوم گزارش شده است. از جمله این گونه‌ها *فوزاریوم پوئه* است که به‌طور ضعیف مولد سم T-۲ است [۱۱، ۱۹].

شناسایی گونه‌های فوزاریوم همیشه برای قارچ‌شناسان مشکل بوده است. روش‌های معمول که برای تشخیص و شناسایی فوزاریوم‌ها به‌کار می‌رود، براساس خصوصیات مورفولوژیکی قارچ (چه از نظر شکل کلنی روی محیط‌های کشت آگاردار و چه از جهت خصوصیات میکروسکوپی اعم از شکل و اندازه ماکروکونیدی و وجود یا عدم وجود میکروکونیدی و کلامیدوسپورها) است که نیاز به صرف زمان، زحمت زیاد و نیروی متخصص دارد و قارچ‌شناسان اغلب برای تشخیص گونه‌هایی که مورفولوژی مشابه دارند با مشکلاتی مواجه هستند [۱۱]. همچنین شناسایی مورفولوژیکی گونه‌های مولد توکسین، کاری بسیار سخت و احتمالاً نشدنی است. از طرفی در حال حاضر برای شناسایی این سم روش‌های مختلفی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش‌های بیوشیمیایی مانند کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC)، گازکروماتوگرافی (GC-MS، GC-FID)، روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC)، HPLC-MS و بیواَسِی (الایزا) اشاره کرد که نیاز به تکنیک‌ها، تجهیزات و امکانات هزینه‌بر و وقت‌گیر دارد [۳، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶].

استفاده از روشی که بتواند قارچ توکسین‌زا را سریعاً شناسایی نماید، اهمیت بسزایی دارد. روش‌های مولکولی مثل PCR روش‌های حساس، سریع، دقیق و مطمئن در تشخیص گونه هستند [۲۷]. روش‌های مولکولی، از جهات مختلفی مانند شناسایی فوزاریوم‌های توکسین‌زا، شناسایی فوزاریوم‌های عامل پاتوژن گیاه یا سیستماتیک قارچی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۲۸، ۲۹].

ژن‌های مسیر بیوسنتز تریکوتسن‌ها در فوزاریوم‌ها مشابه بسیاری از ژن‌های مسیر بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها و دیگر توکسین‌ها، خوشه ژنی را تشکیل می‌دهند که این خوشه ژنی در حال شناسایی است. در این خصوص و به‌ویژه در مورد مسیر بیوسنتز T-۲ در *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس*، مطالعاتی به‌طور گسترده صورت گرفته است و ژن‌های متعددی شامل *Tri۵*، *Tri۴*، *Tri۶*، *Tri۱۱*، *Tri۱۲*، *Tri۱۵*، *Tri۱۰۱*، *Tri۳* و غیره که هر کدام مسئول سنتز گروه عامل یا تنظیم‌کننده در ساختمان سم T-۲ هستند، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱۱، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴]. در مسیر بیوسنتز سم T-۲، ژن *Tri۱۶* اسیل‌ترانسفرازی را کد می‌کند که موجب استریفیه‌شدن کربن شماره ۸ ساختمان تریکوتسنی می‌شود که وجود آن در ساختار T-۲ ضروری است [۳۵].

هدف از مطالعه حاضر، طراحی روش مولکولی (PCR) براساس ژن *Tri۱۶* به منظور شناسایی فوزاریوم‌های مولد سم T-۲ بود.

روش‌ها

سویه‌های مورد استفاده: تعداد ۱۱۱ سویه فوزاریوم مولد و غیرمولد سم T-۲ (شامل ۲۲ سویه استاندارد و ۸۹ ایزوله) مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌های مورد مطالعه از غلات مناطق مختلف ایران در مطالعات قبلی جدا شده بود [۱۷]. سویه‌های مولد سم T-۲ که در مطالعات قبلی (کچویی و همکاران، داده‌های منتشرنشده) مورد

آنالیز قرار گرفته بودند، شامل سویه‌های *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* (۴ سویه)، گونه آتیپیک *فوزاریوم لانگستیه* (یک ایزوله) و *فوزاریوم پوئه* (یک سویه) بودند (جدول ۱).

جدول ۱) سویه‌ها و ایزوله‌های مولد سم T-۲

ردیف	نام گونه	محل جداسازی
۱	*فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس (BBA 10329)*	آلمان
۲	*فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس (VTT D-72014)*	فنلاند
۳	*فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس (MCR 4333)*	آفریقای جنوبی
۴	*فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس (MCR 0043)*	آفریقای جنوبی
۵	*فوزاریوم لانگستیه (ایزوله آتیپیک)*	ایران
۶	*فوزاریوم پوئه (MCR 8486)*	آفریقای جنوبی

لازم به ذکر است که گونه *فوزاریوم لانگستیه* مورد استفاده، از نظر مورفولوژی و توالی ژن *ITS* مشابه *فوزاریوم لانگستیه* بود، اما از نظر توالی قطعه ژن *EF1α* مشابه *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* بود، به همین دلیل در مورد آن لفظ آتیپیک به‌کار برده شده است.

شناسایی گونه‌ها: سویه‌های مورد بررسی به‌روش مورفولوژی و مولکولی در مطالعات قبلی مورد شناسایی قرار گرفته بودند [۱۷].

روش استخراج DNA: استخراج DNA به‌روش فنل- کلروفرم مطابق با روش *چوئی* و همکاران [۳۶] و *رضایی* و همکاران [۳۷] البته با کمی تغییر انجام شد که به‌طور خلاصه به این صورت بود؛ ابتدا از فوزاریوم در محیط کشت پتیتودِکستروزبراث (PDB) به‌مدت ۴ تا ۶ روز کشت انبوه تهیه شد و سپس با بافر PBS شستشو داده شد. بعد از آن، میسلیوم قارچ توسط نیتروژن مایع، فریز و پودر شد و سوسپانسیونی از میسلیوم پودرشده با بافر لیزکننده DNA تهیه شد. سپس به آن پروتئیناز k و SDS ۱۰٪ افزوده شد و در بن‌ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد، فنل- کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل (PCI) به‌ترتیب به نسبت ۱:۲۴:۲۵ و همچنین کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل (CI) به نسبت ۱:۲۴ افزوده شد و سانتریفیوژ ۱۲هزار دور بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت و محلول رویی جدا شد. سپس محلول استات‌سدیم ۳ مولار (به‌میزان ۳ میکرولیتر) و الکل مطلق سرد افزوده شد و به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. بعد از آن، اتانول ۷۰٪ (به‌میزان ۲۰۰ میکرولیتر) اضافه شد و DNA رسوب‌نموده در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. در مرحله آخر نیز DNA روی ژل آگاروز ۱٪ برده شد و با رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید، DNA روی ژل مشاهده شد.

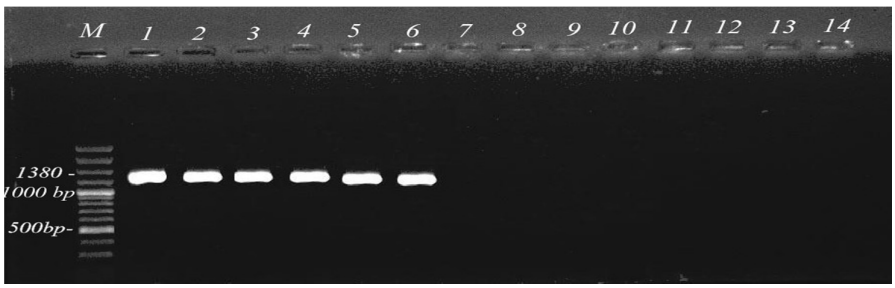
PCR و تعیین توالی: واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (محتوی بافر، dNTP، آنزیم Taq DNA polymerase و $MgCl_2$)، ۰/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای طراحی‌شده و انتخابی Tri۱۶F و Tri۱۶R مطابق جدول ۲ [۳۵] و ۹ میکرولیتر آب مقطر تزریقی بود.

نحوه انجام PCR: واسرشت ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ دور از واسرشت (۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال (۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه) و گسترش (۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و ۲۰ ثانیه) و در ادامه، گسترش نهائی (۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه) انجام شد. به‌منظور پیداکردن بهترین دمای اتصال، PCR به‌صورت گرادیانت از ۵۵ درجه سانتی‌گراد تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد و نتیجتاً دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد.

جدول ۲) توالی پرایمرهای Tri۱۶F و Tri۱۶R

پرایمر	توالی
Tri۱۶F	5'-GCCCTTTCTAGATGCCTGAG-3'
Tri۱۶R	5'-TTGGTTGCCTCCGTCTTGG-3'

مطابق با واکنش و نحوه انجام PCR، قطعه ژن Tri۱۶ در تمام ایزوله‌ها و سویه‌های استاندارد فوزاریوم ردیابی شد. سپس محصول PCR به‌دست‌آمده (تقریباً ۱۳۸۰ جفت باز) در مورد گونه‌های *فوزاریوم پوئه* (MCR 8486) و *فوزاریوم لانگستیه* (آتیپیک) از روی ژل، استخراج و تعیین توالی شد. توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار Mega 5 و روش دستی در کنار رکوردهای ثبت‌شده در بانک اطلاعات ژنی (NCBI) در خصوص ژن *Tri۱۶* مربوط به *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس*، همردیف شدند.



شکل ۱) ردیابی قطعه ژن *Tri۱۶* (۱۳۸۰ جفت باز) در تعدادی از سویه‌های استاندارد و ایزوله‌های فوزاریوم مورد بررسی. M: مارکر. چاهک ۱ تا ۴: *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* به‌ترتیب BBA 10329، VTT D-72014، MCR 4333 و MCR 0043. چاهک ۵: *فوزاریوم پوئه* MCR 8486. چاهک ۶: ایزوله *فوزاریوم لانگستیه آتیپیک*. چاهک ۷: *فوزاریوم پوئه* MCR 8485. چاهک ۸ تا ۱۱: *فوزاریوم گرامینه آروم* به‌ترتیب MCR 4712، MCR 6010 و ایزوله‌ها. چاهک ۱۲: *فوزاریوم پرولیفراتوم* MCR 8549، چاهک ۱۳: *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* MCR 8560. چاهک ۱۴: کنترل منفی.

جدول ۳) توالی بخشی از ژن *Tri ۱۶* (۱۳۸۰ جفت باز) حاصل از *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* گرفته‌شده از بانک ژنی به شماره دسترسی AY187275 (بالا)، *فوزاریوم پوئه* MCR 8486 (وسط) و *فوزاریوم لانگستیه آتیپیک* (پایین)

گونه فوزاریوم	توالی ژن Tri۱۶
فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس به شماره دسترسی AY187275	ATGGCCCTTTCTAGATGCCTGAGAACTAGAACAGCGTTCCTCTCTCCCCTTGACCAATTAAACTCT TCATTTTACATTCGCTGGTCCTTAGTGTTACATGCCAAGGATCGTGACAAAGCTGTCAATCGCCTG TCGAAAGGGTTAAATGCTGTTACATCAAAGCTGCCATTCCTCAAAGGGCGAATCAACTACCATAC GGACACCGCCAACAACAAGATAGCCTCTGCTTCACGGGCTGTTATTTCCATGTCAGACGATAGTCC GAATCTATCATTACGAGAACTACGCCCAGCAAAGGAACTACCCAGCTTAGCAAGGATCAAGCAAC AGGGTGCACCATCCCACCTTTTCACAGACGATCTATACTCGTTGCCTATCTTTATAGATACCACAT CGAAGCAATCTCACCCAGTATTAAAAACAACCTATGCTCCTATCGAGGGAGGCCTGATACTTAAC ATATGCGTTCACCATGGTGTTATGGACGGCCAAGGACTTGCGACGTTGACTGATCTATGGGCCTCG TTCACCCGTCAGCAAGACCAAAACGAAAACGAGGTGCAGCAGCCGAAGAACCTTCCCGATCCCGA TGAGCCTCTTACACGAACGGCCAGACTTGCTACAGCTATAAATGCCACAGCAGACCCTGAGATTA CCGATATCGAAACAAGTCTCCAGCGTTATCGAAACGATAGGATACTCGAACAAAACATCGCTGCA TCGACAGGGGACAGCAGGAAAAAGACAAGCAGGATATTCGCATTTTCAAGCAACAAGCTCAAGG ACGCGAAAGAAGTTTTGGCAAATAACGGCTGCCATGTCACGACAAACTCGATCTTAAATGCTGCG GTCTGGTCTAATCTTACACGTGTACGTCTATCACGCCGGACGCAGCTGCCACCAACACCATTCGCG CGATTTACCCAAATGGTAGATGGTAGACGACAATTACTTCCAAAAATCAACAAGCCGGGGCCTTA TATGGGTAATGTCGTGCTTACATCGTCGGCTGATGTTTCACTTGATACATTGGTGGCGACTGGCTTT TTCAACTATCTGTCAGTCTCTCTGATGGCCCCAGTAGCGCAGGCCATATACGATGCATCAAGAAAA GTTACTACGGAATACATTGATGGCTTCTTGAAAACCCTGCAAAAAGTAGATGACCCCGCAAGCCT CGGCATAGGGAGTATGAGTCAGCATGGGGTCGACTTCATTTCAACAAGTGTTGCAAATGCACCAT TCTACGAATGTGACTTTGGGCCATCGCTTAGCGAAGATTCTGCTGGCGGAAAGGAGGGCAAGCCA GTCTTTGTGCGGTATCCGTATATTGATTGGGCCGATGGCAACATGATATTGCTGCCAAGACGGAGG CAACCAACTGAAAACGATGAGACCATTGAAGCATATATTATGTTAGCAGAGGATGATTTGGTAGC TTTGGCGGAGGATCCTGGGTTTTGTAGTTGGCTGAAAGAGTAA
فوزاریوم پوئه MCR 8486	TGACNATTNAACTCTTCATTTTACATTCGCTGGTCCTTGGTGTTACACGCCAAGGATCGTGACAAA GCTGTCAATCGCCTATCGAAAGGGTTAAATGCTGTTACATCAACGCTGCCATTCCTCAAAGGGCGA ATCAACTACCATACGGACAACGCCAACAACAAGATAGCCTCTGCTTCACGGGCTGTTATTTCCATG TCAGACGATAGTCCGAATCTATCATTACGAGAACTACGCCCAGCAAAGGAACTACCCAGCCTAGC AAGGATCAAGCAACAGGGTGCACCATCCCACCTTTTCACAGACGATCTATACTCGTTGCCTATCTT TATAGATACCACATCGAAGCAATCTCACCCAGTATTAAAAACAACCTATGCTCCTATCGAGGGAG GCCTGATACTCAACATATGCGTTCACCATGGTGTTATGGACGGCCAAGGACTTGCGACGTTGACTG ATCTATGGGCCTCGTTCACCCGTCAGCAAGACCAAAACGAAAACGAGGTGCAGCAGCCGAAGAA CCTTCCCGATCCCGATGAGCCTCTTACACGAACGGCCAGACTTGCTACAGCTATAAATGCCACAGC AGACCCTGAGATTACCGATATCGAAACAAGTCTCCAGCGTTATCGAAACGATAGGATACTCGAAC AAAACATCGCTGCATCGACAGGGGACAGCAGGAAAAAGACAAGCAGGATATTCGCATTTTCAAG CAACAAGCTCAAGGACGCGAAAGAAGTTTTGGCAAATAACGGCTGCCATGTCACGACAAACTCGA TCTTAAATGCTGCGGTCTGGTCTAATCTTACACGTGTACGTCTATCACGCCGGACACAGCTACCAC CAACACCATTCGCGAGATTTACCCAAATGGTAGATGGTAGACGACAATTACTTCCAAAAATCAAC AAGCCCGGGGCCCTTATATGGGTAATGTCGTGCTTACATCGTCGGCTGATGTTTCACTTGATACAT TGGTGGCGACTGGCTTTTTCAACTATCTGTCAGTCTCTCTGATGGCCCCAGTAGCGCAGGCCATAT ACGATGCATCCANAAAAGTTACTACGNATACATTGATGGCTTCTTGAAAACCCTGCGAAAAGTAG ATGACCCCGCAAGCCTTGGCATAGGGAGTATGAGCCAGCATGGGGTCGACTTCATTTCAACAAGT GTTGCAAATGCACCATTC
فوزاریوم لانگستیه آتیپیک	TTGACNATTAAACTCTTCATTTTACATTCGCTGGTCCTTGGTGTTACACGCCAAGGATCGTGACAA AGCTGTCAATCGCCTGTCGAAAGGGTTAAATGCTGTTACATCAAAGCTACCATTCCTCAAAGGGC GAATCAACTACCATACGGACAACGCCAACAACAAGATAGCCTCTGCTTCACGGGCTGTTATTTCC ATGTCAGACGATAGTCCGAATGTATCATTACGAGAACTACGCCCAGCAAAGGAATTACCCAGCCT AGCAAGGATCAAGCAACAGGGTGCACCATCCCACCTTTTCACAGACGATCTATACTCGTTGCCTAT CTTTATAGATACCACATCGAAGCAATCTCACCCAGTATTAAAAACAACCTATGCTCCTATCGAGGG AGGCCTGATACTCAACATATGCGTTCACCATGGTGTTATGGACGGCCAAGGACTTGCGACGTTGA CTGATCTATGGGCCTCGTTCACCCGTCAGCAAGACCAAAACGAAAACGAGGTGCAGCAGCCGAAG AACCTTCCCGATCCCGATGAGCCTCTTACACGAACGGCCAGACTTGCTACAGCTATAAATGCCACA GCAGACCCTGAGATTACCGATATCGAAACAAGTCTCCAGCGTTATCGAAACGATAGGATACTCGA ACAAAACATCGCTGCATCGACAGGGGACAGCAGGAAAAAGACAAGCAGGATATTCGCATTTTCA AGCAACAAGCTCAAGGACGCGAAAGAAGTTTTGGCAAATAACGGCTGCCATGTCACGACAAACTC GATCTTAAATGCTGCGGTCTGGTCTAATCTTACACGTGTACGTCTATCACGCCGGACACAGCTACC ACCAACACCATTCGCGAGATTTACCCAAATGGTAGATGGTAGACGACAATTACTTCCAAAAATCA ACAAGCCCGGGGCCTTATATGGGTAATGTCGTGCTTACATCGTCGGCTGATGTTTCACTTGATACA TTGGTGGCGACTGGCTTTTTCAACTATCTGTCAGTCTCTCTGATGGCCCCAGTAGCGCAGGCCATA TACGATGCATCAAGAAAAGTTACTACGGAATACATTGATGGCTTCTTGAAAACCCTGCGAAAAGT AGATGACCCCGCAAGCCTTGGCATAGGGAGTATGAGCCAGCATGGGGTCGACTTCATTTCAACAA GTGTTGCAAATGCACCATTCTACGAATGTGACTTTGGGCCATCGCTTAGCGAAGATTCTGCTAGCG GAAAGGAGGGCAAGCCAGTCTTTGTGCGGTATCCGTATATG

نتایج

شکل ۱، ردیابی قطعه ژن *Tri ۱۶* (تقریباً ۱۳۸۰ جفت باز) را در تعدادی از سویه‌های استاندارد و ایزوله‌های فوزاریوم مورد مطالعه نشان می‌دهد. از تعداد ۸۹ ایزوله فوزاریوم فقط *فوزاریوم لانگستیه آتیپیک* واجد قطعه ژن *Tri ۱۶* بود. از ۲۲ سویه استاندارد، ۵ سویه شامل ۴ سویه *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* و یک سویه *فوزاریوم پوئه* واجد ژن *Tri ۱۶* بودند که سم T-۲ تولید می‌کردند.

توالی قطعه ژن *Tri ۱۶* مربوط به *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس*، گرفته‌شده از بانک ژنی به شماره دسترسی AY187275، همچنین نتیجه توالی قطعه ژن *Tri ۱۶* مربوط به ایزوله *فوزاریوم لانگستیه آتیپیک* و سویه *فوزاریوم پوئه* (MCR 8486) در جدول ۳ آورده شده است.

بحث

در این مطالعه، پرایمرهای انتخابی و طراحی‌شده علاوه بر این‌که توانستند قطعه ژن *Tri ۱۶* را در ۴ گونه استاندارد *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* ردیابی کنند، همچنین توانستند در گونه آتیپیک *فوزاریوم لانگستیه* نیز ژن *Tri ۱۶* را شناسایی نمایند. این ایزوله، گونه‌ای از فوزاریوم بود که در مطالعات قبلی از غلات انباری شهرستان رباط‌کریم استان تهران جدا شده بود [۱۸] و مولد سم T-۲ بود. در حقیقت، پرایمرهای مورد استفاده توانستند گونه‌های مهم مولد سم T-۲ را ردیابی نمایند. *کچویی* و همکاران [۳۸] نیز با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده براساس ژن *Tri ۳* توانستند گونه‌های مهم مولد سم T-۲ را شناسایی و ردیابی نمایند. در این بررسی، تمامی فوزاریوم‌های مولد سم T-۲ واجد قطعه ژن *Tri ۱۶* و فوزاریوم‌های غیرمولد فاقد قطعه ژن *Tri ۱۶* بودند. عدم وجود قطعه ژن *Tri ۱۶* در *فوزاریوم پوئه* (MCR 8485) که مولد سم T-۲ نیست و وجود این ژن در گونه *فوزاریوم پوئه* (MCR 8486) که مولد سم T-۲ به‌طور ضعیف است، معرف این مطلب است که پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه توانستند علاوه بر گونه‌های مهم مولد سم T-۲، گونه‌های با تولید ضعیف سم T-۲ را نیز شناسایی نمایند. پرایمرهای طراحی‌شده براساس ژن *Tri ۳* توسط *کچوئی* و همکاران [۳۸] نتوانستند گونه‌های با تولید ضعیف را شناسایی نمایند و مطالعه حاضر از این جهت به بررسی قبلی برتری دارد. *فوزاریوم پوئه* گونه‌ای است که به‌ندرت مولد سم T-۲ است. در بررسی *پترسون* و همکاران در سال ۱۹۹۵ روی ۷۴ ایزوله *فوزاریوم پوئه* جداشده از ۱۰ کشور از نظر تولید سم T-۲، فقط یک ایزوله از هلند و ۲ ایزوله از دانمارک قادر به تولید سم T-۲ بودند [۳۹]. در مطالعه دیگر در سال ۱۹۹۸ روی ۲۲ ایزوله از نروژ، هیچ‌کدام از ایزوله‌های *فوزاریوم پوئه* قادر به تولید سم T-۲ نبودند [۴۰]. همچنین ۱۲ ایزوله *فوزاریوم پوئه* تحت بررسی *تورپ* و *لانگستِ* در سال ۱۹۹۹، سم T-۲ را تولید نمی‌کردند [۲۳].

در مطالعه دیگر که توسط *ماراسس* و همکاران روی دو ایزوله *فوزاریوم پوئه* روی ذرت انجام گرفت، نشان داده شد که این ایزوله‌ها به‌میزان کمی مولد سم T-۲ هستند [۴۱].

بررسی‌ها نشان می‌دهد که فقط یک مطالعه، مشابه مطالعه حاضر روی ژن *Tri ۳* توسط *کچوئی* و همکاران [۳۸] صورت گرفته است که در بالا به آن اشاره شد. مطالعات دیگر روی دیگر ژن‌های مسیر بیوسنتز تریکوتسن‌ها، در فوزاریوم‌های مختلف صورت گرفته است. *نایسن* و همکاران در سال ۲۰۰۴ به‌منظور طبقه‌بندی گونه‌های مولد تریکوتسن در دسته اسپوروتریکیلا از ژن *Tri۵* استفاده کردند. آنها مشاهده نمودند که سکانس ژن *Tri۵* در دو گونه *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* و *فوزاریوم لانگستیه* بسیار مشابه است و نمی‌توان پرایمری براساس این ژن برای افتراق این دو گونه طراحی نمود [۴۲]. در بررسی حاضر نیز سکانس ژن *Tri ۱۶* در ۳ گونه *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس*، *فوزاریوم لانگستیه* آتیپیک و *فوزاریوم پوئه* که مولد سم T-۲ بودند، بسیار شبیه همدیگر بود. مطالعه دیگری در ایران توسط *هراتیان* و همکاران در سال ۲۰۰۸ روی ژن *Tri ۱۳* در ایزوله‌های جداشده از ایران که مولد تریکوتسن‌های نیوالنول و داکسی‌نیوالنول بودند، صورت گرفته است [۴۳].

در این مطالعه، روش مولکولی PCR برای شناسایی و ردیابی سم T-۲ مورد استفاده قرار گرفت که هم مقرون به صرفه و هم آسان و سریع است. به‌طور کلی این بررسی نشان داد که با استفاده از ژن *Tri ۱۶* و پرایمرهای مورد استفاده می‌توان فوزاریوم‌های مهم و گونه‌های نادر مولد سم T-۲ را شناسایی و ردیابی نمود. در بررسی‌های بعدی توصیه می‌شود ایزوله‌های بیشتری از گونه‌های مولد ضعیف T-۲ مورد استفاده واقع شود. همچنین وجود این ژن در مواد غذایی و غلات مشکوک به آلودگی به سم T-۲ مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

با پروتکل مولکولی طراحی‌شده بر اساس ژن *Tri ۱۶* می‌توان گونه‌های مهم مولد سم T-۲ مانند *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* و *فوزاریوم لانگستیه* را شناسایی کرد. همچنین می‌توان گونه‌هایی از فوزاریوم که به‌طور ضعیف مولد T-۲ هستند را نیز شناسایی نمود.

تشکر و قدردانی: این مقاله، استخراج‌شده از طرح پژوهشی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی است که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری یکی از دانشگاه‌های علوم پزشکی نظامی شهر تهران در سال ۹۰-۱۳۸۹ انجام گرفته است. بر این اساس از کلیه مسئولان امر، کمال تشکر را داریم. همچنین از آقای دکتر سید *امیر غیاثیان* که اکثر سویه‌های استاندارد را در اختیار این تحقیق قرار دادند، متشکریم. از همکاران در مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی به‌ویژه از آقای دکتر

علی نجفی که در بحث بیوانفورماتیک این بررسی همکاری داشتند نیز تشکر می‌نماییم.

منابع

1- Allameh A, Razzaghi-Abyaneh M. Mycotoxins: Mycological, chemical and environmental aspects. Tehran: Emam Hossein University Publication; 2001. [Persian]
2- Ueno Y. Trichothecenes in food. In: Krogh P, editor. Mycotoxins in food. London: Academic Press; 1987.
3- Ler SG, Lee FK, Gopalakrishnakone P. Trends in detection of warfare agents detection methods for ricin, staphylococcal entrotoxin B and T-2 toxin. J Chroma. 2006;1133(1-2):1-12.
4- Joffe AZ. F. sporotrichioides as principal causal agents of alimentary toxic aleukia. In: Wyllie RD, Morehouse LG, editors. Mycotoxic Fungi, mycotoxins, mycotoxicoses an encyclopedic handbook. New York: Marcel Dekker; 1978.
5- Beardall JM, Miller JD. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. Mycotoxins in grain: Compounds other than aflatoxin. St. Paul: Eagan Press; 1994.
6- Wang ZG, Feng JN, Tong Z. Human toxicosis caused by moldy rice contaminated with Fusarium and T-2 toxin. Biomed Environ Sci. 1993;6(1):65-70.
7- Ueno Y, Ishii K, Kanaeda S, Tsunoda H, Tanaka T, Enomoto M. Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria. IV. Microbial survey on "bean-hulls poisoning of horses" with the isolation of toxic trichothecenes, neosolaniol and T-2 toxin of Fusarium solani M-1-1. Jpn J Exp Med. 1972;42(3):187-203.
8- Yazar S, Omurtag GZ. Fumonisins, Trichothecenes and Zearalenone in cereals. Int J Mol Sci. 2008;9(11):2062-90.
9- Joffe AZ. Toxic Fusarium species and varieties in nature and in laboratory conditions. Fusarium species: Their biology and toxicology. New York: Wiley Interscience; 1986.
10- Wannemacher RW, Wiener SL. Medical aspects of chemical and biological warfare. United States: United States Government Printing; 1997.
11- Leslie JF, Summerell BA. The Fusarium laboratory manual. Oxford: Blackwell Publishing; 2006.
12- Torp M, Nirenberg HI. Fusarium langsethiae sp. nov on cereals in Europe. Int J Food Microbiol. 2004;95(3):247-56.
13- Torp M, Adler A. The European Sporotrichiella project: A polyphasic approach to the biology of a new Fusarium species. Int J Food Microbiol. 2004;95(3):241-5.
14- Infantino A, Pucci N, Conca G, Santori A. First report of Fusarium langsethiae on durum wheat kernels in Italy. Plant Dis. 2007;91(10):1362.
15- Lukanowski A, Lenc L, Sadowski C. First report on the occurrence of Fusarium langsethiae isolated from kernels in Poland. Plant Dis. 2008;92(3):488.
16- Hudec K, Rohacik T. The occurrence and predominance of Fusarium species on barley kernels in Slovakia. Cereal Res Commun. 2009;37(1):101-9.
17- Kachuei R, Yadegari MH, Rezaie S, Allameh A, Safaie N, Zaini F, et al. Investigation of stored mycoflora, reporting the Fusarium cf. langsethiae in three provinces of Iran during 2007. Ann Microbiol. 2009;59(2):383-90.
18- Kachuei R, Yadegari MH, Rezaie S, Allameh A, Safaie N, Zaini F. Isolation of Fusarium langsethiae and Fusarium sporotrichioides intermediate species and characterization of some morphological and molecular features of it. Mil Med J. 2009;11(2):103-8. [Persian]
19- Knutsen AK, Torp M, Holst-Jensen A. Phylogenetic analyses of the Fusarium poae, Fusarium sporotrichioides and Fusarium langsethiae species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. Int J Food Microbiol. 2004;95(3):287-95.
20- Omurtag GZ, Yazicioglu D. Determination of T-2 toxin in grain and grain products by HPLC and TLC. J Inviron Sci Health. 2000;35(6):797-807.
21- Omurtag GZ, Yazicioglu D. Occurance of T-2 in processed cereals and pulses in turkey determine by HPLC and TLC. Food Addit Contam. 2001;18(9):844-9.
22- Langseth W, Rundberget T. Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. J Chroma A. 1998;815(1):103-26.
23- Torp M, Langseth W. Production of T-2 toxin by a Fusarium resembling Fusarium poae. Mycopathologia. 1999;147(2):89-96.
24- Pascale M, Haidukowski M, Visconti A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. J Chroma A. 2003;989:257-64.
25- Mateo JJ, Mateo R, Jimenez M. Accumulation of type A trichothecene in maize, wheat and rice by Fusarium sporotrichioides isolates under diverse culture conditions. Int J Food Microbiol. 2002;72(1-2):115-23.
26- Riazipour M, Vatani H, Tavakoli HR, Mehrabi Tavana A, Afshari MA, Kachuei R, et al. Assessment of T-2 toxin in cereals served in centers of Tehran military earth force in winter 2007. Mil Med J. 2008;10(1):35-44. [Persian]
27- Russell R, Paterson M. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. Process Biochem. 2006;41:1467-74.
28- Jimenez M, Rodrıguez S, Mateo JJ, Gil JV, Mateo R. Characterization of Gibberella fujikuroi complex isolates by fumonisin B1 and B2 analysis and by RAPD and restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA. System Appl Microbiol. 2000;23(4):546-55.
29- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI. Molecular systematics and phylogeography of the Gibberella fujikuroi species complex. Mycology. 1998;90(3):465-93.
30- McCormick SP, Hohn TM, Desjardins AE. Isolation and characterization of Tri3, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from Fusarium sporotrichioides. Appl Environ Microbiol. 1996;62(2):353-9.
31- Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP, Desjardins AE. Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in Fusarium sporotrichioides. Appl Environ Microbiol. 1995;61(5):1923-30.
32- Alexander NJ, Hohn TM, McCormick SP. The Tri11 gene of Fusarium sporotrichioides encodes a cytochrome p-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. Appl Environ Microbiol. 1998;64(1):221-5.
33- Alexander NJ, McCormick SP, Hohn TM. Tri12, a trichothecene efflux pump from Fusarium sporotrichioides: Gene isolation and expression in yeast. Mol Gen Genet. 1999;261(6):977-84.
34- Mathison L, Soliday C, Stephan T, Aldrich T, Rambosek J. Cloning, characterization and use in strain improvement of the Cephalosporium acremonium gene cefG encoding acetyl transferase. Curr Genet. 1993;23(1):33-41.
35- Peplow AW, Meek IB, Wiles MC, Phillips TD, Beremand MN. Tri16 is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by Fusarium sporotrichioides. Appl Environ Microbiol. 2003;69(10):5935-40.
36- Choi GH, Marek ET, Schardl CL, Richey MG, Chang S,

Smith DA. A stress-responsive gene in Fusarium spp. J Bacteriol. 1990;172(8):4522-8.
37- Rezaie S, Ban J, Mildner M, Poitschek C, Brna C, Tschachler E. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen Trichophyton rubrum. Gene. 2000;241(1):27-33.
38- Kachuei R, Rezaie S, Yadegari MH, Allame A, Safaie N, Zaini F, et al. Evaluation of Fusarium isolates containing Tri3 gene for T-2 toxin production. Sari; Firth Iranian Congress of Medical Mycology, 2011. [Persian]
39- Pettersson H. Fusarium toxin research in Sweden. Braunschweig; German Mycotoxin Workshop, 1995.
40- Liu W, Sundheim L, Langseth W. Trichothecene production and the relationship to vegetative compatibility groups in Fusarium poae. Chem Anal. 1998;140(2):105-14.
41- Cullen D. Mycotoxic Fusaria: Pathogenicity, cultural characteristics, taxonomy and genetics [dissertation]. Wisconsin: University of Wisconsin; 1981.
42- Niessen L, Schmidt H, Vogel RF. The use of Tri5 gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene-producing species in the fusarium section sporotrichiella. Int J Food Microbiol. 2004;95(3):305-19.
43- Haratian M, Sharifnabi B, Alizadeh A, Safaie N. PCR analysis of the Tri13 gene to determine the genetic potential of Fusarium graminearum isolates from Iran to produce nivalenol and deoxynivalenol. Mycopathology. 2008;166(2):109-16.