

УДК 639:616.982.17

DOI: 10.31073/vet\_biotech39-04

ЗАХАРОВА О.М., канд. біол. наук, e-mail: olga\_zm@ukr.net,

ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, e-mail: ast97@ukr.net,

ЯНГОЛЬ Ю.А., e-mail: yangol@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

## ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТОКСИНОУТВОРЮЮЧИХ ГРИБІВ РОДУ FUSARIUM

*У статті наведені результати досліджень щодо виявлення фумонізін-продукуючих видів роду Fusarium серед 24 ізолятів, виділених із зерна кукурудзи на території України.*

*В результаті проведених досліджень встановлено, що застосування методу мультиплексної ПЛР дозволяє визначити наявність токсинпродукуючих мікроскопічних грибів роду Fusarium. Серед досліджених 24 ізолятів, виділених із зерна кукурудзи, отриманого з Київської, Черкаської та Херсонської областей, 5 ізолятів продукували фумонізін (20,8%) та 2 ізоляти – трихотецен (8,3%).*

*Застосування ПЛР для визначення токсинпродукуючих мікроскопічних грибів роду фузаріум в Україні є важливим для удосконалення заходів профілактики отруєння тварин мікотоксинами та покращення якості тваринницької продукції.*

**Ключові слова:** Fusarium, фумонізін, ПЛР, ізолят, токсигенність.

**Вступ.** Проблема мікотоксікозів, що виникають в результаті ураження рослин або продукції рослинного походження токсіногенними грибами, є актуальною через поширення в Україні фузаріозу колосу зернових культур [1–3]. За літературними даними, 80% партій насіння злакових культур заражені фузаріозом. В результаті багаторічного моніторингу товарних партій насіннєвого, харчового та фуражного зерна встановлено, що 60% з них були вражені, а 12% містили фузаріотоксини в межах гранично дозованих кількостей кількостях [1, 2, 4].

Реальною загрозою для більшості свино- і птахогосподарств є забруднення зерна мікотоксинами: афлатоксинами, фузаріотоксинами (Т-2 токсином, зеараленоном, дезоксиніваленолом, фумонізинами). Ураження зерна мікотоксинами відбувається в період його дозрівання на полі – Т-2 токсин, зеараленон, дезоксиніваленон, фумонізін, а також при зберіганні – афлатоксини, охратоксини. Під час зберігання зерна в несприятливих умовах можливе повторне забруднення його фузаріотоксинами, яке іноді перевищує початкове ураження. Зерно, що піддалося самозігріванню, в усіх випадках уражене аспергілами, серед яких великий відсоток (до 40%) складають

токсинуотворюючі види грибів. При підвищеній температурі в процесі самозігрівання виникають умови, за яких можливий розвиток токсигенних грибів і синтез мікотоксинів. У цей період на зерні переважає ріст відносно термостабільних грибів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Trichoderma* та інші [1, 4–6].

Фумонізиди володіють нефротоксичною дією, викликають енцефаломалію і зміни в лейкоцитарному складу крові. Крім того вони руйнують клітинні мембрани, що в першу чергу призводить до ураження печінки і нирок сільськогосподарських тварин. У птахів фумонізиди часто призводять до розвитку так званого синдрому токсичного корму, що включає рухові порушення і уповільнення росту [10].

У сучасних умовах для виявлення мікотоксинів використовують складні методи – ВЕРХ та ІФА [11–13]. Застосування нових молекулярно-біологічних методів (зокрема полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР) дозволяє визначати токсин-продукуючі мікроскопічні гриби з високим ступенем достовірності та за короткий проміжок часу, що важливо для запобігання контамінації кормів мікотоксинами та забезпечення якості кормів та продукції тваринництва.

**Метою роботи** було встановлення за допомогою методу ПЛР токсинпродукуючих видів роду фузаріум, виділених на території України.

**Матеріали та методи досліджень.** Для досліджень використовували 24 ізоляти грибів роду *Fusarium*, виділені із зерна кукурудзи, отриманого з різних областей України (Київська, Черкаська, Житомирська, Чернігівська).

Тестові токсинпродукуючі культури *F. graminearum* та *F. sporotrichioides*, використовували в якості позитивного контролю.

Виділення та видову ідентифікацію досліджених мікроскопічних грибів проводили за мікроскопічними, культуральними, біохімічними властивостями загальноприйнятими методами.

Вивчення культуральних особливостей росту проводили із використанням загальноприйнятих мікробіологічних методів на середовищах бульйон Сабуро, агар Сабуро та Чапека, які готували згідно рекомендацій виробника (HiMedia).

ДНК екстрагували за допомогою лізуючого буфера, що містить 20 мл 1 М TrisHCl (pH 8,5), 100 мкл Твін 20, 48 мг протеїнази К і 32 мл води для молекулярно-генетичних досліджень. Матеріал, колонії мікроскопічних грибів, був змитий з чашок Петрі з агара Чапека після культивування протягом 10–14 діб за температури  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$  та інактивованій за температури  $96^\circ\text{C}$  протягом 10 хвилин. Супернатант використовували після центрифугування при 15 тис об / хв протягом 5 хв. Усі реакції ПЛР проводили, використовуючи ДНК в концентрації не менше 20 нг/мкл.

Продуктування токсинів – фумонізину та трихотецену визначали молекулярно-генетичним методом ПЛР (класичний метод із електрофоретичним визначенням результатів) із застосуванням трьох наборів праймерів, рекомендованих В. Bluhm et al. (2002) [14], представлених в таблиці 1. Праймери були розраховані на специфічний фрагмент з гену TRI6, який бере участь в біосинтезі трихотеценів, і гену FUM5, який бере участь в біосинтезі фумонізинів. Специфічність праймера визначалася шляхом тестування на перехресну активність щодо очищеної геномної ДНК 14 видів грибів, які зберігаються в музеї мікроорганізмів IBM НААН, які включали різні види *Aspergillus spp*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp*, та інші.

Таблиця 1

**Праймери для визначення токсинопродуктування грибів роду *Fusarium* за допомогою мультиплексної реакції ПЛР**

Набір праймерів	Сіквенс праймера (5' - 3')	Фрагмент гена, на який розраховано праймери	Розмір продукту ампліфікації, нп
Видоспецифічний для роду <i>Fusarium spp</i> .	F: AACTCCCAAACCCCTGTGAACATA R: TTAAACGGCGTGGCCGC	rDNA	431
Виявлення трихотецен-продукуючих видів <i>Fusarium spp</i> .	F: CTCTTTGATCGTGTTCGTC R: CTTGTGTATCCGCCTATAGTGATC	TRI6	596
Виявлення фумонізин продукуючих видів <i>Fusarium spp</i> .	F: GTCGAGTTGTTGACCACTGCG R: CGTATCGTCAGCATGATGTAGC	FUM5	845

Для проведення ПЛР, використовували оптимізований нами режим ампліфікації із застосуванням мастерміксу з полімеразою «гарячого старту» (NewEngland Biolabs, США) згідно таблиці 2.

Аналіз продуктів ампліфікації проводили стандартним методом шляхом розділення ампліфікованих фрагментів ДНК у 1,5% гелі агарози з бромистим етидієм із застосуванням маркеру «100 bp ladder» (NewEngland Biolabs, США).

Результати експериментальних досліджень оброблені загальноприйнятими методами статистики з використанням програмного пакету «R studio».

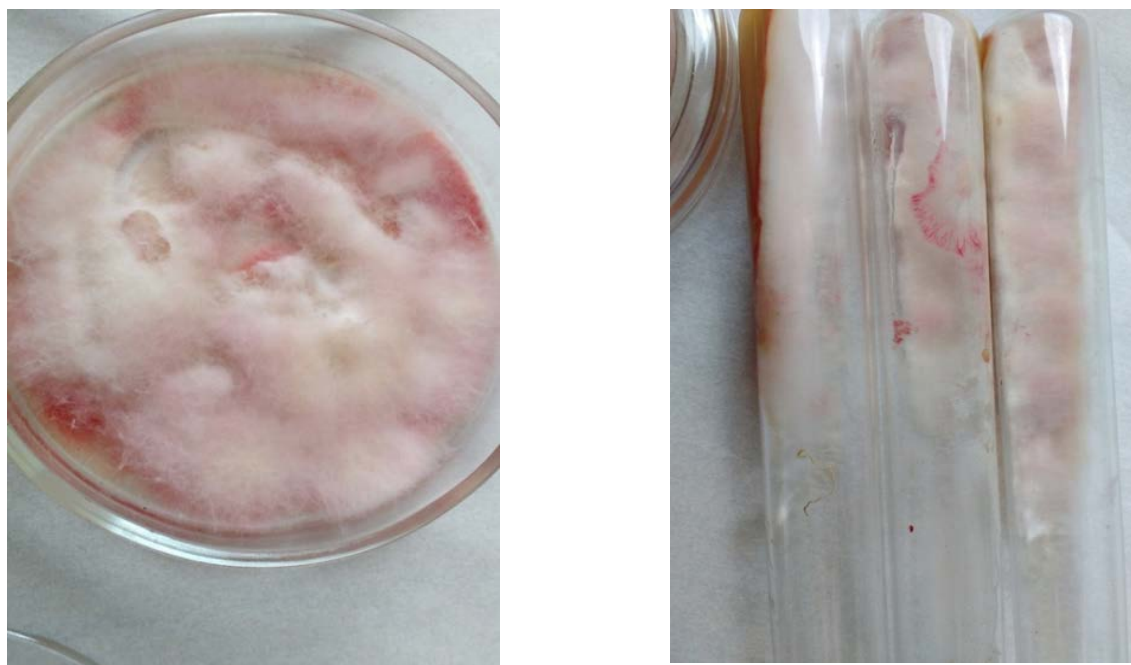
Таблиця 2

**Програма температурного режиму ампліфікатора для проведення ПЛР**

Етап	Режим	Кількість циклів
1	94°C – 5хв	1
2	62°C – 60с	35
	93°C – 45 с	
	72°C – 60с	
3	72°C – 10 хв	1
4	10°C	зберігання

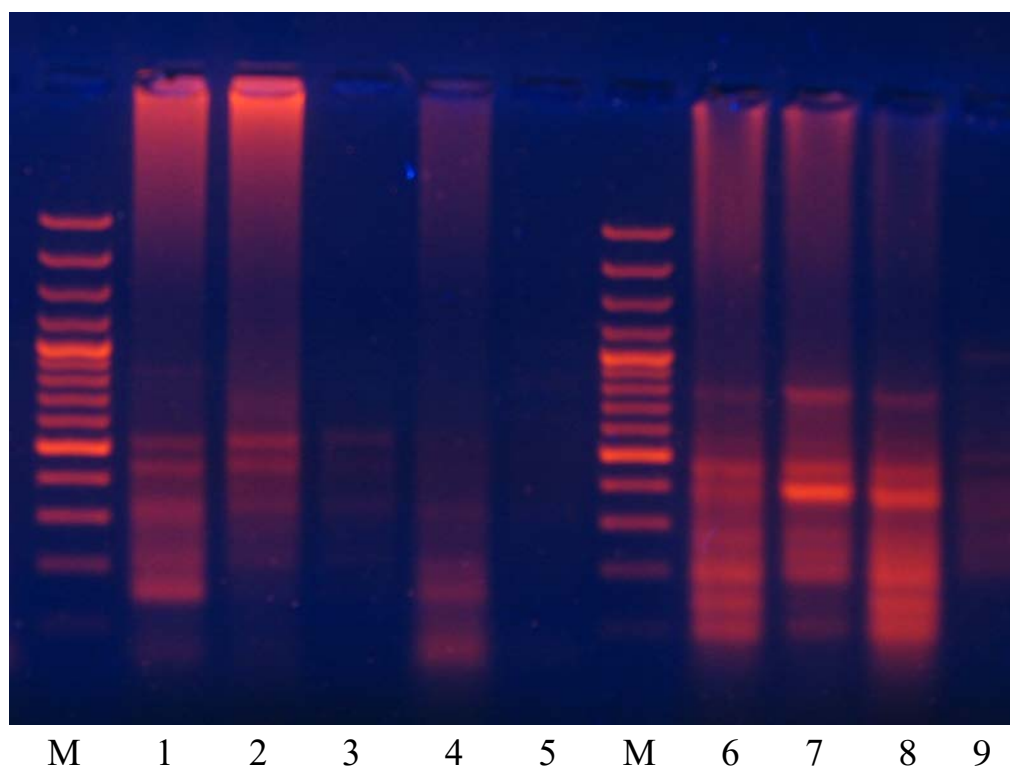
**Результати досліджень та їх обговорення.** За результатами досліджень морфологічних, культуральних та ферментативних властивостей ізолятів *Fusarium spp.* було встановлено, що означені культури протягом 10–14 діб за температури  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$  за культивування на агарі Чапека та Сабуро утворювали характерний для роду ріст у формі ватоподібних колоній із білим повітряним міцелієм, які мають переважно легкий червоний відтінок. Гіфи блідо-оливкового кольору (рис. 1).

За аналізом результатів проведених мікробіологічних досліджень встановлено, що всі досліджені ізоляти володіли основними типовими властивостями, характерними для мікроскопічних грибів роду *Fusarium spp.*

**Рис. 1. Типовий ріст грибів роду *Fusarium* на агарі Чапека.**

У проведеному дослідженні використана нами мультиплексна ПЛР дозволила виявити серед 24 ізолятів 5, які несуть ген, пов'язаний із продукуванням фумонізіну (20,8%) та 2 (8,3%) ізоляти – тріхотецену.

Оскільки особливості таргетного гену не дозволяють відрізнити види мікроскопічних грибів, що, однак, не є важливим з точки зору визначення токсинопродукування, оскільки навіть в межах одного виду можуть зустрічатись як продукуючі, так і не продукуючі токсини ізоляти. На електрофореграмі (рис. 2) показані характерні смужки ампліконів, отриманих в результаті проведених досліджень.



**Рис. 2. Електрофореграма результатів визначення токсинопродукування ізолятів роду *Fusarium spp.*: 1–2 – тріхотеценпродукуючі ізоляти; 4 – нетоксигенний ізолят; 6–8 – фумонізінпродукуючі ізоляти; 4, 5, 9 – негативний контроль.**

Результати оцінки чутливості методу мультиплексного ПЛР-аналізу дозволяють провести виявлення за найменшої концентрації збудника в пробі не менше  $10^4$  КУО. Вказана концентрація легко досягається при субкультивуванні збудника на звичайних поживних середовищах (середовище Сабуро) протягом 24 годин після інокуляції. Це значно скорочує витрати часу на отримання достатньої кількості культури для проведення досліджень.

### Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. В результаті проведених досліджень встановлено, що застосування методу мультиплексної ПЛР дозволяє визначити наявність токсинпродукуючих мікроскопічних грибів роду *Fusarium*.

2. Аналіз результатів досліджень показав, що серед 24 ізолятів, виділених із зерна кукурудзи 5 ізолятів продукували фумонізін (20,8%) та 2 (8,3%) ізоляти – трихотецен.

Застосування ПЛР для визначення токсинпродукуючих мікроскопічних грибів роду фузаріум в Україні є важливим для удосконалення заходів профілактики отруєння тварин мікотоксинами та покращення якості тваринницької продукції.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Моніторингові дослідження мікобіоти кормів з різних регіонів України / О.М. Васянович, О.Ф. Корзуненко, А.Ф. Ображей [та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2003. – №4. – С. 27–30.
2. Болтянская Э.В. Изучение распространённости токсигенных штаммов грибов рода *Fusarium* и факторов, влияющих на их токсинообразование / Э.В. Болтянская, М.Б. Куваева, Е.А. Кроякова // Сб. науч. тр. Ин-т питания АМН СССР. – 1989. – Т. 9. – С. 256–262.
3. Буряк В.Н. Микотоксикозы свиней и их профилактика / В.Н. Буряк // Зоотехния. – 2007. – № 9. – С. 29–31.
4. Апатенко В. Небезпечні мікотоксини / В. Апатенко // Агробізнес сьогодні. – 2011. – № 1/2. – С. 18–20.
5. Саттон Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергил, М. Ринальди. – Москва: Мир, 2001. – 467 с.
6. Малінін О. Мікотоксикологічний моніторинг концентрованих кормів Лісостепу України / О. Малінін, О. Куцан, Г. Шевцова // Тваринництво. – 2003. – №12. – С. 26–28.
7. Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity and risk assessment: fumonisin B1 as an example / Y.P. Dragan, W.R. Bidlack, S.M. Cohen [et al.] // Toxicol. Sci. – 2001. – № 61. – P. 6–17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/61.1.6>.
8. Grenier B. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions / B. Grenier, I. Oswald // World Mycotoxin Journal. – 2011. – № 4 (3). – P. 285–313. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1281>.
9. Henry M.H. The toxicity of purified fumonisin B1 to broiler chicks / M.H. Henry, R.D. Wyatt, O.J. Fletchert // Poultry Sci. – 2000. – № 79. – P. 1378–1384. <https://doi.org/10.1093/ps/79.10.1378>.
10. Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice / P.C. Howard, R.M. Eppley., M.E. Stack [et al.] // Environ. Health Persp. – 2001. – № 109 (Suppl. 2). – P. 277–282. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s2277>.
11. Rahmani A. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins / A. Rahmani, S. Jinap, F. Soleimany // Food Science And Food Safety. – 2009. – Vol. 8. – P. 202–252. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x>.

12. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates / P.F. Ross, L.G. Rice, G.D. Osweiler [et al.] // *Mycopathologia*. – 1992. – № 117. – P. 109–114. <https://doi.org/10.1007/BF00497286>.

13. Nelson P.E. Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species; biology, chemistry, and significance / P.E. Nelson, A.E. Desjardins, R.D. Plattner // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1993. – Vol. 31. – P. 233–252. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.001313>.

14. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal / B.H. Bluhm, J.E. Flaherty, M.A. Cousin [et al.] // *J Food Prot.* – 2002. – Vol. 65(12). – P. 1955–1961. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.12.1955>.

# **ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТОКСИНОПРОДУЦИРУЮЩИХ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* / Захарова О.М., Тарасов А.А., Янголь Ю.А.**

*В статье приведены результаты исследований по выявлению фумонизин-продуцирующих видов рода *Fusarium* среди 24 изолятов, выделенных из зерна кукурузы на территории Украины.*

*В результате проведенных исследований установлено, что применение метода мультиплексной ПЦР позволяет определить наличие токсинпродуцирующих микроскопических грибов рода *Fusarium*. Среди исследованных 24 изолятов, выделенных из зерна кукурузы, полученного из Киевской, Черкасской и Херсонской областей 5 изолятов продуцировали фумонизины (20,8%) и 2 (8,3%) изолята – трихотецены.*

*Применение ПЦР для определения токсинпродуцирующих микроскопических грибов рода фузариум в Украине является важным для совершенствования мер профилактики отравления животных микотоксинами и улучшения качества животноводческой продукции.*

**Ключевые слова:** *Fusarium*, фумонизин, ПЦР, изолят, токсигенность.

# **USE OF POLIMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF TOXINPRODUCING FUNGI OF *FUSARIUM* GENUS / Zakharova O., Tarasov O., Yangol Y.**

**Introduction.** *The mycotoxicosis issues due to the wide area of dissemination of toxinogenic fungi is relevant because of the spread of poisoning animals with fusariotoxins. According to the published data, 80% of cereals are contaminated with fusarium toxins. As a result of long-term monitoring of micotoxins contamination of seed, food and grain, it was found that 60% of them were contaminated, and 12% contained fusariotoxins.*

**The goal of the work** *was to detect of toxin-producing species of the genus *Fusarium* isolated in Ukraine by polymerase chain reaction (PCR).*

**Materials and methods.** *It was used 24 isolates of *Fusarium* genus fungi from museum of the Institute of veterinary medicine NAAS. Studies of morphological and cultural properties were performed using conventional microbiological methods.*

*The fusariotoxin producing isolates were determined by multiplex PCR test (conventional method with electrophoretic reading of results) using three sets of primers recommended by Bluhm et al. (2004). The assay parameters were optimized by us.*

*The results of experimental studies are processed by conventional methods of statistics.*

**Results of research and discussion.** According to the analysis of the results of microbiological studies, it was found that all the studied isolates had the main typical properties characteristic of microscopic fungi of the genus *Fusarium* spp.

In our study, the multiplex PCR we detected among the 24 isolates isolated from corn grain obtained from Kyiv, Cherkasy, Zhytomyr and Chernihiv regions, 5 isolates were carrying the gene associated with the production of fumonisin (20.8%) and 2 (8.3%) isolates were associated with trichothecene production.

**Conclusions and prospects for further research:**

1. As a result of research, it was found that the use of multiplex PCR allows to determine the presence of toxin-producing microscopic fungi of the genus *Fusarium*.

2. Analysis of research results showed that among 24 isolates isolated from corn grain obtained from Kyiv, Cherkasy and Kherson regions, 5 isolates produced fumonisin (20.8%) and 2 (8.3%) isolates – trichothecene.

The use of PCR to detect toxin-producing microscopic fungi of the genus *Fusarium* in Ukraine is important for improving measures to prevent poisoning of animals with mycotoxins and improve the quality of livestock products.

**Keywords:** *Fusarium*, fumonisin, PCR, isolate, toxigenic strain.

**REFERENCES**

1. Vasjanovich, O.M., Korzunenko, O.F., & Obrazhej, A.F. (2003). Monitoringovi doslidzhennja mikrobioti kormiv z riznih regioniv Ukrainy [Monitoring researches of mycobiota feeds from different regions of Ukraine]. *Veterinarna biotekhnologija – Veterinary Biotechnology*, 4, 27-30 [in Ukrainian].
2. Boltjanskaja, Je.V., Kuvaeva, M.B., & Krojakova, E.A. (1989). Izuchenie rasprostranjonnosti toksigennyh shtammov gribov roda *Fusarium* i faktorov, vlijajushhih na ihtoksinoobrazovanie [Study of the prevalence of toxigenic strains of the fungus of the genus *Fusarium* and factors affecting their toxin formation]. *Sbornik nauchnyh trudov – Collection of scientific papers*, 9, 256-262 [in Russian].
3. Burjak, V.N. (2007). Mikotoksikozy svinej i ih profilaktika [Mycotoxinoses of pigs and their prevention]. *Zootehnika – Zootechnics*, 9, 29-31 [in Russian].
4. Apatenko, V. (2011). Nebezpečni mikotoksini [Dangerous mycotoxins]. *Agrobiznes sьогодni – Agribusiness today*, 1-2, 18-20 [in Ukrainian].
5. Satton, D., Fotergil, A., & Rinaldi, M. (2001). *Opredelitel patogennykh i uslovno patogennykh gribov [Determinant of pathogenic and conditionally pathogenic fungi]*. Moscow: Mir [in Russian].
6. Malinin, O., Kutsan, O., & Shevcova, G. (2003). Mikotoksikologichnij monitoring koncentrovanih kormiv Lisostepu Ukraїni [Mycotoxicology monitoring of concentrated feeds of the forest steppe of Ukraine]. *Tvarinnictvo Ukraini – Animal husbandry of Ukraine*, 12, 26-28 [in Ukrainian].
7. Dragan Y.P., Bidlack W.R., Cohen S.M., Goldsworthy T.L., Hard G.C., Howard P.C., et al. (2001). Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity and risk assessment: fumonisin B1 as an example. *Toxicol. Sci.*, 61, 6-17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/61.1.6>.
8. Grenier B., & Oswald I. (2011). Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin Journal*, 4(3), 285-313. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1281>.

9. Henry, M.H., Wyatt, R.D., & Fletchert, O.J. (2000). The toxicity of purified fumonisin B1 to broiler chicks. *Poultry Sci.*, 79, 1378-1384. [https://doi.org/ 10.1093/ps/79.10.1378](https://doi.org/10.1093/ps/79.10.1378).
10. Howard, P.C., Eppley, R.M., Stack, M.E., Warbritton, A., Voss, K.A., Lorentzen, R.J., Kovach, R.M., & Bucci, T.J. (2001). Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ. Health Persp.*, 109 (Suppl. 2), 277-282. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s2277>.
11. Rahmani, A., Jinap, S., & Soleimany, F. (2009). Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Food Science And Food Safety.*, 8, 202-252. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x>.
12. Ross, P.F., Rice, L.G., Osweiler, G.D., Nelson, P.E., Richard, J.L., & Wilson, T.M. (1992). A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. *Mycopathologia*, 117, 109-114. <https://doi.org/10.1007/BF00497286>.
13. Nelson, P.E., Desjardins A.E., & R.D. Plattner. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species; biology, chemistry, and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31, 233-252. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.001313>.
14. Bluhm, B.H., Flaherty, J.E., Cousin, M.A., & Woloshuk, C.P. (2002). Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *J Food Prot.*, 65(12), 1955-61. doi: 10.4315/0362-028x-65.12.1955. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.12.1955>.