

## 鸡舍环境中 *tri5* 基因阳性镰孢菌的分离及其产毒特性

欧阳毅<sup>1,2,3</sup>, 孙晓东<sup>2</sup>, 王雅玲<sup>3\*</sup>, 李军<sup>4</sup>, 卫峰<sup>4</sup>, 吕国忠<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029

<sup>2</sup>大连民族学院环境与资源学院, 大连 116600

<sup>3</sup>广东海洋大学食品科技学院, 湛江 524088

<sup>4</sup>辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001

**摘要:**【目的】探讨利用 *tri5*-PCR 鉴定产毒镰孢菌的可行性以及 *tri5* 阳性菌株的产毒特性和产毒条件。评估鸡舍空气和固体基质中镰孢菌分离株中产单端孢霉烯族毒素潜力的发生率。【方法】利用编码单端孢霉烯族毒素合成酶的起始基因 (*tri5* 基因) 对 139 株镰孢菌分离株进行 PCR 检测, 并对 *tri5* 阳性菌株进行产毒培养, 通过免疫亲和柱-高效液相色谱方法来检测培养产物中的 T-2 毒素和 HT-2 毒素含量。【结果】共筛选到 42 株 *tri5* 阳性菌株, 其中分离自鸡舍空气中的 10 株 *tri5* 阳性菌株经产毒培养后 7 株菌株产生 T-2 毒素 (1.36 - 5 ng/mL) 或 HT-2 毒素 (6.1 - 17.1 ng/mL)。在 5°C - 20°C 间隔 24 h 变温、光照与黑暗间隔 24 h 交替、前期振荡后期静止的培养条件下培养 9 d 镰孢菌的产毒量最高; 镰孢菌的产毒量与温度和时间显著相关, 而与菌丝体干重无显著相关性。【结论】与传统鉴定产毒镰孢菌的方法比较, *tri5*-PCR 更适用于快速、准确地检测大量鸡舍环境样本中的产毒镰孢菌。本研究为养殖环境的产毒镰孢菌的危害预警和控制提供技术支撑和理论依据。

**关键词:** 饲养环境, 毒素检测, *tri5* 基因, 单族毒素

**中图分类号:** Q938      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 06-0805-06

单端孢霉烯族真菌毒素 (Trichothecene mycotoxins, 简称单族毒素) 是真菌毒素家族中的一种由镰孢菌属真菌 (*Fusarium* spp.) 产生的倍半萜烯类化合物, 包括 A、B、C 和 D 四个类型<sup>[1]</sup>。T-2 毒素是单族毒素中最重要的一种, 属 A 型单族毒素。所有真菌单族毒素生物合成的初步反应均由 *tri5* 基因编码的单端孢霉烯合成酶所催化<sup>[2]</sup>, 已有许多研究者应用 *tri5* 基因中的保守序列设计出引物, 以便对镰孢菌中单族毒素产生菌进行鉴定、检测和定量

分析<sup>[3]</sup>。另外, 加上实时定量 PCR 技术的应用, 使得产毒镰孢菌鉴定及毒素分析更加快捷<sup>[4-5]</sup>, 但是, 关于 *tri5* 基因的表达与毒素产量之间量化关系的研究却鲜见报道。曾有报道表明 *tri5* 基因表达与镰孢菌生物量之间呈反比关系<sup>[6]</sup>, 并且, 培养基中葡萄糖的浓度与镰孢菌 T-2 毒素的含量有直接关联<sup>[7]</sup>, 培养条件能影响镰孢菌产毒。

近年来, 关于空气中产毒真菌的报道日渐增多, 各种环境中的真菌毒素均为人们所关注。曾有报道

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30771584, 30770009); 科技部基础性工作专项 (2006FY120100)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-759-2080309; E-mail: wangylchina@163.com (王雅玲); Tel/Fax: +86-411-87531936; E-mail: lvzg@dlnu.edu.cn (吕国忠)

**作者简介:** 欧阳毅 (1987-), 女, 江西赣州人, 硕士研究生, 主要研究方向: 真菌及其毒素检测技术。E-mail: oyy6005@163.com

**收稿日期:** 2010-12-28; **修回日期:** 2011-03-30

指出,在波兰,有 210 个肿瘤病人的居室中存在更多的产毒真菌<sup>[8]</sup>。中国是禽业大国,我国 2007 年鸡只存栏总数达 45 亿只,位列世界第一。养殖环境空气中携带真菌毒素的真菌孢子通过皮肤接触或呼吸道进入机体,其毒性作用类同于消化道吸收产生的作用<sup>[9]</sup>,能导致家禽出现明显的健康问题和生产性能降低,从而对生产者造成相当大的直接或间接经济损失<sup>[10]</sup>,同时也威胁养殖人员的健康。环境中真菌毒素的检测一般属痕量检测,在与其他应激因子相互作用时,使动物出现亚临床症状,从而导致的损失比急性危害更为严重,而且更难做出诊断<sup>[11]</sup>。因此,如何能够快速准确地检测产毒真菌,以评估养殖环境中的真菌毒素浓度便成为保证动物和从业人员健康的主要问题。

本研究目的在于通过 *tri5*-PCR 筛选鸡舍空气中产毒镰孢菌以及 *tri5* 阳性 (*tri5*<sup>+</sup>) 镰孢菌菌株的产毒培养,分析 *tri5* 基因、真菌生物量与真菌毒素产量之间的相关性。同时,研究环境对 *tri5*<sup>+</sup> 菌株产毒特性的影响,从而为鸡舍环境产毒镰孢菌的危害控制和预警提供技术支撑和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 鸡舍样品采集与处理:**2009 年 11 月在辽宁省大连某养鸡场,分别于蛋鸡舍、种鸡舍、雏鸡舍 3 个鸡舍采集样品。记录不同类型鸡舍的温度、湿度、鸡只饲养密度和鸡龄等采样条件数据。

空气样品的采集:在鸡舍入口处和鸡舍进门后纵向平行 3 个过道上采样,每个过道 2 个位点采集,每个位点高处(距地面 150 cm)和低处(距地面 20 cm)各放置一台采样器;使用灭菌 AGI-30 采样器(将采样器用铝箔包好,250℃干热灭菌 1 h),以无菌去离子水为收集液采集空气中真菌气溶胶样品共 19 份,采集流速为 8 L/min,收集液的体积为 20 mL,每个采样点采集 30 min。

固体基质样品的采集:使用灭菌小铁铲作采样工具,在鸡舍进门后 3 个过道上从近门处起 5、10、15 m 处设为采样点,分别在饲料槽和拌料间采集饲料样品;在鸡舍门口、窗台和地面采集土壤和积尘样品;样品装入密封袋中,保证密封袋密封性良好。采样人员采样时戴橡胶手套,不同样品之间更换手套

和采样工具。

采集的空气样品和固体基质样品放置于 4℃ 冰箱内保存备进一步试验。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**GBS8000 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司);T-2 毒素免疫亲和柱(美国 VICAM 公司);Aligent 1100 型高效液相色谱分析仪(美国 Aligent 公司);色谱柱(ZORBAX Elipse XDB-C18 150 mm × 4.6 mm, 5 μm);生化试剂均为分析纯试剂。

### 1.2 供试菌株的 *tri5*-PCR 扩增

鸡舍空气样品和固体基质样品经孟加拉红培养基(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 18 g, 蛋白胨 5.0 g, 孟加拉红 0.033 g, 蒸馏水 1000 mL)、PDA 培养基(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL)分离纯化镰孢菌,将分离纯化所得全部镰孢菌分离株作为供试菌株进行 *tri5*-PCR。将供试镰孢菌接入 GYM 液体培养基[NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, KCl 0.2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, 葡萄糖 10 g, 酵母膏 5 g, 铜溶液(0.005 g/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) 1 mL, 锌溶液(0.01 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 1 mL, 蒸馏水 1000 mL]中 25℃ 培养,时间为 3-5 d。采用改良的 Cenis 微电钻 DNA 基因组提取法<sup>[12]</sup>快速提取供试菌株的基因组 DNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA。以 HATri/F(CAGAT GGAGA ACTGGA TGGT) 和 HATri/R(GCACA AGTGCCACGTGAC)为引物对<sup>[13]</sup>,采用 25 μL PCR 反应体系,按 94℃ 15 s、62℃ 15 s 和 72℃ 45 s 程序循环 40 次。此前增加一次 94℃ 75 s 循环,最后增加一次 72℃ 4 min 15 s 循环<sup>[14]</sup>进行 *tri5*-PCR 扩增。采用凝胶成像系统成像检测 2% 琼脂糖凝胶电泳的 PCR 产物。

### 1.3 供试菌株的产毒培养

选取一株 *tri5* 阳性菌株,采用正交试验设计法对其进行产毒培养,正交表使用 L<sub>25</sub>(5<sup>6</sup>),培养基为 Richard 液体培养基。按照 1.6 中描述的 IMC-HPLC 法检测正交试验培养产物中 T-2 毒素产量,并通过正交分析以获得产毒培养的最佳条件。再将 *tri5*-PCR 所得阳性菌株与同种同源或同种不同源的对照菌株按照最佳产毒条件进行产毒培养,对培养产物进行 HPLC 检测。菌丝体于烘箱中 80℃ 干燥 2 h,称量干重以分析镰孢菌产毒量与菌丝体重量之间的相关性。

## 2 结果和分析

### 2.1 鸡舍环境介质中镰孢菌分离株的 *tri5*-PCR

按照 1.1 的采集条件, 分别于种鸡舍、蛋鸡舍、雏鸡舍进行采样, 采集空气气溶胶样品共 19 份, 固体基质样品共 140 份及饮用水样品共 24 份。不同鸡舍采样环境见表 1。鸡舍空气样本中镰孢菌平均总浓度为  $2.845(\pm 0.658) \times 10^4$  CFU/m<sup>3</sup>, 经形态学分类鉴定出 14 种共 59 株镰孢菌分离株(表 2); 鸡舍固体基质(包括饮用水)中分离到 80 株镰孢菌(未完全定

种)。经对鸡舍环境介质中分离得到的共 139 株镰孢菌分离株进行 *tri5*-PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳, 共有 42 株镰孢菌确定为 *tri5*<sup>+</sup> 菌株, 其中从空气样本中得到 10 株 *tri5*<sup>+</sup> 菌株 (16.99%, 10/59), 其余为 *tri5*<sup>-</sup> 菌株 (83.1%, 49/59) (表 2); 从固体基质中共得到 32 株 *tri5*<sup>+</sup> 菌株 (40%, 32/80), 其余为 *tri5*<sup>-</sup> 菌株 (60%, 48/80)。PCR 产物电泳结果显示产物大小在 250 bp 左右(图 1), 这与 *tri5*-PCR 预计产物为 260 bp 大小是一致的。由于固体基质中镰孢菌分离株未完全定种, 因此, 选取空气中 *tri5*<sup>+</sup> 菌株进行产毒培养, 选取与之对照的 *tri5*<sup>-</sup> 菌株(表 2), 同时进行产毒培养。

表 1 不同鸡舍的采样条件

Table 1 The condition of different sampling poultry houses

Type of poultry house	Sampling condition				Structure
	T/°C	Humidity/%	Chicken age/d	Chicken density/(ones/m <sup>2</sup> )	
Chicken house	18 - 19	65 - 69	235	62.2	Enclosed
Layer house	19 - 21	58 - 63	358	10.3	
Chicks house	26 - 27	49 - 52	78	6.5	

表 2 鸡舍空气中不同镰孢菌分离株浓度及 *tri5*<sup>+</sup> 菌株分离率

Table 2 *Fusarium* concentration in air of chicken house and isolation rate of *tri5*<sup>+</sup> and *tri5*<sup>-</sup> strains

Species No.	<i>Fusarium</i> species	<i>Fusarium</i> concentration in air/ ( $\times 10^3$ CFU/m <sup>3</sup> )	Strains No.	Isolation rate of <i>tri5</i> <sup>+</sup> strains/%
1	<i>F. semitectum</i>	8.7	IBE001 <sup>a</sup> (1-1) IBE002 <sup>a</sup> (1-2) IBE003 <sup>*</sup> IBE004-IBE009	3.4
2	<i>F. camptoceras</i>	0.5	IBE023 <sup>a</sup>	1.7
3	<i>F. solani</i>	4.4	IBE028 <sup>a</sup> (3-1) IBE029 <sup>a</sup> (3-2) IBE030 <sup>a</sup> (3-3) IBE031 <sup>*</sup> IBE032-IBE034	5.09
4	<i>F. crookwellense</i>	0.3	IBE039 <sup>a</sup>	1.7
5	<i>F. graminearum</i>	5.2	IBE040 <sup>a</sup> IBE041 <sup>*</sup> WE15-9 <sup>*^</sup> IBE042	1.7
6	<i>F. poae</i>	2.7	IBE051 <sup>a</sup> IBE052 <sup>*</sup> WE13-5 <sup>*^</sup> IBE053	1.7
7	<i>F. equiseti</i>	3.9	IBE058 <sup>a</sup> IBE059 <sup>*</sup> IBE060-IBE062	1.7
8	<i>F. acuminatum</i>	0.2	IBE068	
9	<i>F. tricinctum</i>	0.4	IBE069 <sup>*</sup>	
10	<i>F. nivale</i>	0.3	IBE070	
11	<i>F. avenaceum</i>	1.9	IBE071-IBE073	
12	<i>F. verticillioides</i>	23.2	IBE080-IBE095	
13	<i>F. oxysporum</i>	13.3	90 <sup>*^</sup> , WS1-11 <sup>*^</sup> IBE113-IBE119	
14	<i>F. ventricosum</i>	0.3	IBE121	
Total	14 Species	65.3	59 Strains	16.99

Note: isolation rate of *tri5*<sup>+</sup> and *tri5*<sup>-</sup> strains meaning their percentage in the total of *Fusarium* strains in air. <sup>a</sup> representing *tri5*<sup>+</sup> strains; <sup>\*</sup> representing *tri5*<sup>-</sup> strains for control; <sup>^</sup> representing *tri5*<sup>-</sup> strains from other resources.

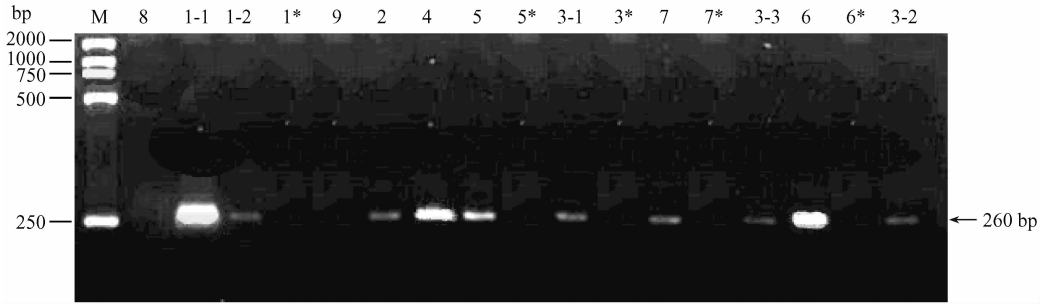


图1 鸡舍空气中10株 *tri5*<sup>+</sup> 菌株和2株 *tri5*<sup>-</sup> 菌株 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Amplification by *tri5*-PCR of ten *tri5*<sup>+</sup> strains and two *tri5*<sup>-</sup> strains from the air in poultry house. M: DL2000 Maker. The name of *Fusarium* corresponding to the lane from left to right is: 8-*F. acuminatum*; 1-1, 1-2-*F. semitectum*; 9-*F. tricinctum*; 2-*F. camptoceras*; 4-*F. crookwellense*; 5-*F. graminearum*; 3-1, 3-2, 3-3-*F. solani*; 7-*F. equiseti*; 6-*F. poae*.

## 2.3 产毒培养

**2.3.1** 经 *tri5*-PCR 得出 *tri5*<sup>+</sup> 菌株 PCR 产物电泳条带比较,选取条带亮度最亮的 IBE001 号(1-1)菌株(*F. verticillioides*)进行产毒正交试验。通过正交设计试验分析,得出该菌株的最近产毒培养条件为 5℃ - 20℃ 间隔 24 h 变温、光照与黑暗间隔 24 h 交替、前期振荡后期静止的培养条件下培养 9 d。各条件对产毒结果影响大小顺序为时间 > 温度 > 光照 > 方式,其中时间和温度对结果具有显著影响( $P < 0.05$ )。

**2.3.2** 各 *tri5*<sup>+</sup> 菌株的 HPLC 法检测 T-2 毒素结果表明,10 株 *tri5*<sup>+</sup> 菌株中有 7 株产生了 T-2 毒素,浓度范围为 1.3 - 5 ng/mL,3 株产生了 HT-2 毒素,浓度分别为 6.1、17.1 和 11.7 ng/mL,检测结果见图

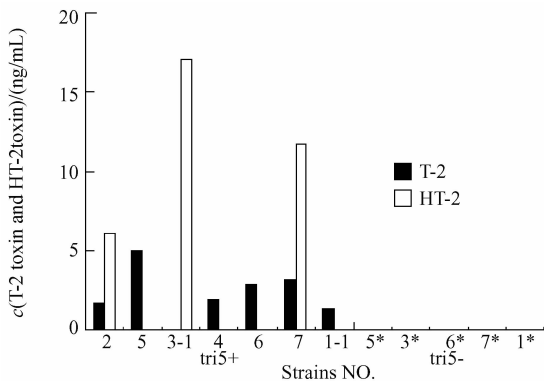


图2 *tri5*<sup>+</sup> 菌株产毒培养产物 IMC-HPLC 检测结果

Fig. 2 The concentration of T-2 and HT-2 toxins in *tri5*<sup>+</sup> strain toxicogenic culture detected by IMC-HPLC

The strain numbers of *tri5*<sup>+</sup> strains in accordance with descending order of dry mass of mycelium. \* representing the control group of *Fusarium*. 1: *F. semitectum*, 2: *F. camptoceras*, 3: *F. solani*, 4: *F. crookwellense*, 5: *F. graminearum*, 6: *F. poae*, 7: *F. equiseti*.

2;其对照组菌株共 10 株镰孢菌均未检测到毒素的产生。镰孢菌的产毒量与菌丝体干重无显著相关性( $P > 0.05$ )。10 株 *tri5*<sup>+</sup> 镰孢菌中 1-2 (*F. semitectum*)、3-2 和 3-3 (*F. solani*) 的产毒培养产物中未检测到毒素产生。

## 3 讨论

镰孢菌能够产生单族毒素已广为人知,但各种外界环境条件对镰孢菌产毒的影响仍然是许多研究者热衷的课题。已有许多对作为农作物病原菌或用于毒素生产的镰孢菌的产毒条件做了相关研究。本试验首次使用正交试验设计方法进行镰孢菌产毒条件的摸索试验,与前人的研究结果相比,关于温度对产毒影响的认知是一致的,普遍认为低温尤其是变温条件下镰孢菌产毒量较高<sup>[15]</sup>。本试验的研究结果也是如此,但在光照及培养方式上本试验与前人研究结果有所不同<sup>[16-17]</sup>。温度和时间对镰孢菌产毒的影响极大,尤其是饲料、土壤等固体基质中产毒镰孢菌的比例较高。因此,在鸡舍养殖过程和饲料运输过程中需重点控制温度和空气流通,限制镰孢菌产毒株的产毒条件,重视鸡舍环境和养殖人员操作工具的卫生清洁,防止交叉污染,减少镰孢菌产毒株数量,从而控制 *tri5*<sup>+</sup> 镰孢菌产毒和环境中毒素含量,保证鸡只和从业人员的健康。

镰孢菌各菌株间产毒能力存在明显差异,即使同一菌株在不同液体培养基中或不同培养条件下也会产生明显不同的结果<sup>[18-19]</sup>,因此,传统的产毒培养检测方法有很大的不稳定性。在本试验中,利用 *tri5*-PCR 检测方法评价镰孢菌产毒能力与传统

产毒培养检测方法可以得出一致的结果,因此,可以利用简便快速的分子生物学方法替代传统的产毒培养后再进行物理化学检测的方法。镰孢菌是否具有产生真菌毒素的能力,这与 *tri5* 基因的浓度有一定联系,但镰孢菌各菌株之间的产毒量与菌丝体干重无显著相关性,这一点与真菌生长毒素与 *tri5* 表达相对独立的结果是一致的<sup>[20]</sup>。

*tri5*-PCR 是鉴定 T-2 毒素和 HT-2 毒素产毒镰孢菌的一种切实可行的方法,并在一定产物浓度上对产毒菌株的产毒能力进行评估,这为分子生物学方法检测环境中毒素产生菌并且估计毒素产量提供了理论依据。*tri5*<sup>+</sup> 菌株经产毒条件刺激后产生毒素的结果和毒素发生的条件相关联有助于我们对鸡舍的饲养环境,乃至各种职业环境进行控制和管理,为人类和动物真菌病的预防提供理论依据。

## 参考文献

[ 1 ] Anke T, Walburga S, Hans-Ulrich H. Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals including oats after immunoaffinity clean-up by liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(13): 4968-4975.

[ 2 ] Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state of the art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 371(3): 285-299.

[ 3 ] Niessen L, Schmidt H, Vogel R. The use of *tri5* gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene-producing species in the *Fusarium* section Sporotrichiella. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 95(3): 305-319.

[ 4 ] Schnerr H, Niessen L, Vogel RF. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by light cycler-PCR using SYBR green I for continuous fluorescence monitoring. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 71(1): 53-61.

[ 5 ] Anne SH, Karl-Christian N. Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. *Journal of Environmental Monitoring*, 2006, 8(12): 1235-1241.

[ 6 ] Doohan FM, Weston G. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *tri5* by *Fusarium* species in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 3850-3854.

[ 7 ] Blesa J, Meca G, Rubert J, Soriano JM, Ritieni A, Manes J. Glucose influence on the production of T-2 toxin by *Fusarium sporotrichioides*. *Toxicon*, 2010, 55(6): 1157-1161.

[ 8 ] Jarvis BB. Working paper provided to the health and wealth Canada working group on fungi and indoor air. Ottawa: *Environment Health Directorate*, 1986: 2-3.

[ 9 ] 阚海东. 空气中的真菌毒素. 国外医学(卫生学分册) (*Foreign Medical Sciences (Section of Hygiene)*), 1999, 26(6): 357-360.

[10] Radmila MR, Ksenija DN, Vladimir DN, Todor DP, Vesna MJ. Mycotoxins in poultry production. *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad*, 2009, (116): 7-14.

[11] 曹冬梅, 孙安权. 霉菌毒素对家禽生产的影响. 饲料广角 (*Feed China*), 2010, (4): 20-23.

[12] Cenis JL. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 2380.

[13] Edwards SG, Pirgozliev SR, Hare MC and Jenkinson P. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1575-1580.

[14] 王雅玲. 养殖环境真菌气溶胶及相关真菌毒素的检测. 山东农业大学博士学位论文, 2006.

[15] 李群伟, 李德安, 孟宪清, 李晓丹. 影响镰刀菌生长与产毒的基本因素的研究. 中国地方病学杂志 (*Chinese Journal of Endemiology*), 1998, 17(6): 355-358.

[16] 徐雍皋, 朱斌, 方中达. 禾谷镰刀菌培养滤液对小麦胚根毒性作用的研究. 南京农业大学学报 (*Journal of Nanjing Agricultural University*), 1991, 14(1): 43-46.

[17] 石晓燕, 邓福友. 禾谷镰刀菌液体培养产毒条件研究初报. 河北农业大学学报 (*Journal of Agricultural University of Hebei*), 1992, 15(4): 34-38.

[18] Chu FS, Liang MY, Zhang GS. Production and characterization of antibody against diacetoxyscirpenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48(4): 777-780.

[19] Ueno Y, Sawano M, Ishii K. Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture. *Applied Microbiology*, 1975, 30(1): 4-9

[20] Marín P, Jurado M, Magan N, Vázquez C, González-Jaén MT. Effect of solute stress and temperature on growth rate and *tri5* gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 140(2-3): 169-174.

# Isolation and toxogenic characterization of *tri5* positive *Fusarium* from poultry houses

Yi Ouyang<sup>1, 2, 3</sup>, Xiaodong Sun<sup>2</sup>, Yaling Wang<sup>3\*</sup>, Jun Li<sup>4</sup>, Feng Wei<sup>4</sup>,  
Guozhong Lü<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

<sup>2</sup> College of Environment and Resources, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China

<sup>3</sup> College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

<sup>4</sup> Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China

**Abstract:** [ **Objective** ] We used *tri5*-PCR technique to identify the toxin-producing *Fusarium* strains, the toxogenic characteristics and toxicogenic condition of *tri5* positive strains. We also evaluated the potential trichothecene-producing level of the *Fusarium* strains from the air and solid materials in poultry houses. [ **Methods** ] *tri5* gene, the start gene encoding trichothecene synthase, was taken to detect 139 *Fusarium* isolates by PCR. Toxogenic culture was carried out for *tri5* positive *Fusarium* strains, and the quantities of T-2 and HT-2 toxins in toxogenic cultures were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) after immune-affinity column clear-up. [ **Results** ] Among the 42 *tri5* positive strains determined by *tri5*-PCR, all 10 *tri5* positive strains from the air in poultry houses were found to produce T-2 toxin (1.36 – 5 ng/mL) or HT-2 toxin (6.1 – 17.1 ng/mL) after culture. The optimal conditions for toxogenic culture were 9 days of culture with 5°C -20°C temperature fluctuation and light-dark alternating at 24 h intervals, shaking at early stage and non-shaking at later stage. The toxin production of *tri5* positive strains was significantly affected by temperature and time, but it has no correlation with the dry mass of mycelium. [ **Conclusion** ] In comparison with the traditional method, *tri5*-PCR is a rapid method for accurate detection of toxogenic *Fusarium* isolates in large amounts of environmental samples from poultry houses. The results provide a technical support and theoretical basis for early hazard warning and control of toxogenic *Fusarium* strains in animal raising environments.

**Keywords:** mycotoxin, animals raising environment, mycotoxin detection, *tri5* gene

(本文责编:张晓丽)