Archive of SID

مجله گیاهپزشک و غذا، شماره ۲، فروردین- اردیبهشت ۱۳۸۷

اهمیت و نقش توکسین destruxin B در بیماریزایی قارچ *Alternaria brassicae* در کلزا با تکیه بر ردیابی ژن‌های درگیر در تولید آن

معصومه مصطفی[۱]، *میرمعصوم عراقی[۲] و بهرام شریف نبی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی و [۳] دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه صنعتی اصفهان، [۲] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

* پست الکترونیکی: Iraqi602@yahoo.com

چکیده

سوختگی برگ کلزا یا بلایت آلترناریایی که تحت عناوین black spot و gray leaf spot نیز شناخته شده است یکی از بیماری‌های مخرب گیاهان خانواده کلم از جمله کلزا بوده و بیماری قابل توجه در هند، چین، شرق کانادا، آلمان و ایران است. چهار گونه از *Alternaria* در رابطه با این بیماری شناخته شده‌اند *(A. brassicae , A. brassicicola ،A. raphani و A. arborescense)* که از این میان *A. brassicae* دارای دامنه میزبانی اختصاصی‌تری نسبت به دیگر گونه‌ها می‌باشد. این بیمارگرها همه قسمت‌های هوایی گیاه (برگ، ساقه، غلاف و دانه) را در تمام مراحل رشد تحت تأثیر قرار می‌دهند و به‌عنوان عوامل بیماریزای پس از برداشت نیز قابل توجه هستند. بیماری با آلودگی گیاه به‌وسیله مایه تلقیح هوازاد یا بذرزاد آغاز می‌شود و علائم به‌صورت مرگ گیاهچه، لکه‌هایی با مرکز خاکستری، قهوه‌ای یا سیاه با حاشیه زرد ظاهر شده که در نهایت باعث کاهش سطح فتوسنتز، برگ‌ریزی سریع، چروکیدگی دانه و کاهش محصول می‌گردد. کلروز و نکروز ایجاد شده به‌وسیله *A. brassicae* در ارتباط با فیتوتوکسین‌های این قارچ است. جدایه‌های توکسین‌زای این بیمارگر قادر به تولید توکسین‌هایی از قبیل انواع دکستروکسین (destruxin)، آلترناریول (AOH)، اسیدتنوآزونیک (TA) و آلترناریول متیل اتر (AEM) می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: دکستروکسین، قارچ بیماریزا، *Alternaria*، کلزا

مقدمه

گونه‌هایی از جنس *Brassica* از جمله کلزا (*B. napus* و *B. rapa*) از نظر اقتصادی جزء گیاهان مهم جهان محسوب می‌شوند (۱۰). کلزا از نظر تولید روغن دومین مقام را در میان دانه‌های روغنی به خود اختصاص داده و هم‌اکنون این محصول در ۵۳ کشور جهان کشت می شود. به‌دلیل سازگاری کلزا با شرایط مختلف آب و هوایی و سایر ویژگی‌های این گیاه، کشت کلزا در ایران از سال ۷۸ آغاز شده و ۲۲۰ هزار هکتار از اراضی زیر سطح کشت این محصول می‌باشند (۱) با این وجود تولید این گیاهان همه ساله با عوامل بیماریزای مختلف از جمله گونه‌های

www.SID.ir

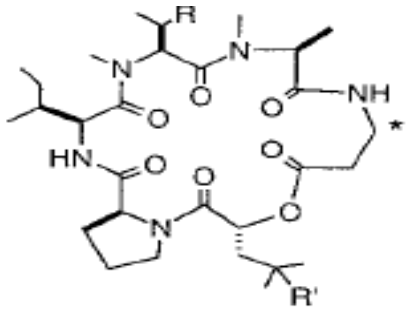
Archive of SID

Alternaria محدود می‌شود (۲۵). در هند تولید روغن در اثر آلودگی به این قارچ عامل بیماری کاهش قابل توجهی را نشان داده است (۹).

انواع دستروکسین تولید شده از این قارچ، به‌ویژه دستروکسین بی فعالیت فیتوتوکسیک نشان می‌دهند (۷). آنالیز آمینواسیدها نشان داد که توکسین مولد کلروتیک یک دپسیپپتید (depsipeptid) به نام دستروکسین بی بوده و همچنین مشخص شد که توکسین مولد نکروتیک احتمالاً یک پلی‌کتید (polyketide) است (۹). پدراس و همکاران در سال ۲۰۰۰ اعلام کردند که دستروکسین بی علائم کلروز را مشابه با علائم طبیعی *A. brassicae* روی گیاه میزبان ایجاد می‌کند (۲۰). لازم به ذکر است که همولوگ‌های دیگر این توکسین نیز ممکن است در تولید علائم سهیم باشند (۲۱). محققان دیگری در سال ۱۹۹۲ دریافتند که، دستروکسین بی را به‌عنوان فاکتور بیماریزایی معرفی کرده و متذکر شدند که این توکسین بافت میزبان را برای هجوم *A. brassicae* آماده کرده و بنابراین تعیین‌کننده حساسیت میزبان است (۲۵) ولی نقش این توکسین در توسعه بیماری به‌طور کامل مشخص نشده است (۲۰).

انواع دستروکسین خانواده بزرگی از متابولیت‌های ثانویه تولید شده به‌وسیله قارچ‌هایی شامل *Metarhizium anisoplia*، *A. brassicae*, *Ophiosphaerella herpotricha* (۷، ۲۱) و *Trichothecium roseum* (۱۰) بوده و به‌عنوان فاکتورهای بیماریزای قارچی مورد توجه هستند (۱۰). *A. brassicae* چهار فیتوتوکسین شامل دستروکسین بی (فیتوتوکسین اصلی) و homodestruxin B desmetyl destruxin B و destruxin B_2 (فیتوتوکسین های مینور) را متعلق به این خانواده توکسینی تولید می کند (۶، ۱۶).

destruxin B ($CH_2 - CH(CH_3)_2$) یک هگزادپسیپپتید (hexadepsipeptid) حلقوی (شکل ۱)، متشکل از یک α–hydroxy acid، یک β-amino acid و چهار α-amino acid است (۲۱) که در گیاه میزبان و *In vitro* تولید می‌شود (۱۶، ۲۵).



شکل ۱- فرمول حلقوی destruxin B از عامل بیماریزای *Alternaria brassicae*

محققین دیگری دکستروکسین بی را به‌عنوان توکسین اختصاصی میزبان (HST) معرفی کردند (۵) نتایج بررسی‌ها نشان داد که دکستروکسین بی یک توکسین غیراختصاصی است، آنها متذکر شدند که این توکسین مسئول القاء آمادگی

www.SID.ir

Archive of SID

میزبان برای پذیرش عامل بیماریزا نمی‌باشد و احتمالاً توکسین‌های دیگری غیر از این در این فرایند نقش خواهند داشت (۱۶).

مسیر ژنتیکی بیوسنتز توکسین‌های قارچ *A. brassicae* به‌طور واضح مشخص نشده است (۹). ژن‌های NRPS (Non ribosomal peptid synthetase) ممکن است در توسعه بیماری لکه سیاه در گیاهان خانواده کلم نقش داشته باشند (۱۰). NRPS به‌عنوان یکی از بزرگترین و مهمترین گروه‌های سنتزکننده متابولیت‌های ثانویه قارچی (۲۵) احتمالاً در سنتز توکسین‌هایی از قبیل دکستروکسین، همچنین در سنتز سیدروفورها دخالت داشته (۲۲) و نقش کلیدی در بیماریزایی *A. brassicae* دارند (۱۰، ۱۲). باینز و تواری (۱۹۸۷) اعلام کردند که حضور حداقل یک ژن NRPS در ژنوم *A. brassicae* دور از انتظار نمی‌باشد (۵). *AbrePsy*۱ متعلق به گروه NRPS و *AbreAtr*۱ عضوی از بالاخانواده ABC transporter[1] از ژنوم *A. brassicae* به‌عنوان کد کننده‌های احتمالی توکسین‌های این بیمارگر شناخته شده‌اند. افزایش بیان این ژن‌ها در طول فرایند آلودگی مشاهده شده است (۱۰). *AbrePsy*۱ شامل یک توالی 22050 bp است (۱۸) و پروتئین بزرگ 792 kDa، شامل ۷۱۹۱ اسید آمینه را کد می‌کند. این پروتئین دارای چهار تکرار در ناحیه A (A-domain) خود می‌باشد و مسئول فعال‌سازی آمینواسیدها در پپتید سنتز شده نهایی است. *AbreAtr*۱ در مجاورت ژن *AbrePsy*۱ قرار گرفته و شامل یک توالی 4912 bp است که پروتئین کوچک‌تر 166 kDa، شامل 1500 اسید آمینه را کد می‌کند. این پروتئین از دو بخش همولوگ TMD و NBF تشکیل شده و احتمالاً در انتقال پپتیدهای سنتز شده توسط *AbrePsy*۱ نقش دارد.

آنالیز توالی نوکلئوتیدی خوشه ژنی NRPS-ABC transporter هفت ناحیه اینترون را در هر دو ژن نشان داد. در مجاورت انتهای ´3 از ژن *AbrePsy*۱ تـوالی پلی‌آدنین (AAGAAA) و در انتهای ´5 این ژن، آدنین در موقعیت 3- قرار گرفته است توالی‌های پروموتوری (TAAATT در 253- و CAAT در503-) در مجاورت ناحیه ´5 این ژن قرار دارند. به‌طور مشابه در *AbreAtr*۱ توالی AACTATGGA و آدنین در موقعیت 3- در اطراف نقطه شروع ترجمه وجود دارنـد تـوالی TAATA شبیـه به (TATA) در موقعیت 100-، همچنین موتیف CAAT در موقعیت 191- به نقطه شروع ترجمه این ژن وابسته هستند. لازم به ذکر است که این دو خوشه ژنی علی‌رغم پیوستگی فیزیکی، از نظر وظایف وابسته نبوده و روش بیان آنها در گیاه متفاوت می‌باشد (۱۰). در مورد فاکتورهای بیماریزایی *A. brassicae* و چگونگی نفوذ و کلونیزه کردن بافت میزبان اطلاعات کمی در دست است (۱۰، ۱۳). آنالیز بیان دو ژن شناسایی شده در طول فرایند آلودگی به‌علت اندازه بزرگ *AbrePsy*۱، همچنین به‌دلیل تغییرات اساسی اسید نوکلئیک RNA قارچ نسبت به RNA گیاهی در طی مراحل مختلف آلودگی، قابل بحث است. PCR تکثیر آزمایشگاهی توالی‌های هدف و تعیین کمیت نسبی *AbreAtr*۱ و *AbrePsy*۱ را در مراحل مختلف آلودگی تسهیل می‌کند ولی برای تعیین قطعی نقش این ژن‌ها، آنالیز فنوتیپی موتانت‌های وارد شده مورد نیاز است (۱۰).

1. ATP binding cassette transporter

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی نهایی و تعیین کمیت این فیتوتوکسین با چندین روش کروماتوگرافی از قبیل TLC، HPLC و DFC انجام می‌گیرد (٦ و ١٩). به‌منظور آنالیز بیشتر این توکسین، از روش ایسکتروسکوپی MS نیز به‌دنبال روش‌های کروماتوگرافی قابل انجام است (١٦).

با توجه به نقش احتمالی دکستروکسین بی به‌عنوان یک واسطه در تعامل بین *A. brassicae* و میزبان (٢١) و اهمیت ژن‌های *AbrePsy*١ و *AbreAtr*١ در مسیر بیوسنتز این توکسین و سایر اطلاعات موجود، تحقیقات بیشتر در این زمینه مورد نیاز می‌باشد.

منابع

١. شریعتی، ش. و قاضی، پ. ١٣٨٥. کلزا. اداره کل آمار واطلاعات در امور کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی.

٢. علوی، س. ا. ١٣٨٣. مایکوتوکسین‌ها در کشاورزی و امنیت غذایی (ترجمه). علوم کشاورزی کاربرد. جلد ١.

٣. قوستا، ی. ارشاد، ج. زارع، ر. محمدی گل‌تپه، ا. ١٣٨٥. مطالعه تاکسونومیکی گونه‌های آلترناریا در ایران. بیماری‌های گیاهی، جلد ٤٠. صفحات ٣١-٥٦.

٤. نورانی، س. ل. ١٣٨٦. بررسی گونه‌های بیماریزای *Alternaria* کلزا و تعیین مقاومت نسبی برخی از ارقام کلزا در ایران. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه تربیت مدرس. ١٠٠ صفحه.

5.Bains, P.S., and Tewari, J.P. 1987. Purification, chemical characterization and host-specificity of the toxin produced by *Alternaria brassicae*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 30:71-259.

6.Buchwaldt, L., and Green, H. 1992. Phytotoxicity of destruxin B and its possible role in the pathogenesis of *Alternaria brassicae*. Plant Pathol. 41:55-63.

7.Cavelier, F., Verducci, J., Andre´, F., Haraux, F., Sigalat, C., Traris, M., and Vey, A. 1997. Natural cyclopeptides as leads for novel pesticides: tentoxin and destruxin. Pestic. Sci. 52:81-89.

8.Ferreira, S.A., and Boley, R.A. 1991. *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. raphani* .in: http://extentio.hawaii.edu.

9.Garg, G.K., Kumar, A., Taj, G., Pandey, D., and Singh, U.S. 1999. Rapeseed congress. Australia.

10.Guillemette, T., and Simoneau, P. 2004. Analysis of nonribosomal peptide synthetase gene from *Alternaria brassicae* and flanking genomic sequences. Curr. Genet. 45:214-224.

11.Jasalavich, C.A., Morales, V.M., Pelecher, L.E., and Se´guin-Swartz, G. 1995. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathologic to crucifers. Mycol. Res. 99 (5):604-614.

12.Khandelwal, A., Khumar, A., Taj, G., and Garg, G.K. 1999. Over-expression of P^{53} protein in *Brassica* calli and leaves in response to *Alternaria* pathotoxin(s). Rapeseed congress. Australia.

13.Kim, K.H., Cho, Y., Rota, M.L., Cramerjr, R.A., and Lawrence, C.B. 2007. Functional analysis of the *Alternaria brassicicola* non-ribosomal peptide syntthetase gene *AbNPS2* reveals in conidial cell wall construction. Mol. Plant Pathol. 8: 23-39.

www.SID.ir

Archive of SID

14.Kubota, M., Abiko, K., Yanagisawa, Y., and Nishi, K. 2006. Frequency of *Alternaria brassicicola* in commercial cabbage seed in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 72:197-204.
15.Mcroberts, N., and Lennard, J.L. 1996. Pathogen behavior and plant cell reactions in interactions between *Alternaria* species and leaves host and nonhost plants. Plant Pathol. 45: 742-752.
16.Parada, R.Y., Oka, K., Yamagishi, D., Kodama, M., and Otani, H. 2007. Destruxin B produced by *Alternaria brassicae* does not induce accessibility of host plants to fungal invasion. Physiol. Mol. Plant Pathol**.** Article in press.
17.Pattanamahakul, P., and Strange, R.N. 1999. Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent dark leaf spot disease of *Brassica* species grown in Thailand. Plant Pathol. 48:749-755.
18.Pedras, M.S.C., Biesenthal, C.J., and Zaharia, I.L. 2000. Comparison of the phytotoxic activity of phytotoxin destruxin B and four natural analogs. Plant Sci. 156:185-192.
19.Pedras, M.S.C., Zaharia, I.L., Smith, K.C., Gai, Y., and Ward, D.E. 1999. *Alternaria* blackspot phytoptoxins: new strategies for determining specific disease resistance traits. Rapeseed congress. Australia.
20.Pedras, M.S.C., Zaharia, I.L., Gai, Y., Zhou, Y., and Ward, D.E. 2000. In planta sequential hydroxylation and glycosylation of a fungal phytotoxin: avoiding cell death and overcoming the fungal invader. Plant Biology. 98:747-752.
21.Pedras, M.S.C., Zaharia, I.L., and Ward, D.E. 2002. The destruxins: synthesis, biotransformation, and biological activity. Phytochemistry. 59:576-596.
22.Renshaw, J.C., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., Wiebe, M.G., Livens, F.R., Collison, D., and Taylor, R.J. 2002. Fungal siderophores: structures, functions and applications. Mycol. Res. 106:1123-1142.
23.Sharma, N., Rahman, M.H., Strelkov, S., Thiagarajah, M., Bansal, V.K., and Kav, N.N.V. 2007. Proteome-level changes in two *Brassica napus* lines exhibiting differential responses to the fungal pathogen *Alternaria brassicae*. Plant Sci. 172: 95-110.
24.Schwarzer, D., Finking, R., and Marahiel, M.A. 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. Nat. Prod. Report. 20:275-287.
25.Ward D.E., Gai, Y., Lazny, R., and Pedras, M.S.C. 2001. Probing host-selective phytotoxicity: synthesis of destruxin B and several natural analogues. J. Org. Chem. 66:7832-7840.

www.SID.ir