ارزیابی استیل ترانسفراز مخمر (AYT1) در سم زدایی توکسین فوزاریومی دی اکسی نیوالنول در گیاهان تراریخت

فروغ سنجریان[۱و۲]، امیر موسوی[۱]، عزیزاله علیزاده[۳]، هانا ویندورفر[٤] و گرهارد آدام[٤]

[۱] پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه رازی، کرمانشاه
[۳] دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
[٤] مرکز ژنتیک کاربردی، دانشگاه علوم کشاورزی وین، اتریش

چکیده

Fusarium graminearum عامل بیماری بلایت فوزاریومی گندم، فیتوتوکسین DON را تولید می کند که از دسته تریکوتسنهاست وعلاوه بر تشدید بیماریزایی قارچ عامل، مخاطراتی را برای سلامتی انسان و حیوانات در بر دارد. برای مطالعه راههای احتمالی کاهش تأثیرات DON، ژن استیل ترانسفراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از DNA مخمر توسط PCR جداسازی ، تکثیر و سپس به آگروباکتریوم منتقل گردید . گیاه مدل توتون توسط اگروباکتریوم با این ژن تراریخت شد AYT1 آنزیمی را کد می کند که یک گروه استیل را به گروه هیدروکسیل C3 تریکوتسنها اضافه می کند. بررسیهای ملکولی و آزمونهای در شرایط کشت درون شیشه، حاکی از کاهش سمیت DON و تحمل نسبی به آن در گیاهان تراریخت که نتیجه بیان تراژن مذکور می باشد .

واژه های کلیدی: بلایت فوزاریومی گندم، دی اکسی نیوالنول، استیل ترانسفراز، سم زدایی

مقدمه

قارچ *Fusarium graminearum* بهمراه *F. colmorum* گونه های غالب عامل بلایت فوزاریومی گندم (FHB) در بسیاری از نقاط دنیا هستند (۳۲،۲۱،۳۰). این پاتوژنها، بیماری ویرانگری تحت عنوان اسکب (Scab) تولید می کنند که در گندم، جو وسایر غلات دانه ریز دیده می شود (١٤). دانه های آلوده بصورت بیرنگ و با وزن کمتری هستند و در موارد شدید بیماری، بصورت چروکیده در می آیند (۲۱). قارچ عامل بیماری این قابلیت را دارد که مقدار قابل توجهی از محصول را قبل از برداشت از بین ببرد و باعث خسارت شدید به مزارع شود (۷، ۹، ١٤).

این بیماری در سالهای اولیه قرن بیستم از انگلستان گزارش گردید (١٤) و از آن پس در بسیاری از مناطق جهان مانند آمریکا و کانادا (١٦)، اروپا (۹) و چین (۲۱) گزارش شده است. اسکب در شمال ایران بصورت اندمیک وجود دارد (٤) و گزارشاتی از نقاط دیگر مانند فارس، هرمزگان، مغان، آذربایجان و خوزستان مبنی بر مشاهده این بیماری در آن نقاط ارائه شده است (۱، ۲، ۳، ٥).

علاوه بر خسارت مستقیم وارد شده به مزارع از طریق این بیماری دلیل کاهش عملکرد میکوتوکسینهای فراوانی نیز که توسط قارچ بیمارگر تولید می شود که باعث افت شدید کیفیت محصول آلوده می گردد (۷، ۹، ۱۰، ١٤). از جمله این میکوتوکسینها، تریکوتسنها (Trichothecene) می باشند که مهار کننده های فعال مرکز پپتدیل ترانسفراز ریبوزومهای یوکاریوتی می باشند (۸) و از تولید پروتئین در مراحل طویل شدن (Elongation) (۸ و۲۰) و خاتمه (Termination) (۸) جلوگیری می کنند. یکی از مهمترین

Archive of SID
www.SID.ir

تریکوتسنها، Deoxynivalenol (DON) است. پیشنهاد شده است که DON با جلوگیری از بیان پروتئینهای مرتبط با مقاومت در گیاه، در شدت بیماریزایی پاتوژن نقش دارد (۱۷). اهمیت ویژه DON، اثرات بیماریزای آن در انسان و حیوانات است. این میکوتوکسین در حیوانات باعث بروز علائمی از قبیل اسهال، امتناع از خوردن غذا، آماس پوستی و در انسان نیز باعث بی اشتهایی، تشنج، تهوع و استفراغ، اختلالات عصبی و سیستم ایمنی می شود (۲۶،۱۴،۹). بطوریکه در کشورهای پیشرفته حداکثر مقدار قابل قبول آلودگی به DON در مورد گندم (برای مصرف انسان) ppm ۲-۵/. است ودر جو این مقدار حتی به کمتر از ۵ppm/. می رسد (۷). بدین ترتیب مبارزه با بیماری یا تلاش در جهت کم کردن مقدار توکسین موجود در دانه ارزش ویژه ای جهت تولید غذای سالم در جوامع پیشرفته دارد.

مبارزه شیمیایی با این بیماری غالباً مؤثر واقع نشده و استفاده از قارچ کشها اگرچه ممکن است در کوتاه مدت در کنترل اپیدمیک اسکب مؤثر باشد، اما باعث آلودگی زیاد محیط زیست شده و در عین حال نمیتواند مقدار توکسینهای تولیدی قارچ را به مقدار قابل تحمل برای انسان پایین بیاورد. لذا، لزوم بررسی ژرم پلاسمهای مقاوم و توسعه ارقام متحمل به این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است. از راهکارها موجود جهت توسعه ارقام مقاوم، استفاده از تکنیک دورگه گیری و گزینش بعد از آن است که آن هم با توجه به منابع محدود مقاومت به اسکب در گندم معمولی و چند ژنی بودن آن چندان کارآمد نیست (۱۲). بدین ترتیب لزوم بررسی دقیق تر مکانیسمهای مقاومت به بیماری در سطح مولکولی جهت استفاده بهینه در ارقام حساس و در عین حال بهره گیری از ژنهای مفید متعلق به سایر ارگانیسمها بیش از پیش مورد نیاز می باشد.

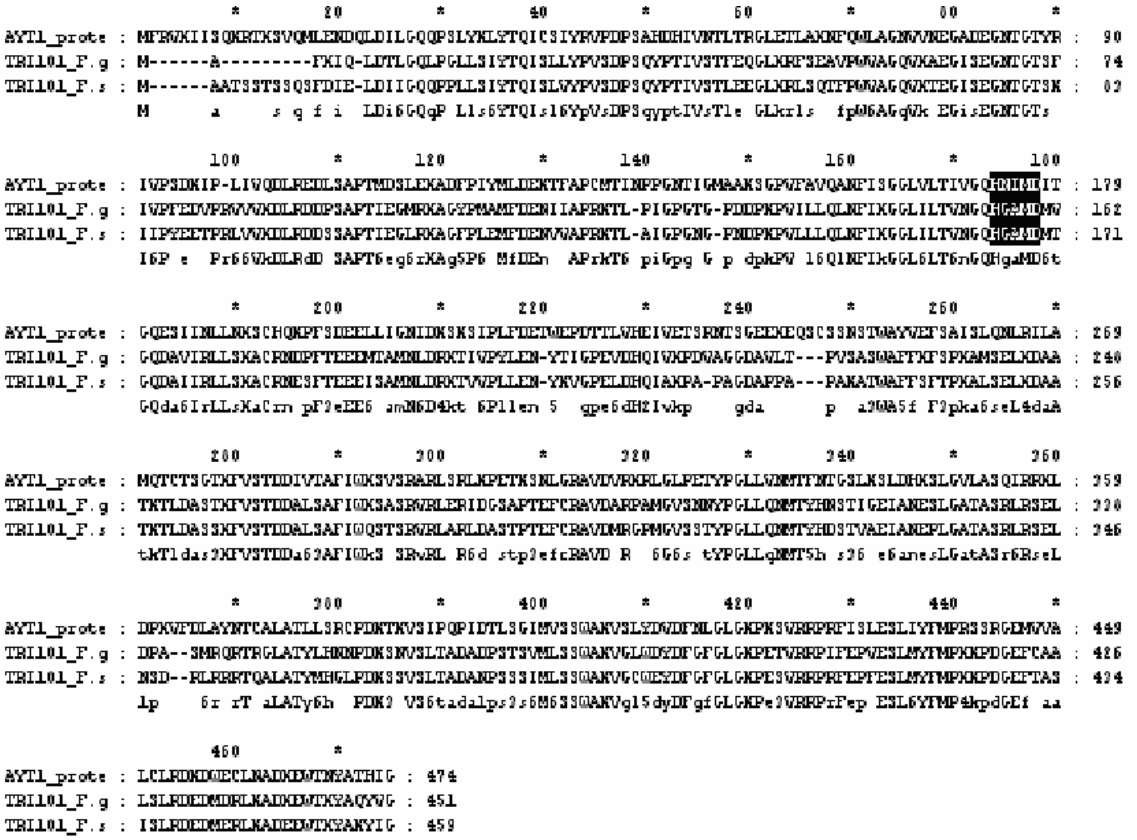
امروزه با استفاده از تکنیکهای مهندسی ژنتیک، ژن مسئول مقاومت می تواند از هر منبعی به گیاه زراعی انتقال داده شود که این امر باعث افزایش تعداد وگوناگونی ژنهای مورد استفاده می شود (۷). از جمله ژنهایی که برای تشدید مقاومت به بیماری اسکب از طریق کاهش تجمع DON مورد استفاده قرار گرفته است، ژن *Tri*101 از قارچ *F. sporotrichioides* است که محصول آن نوعی استیل ترانسفراز بوده که تریکوتسن را به ترکیباتی با سمیت کمتر تبدیل می کند. این آنزیم بهمراه ژنهای دیگر (مانند *pdr*5، ژن کد کننده ناقل ABC) در مکانیسم افزایش تحمل به تریکوتسنها نقش دارد. از لحاظ توالی، بین ژن *Tri*101 و سایر O- استیل ترانسفرازهای فوزاریومی شباهت چندانی وجود ندارد و این ژن از لحاظ اندازه و برخی از موتیفهای مجزا به استیل ترانسفرازهای گیاهی شبیه است (٦). در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* ژن *AYT*1 (ORF-Y1106Bc) شناسایی شده که محصول آن از لحاظ ساختمانی و عملکردی شبیه به TRI101 است (شکل ۱) و بنظر می رسد در حفاظت مخمر در برابر تریکوتسنها نقش دارد (٦).

در پژوهش حاضر، تأثیر استیله شدن میکوتوکسین DON در افزایش تحمل گیاه به آن از طریق انتقال ژن استیل ترانسفراز مخمری *AYT*1 به گیاه مدل توتون و سپس نحوه تحمل به DON در گیاهان تراریخت در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

همسانه سازی ژن *AYT1* : با استفاده از توالی ژن *AYT*1 مخمر موجود در بانک ژن (با شماره دسترسی Z73168 Y13138)، جفت آغازگر زیر جهت همسانه سازی و بررسیهای مولکولی آن طراحی گردید:

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- هم ردیفی پروتئین AYT1 با استیل ترانسفرازهای قارچهای *F.graminearum* و *F. sporotrichioides*. موتیف HXXXD که سایه دار در شکل نشان داده شده است، به احتمال زیاد جایگاه فعال آنزیم است [pfam02458|17151].

AYT1Fw1: 5'–ATCGGATCCGAAGGTAGATGGATGTTTAGAG- 3'

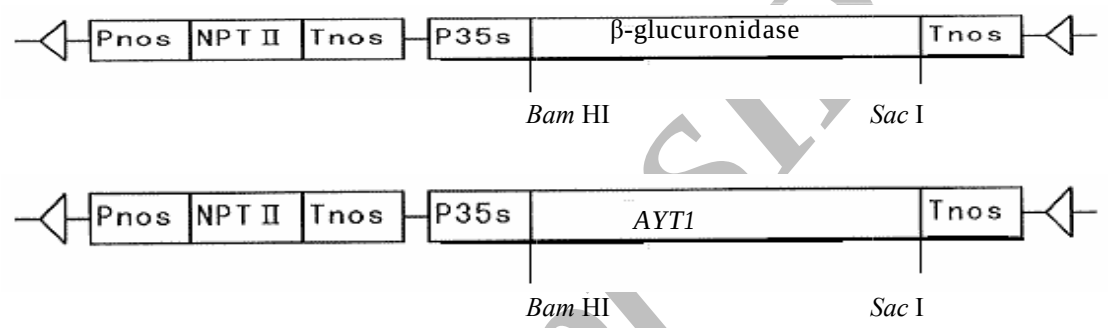
AYT1Re2: 5'–TAGAGCTCATATCATCATCCTATATGTGTAG- 3'

سویه مخمر وحشی با استفاده از کشت مایه خمیر (ایران مایه، تهران، ایران) بر روی محیط YPD (10g/L yeast extract, 20g/L bactopeptone, 20g/L dextrose, 18g/L Agar agar) با تشکیل کلنی منفرد بدست آمد. استخراج DNA از مخمر با استفاده از روش Hoffman and Winston (1987) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده بترتیب با اسپکتروفتومتر و مشاهده بر روی ژل آگارز بررسی شد و این DNA برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. مواد واکنش دهنده در این PCR عبارت بودند از 0.2 mM از هر کدام از dNTP ها، 1.5mM $MgCl_2$، 0.5µM از هر کدام از آغازگرهای AYT1Fw1وAYT1Re2 ، 50 ng از DNA ژنومی بعنوان الگو و1 unit از آنزیم *Pfu* DNA polymerase (Fermentas). شرایط دمایی واکنش شامل، دمای واسرشت شدن اولیه ۹۳ درجه سانتی گراد بمدت سه دقیقه، سپس ۳۰ سیکل تکرار دمای واسرشت شدن ۹۳ درجه سانتی گراد بمدت ٦٠ ثانیه ، دمای اتصال ٦٠ درجه سانتی گراد بمدت ٦٠ ثانیه و دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ٦٠ ثانیه بود. بعد از اتمام این سیکل، دمای طویل شدن نهایی۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه بود.

ساخت سازه های ژنی: محصولات PCR پس از برش دوگانه با آنزیمهای *Bam*HI و *Sac*I (که در آغازگرها طراحی شده و در قطعه مورد نظر فاقد محل برش بودند) و با استفاده از آنزیم T4 Ligase (Fermentase) در جایگاه همسانه سازی چندگانه پلاسمید pBluescript SK (Strategen) همسانه سازی وسپس توالی یابی شدند. توالی یابی توسط شرکت MWG -Biotech (Ebersburg,

Archive of SID
www.SID.ir

(Germany) انجام گرفت. جهت هم ردیفی توالیهای به دست آمده با سایر توالیهای موجود در GenBank از جستجوگر BLASTP Ver. 2.2.10 [Oct-19-2004] در بانک ژن NCBI استفاده شد. قطعه مورد نظر با استفاده از برش آنزیمی توسط دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I در دو انتهای قبل از این قطعه، از پلاسمید pBluescript SK خارج و با استفاده از T4 Ligase در پلاسمید دوگانه pBI121 (Clontech) همسانه سازی گردید. T-DNA پلاسمید pBI121 دارای ژن *nptII* (عامل ایجاد مقاومت به کانامایسین) بعنوان نشانگر انتخابی در باکتری و گیاه است. همچنین ژن گزارشگر GUS بین راه انداز 35S و پایان دهنده NOS در این قسمت طراحی شده است که قطعه مورد نظر جایگزین این ژن گردید (شکل ۲). در عین حال پلاسمید pBI121 بدون اتصال به قطعه نیز بعنوان ناقل کنترل در آزمایشات تراریختی بکار گرفته شد.



شکل ۲- سازه مورد استفاده در تراریخی با جایگزین کردن ژن *β- glucuronidase* با ژن *AYT1* توسط برش آنزیمی دوگانه با آنزیمهای *Sac* I و *Bam* HIساخته شد.

تراریختی گیاه توتون: در ابتدا سازه نوترکیب ساخته شده و همچنین پلاسمید بدون قطعه AYT1 (حاوی ژن گزارشگر GUS)، به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 از طریق روش انجماد و ذوب (۱۵) انتقال یافت. تراریختی گیاهان توتون با ساختارهای ژنی موجود، از طریق آلوده سازی قطعات برگی (Leaf disc) انجام شد (۱۵). باززایی و انتخاب لاینهای تراریخت در محیطهای کشت انتخابی حاوی ۵۰ mg/ml کانامایسین انجام پذیرفت. در مرحله شش تا هشت برگی، گیاهان تراریخت به گلدان منتقل گردیدند و در شرایط کنترل شده (شامل چرخه ۱۶ ساعت نور و۸ ساعت تاریکی، ۱۴۰µmol m^{-2} sec^{-1} نور سفید، و۲۵ درجه سانتی گراد)، نگاهداری شدند. بذرهای حاصل خود لقاحی نسل T0 جمع آوری و برای آنالیز های فنوتیپی استفاده شد

آزمون مقاومت به توکسین DON : بذرهای برداشت شده از گیاهان تراریخت با استفاده از وایتکس ۳۰ درصد، استریل و در محیط استاندارد MS محتوی ۲ درصد سوکروز و ۷/ درصد آگار برروی مشهای ضد زنگ استریل قرار داده شد. جهت همزمانی رشد، پلیتها بمدت یک شبانه روز در تاریکی و در دمای ٤ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس بمدت ۱۰ روز در شرایط کنترل شده رشد داده شدند. جوانه ها در مرحله دو برگی به محیط کشت مایع MS محتوی ۵ ppm از DON برده شدند که بعد از پنج روز این محیط با MS مایع محتوی ۱۰ ppm از DON تعویض شد. نحوه و میزان رشد و نمو گیاهان تحت تیمار بمدت دو هفته مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

بررسیهای مولکولی گیاهان تراریخت: جهت اثبات ورود ژن *AYT*1 به گیاه، DNA ژنومی از بافت برگ با استفاده از روش CTAB (۱۳) استخراج گردید و با همان شرایط

Archive of SID
www.SID.ir

واکنش PCR ذکر شده تکثیر گردید با این تفاوت که در این واکنش از آنزیم *Taq* DNA polymerase (Cinna Gen, Iran) استفاده شد.

RNA کل گیاهان تراریخت نیز به روش Chomczynski and Sacchi (1987) از برگ گیاه استخراج گردید و cDNA با استفاده ازآغازگر اختصاصی AYT1ReNe4 ساخته شد. شرایط ساخت اولین رشته cDNA عبارت بود از : 20 nM از هر کدام از dNTP ها ، 50 pM از آغازگر AYT1ReNe4 ، 2µg از RNA تام و 40 unit از آنزیم AMV Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim, Germany)، که بمدت یک ساعت در دمای ٤٢ درجه سانتی گراد قرار می گرفت. برای ساخت رشته دوم و تکثیر cDNA از واکنش PCR استفاده گردید که مواد واکنش دهنده آن عبارت بودند از : 0.2mM از هر کدام از dNTP ها، 0.75 mM $MgCl_2$ ، 0.5 µ از هر کدام از آغازگرهای AYT1FwNe3 و AYT1ReNe4 ، 1µL از cDNA ساخته شده، 1 unit از آنزیم *Taq* DNA polymerase (Cinna Gen, Iran) . از آغازگرهای 18S RNA بعنوان کنترل مثبت واکنش RT-PCR استفاده گردید. این آغازگرها عبارت بودند از:

18SFw: 5' - CTTCGGGATCGGAGTAATGATTAA -3'

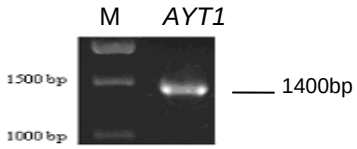
18SRe: 5' - GCCGAGAACATCTAAGGGCATCACAGA - 3'

(۲۲). شرایط واکنش همانند واکنش با آغازگرهای اختصاصی AYT1 بود و همزمان با آن انجام می گرفت.

نتایج

محصولات PCR از DNA ژنومی مخمر توسط آغازگرهای طراحی شده بصورت باند منفرد و در اندازه مورد انتظار (١/٤Kb) بر روی ژل ظاهر شدند (شکل ۳).

تعیین ترادف قطعات همسانه سازی شده این محصولات و مقایسه آنها با توالی موجود در بانک ژن، صحت توالیهای مورد استفاده را بدون هیچگونه تغییر در بازها تأیید کرد.



شکل ۳- همسانه سازی ژن *AYT1* از DNA ژنومی مخمر بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز. M: 1Kb Ladder (Fermentas) .

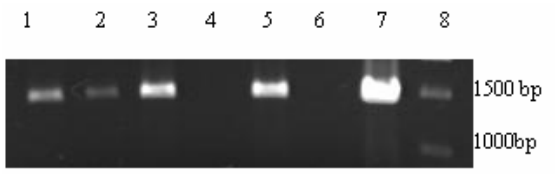
پس از همسانه سازی محصولات PCR در پلاسمید دوگانه pBI121، سازه بدست آمده در تراریختی گیاهان توتون از طریق آگروباکتریوم بکار رفت. تعداد ۱۵ لاین تراریخت شده با ژن *AYT*1 بدست آمد. ساختارهای فاقد ژن *AYT*1 (پلاسمید pBI121) نیز برای بررسی تأثیر مراحل تراریختی، به توتون انتقال داده شد که ۷ دودمان تراریخت شده با این ناقل نیز به دست آمد. در مقایسه با توتونهای غیر تراریخت، گیاهان بدست آمده از لحاظ ظاهری تفاوتی را نشان نمی دادند که مشخص کننده عدم تأثیرات مورفولوژیک ژن *AYT*1 بر روی این گیاه است.

با استخراج DNA از دودمانهای تراریخت وتکثیر آن توسط آغازگرهای اختصاصی و مشاهده باند ١/٤ Kb، وجود DNA مربوط به *AYT*1 در لاینهای تراریخت اثبات شد. این باند در لاینهای تراریخت شده با ناقل پلاسمیدی و همچنین در توتون غیر تراریخت مشاهده نشد (شکل ٤).

RT-PCR از روی RNA استخراج شده از گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نیز باند مورد نظر را نشان می داد که نشانگر بیان ژن در سطح رونویسی در گیاهان تراریخت است. چون ژن مورد استفاده فاقد اینترون است، آلودگی با DNA ژنومی در این مرحله می تواند باعث جواب مثبت کاذب شود، لذا با استفاده از واکنش کنترل منفی، یعنی واکنش RT-PCR در غیاب آنزیم Reverse Transcriptase مشخص شد که RNA استخراجی فاقد آلودگی با DNA است. همچنین برای واکنش کنترل مثبت RT-PCR از آغازگرهای اختصاصی

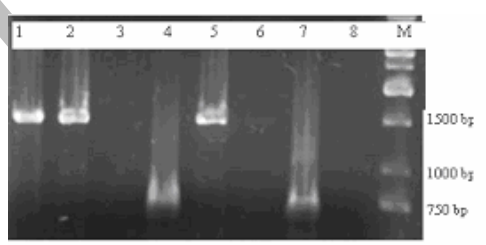
Archive of SID
www.SID.ir

18S RNA استفاده گردید و با مشاهده قطعه ٦٠٠ bp مورد نظر، کیفیت RNA و واکنش RT-PCR مورد تأیید قرار گرفت (شکل ٥).



شکل ٤ – محصولات PCR گیاهان تراریخت توتون با استفاده از آغازگر های اختصاصی ژن *AYT1*. چاهکها به ترتیب عبارتند از:

۱: لاین AYT16B؛ ۲: لاین AYT110C؛ ۳: لاین AYT14A؛ ٤: لاین pBI1212A؛ ٥: لاین AYT18B؛ ٦: توتون نوع طبیعی(Wt)؛ ۷: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121-AYT1)؛ ۸: 1 Kb Ladder (Fermentas).



شکل ٥- محصولات RT-PCR از لاینهای توتون تراریخت شده با *AYT1*. چاهکها بترتیب عبارتند از:

۱: کنترل مثبت PCR با پلاسمید PBI121-*AYT1*؛ ۲: لاین AYT1 8B؛ ۳: کنترل منفی از لاین AYT1 8B. بدون آنزیم RT؛ ٤: کنترل مثبت با آغازگرهای 18S از لاین AYT1 8B؛ ٥: لاین AYT1 4A؛ ٦: کنترل منفی از لاین AYT1 4A بدون آنزیم RT؛ ۷ : کنترل مثبت با آغازگرهای 18S از لاین AYT1 4A؛ ۸: کنترل منفی PCR.

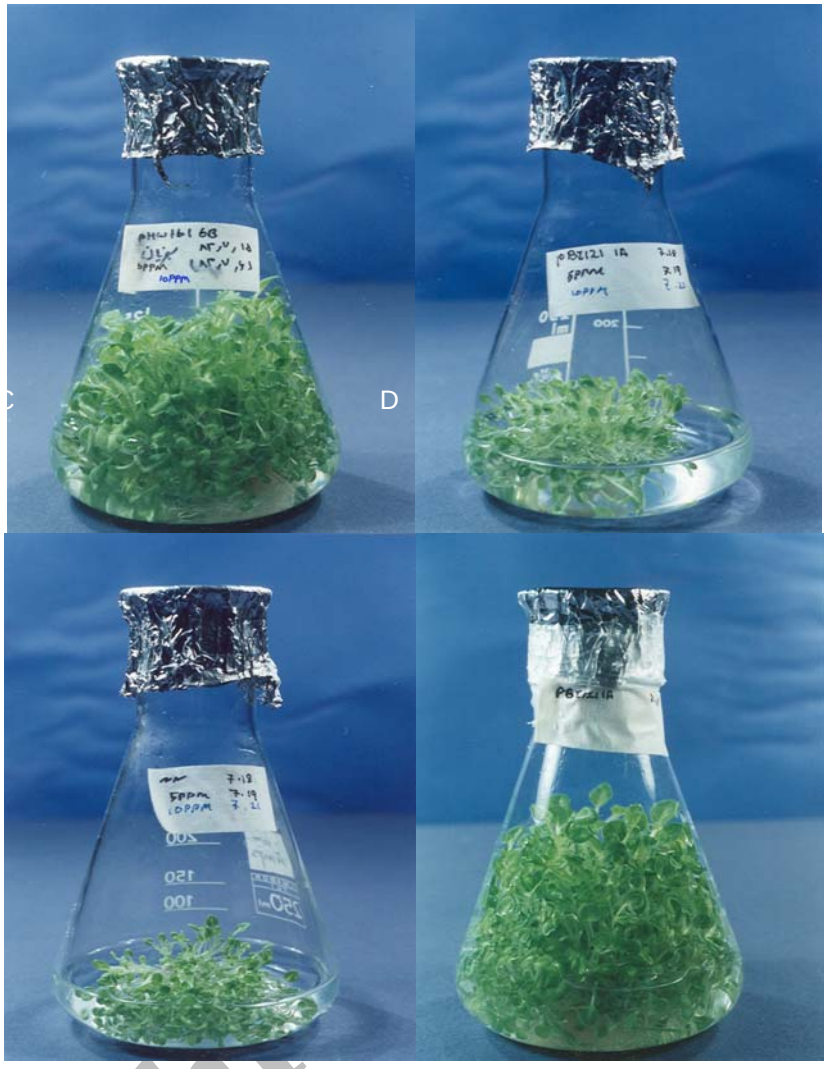
در آزمایشات فنوتیپی در ابتدا بذور بدست آمده از خود تلقیحی گیاهان T0 در محیط جوانه زنی حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت گردیدند. عدم سفید شدن دانه رستها در این محیط در مقایسه با بذور جوانه زده نوع وحشی، حاکی از تراریخت بودن احتمالی این دودمانهای بود. بمنظور بررسی میزان و نحوه مقاومت دودمانهای تراریخت شده، بذور حاصل از خود تلقیحی گیاهان نسل اول تراریخت پس از جوانه زنی و در مرحله دو برگی به محیط کشت مایع حاوی مقادیر حداقل(4 ppm) از میکوتوکسین DON انتقال یافته و پس از یک هفته نهایتاً به محیط حاوی 10 ppm از DON منتقل شدند. مقایسه دودمانهای مختلف گیاهان تراریخت و شاهد و مقایسه آنها با شرایط کشت بدون DON، حاکی از اثر ممانعت کنندگی این توکسین بر روی رشد و توسعه اندام های سبز و ریشه گیاهان نوع وحشی و نیز گیاهان تراریخت حاوی پلاسمید شاهد pBI121 بود. این در حالی است که دودمانهای تراریخت AYT1 در محیط حاوی DON دارای الگوی طبیعی رشد و قابل مقایسه با تیمارهای بدون DON بودند (شکل ٦).

بحث

قارچ *F. graminearum* ترکیبات و متابولیتهای ثانویه ای را تولید می کند که عوامل بیماریزا برای انسان وهمچنین گیاهان هستند (۳). یکی از راههای مقابله با این عوامل تغییر در ساختمان آنها بمنظور کاهش سمیتشان است که معمولا توسط آنزیمهای سم زدا صورت می گیرد. از جمله این آنزیمها می توان گلوتاتیون S- ترانسفراز (۲۷) و ZHD101 (۱۸) را نام برد که باعث سمیت زدایی از میکوتوکسین استروژنی زیرالنون می شوند.

گروه هیدروکسید موقعیت ۳ میکو توکسین DON باعث تشدید سمیت می شود (۳۱) و تغییر این گروه بطوریکه DON تبدیل به ۳- کتو ٤- دی اکسی نیوالنول (۳۰، ۳٤) یا DON-۳- O- گلیکوزید (۲۹) شود باعث کاهش سمیت آن می شود. استیل ترانسفراز مخمری (AYT1)،

Archive of SID
www.SID.ir

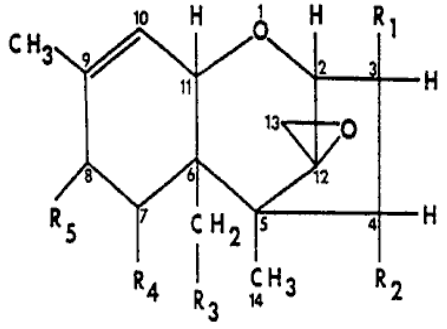


شکل ٦- الگوی رشد لاینهای مختلف توتون در حضور یا عدم حضور DON. A, B وC بترتیب شامل توتونهای تراریخت شده با ساختار ژنی *AYT1*، گیاهان تراریخت شده با ناقل پلاسمیدی بدون قطعه خارجی و گیاهان غیر تراریخت در حضور 10 ppm از توکسین DON است. D: گیاهان تراریخت شده با ناقل پلاسمیدی در عدم حضور توکسین را نشان می دهد. ناقل پلاسمیدی فاقد هر گونه تأثیر بر روی رشد گیاهان بوده و تنها توتونهای تراریخت شده با ساختار ژنی *AYT1* تحمل به توکسین DON را نشان می دهد.

DON را به 3A-DON تبدیل می کند (شکل ۷) که سمیت آن حداقل دو بار کمتر از DON است (۲۹) و عملکردی مشابه استیل ترانسفراز فوزاریومی TRI101 دارد. پیشنهاد شده است *Tri101* از جمله ژنهای درگیر در حفاظت از خود در قارچهای تولید کننده تریکوتسنهاست (۲۳). بعلاوه TRI101 از آنزیمهای حد واسط تولید تریکوتسنها است (۲۵) که گروه استیل اضافه شده توسط آن در مراحل بعدی توسط TRI8 برداشته می شود (۲٤). در توتونهای تراریخت یافته با ژن Fs*Tri101*، افزایش میزان تحمل بهDON نشان داده شده است (۲۸). مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن *AYT1* از مخمر نیز موجب افزایش مقاومت به DON در توتون تراریخت می شود. بمنظور بررسی چگونگی بیان ژن *AYT1* در سطح ترجمه، تولید آنتی بادی اختصاصی این پروتئین و بررسیهای ایمونولوژیک گیاهان تراریخت بدست آمده، در مراحل بعدی این پژوهش مد نظر می باشد. همچنین آنالیزهای بیوشیمیایی جهت بررسی

www.SID.ir

ماهیت تغییراتی که توسط آنزیم AYT1 در ساختمان DON انجام می گیرد و سبب کاهش سمیت این توکسین می شود، در کشت گیاهان تراریخت در دست بررسی است. از آنجایی که DON فاکتور تشدید بیماری است، بنظر می رسد بیشترین نقش AYT1 در تحمل به DON و مراحل بعد از آلودگی اولیه مشخص شود (۳۳). بطور کلی کم کردن مقدار DON باعث افزایش کیفیت غلات می شود و همچنین در مقاومت به قارچ *F. graminarum* نیز نقش بسزایی ایفا می کند.



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
T-2 Toxin	OH	CH_3COO-	CH_3COO-	H	$(CH_3)_2$ $CHCH_2COO$-
Diacetoxyscirpenol	OH	CH_3COO-	CH_3COO-	H	H
Deoxynivalenal	OH	H_2	OH	OH	O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	O

شکل ۷- ساختار شیمیایی دی اکسی نیوالنول و تریکوتسنهای دیگر(www.ivis.org) . ۳-استیل دی اکسی نیوالنول در موقعیت R_1 خود بجای گروه OH موجود در DON دارای گروه استیل می باشد.

نکته قابل بحث دیگر این است که توسعه غلات دانه ریز تراریخت مقاوم نسبت به FHB گرچه جذاب و کارآمد بنظر می رسد اما نباید موانعی نظیر مشکل بودن بدست آوردن گیاهان تراریخت موفق، تأثیر ژنوتیپ روی باززایی گیاه، تنوع سوماکلنی و سایر فاکتورهای ایجاد کننده تنوع را از نظر دور داشت (۱۲).

از سوی دیگر، برخی از محققین تلاش کرده اند که از آزمون حساسیت به DON برای معرفی روشی سریع در غربالگری گیاهان مقاوم استفاده کنند. در این روش ها، از قابلیت DON در جلوگیری از رشد کالوس و پروتوپلاست (۱۶)، رشد دانه رستها (۳۳،۲۳) و رشد ریشه و کشت بافت (۱۶) استفاده شده است.در مطالعه حاضر، اثر ممانعت کنندگی توکسین در رشد گیاهچه ها مورد بررسی قرار گرفت. این آزمون قبلاً نیز در بررسی مقاومت فنوتیپی گیاهان حاوی ژنهای جهش یافته Ribosomal Protein L3 (RPL3) گوجه فرنگی(۲۶ Renu *et. al* , unpublished , data) بکار رفته است که فنوتیپهای بدست آمده با نتایج این تحقیق هم خوانی داشته و آن را تأئید می نماید. با توجه به مقدار کم توکسین مورد مصرف و کارایی نسبتاً مطلوب این آزمون در مقایسه با دیگر آزمونها، این روش از لحاظ اقتصادی مقرون بصرفه است که با اندکی تغییرات می توان آن را در مورد غلات دانه ریز نیز بکار برد.

تشکر وقدردانی: نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، طرح ۱۵۹، بدلیل فراهم آوری امکانات انجام این پروژه و دفتر همکاریهای فن آوری ریاست جمهوری بدلیل حمایتهای مالی قدردانی می نمایند.

منابع

۱- بابادوست، م. (۱۳۷٤). وقوع گونه های فوزاریوم در بذور گیاهان گندم آذربایجان شرقی و اردبیل. مجله بیماریهای گیاهی. ۱۰۰-۸۸ :۳۱

۲- فروتن، ع.، ارشاد، ج.، دلیلی، ع. و گرامی، ق. (۱۳۷۲). شیوع بلایت خوشه گندم در مازندران. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه گیلان. رشت.ص: ۳۳

Archive of SID
www.SID.ir

۳- علیزاده، ع.، سعیدی، ع.(۱۳۸۳). اثر متابولیت های گیاهی بر روی تولید توکسین در عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم و بررسی یک روش بیوکنترلی جدید. گزارش پیشرفت پروژه ملی فوزاریوم. SPII. کرج. ایران (۲۲٦ صفحه).

٤-گلزار، ح. (۱۳۷۲). بررسی پراکندگی فوزاریوم خوشه گندم در مناطق گرگان و گنبد و میزان حساسیت ارقام تجارتی. مجله بیماریهای گیاهی.۲۲-۱۷ :۲۵

۵- موسوی جرف، س. م.، (۱۳۸۲). اولین گزارش از بلایت فوزاریومی گندم در استان خوزستان ایران. مجله بیماریهای گیاهی.۸۰-۷۰ :۳۹

6- Alexander N. J,.McCormick S. P., Hohn T. M. 2002. The identification of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *AYT1* (ORF-YLL063c) encoding an acetyltransferase. Yeast.19:1425-30

7- Bai G. 2004. Managment and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. Annu. Rev. Phytopathol. 42:135-161

8- Barbacid, M., Vazquez, D. 1974. Binding of acetyl- C^{14} trichodermin to the peptidyl transferase center of eukaryotic ribosome**.** Eur. J. Biochem 44: 437-444

9- Buerstmayr H.. Steiner B.. Hartl L. 2003. Molecular mapping of QTL for fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. Theor Appl. Genet. 107: 503-8

10- Burstmayr, H., Lemmens, M., Gransgruber, H., Ruckenbaure, P. 1996. Scab resistance of international germ plasm. Cereal Res. Comm. 24: 197-202

11- Chomczynski P, Sacchi. N.1987. "Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform extraction." Anal. Biochem. 162: 156-9.

12- Dahleen L. S, Okubara P A., Bleechl A.E.2001. Transgenic approchese to combat fusarium head blight in wheat and barley. Crop Sci. 41:627-638

13- Doyle, J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bulletin 19:11-15.

14- Goswami R. S., Kistler H. C.2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol. Plant. Pathol. 5: 515-525

15- Harisch R. B., Fry J., Hoffmann N., Nidermeyer J., Rogres S. G., Fraley R. T. 1988. Leaf disc transformation; in *Plant molecular biology manuual.*(eds). S. B Gelvin and R. A Schilperoort (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers). pp: 1-9

16- Harris, L.J., Gleddie, S.G. 2001. A modified RPL3 gene from rice confers tolerance of *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol to transgenic tobacco. Physio. Mol. Plant Path**.** 58: 173-181.

17- Hariss L.J, Desjardin. A. E., Planter R.D.1999. "Possible role in trichothecene mycotoxins in virulace of *Fusarium graminearum* on maize." Plant Disease. 83: 954-960.

18-Higa A., Kimura M., Mimori K.2003. Experation in cereal plants of genes that inactive fusarium mycotoxin. Biosci. Biothechnol. Biochem. 67: 914-8

19- Hoffman C.S. Winston. F.1987. "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmid for transformation of *Esherichia coli.*" Gene 57: 267-72

20- Fried H. M., Warner J. R..1981. Cloning of yeast gene for trichodermin resistance and ribosomal protein L3. Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 78: 238-42

21- Jenkinson P., Parry D.W. 1994. Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum.* Mycol. Res. 98: 506-10

22- Kawata M., Matsumura Y., Oikawa T., Kimuzu M., Fukumoto F., Kuradus S. 2003. Analysis of DNA extraction buffer components from plant tissue by polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 18:314-7

23- Kimura M, Kaneko I., Komiyama M.1998. "Trichothecene3-O-acetyltransferase protects both the producing organisms and transformed yeast from related mycotoxins." J.Biol.Chem 237: 164-1661.

24- McCormik S. P., Alexander N. J. 2002. *Fusarium* Tri8 encodes trichothecene C-3-estrase. Appl. Environm. Micribiolo. 68: 2959-2964

25- McCormik S. P., Alexander N. J., Trapp S. E., Hohn T. M. 1999. Disruption of *TRI101*, the gene encoding thrichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides.* Appl. Environ. Microbiol. 65: 5252-5256

Archive of SID
www.SID.ir

26- Mitterbaure R, Poppenberger B, Raditsching A. Adam G. 2004. Toxin-dependent utilization of engineered ribosomal protein L3 limits trichothecene resistance in transgenic plants. J. Plant . Biotechol. 2: 329-340

27- Mohammadi M., Allameh A., Koursandi H. 2000. Change in glutathione S-transferase acting and zeralenone content in susceptible and tolerant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum,* the causal agent of fusarium head scab. J. Sci**.** 11: 175-180

28- Muhitch M. J., McCormick S. P., Alexander N. J., Hohn T. M. 2000. Transgenic expression of *Tri101* or *PDR5* gene increase resistance in tobacco to the phytotoxic effects of trichothecenes 4, 15 diacetoxyscripenol. Plant Sci. 157: 201-207

29- Poppenberger B., Berthiller F., Lucyshin D., Siebere T., Schuhmacher R.,Kuchler K., Glossel J., Luschning C., Adam, G. 2003. Detoxification of fusarium mycotoxin deoxynivalenol by UDP-glycosyltransferases from *Arabidopsis thaliana.* J. Biol. Chem**.** 278: 47905-14.

30- Ruckenbauer P., Buerstmayr H., Lemmens M. 2001. Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). Euphyti ca.119:121-127

31-Shima J., Takase Sh., Iwai Y. 1997. Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin Deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. Appl. Environ.l Microbiol. 63: 3825-3830

32- Sewald N., Lepschy J., Gleissenthall V. 1992. Structure elucidation of a plant metabolite of 4-dioxynivalenol. Tetrahedron: Asymmetry. 3: 953-60

33- Snijder C.H.A. 2004. Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. Toxicol. Letters.153: 37-46

34-Volkl A., Vogler B., schollenberger M., Karlovsky P.2004. Microbial detoxification of mycotoxin deoxynivalenol. J. Basic. Microbiol. 44: 147-65

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of the yeast acetyltransferase (AYT1) in detoxification of the *F. graninearum* toxin deoxynivalenol in transgenic plants

Forough Sanjarian[1, 2], Amir Mousavi[1], Azizollah Alizadeh[3], Hanna Weindorfer[4], Gerhard Adam[4]

[1]National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran
[2] Biology Division, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran
[3]College of Agriculture, University of Tarbiat Modarres, Tehran, I.R. of Iran
[4] Center of Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna, Austria

Abstract

The primary causal agent of FHB (*F. graminearum*) can produce deoxynivalenol (DON), a trichothecene mycotoxin that enhances disease severity and poses a health hazard to human and monogastric animals. To study the possible ways for reducing the effect of DON, an acetyltransferase (*AYT1*) gene from yeast was cloned and transformed into tobacco as a model plant. *AYT1* encodes an enzyme that transfers an acetyl moiety to the C3 hydroxil group of trichothecene. The results of in vitro culture resistance tests suggested detoxification and partial protection against DON mycotoxin in transgenic plants.

Key words: *Fusarium* head blight. deoxynivalenol. acetyltransferase. detoxification.

Archive of SID

www.SID.ir