بهینه سازی تولید پروتوپلاست از قارچ بیماریزای گیاهی *Fusarium garminearum* به منظور تراریختی آن

سهراب مرادی[۱و۲]، فروغ سنجریان[۱،*] و ناصر صفایی[۳]

[۱] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۲] تهران، دانشگاه پیام نور تهران

[۳] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۱۶

چکیده

در این مطالعه، *Fusarium graminearum* قارچ رشته‌ای اسکومیست که باعث همه‌گیریهای شدید بلایت فوزاریومی سنبله گندم در دنیا و آلودگی دانه ها به میکوتوکسین‌های تریکوتسنی می‌شود، مورد استفاده قرار گرفته است. از راههای مؤثر در مطالعه برهم کنش گیاه – پاتوژن و ارزیابی مکانیسم بیماریزایی و مطالعات ژنومی قارچهای پاتوژن گیاهی، تراریختی قارچ است. در دسترس بودن یک سیستم تراریختی مؤثر، امکان مطالعه در زمینه های اپیدمیولوژی و تغییرات ژنی و همچنین به کارگیری روشهایی نظیر تخریب ژن یا خاموش کردن ژن، امکان بررسی نقش تولیدات قارچ در بیماریزایی را فراهم می آورد.

در روش های معمول تراریختی قارچ های رشته‌ای مانند گونه های فوزاریوم، تهیه پروتوپلاست، اولین گام است. در طی این بررسی، مطالعه تاثیر مقدار اسپور، زمان در معرض‌گیری با آنزیم و سن میسلیومها در تهیه پروتوپلاست مورد ارزیابی قرار گرفته است.

واژه های کلیدی: تراریختی قارچ، پروتوپلاست، *Fusarium graminearum*، آنزیم های هیدرولیز کننده

* نویسنده مسئول، تلفن : ۴۴۵۸۰۴۵۳-۰۲۱ پست الکترونیکی: fsanjarian@nigeb.ac.ir

مقدمه

بیماریهای غلات هر ساله باعث از دست رفتن ۱۰ درصد از محصولات می شوند و در این میان پاتوژنهای قارچی سهم عمده ای در این خسارت دارند (۱۹). بیماری بلایت فوزاریومی خوشه Fusarium Head Blight (FHB) از جمله بیماریهای مهم قارچی غلات و خصوصاً گندم در سرتاسر دنیا محسوب می گردد. این بیماری در نقاط مرطوب و نیمه مرطوب شیوع بیشتری دارد (۲۲). در ایران نیز این بیماری از سالها پیش وجود داشته (۲) و تقریباً از تمام نقاط کشت گندم در ایران گزارش شده است (۷، ۶، ۳، ۱).

کاهش تعداد، وزن و مقدار پروتئین و گلوتن در دانه وهمچنین عدم مرغوبیت آرد دانه ها برای نانوایی از جمله خسارتهای بیماری است. علاوه بر این، تولید وتجمع مقدار متنابهی از میکوتوکسین های تولیدی قارچ در دانه ها، باعث افت شدید کیفیت محصول می گردد (۹،۱۹). این میکوتوکسین ها عوارض متعددی در انسان و دام مصرف کننده دانه آلوده تولید می کنند (۱۳) که از جمله آنها می توان به کم خونی، تهوع، کاهش ایمنی و بی اشتهایی اشاره کرد(۲۰).

در حدود ۲۰ گونه از جنس فوزاریوم به عنوان عامل بیماری گزارش شده اند که اصلی ترین و غالب ترین عامل آن Schwab *Fusareaum graminearum* با فرم جنسی *Gibberella zeae* (Schweinitz) Petch (۱۳) است که یک قارچ اسکومیست هموتالیک (۱۱) محسوب می گردد. کلید های شناسایی مختلفی توسط محققان برای رده بندی فوزاریوم در سطح گونه و پایین تر تا کنون توسعه یافته است. تنوع ژنتیکی در گونه های ایرانی نیز با استفاده از

Archive of SID
www.SID.ir

نشانگرهای بیوشیمیایی و ایزوآنزیمی (۵) و نشانگرهای مولکولی (۴) مورد بررسی قرار گرفته است.

ژنوم این قارچ که در کل۳۶/۱ Mb است به طور کامل توالی یابی شده است. با توجه به هاپلوئید بودن، این ژنوم در چهارکروموزوم (n=4) بسته بندی شده است که نسبت به سایر گونه های فوزاریوم با اندازه ژنوم مشابه تعداد کمتری کروموزوم دارد (۱۰). در این ژنوم حدود ۱۳۹۰۰ توالی کاندید ژن تخمین زده شده که تعداد زیادی از آنها تعیین خصوصیت شده اند و عملکرد بسیاری از آنها نیز ناشناخته است (۲۱).

تراریختی سلول با DNA همسانه سازی شده به دلیل اینکه امکان تغییر ونمایش ژنهای مورد علاقه را در سلولهای زنده می دهد، روش مفیدی برای مطالعه عملکرد ژنها در میکروارگانیسم هاست و هنگامی که با داده های ژنوم با هم استفاده شوند بسیار کارآمد خواهد بود. یکی از راههای مؤثر برای مطالعه مکانیسم بیماریزایی در قارچ و بررسی مسیرهای بیوشیمیایی مربوط به آن، تخریب ژنها به طور هدف دار یا بدون هدف است، که این مسئله توسط تکنیکهای تراریختی قارچ امکان پذیر است. قارچها دارای دیواره سلولی مستحکمی تشکیل شده از کیتین، ۳،۱ بتا و ۶،۱ بتا گلوکان، مانان و پروتئینها هستند (۸) انتقال DNA به پروتوپلاست، روشی است که بیش از همه مورد استفاده قرار می گیرد (۱۸). کیتین ترکیب کلیدی دیواره قارچ هاست و با سایر ترکیبات ارتباطات متقاطعی را تشکیل می دهد و نقش مهمی در رشد و نگهداری قطبیت میسلیومها ایفاء می کند (۱۵). علاوه بر کیتین، گلوکان و سایر ترکیبات قندی در دیواره سلولی قارچها، پروتئینهای مختلفی نیز وجود دارند که در برخی از اعمال قارچ نظیر رشد ساپروفیت بر روی گیاه و تکثیر غیر جنسی آن دخیل هستند (۱۹). جهت تولید پروتوپلاست از قارچها، ازآنزیم کیتیناز به همراه مخلوطی از آنزیمهای سلولاز، گلوکاناز، لامیناریناز و پروتئاز استفاده به عمل می آید و معمولاً از یک نشانگر انتخابی مانند مقاومت به هیگرومایسین برای جداسازی همسانه های تراریخت استفاده می شود.

مواد و روشها

تهیه اسپور از قارچ: برای تهیه اسپور از قارچ، محیطهای مختلف مورد بررسی قرار گرفتند که عبارت بودند از:

محیط برگ میخک، Carnation Leaf (CL) : این محیط با ترکیب ۵ گرم برگ خرد شده میخک در ۱۲۰–۱۰۰ میلی لیتر آب که به دو صورت مایع و جامد (حاوی ۱/۵درصد آگار) تهیه شد.

محیط Spezieiller Nohrstoffarmer (SN) : ترکیبات این محیط شامل، ۱ گرم KH2Po4 ، ۱ گرم KNo3 ، ۰/۵ گرم KCl ، ۰/۵ گرم MgSo4*7H2O ، ۰/۲ گرم Glucose ، ۰/۲ گرم Sucrose بود و به دو صورت مایع و جامد(حاوی ۱/۵درصد آگار) تهیه شد.

محیط ماش Mung bean (MB) : این محیط با ترکیب ۱۰ گرم گلوکز در یک لیتر عصاره ماش (برای تهیه عصاره، ۲۰۰ گرم ماش در ۱ لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد) تهیه شد.

محیط ساده Simple Media (SM) : با ترکیب ۵ گرم پودر کاه گندم در ۱۲۰ میلی لیتر آب، که به صورت مایع استفاده شد.

شرایط برای گرمخانه گذاری در تمامی محیطها یکسان و در دمای ۳۰–۲۸ درجه سانتی گراد در زیر نور فلورسنت نزدیک بود. در کشت مایع از شیکر ۱۲۰ دور در دقیقه نیز استفاده شد. برداشت اسپورها از محیط مایع توسط صافی انجام می گرفت. اسپورها از محیط کشت جامد با ریختن یک میلی لیتر آب مقطر و شستشوی روی محیط صورت گرفت. از روز اول اقدام به برداشت اسپورهای تهیه شده گردید و تا روز چهارم ادامه یافت. تعداد اسپورهای تهیه شده در روزهای مختلف با هم مقایسه شدند.

برای نرمال کردن داده‌ها توسط لگاریتم‌گیری، از نرم‌افزار MINITAB نسخه شماره ۱۵ و جهت مقایسه محیطهای کشت در طرح آماری کاملاً تصادفی، از نرم‌افزار SAS نسخه شماره ۹ استفاده شد. از مقدار خطای استاندارد

Archive of SID

www.SID.ir

جهت مشخص نمودن محدوده خطا استفاده گردید و برآورد اختلاف میانگینها با روش دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

جوانه زنی اسپور ها: برای به دست آوردن الگوی رشد اسپور ها در محیط جوانه زنی، ۱×۱۰^{۶} اسپور به محیط YEPD (حاوی ۳ گرمYeast extract ,۱۰ گرم , Bacto peptone۲۰ گرم Dextrose) تلقیح شد و در هر ساعت نمونه برداری انجام و با میکروسکوپ اختلاف فاز بررسی شد.

تهیه پروتوپلاست: برای تهیه پروتوپلاست، دیواره ماکروکونیدی های جوانه زده توسط محلول آنزیمی هضم شد، به این ترتیب که ابتدا تعداد ۵×۱۰^{۶} اسپور تازه به ۱۰۰ میلی لیتر محیط YEPD منتقل شدند ودر دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با زمانهای ۶، ۸، ۱۲ و ۱۴ ساعت اجازه جوانه زنی و رشد یافتند. سپس با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی میسلیومها جمع آوری شدند. و در ۲۰ میلی لیتر محلول تهیه پروتوپلاست زایی معلق شدند. محلول آنزیمی تهیه پروتوپلاست محتوی مواد زیر بود.(۲۱).

1.2 M KCl containing 25 mg/ml driselase, 5 mg/ml lysing enzyme from *Trichoderma harzianum*, 50 µg/ml chitinase

میسلیومها به مدت سه ساعت جهت تهیه پروتوپلاست تحت تاثیر آنزیم قرار گرفتند و سپس با استفاده از صافی، پروتوپلاستهای تولیدی از میسلیومها جداسازی شدند.

زمان در معرض قرارگیری با محلول آنزیمی: پس از به دست آمدن زمان بهینه رشد میسلیومها اقدام به بهینه سازی زمان تأثیر محلول آنزیمی گردید. به این ترتیب که مقدار پروتوپلاست تولیدی در زمانهای یک، دو ، سه و چهار ساعت اندازه گیری شدند.

آزمون زنده مانی پروتوپلاستها: برای اینکه درصد پروتوپلاستهای زنده در میان پروتوپلاستهای تولیدی به دست آید از رنگ آمیزی Trypan Blue استفاده شد.(۱۲).

نتایج

تهیه اسپور از قارچ: نتایج حاصل از مقایسه نوع محیط کشت و مدت اسپورزایی (جدول ۱) بیانگر اختلاف معنی داری بین محیطهای اسپورزا بود. بنابراین از محیط کشت ساده (SM) در روند تولید پروتوپلاست استفاده گردید. با توجه به اینکه اسپورهای به دست آمده از کشتهای یک روزه نامناسب بودند، از نتایج آن در مقایسه محیطهای کشت (جدول ۱) صرف نظر شد.

بیشترین تعداد اسپور در روز چهارم به دست آمد، ولی با توجه به اینکه برخی از اسپورها در این زمان به فاز رشد می رفتند، در روز سوم برداشت اسپورها انجام گرفت. قابل ذکر است که نتایج حاصل از کشتهای سه روزه و چهار روزه در یک گروه دانکن قرار گرفتند (نمودار۱).

شستشوی محیطهای جامد کارآمد نبود و حداکثر ۱۰۰ اسپور در میلی لیتر برداشت شد.

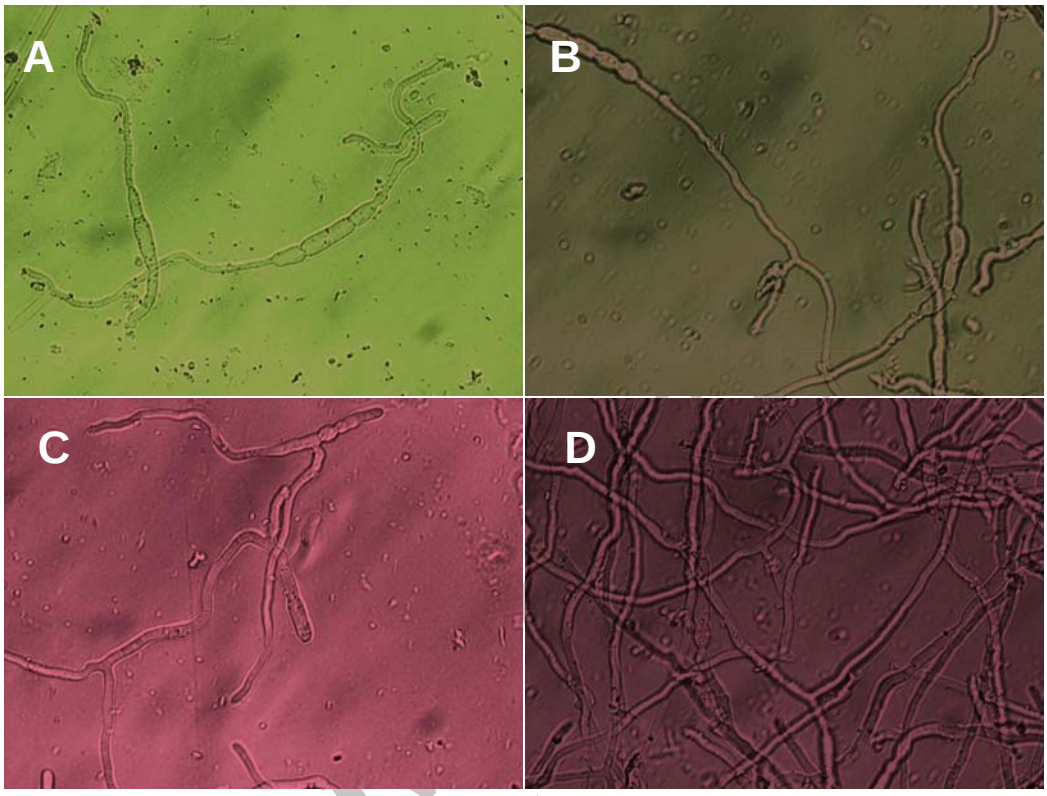
تهیه الگوی رشد جوانه زنی اسپور ها : با مشاهدات میکروسکوپی مشخص شد که اسپورها از ساعت دوم بعد از تلقیح در محیط جوانه زنی شروع به رشد و تولید میسلیوم می کنند و تا ساعت ششم قریب به اتفاق اسپورها مرحله جوانه زنی را به اتمام رسانده، وارد فاز رشد میسلیوم شده اند. در ساعت هشتم، تمامی اسپورها این مرحله را تکمیل و وارد فاز منشعب شدن میسلیومها شده اند. در ساعات بعد از ساعت هشتم، دیواره سلولی میسلیومهای تشکیل شده شروع به ضخیم تر شدن می کند (شکل ۱).

برای تهیه پروتوپلاست، از اسپورهای در حال رشد بعد از ۶، ۸، ۱۲ و ۱۴ ساعت از تلقیح به محیط جوانه زنی استفاده شد. مقدار پروتوپلاستهای تولیدی در محلول تهیه پروتوپلاست و درصد پروتوپلاستهای زنده بعد از سه ساعت به شرح جدول ۲ می باشد.

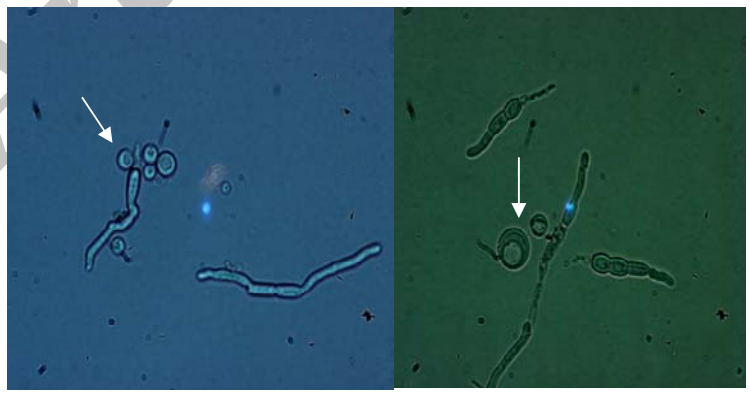
جهت تهیه پروتوپلاست، میسلیومها به مدت یک، دو، سه و چهار ساعت در معرض محلول آنزیمی قرار گرفتند. مقدار پروتوپلاست تولیدی در ساعت سوم افزایش چشمگیری را نشان می داد، اما پس از آن به دلیل اینکه

Archive of SID
www.SID.ir

اکثریت میسلیومها تا ساعت سوم به پروتوپلاست تبدیل شده بودند و مقدار آنها در محیط کم بود، تولید پروتوپلاست تفاوت چندانی نمی کرد (نمودار ۲).



شکل ۱- مراحل مختلف جوانه زنی اسپورها در محیط YEPD. A: دو ساعت پس از رشد، اسپورها شروع به جوانه زنی کرده اند. B: چهار ساعت پس از رشد، میسلیومهای تشکیل شده طویل شده اند. C: شش ساعت پس از رشد، میسلیومها شروع به منشعب شدن کرده اند. D: هشت ساعت پس از رشد، میسلیومها کاملاً منشعب شده اند.



شکل ۲- تولید پروتوپلاست از اسپورهای جوانه زده *F. graminearum* در محیط محلول پروتوپلاست ساز. پیکان ها پروتوپلاست ها را نشان می دهند.

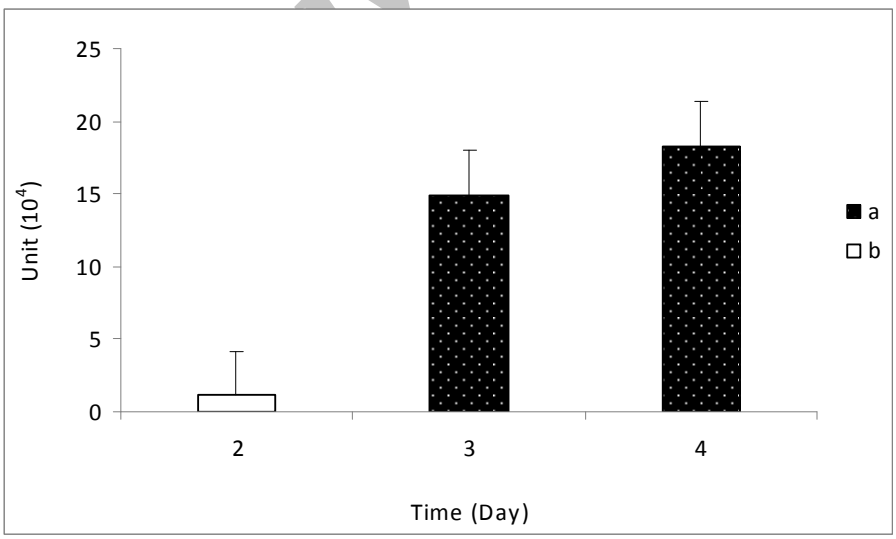
www.SID.ir

جدول ۱- مقایسه نتایج حاصل از محیطهای کشت مختلف در روزهای متفاوت.

محیط کشت (10^4)	زمان (روز) ۲	۳	۴
SM	۱/۱۸۶ ± ۰.۱۷^b	۱۴/۹۲۲ ± ۰.۲۳^a	۱۸/۲۹۱ ± ۰.۵۱^a
CLB	-	۳/۵۵۷ ± ۰.۳۸^b	۱۳/۲۰۷ ± ۰.۷۶^a
MB	۰/۲۰۲ ± ۰.۱۱^a	۰/۶۲۸ ± ۰.۴۲^a	۱/۰۶۲ ± ۰.۳۹^a
SNB	۰/۰۲۷ ± ۰.۰۲^a	۰/۰۳۳ ± ۰.۰۱^a	۰/۰۳۳ ± ۰.۰۱^a

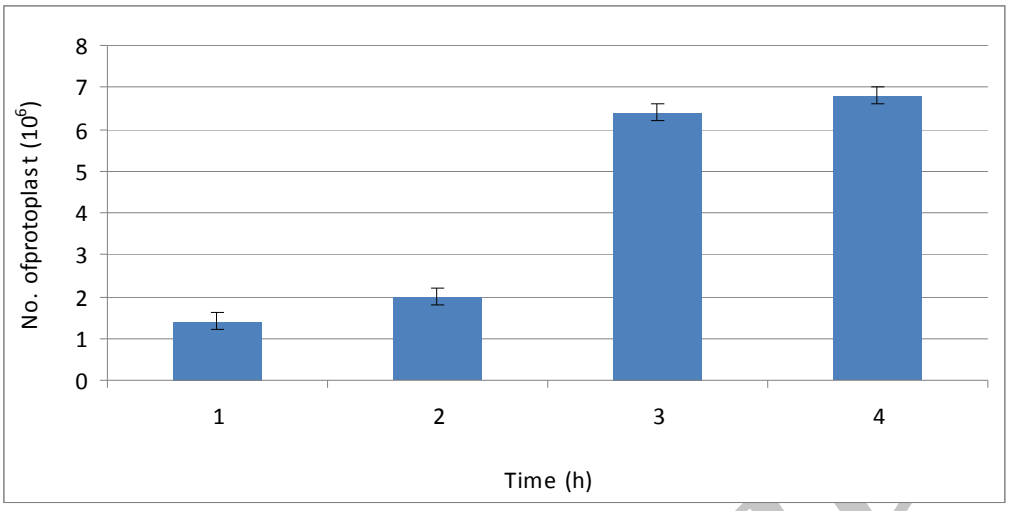
جدول ۲- مقدار پروتوپلاستهای تولیدی و درصد پروتوپلاستهای زنده در زمانهای مختلف از مراحل رشد اسپور

عمر میسلیومها در زمان تهیه پروتوپلاست	۶ ساعت	۸ ساعت	۱۲ ساعت	۱۶ ساعت
مقدار پروتوپلاست تولیدی در میلی لیتر	۰/۸×۱۰^6	۱/۲×۱۰^5	۳/۳×۱۰^4	۴/۵×۱۰^3
درصد پروتوپلاستهای زنده	۸۷	۸۵	۹۰	۸۰



نمودار۱- تعداد اسپورهای تولید شده در روزهای دوم، سوم و چهارم کشت در محیط مایع SM. به دلیل اینکه برخی از اسپورها فاز رویشی را در روز چهارم آغاز کرده بودند، از کشت سه روزه استفاده شد. a و b گروههای دانکن می‌باشند (α=%۵). محدوده خطا با استفاده از خطای استاندارد رسم گردیده است.

www.SID.ir



نمودار ۲- مقایسه تعداد پروتوپلاستهای تولیدی در زمانهای مختلف درمعرض قرارگیری با آنزیمهای هیدرولیز کننده. مقدار پروتوپلاست تولیدی در ساعت سوم افزایش چشمگیری را نشان می داد و پس از آن بدلیل نبودن میسلیوم در محیط، افزایش بسیار اندکی داشت. محدوده خطا با استفاده از خطای استاندارد رسم گردیده است.

بحث

یکی از ابزارهای قدرتمند در مطالعه عملکرد میکروارگانیسم ها در حین بیماریزایی، تراریختی است. قارچهای رشته ای از جمله میکروارگانیسم هایی هستند که روشهای معمول تراریختی آنها بر اساس تولید پروتوپلاست، وارد کردن DNA خارجی و انتخاب سلولهای تراریخت استوار است. برای این کار، اولین گام هضم دیواره میسلیومهای جوان قارچ توسط آنزیمهای هیدرولیتیک است. میسلیومهای جوان معمولاً حاصل جوانه زنی اسپورهای قارچ (ماکروکونیدی و یا میکروکونیدی) هستند.

برای تولید اسپور از قارچ *F. graminearum* ، محیطها و روشهای کشت متفاوتی پیشنهاد شده است. از جمله روشهای پیشنهادی جهت تولید اسپور از این قارچ می توان به کشت چهار روزه در محیط Mung bean در ۲۸ درجه سانتی گراد (۱۱)، کشت سه روزه در محیط SN مایع در ۲۸ درجه سانتی گراد (۲۱)، کشت در محیط SNA در ۱۸ درجه سانتی گراد در معرض نور سفید و UV نزدیک با فتوپریود ۱۲ ساعت (۱۴)، کشت ۷-۵ روزه در محیط V8 juice آگار، با شرایط ۱۲ ساعت نور در ۲۵ درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت تاریکی در ۲۲ درجه سانتی گراد (۱۷) و کشت سه روزه در محیط CMC در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد (۱۶) اشاره کرد. در این پژوهش، از کشت سه روزه محیط کشت ساده آب کاه استفاده شد که هم از لحاظ اسپور دهی بهترین نتیجه را داشت و هم از لحاظ تهیه، هزینه و کار با آن محیط ساده ای بود.

محیط YEPD جهت جوانه زنی اسپور استفاده شد که از محیطهای کشت پیشنهادی دیگر نظیر Littman oxgall (۲۱) ساده تر بود. البته محیطهای کشت دیگری نظیر GYEP (۱۷) و YPG (۱۶) نیز برای این کار پیشنهاد شده اند که با توجه به امکانات آزمایشگاهی، محیط YEPD در دسترسی بیشتری قرار داشت.

نتایج حاصل از بررسی الگوی رشد اسپورها توسط میکروسکوپ اختلاف فاز نشان داد که جوانه زنی اسپور ها در ساعت ششم تکمیل شده و از ساعت هشتم میسلیومهای جوان به فاز انشعاب و شاخه شاخه شدن می روند. بعد از ساعت هشتم، میسلیومها کاملاً منشعب و دیواره سلولی آنها در حال ضخیم شدن می باشد. بنابراین بهترین ساعت جهت تیمار آنزیمی میسلیومهای جوان بین ساعات ششم و هشتم بعد از مرحله جوانه زنی است.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدار پروتوپلاستهای زنده نیز عامل بسیار مهمی در موفقیت تراریختی قارچ است. تنها پروتوپلاستهای زنده قادر به دریافت DNA و رشد بعد از آن هستند. با رنگ آمیزی تریپان بلو، پروتوپلاستهای مرده کاملاً رنگ می گیرند در حالی که رنگ به داخل پروتوپلاستهای زنده نفوذ نمی کند. با بررسی نتایج مشخص شد که میسلیومهایی با عمر شش ساعت بیشترین مقدار پروتوپلاست، $۰/۸\times۱۰^{۶}$ در میلی لیتر را تولید می کنند که از این تعداد، ۸۷ درصد زنده هستند که مقدار زنده مانی بالایی است.

همانطور که قبلاً نیز ذکر شد، تهیه پروتوپلاست اولین گام در روشهای مرسوم تراریختی قارچهای رشته ای مانند الکتروپوریشن و روشهای شیمیایی است و بهینه سازی تولید آن در بازدهی تراریختی بسیار مؤثر است. در این مطالعه، فاکتورهای مهم در تولید پروتوپلاست مورد بررسی و بحث قرار گرفت.

تشکر و قدر دانی

این پژوهش در غالب طرحهای مصوب پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (طرح ۳۳۳) انجام گرفته است که بدین وسیله نویسندگان از آن پژوهشگاه قدردانی می کنند. همچنین از آقای مرتضی شبان نژاد ممقانی به دلیل راهنماییهایشان در اجرای طرح آماری تشکر می‌گردد.

منابع

۱- بابادوست، م. ۱۳۷۴. وقوع گونه های فوزاریوم در بذور گیاهان گندم آذربایجان شرقی و اردبیل. مجله بیماریهای گیاهی. ۱۰۰-۸۸ :۳۱

۲- بامدادیان، ع و ترابی، م. ۱۳۶۲. بیماریهای مهم گندم و جو و نحوه یادداشت برداری از آنها. انتشارات مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی. تهران، ۶۷ صفحه

۳- 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

۴- صفایی، ن.، علیزاده، ع.، سعیدی، ع.، رحیمیان، ح. و آدام،گ. ۱۳۸۴a. تشخیص ملکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتهای ایرانی *Fusarium graminearum*، عامل بلایت سنبله گندم. مجله بیماریهای گیاهی. ۱۹۰-۱۷۱ :۴۱

۵- صفایی، ن. علیزاده، ع. ۱۳۸۰. بررسی گوناگونی فنوتیپی در جدایه های *Fusarium graminearum* ، عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم و معرفی یک نشانگر جدید برای این گونه. مجله بیماریهای گیاهی. ۲۰۸-۱۹۷ :۳۷

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

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

8. Adams D J, 2004. Fungal cell wall chitinase and glucanase. Microbiology 150: 2029-35
9. Buerstmyr H, Lemmens M, Grausgruber H and Ruckenbauer P.1996. Scab resistance of international wheat germ plasms. Cereal Res. Commun. 24:195-202.
10. Cuomo A C, Güldener U, Xu J-R, Trail F, B. Turgeon G, Di Pietro A, Walton J D, Ma L-J, Baker S E, Rep M, Adam G, Antoniw J, Baldwin T, Calvo S, Chang Y-L, DeCaprio D, Gale L R, Gnerre S, Goswami R S,Kosack H-K, Harris L J, Hilburn K, Kennell J C, Kroken S, Magnuson J K, Mannhaupt G, Mauceli E, Mewes H-W, Mitterbauer R, Muehlbauer G, Münsterkötter M, Nelson D, O'Donnell K, Ouellet T, Qi W, Quesneville H, Roncero M I J, Seong K_Y, Tetko I V, Urban M, Waalwijk C, Ward T J, Yao J, Birren B W and Kistler H C.2000. The *Fusarium graminearum* Genome Reveals a Link Between Localized Polymorphism and Pathogen Specialization. Science 317(5843). 1400 – 1402
11. Desjardins A E, Brown D W, Yun S-H, Proctor R H, Lee T, Plattner R D, Lu S-w and Turgeon B G. 2004. Deletion and complementation of the mating type (MAT) locus of the wheat head blight pathogen *Gibberella zeae*. Appl. Envirn. Microbiol. 70(4): 2437-44
12. Feron E J, Veckeneer M, Parys-Van Ginderdeuren R, Van Lommel A, Melles G R J,; Stalmans P. 2002.Trypan Blue Staining of Epiretinal Membranes in Proliferative Vitreoretinopathy. Arch Ophthalmol. 120:141-144
13. Goswami R S and Kistler H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarum graminearam* on cereal crops. Mol. Plant Pathol. 5: 515-525.

Archive of SID
www.SID.ir

14. Jenczminoka N J, Maier F J, Losch A P and Schafer W. 2003. Mating, condition and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head blight disease of wheat are regulated by the Map kinase gpmk1. Curr Genet 43:87-95
15. Kim J-E. Lee H-J. Lee, Kim K.W, Yun S-H,Shim W-B and Lee Y-W. 2009. *Gibbberella zeae* chitin synthase are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenecity. Cur. Genet. 55 (4) :449-59
16. Lee T, Han Y-K, Kim K-H, Yun S-H and Lee Y-W. 2002. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Gibberella zeae*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2148-54
17. Mc Cormick S P, Alexander N J, Trapp S E and Hohn T M. 1999. Distruption of *TRI101*, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichoides*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5252-56
18. Mullins E D and Kang S. (2001) Transformation: A tool for studying fungal pathogens of plants. Cell. Mol. Life Sci. 58: 2043-2052.
19. Parry D W, Jenkinson P and Mcleod L. 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. Plant. Pathol. 44: 207-238.
20 Rizzo A F, Atroshi F, Hirvi T and Saloniemi H. 1992. The hemolytic activity of deoxynivalenol and T-2 toxin. Nat. Toxins, 1: 106–110
21. Watson R J, Burchat S, Bosley J. 2008. Amodel for integration of DNA into the genome during transformation of *Fusarium graminearum*. Fungal genetic and Biology 45:1348-63
22. Yang R-M, Zhou M-G, Ye Z-Y. 1998. Current status of fungicide resistance in Jiangsu. Pages 65-67 in: Chemical control of plant disease in China Vol. 1. Zhou M-G (ed.). China Agricultural Science and Technology Publishing House, Beijing.

Optimization of protoplast production in plant pathogen fungus *Fusarium graminearum* in order to its transformation

Moradi S.[1,2], Sanjarian F.[1] and Safaee N.[3]

[1] **National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of IRAN**

[2] **Payam noor University, Tehran, I.R. of IRAN**

[3] **Agriculture Faculty, Tarbiat Modares Univesity, Tehran, I.R. of IRAN**

Abstract

We studied *Fusarium graminearum*, a filamentous ascomycets that causes severe epidemics of wheat head blight worldwide and contaminates grain with thrichothecene mycotoxins. an effective way to study the plant – pathogen interaction, the disease causing mechanism and genomics studies of plant pathogen fungi is fungi transformation. The availability of a perfect transformation system would let to study gene exchange, epidemiology and to utilize techniques such as gene disruption or gene silencing to investigate the role of fungal products in pathogenesis. Typical procedures for transforming filamentous fungi such as *Fusarium* sp. involve the preparation of fungal protoplast. The effect of spore amount, enzymes exposing time and mycelium age on preparation of protoplast were studied in this article.

Keywords: Fungi transformation, Protoplast, *Fusarium graminearum*, Hydrolytic enzymes

Archive of SID

www.SID.ir