فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۴۵- ۵۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴

ارزیابی تولید داکسی نیوالنول در جدایه‌های *Fusarium graminearum* دارا و فاقد dsRNA با استفاده از توتون‌های تراریخت با ژن *AYT1*

سمیرا شهبازی *: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای‌ایران، sshahbazi@nrcam.org
ناصر صفایی: دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، nsafaie47@yahoo.com
امیر موسوی: دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشکده ملی تحقیقات ژنتیک و مهندسی زیستی، تهران، ایران، amir-m@nigeg.ac.ir
فروغ سنجریان: استادیار بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشکده ملی تحقیقات ژنتیک و مهندسی زیستی، تهران، ایران، fsanjarian@nigeb.ac.ir
مهسا کریمی: کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، mkarimi_bio@yahoo.com

چکیده

مقدمه: از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم، بلایت فوزاریومی است که علاوه بر کاهش عملکرد مایکوتوکسین داکسی‌نیوالنول را که یک ممانعت کننده از سنتز پروتیین است و سلامت انسان و دام را به خطر می‌اندازد، تولید می‌کند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium graminearum* آلوده به dsRNA دستخوش تغییراتی مانند کاهش شدت بیماری‌زایی و کاهش میزان مایکوتوکسین داکسی‌نیوالنول می‌شوند. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که بیان استیل ترانس فراز مخمری ((*ScAYT1* که یک ۳- O- تریکوتسین استیل ترانس فراز است و داکسی‌نیوالنول را به شکل استیله آن که به مراتب سمیت پایین‌تری دارد تبدیل می‌کند، قادر است حساسیت به توکسین را در مخمرهای موتانت به شدت کاهش دهد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ژن *AYT1* با استفاده از اگروباکتریوم به گیاه مدل توتون انتقال داده شد. به منظور بررسی اینکه بیان *ScAYT1* در توتون‌های تراریخت می‌تواند در سم‌زدایی از مایکوتوکسین داکسی‌نیوالنول موجود در عصاره قارچ مؤثر باشد و همچنین، مطالعه اثر آلودگی به dsRNA در میزان سم‌زدایی و مقاومت گیاهچه‌ها، نسل دوم گیاهان توتون تراریخت با عصاره استخراج شده از کشت جدایه‌های *F.graminearum* دارای dsRNA و فاقد آن تیمار شدند.

نتایج: ارزیابی‌های درون شیشه‌ای انجام شده با استفاده از عصاره کشت جدایه‌های فوزاریوم دارای dsRNA و فاقد آن و ۱۰ ppm مایکوتوکسین داکسی‌نیوالنول، بروز سطوح متفاوتی از مقاومت را در گیاهان تراریخت نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیان تراژن *AYT1* و آلودگی فوزاریوم به dsRNA می‌توانند در القای تحمل به داکسی‌نیوالنول و به دنبال آن افزایش مقاومت به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم مؤثر باشند.

واژه‌های کلیدی: بلایت فوزاریومی سنبله گندم، سم زدایی، مایکوتوکسین، dsRNA

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

بلایت فوزاریومی سنبله گندم [۱] علاوه بر کاهش چشمگیر عملکرد، خسارت غیر مستقیمی از طریق تجمع مایکوتوکسین‌هایی مانند دی‌اکسی‌نیوالنول به دانه‌های برداشت شده وارد می‌سازد. نبود منابع مقاومت در ارقام زراعی بر لزوم مطالعات در زمینه انتقال ژن‌های مؤثر در افزایش مقاومت به توکسین‌های این بیماری افزوده است. از جمله ژن‌های منتخب در این زمینه ژن استیل‌ترانس فراز مخمری *AYT1* [۲] است که یک گروه استیل را جایگزین گروه هیدروکسیل C3 تریکوتسن‌ها می‌کند و از سمیت آن‌ها به میزان قابل توجهی می‌کاهد (۱). ارزیابی‌های درون شیشه‌ای دانه رست‌های توتون تراریخت با *AYT1* گویای افزایش تحمل نسبی به دی‌اکسی‌نیوالنول در نتیجه بیان تراژن یاد شده بوده است (۲). در *F.graminearum* وجود dsRNAهایی با اندازه ۱/۷ تا ۱۰ کیلوباز گزارش شده است. این آلودگی سبب بروز تغییراتی در ریخت‌شناسی قارچ و کاهش شدت بیماری‌زایی و تولید مایکوتوکسین‌ها می‌شود (۳). بررسی‌ها نشان داده‌اند که در حدود ۷ درصد از جدایه‌های *F.graminearum* در ایران به dsRNAهایی با اندازه۱/۵ تا ۶ کیلوباز آلوده هستند (۴). در این مطالعه، از عصاره کشت دو جدایه قارچ *F.graminearum* جمع آوری شده از مزارع آلوده به بلایت فوزاریومی سنبله گندم Blight Head *Fusarium* (FHB) در شمال کشور که به dsRNA آلودگی داشته‌اند برای ارزیابی میزان مقاومت دانه رست‌های نسل دوم گیاهان توتون تراریخت با ژن *AYT1* استفاده شد؛ تا در مقایسه با توکسین خالص و عصاره همان جدایه‌ها در زمان عدم آلودگی به dsRNA، اثر آلودگی به dsRNA و کاهش میزان توکسین قارچ بر بروز مقاومت در گیاهان تراریخت بررسی شود.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچ *F.graminearum*: جدایه‌های قارچ جمع‌آوری شده از مزارع گندم آلوده به بلایت فوزاریومی سنبله گندم که وجود dsRNA در آن‌ها پیش‌تر مشخص شده بود بر روی محیط PDA کشت شد (۴). از بین کشت‌های خالص‌سازی شده، دو جدایه F38 و F42 در محیط بذر برنج با استفاده از روش لورن و اگنو [۳] (۵). به منظور تولید توکسین کشت شد. حذف dsRNA از این دوجدایه با استفاده از روش مکانیکی و نوک هیف کردن انجام شد. عصاره‌گیری از کشت هر دو جدایه در دو حالت واجد و فاقد dsRNA با روش جنینگ [۴] و همکاران (۶) انجام شد.

بررسی کمی توکسین دی‌اکسی‌نیوالنول موجود در عصاره قارچ با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا: پس از تخلیص عصاره کشت جدایه‌های قارچ، با استفاده ازسیستم کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا Waters™600 باستون ۲۵Luna™C_{18} (سانتی‌متری با قطر منافذ ۴/۵ میکرومتر) و دتکتور فرابنفش ۲۴۸۷ UV با طول موج ۲۲۰ نانومتر و فاز متحرک شامل متانول/ آب با نسبت حجمی (۵/۹۵)، میزان کمی دی‌اکسی‌نیوالنول موجود در عصاره کشت هر دو جدایه در دو حالت واجد و فاقد dsRNA بررسی شد.

همسانه‌سازی سازه ژنی *AYT1*: ژن *AYT1* با انجام واکنش PCR بر روی ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی مخمر به عنوان رشته الگو و جفت آغازگرهای AYT1Fw و AYT1Re، طراحی شده با استفاده از توالی ژن *AYT1* مخمر موجود در بانک ژن NCBI و یک واحد از آنزیم polymerase DNA Expand تکثیر شد. محصولات PCR در پلاسمید SK pBluescript (Strategen) همسانه‌سازی و سپس توالی‌یابی شد.

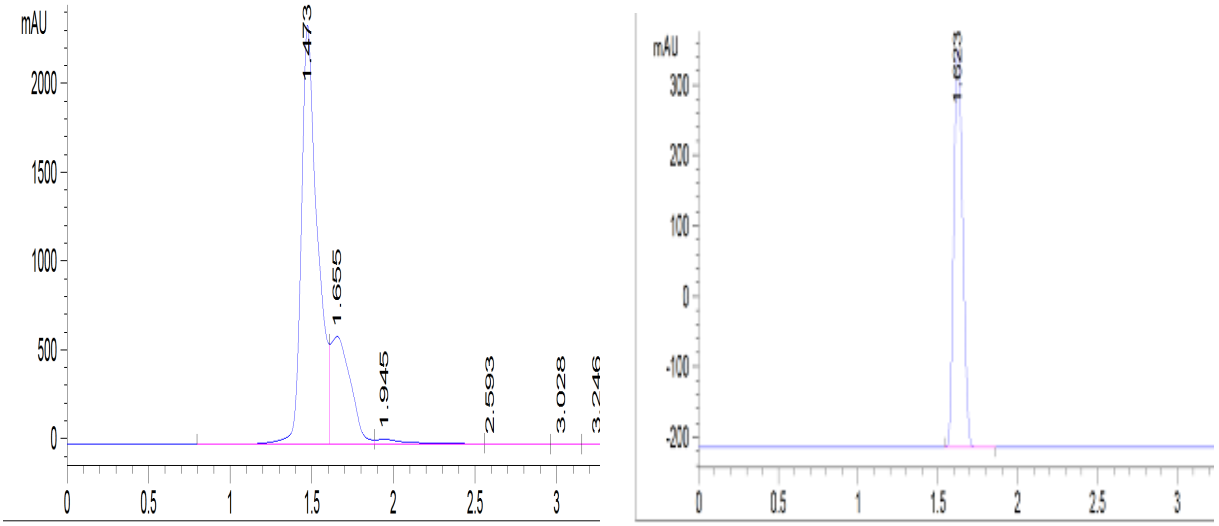
تراریختی گیاهان توتون با *AYT1*: پس از همسانه‌سازی ژن *AYT1* در ناقل دوگانه گیاهی pBI12، و انتقال به سویه LBA4404 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* تراریختی قطعات برگی [۵] گیاهچه‌های توتون (Xanthi cv. *tabacum Nicotiana*) انجام شد. گیاهچه‌های باززایی شده در محیط دارای صد میلی‌گرم در لیتر کانامایسین رشد داده و در محیط گلخانه‌ای تا مرحله گل‌دهی و تولید بذر نگهداری شد. به عنوان کنترل منفی گیاهان تراریخت با ژن گزارشگر GUS تولید شد. بذرهای حاصل خود لقاحی (نسل T0) برای ارزیابی مقاومت به توکسین استفاده شد.

تحلیل مولکولی گیاهان تراریخت: با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *AYT1* و شرایط مشابه با شرایط تکثیر آن و DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان، انتقال تراژن به لاین‌های باززایی شده بررسی شد. نسخه‌برداری از تراژن یاد شده با تکثیر cDNA ساخته شده از RNA استخراجی با کیت RNX-Plus ™ (Cat. No. RN7713C) و با جفت آغازگرهای AYT1Fw و AYT1Re تایید شد.

بررسی مقاومت دانه رست‌های گیاهان تراریخت به توکسین: به محیط‌های MS مایع به غلظت ۱۰ ppm از عصاره کشت جدایه‌های فوزاریوم دارا و فاقد dsRNA اضافه شد تا گیاهچه‌های دو برگی حاصل از جوانه‌زنی بذرهای گیاهان تراریخت و شاهد (غیر تراریخت و کنترل منفی) تیمار شوند. پس از سه هفته میزان رشد و وزن (خشک و تر) گیاهان اندازه‌گیری و مقایسه آماری شدند. تیمارهای شاهد با استفاده از محیط MS فاقد توکسین و محیط حاوی ۱۰ ppm توکسین خالص داکسی‌نیوالنول و ۳- استیل نیوالنول انجام شد. تمام مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD و تحلیل‌های آماری با نرم افزار MSTAT-C Ver. 1.42 انجام شد.

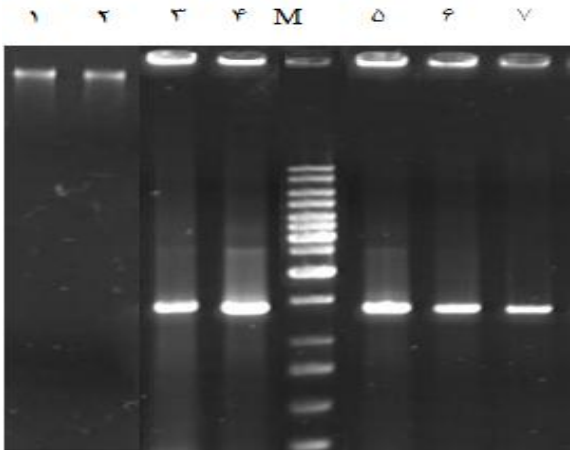
نتایج

ارزیابی میزان توکسین در جدایه‌های قارچ دارای dsRNA: جدایه‌های قارچ *F.graminearum* پس از فعال‌سازی مجدد بر روی محیط کشت PDA ابتدا توده میسلیومی سفیدرنگ تولید کردند و پس از ۷ تا ۱۰ روز کلونی‌ها به رنگ صورتی در آمدند. وجود dsRNA در آن‌ها پیش‌تر توسط هاشمی [۶] و همکاران اثبات شده بود (۴). با استفاده از روش جنینگ [۷] و همکاران (۶) عصاره‌گیری از کشت هر دو جدایه F38 و F42 در دو حالت واجد و فاقد dsRNA انجام شد. نتایج کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا نشان داد که پس از حذف dsRNA کاهش میزان تولید توکسین داکسی‌نیوالنول در این ایزوله‌ها قابل مشاهده است (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی کمی توکسین داکسی‌نیوالنول موجود در عصاره استخراج شده از دو جدایه قارچ فوزاریوم با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (سمت چپ دارای dsRNA و سمت راست فاقد dsRNA)

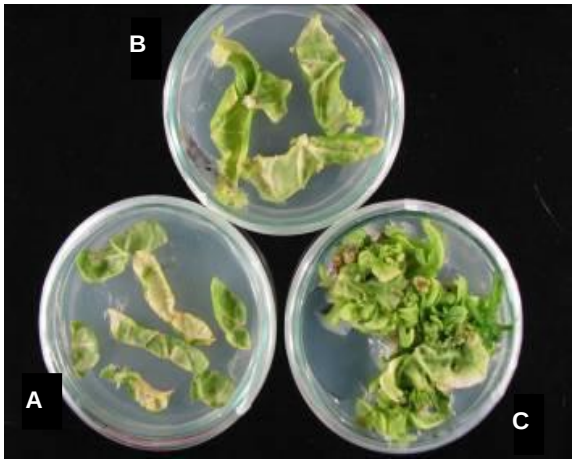
همسانه‌سازی سازه ژنی *AYT1*: ژن *AYT1* پس از انجام واکنش PCR بر روی DNA ژنومی مخمر به عنوان رشته الگو و جفت آغازگرهای AYT1Fw و AYT1Re با اندازه مورد انتظار قطعه‌ای به طول ۱/۴ کیلوباز تکثیر شد (شکل ۲).



شکل ۲- الکتروفورز نتایج تکثیر و همسانه‌سازی ژن AYT1 M: نشانگر وزنی یک کیلوباز (Fermentas)، ۱ و ۲: DNA استخراج شده از مخمر، ۳ و ۴:محصول تکثیر ژن AYT1 از ژنوم مخمری، ۵- ۷: محصول تکثیر ژن AYT1 از ناقل نوترکیب SK pBluescript

برای جلوگیری از بروز جهش‌های ناخواسته از آنزیم polymerase DNA Expand که دارای توانایی پروف ریدینگ [۸] است استفاده شد. نتایج توالی‌یابی ژن همسانه‌سازی شده در پلاسمید SK pBluescript (Strategen) نشان داد که در سطح اسید آمینه هیچ گونه تغییری در توالی این ژن در مراحل همسانه‌سازی رخ نداده است و صحت توالی ژن *AYT1* همسانه‌سازی شده پس از هم‌ردیفی با توالی موجود در بانک ژن تایید شد.

تراریختی گیاهان توتون با *AYT1*: پس از انتقال ژن *AYT1* به ریزنمونه‌های برگی گیاه توتون، بهینه‌سازی محیط‌های القای شاخه زایی ابتدا بر روی گیاهان تراریخت شده با پلاسمیدهای شاهد انجام و سپس برای باززایی گیاهان تراریخت شده با قطعه ژنی مورد نظر استفاده شد.



شکل ۳- مراحل تراریختی توتون با تراژن *AYT1* (A) تلقیح ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم و قرار دادن در محیط هم کشتی (CoC)، (B) باززایی گیاهچه‌های تراریخت در محیط القای شاخه‌زایی (SIM)، (C) تشکیل گیاهچه سبز بر روی محیط انتخابی طویل شدن شاخه (SEM)

شکل ۴- مراحل رشد گیاهچه‌های تراریخت با سازه ژنی *AYT1*: (A) نوساقه های رشد یافته در محیط طویل شدن ساقه (SEM)، (B) انتقال گیاهچه‌های حاصل به محیط ریشه زایی (RIM)، (C) مرحله رشد رویشی کافی گیاهچه‌ها در محیط درون شیشه‌ای، (D) انتقال گیاهچه‌ها به خاک، (E) نگهداری گیاهان تراریخت در اتاقک‌های رشد و (F) گل دهی و بذرگیری از گیاهان تراریخت.

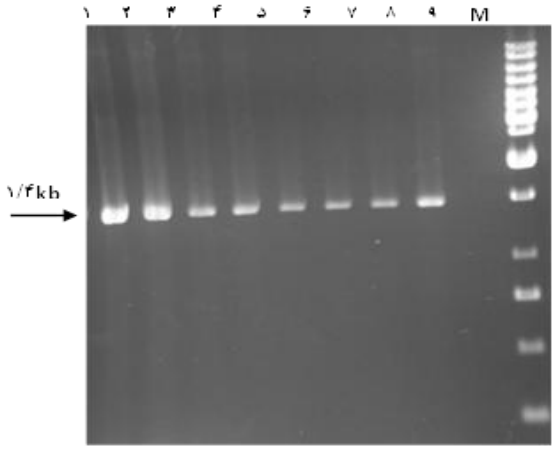
تیمارهای شاهد شامل باکتری‌های حاوی ژن گزارشگر GUS و پلاسمید بدون قطعه ورودی pBI121 (-) بودند. پس از ۷۲ ساعت قطعات برگی غیرتراریخت (شکل۳، A) به سرعت زرد شدند، اما تعداد بسیار زیادی گیاهچه‌های سبز تراریخت بر روی محیط باززایی دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت صد میلی‌گرم در لیتر رشد کردند (شکل ۳، C). شایان ذکر است برای جلوگیری از رشد اگروباکتریوم از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت پانصد میلی‌گرم در لیتر در محیط القای شاخه‌زایی استفاده شد که تا آخرین مرحله رشد رویشی در محیط درون شیشه‌ای هم ادامه پیدا کرد. با استفاده از محیط القای شاخه‌زایی باززایی به طور مستقیم انجام شده و زمان آن نیز بهبود چشمگیری یافت. به طوری که از ۱۴ روز به ۵ روز تقلیل پیدا کرد. گیاهچه‌های باززایی شده در محیط انتخابی دارای کانامایسین تا رسیدن به رشد کافی رویشی و آمادگی برای انتقال به شرایط خاک، در محیط درون شیشه‌ای نگهداری شدند.

مراحل انتقال این گیاهان به خاک و نگهداری تا مرحله تولید گل و بذر دهی در شکل ۴ نشان داده شده است. در نهایت، بذرهای حاصل از ۵۷ گیاه تراریخت جمع‌آوری و تحلیل‌های مولکولی برای بررسی انتقال ژن به آن‌ها در سطح DNA و RNA انجام شد (شکل ۵).

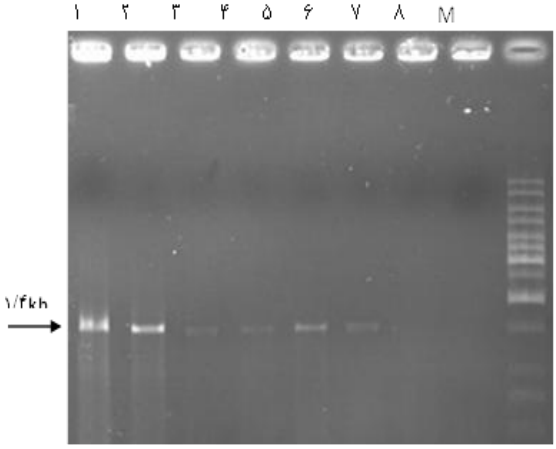
تحلیل مولکولی گیاهان تراریخت:پس از طی مراحل باززایی ۵۷ لاین توتون تراریخت با تراژن *AYT1* به دست آمد که از نظر ریخت‌شناسی تفاوتی با لاین‌های تراریخت شده با ناقل واجد ژن گزارشگر GUS و گیاهان غیر تراریخت از خود نشان ندادند (شکل ۶).

تحلیل‌های مولکولی گیاهان باززایی شده نشان داد که با وجود تکثیر قطعه ۱/۴کیلوباز در محصول PCR بر روی DNA ژنومی همه۵۷ لاین (شکل ۵)، در ۵۳ لاین پس از استخراج RNA کل و سنتز cDNA قطعه‌ای با همان اندازه ۱/۴ کیلوباز تکثیر شد (شکل ۶). نسخه‌برداری کامل از تراژن یاد شده در گیاهان تراریخت را با کارآیی کمابیش بالایی نشان می‌دهد. در عین حال هیچ یک از گیاهان غیر تراریخت و گیاهان تراریخت واجد ژن گزارشگر GUS هیچگونه باندی را با دو آغازگر اختصاصی ژن مزبور نشان نداد.

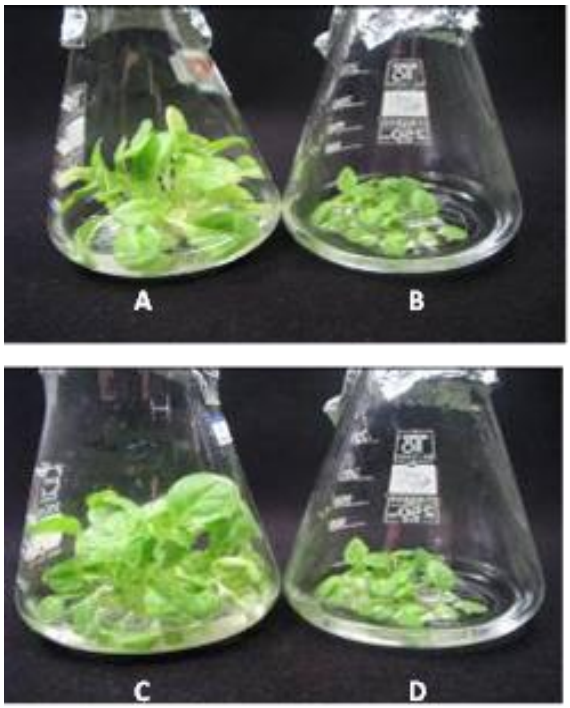
بررسی مقاومت دانه رست‌های گیاهان تراریخت به توکسین: به منظور مطالعه اثر میزان کاهش توکسین اندازه‌گیری شده در عصاره قارچ بر واکنش گیاهان تراریخت، عصاره کشت مایع این ایزوله در دو حالت دارای dsRNA و تیمار شده در ارزیابی مقاومت دانه رست‌های گیاهان تراریخت استفاده شد (شکل ۷).



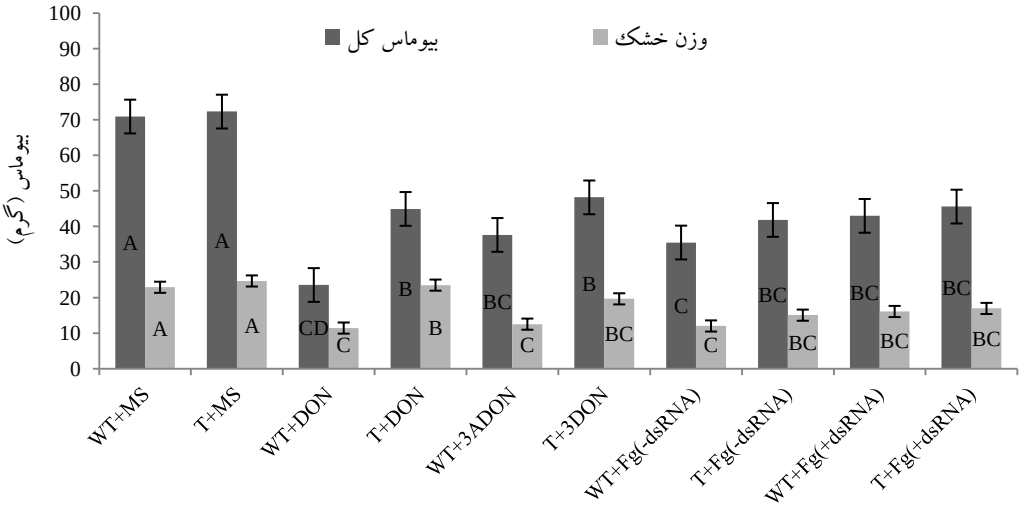
شکل ۵- الکتروفورز نتایج حاصل ازتکثیر تراژن برای تایید تراریختی گیاهان توتون. ۱: کنترل مثبت (*AYT1* در pBluescript)، ۲: کنترل مثبت (*AYT1* در pBI121)، ۳- ۸: گیاهان تراریخت با *AYT1*، ۹: کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت) و M: نشانگر وزنی یک کیلوباز (Fermentas)



شکل ۶- الکتروفورز نتایج حاصل از RT-PCR برای تایید نسخه‌برداری تراژن *AYT1* در گیاهان تراریخت. ۱: کنترل مثبت (*AYT1* در pBI121)، ۲- ۶: گیاهان تراریخت با *AYT1*، ۷: کنترل منفی (گیاه غیر تراریخت)، ۸: کنترل منفی (RT-PCR بدون Reverse transcriptase) و M: نشانگر وزنی یک کیلوباز (Fermentas)



شکل ۷- عکس العمل دانه رست‌های تراریخت (AYT1) به محیط حاوی عصاره قارچ. A: گیاهان تراریخت (AYT1) در محیط حاوی عصاره ایزوله فاقد dsRNA، B: گیاهان غیرتراریخت در غلظت ۱۰ ppm داکسی‌نیوالنول (شاهد)، C: گیاهان تراریخت (AYT1) در محیط حاوی عصاره ایزوله دارای dsRNA و D: گیاهان غیرتراریخت در غلظت ۱۰ ppm داکسی‌نیوالنول (شاهد)



شکل ۸- مقایسه میزان اثر توکسین (۳استیل داکسی‌نیوالنول (3ADON) و داکسی‌نیوالنول (DON) و عصاره کشت قارچ فوزاریوم گرامینیاروم (F.g) (دارا و فاقد dsRNA) در محیط MS بر رشد دانه رست‌های تراریخت با *AYTI*، (WT: گیاه غیر تراریخت؛ T: گیاهان تراریخت با *AYTI*)

تحلیل‌های آماری نشان داد که اثر ژنوتیپ و محیط کشت و اثر متقابل آن‌ها بر تمامی شاخص‌های اندازه‌گیری شده در سطح ۰/۰۱ کاملا معنادار است. به عبارت روشن‌تر، عکس‌العمل گیاهچه‌های تراریخت و غیرتراریخت در حضور توکسین با هم متفاوت بوده و بیان تراژن سبب تغییر در شاخص‌های اندازه‌گیری شده، به شکل معناداری شده است (شکل ۸).

همان‌طور که درشکل ۸ مشاهده می‌شود میزان ممانعت از رشد عصاره کشت جدایه‌های دارای dsRNA پایین‌تراز توکسین داکسی‌نیوالنول و کمابیش مشابه اثر ppm ۱۰ ۳- استیل داکسی‌نیوالنول بوده است، در حالی که عصاره کشت همان جدایه‌ها پس از حذف dsRNA میزان سمیت بالاتری ازخود نشان دادند. اثرآلودگی با dsRNA برکاهش اثر ممانعت کنندگی از رشد گیاهان با کاهش میزان توکسین در عصاره جدایه‌ها مرتبط می‌باشد که با نتایج بدست آمده از بررسی کمی میزان توکسین داکسی‌نیوالنول کروماتوگرافی مایع قابل انطباق است.

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری بلایت سنبله گندم علاوه بر خسارت کمی ناشی از کاهش میزان محصول و وزن هزار دانه، به علت کاهش درصد پروتئین و نشاسته و آلوده کردن دانه‌ها به مایکوتوکسین‌های مختلف کیفیت محصول را نیز کاهش می‌دهد و مصرف دانه‌های آلوده توسط انسان و دام سبب بروز اختلالات و بیماری‌های متعددی در آن‌ها می‌شود (۷).

مدیریت کنترل بلایت فوزاریومی سنبله گندم دربرگیرنده روش‌های متعددی شامل مبارزه زراعی، کشت ارقام مقاوم، کنترل زیستی و استفاده از قارچ‌کش است (۸). هر چند هیچکدام راه حل کاملا مؤثری برای مهار این بیماری به شمار نمی‌روند. نبود منابع مقاومت مناسب در ارقام زراعی، موجب جلب توجه پژوهشگران در سال‌های اخیر به ارایه راهکارهای مؤثر برای القای مقاومت به این بیماری در گندم شده است (۹). به علت پیچیدگی‌های کنش متقابل *F.graminearum* و گیاه

میزبان، دانسته‌های ما درباره ترکیبات کلیدی و مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به این بیماری در گیاه بسیار اندک است. سال‌هاست که پژوهش‌های زیادی برای شناسایی مکانیسم‌های بیماری‌زایی این قارچ و ژن‌های مسوول مقاومت به آن به وسیله دانشمندان انجام شده و یا در جریان است. تنها اطلاعاتی در زمینه نحوه عمل تریکوتسین‌ها که بخشی از مایکوتوکسین‌های این قارچ می‌باشند، در دست است و همین امر سبب شده که با توجه به اهمیت نقش آن‌ها در فرایند بیماری‌زایی مطالعه مکانیسم‌های مقاومت به آن‌ها نظر بیشتر پژوهشگران را جلب کند.

پیش‌تر به اهمیت تولید مایکوتوکسین‌ها از جمله تریکوتسین‌ها و به ویژه دی اکسی‌نیوالنول و تجمع آن‌ها در دانه‌ها اشاره شد. مطالعات متعدد نشان داده است که دی‌اکسی‌نیوالنول ویژگی فیتوتوکسیک داشته و یک عامل بیماری‌زا در بلایت سنبله است و سبب افزایش شدت بیماری در گندم و ذرت می شود (۷، ۱۰ و ۱۱). همچنین، بررسی‌ها نشان داده است که سویه‌های *F.graminearum* فاقد توانایی تولید تریکوتسین‌ها هستند و بیماری‌زایی کمتری برروی گیاهان در شرایط مزرعه‌ای دارند (۱۲). بنابراین، یکی از راهکارهای کاهش خسارت بیماری می‌تواند کاهش تولید مایکوتوکسین در آن از طریق انتقال مایکوویروس در جمعیت قارچی باشد. به عبارت دیگر، وجود جدایه‌های قارچ *F.graminearum* آلوده به مایکوویروس می‌تواند منبعی از انتقال عامل هایپویورولانس در جمعیت پاتوژن شود. مطالعات پیشین نشان داده است انتقال این مایکوویروس‌ها از جدایه‌ای قارچ *F.graminearum* آلوده به جدایه‌های وحشی از طریق آسکوسپور و کنیدیوم بین ۳۰ تا ۱۰۰ درصد است (۱۳).

مطالعات گذشته نشان داده است که dsRNA (مایکوویروس) بر اساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خود به ۸ خانواده Chrysoviridae، Birnaviridae، Cytoviridae، Endornaviridae، Hypoviridae، Partiviridae، Reoviridae و Totiviridae تقسیم می‌شوند (۱۴). وجود مایکوویروس‌های dsRNAیی در دامنه وسیعی از قارچ‌های رشته‌ای و مخمری گزارش شده است (۱۵- ۱۷). که توالی آن‌ها در پایگاه اطلاعاتی ژنوم موجود است و بر اساس داده‌های توالی ژنوم مایکویوروس‌ها بیشتر به سه جنس Mitovirus، Partitivirus و Totivirus متعلق هستند. در قارچ *F.graminearum* بررسی‌های زیادی در مورد جنس‌های مایکوویروسی و ژنوم و نقش آن‌ها در شدت بیماریزایی قارچ انجام شده است (۱۸). داریسا [۹] و همکارانش در ۱۰ جدایه *F.graminearum* پنج نوع *dsRNA* مختلف جداکردند. مطالعات روی توالی ژنوم آن‌ها نشان داد حداقل سه قطعه از این قطعات جداسازی شده، پروتئین‌های ساختاری را کد می‌کنند. این پنج قطعه به شکل جداگانه کپسیده شده و با جمعیت متفاوتی در ریسه‌ها و اسپورهای جنسی و غیر جنسی پراکنش می‌یابند (۱۸). تمامی قطعات ویروسی جداشده از این جدایه‌ها به خانواده *Chrysoviridae* تعلق داشتند (۱۸). در مطالعه دیگری که بر روی ۸۲۷ جدایه قارچ *F.graminearum* انجام شده است وجود *dsRNA* در حداقل ۱۹ جدایه اثبات شده است. نتایج این بررسی نشان داده‌است که وجود *dsRNA* با تغییرات ریخت‌شناسی مانند کاهش سرعت رشد ریسه و افزایش تولید رنگدانه در قارچ که به رنگ نارنجی تیره تا قرمز در ریسه‌های منجر آن شده است، ارتباط صد در صد داشته است (۱۳). همچنین، میزان اسپورزایی و شدت

بیماری‌زایی جدایه‌های آلوده به dsRNA نیز در مقایسه با جدایه‌های فاقد آن بسیار پایین‌تر گزارش شده است (۱۳). داده‌های حاصل از این پژوهش نیز با این نتایج مشابهت داشته و با حذف مکانیکی *dsRNA* از ریسه‌های *F.graminearum* میزان تولید دی‌اکسی نیوالنول در جدایه بالاتر و به دنبال آن شدت بیماری‌زایی آن نیز بالا رفت.

بررسی‌های یو [۱۰] و همکارانش در جمعیتی از جدایه‌ها در *F.graminearum* دارای dsRNA نشان داد که اندازه ژنوم این dsRNA بین ۱/۷ تا ۱۰ متغیر بوده است. این آلودگی سبب بروز تغییراتی در ریخت‌شناسی قارچ، کاهش شدت بیماری‌زایی و کاهش تولید مایکوتوکسین‌ها در جدایه‌های آلوده به dsRNA شده بود (۱۹). همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد بررسی‌ها روی جمعیت‌های *F.graminearum* در ایران وجود dsRNAهایی با اندازه ژنوم حدود از جدایه با اندازه ۱/۵ تا ۶ کیلوباز را نشان داده و پراکنش میزان این جدایه‌ها در جمعیت طبیعی در حدود ۷ درصد تخمین زده شده است (۴). در این مطالعه، از عصاره کشت دو جدایه قارچ *F.graminearum* جمع‌آوری شده از مزارع آلوده به بلایت فوزاریومی سنبله گندم FHB *(Blight Head Fusarium)* در شمال کشور که آلودگی به dsRNA داشته‌اند استفاده شد. نتایج آزمون کروماتوگرافی تایید کرد که با حذف dsRNA از ریسه میزان تولید مایکوتوکسین داکسی‌نیوالنول در آن‌ها کاهش می‌یابد که تایید کننده یافته‌های پیشین بود (۱۳ و ۱۹). پیشنهاد می‌شود که ویژگی‌ها و درصد انتقال این dsRNAها از جدایه‌های آلوده به وحشی با استفاده از آناستاموزیس (هم‌دهانی هیفی) در بین جدایه‌های قارچ *F.graminearum* بررسی و تعیین شود. همچنین، برای افزایش کارایی این روش کنترلی هایپوویرولانس (انتقال dsRNA به منظور کاهش شدت بیماری‌زایی *F.graminearum*) در این پژوهش امکان کاربرد تلفیقی روش هایپوویرولانس با بیان تراژن استیل کننده مایکوتوکسین (که با مکانیسم سم زدایی از مایکوتوکسین مقاومت به بیماری را بالا می‌برد) در دانه رست‌های نسل دوم گیاهان توتون تراریخت با ژن *AYT1* استفاده شد. نتایج نشان داد که استفاده هم‌زمان از هر دو روش می‌تواند با کاهش قدرت توکسین‌زایی قارچ و افزایش مقاومت گیاه به توکسین، به میزان قابل قبولی در کاهش علایم بیماری در دانه رست‌ها مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، طرح ۲۵۹ و گروه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس برای فراهم‌آوری امکانات انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Alexander NJ., McCormick SP., HohnTM. The identification of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *AYT1* (ORF-YLL063c) encoding an acetyltransferase. Yeast 2002; 19 (16): 1425- 30.

(2) Sanjarian F., MousaviA., PoppenbergerB., WeindorferH., Adam G. Evaluation of the Yeast acetyltransferase (AYT1) in Detoxification of the *F. graninearum* Toxin Deoxynivalenol in Transgenic Plants. *Iranian Journal of Biology* 2006; 19 (2): 222- 31.

(3) Chu M., Jean J., Yea SJ., Kim YH., LeeYW., Kim KH. Double-strand RNA mycoviruses from *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68: 2529- 34.

(4) Hashemi M., Mozafari J., Alizadeh A., Shams-Bakhsh M. dsRNA associated with *Fusarium graminearum* isolates in Iran. *Iranian Journal Plant Pathology* 2004; 40: 313- 26.

(5) Lauren DR., Agnew MP. Multitoxinscreening for *Fusarium* mycotoxins grain. *Journal of Agrichulture and Food Chemicals* 1991; 39: 502- 07

(6) Jenning PME., Coates JA., Turner EA., Chandler Nicholson p. Name ordering is different from others Determination of a deoxynivalenol- and nivalenol- producing chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *European Journal of Plant Pathology* 2004; 53: 182- 90.

(7) Proctor RH., Desjardins AE., McCormick SP., Plattner RD., Alexander NJ., Brown DW. Genetic analysis of the role of trichothecene and *Fumonisin mycotoxins* in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 2002; 108: 691- 8.

(8) PalazziniJM., RamirezM L., TorresAM., ChulzeSN. Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Protection* 2007; 26:1702- 10.

(9) Bai GH., Shaner G. Management and Resistance in Whaet and Barely to *Fusarium* Head Blight. *Phytopathol* 2004; 42: 135- 61

(10) Desjardins AE., Proctor RH . Molecular biology of *Fusarium mycotoxins*. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 119: 47- 50.

(11) Mesterhazy A. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* 2002; 108: 675- 84.

(12) Harris LJ., Gleddie SC. A modified *Rpl3* gene from rice confers tolerance of the *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol to transgenic tobacco. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 2001; 58: 173- 81.

(13) Chu Y., Lim W., Sang-Jin Y., ChoJ., LeeY., KimK. Complexity of dsRNAMycovirus Isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes* 2004; 28 (1): 135- 43.

(14) Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archive of Virology* 2002; 147: 1655- 63.

(15) Dawe AL., Nuss DL. Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* 2001; 35: 1- 29.

(16) Varga J., Toth B., Szencz S., Molnar J., Fekete, CS. Double- stranded RNA elements and virus- like particles in *Aspergillus SPP*. *Acta Biologia* 2001; 52: 355- 63.

(17) Varga J., Rigo K., Molnar J., Toth B., Szencz S. Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *Aspergillus* section. *Acta Biologia* 2003; 83: 191- 200.

(18) Darissa O., Willingmann P., Schäfer W., Adam G. A novel double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*: nucleic acid sequence and genomic structure. *Archives of Virology* 2011; 4 (156): 647- 58.

(19) Yu J., Kwon S., Lee K., Son M., Kim K. Complete nucleotide sequence of double-stranded RNA viruses from *Fusarium graminearum* strain DK3. *Archives of Virology* 2009. 11 (154): 1855- 8.

---

[1]- Fusarium Head Blight(FHB)
[2]- (Yeast AcetylTransferase)
[3]- Lauren and Agnew
[4]- Jenning
[5]- Leaf disk
[6]- Hashemi
[7]- Jenning
[8]- Proof Reading
[9]- Darissa
[10]- Yu

Evaluation of deoxynivalenol production in dsRNA Carrying and Cured *Fusarium graminearum* isolates by *AYT1* expressing transformed tobacco

Samira Shahbazi *
Ph. D. of Molecular mycology- Plant pathology- Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Iran, sshahbazi@nrcam.org
Naser Safaeie
Ph. D. of Molecular mycology, Tarbiat Modares University, Iran, nsafaie47@yahoo.com
Amir Mousavi
Ph. D. of Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Iran, amir-m@nigeg.ac.ir
Forogh Sanjarian
Ph. D. of Biotechnology, National Institute of Genetic engineering and Biotechnology, Iran, fsanjarian@nigeb.ac.ir
Mahsa Karimi
M.Sc. of Agricultural biotechnology, Payam Noor University (PNU), Iran, mkarimi_bio@yahoo.com

Abstract

Introduction: Fusarium head blight (FHB), is the most destructive disease of wheat, producing the mycotoxin deoxynivalenol, a protein synthesis inhibitor, which is harmful to humans and livestock. dsRNAmycoviruses-infected-isolates of *Fusariumgraminearum*, showed changes in morphological and pathogenicity phenotypes including reduced virulence towards wheat and decreased production of trichothecene mycotoxin (deoxynivalenol: DON).

Materials and methods: Previous studies indicated that over expression of yeast acetyl transferase gene (*ScAYT1*) encoding a 3-O trichothecene acetyl transferase that converts deoxynivalenol to a less toxic acetylated form, leads to suppression of the deoxynivalenol sensitivity in *pdr5* yeast mutants. To identify whether *ScAYT1* over-expression in transgenic tobacco plants can deal with mycotoxin (deoxynivalenol) in fungal extract and studying the effect of dsRNA contamination on detoxification and resistance level, we have treated T1 *AYT1* transgenic tobacco seedlings with complete extraction of normal *F. graminearum* isolate carrying dsRNA metabolites. First, we introduced *AYT1*into the model tobacco plants through Agrobacterium-mediated transformation in an attempt to detoxify deoxynivalenol.

Results: *In vitro* tests with extraction of dsRNA carrying and cured *isolates of F. graminearum and* 10 ppm of deoxynivalenol indicated variable resistance levels in transgenic plants.

Discussion and conclusion: The results of this study indicate that the transgene expression AYT1 and Fusarium infection to dsRNA can induce tolerance to deoxynivalenol, followed by increased resistance to Fusarium head blight disease of wheat.

Key words: Fusarium head blight, Detoxification,Deoxynivalenol, *ScAYT1*,dsRNA

* Corresponding author
Received: January 5, 2014 / **Accepted:** August 26, 2014