

انتقال ژن *FsTri101* کدکننده استیل ترانسفراز از قارچ *Fusarium sporotrichioides* به گیاه توتون و بررسی تأثیر آن در سم‌زدایی از تریکوتسن‌دی‌اکسی‌نیوالنول

مهسا بنایی^۱، فروغ سنجریان^{۲*} و غلامرضا بخشی‌خانیکی^۳

۱، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲، استادیار بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

۳، استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۳/۴)

Tobacco Transformation by *FsTri101* Gene Encoding Acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides* and Study of Its Effect in Detoxification of Deoxynivalenol Trichothecene

M. BANAEI¹, F. SANJARIAN^{2*} AND GH. BAKHSI KHANIKI³

1, M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran; 2, Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran; 3, Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran
(Received: January 10, 2013 - Accepted: May 25, 2013)

Abstract

چکیده

Acetyl transferases are enzymes responsible for enzymatic transfer of an acetyl group to suitable receptor molecule by using acetyl CoA as donor. Acetyltransferase reaction is involved in biosynthesis pathway of some important secondary metabolites such as antibiotics, as well as in their detoxification. Trichothecenes are significant secondary metabolites produced by the plant fungal pathogens *Fusarium* ssp. Such as *F. sporotrichioides* and *F. graminearum*. These fungi possess specific genes in their genomes encoding acetyl transferase enzymes are affecting trichothecene. In this study, the gene encoding acetyltransferase from the fungus *F. sporotrichioides*, *TRI 101*, was cloned and transferred into tobacco plant as model plants and the effect of the enzyme on the detoxification of deoxynivalenol (DON), a well known trichothecene, was investigated. In addition it was shown that, in comparison with the roots of wild type plants, transgenic roots grew normally in the deoxynivalenol-contained medium.

Keywords: detoxification, *Fusarium* Head Blight, *Fusarium sporotrichioides*, Transgenic plants, Trichothecene

استیل ترانسفرازها آنزیم‌هایی هستند که یک گروه استیل از دهنده استیل CoA به یک مولکول گیرنده مناسب انتقال می‌دهند. واکنش استیل ترانسفراز در بیوسنتز و همچنین سم‌زدایی از بسیاری متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک‌ها دخیل است. تریکوتسن‌ها متابولیت‌های ثانویه مهمی هستند که توسط قارچ‌های پاتوژن گیاهی جنس *Fusarium* از قبیل *Fusarium* و *Fusarium sporotrichioides* *graminearum* تولید می‌شوند. این قارچ‌ها در ژنوم خود دارای ژن‌های کدکننده استیل ترانسفرازهای موثر بر تریکوتسن‌ها هستند. در این تحقیق‌ها ژن *Tri 101* کدکننده استیل ترانسفراز از قارچ *F. sporotrichioides* به گیاه توتون انتقال داده شد و تأثیر آن در سم‌زدایی از تریکوتسن شناخته شده دی‌اکسی‌نیوالنول، مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، در بررسی ریشه گیاهان تراریخت برخلاف ریشه گیاهان غیرتراریخت در محیط حاوی دی‌اکسی‌نیوالنول به رشد طبیعی خود ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: بلایت فوزاریومی گندم، تریکوتسن‌ها، سم‌زدایی، گیاهان تراریخت، *Fusarium sporotrichioides*

مقدمه

بیماری بلایت فوزاریومی خوشه گندم در اکثر مناطق کشت غله در جهان، مشاهده شده و باعث کاهش محصول می‌گردد. این بیماری علاوه بر گندم و جو به سایر غلات دانه ریز نیز حمله می‌کند (Goswami and Kistler, 2004). کاهش تعداد و وزن دانه، نامرغوب‌بودن آرد دانه‌های آلوده برای نانوبی و نیز سمیت محصولات برای انسان و دام از جمله عوارض بیماری در گیاه است. در ایران، این بیماری در مناطق گیلان و مازندران (Foroutan et al., 1993)، خوزستان (Moosawi-Jorof, 2003)، گرگان و گنبد (Golzar et al., 1998) گزارش شده است. عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم، قارچ *Fusarium graminearum* است که به‌صورت ساپروفیت در بقایای گیاهی آلوده زمستان‌گذرانی می‌کند (Gilbert and Tekauz, 2011). در طول بهار و تابستان با خروج آسکوسپورهای چسبناک از پریتسیوم‌ها و انتقال آن‌ها در محیط، در مرحله گلدهی که حساس‌ترین مرحله گندم به بیماری است، فرایند آلودگی در سنبله گندم و جو آغاز می‌شود (Goswami and Kistler, 2004). گونه‌های مختلف فوزاریوم و حتی جدایه‌های مختلف در هنگام ایجاد بیماری در گیاه، توکسین‌های متفاوتی تولید می‌کنند. تریکوتسین‌ها فراوان‌ترین میکوتوکسین‌های ردیابی شده در غلات هستند (Nicholson et al., 2004). تریکوتسین‌ها ترکیباتی سسکوئی‌ترین با وزن مولکولی پایین (۲۰۰ تا ۵۰۰ دالتون) هستند که با اثر بر زیر واحد ریبوزومی 60 S یوکاریوتی از آغاز و یا ادامه طول‌شدن زنجیره پلی‌پپتیدی جلوگیری می‌کنند (Pestka, 2007). دی‌اکسی نیوانول (DON) به همراه زراننون (Zearalenone) فراوان‌ترین میکوتوکسین‌های تولیدشده در دنیا در ارتباط با FHB می‌باشند (Alexander et al., 2011). DON عامل ویرولانسی قارچ، با ممانعت از بیان ژن‌های مربوط به مکانیزم دفاع گیاه در برابر حمله قارچ، بیماری‌زایی پاتوژن را افزایش می‌دهد (Mitterbauer et al., 2004). تولید میکوتوکسین DON منجر به شکل‌گیری بیماری در اندام گل می‌شود اما در غیاب DON، پاسخ دفاعی میزبان مقاوم در ساقه فعال شده و نفوذ ریشه‌های قارچ به گلچه محدود می‌شود (Dean et al., 2012).

DON علاوه بر تأثیر مخرب بر گیاه، باعث ایجاد عوارضی جدی در انسان و حیوانات تغذیه‌کننده با موادغذایی

آلوده به این میکوتوکسین می‌شود (Foroud and Eudes, 2009). در سلول‌های جانوری تأثیرات سمی DON و دیگر تریکوتسین‌ها به‌دلیل خاموشی کامل پروتئین‌سازی نیست، بلکه این مواد با تغییر در مسیرهای سلولی وابسته به فعالیت کینازی MAP تأثیر مخرب خود را می‌گذارند (Ohasto et al., 2007). از اثرات سمی این میکوتوکسین در سلامتی حیوانات می‌توان به دخالت در سیستم ایمنی و دستگاه گوارش اشاره کرد (Marseca et al., 2002). در همین رابطه در انسان بیماری‌هایی از قبیل کم‌خونی، سر درد، تهوع، شکم درد گزارش شده است (Karlovsky, 2011). به همین دلیل در آمریکا، اروپا و سایر مناطق، محدودیت‌های زیادی در ارتباط با سطوح توکسین‌های خاص در دانه‌ها و غذاهای مصرفی اعمال شده است. (Commission Regulation (EC) 1881/2006 از آنجا که DON در بیشترین غلظت توسط فوزاریوم تولید می‌شود به‌عنوان سم شاخص آن معروف است. این ماده بسیار پایدار در شرایط انبارداری، فرآوری و پخت نان می‌باشد و در حرارت بالا تجزیه نمی‌شود. (Prangle et al., 2005). آنزیم‌هایی که 3-O-acetyltransferase نامیده می‌شوند، می‌توانند تریکوتسین‌ها را به مشتقات استیل آن‌ها تبدیل کنند. این آنزیم‌ها در قارچ‌های فوزاریومی توسط ژن‌های *TRI101* و *TRI201* کد می‌شوند (Khatibi et al., 2011). علاوه بر این ژن‌های دیگری مانند *AYTI* مخمری نیز شناسایی شده‌اند که محصولات آن‌ها این خاصیت آنزیمی را دارد (Sanjarian et al., 2006). این آنزیم‌ها کربن شماره ۳ ترکیب DON را هدف قرار داده و گروه OH آن را با گروه استیل جایگزین کرده و در نهایت آن را به 3ADON ترکیبی با سمیت کمتر، تبدیل می‌کند (Cormick et al., 1999). در این پژوهش کارایی آنزیم استیل ترانسفراز قارچ *Fusarium sporotrichioides* (*FsTRI101*) در استیله‌شدن DON و افزایش تحمل گیاه به میکوتوکسین DON از طریق انتقال این ژن به گیاه مدل توتون و سپس استخراج پروتئین از گیاهان تراریخت و سنجش کارایی آنزیم و همچنین آزمون مقاومت به توکسین در ریشه این گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

قارچ *F. sporotrichioides* از کلکسیون قارچ مؤسسه گیاه‌پزشکی ایران تهیه شد. به‌منظور جداسازی DNA ژنومی، ابتدا قارچ را در پلیت حاوی محیط کشت PDA (Potato

ادامه جهت اثبات ورود ژن *FsTRI101* به گیاه، بافت برگ گیاهان با آزمون‌های مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور DNA بافت برگ گیاه تراریخت استخراج (Doyle and Doyle, 1987) و در واکنش PCR تکثیر شد. RNA کل گیاهان تراریخت نیز با استفاده از کیت RNX-PlusTM (Cinna Gen Co. Iran) از بافت برگ گیاه استخراج و ساخت cDNA با استفاده از آغازگر OligodT انجام شد. برای ساخت رشته مکمل و تکثیر cDNA، آغازگرهای ژن مورد استفاده قرار گرفتند. شرایط دمایی واکنش PCR مانند شرایط ذکر شده در تکثیر ژن بود.

گیاهان تراریخت به دست آمده جهت تولید بذر و ادامه مطالعات در نسل بعدی به گلدان منتقل شده و با پوشاندن گل‌ها بذرهایی حاصل از خود لقاحی تولید شدند. برای بررسی تأثیر توکسین بر روی رشد ریشه، بذرهایی برداشت شده از گیاهان تراریخت استریل شده و در محیط جامد MS دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین به مدت ۱۰ شبانه‌روز در شرایط کنترل شده کشت داده شدند. جوانه‌ها در مرحله دو برگی به محیط کشت MS مایع محتوی ۱۰ ppm توکسین DON انتقال یافته و بعد از ۴ روز با قرائت OD محیط مایع توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج‌های بین ۱۹۰ تا ۲۹۰ نانومتر، میزان جذب توکسین توسط ریشه گیاهان تراریخت و همچنین میزان رشد و توسعه ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از گیاه غیرتراریخت به عنوان نمونه کنترل استفاده گردید. آزمون TLC برای بررسی فعالیت آنزیمی گیاهان تراریخت با ژن *FsTRI101* و تبدیل DON به 3A انجام شد. بدین منظور پروتئین از گیاهان تراریخت استخراج شد و به روش Ohasto *et al.*, (2007) این آزمون انجام گرفت.

نتایج و بحث

محصولات PCR از DNA ژنومی قارچ توسط آغازگرهای اختصاصی جداسازی و به صورت باند منفرد و در اندازه مورد نظر (1390bp) بر روی ژل الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۱).

Dextrose Agar) کشت داده شد. پس از جمع‌آوری میسلیوم‌های قارچی توسط ازلت مایع در هاون چینی به صورت پودر درآمده به روش Safaie *et al.*, (2005) استخراج DNA صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی با استفاده از توالی ژن *FsTRI101* قارچ *F. sporotrichioides* موجود در بانک ژن (شماره دسترسی AY032747.1) طراحی گردیده و در تکثیر ژن توسط PCR به کار گرفته شدند.

FTRI101

5

GCGGATCCATGGCCGCAACAAGCAGC
ACAAGCAGCCATGCTTTGGAC 3

Bam HI

RTRI101

5

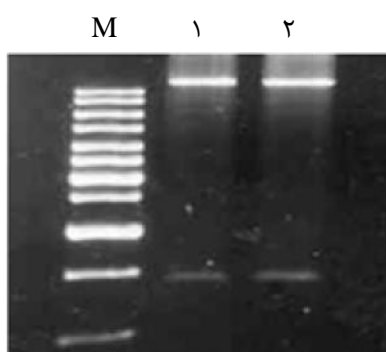
GCCCCGGGCTACCCAATATACTTTGCG
TACTTTGTCCACTCCTCATCC 3

Sma I

شرایط دمایی واکنش PCR عبارت بود از واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، اتصال ۶۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، طولیل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، که ۳۰ سیکل تکرار می‌شد.

ساخت سازه‌های ژنی

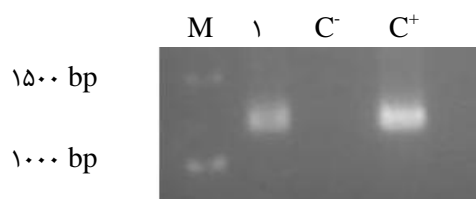
محصولات PCR با استفاده از آنزیم *T4 Ligase* (Fermentas) به جایگاه همسانه‌سازی pGEM TEasy (Promega) منتقل و همسانه‌سازی شده و مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. پس از اطمینان از صحت توالی، قطعه مورد نظر با برش دوگانه توسط آنزیم *Bam HI* و *Sma I* از پلاسمید pGEM TEasy خارج و جایگزین ژن گزارشگر GUS در pBI121 شد. سازه به دست آمده به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* DH5 انتقال داده شد. پس از انتخاب کلنی‌ها در محیط حاوی کانامایسین، با استفاده از کلونی PCR و هضم آنزیمی ورود قطعه مورد نظر به پلاسمید pBI121 مورد تأیید قرار گرفت. جهت تراریختی توتون با واسطه آگروباکتریوم، سازه به دست آمده در باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 از طریق روش انجماد و ذوب (Harisch *et al.*, 1988) منتقل شد. تراریختی توتون از طریق آلوده‌سازی قطعات برگ انجام شد (Sanjarian *et al.*, 2006) و انتخاب گیاهان تراریخت در محیط کشت حاوی کانامایسین صورت گرفت. در



(ب)

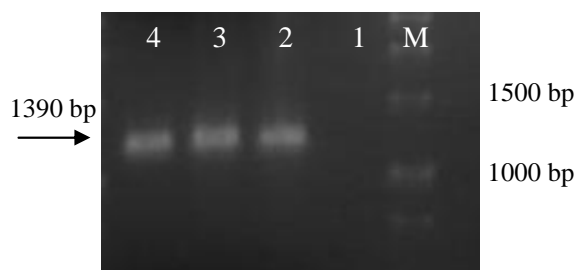
شکل ۲- تأیید انتقال ژن *FsTRI101* به پلاسمید pBI121. (الف)
 M: 1Kb ladder با آغازگرهای اختصاصی ژن. PCR pBI121+*TRI* (Fermentas)، ۱: کنترل منفی، ۲ و ۳: سازه pBI121+*TRI* 101. (ب) هضم آنزیمی با ۲ آنزیم *Eco R* و *Bam H* ۱ و ۲: سازه‌های pBI121+*TRI* 101، M: 1Kb ladder (Fermentas).

جهت ورود سازه نو ترکیب به گیاه، سازه ژن pBI121+*TRI* 101 به باکتری *A. tumefaciens* انتقال یافته و به وسیله کلنی PCR باکتری اگروباکتریوم حاوی این سازه انتخاب شد (شکل ۳).



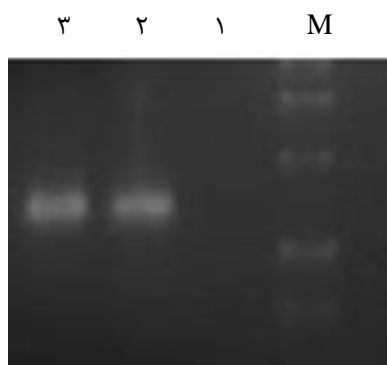
شکل ۳- کلنی PCR باکتری از اگروباکتریوم. M: 1Kb ladder (Fermentas)، ۱: اگروباکتریوم دارای سازه pBI121+*TRI* 101، C⁻: کنترل منفی، C⁺: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121+*TRI* 101).

اگروباکتریوم به دست آمده در تراریختی گیاهان توتون از طریق آلودگی قطعات برگ‌گی مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تأیید انتقال تراژن به ژنوم گیاه توتون، ابتدا از گیاهان مقاوم به کانامایسین DNA ژنومی استخراج و با استفاده از جفت آغازگرهای *FTRI101* و *RTI101* PCR انجام پذیرفت، مشاهده قطعاتی با اندازه تقریبی ۱۳۹۰ bp در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاه غیرتراریخت، ورود سازه‌های ژنی مورد نظر را به توتون اثبات نمود (شکل ۴).



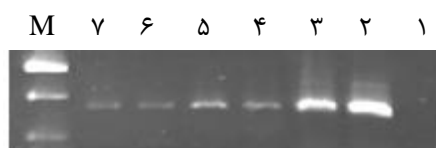
شکل ۱- همسانسازی ژن *FsTRI101* توسط واکنش PCR. ۱- کنترل منفی با آب، ۲ و ۳ و ۴- تکثیر ژن *FsTRI101* با استفاده از الگوی DNA قارچ *F. sporotrichioides*. M: 1Kb DNA Ladder (Fermentas)

محصولات PCR در جایگاه همسانسازی pGEM TEasy همسانسازی شده و مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. توالی‌یابی صحت توالی به دست آمده را تأیید کرد. از آنجا که ژن *FsTRI101* دارای جایگاه برشی برای آنزیم *Sac I* است، برای همسانسازی آن در پلاسمید pBI121 این ژن توسط برش دوگانه توسط آنزیم‌های *Bam HI* و *Sma I* از پلاسمید pGEM TEasy جدا شد. انتهای ایجاد شده توسط برش آنزیمی با *Sma I* به صورت انتهای صاف است. پلاسمید pBI121 نیز توسط دو آنزیم *Bam HI* و *ECI136 II* برش داده شد. آنزیم *ECI136 II* نئوشیزومر آنزیم *Sac I* است اما انتهای غیرچسبنده به جا می‌گذارد. بدین ترتیب *ECI136 II* ژن مورد نظر با یک انتهای چسبنده و یک انتهای غیرچسبنده در پلاسمید pBI121 همسانسازی گردید. سازه ساخته شده توسط PCR و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Eco R* و *Bam H* تأیید شد (شکل ۲).



(الف)

شکل ۵- RT-PCR برای تأیید نسخه برداری تراژن *FsTRI101* در گیاهان تراریخت. ۱: کنترل منفی با گیاه غیرتراریخت، ۲: کنترل منفی RT-PCR بدون *Reverse transcriptase* 1Kb M: ladder (Fermentas) ۳-۷: گیاهان تراریخت.

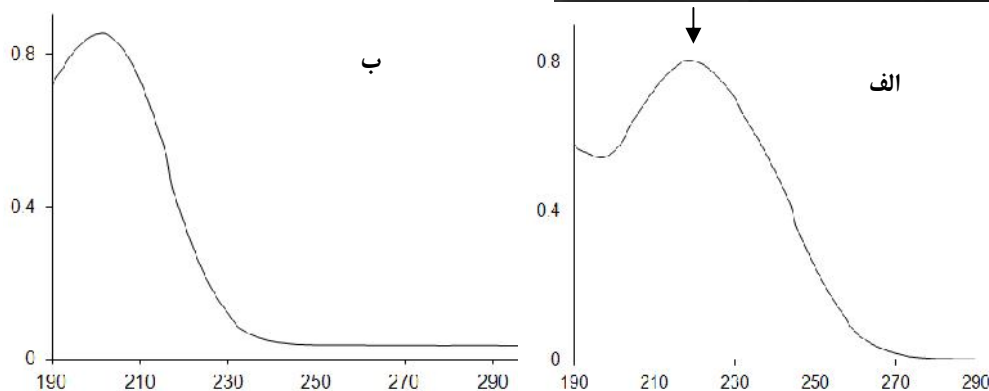
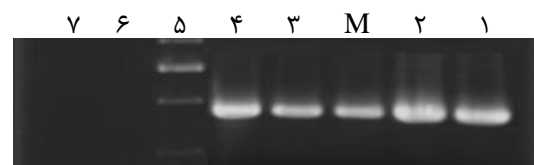


شکل ۴- PCR برای تأیید تراریختی گیاه توتون حاوی ژن *FsTRI101*. ۱: گیاه غیرتراریخت، ۲: کنترل مثبت (پلاسمید *pBI121+TRI 101*) ۳-۷: گیاهان تراریخت، M: 1Kb ladder (Fermentas)

بررسی نحوه رشد و توسعه ریشه بذور گیاهان تراریخت در حضور میکوتوکسین DON در محیط کشت مایع MS انجام گرفت. بیشترین میزان جذب در نمونه DON خاص در طول موج حدود ۲۱۸ نانومتر بود (شکل ۶- الف) که با طول موج ذکر شده توسط شرکت سازنده (biopure, Austria) تطابق داشت، اما در نمونه گرفته شده از محیط کشت گیاهان بعد از ۴ روز اثری از این پیک نبود (شکل ۶- ب) که نشانگر جذب DON توسط گیاهچه‌ها بود.

۴ روز بعد از انتقال گیاهچه‌های دو برگی به محیط حاوی توکسین نحوه رشد ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که در گیاه تراریخت رشد یافته در محیط حاوی DON، ریشه‌ها همچنان به رشد تقریباً مستقیم خود ادامه می‌دهند اما در گیاهان غیرتراریخت به دلیل وجود توکسین در محیط، ریشه‌ها از DON اجتناب کرده و در نتیجه از مسیر مستقیم رشد خود منحرف شده و ریشه‌ها خمش می‌یابند (شکل ۷).

جهت تأیید نسخه برداری تراژن‌های *FsTRI101* در گیاهان توتون تراریخت واکنش RT-PCR با استفاده از RNA کل از گیاهان توتونی که تراریختی آن‌ها در مرحله قبل به اثبات رسیده بود، انجام شد. جهت اطمینان از عدم آلودگی RNA استخراجی با DNA، یک واکنش بدون افزودن آنزیم *Reverse Transcriptase* انجام شد. عدم وجود تکثیر قطعه موردنظر نشانگر عدم آلودگی واکنش با DNA ژنومی و وجود این قطعه در سایر واکنش‌ها نشانگر رونویسی از تراژن بود (شکل ۵).



شکل ۶- نمودار جذب نور در طول موج‌های مختلف توسط الف) DON خالص و ب) محیط کشت به همراه 20ppm DON که در مدت ۴ روز توسط گیاه مصرف شده است. پیکان جذب توسط DON را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل پیداست این پیک در محیط کشت مصرف شده توسط گیاه وجود ندارد.

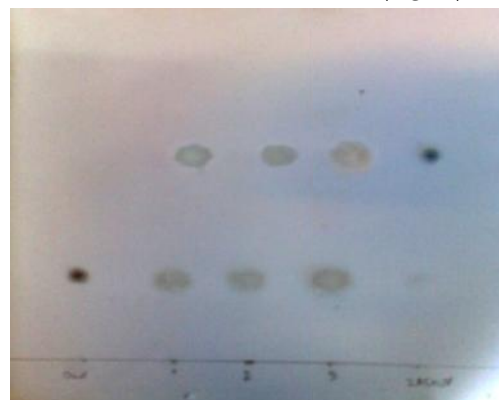


شکل ۷- بررسی نحوه و الگوی رشد ریشه گیاه توتون در محیط حاوی توکسی DON. (۱) توتون تراریخت در محیط فاقد DON ۲: توتون تراریخت در محیط دارای DON، (۳) توتون غیرتراریخت در محیط فاقد DON، (۴) توتون غیرتراریخت در محیط دارای DON. همان‌طور که در شکل پیداست ریشه گیاه تراریخت در محیط دارای DON خمش کمتری نسبت به گیاه تراریخت پیدا کرده است.

آن را تشدید می‌کند (Shima *et al.*, 1997). در سطح سلول این توکسین باعث جلوگیری از سنتز پروتئین و همچنین تخریب غشا سلولی می‌شود که در نتیجه آن نشت الکترولیت‌ها و مرگ سلول را موجب می‌شود (Walter and Doohan, 2011). چنانچه گروه هیدروکسیل کربن شماره ۳ DON با گروه‌هایی از قبیل استیل یا گلیکوزیل جایگزین شود، سمیت آن تا ده برابر برای انسان و دو برابر برای گیاه کم می‌شود (Poppenberger *et al.*, 2003). در قارچ‌های مولد، ژن *TRI 101* با فعالیت 3-O- استیل ترانسفراز در محافظت از خود قارچ در برابر توکسین‌های تولیدی به‌عنوان مکانیسم‌های خود ایمنی نقش دارد. در نتیجه فعالیت آن، قارچ با تولید 3A-DON ریشه‌های خود را از اثرات سمی توکسین در امان نگه داشته و در زمان موردنیاز با فعالیت داستیلازی آن را به DON که سمیت آن بیشتر است تبدیل می‌کند و به این ترتیب شدت بیماری‌زایی خود را بالا ببرد (Kimura *et al.*, 1998). قارچ‌ها همچنین دارای ژن *TRI 201* هستند که آن هم نوعی استیل ترانسفراز است و در کاهش سمیت DON نقش دارد. دو ژن *TRI 101* و *TRI 201* توسط اکثر گونه‌های فوزاریوم تولیدشده و تشابه ژنتیکی توالی آن‌ها ۶۶-۹۸٪ است. آنزیم‌های کدشده توسط این ژن‌ها می‌توانند ۵۰-۱۰۰٪ DON را به 3-ADON تبدیل کنند که این میزان بسته به گونه فوزاریوم متفاوت است (Khatibi *et al.*, 2011).

از آنجا که در حال حاضر روش‌های کمی برای ایجاد تحمل به بیماری و حذف تریکوتسین‌ها وجود دارد (Jianwei *et al.*, 2010)، به‌نظر می‌رسد استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی در کاربرد آنزیم‌هایی که سمیت این

انجام واکنش آنزیمی و مشاهده لکه محصولات واکنش بر روی کاغذ TLC نشان داد که پروتئین استخراج‌شده از گیاهان تراریخت توانایی تبدیل DON به مشتق استیل آن، 3ADON را دارد. اگرچه این واکنش برگشت‌پذیر می‌باشد اما وجود فعالیت استیل ترانسفراز را در این واکنش اثبات می‌کند (شکل ۸).



شکل ۸- محصولات واکنش آنزیمی جهت تأیید فعالیت استیل ترانسفراز پروتئین‌های *FsTRI101* در گیاهان تراریخت. ۱: DON خالص (مارکر)، ۲-۴: واکنش آنزیمی با استفاده از پروتئین استخراج‌شده از لاین‌های مختلف توتون تراریخت، در این واکنش‌های آنزیمی مقداری از سوبسترای DON تبدیل به 3-ADON گردیده و محصولات نهایی به‌صورت دو لکه (DON, 3-ADON) دیده می‌شوند. ۵: 3-ADON خالص (مارکر).

دی‌اکسی‌نیوالنول، غالب‌ترین میکوتوکسین تریکوتسنی تولید شده توسط *F. graminearum*، دارای یک گروه اپوکسی در موقعیت کربن‌های ۱۲ و ۱۳ است که خاصیت سیتوتوکسیتی آن را باعث می‌شود (Prangle *et al.*, 2005). علاوه بر این ترکیب در ساختار خود دارای ۳ گروه هیدروکسیل از جمله در کربن شماره ۳ است که سمیت

سپاسگزاری

این پژوهش قسمتی از رساله کارشناسی ارشد نگارنده اول است. نگارندگان از پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری در اجرای طرح پژوهشی ۳۸۱ به دلیل فراهم‌آوری امکانات انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

- Alexander NJ, McCormick SP, Waalwijk C, Van Der Lee T, Proctor RH (2011) The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. Fungal Genet. Biol. 48: 485–495.
- Dean R, Van kan J, Pretorius Z, Hammond-Kosack K, Dipietro A, Spanu P, Rudd J, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster G (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13: 414–430.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bulletin 19: 11-15.
- Foroud NA, Eudes F (2009) Trichothecenes in cereal grains. Int. J. Mol. Sci. 10: 147–173.
- Gilbert J, Tekauz A (2011) Strategies for management of *Fusarium* head blight (FHB) in cereals. Prairie Soils & Crops Journal 4: 97-104.
- Foroutan A, Ershad D, Dalili A, Bamdadian T, Gerami GH (1993) Occurrence of head blight of wheat in Mazandaran. Proceedings of the 11th Iranian Plant Protection Congress, Gillan University, Rasht, Iran.
- Golzar H, Foroutan A, Ershad D (1998) Studies off *Fusarium* species causing head blight of wheat and sources of resistance to *F. graminearum* in Gorgan and Mazandaran. Iran J. Plant Pathol. 34:158-169
- Goswami RS and Kistler HC (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol. Plant Pathol. 5: 515–525.
- Harisch RB, Fry J, Hoffmann N, Nidermeyer J, Rogres SG, Fraley RT (1988) Leaf disc transformation; in Gelvin SB and Schilperoort RA (ed) Plant molecular biology manual, Kluwer Academic. pp: 1-9.
- He J, Zhou T, Young JC, Boland GJ, Scott PM (2010) Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains. Trends in food Science and Technology.21:67-76.
- Karlovsky P (2011) Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91: 491-504.
- Khatibi PA, Newmister SA, Rayment I, McCormick SP, Alexander NJ, Schmale DG (2011) Bioprospecting for trichothecene 3-O-acetyltransferases in the fungal genus *Fusarium* yields functional enzymes with different abilities to modify the mycotoxin deoxynivalenol. Appl. Environ. Microbiol. 77: 1162-1170
- Kimura M, Kaneko I, Komiyama M, Takatsuki A, Koshino H, Yoneyama K, Yamaguchi I (1998) Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101. J. Biol. Chem. 273: 1654-1661.
- McCormick SP, Alexander NJ, Trapp SE, Hohn TM (1999) Disruption of *TRI101*, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. Appl. Environ. Microbiol. 65(12): 5252-5256.
- Merseca M, Mahfoud R, Garmy N, Fantini J (2002) The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. J. Nutr.132: 2723-2731.

مواد را کاهش می‌دهند، از عمده‌ترین راهکارها برای غلبه بر این مشکل است. در مطالعه حاضر کارایی سم‌زدایی ژن *TRI 101* از قارچ *F. sporotrichioides* (*FsTRI101*) مورد بررسی قرار گرفت. اما انتخاب بهترین و کارآمدترین مکانیسم در گیاه هدف، گندم، مستلزم مطالعه، شناسایی و مقایسه توانایی آنزیم‌های دیگر و یا حتی دو آنزیم از این مسیر در گیاه مدل توتون و پیشنهاد مناسب‌ترین گزینه موجود می‌باشد.

- Mitterbauer R, Adam G (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*: useful model systems for the identification of molecular mechanisms involved in resistance of plants to toxins. Eur. J. Plant Pathol. 108: 699-703.
- Moosawi-Jorof SA (2003) First report of Fusarium Head Blight in Khuzestan province, Iran. Iran. J. Plant. Path. 39: 79-80.
- Nicholson P, Simpson DR, Wilson AH, Chandler E, Thomsett M (2004) Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. Eur. J. Plant Pathol. 110: 503-514.
- Ohsato S, Ochiai-Fukuda T, Nishiuchi T, Takahashi-Ando N, Koizumi S, Hamamoto H, Kudo T, Yamaguchi I, Kimura M (2007) Transgenic rice plants expressing trichothecene 3-O-acetyltransferase show resistance to the *Fusarium* phytotoxin deoxynivalenol. Plant Cell Rep. 26: 531-538.
- Pestka JJ (2007) Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. Anim. Feed Sci. Tech. 137:283-298.
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glossl J, Luschnig C, Adam G (2003) Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 278: 47905-47914.
- Prange A, Birzele B, Kramer J, Meier A, Modrow H, Kohler P (2005) *Fusarium* inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. Food Control. 16: 739-745.
- Safaie N, Alizadeh A, Rahimian H, Adam G (2005) Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat head blight. Iranian J. Plant Pathol. 41: 171-191.
- Shima J, Takase S, Takahashi Y, Iwai Y, Fujimoto H, Yamazaki M, Ochi K (1997) Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3825-3830.
- Sanjarian F, Mousavi A, Alizadeh A, Weindorfer H, Adam G (2006) Evaluation of the yeast acetyltransferase (AYT1) in detoxification of the *F. graminearum* toxin deoxynivalenol in transgenic plants. Iranian J. Biology 19: 222-232.
- Walter S, Doohan F (2011) Transcript profiling of the phytotoxic response of wheat to the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. Mycotox. Res. 27:221-230.