ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵
صفحه ۱۴۲-۱۳۵

نقش محتمل ژن الکل دهیدروژناز در خنثی‌سازی مایکوتوکسین دی‌اکسی‌نیوالنول در مرحله بالغ و گیاهچه‌ای گندم

The class I alcohol dehydrogenase gene, *ADH1*, may plays a major role in detoxifying Deoxynivalenol mycotoxin at seedling and adult stage of wheat

نرجس عالمی[۱]، حسن سلطانلو*[۱]، احد یامچی[۱]، سیده ساناز رمضانپور[۱]، سعید نواب‌پور[۱]

۱- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، دانشیاران، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

Alemi N[1], Soltanloo H[*1], Yamchi A[1], Ramezanpour SS[1], Navabpour S[1]

1-Graduated MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, Associate Professors, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: soltanlooh@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۳۰- تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

قارچ فوزاریوم از قارچ‌های آلوده کننده گندم در سطح جهان می‌باشد که باعث بیماری ویرانگر بلایت فوزاریومی گندم (FHB) می‌شود که علاوه بر کاهش تولید جهانی گندم، به دلیل آلودگی دانه‌ها به تجمع مایکوتوکسین‌ها از جمله توکسین دی‌کسی‌نیوالنول در سلامت و ایمنی مواد غذایی تاثیر بسیاری دارد. در مطالعه حاضر، پاسخ ژن الکل دهیدروژناز در آلودگی به توکسین خالص DON، اسپور و عصاره قارچ در بافت‌ها و مراحل رشدی مختلف سه رقم متحمل و حساس گندم نسبت به FHB مورد بررسی قرار گرفت. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی نشان داد میزان بیان ژن الکل دهیدروژناز در سنبله‌های آلوده به توکسین DON در ۱۲ ساعت پس از آلودگی در رقم مقاوم سومای‌تری و فرونتانا افزایش شدیدی داشته‌است. همچنین الگوی تظاهر مشابهی از ژن الکل دهیدروژناز در هیپوکوتیل، ریشه و برگ در مرحله گیاهچه‌ای مشاهده شد، این در حالی است که بیان ژن الکل دهیدروژناز در بافت سنبله گیاه بالغ بیش از مرحله گیاهچه‌ای بوده است. الگوی بیان ژن الکل دهیدروژناز در پاسخ به توکسین DON، سوسپانسیون و عصاره قارچ نشان داد که DON می‌تواند به عنوان یک الیسیتور در بیان ژن الکل دهیدروژناز عمل کرده و منجر به تولید آنزیم الکل دهیدروژناز نوع یک شود که احتمالاً نقش مهمی در سم‌زدایی توکسین DON و سایر مایکوتوکسین‌ها در مراحل اولیه آلودگی به فوزاریوم در ارقام متحمل دارد.

واژه‌های کلیدی

الکل دهیدروژناز
بلایت فوزاریومی سنبله
خنثی‌سازی
گندم
DON

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.14.7]

مقدمه

قارچ *Fusarium graminearum* از گونه‌های غالب عامل بلایت فوزاریومی گندم است. FHB[1] یکی از بیماری‌های مهم اقتصادی گندم و جو در بسیاری از مناطق دنیا است. این بیماری باعث کاهش عملکرد دانه و کیفیت آن می‌شود. کاهش عملکرد نتیجه عقیم ماندن گل‌ها و تولید بذور چروکیده و سبک است. اهمیت اقتصادی این بیماری بیشتر به علت وجود فیتوتوکسین‌ها در بذور آلوده است (Malihipoor et al. 2000). قارچ *F. graminearum* بسته به شرایط محیطی قادر به تولید مایکوتوکسین‌های متفاوتی است. مایکوتوکسین دی اکسی نیوالنول (DON)[2] که به‌وسیله این قارچ تولید می‌شود، با مصرف دانه‌های آلوده آثار نامطلوبی بر سلامتی انسان و حیوانات برجای می‌گذارد (Nevo and Chen 2010). دی‌کسی‌نیوالنول یک ممانعت کننده آنزیم پپتیدیل‌ترانسفراز در یوکاریوت‌هاست که در روند بیماری‌زایی قارچ با غیرفعال کردن و یا به تأخیر انداختن بیان پروتئین‌های مرتبط با مقاومت در گیاه، باعث تشدید شدت بیماری می‌شود (Miedaner et al. 2003).

برای کنترل بیماری استفاده از قارچ‌کش‌ها یا روش کنترل زراعی فقط خسارات ناشی از کاهش عملکرد را کاهش می‌دهند ولی نمی‌توانند مانع تجمع مایکوتوکسین‌ها در دانه‌های گندم شوند، اما استفاده از واریته‌های متحمل علاوه بر پوشش دادن خسارت ناشی از کاهش عملکرد، از تجمع مایکوتوکسین‌ها در دانه جلوگیری می‌کند. بنابراین ایجاد مقاومت به DON همواره به‌عنوان یکی از عوامل مهم مقاومت پیچیده و پلی ژنی در مقابل FHB مطرح می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که کشت ارقام مقاوم هم از نظر زیست محیطی و هم از نظر اقتصادی و میزان تاثیر بهترین راهکار برای کنترل FHB باشد (Bai et al. 2001).

گیاهان قادرند در پاسخ به تنش‌های زیستی مکانیسم‌های سازگاری خود را فعال کنند و با تغییر بیان ژن‌های خود به عوامل محیطی واکنش نشان دهند. بنابراین ضروری است که ژن‌های مسئول مقاومت شناسایی و با اطلاع از نقش آن‌ها در مکانیسم مقاومت، استراتژی‌های موثر برای اصلاح مقاومت به بیماری‌ها ایجاد شود. یکی از راه‌های بررسی الگوی بیان ژن‌ها و اندازه‌گیری میزان رونوشت‌های mRNA رمز شده از تک تک ژن‌ها است (Seki et al. 2002).

qRT-PCR روش مناسبی برای مطالعه تظاهر ژن‌ها با دقت و حساسیت زیاد و اطمینان بالا به شمار می‌رود. این فن‌آوری در بین روش‌های کمی دقت مطلوبی داشته و می‌توان از آن برای مقایسه سطوح mRNA برای تعیین الگوی تظاهر ژن و تجزیه ساختار RNA استفاده کرد (Bustin 2000).

شناسایی مکانیسم‌های مولکولی درگیر در واکنش‌های دفاعی رقم متحمل در پاسخ به آلودگی فوزاریومی، افق جدیدی برای اصلاح‌گران در ایجاد ویژگی‌های فیزیولوژیکی مناسب در رقم حساس می‌گشاید (Soltanloo et al. 2010). از مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به فوزاریوتوکسین‌ها می‌توان به سم‌زدایی از توکسین‌ها و غیرفعال‌سازی توکسین DON اشاره کرد. از راه‌های حفاظت از ریزسازواره‌های تولید کننده آنتی بیوتیک‌ها از خودشان، متابولیزه کردن این ترکیبات و کاهش اثرات سمی آن‌ها است. در قارچ‌های تولید کننده مایکوتوکسین آنزیم‌های مختلفی با این کارکرد وجود دارد. قارچ *F. graminearum* به کمک آنزیم تریکوتسین ۳-۵-استیل ترانسفراز (TRI 101) تریکوتسین‌ها را به مشتقاتی با سمیت کم‌تر تبدیل می‌کند (Kimura et al. 2007). علاوه بر قارچ فوزاریوم، برای آنزیم‌های سم‌زدایی کننده از تریکوتسین‌ها، منابع دیگری در طبیعت شناسایی شده‌اند، از جمله می‌توان به باکتری‌های خاکزی اشاره کرد که توانایی تبدیل DON را به ۳-کتو-٤-دی اکسی نیوالنول دارند (Garvey et al. 2008). برای سم‌زدایی از توکسین‌ها علاوه بر اضافه کردن گروه‌های استیل (Alexander et al,2002)، افزودن گلوکوزیل نیز پیشنهاد شده‌است (Poppenberger et al. 2003). ژن الکل دهیدروژناز در طول مراحل مختلف رشدی گیاه حضور دارد و در واکنش به تنش‌ها، السیتورهای پاتوژنی و جراحت بیان می‌شود که نقش آن تبدیل الکل به کتون و آلدهید با استفاده از کوآنزیم NAD+ در شرایط تنش‌های زیستی و غیر زیستی است و در نتیجه باعث افزایش پایداری مولکول‌ها می‌شود (Gigot et al. 2010).

در این پژوهش، تکنیک Real time PCR برای ارزیابی الگوی بیان ژن الکل دهیدروژناز در گندم نسبت به آلودگی فوزاریومی

[1] Fusarium head blight
[2] Deoxynivalenol

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.14.7]

بکار گرفته شد. هدف از این مطالعه مقایسه الگوی بیان ژن الکل دهیدروژناز در شرایط تیمارهای مختلف شامل توکسین DON، عصاره قارچ و سوسپانسیون اسپور قارچ، در مراحل رشدی مختلف سه رقم گندم نان بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه از سه رقم گندم (*Triticum aestivum*) به نام‌های سومای‌تری و فرونتانا (مقاوم به بیماری FHB) و فلات حساس به فوزاریوم سنبله استفاده شد. هر کدام در ردیف‌هایی به صورت جداگانه و با فاصله از هم برای نمونه های مزرعه‌ای کشت شدند.

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ

از جدایه قارچ *F. graminearum* جدایه ۱۳۹۱ گرگان، برای تهیه سوسپانسیون استفاده شد. قارچ مورد نظر روی محیط کشت سیب-زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت و درون انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از حدود یک هفته قارچ کل سطح محیط کشت را پوشاند. پنج گرم پودر کاه گندم درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری قرار داده و ۱۲۵ میلی‌لیتر آب به هر ارلن اضافه شد. ارلن‌ها دو بار به فاصله ٢٤ ساعت به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر قرار گرفت. پس از اتوکلاو، ارلن‌ها به زیر هود لامینار منتقل و به اندازه یک سانتی‌متر مربع از محیط کشت حاوی قارچ به هر یک از ارلن‌ها اضافه شد. در ادامه ارلن‌ها به مدت ٩٦ ساعت درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت rpm ۱۲۰ قرار داده شدند. پس از ٩٦ ساعت محیط درون ارلن‌ها در زیر هود با استفاده از پارچه سترون صاف شد. از محلول صاف شده که به‌صورت یک سوسپانسیون به رنگ قهوه ای تیره بود نمونه‌گیری شد و با استفاده از لام هموسیتومتر، غلظت سوسپانسیون برحسب تعداد ماکروکنیدی‌ها در هر میلی لیتر تعیین شد. در این آزمایش، از سوسپانسیون تازه قارچ استفاده شد و از غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر برای تلقیح در مزرعه استفاده شد.

تهیه عصاره کشته شده قارچ

۱۰۰ گرم برنج دانه سفید با ٤٣ میلی‌لیتر آب‌مقطر به‌مدت ٦ ساعت خیسانده شد و دو بار هر بار به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شد. سپس از سوسپانسیون قارچ فوزاریوم جدایه ۱۳۹۱ گرگان با غلظت ۱×۱۰^{٦} اسپور در میلی‌لیتر برای آلوده‌سازی استفاده شد و به‌منظور رشد قارچ، محیط مذکور به‌مدت ۱۸ روز در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. در ادامه برای عصاره‌گیری به ازای هر ۱۰ گرم برنج، ۲۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و با استفاده از همزن برقی مخلوط مذکور را کاملاً آسیاب کرده و پس از دو ساعت با کاغذ واتمن شماره یک فیلتر شد. از مخلوط باقی-مانده دو بار دیگر عصاره گرفته شد و هر بار ۲۰ میلی‌لیتر متانول اضافه کرده و عمل صاف کردن تکرار شد (He et al. 2007). در نهایت از عصاره حاصل برای آلوده‌سازی سنبله‌ها در مزرعه استفاده شد.

به‌منظور حصول اطمینان از وجود توکسین DON در عصاره کشته شده قارچ فوزاریوم از روش کروماتوگرافی مایع (HPLC) با ستون Prosphere 100 C18 5u (150 mm × 4.6 mm) استفاده شد. برای آماده‌سازی محلول‌های استاندارد از توکسین خالص DON با غلظت ppm ۱۰۰۰ (شرکت سیگما، امریکا)، غلظت‌های ppm ۰/۲، ppm ۰/۵، ppm ۰/۸ و ppm ۱ تهیه شدند. برای رقیق-سازی از آب دیونیزه استفاده گردید. مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره به ستون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تزریق شد. محلول استونیتریل: آب (نسبت ۹۰:۱۰ حجمی/ حجمی) به‌عنوان فاز متحرک همچنین سرعت جریان دستگاه ۰/٦ میلی‌لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد. توکسین DON در طول موج ۲۱۸ نانومتر با استفاده از آشکارساز UV شناسایی شد.

تهیه محیط کشت حاوی توکسین خالصDON با غلظت ppm ۱۰ به‌منظور ارزیابی مقاومت به بلایت فوزاریومی در مراحل اولیه رشد نسبت به توکسین DON به‌عنوان عامل اصلی بیماری‌زایی قارچ فوزاریوم، محیط کشت با ترکیبات نمک‌های فسفات سدیم، دی هیدروژن فسفات پتاسیم، آگار و آب‌مقطر تهیه شد. از توکسین خالص DON (شرکت سیگما، آمریکا) با غلظت ppm ۱۰ برای آلوده‌سازی محیط کشت استفاده شد، بذور رقم‌های سومای‌تری و فلات به‌صورت جداگانه در دو سطح تیماری شامل

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.14.7]

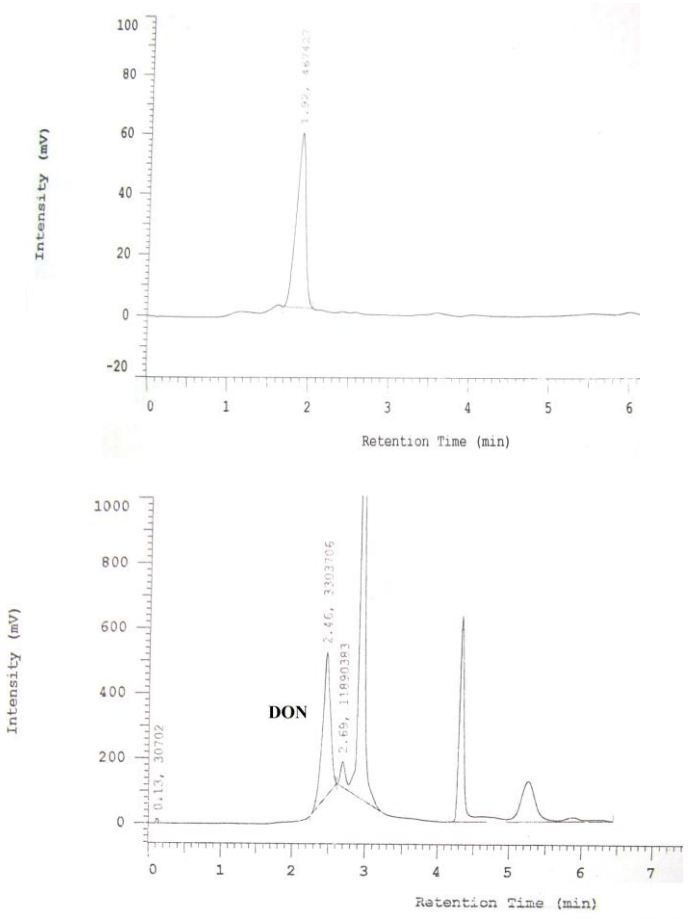
محیط کشت حاوی توکسین DON باغلظت ppm ۱۰ و محیط کشت بدون توکسین DON به‌عنوان شاهد قرار داده شدند که پس از جوانه‌زنی بذور نمونه‌گیری اول، ۳ روز پس از کشت از هیپوکوتیل و ریشه به‌صورت همزمان و نمونه‌برداری دوم ١٤ روز پس از کشت زمان رویت گیاهچه‌های دوبرگی از ریشه و برگ صورت گرفت، پس از نمونه‌گیری بلافاصله نمونه‌ها در ازت مایع قرار داده شدند و برای استخراج RNA به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

مایه‌زنی مصنوعی ارقام

با توجه به این‌که دوره آسیب‌پذیری گندم به بیماری بلایت فوزاریومی در طول مرحله به سنبله رفتن و باز شدن گلچه‌ها است، در این بررسی نیز هر سه رقم گندم با تیمارهای مختلف شامل سوسپانسیون اسپور قارچ *F. graminearum* با غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر، عصاره قارچ و توکسین DON با غلظت ppm ۱۰ و آب به‌عنوان تیمار شاهد مایه‌زنی شدند، به این‌صورت که ۱۰ میکرولیتر از هر تیمار به صورت جداگانه به تمام گلچه‌های وسطی سنبله بین لما و پالئا تزریق شد.

نمونه‌برداری از سنبله‌ها و استخراج RNA

اولین نمونه‌برداری قبل از مایه‌زنی سنبله‌های غیر آلوده هر دو رقم انجام گرفت و به‌عنوان کنترل و زمان صفر در نظر گفته شد. نمونه‌برداری‌های بعدی از سنبله‌های آلوده در زمان‌های ۳، ٦، ۱۲، ٢٤، ٤٨، ۷۲ ساعت پس از آلودگی انجام گرفت. سپس نمونه‌های گرفته شده از سنبله برای جلوگیری از تجزیه RNA موجود در بافت بلافاصله در ازت مایع قرار گرفتند و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. استخراج RNA توسط کیت P-biozol (شرکت بیونیر، ژاپن) طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. برای تعیین کمیت RNAهای استخراج شده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ٢٦٠ نانومتر و برای تعیین کیفیت از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد.



شکل ۱- نمودار غلظت سنجی توکسین دی‌اکسی‌نیوالنول به روش HPLC با استفاده محلول استاندارد توکسین DON (بالا) و عصاره کشته شده قارچ فوزاریوم حاوی توکسین DON (پایین)

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در QRT-PCR

ژن	نام کامل ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر پیشرو	توالی آغازگر پسرو	طول محصول (bp)
TEF	Translation elongation factor	*M90077*	5'- TGACATGAGGCAAACTGTGG -3'	5'- CATATCACACGGCGCTAACA -3'	۱۸۷
ADH1	Alcohol dehydrogenase	*EF122847*	5'- ATTCAAGACCCACCCGATGA -3'	5'- ATGAGGTCGAACGCCTTGTT -3'	۱۸٦

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.14.7]

تیمار آنزیم DNase I برای حذف DNA ژنومی بر روی RNA استخراجی قبل از سنتز cDNA صورت گرفت. در ادامه با توجه به‌میزان غلظت RNA هر نمونه، به مقدار مساوی توسط oligo dT و آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase اقدام به ساخت cDNA شد. آغازگرهای پیشرو و پسرو برای انجام qRT-PCR به وسیله نرم‌افزار آنلاین Primer3 و اطلاعات ثبت شده در بانک ژن NCBI طراحی شد (Rozen and Skaletsky 2000). اطلاعات مربوط به آغازگرهای اختصاصی به‌همراه آغازگر ژن خانه‌دار *TEF* در جدول یک ارائه شده است.

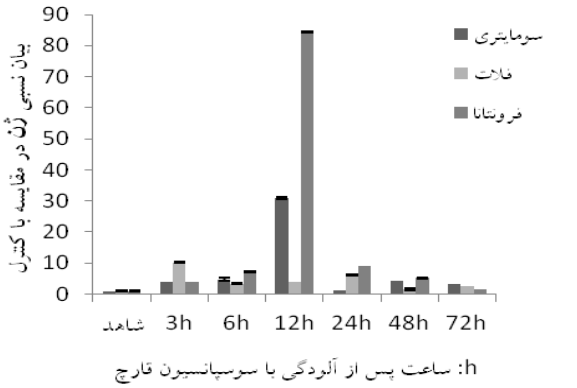
آزمایش RT-PCR کمی

آزمایش‌های PCR در زمان واقعی (Real-Time PCR) با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I و کیت سایبربیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران) در دستگاه iQ5 (شرکت بیورد، امریکا) انجام شد. بعد از فاز اولیه آنزیم DNA پلیمراز در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، تکثیر نمونه‌ها در ۳۵ سیکل انجام گرفت (دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦٢ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه). برای هر نمونه ۳ تکرار تکنیکی و ۲ تکرار بیولوژیکی در نظر گرفته شد.

پس از بررسی نتایج و بدست آوردن داده‌ها در نرم افزار iQ5، از نرم افزار REST جهت محاسبه مقادیر تغییرات میزان بیان ژن مورد بررسی در تیمارهای مختلف استفاده شد.

نتایج و بحث

cDNAهای سنتز شده از RNA در مرحله گیاهچه‌ای و سنبله‌های آلوده و غیر آلوده ارقام گندم شامل فلات، سومای‌تری و فرونتانا در محدوده‌های زمانی تعیین شده پس از آلودگی، با آغازگرهای اختصاصی *ADH1* و همچنین آغازگرهای عمومی ژن TEF به عنوان ژن خانه‌دار در آزمون RT-PCR به کار گرفته شدند. هدف از بکارگیری تیمارهای قارچی اسپور، بررسی اثر این تیمارها در مقایسه با تیمار توکسین خالص دی‌کسی‌نیوالنول به‌منظور مطالعه نحوه پاسخ ژن الکل دهیدروژناز بود.



شکل ۲- روند تغییرات بیان ژن الکل دهیدروژناز در مرحله گیاه بالغ و بافت سنبلچه ارقام فلات، فرونتانا و سومای‌تری در تیمار با سوسپانسیون اسپور قارچ.

اثر سوسپانسیون اسپور قارچ فوزاریوم بر میزان بیان ژن الکل دهیدروژناز در سنبله همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود روند بیان ژن الکل دهیدروژناز در بازه‌های زمانی مختلف بعد از آلودگی در سه رقم متفاوت می‌باشد. با افزایش زمان آلودگی میزان بیان این ژن در رقم فلات کاهش یافته این در حالی است که میزان بیان این ژن در دو رقم سومای‌تری و فرونتانا با افزایش زمان آلودگی افزایش یافته به طوری‌که در ۱۲ ساعت پس از آلودگی افزایش ناگهانی بیان ژن مشاهده شد و این افزایش بیان در رقم فرونتانا بیشتر از رقم سومای‌تری بوده است. در ٢٤ ساعت پس از آلودگی کاهش ناگهانی بیان ژن در دو رقم مشاهده شد و در ٤٨ و ۷۲ ساعت نیز میزان بیان ژن روند کاهشی داشته است. در روند آلودگی با قارچ فوزاریوم سه مرحله پیش رو است، کلونیزه شدن قارچ در ٦ تا ۱۲ ساعت پس از آلودگی شامل جوانه زنی و رشد هیف قارچ در سلول‌های میزبان که در خلال مرحله اول اتفاق می‌افتد و هیچ‌گونه از علایم بیماری در این مرحله مشاهده نمی‌شود. در مرحله دوم میزان آلودگی وسعت بیشتری پیدا کرده و هیف قارچ در تمامی سلول‌ها و فضاهای بین سلولی نفوذ کرده و شامل تولید و فعال‌سازی مایکوتوکسین‌های قارچ در میزبان است و در نهایت مرحله سوم که انتشار قارچ در گیاه کامل شده و شامل بروز علایم در گیاه است (Boenisch and Schafer 2011). با توجه به الگوی تظاهر ژن الکل دهیدوژناز، افزایش ناگهانی میزان بیان ژن در ۱۲ ساعت پس از آلودگی در دو رقم مقاوم سومای‌تری و فرونتانا نشان دهنده واکنش دفاعی گیاه در

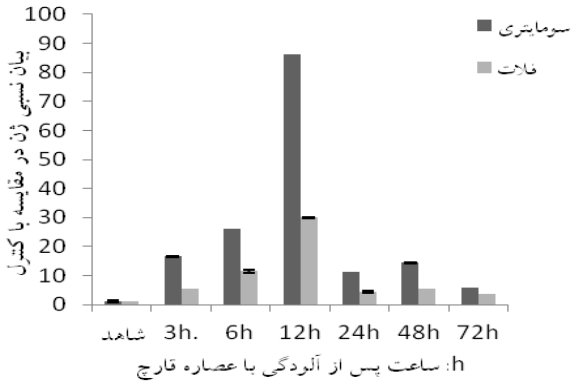
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.14.7]

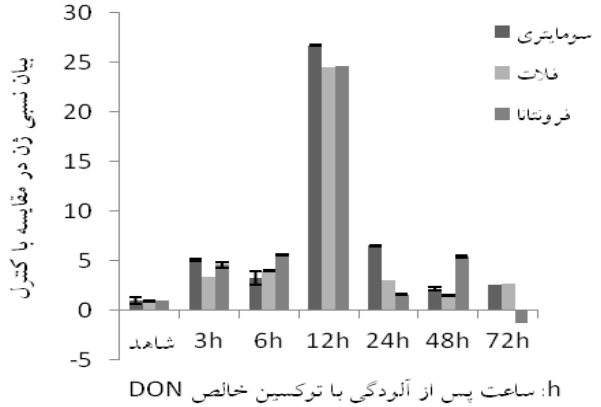
مقابل فعال‌سازی مایکوتوکسین‌های قارچ در این زمان بوده است و می‌توان به ایفای نقش این ژن در مبارزه با توکسین پی برد.

پس از استخراج عصاره قارچ میزان توکسین DON موجود در آن با استفاده از روش HPLC به‌روش مقایسه با محلول استاندارد دی‌اکسی‌نیوالنول مورد ارزیابی قرار گرفت. در شکل ۱ نمودار مربوط به حرکت توکسین DON و عصاره کشت قارچ فوزاریوم نشان داده شده است. با استفاده از غلظت سنجی میزان توکسین موجود در عصاره، غلظت عصاره طوری در محیط کشت تنظیم شد که میزان غلظت نهایی توکسین DON در محیط کشت برابر ۱۰ ppm شود. در الگوی مشاهده شده بیان ژن الکل دهیدروژناز به دلیل وجود همه مایکوتوکسین‌های قارچ در عصاره از ۳، ٦ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی افزایش بیان ژن در هر دو رقم مشاهده شد با این تفاوت که افزایش بیان در رقم مقاوم سومای‌تری بسیار بیشتر بوده که نشان دهنده فعالیت این آنزیم در غیرفعال‌سازی و سمیت‌زدایی از مایکوتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ است و به نظر می‌رسد زمان بحرانی برای فعالیت این آنزیم ۱۲ ساعت پس از شروع آلودگی می‌باشد. در ادامه با گذشت ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از آلودگی میزان بیان ژن کاهش داشته که کاهش بیان ژن در رقم حساس بیشتر بود (شکل ۳).

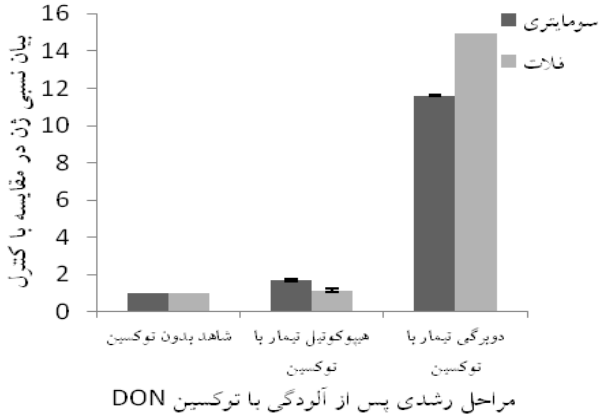
فعالیت ژن الکل دهیدروژناز کاملاً منطبق با الگوی بیان این ژن در سنبله در پاسخ به آلودگی با اسپور قارچ فوزاریوم می‌باشد. در بیان ژن الکل دهیدروژناز در تیمار با توکسین DON در ۳ و ٦ ساعت پس از آلودگی در هر سه رقم افزایش بیان تقریبا ثابتی مشاهده شد اما در ۱۲ ساعت پس از آلودگی هر سه رقم افزایش بیان ناگهانی داشتند. و در ادامه در ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از آلودگی کاهش بیان ژن در هر سه رقم مشاهده شد (شکل ٤). این نتیجه احتمالاً نشان می‌دهد که در صورت عدم وجود سایر توکسین‌ها و اسپور قارچ زنده تفاوتی در الگوی بیان ژن الکل دهیدروژناز بین ارقام حساس و مقاوم وجود ندارد. در مرحله گیاهچه دو برگی در ارقام سومای‌تری و فلات میزان بیان ژن الکل دهیدروژناز در پاسخ به توکسین خالص DON افزایش داشته است و منطبق بر الگوی بیان این ژن در سنبله می‌باشد هرچند مقدار افزایش بیان ژن در گیاهچه دو برگی بسیار کمتر از مرحله گیاه بالغ و بافت سنبله می‌باشد (شکل ٥).



شکل ۳- روند تغییرات بیان ژن الکل دهیدروژناز در مرحله گیاه بالغ و بافت سنبلچه ارقام فلات، فرونتانا و سومای‌تری در تیمار با عصاره قارچ فوزاریوم.



شکل ٤- روند تغییرات بیان ژن الکل دهیدروژناز در مرحله گیاه بالغ و بافت سنبلچه ارقام فلات، فرونتانا و سومای‌تری در تیمار با توکسین خالص DON.



شکل ٥- روند تغییرات بیان ژن الکل دهیدروژناز در مرحله گیاهچه‌ای ارقام فلات، فرونتانا و سومای‌تری در تیمار با توکسین خالص DON.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.14.7]

جالب توجه بود که میزان بیان ژن الکل دهیدروژناز در مرحله هیپوکوتیل در هر دو رقم نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان نداد. این موضوع بیانگر عدم القای ژن مذکو در مرحله رشد هیپوکوتیل می‌باشد. میزان بیان ژن در پاسخ به آلودگی سوسپانیون و عصاره قارچ در دو رقم مقاوم در ۱۲ ساعت پس از آلودگی بیشتر از رقم حساس بوده است این در حالی است که میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی با توکسین خالص DON در همان زمان علاوه بر ارقام متحمل در رقم حساس فلات هم افزایش بیان ناگهانی داشته است. به‌نظر می‌رسد در آلودگی با سوسپانسیون اسپور و عصاره قارچ عوامل دیگری غیر از توکسین DON وجود دارند که از بیان ژن الکل دهیدروژناز در رقم حساس جلوگیری می‌کنند. با توجه به این‌که در هر سه تیمار (سوسپانسیون اسپور قارچ، عصاره قارچ و توکسین خالص DON) عامل مشترک توکسین خالص DON بوده و با استناد به مطالعات گذشته مبتنی بر تولید و فعال‌سازی توکسین در ۱۲ ساعت پس از آلودگی از الگوی تظاهر ژن الکل دهیدروژناز در هر سه تیمار می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که این ژن در پاسخ به توکسین DON و به‌منظور غیرفعال‌سازی آن افزایش بیان داشته‌است. مطالعات گذشته نشان داد که برخی از ارقام گندم و ذرت دارای آنزیم‌هایی هستند که قادرند در گیاه دی‌اکسی نیوالنول را تجزیه کنند. گروه هیدروکسید موقعیت ۳ مایکوتوکسین DON باعث تشدید سمیت می‌شود (Shima et al. 1997) و تغییر این گروه به طوری‌که DON تبدیل به ۳-کتو،٤-دی اکسی‌نیوالنول باعث کاهش سمیت آن می‌شود (Parry et al. 1995). فرایند اصلی تحمل به توکسین از طریق تغییر متابولیکی توکسین اعمال می‌شود که این فرآیند اغلب با تجزیه کامل آن صورت می‌گیرد. گلیکوزیلاسیون تریکوتسین‌ها منجر به سمیت‌زدایی فوری در گیاهان می‌شود. غیرفعال‌سازی توکسین از طریق گلیکوزیلاسیون یک مکانیسم طبیعی معمول در مقاومت به توکسین می‌باشد، که گیاهان را قادر می‌سازد تا با دامنه گسترده‌ای از متابولیت‌های سمی و میکروبی که در طول دوره رشد خود رو به رو می‌شوند به نحو موثری مقابله کنند. ژن دی اکسی نیوالنول گلوکوزیل ترانسفراز جداسازی شده از گیاه آرابیدوپسیس باعث سم‌زدایی در ۱۵- استیل دی اکسی نیوالنول به عنوان مشتق استیله شده DON می‌شود (Poppenberger et al. 2003). با توجه به ساختار شیمیایی توکسین DON و وجود ۳ گروه عاملی هیدروکسیل و نقش آنزیم الکل دهیدروژناز، که تبدیل الکل به کتون و آلدهید را با استفاده از کوآنزیم NAD+ آسان می‌سازد، می‌توان نقش احتمالی این آنزیم را در سمیت‌زدایی توکسین در نظر گرفت. علاوه بر PR پروتئین‌ها که ۱۲-٦ ساعت پس از آلودگی با قارچ فوزاریوم در هر دو رقم متحمل و حساس افزایش بیان ناگهانی دارند و بیان آن‌ها در رقم مقاوم زودتر و بیش‌تر می‌باشد، آنزیم‌های دیگری از جمله سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، آسکوربیک اسید پراکسیداز و چندین گروه آنزیمی دیگر وجود دارند که در پاسخ به آلودگی فوزاریومی در هر دو رقم متحمل و حساس بیان می‌شوند و همانند PR پروتئین‌ها بیان آن‌ها در رقم متحمل بیش‌تر و زودتر می‌باشد، بنابراین می‌توان این آنزیم‌ها را به‌همراه PR پروتئین‌ها در گروه ژن‌های درگیر در مبارزه و دفاع در برابر آلودگی فوزاریومی دانست (۲). با توجه به الگوی بیان ژن الکل دهیدروژناز که در ۱۲ ساعت پس از آلودگی بالاترین میزان بیان را در رقم متحمل نسبت به رقم حساس دارد، نشان دهنده واکنش دفاعی گیاه در مقابل فعال‌سازی مایکوتوکسین‌های قارچ در این زمان بوده است و می‌توان به ایفای نقش این ژن در مبارزه با توکسین پی برد.

احتمالاً کاهش بیان ژن الکل دهیدروژناز پس از ۱۲ ساعت از اعمال تیمار ممکن به دلیل اتمام نقش کلیدی این آنزیم در مقابله با قارچ و یا اتمام فرایند خنثی‌سازی توکسین به عنوان سوبسترای آن باشد. می‌توان نتایج بدست آمده از این تحقیق را با یافته‌های مطالعات گذشته مرتبط دانست. همچنین لازم به توضیح است که برای اولین بار در این پژوهش به ارزیابی الگوی بیان این ژن در پاسخ به آلودگی با توکسین DON و قارچ فوزاریوم و نقش دفاعی آن در سم‌زدایی از توکسین قارچ اشاره می‌شود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.14.7]

منابع

Alexander NJ, Mc Cormick S, Hohn T (2002) The indentification of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *AYT1* (ORF-YLL063c) encoding an acetyltransferase. Yeast 19:1425-30.

Bai GH, and Shaner G (2004) Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. Phytopathology 42:135-161.

Bai GH, Plattner R, Desjardins A, Kolb F (2001) Resistant to Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulayion in wheat. Plant Breeding 120:1-6.

Boenisch MJ, and Schafer W (2011) Fusarium graminearum forms mycotoxin producing infection structures on wheat. BMC Plant Biology 11: 110.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology 25:169-193.

Garvey GS, Mc cormic SP, Rayment I (2008) Structural and functional characterization of the TRI101 trichothecene 3-O-acetyltransferase from Fusarium sporotrichioides and Fusarium graminearum: kinetic insights to combating Fusarium head blight. J Biol Chem 18;283(3):1660-9.

Gigot C, Ongena M, Fauconnier ML, Wathlet JP, Jardin P and thonart P (2010) The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. Biotechnology Agronomy, Society and Environment 451-460.

He J, Yang R, Zhou T, Tsao R, Young C, Zhu H, Li X, Boland GJ (2007) Purification of deoxynivalenol from Fusarium graminearum rice culture and mouldy corn by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A 1151: 187-192.

Kimura M, Takahashi-Ando T, Nishiuchi S, Ohasto T, Tokai N, Ochiai M, Fujimura T, Kudo H, Hamamoto I, Yamaguchi Y (2007) Molecular and genetic studies of Fusarium trichothecene biosynthesis: Pathways, Genes, and Evaluation Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 71:2105-2123.

Malihipoor A, Okhovat M, and Alizadeh A (2000) Analysis of development of wheat fusarium head blight disease in the controlled environment using the epidemiologic models. The journal of science and research of plant diseases experts' society of Iran 36: 1-2.

Miedaner T, Schneider B, Geiger H (2003) Deoxynivalenol (DON) content and Fusarium head blight resistance in segregating populations of winter rye and winter wheat. Crop Science 43: 519-526.

Nevo E and Chen G (2010) Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. Plant Cell and Environment 33, 670-685.

Parry DW, Jenkinson P and Mcleon I (1995) Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review. Plant Pathology 44:207-238.16.

Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshin D, Siebere T, Schumacher R, kuchler K, glossel, J, luschning, C and adam G (2003) Detoxification of the Fusarium mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from Arabidopsis thaliana. Journal of Boilogical Chemistry 278:47905-14.

Rozen S and Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyam K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 arabidopsis genes under drought, cold, and high-salinity stresses using at full-length cDNA microarray. Plant Journal 31:279-292.

Shima J, Takase Sh, Iwai Y (1997) Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. Applied and Environmental Microbiology 63:3825-3830.

Soltanloo H, Ghadirzade E, Ramezanpour SS, Kalate Arabi M (2010) The expression profile of Chi-1, Glu-2, Glu-3 and PR1.2 genes in scab-resistant and susceptible wheat cultivars during infection by Fusarium graminearum. Plant Omics Journal 3: 162-166.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.14.7]