مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تبدیل میکوتوکسین دی‌اکسی‌نیوالنول به فرم ۳- استیله آن در گیاهان گندم و توتون از طریق بیان ژن سنتتیک استیل ترانسفراز

زهرا ایرانی[۱،۲]، فروغ سنجریان*[۱]، محمدرضا عظیمی[۲]

[۱] پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
[۲] دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۳/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۲۳

چکیده

یکی از مکانیسم‌های مولکولی ایجاد مقاومت به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم که توسط *Fusarium graminearum* تولید می‌شود سم‌زدایی توکسین دی‌اکسی‌نیوالنول (DON) است. فوزاریوم‌های تولید کننده میکوتوکسین دارای آنزیم‌هایی هستند که خاصیت سمی آن‌ها را کاهش می‌دهند. آنزیم تریکوتسین ۳-O-استیل ترانسفراز (*Tri101*) تریکوتسین‌ها را به ترکیباتی با سمیت کمتر تبدیل می‌کند. این آنزیم‌ها با جایگزین کردن گروه استیل به جای گروه OH در کربن ۳ از سمیت آنها می‌کاهد. مطالعات نشان داده است که در مخمر ژن*AYT1* قادر به انجام این کار است. در این پژوهش ژن سینتتیک *AYT1* به گیاه توتون منتقل شده، در گندم نیز به صورت موقت بیان شد. نتایج نشان داد که این ژن سینتتیک در هر دو گیاه بیان می‌شود. بررسی واکنش آنزیمی استیل ترانس فرازی با تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک مشخص کرد که این ژن می‌تواند با تبدیل DON به 3A DON (۳- استیل دی‌اکسی‌نیوالنول) از سمیت آن بکاهد.

واژه‌های کلیدی: *استیل ترانسفراز، بلایت فوزاریومی گندم، دی‌اکسی‌نیوالنول، سم‌زدایی.*

* نویسنده مسئول: فروغ سنجریان تلفن: ۰۹۱۲۲۰۴۴۹۸۷ Email: fsanjarian@nigeb.ac.ir

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچی هستند که برای جانوران سمی هستند (Karlovsky, 2011). از مهم ترین آنها می‌توان به تریکوتسن‌ها، مایکوتوکسین غالب ردیابی شده در غلات اشاره کرد (Karlovsky, 2011; Nicholson *et al*., 2003; Nicholson *et al*., 2004). این توکسین‌ها که توسط قارچ‌هایی از جنس Fusarium، Myrothecium، Stachybotrys، Trichoderma، Trichothecium تولید می‌شوند، اثرات مهلکی بر سلامت انسان و حیوانات دارند (Karlovsky, 2011; Sarter & Zakhia, 2004). از اثرات آنها بر روی سلولهای یوکاریوتی می‌توان مهار سنتز پروتیین، RNA و DNA، مهار عملکرد میتوکندری، تاثیر بر تقسیم سلولی و عمل غشا (He *et al*., 2010) و همچنین القای آپوپتوز (Karlovsky, 2011) را نام برد. این سموم به دلیل پایداری در شرایط انبارداری، فراوری و پخت نان برای سلامت خطرناک بوده (Goswami & Kistler, 2004) و از طریق شیر، گوشت و تخم مرغ وارد زنجیره غذایی انسان شده و سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازند (He *et al*., 2010).

از مهمترین تریکوتسن‌های آلوده کننده غلات، دی‌اکسی‌نیوالنول (DON) می‌باشد، که عمدتا توسط قارچ *F. graminearum*، عامل اصلی بیماری بلایت فوزاریومی سنبله در گندم و ذرت، تولید می‌شود.DON مانند سایر تریکوتسن‌ها، ترکیبی سسکویی‌ترپنوئیدی، دارای ساختار حلقوی با وزن مولکولی کم است (He *et al*., 2010; Llorens *et al*., 2006) و در ساختار خود دارای گروه اپوکسی بر روی کربن شماره ۱۲ و ۱۳ و گروه OH بر روی کربن‌های ۳ و ۱۵ است که سمیت آنرا موجب می‌شوند (Krska *et al*., 2001; Alexander *et al*., 2002).

کاهش خطرات تهدید کننده مایکوتوکسین برای انسان و دام از طریق سم‌زدایی امکان پذیر است. سم‌زدایی DON به طرق شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد. بهترین ماده جهت سم‌زدایی شیمیاییDON، سدیم متا بی سولفات می‌باشد که از لحاظ کاربردی دارای محدودیت‌هایی است (Karlovsky, 2011). در سم‌زدایی آنزیمی DON، آنزیم‌های مختلفی به کار گرفته شده اند، که از جمله آنها می‌توان به استیل ترانسفرازهای قارچی (Alexander *et al*., 2002; He *et al*., 2010) و گلیکوزیل ترانسفرازهای گیاهی (Poppenberger *et al*., 2003) اشاره کرد. این آنزیم‌ها کربن شماره ۳ ترکیب DON را هدف قرار داده و گروه OH آن را با گروه استیل و یا گروه گلیکوزیل جایگزین کرده و موجب کاهش سمیت مایکوتوکسین می‌شوند (Mc Cormick *et al*., 1999).

مقدار مجاز مصرفی DON در ایالات متحده برای انسان 1 µg/g و دام 5 µg/g می‌باشد (Manoharan *et al*., 2006). علاوه بر این DON عامل تهاجم قارچ بیمارگر به گیاه است و تحمل به آن باعث کاهش خسارات مزرعه ای می‌شود

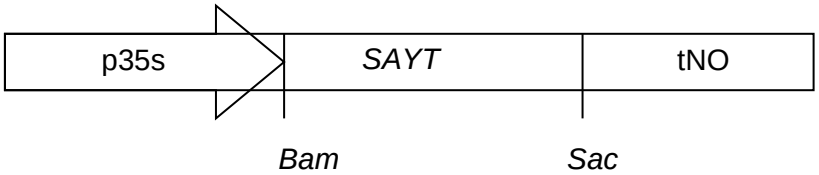
(Poppenberger *et al*., 2003). بیماری بلایت فوزاریومی در اکثریت نقاط غله خیز دنیا وجود دارد و باعث کاهش محصول می‌شود (Goswami & Kistler, 2004). در ایران نیز عامل این بیماری در مناطق گیلان و مازندران (Foroutan *et al*., 1993)، مغان (Babadoost *et al*., 1995) و خوزستان (Moosawi-Jorof, 2003) گزارش شده است. بنابراین سم‌زدایی از این مایکوتوکسین می‌تواند هم در افزایش عملکرد و هم در سلامت غذای انسان و خوراک دام تاثیر بسزایی داشته باشد.

در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* مکان ژنی *AYT1*(ORF-Y1106Bc) شناسایی شده است که محصول آن در حفاظت مخمر در برابر تریکوتسن‌ها نقش دارد (Alexander *et al*., 2002). در این پژوهش ORF کد کننده استیل ترانسفراز مورد استفاده قرار گرفته است. این ژن برای بیان در گیاه بهینه سازی شده و سپس به گیاه منتقل شد. و در نهایت نحوه عملکرد و توانایی آن در کاهش سمیت مایکوتوکسین، از طریق استیله کردن آن، در گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک بدون تغییر در توالی اسیدآمینه ای عمل بهینه سازی رمز در توالی ژن *AYT*1 مخمر موجود در بانک ژن با شماره دسترسیZ73168Y13138 درمورد گیاه به عنوان میزبان انجام گرفت (Abkar *et al*., 2010). توالی بهینه‌سازی شده توسط شرکت Shine Gene Molecular Biotech ساخته و به صورت کلون شده در پلاسمیدpUC57 ارایه شد.

ساخت سازه‌های ژنی: ژن*AYT*1 مصنوعی پس از تائید توسط توالی یابی با استفاده از برش آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *Bam* H1 و *Sac* 1 از پلاسمید pUC57 خارج و با استفاده از آنزیم *T4* *Ligase* (Fermentase) به جای ژن گزارشگر *gus* در پلاسمید دو گانه pBI121 همسانه سازی شد و سازه جدید pBI121SA بدست آمد (شکل ۱).



شکل ۱- سازه مورد استفاده در تراریختی گیاه (pBI121SA). ژن *AYT* سنتتیک جایگزین ژن *gus* در پلاسمید PBI121 شده است.

Figure 1- Construct used for plant transformation (pBI121SA). *gus* gene was replaced with Synthetic *AYT1* gene.

سازه ژنی حاصل به باکتری *E. coli* سویه DH5α منتقل شد و سپس با روش ذوب و انجماد (Harisch *et al*, 1988.) به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 انتقال یافت. غربالگری کلنی‌های به دست آمده با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، با کلنی PCR صورت گرفت. از سازه حاصل جهت تراریختی پایدار توتون و همچنین تراریختی موقت گندم استفاد شد. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده عبارت بودند از:

F*AYT*1: 5`-GCGTGCAGATGCTTGAAAATGACC-3`,
R *AYT*1: 5`-CGTAGCGTAATTAGTCCATTC-3`

شرایط PCR انجام شده عبارت بود از: ۹٤درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه، ٥٤ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه، که برای ۳۰ سیکل تکرار می‌گردید. تراریختی پایدار گیاه توتون: تراریختی توتون با ساختار ژنی موجود از طریق آلوده سازی قطعات برگی انجام شد (Sanjarian *et al*., 2006). باززایی و انتخاب لاینهای تراریخت در محیط‌های کشت انتخابی حاوی ۱۰۰ mg/ml کانامایسین انجام پذیرفت. پس از ریشه دهی، گیاهچه‌ها به گلدان منتقل شدند، بذرهای حاصل از خودلقاحی نسل T0 جمع آوری شده و برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیزهای مولکولی گیاهان تراریخت: جهت اثبات ورود ژن synth-*AYT1* به گیاه و بیان آن از واکنش PCR و RT-PCR استفاده شد. DNA ژنومی از بافت برگ با استفاده از روش CTAB (Doyle & Doyle, 1987) استخراج گردید. RNA کل گیاهان تراریخت نیز با استفاده از کیت RNX-Plus ™(Cat. No. RN7713C. Cina gene,Iran) از برگ گیاه استخراج شد و ساخت cDNA با استفاده از آغازگر OligodT انجام شد. DNA و cDNA با آغازگرهای اختصاصی ذکر شده در کلنی PCR و با همان شرایط تکثیر شدند (Sanjarian *et al*., 2006).

تراریختی موقت گندم: تراریختی موقت گندم با روش اگروایفیلتریشن انجام شد. پس از دست یافتن به شرایط بهینه تراریختی موقت با روش اگروایفیلتریشن توسط ژن *gus* (Irani *et al*.,2012)، تراریختی موقت گندم با سازه حاوی ژن مصنوعی *AYT1* انجام شد. برای انجام تراریختی ابتدا اگروباکتریوم حاوی ژن *AYT1* در محیط LB مایع حاوی ۱۰۰ mg/ml کانامایسین، در ۲۸ درجه سانتیگراد کشت شد. سوسپانسیون باکتری در OD برابر با ۰/٦ ، در٤°C، ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. سپس باکتری‌ها با محیط (Murashige & Skoog,1962) MS با pH=5.2، استوسیرنگون با غلظت ۱۰mM و بافر MES با غلظت ۰/٥ M مجددا به صورت سوسپانسیون درآمدند و سپس باکتری‌ها در شیکر ۲۸ °C به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. این سوسپانسیون باکتریایی برای

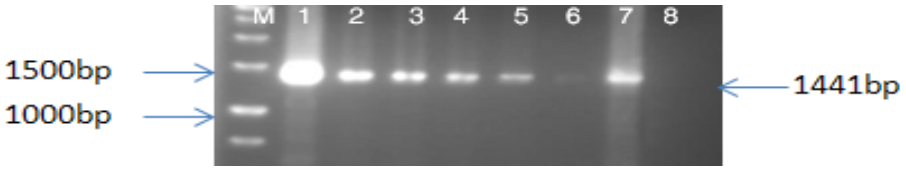
آلوده‌سازی قطعات برگی گندم استفاده شد. قطعات برگ در سوسپانسیون باکتری غوطه ور شدند و به مدت ۲۰ دقیقه تحت خلا قرار گرفتند. سپس با قطع ناگهانی خلا باکتری‌ها به بافت برگ نفوذ کردند. برگ‌ها با آب مقطر استریل شسته شدند و به پتری دیش منتقل شدند. پس از ٦روز، از برگ‌ها پروتئین استخراج شد و در واکنش آنزیمی جهت تبدیل DON به 3A DON استفاده شد و فعالیت آنزیمی با TLC بررسی شد.

بررسی فعالیت آنزیمی تراژن‌های *AYT1*:

از گیاهان تراریختی که توسط آنالیزهای مولکولی، تراریختی آنها اثبات شده بود، پروتئین استخراج شد (Ohasto *et al*. 2007) و در واکنش آنزیمی جهت تبدیل DON به 3A DON استفاده شد. به میزان ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین کل استخراج شده با ٤۰ میکروگرم DON مخلوط گردید و برای پیشرفت واکنش استیله‌شدن، استیل کوآنزیم A با غلظت نهایی ۱mM اضافه شد و حجم نهایی واکنش با Tris-HCl 50Mm pH= 7.5 به ۲۵۰ میکرولیتر رسید. مخلوط فوق در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شد. سپس ۲۵۰ میکرو لیتر اتیل استات به مخلوط اضافه شد و پس از سانتریفیوژ، روشناور بر روی کاغذ TLC لکه گذاری شد. انتهای کاغذ در درون فاز متحرک کروماتوگرافی (اتیل استات و تولوئن به نسبت ۳:۱) قرار داده شد. پس از حرکت فاز متحرک در طول فاز ثابت (کاغذ TLC)، کاغذ در دمای اتاق خشک شد و آشکارسازی با مخلوط اتانول و اسید سولفوریک با نسبت ۱:۹ انجام شد.

نتایج

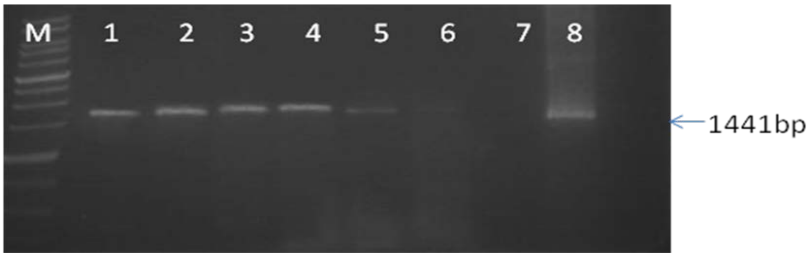
توالی یابی ژن سنتز شده، صحت آن را در مقایسه با توالی طراحی شده تائید کرد. با استفاده از آزمون کلنی PCR ورود سازه pBI121SA به اگروباکتریوم تایید شد (شکل۲) و این باکتری جهت تراریختی گیاهان مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲- کلنی PCR از اگروباکتریوم، M: نشانگر(1Kb DNA Ladder (Fermentas، ۱: کنترل مثبت(pUC+*AYT1*) ، ۷-۲: آگروباکتریوم‌های تراریخت شده، ۸: کنترل منفی (اگروباکتریوم غیرتراریخت).

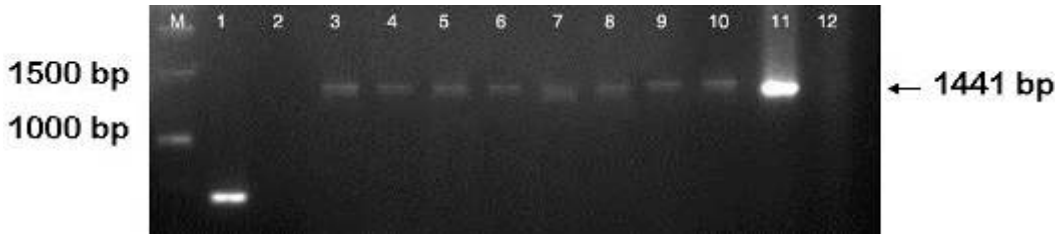
Figure 2- Colony PCR from Agrobacterium. M: 1kb ladder (Fermentas), 1:Positive control (pUC+*AYT1*), 2-7: Transfomed Agrobacterium, 8: Negative control (non-transformed Agrobacterium).

جهت آنالیزهای مولکولی توتون‌های تراریخت ۸ گیاه مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. DNA ژنومی از این گیاهان استخراج و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تراژن تکثیر گردید. مشاهده محصولات PCR با اندازه مورد انتظار ۱٤٤۱ bpورود ژن به ژنوم گیاهان را تائید کرد (شکل ۳). برای تائید رونویسی از تراژن *AYT1*، RNA کل از گیاهان منتخب استخراج گردید و از روی آنها cDNA ساخته و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن تکثیر شد. وجود باندی با اندازه تقریبی ۱٤٤۱ bp در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاه غیر تراریخت رونویسی ژن را تائید کرد. با استفاده از کنترل منفی RT-PCR بدون آنزیم *Reverse transcriptase*، عدم آلودگی RNA با DNA را نشان داد (شکل ٤).



شکل۳- محصولات PCR توتون‌های تراریخت شده M: نشانگر 1Kb DNA Ladder (Fermentas) 1-6: گیاهان تراریخت با سازه دارای ژن *AYT1*، 7: کنترل منفی(گیاه غیرتراریخت)، 8: کنترل مثبت (pUC+*AYT1*).

Figure 3- PCR products from transformed tobaccos, M: 1kb ladder (Fermentas), 1-6: Syntetic *AYT1* Transformed tobaccos, 7: C^- (non-transformed tobacco), 8: C^+ (pUC+*AYT1*).



شکل٤- RT-PCR از گیاهان تراریخت. M: نشانگر 1Kb Ladder (Fermentas)، ۱: کنترل مثبت باآغازگرهای ژن توبولین، ۲: کنترل منفیRT-PCR بدون آنزیم *Reverse transcriptase*، ۱۰-۳: گیاهان تراریخت شده باژن سنتزی *AYT1*، ۱۱: کنترل مثبت(pUC+*AYT1*) ، ۱۲: کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت).

Figure 4- RT-PCR products from transformed plants, M: 1kb Ladder (Fermentas), 1: C^+ by using tubulin primers, C^- RT-PCR without Reverse Transcriptase, 3-10: Transformed plants with synthetic *AYT1* gene, 11: C^+ (pUC+*AYT1*), 12: C^- (non-transformed plant)

برای ظهور و تشخیص سوبسترا (DON)، محصول حاصل از واکنش آنزیمی از روش کروماتوگرافی بر روی لایه نازک (TLC) استفاده گردید. پروتئین کل از توتون‌های تراریخت و توتون‌های غیر تراریخت بعنوان کنترل منفی و همچنین از برگ گندم تراریخت شده استخراج شد و پروتئین کل در واکنش آنزیمی بعنوان آنزیم استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمایشات نشان داد که پروتئین‌های استخراج شده از توتون‌ها و برگ‌های گندم تراریخت فعالیت استیل ترانسفرازی دارند و لکه مربوط به فرم استیله سوبسترا یعنی 3A DON در واکنش آنزیمی مربوط به این گیاهان مشاهده می‌شود (شکل ۵و ٦). در صورتی که پروتئین‌های استخراجی از گیاهان غیر تراریخت فاقد فعالیت استیل ترانسفرازی بوده و فقط لکه مربوط به سوبسترا DON در ردیف TLC مربوط به آنها مشاهده شد. البته لکه سوبسترا DON در نمونه‌های تراریخت نیز قابل مشاهده بود (شکل ۵و ٦).

بحث

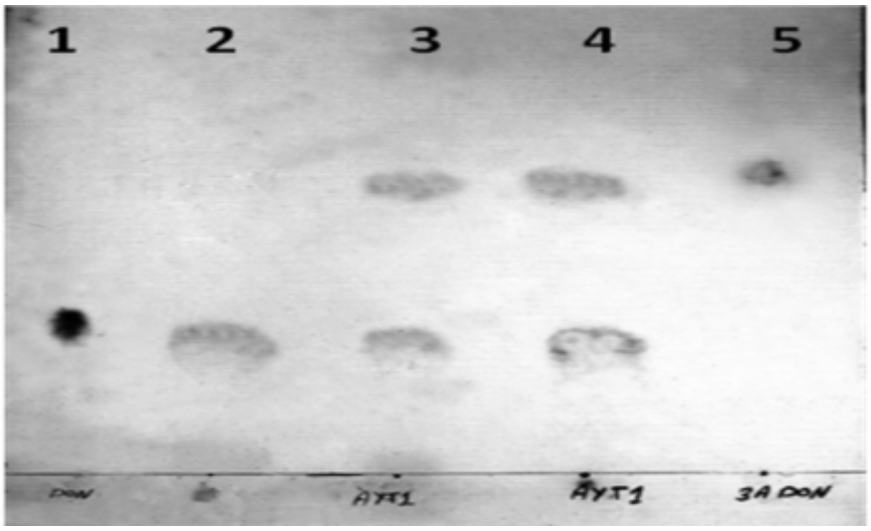
قارچ *F. graminearum* ترکیبات سمی را تولید می‌کند که از عوامل بیماریزا برای انسان می‌باشد. گروه هیدروکسیل موقعیت۳ مایکوتوکسین DON باعث تشدید سمیت می‌شود (Shima *et al.*, 1997). جایگزینی این گروه با گروه‌های دیگر مانند استیل و گلیکوزیل باعث می‌شود که سمیت این توکسین برای انسان به ده برابر کمتر از فرم تغییر نیافته (DON) کاهش یابد (Poppenberger *et al.*, 2003). بنابراین تراریختی گیاه با ژن‌های سم‌زدایی کننده مانند *HvUGT13248* که باعث گلیکوزیله شدن (Schweiger *et al.*, 2010) یا ژن‌های *Tir101* (Ahmadizade *et al.*, 2013; Muhitch *et al.*,2000) و یا *AYT1* (Sanjarian *et al.*, 2006) که باعث استیله شدن مایکوتوکسین‌ها می‌شود، می‌تواند گام موثری در این راه باشد. از آنجا که منشا ژن *AYT1* مخمری است بهینه سازی کدون جهت بیان در گیاه می‌تواند کمک شایانی به افزایش بیان و خاصیت آنزیمی آن شود. البته مقایسه قدرت سم‌زدایی پروتئین‌های کاندید دیگر با این پروتئین می‌تواند در انتخاب مطلوبترین ژن برای تراریختی گیاه هدف (گندم) راهگشا باشد، که این مطالعات در حال انجام است.

مطالعات نشان داده که ارقام مقاوم گندم پس از آلودگی با قارچ عامل FHB، افزایش بیان آنزیم P450 منواکسیزناز را نشان می‌دهند که این آنزیم توانائی سمیت‌زدائی DON را دارد (Li *et al.*, 2010). آنزیم گلوتاتیون‌ترانسفراز نیز از طریق تشکیل ترکیب گلوتاتیون-DON می‌تواند در سمیت‌زدائی این میکوتوکسین نقش داشته باشد (Karlovsky, 2011). همچنین آنزیم گلیکوزیل‌ترانسفراز در آرابیدوپسیس که به وسیله ژن *DOGT1* کد می‌شود DON را به حالت گلیکوزیله که سمیت پایین‌تری دارد، تبدیل می‌کند (Poppenberger *et al.* 2003). در مطالعه

حاضر افزایش مقاومت به DON در گیاهان گندم با بیان ژن مصنوعی *AYT*1 مخمر برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن سینتتیک *AYT1*، هم در گیاه توتون و هم در گندم قابلیت تبدیل فوزاری توکسین DON را به 3-A DON دارد. اگرچه این عمل بطور کامل صورت نمی‌گیرد و مقداری از سوبسترا همچنان باقی می‌ماند که این در مورد سایر ژن‌های استیله کننده نیز صادق است(Ohasto *et al*., 2007). بنابراین این ژن مصنوعی می‌تواند بعنوان یک ژن کاندید جهت سم‌زدایی از مایکوتوکسین‌ها و تراریختی گندم مطرح باشد و جهت مقابله با بیماری FHB به گندم انتقال یابد.

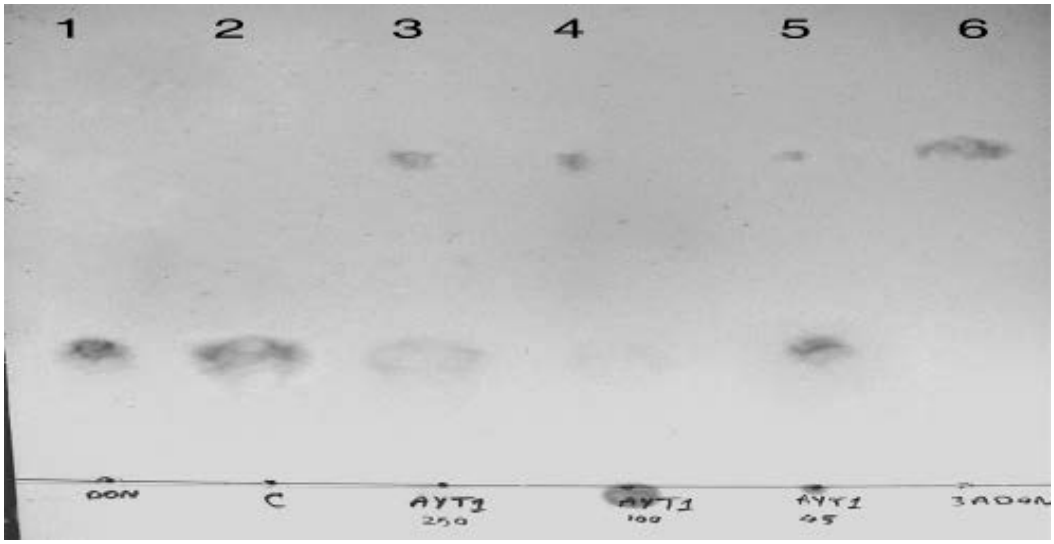
تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول است. نویسندگان از پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به دلیل فراهم آوری امکانات انجام این تحقیق قدردانی می‌نمایند. یاد و خاطره دانشمند گرانقدر جناب آقای دکتر حق نظری را گرامی می‌داریم، روحش شاد.



شکل۵- سنجش فعالیت استیل ترانسفرازی تراژن Synthetic *AYT1* در توتون. ۱: استانداردDON خالص، ۲: پروتئین استخراجی از گیاه غیرتراریخت + DON (کنترل منفی)، ٤-۳: پروتئین استخراجی از گیاهان تراریخت + DON، ۵: استاندارد 3ADON خالص.

Figure 5- Acetyltransferase assay of Synthetic *AYT1* in Tobacco. 1: Standard samples of DON, 2: C⁻Reaction of protein extract from non-transformed tobacco+ DON, 3-4: Reaction of protein extract from transformed tobacco+ DON, 5: Standard sample of 3ADON.



شکل٦- سنجش فعالیت استیل ترانسفرازی تراژن Synthetic *AYT1* در گندم. ۱: استانداردDON خالص، ۲: پروتئین استخراجی از گیاه غیرتراریخت + DON (کنترل منفی)، ۵-۳: پروتئین استخراجی از گیاهان تراریخت + DON، ٦: استاندارد 3ADON خالص.

Figure 6- Acetyltransferase assay of Synthetic AYT1 in wheat. 1:Standard samples of DON, 2: C^{-} Reaction of protein extract from non-transformed wheat + DON, 3-5: Reaction of protein extract from transformed wheat + DON, 6: Standard sample of 3ADON.

منابع

Abkar M, Ahmahizade A, Sanjarian F (2010). Optimization of yeast acetyle transferase gene (*AYT1*) for high expression in wheat toward resistance to mycotoxin DON. 16th National and 4th International Conference of Biology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran pp. 254.

Ahmadizadeh A, Sanjarian F, Mousavi A, Haghbeen K (2013). Enzymatic detoxification of Don in transgenic plants via expression of Fusarium graminearum Tri101gene. Progress in Biological Sciences 3: 53-59.

Alexander NJ, McCormick SP, Hohn TM (2002). The identification of the *Saccharomyce cerevisiae* gene *AYT1* (ORF-YLL063c) encoding an acetyltransferase. Yeast 19: 1425-30

Babadoost M (1995). Incidence of seed-born fungal diseases of barley in east Azarbaijan and Ardebil provinces. Iranian Journal of Plant Pathology 31: 88-100.

Doyle J J and Doyle J L (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Photochemical Bulletin 19: 11-15.

Foroutan A, Ershad D, Dalili A, Bamdadian T and Gerami Q (1993). Outbreak of wheat scab in Mazandaran.. Proc. 11th Iran Plant Protec. Cong. University of Gilan, Rasht, Iran pp.33

Goswami RS, Kistler H C (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology 5: 515-525

Harisch RB, Fry J, Hoffmann N, Nidermeyer J, Rogres SG, Fraley R T (1988). Leaf disc transformation; in *Plant molecular biology manuual.*(eds). S. B Gelvin and R. ASchilperoort (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers). 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

Irani Z, Sanjarian F, Haghnazari A (2012). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient gene expression by agroinfiltration in wheat. 12th Iranian Genetic Con. Sh. Beheshti University. Tehran. Iran. Pp.390

Karlovsky P (2011). Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. Applied Microbiology and Biotechnology 91: 491–504.

Krska R, Baumgartner S and Josephs R (2001). The state of the art in the analysis of type-A and type-B trichothecene mycotoxins in cereals. Journal of Annual Chemistry 371: 285-299.

Li X, Zhang JB, Song B, Li HP, Xu HQ, Qu B, Dang FJ, Liao YC (2010). Resistance to Fusarium head blight and seedling blight in wheat is associated with activation of a cytochrome p450 gene. Phytopathology 100: 183-91

Llorens A, Hinojo M J, Mateo R, Gonzalez-Jaen M T, Valle-Algarra F M, Logrieco A, Jimenez M (2006). Characterization of Fusarium spp. Isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). International Journal of Food Microbiology 106: 287-306.

Manoharan M, Dahleen L S, Hohn T M , Neate S M , Yu X-H , Alexander N J, McCormick S P, Bregitzer P, Schwarz P B, Horsley R D (2006). Expression pf 3-OH trichothecene acetyltransferase in barley (*Hordeum vulgar* L.) and effects on deoxynivalenol. Plant Science 171: 699-706.

McCormik SP, Alexander N J, Trapp S E and Hohn T M (1999). Disruption of *Tri101*, the gene encoding thrichothecene 3-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. Applied and Environmental Microbiology 65: 5252-5256.

Moosawi-Jorof SA (2003). First report of Fusarium Head Blight in Khuzestan province, Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 39: 79-80

Muhitch MJ, McCormick SP, Alexander NJ, Hohn TM (2000). Transgenic expression of the *TRI101* or *PDR5* gene increases resistance of tobacco to the phytotoxic effects of the trichothecene 4,15- diacetoxyscirpenol. Plant Science 157: 201-207.

Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nicholson P, Chandler E, Draeger RC,Gosman NE, Simpson DR, Thomsett M and Willson AH (2003). Molecular tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of Cereals. European Journal of Plant Pathology 109: 691-703.

Nicholson P, Simpson DR, Wilson AH, Chandler E and Thomsett M (2004). Detection and differentation of trichothecene and enniatin –producing fusarium species on small grain creals. European Journal of Plant Pathology 2: 1-12.

Ohsato ShT, Ochiai-Fukuda T, Nishiuchi N, Takahashi-Ando Sh, Koizumi H, Hamamoto T, Kudo I, Kimura M (2007). Transgenic rice plants expressing trichothecene3-*O*acetyltransferase show resistance to the *Fusarium* phytotoxin deoxynivalenol. Plant Cell Reports 26: 531–538

Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshin D, Siebere T, Schuhmacher R, Kuchler K, Glossel J, Luschning C, Adam G (2003). Detoxification of fusarium mycotoxin deoxynivalenol by UDPglycosyltransferases from *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry 278: 47905-14.

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 Journal of Biology 19: 222-23

Sarter S and Zakhia N (2004). Chemiluminescent and bioluminescent aassay: as innovative prospect for mycotoxin determination in food and feed. Luminescence 19: 345-351.

Schweiger W, Boddu J, Shin S, Poppenberger B, Berthiller F, Lemmens M, Muehlbauer GJ, Adam G (2010). Validation of a Candidate Deoxynivalenol-Inactivating UDP-Glucosyltransferase from Barley by Heterologous Expression in Yeast. Molecular Plant- Microbe Interactions 23: 977-986

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.

Conversion of Deoxynivalenol to 3-acetyl deoxynivalenol in wheat and tobacco through the expression of Synthetic Acetyltransferase gene

Irani Z.[1,2] , Sanjarian F.[1*], Azimi M.R.[2]

[1]National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
[2]College of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

Abstract

Detoxification of deoxynivalenol (DON) is one of the molecular mechanisms of resistance to Fusarium Head Blight desease in wheat, which causes by *Fusarium graminearum.* Mycotoxin producing Fusarium spices have some enzymes to reduce toxic effects. They can change trichothecenes to less toxic compounds by using trichothecene 3-O-acetyletransferase (*Tri101*) enzyme. This enzyme converts trichothecene to less toxic compounds by replaceing OH group on C3 with acetyl group. It had shown that a yeast acetyltransferase, AYT1, can convert DON to 3A DON and reduce it toxicity. In this study synthetic *AYT1* gene was used for tobacco transformation and transiently expressed in wheat plants. The results showed that the synthetic *AYT1* expresses in tobacco as well as wheat. Acetyltransferase activity analyses by thin layer chromatography confirmed that this enzyme can convert DON to 3-A DON that leads to reduce poisonous effect of mycotoxin.

Key words: *Acetyltransferase. Deoxynivalenol .Fusarium Head Blight. Detoxification.*

* Corresponding Author: Sanjarian F. Tel: 09122044987 Email: fsanjarian@nigeb.ac.ir