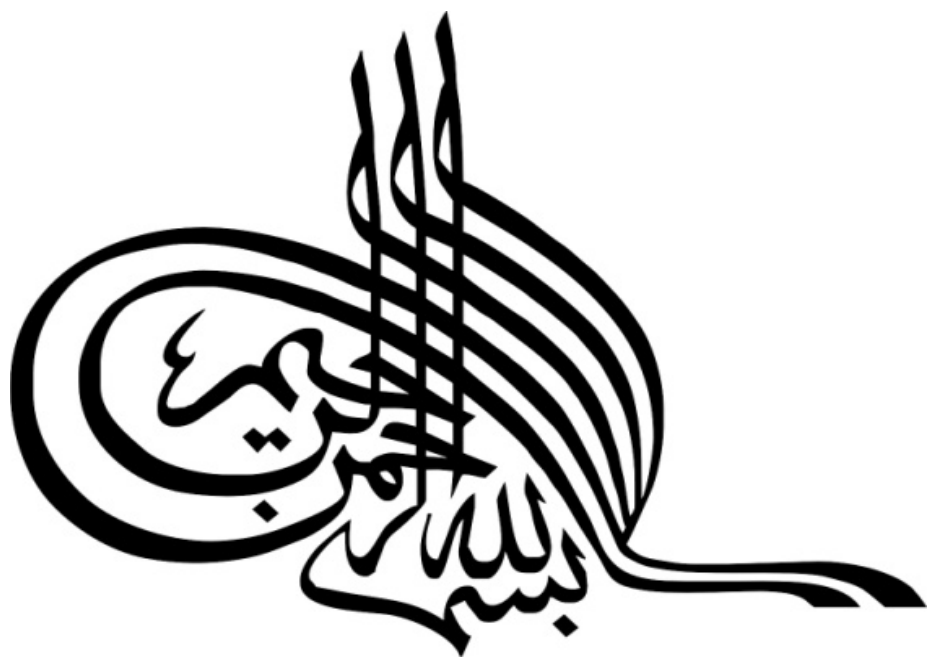






دانشکده کشاورزی

گروه زراعت

پایان نامه ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

آنالیز مولکولی و ارزیابی کارایی ژن استیل ترانسفراز مخمری (*AYT1*) در لاین های نسل دوم

گندم تراریخته

دانشجو:

مهرداد اسدیان

اساتید راهنما:

دکتر شاهرخ قرنچیک

دکتر امیر موسوی

استاد مشاور:

دکتر ناصر فرخی

تیر ۱۳۹۲

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده: کشاورزی

گروه: زراعت

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای مهرداد اسدیان
تحت عنوان: آنالیز مولکولی و ارزیابی کارایی ژن استیل ترانسفراز مخمری (AYTI) در لاین‌های نسل دوم گندم
تراریخته

در تاریخ ۱۳۹۲/۴/۳۰ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد
درجه عالی مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی:		نام و نام خانوادگی: شاهرخ قرنجیک
عالم	ناصر فرخی	عالم	نام و نام خانوادگی: امیر موسوی

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی:		نام و نام خانوادگی: حمیدرضا صمدلویی
عالم	کامبیز جهان‌بین		نام و نام خانوادگی: مهدیه پارسائیان

تقدیم به

پدرم خورشید زندگی من،
مادرم دریای محبت و از خود گذشتگی

و

همه کسانی که به من علم و درست زندگی کردن را آموختند.

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانم بعد از اتمام این پژوهش با سپاس و حمد خدای بزرگ از تمام کسانی که در انجام این رساله راهنما و مشاور و مشوقم بودند صمیمانه سپاسگزاری کنم. در آغاز جا دارد از تلاش‌های بی‌شائبه اساتید ارجمندم جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک و جناب آقای دکتر امیر موسوی که با راهنمایی‌های ارزنده و موثرشان در بسیاری از موارد راهگشای اینجانب بودند و همچنین از جناب آقای دکتر ناصر فرخی که به عنوان استاد مشاور در تهیه این پایان نامه از مشورت ایشان بی‌نصیب نبودم تشکر و قدردانی نمایم و نیز وظیفه خود می‌دانم از زحمات خانواده‌ام که در این راه با صبوری و کمک ارزنده در تهیه این رساله مرا یاری نمودند، سپاسگزاری نمایم.

تعهد نامه

اینجانب مهرداد اسدیان دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه آنالیز مولکولی و ارزیابی کارایی ژن استیل ترانسفراز مخمری (AYTI) در لاین‌های نسل دوم گندم تراریخته تحت راهنمایی آقایان دکتر شاهرخ قرنچیک و دکتر امیر موسوی متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ ۱۳۹۲/۵/۸

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

✽ متن این صفحه نیز باید در ابتدای نسخه های تکثیر شده پایان نامه وجود داشته باشد .

چکیده

گندم از جمله غلات مهمی است که به عنوان غذای انسان و دام مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم یا اسکب که عامل آن قارچ *Fusarium graminearum* می‌باشد از بیماری‌های مهم گندم و سایر غلات دانه ریز به خصوص در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب می‌باشد. این بیماری در مرحله سنبله‌دهی گیاهان را آلوده می‌کند و خسارات اقتصادی زیادی به محصول وارد می‌کند. این بیماری علاوه بر تاثیر منفی بر روی رشد محصول، با تولید مایکوتوکسین‌های خطرناکی نظیر توکسین دی‌اکسی‌نیوالنول (DON) بر روی کیفیت دانه‌های تولیدی نیز اثرات منفی دارد. این توکسین یک بازدارنده سنتز پروتئین‌ها می‌باشد که خطراتی را برای سلامتی انسان و دام در پی دارد. ایجاد تغییر در ساختار توکسین DON می‌تواند از تجمع این توکسین درون دانه بکاهد. ژن استیل ترانسفراز در مخمر (*AYT1*) آنزیمی را کد می‌کند که یک گروه استیل را به گروه هیدروکسیل C_3 تریکوتسین‌ها اضافه می‌نماید و از سمیت آن‌ها می‌کاهد. در این تحقیق بذور گندم تراریخته نسل دوم حاوی ژن *AYT1* مخمیری کشت و آنالیزهای مولکولی شامل PCR و RT-PCR برای اثبات حضور ژن مورد نظر در این گیاهان صورت پذیرفت. تعداد نسخ ژنی نیز از طریق آزمون دورگه سازی سادرن مشخص شد که این آنالیز ورود بیش از یک نسخه از ژن *AYT1* را در سه لاین بررسی شده، نشان داد. همچنین آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک، نشان دهنده فعالیت مناسب استیل ترانسفراز ژن *AYT1* در تعدادی از لاین‌های تراریخته بود. علاوه بر این، آزمون ارزیابی زیستی که در آن گیاهان تراریخته با قارچ عامل بیماری‌زا تیمار شدند نیز نشان از سم‌زدایی توکسین DON و تحمل مناسب گیاهان تراریخته در برابر قارچ عامل بیماری داشت.

واژگان کلیدی: بلایت فوزاریومی سنبله گندم، دی‌اکسی‌نیوالنول، ژن استیل ترانسفراز مخمیری، گندم تراریخته، آنالیز مولکولی

فهرست

فصل اول.....	۱
۱-۱- گندم و تاریخچه تکاملی آن.....	۲
۱-۱-۱- اهمیت گندم.....	۲
۱-۱-۲- میزان تولید و اهمیت اقتصادی گندم.....	۳
۱-۱-۳- گیاهشناسی گندم.....	۴
۱-۱-۴- خصوصیات ژنتیکی گندم و رده‌بندی آن.....	۵
۱-۱-۵- بیماری‌های گندم.....	۶
۱-۲- بلایت فوزاریومی سنبله گندم.....	۹
۱-۲-۱- علائم بیماری.....	۹
۱-۲-۲- زیست‌شناسی.....	۱۰
۱-۲-۳- مدیریت تلفیقی بیماری.....	۱۱
۱-۳- استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک در گیاهان.....	۱۱
۱-۴- سیستم‌های تراریختی در گندم.....	۱۳
۱-۵- روش‌های آنالیز گیاهان تراریخته.....	۱۴
۱-۵-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....	۱۵
۱-۵-۲- RT-PCR.....	۱۸
۱-۵-۳- روش‌های بلاتینگ.....	۱۹
۱-۵-۳-۱- روش سادرن بلات.....	۱۹
۱-۵-۳-۲- روش نوردن بلات.....	۲۰
۱-۵-۳-۳- روش وسترن بلات.....	۲۱

فصل دوم.....	۲۳
۱-۲- بلایت فوزاریومی سنبله گندم.....	۲۴
۲-۲- مکانیسم فعالیت تریکوتسین‌ها.....	۲۵
۳-۲- خارج کردن توکسین از محیط سلولی توسط ناقلین ABC.....	۲۷
۴-۲- تغییر در جایگاه اتصال توکسین‌ها.....	۲۸
۵-۲- سم‌زدایی توکسین توسط آنزیم‌ها.....	۲۹
۶-۲- مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم.....	۳۱
۷-۲- شناسایی ژن <i>AYT1</i> در مخمر.....	۳۲
فصل سوم.....	۳۵
۱-۳- زمان و مکان تحقیق.....	۳۶
۲-۳- شرایط کاشت بذور.....	۳۶
۳-۳- نمونه‌گیری برگی.....	۳۷
۴-۳- استخراج DNA از نمونه برگی.....	۳۷
۱-۴-۳- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز جهت استخراج DNA.....	۳۸
۲-۴-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA.....	۳۹
۳-۴-۳- واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر.....	۴۰
۵-۳- استخراج RNA.....	۴۲
۱-۵-۳- تعیین کمیت و کیفیت RNA.....	۴۳
۲-۵-۳- تیمار با DNaseI برای حذف آلودگی DNA.....	۴۴
۶-۳- ساخت cDNA.....	۴۴
۱-۶-۳- واکنش RT-PCR.....	۴۵
۷-۳- آنالیز دوره‌سازی سادرن بلات.....	۴۶

۴۶	۱-۷-۳ ساخت کاوشگر.....
۴۷	۲-۷-۳ هضم DNA ژنومی.....
۴۸	۳-۷-۳ رسوبدهی DNA هضم شده.....
۴۸	۴-۷-۳ الکتروفورز محصول هضم آنزیمی.....
۴۹	۵-۷-۳ انتقال نمونه DNA به غشا.....
۴۹	۶-۷-۳ آشکارسازی غشا.....
۵۰	۸-۳ آنالیز TLC.....
۵۰	۱-۸-۳ استخراج پروتئین.....
۵۱	۲-۸-۳ اندازه گیری میزان پروتئین محلول.....
۵۲	۳-۸-۳ سنجش فعالیت آنزیمی تراژن <i>AYT1</i> با استفاده از TLC.....
۵۳	۹-۳ بررسی میزان جوانه زنی و ارتفاع گیاهچه در حضور توکسین DON.....
۵۳	۱۰-۳ تهیه تیمار سوسپانسیون قارچ <i>Fusarium graminearum</i> و ایجاد آلودگی در سنبله.....
۵۴	۱-۱۰-۳ تهیه سوسپانسیون اسپور فوزاریوم.....
۵۵	۲-۱۰-۳ تلقیح مصنوعی سنبله های گندم تراریخته حاوی ژن <i>AYT1</i> توسط اسپور.....
۵۶	فصل چهارم.....
۵۸	۱-۴ تعیین کیفیت DNA.....
۵۸	۲-۴ واکنش PCR.....
۶۰	۳-۴ تعیین کیفیت RNA.....
۶۱	۴-۴ واکنش RT-PCR.....
۶۳	۵-۴ آنالیز دورگه سازی سادرن بلات.....
۶۳	۱-۵-۴ نتایج هضم آنزیمی.....
۶۳	۲-۵-۴ سنتز کاوشگر برای قطعه ۳۰۵bp.....

۶۵	۶-۴- سنجش فعالیت آنزیمی تراژن <i>AYT1</i> با آزمون TLC
۶۷	۷-۴- بررسی قدرت جوانه‌زنی و ارتفاع گیاهچه
۶۸	۸-۴- اثرات آلودگی قارچ فوزاریوم روی سنبله گندم تراریخته با تراژن <i>AYT1</i>
۶۹	بحث
۷۴	نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات
۷۵	پیوست
۸۳	منابع

فهرست اشکال

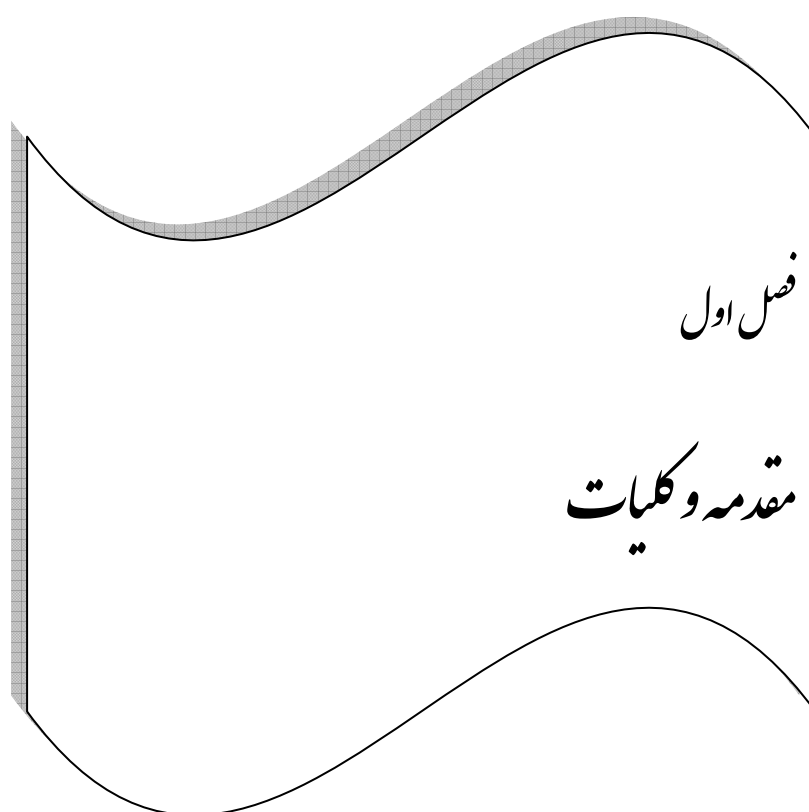
۴	شکل ۱-۱- مشخصات ظاهری گندم
۶	شکل ۲-۱- شمای تاریخچه تکاملی گندم نان
۱۰	شکل ۳-۱- بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم
۱۱	شکل ۴-۱- چرخه زندگی قارچ <i>Fusarium graminearum</i>
۱۷	شکل ۵-۱- مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
۱۸	شکل ۶-۱- واکنش RT-PCR
۲۰	شکل ۷-۱- سادرن بلات
۲۱	شکل ۸-۱- نوردن بلات
۲۲	شکل ۹-۱- وسترن بلات
۲۸	شکل ۱-۲- نمای شماتیک ناقل ABC
۳۶	شکل ۱-۳- گندم‌های کاشته شده در گلدان
۴۲	شکل ۲-۳- مرحله کوبیدن نمونه‌های برگ‌ی در ازت مایع
۴۹	شکل ۳-۳- نحوه انتقال DNA به غشا

شکل ۳-۴ - نمودار استاندارد پروتئین به روش براد فورد.....	۵۲
شکل ۳-۵ - تهیه سوسپانسیون قارچ فوزاریوم.....	۵۵
شکل ۴-۱ - تعیین کیفیت DNA.....	۵۸
شکل ۴-۲ - الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای <i>AYT1-Fw1</i> و <i>AYT1-Re2</i>	۵۹
شکل ۴-۳ - الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای داخلی.....	۵۹
شکل ۴-۴ - الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA استخراج شده.....	۶۱
شکل ۴-۵ - الکتروفورز محصولات RT-PCR با استفاده از پرایمرهای <i>AYT1-Fw1</i> و <i>AYT1-Re2</i>	۶۲
شکل ۴-۶ - الکتروفورز محصولات RT-PCR با استفاده از پرایمرهای داخلی.....	۶۲
شکل ۴-۷ - هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم <i>HindIII</i>	۶۳
شکل ۴-۸ - سنتز کاوشگر.....	۶۴
شکل ۴-۹ - آنالیز سادرن.....	۶۵
شکل ۴-۱۰ - فعالیت استیل ترانسفراز <i>AYT1</i> ژن در تعدادی از گیاهان تراریخته.....	۶۶
شکل ۴-۱۱ - قدرت جوانه‌زنی گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان شاهد در محیط حاوی توکسین DON.....	۶۷
شکل ۴-۱۲ - نتایج تیمار سنبله گندم با قارچ فوزاریوم.....	۶۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱ - مقایسه ژن‌های استیل ترانسفراز در برخی از موجودات.....	۳۳
جدول ۳-۱ - بافر استخراج CTAB.....	۳۹
جدول ۳-۲ - مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای ژن <i>AYT1</i>	۴۱
جدول ۳-۳ - غلظت مواد استفاده شده در واکنش PCR.....	۴۱
جدول ۳-۴ - برنامه زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به پرایمرهای <i>AYT1 f6/r6</i>	۴۱
جدول ۳-۵ - برنامه زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به پرایمرهای <i>AYT1 Fw1/Re2</i>	۴۲

- جدول ۳-۶- غلظت مواد استفاده شده در واکنش RT-PCR به همراه حجم..... ۴۵
- جدول ۳-۷- برنامه زمانی واکنش RT-PCR مربوط به پرایمرهای *AYT1 f6/r6*..... ۴۵
- جدول ۳-۸- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای ژن 18srRNA..... ۴۶
- جدول ۳-۹- مواد مورد نیاز برای ساخت پروب..... ۴۷
- جدول ۳-۱۰- مواد مورد نیاز برای واکنش هضم آنزیمی..... ۴۷
- جدول ۳-۱۱- مواد مورد نیاز برای رسوب DNA استخراج شده..... ۴۸
- جدول ۳-۱۲- مواد استفاده شده در بافر خنثی سازی..... ۴۸
- جدول ۳-۱۳- مواد مورد نیاز برای تهیه بافر SSC..... ۴۹
- جدول ۳-۱۴- مواد مورد نیاز برای تهیه بافر بلوکه کننده..... ۵۰
- جدول ۳-۱۵- مواد مورد نیاز برای تهیه بافر تشخیص..... ۵۰
- جدول ۳-۱۶- ترکیب بافر استخراج پروتئین..... ۵۱
- جدول ۳-۱۷- مقادیر مواد مورد نیاز در رسم نمودار استاندارد آلبومین..... ۵۲
- جدول ۴-۱- اسامی لاین‌هایی که حضور ژن *AYT1* در آن‌ها توسط آنالیز PCR مورد تایید قرار گرفته است..... ۶۰
- جدول ۴-۲- مقایسه درصد جوانه‌زنی و ارتفاع گیاهچه‌های تراریخته و غیر تراریخته در حضور توکسین DON..... ۶۸



۱-۱- گندم و تاریخچه تکاملی آن

۱-۱-۱- اهمیت گندم

بشر تمام غذای خود را چه به شکل مستقیم و چه به شکل غیرمستقیم از گیاهان به دست می‌آورد. جنس-های مختلف غلات که از خانواده گرامینه^۱ می‌باشند تقریباً نصف کالری و قسمت زیادی از احتیاجات غذایی انسان را تامین می‌نمایند (Lev-Yadun et al, 2000).

در بین جنس‌های مختلف غلات، گندم (*Triticum aestivum*) که بر اساس تحقیقات موجود حداقل از تلاقی سه گونه وحشی به وجود آمده است اهمیت بیشتری در تامین غذایی انسان دارد، به طوری که حداقل، در یک وعده غذایی روزانه به صورت نان مصرف می‌شود و امروزه گندم یکی از مهم‌ترین گیاهان غذایی جهان محسوب می‌گردد. گندم به تنهایی حدود یک پنجم از کالری مورد نیاز انسان را تامین می‌کند (Tanno and Willcox, 2006).

اهمیت گندم به علت خواص فیزیکی و شیمیایی گلوتن دانه آن است به طوری که می‌توان با آن به اشکال مختلف نان تهیه نمود. گندم در تولید مواد غذایی مختلفی چون نان، کلوچه، سوخاری، انواع شیرینی و انواع زیادی غذاهای گرم و سرد و دیگر تولیدات غذایی به کار می‌رود. گندم غذای مهمی برای طیور اهلی بوده و حدود ۱۰٪ از دانه آن به تغذیه دام می‌رسد. در بسیاری از نواحی، گندم در تهیه چراگاه، مرتع و علوفه خشک مورد استفاده قرار می‌گیرد. در ضمن مقادیر ناچیزی گندم به صورت صنعتی برای تولید کاغذ، نشاسته، الکل، روغن و ... استفاده می‌شود.

بر اساس نوشته‌های تاریخی که از کاوش‌های باستان شناسان به دست آمده است، گندم یکی از گیاهان مهم زراعی است که مصرف خوراکی داشته و مرکز پیدایش آن جنوب غربی آسیا می‌باشد. هم اکنون نیز می‌توان ارقام وحشی این گیاه را در لبنان، سوریه، عراق، شرق ترکیه و ایران به دست آورد و گروهی از محققین

1. Gramineae

معتقدند که اولین قرص نان در ۲۶۰۰ سال قبل از میلاد مسیح در سرزمین مصر تهیه شده است (Tanno and Willcox, 2006).

گندم از زمان‌های بسیار قدیم در کشورهایی مانند ایران، مصر و یونان که تمدن بسیار پیشرفته‌ای داشته‌اند در حجم وسیعی کشت و کار می‌شده است. گندم از این مناطق توسط سیاحان و تجار اولیه و از طریق اروپا به چین، هندوستان و استرالیا برده شد و بعد از کشف قاره آمریکا توسط مهاجرین اروپایی به آمریکا راه یافته است (Tanno and Willcox, 2006). طی قرون متمادی، گندم به تدریج تغییر شکل یافته و با استفاده از روش‌های جدید به نژادی این تغییرات در جهت افزایش عملکرد و کیفیت گندم با سرعت بیشتری انجام می‌شود. گندم در سراسر جهان گسترش یافته و در بین سایر غلات سازگارترین غله محسوب می‌گردد همچنین گندم از لحاظ سطح زیر کشت و میزان تولید نسبت به سایر غلات برتری دارد.

۱-۲- میزان تولید و اهمیت اقتصادی گندم

گندم هم به دلیل دارا بودن بالاترین سطح زیر کشت در ایران و هم به دلیل دارا بودن مواد غذایی غنی، از اهمیت بالایی در کشور ما برخوردار است. با خوردن ۱۳۵۰ گرم نان در روز حدود ۳۵۰۰ کالری برای انسان به دست می‌آید. فراورده‌های گندم در الگوی غذایی مردم ایران از اهمیت زیادی برخوردارند. یعنی ۴۰ تا ۴۵ درصد کالری و حدود ۵۰ درصد پروتئین مورد نیاز روزانه هر فرد را فراهم می‌کند. نسبت سطوح زیر کشت گندم به سایر محصولات عمده کشاورزی نیز رقم نسبتاً بالایی را تشکیل می‌دهد. همواره حدود ۶۵-۷۰ درصد اراضی زیر کشت محصولات عمده زراعی به گندم تعلق دارد. حدود دو سوم زمین‌های زیر کشت گندم کشور به صورت دیم بهره برداری می‌شود. طبق آمار FAO در سال ۲۰۱۱ مقدار محصول این غله ۷۰۴ میلیون تن بوده است که از این مقدار ۱۴ میلیون تن در ایران تولید شده است. همچنین سطح زیر کشت این محصول در جهان ۲۲۰ میلیون هکتار بوده که از این میزان ۷ میلیون هکتار به ایران اختصاص دارد (-). (www.FAO.org)

۱-۱-۳ گیاهشناسی گندم

گندم گیاهی تک لپه علفی و یکساله از تیره غلات و جنس *Triticum* است که دارای گونه‌های زیادی است. ریشه‌های گندم افشان و سطحی است. ریشه‌های اصلی و فرعی از محل طوقه خارج شده و همگی هم قطر می‌باشند. ساقه گندم مانند تمام گیاهان تیره غلات، ماشوره ای و برگ‌ها دو سویه و دارای پهنک نواری شکل فاقد دم‌برگ و شامل زبانک می‌باشند که از محل اتصال برگ به دم‌برگ خارج می‌شود. گل آذین مرکب از سنبله‌هایی است که به وسیله گلوم پوشیده می‌شوند. انتهای هر ساقه یک سنبله وجود دارد که دارای یک محور اصلی است و در روی آن سنبلچه‌ها قرار می‌گیرند. هر سنبلچه دارای ۳-۵ گل می‌باشد و هر گل توسط دو براکته مخصوص به نام پوشینه محافظت می‌شود. در برخی از نژادهای گندم انتهای پوشینه دارای تیغه‌ای بلند و باریک به نام پوشینک است که دارای کلروپلاست و روزنه بوده و به خوبی فتوسنتز می‌کند. مادگی دارای سه وجه متصل به هم، تخمدان یک خانه‌ای محتوی یک تخمک است و انتهای مادگی به کلاله دو شاخه پرمایند منتهی می‌شود. میوه خشک و ناشکافا و از نوع گندمه است (Bar, 1968) (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱- مشخصات ظاهری و شکل آرایش برگ‌ها و نوع بذر در گندم

۱-۴-۱- خصوصیات ژنتیکی گندم و رده‌بندی آن:

گندم نان (*Triticum aestivum*) هگزاپلوئید و دارای ۴۲ کروموزوم است. به طور کلی سه نوع عمده گندم وجود دارد: دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید. تنها گندم زراعی دیپلوئید، *Triticum monococcum* و یا Einkorn است. کلمه Einkorn به معنای یک دانه در یک گل‌آذین است. این واریته در برخی از مناطق خاورمیانه و شمال اروپا برای تهیه نان تیره کشت می‌شود. پوشینه این گندم محکم در اطراف دانه چسبیده است و جدا کردن آن مشکل است.

مهم‌ترین گندم‌های زراعی تتراپلوئید (*Triticum turgidum* (Emmer و *Triticum durum* هستند. گندم Emmer به طور گسترده‌ای در نواحی مدیترانه‌ای کشت می‌شود و برای تهیه نان و ماکارونی مناسب است. اما برداشت و خرمن‌کوبی آن مانند Einkorn سخت است و در حال حاضر در مناطق محدودی جهت تولید غذای دام کشت می‌شود. رقم Durum در نواحی مختلفی از ایتالیا، اسپانیا و ایالات متحده آمریکا رشد می‌کند و آرد آن هنگامی که خیس می‌شود چسبنده می‌گردد. همین خصوصیت، آن را برای تهیه رشته‌های ماکارونی و اسپاگتی ایده‌آل می‌سازد.

عمده‌ترین گونه از گندم که تقریباً در تمام نقاط دنیا کشت داده می‌شود، گندم هگزاپلوئید *T. aestivum* است. این گونه دارای گل‌آذین‌هایی است که در هنگام درو خرد نمی‌شود و پس از جمع‌آوری، خرمن‌کوبی آن به راحتی انجام می‌گیرد. دانه‌های هگزاپلوئید همگی دارای مقدار زیادی از پروتئین گلوتن هستند که باعث تولید نان ورآمده و پف کرده می‌شود (Hancock, 1992).

۱. گندم‌های دیپلوئید^۱: تعداد کروموزوم آن $2n=14$ است مانند گندم تک دانه (*T. monococcum*)

۲. گندم‌های تتراپلوئید^۲: تعداد کروموزوم آن $2n=28$ است مانند الف: *T. dicoccum* ب: *T. durum*

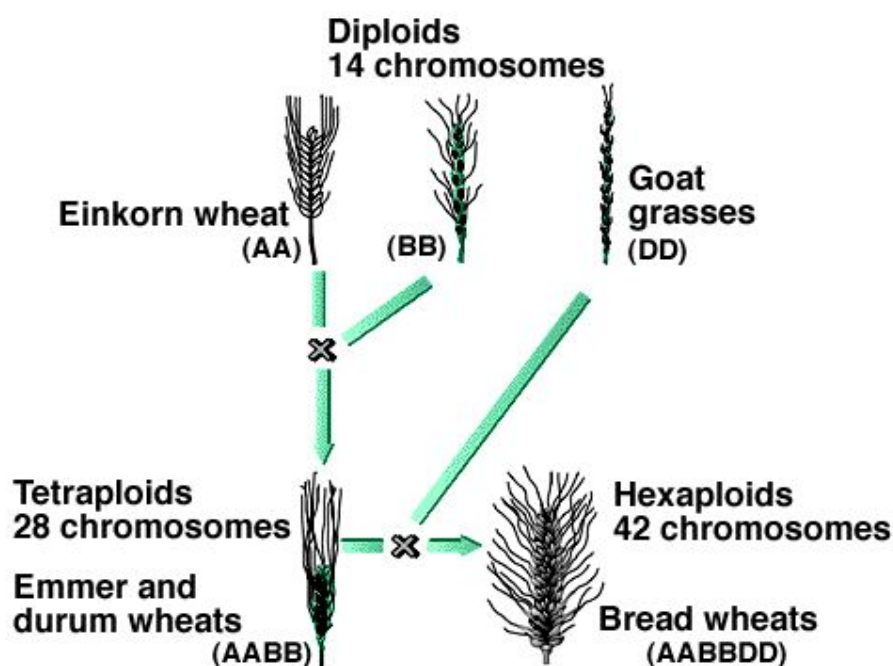
1. Diploid
2. Tetraploid

پ: *T. polonicum* ت: *T. timopheevi* ث: *T. turgidum*

۳. گندم‌های هگزاپلوئید : تعداد کروموزوم آن $2n = 42$ است مانند الف: *T. compactum*

ب: *T. aestivum* پ: *T. spelta* ت: *T. macha* ث: *T. sphaeracoccum*

Evolution of Domesticated Wheat



شکل ۱-۲- شمای تاریخچه تکاملی گندم نان

۱-۱-۵- بیماری‌های گندم:

گندم از دیرباز همچون سایر محصولات مورد تهدید و هجوم بیماری‌های مختلفی قرار می‌گرفته است. بنابراین در مقاطع زمانی مختلف انسان‌ها همواره کوشیده‌اند تا با توجه به دانسته‌های خود و همچنین امکانات موجود، گیاهان زراعی را از گزند این عوامل حفظ نمایند. لذا در این راستا و به منظور دستیابی هر چه بهتر به این مهم، شناخت هر چه بیشتر ما از عوامل بیماری‌زا از جهات گوناگون و روابط متقابل آنان با

میزبان و محیط اطراف بسیار پر اهمیت بوده و می‌تواند ما را در اتخاذ تدابیر مناسب به منظور برخورد با عوامل بیماری‌زا یاری رساند. انواع بیماری‌های شایع در مزارع گندم به شرح زیر می‌باشند:

الف- زنگ زرد گندم^۱: عامل این بیماری قارچی به نام *Puccinia striiformis* می‌باشد. از علائم این بیماری می‌توان به وجود جوش یا تاول‌هایی به رنگ زرد مایل به نارنجی بر روی برگ‌های جوان اشاره کرد که این جوش‌ها به هم پیوسته‌اند.

ب- زنگ قهوه‌ای گندم^۲: عامل این بیماری قارچی به نام *Puccinia recondite* می‌باشد. آثار بیماری به شکل جوش‌های بیضی شکل پراکنده و به رنگ نارنجی متمایل به قهوه‌ای می‌باشد که در سطح برگ و روی غلاف ظاهر می‌شوند.

پ- زنگ سیاه گندم^۳: عامل بیماری زنگ سیاه یا زنگ ساقه گندم قارچ *Puccinia graminis* می‌باشد. علائم این بیماری روی گندم در ابتدا به صورت جوش‌های باریک، بیضوی و موازی با محور اصلی ساقه، برگ یا غلاف ظاهر می‌شود. در مراحل بعدی رشد گیاه، جوش‌ها ممکن است روی سنبله‌ها و ریشک‌ها نیز تشکیل گردد.

ت- سیاهک پنهان معمولی^۴: عامل این بیماری دو گونه *Tilletia tririci* و *Tilletia laevis* می‌باشد. بوته‌های مبتلا به این بیماری کوتاه‌تر از حد طبیعی بوده و تعداد پنجه افزایش پیدا می‌کند. سنبله‌های آلوده دارای رنگ سبز مایل به آبی می‌باشند. دانه‌های آلوده سیاه رنگ، گرد و کوچک‌تر می‌باشند و با فشار دادن دانه بین انگشتان پودر سیاه رنگی از آن خارج می‌شود.

ث- سیاهک ناقص^۵: عامل این بیماری قارچی به نام *Tilletia indica* می‌باشد که می‌تواند گندم نان، دوروم و تریتیکاله را آلوده کند. در این بیماری دانه‌های گندم به طور تصادفی مورد حمله قارچ عامل بیماری‌زا قرار

1. Stripe rust = yellow rust

2. Leaf rust = brown rust

3. Stem rust = black rust

4. Common bunt = stinking smut

5. Karnal bunt = partial bunt

می‌گیرند. به عبارت دیگر در یک بوته تمام سنبله‌ها آلوده نشده و در یک سنبله آلوده نیز تمام دانه‌ها آلوده نمی‌شوند و یک دانه آلوده نیز ممکن است به صورت ناقص و یا فقط قسمتی از آن سیاه شود، به همین خاطر نیز سیاهک ناقص نامیده می‌شود.

ج- سیاهک آشکار^۱ : عامل این بیمار قارچی به نام *Ustilago tritici* می‌باشد. سیاهک آشکار گندم به طور معمول تا زمانی که بوته‌ها به سنبله بروند هیچ نوع نشانه‌ای ایجاد نمی‌کند. بوته‌های سیاهک زده زودتر از بوته‌های سالم به خوشه رفته و خوشه‌های سیاهک زده سریعاً بلند شده و از خوشه گیاهان سالم بالاتر می‌روند. در یک بوته آلوده تمام خوشه‌ها و دانه‌ها از توده سیاه اسپور پر می‌شوند. سنبله‌های گیاه آلوده به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آیند.

چ- سفیدک پودری گندم^۲ : عامل این بیماری قارچ *Blumeria(Erysiphe) graminia f.sp tritici* می‌باشد. مهم‌ترین نشانه بیماری سفیدک پودری گندم، ظهور و تشکیل یک پوشش پنبه‌ای به رنگ سفید مایل به خاکستری در سطح برگ‌هاست.

ح- بیماری سوختگی سپتوریای گندم^۳ : عامل این بیماری قارچی است که در مرحله غیرجنسی به نام *Septoria tritici* شناخته می‌شود. علائم این بیماری ابتدا به صورت لکه‌های کوچک نامنظم به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز به چشم می‌خورد. این لکه‌ها در روی رگبرگ‌ها محدود شده و به صورت طولی توسعه می‌یابند و به تدریج با پیشرفت لکه‌ها رنگ آن‌ها خاکستری می‌شود.

خ- بیماری پاخوره گندم^۴ : عامل این بیماری قارچی به نام *Gaeumannomyces graminis f.sp tritici* می‌باشد. علائم بیماری در زمان سنبله‌دهی ظاهر می‌شود. خوشه‌های آلوده به طور معمول کوچک‌تر و سفیدتر هستند.

1. Loose smut
2. Powdery mildew
3. Septoria blotch
4. Take-all

د- بیماری سفیدک دروغی گندم^۱ : عامل بیماری قارچ *Sclerophthora macrospora* می باشد. نشانه های بیماری به صورت لکه های کشیده و بیضی شکل در برگ ها ظاهر می شود که به طور معمول به رنگ قهوه ای تیره می باشند، گیاهان مبتلا دچار کوتولگی شدید شده و پنجه زنی آن ها افزایش می یابد.

ذ- بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم: عامل این بیماری گونه های قارچ فوزاریوم می باشد که گونه *F.graminearum* با فرم جنسی *Gibberella zeae* به عنوان گونه غالب معرفی شده است. گونه *F.culmorum* نیز علایم مشابهی بر روی گندم به وجود می آورد اما فعالیت این گونه در مناطق خشک گسترده تر است. بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم باعث ایجاد خسارات شدید روی محصول گندم به ویژه در مناطق شمالی کشور می شود. از آنجا که در این تحقیق بررسی مقاومت گندم به این بیماری مد نظر می باشد، در ذیل به توضیح بیشتری در مورد این بیماری می پردازیم.

۱-۲-۱- بلایت فوزاریومی سنبله گندم^۲

۱-۲-۱- علایم بیماری

مهم ترین علامت بیماری فوزاریوم سنبله، سفید شدن بخش و یا تمام سنبله قبل از تکامل آن می باشد. آلودگی گاهی به یک یا چند سنبله محدود می گردد و به طور معمول قسمت هایی از خوشه که بالای محل آلودگی قرار دارند خشک می شوند.

در صورت وجود رطوبت میسیلیوم قارچ به همراه اسپورزایی زیاد در سطح خوشه به رنگ صورتی ظاهر می شوند. برحسب زمان آلودگی خوشه، دانه ها چروکیده و در مواردی عقیم می گردند. علایم بیماری در سایر قسمت های بوته به صورت پوسیدگی ریشه و طوقه، قهوه ای شدن پای ساقه و سیاه شدن گره ها می باشد

(Goswami and Kistler., 2004; Parry et al., 1995).

1. Downy mildew

2. Fusarium Head Blight

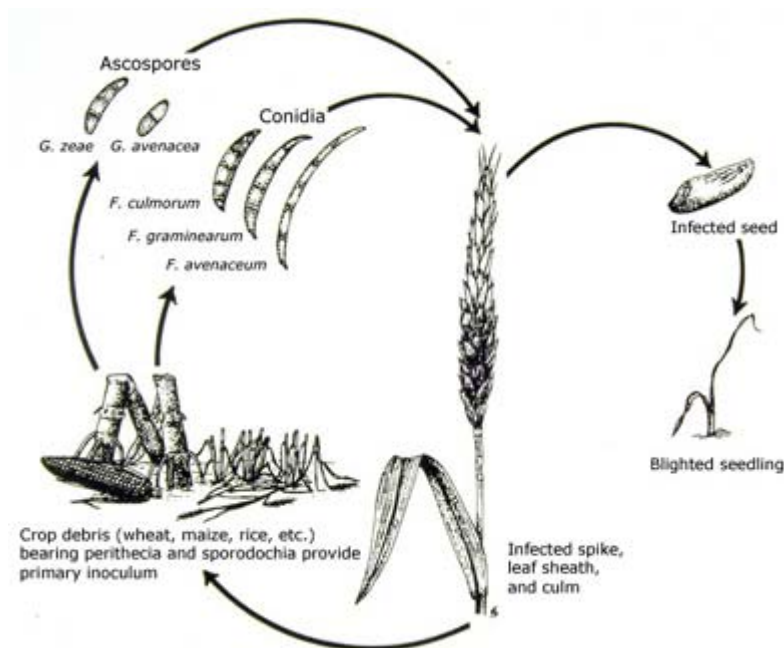


شکل ۱-۳- بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم. الف- مراحل اولیه آلودگی سنبله توسط قارچ عامل بیماری، ب- گسترش قارچ سنبله پس از آلودگی

۱-۲-۲- زیست شناسی

کشت ارقام حساس، رطوبت مناسب و ابری بودن هوا، درجه حرارت مناسب و هم زمانی بارندگی‌های بهاره با مرحله حساس گلدهی چهار فاکتور اصلی در گسترش بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم هستند. قارچ عامل بیماری بر روی علف‌های هرز گرامینه به عنوان میزبان ثانویه و همچنین در بقایای گیاهی به صورت فرم جنسی یا پریتسیوم، کلامیدوسپور و میسیلیوم به سر می‌برد. بذور آلوده در انتقال و انتشار بیماری نقش بسیار مهمی دارند.

آلودگی اولیه به طور معمول به وسیله آسکوسپورها و استقرار آن‌ها روی خوشه صورت می‌گیرد. پس از جوانه‌زنی و تولید اسپور، انتشار اسپور توسط باد، باران و یا حشرات و پرندگان صورت می‌گیرد. زمان گلدهی تا شیری شدن دانه‌ها مناسب‌ترین دوره برای ایجاد آلودگی است. شب‌نم و بارندگی‌های بهاره نقش بسیار مهمی در ایجاد آلودگی دارند (Urban et al., 2002).



شکل ۱-۴- چرخه زندگی قارچ *Fusarium graminearum* (www.apsent.org)

۱-۲-۳- مدیریت تلفیقی بیماری :

روش‌هایی که برای کنترل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم استفاده می‌شود عبارتند از: استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل به بیماری، به کارگیری روش‌های زراعی مثل تعیین مناسب‌ترین زمان کاشت، تناوب و رعایت تراکم کاشت، استفاده از بذر سالم و گواهی شده، از بین بردن علف‌های هرز گرامینه، عدم انتقال بذور استحصالی از مناطق آلوده به سایر مناطق، ضد عفونی بذر با یکی از سموم قارچ‌کش تماسی و برحسب ضرورت استفاده از سموم قارچ‌کش به صورت محلول پاشی در مرحله گلدهی و تکرار آن (Nakajima et al., 1997).

۱-۳- استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک در گیاهان جهت افزایش مقاومت به پاتوژن‌های

قارچی

از زمان اهلی شدن گیاهان و استفاده از آن‌ها توسط انسان در بیشتر مواقع، بیماری گیاه علت اصلی کاهش عملکرد و میزان رضایت انسان در سرتاسر جهان بوده است. پس محققین به دنبال چاره‌ای جهت رفع این مشکل برآمدند. در ابتدا از یک سری روش‌های اصلاحی جهت انتخاب گیاهان برتر استفاده می‌کردند ولی

این روش‌ها هزینه و وقت زیادی را در بر می‌گرفت. لذا محققین به این نتیجه رسیدند که انتقال ژن‌های مقاومت در گیاهان از طریق تکنیک‌های مهندسی ژنتیک می‌تواند یکی از روش‌های اصلاحی موفق نسبت به روش‌های اصلاحی سنتی در گیاهان باشد که امروزه برخی از کولتیوارهای مورد استفاده، دارای ژن‌های مقاومت جهت مقابله با عوامل بیماری‌زا هستند که بدون این ژن‌های مقاومت تولیدات گیاهی و عملکرد آن‌ها در حد قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. با شروع کارهای مولکولی در گیاهان در اوایل سال ۱۹۸۰، سطح وسیعی از تحقیقات جهت شناسایی، همسانه سازی و به دست آوردن ژن‌های دخیل در مقاومت به بیماری‌ها انجام شد. از این رو مکانیسم‌های متعددی جهت بهبود گیاهان در پاسخ به آلودگی پاتوژنی کشف شد و همین طور پیشرفت‌های زیادی تا به امروز جهت به دست آوردن ژن‌های درگیر در پاسخ‌های دفاعی گیاهان حاصل شده است (Punja, 2007).

پاسخ‌های دفاعی گیاهان را می‌توان در ۵ دسته طبقه بندی نمود (Punja, 2007):

- ۱- تولیدات حاصل از بیان ژن‌های مقاومت که سم حاصل از پاتوژن را خنثی می‌کنند و یا از رشد پاتوژن در محل جلوگیری می‌کنند. این تولیدات شامل پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (پروتئین‌های PR)، آنزیم‌های هیدرولیتیک (کیتیناز، گلوکوناز) و پروتئین‌های ضد قارچی (اسموتین) هستند.
- ۲- تولیدات حاصل از بیان ژن‌هایی که باعث تخریب ترکیبات مترشحه از پاتوژن می‌شوند مثل پلی گالاکتوروناز، اگزالیک اسید و لیپازها.
- ۳- تولیدات حاصل از بیان ژن‌هایی که ساختارهای دفاعی در گیاهان را بهبود می‌بخشند. مانند بهبود در سطوح پراکسیداز و لیگنین.
- ۴- تولیدات حاصل از بیان ژن‌هایی که علائم و نشانه‌هایی را جهت افزایش میزان استحکامات در گیاهان آزاد می‌کنند. این مواد شامل هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، سالیسیلیک اسید (SA) و اتیلن (C_2H_4) هستند.
- ۵- تولیدات حاصل از بیان ژن‌های مقاومت (R) که در پاسخ‌های فوق حساسیت درگیر هستند.

به طور کلی انتخاب و انتقال ژن‌های مقاومت در گیاهان از طریق تکنیک‌های مهندسی ژنتیک تا حدی می‌تواند از رشد و توسعه عوامل بیماری‌زا جلوگیری کند. این نکته مهم است که بدانیم بسیاری از تولیدات ژنی متعلق به گروه پروتئین‌های PR¹ هستند. اخیراً همسانه سازی ژن‌های R² با سرعت بیشتری انجام می‌شود چرا که این ژن‌ها می‌توانند طیف وسیعی از مقاومت در برابر بیماری را ایجاد کنند. امروزه از برخی از روش‌های جدید مهندسی ژنتیک هم جهت معرفی و ورود ژن‌ها به داخل گیاه استفاده می‌شود مثل استفاده از RNA دو رشته‌ای که در ویروس‌ها و قارچ‌ها یافت شده است یا همسانه‌سازی ژن‌های لیزوزیم که از بافت‌های انسانی گرفته شده است (Punja, 2007).

۱-۴- سیستم‌های تراریختی در گندم

مهندسی ژنتیک هم اکنون در فناوری‌های کشت بافت و انتقال ژن، در گندم به کار می‌رود. غلبه بر موانع دست‌ورزی ژن‌های گیاهی با شناخت خصوصیات روش‌های مختلف انتقال ژن و بهره برداری مناسب از آن‌ها محقق می‌گردد. در گذشته تعدادی از روش‌های انتقال، شامل روش‌های انتقال شیمیایی ژن (مثل استفاده از پلی اتیلن گلایکول) و روش‌های فیزیکی انتقال ژن مثل ریز تزریقی (DNA به طور مستقیم و به صورت مکانیکی و از طریق کنترل میکروسکوپی به درون یک هدف مشخص فرستاده می‌شود) برای انتقال ژن‌های مورد نظر به بافت هدف در گندم استفاده می‌شد. ولی بی شک امروزه موفق‌ترین رهیافت، روش بمباران ذره-ای (به دلیل تک لپه‌ای بودن گندم) می‌باشد (weeks et al, 1993). این تکنیک هم اکنون در آزمایشگاه‌های بسیاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. تکنیک بمباران ذره‌ای که روش بیولیستیک نیز نامیده می‌شود، خود را به عنوان انعطاف پذیرترین و مؤثرترین راه برای ایجاد انواع مختلفی از موجودات تراریخت شامل میکروارگانیسم‌ها، سلول‌های حیوانی و گونه‌های گیاهی مطرح ساخته است. این روش که در آن از ذرات ریز پرشتاب (طلا یا تنگستن) برای فرستادن اسیدهای نوکلئیک به درون سلول‌های زنده استفاده می‌شود،

1. pathogenesis-related proteins
2. Resistance genes

توسط کلین و همکاران (۱۹۸۷) و سانفورد و همکاران (۱۹۸۷) ابداع گردید. در این روش ذرات طلا یا تنگستن حامل DNA به قطر ۱-۳ میکرومتر به سمت سلول‌های گیاهی زنده پرتاب می‌شوند. چندین سیستم در این روش استفاده می‌شود اما تفنگ Biorad PDS1000/Helium بیشترین استفاده را دارد چرا که بازدهی آن نسبت به سایر سیستم‌ها بالاتر است.

همچنین امروزه توجهات به سمت استفاده از آگروباکتریوم نیز به عنوان روشی برای تراریخته کردن گندم معطوف شده است. قبلاً چنین اندیشیده می‌شد که تک لپه ای‌ها به آلوده‌سازی توسط آگروباکتریوم ناسازگار باشند و آگروباکتریوم روشی مناسب برای انتقال ژن‌های مورد نظر به گیاهان تک لپه نمی‌باشد. اما موفقیت‌های به دست آمده در برنج (Hiei et al, 1994) و جو (Tingay et al, 1997) نشان داد که نژادهایی از این باکتری می‌تواند برای انتقال ژن در تک لپه‌ای‌ها مناسب باشد. این روش دارای مزیت‌هایی می‌باشد به عنوان مثال این روش یک ابزار طبیعی برای انتقال ژن‌ها است و در بین کسانی که روش‌های طبیعی را ترجیح می‌دهند از مقبولیت بیشتری برخوردار می‌باشد، از طرفی در اکثر موارد تنها یک نسخه از ژن مورد نظر به درون بافت هدف انتقال می‌یابد که این امر پایداری ژن منتقل شده را بهبود می‌بخشد. (Zambryski et al, 2010).

۱-۵- روش‌های آنالیز گیاهان تراریخته

پس از آنکه ژن مورد نظر به گیاه مربوطه با یکی از روش‌های انتقال ژن، منتقل شد برای اطمینان از حضور ژن مورد نظر و بررسی بیان آن و نیز اطمینان از عدم تفرق ژن انتقال یافته در نسل‌های بعدی بایستی بذور تراریخته نسل اول مورد کشت قرار گیرد و گیاهان حاصل مورد آنالیز مولکولی قرار گیرند. از طرفی پس از تایید حضور ژن در سطوح مختلف، مسئله ارزیابی بیولوژیک (محصول تولیدی) نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. روش‌های مختلفی برای آنالیز مولکولی گیاهان تراریخته وجود دارد که توسط آن‌ها می‌توان وجود ژن خارجی را در سطوح مختلف DNA، RNA و پروتئین مورد بررسی و تایید قرار داد. واکنش زنجیره‌ای

پلیمراز، روش‌های هیبریداسیون اسید نوکلئیک مثل Southern blot و Northern blot و نیز Western blot جهت آنالیز در سطح پروتئین از این جمله می‌باشند.

۱-۵-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):

از زمان کشف DNA و به دنبال آن توسعه فناوری DNA نو ترکیب، تکثیر DNA به صورت مصنوعی یکی از آرمان‌های محققین در حوزه بیولوژی مولکولی بوده که سرعت زیادی به پیشرفت علم بیوتکنولوژی و کاربرد آن در بسیاری از شاخه‌های مختلف زیستی بخشیده است. ابداع و معرفی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) که در واقع مجموعه‌ای از واکنش‌های شیمیایی برای تکثیر اختصاصی بخش معینی از DNA است این حوزه از دانش زیستی را بسیار مهیج کرده و دامنه کاربرد آن را بسیار گسترش داده است. امروزه روش PCR، تحقیق در بیولوژی مولکولی را دچار تحول نموده و باعث افزایش کاربرد آن در بیشتر آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی و تشخیص پزشکی شده است همچنین کاربرد آن در علوم دیگر مانند حقوق، باستان شناسی، انسان شناسی و سیستماتیک مولکولی نیز اثبات شده است. این واکنش، مبتنی بر همانندسازی نیمه حفاظتی DNA می باشد که در تمام انواع سلول ها به وسیله DNA پلیمرازها صورت می‌گیرد. پس به طور کلی PCR جهت تکثیر ناحیه و یا قطعه خاصی از DNA هدف بکار گرفته می‌شود. اکثر روش‌های PCR به طور معمول قطعاتی با اندازه حدود ۱۰ Kb را تکثیر می‌کنند. به طور کلی مراحل واکنش PCR با توجه به شکل ۱-۵ به صورت زیر است:

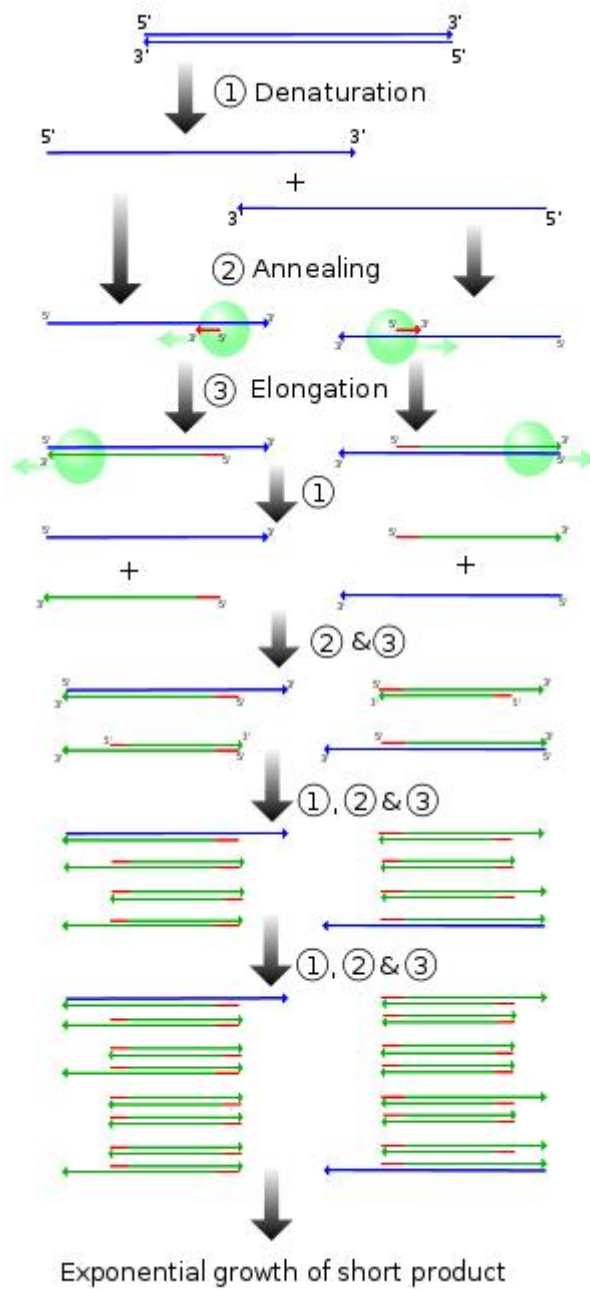
۱- مرحله آغاز (Initialization step): این مرحله در دمای حدود ۹۴ درجه به مدت ۹-۱ دقیقه انجام می‌شود. البته این مرحله در مواردی بکار می‌رود که آنزیم پلیمراز مورد استفاده جهت انجام فعالیت نیاز به گرم شدن دارد که به Hot- start PCR معروف است.

۲- مرحله دناتوراسیون (Denaturation Step): این مرحله اولین مرحله معمول PCR بوده که در دمای ۹۴-۹۸ درجه به مدت ۲۰-۳۰ ثانیه انجام می‌شود. این عمل باعث جدا شدن دو رشته DNA از یکدیگر از

طریق هضم پیوندهای هیدروژنی بین نوکلئوتیدهای دورشته DNA می‌شود و در نهایت تولید DNA تک رشته ای می‌نماید.

۳- مرحله اتصال (Annealing step) : در این مرحله دمای واکنش به ۶۵-۵۰ درجه به مدت ۴۰-۲۰ ثانیه کاهش می‌یابد تا امکان اتصال پرایمر به DNA الگو که حالا تک رشته ای است فراهم شود. مناسب ترین اتصال DNA-DNA بین رشته الگو و پرایمر زمانی ایجاد می‌گردد که هر دورشته در فاصله نزدیکی از هم قرار گیرند و هرچه توالی پرایمر با توالی رشته الگوی متناسب تر باشد این اتصال قوی تر بوده و اتصال قوی جهت انجام عمل پلیمرز مورد نیاز است.

۴- مرحله گسترش یا طویل شدن (Extension/Elongation step) : درجه حرارت این مرحله به آنزیم پلیمرز مورد استفاده و درجه حرارت اپتیمم مورد نیاز برای آن بستگی دارد. بطور مثال آنزیم *Taq* پلیمرز در درجه حرارت ۷۵-۸۰ درجه سانتیگراد فعالیت قابل قبول داشته ولی بطور معمول از درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد برای این آنزیم استفاده می‌شود. در این مرحله آنزیم پلیمرز نوکلئوتیدهای مکمل را بر اساس رشته الگو در کنار هم قرار داده و در نهایت رشته مکمل رشته الگوی اولیه را تولید می‌کند. مدت زمان این مرحله به طول رشته DNA الگو بستگی دارد. در پایان از تکنیک‌های بسیار زیادی برای مطالعه فرآورده‌های PCR استفاده می‌شود که سه نوع از مهمترین آنها به این شرح است: الکتروفورز ژل آگارز، همسانه‌سازی محصولات PCR و توالی‌یابی محصولات PCR.



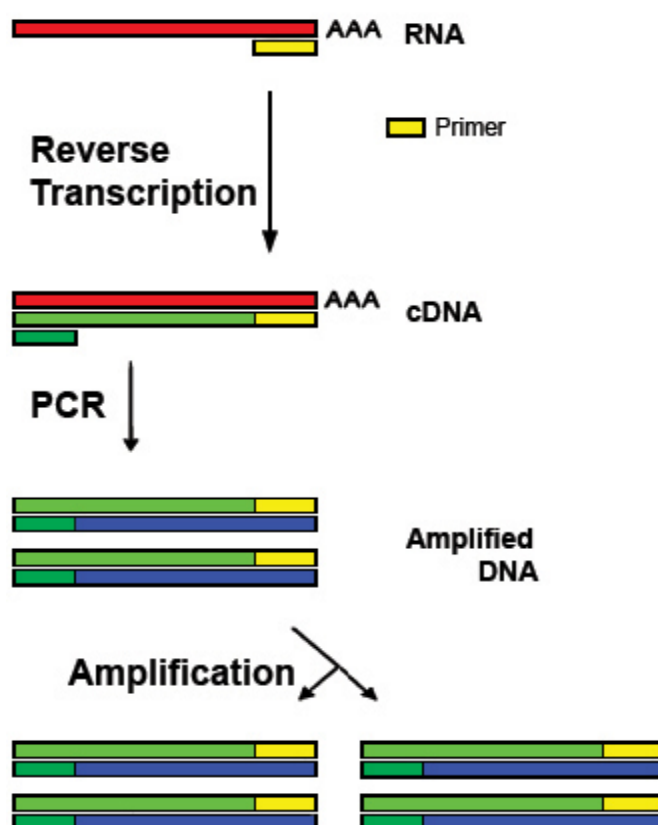
شکل ۱-۵- مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۱: واسرشت سازی رشته DNA ۲: اتصال آغازگر به DNA هدف و ۳:

سنتز یا بسط مولکول DNA

۱-۵-۲ PCR وابسته به واکنش رونوشت برداری معکوس (RT-PCR)^۱

در این روش می‌توان به طور نیمه کمی و به کمک PCR به بررسی میزان بیان ژن انتقال یافته پرداخت. همان طور که از نام این تکنیک پیداست باید از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس استفاده شود. کاربرد موثر تکنیک RT-PCR این است که می‌توان با دقت بالایی به مطالعه ژن‌های رونویسی شده و سطوح بیان شده-ای از RNA در سلول پرداخت.

RT-PCR یک روش دو مرحله‌ای است (شکل ۲-۴) که شامل ۱. آنزیم ترانسکریپتاز معکوس از روی mRNA ، cDNA^۲ را می‌سازد ۲. نمونه cDNA با PCR تکثیر می‌شود که در نهایت چندین نسخه cDNA را داریم. در RT-PCR، نیز همانند PCR باید محصول به دست آمده را الکتروفورز نماییم تا از نسخه‌برداری ژن مورد نظر خود مطمئن شویم.



شکل ۱-۶: فرایند RT-PCR که شامل ۱: سنتز cDNA و ۲: تکثیر با PCR می‌باشد.

1. Reverse Transcriptase PCR
2. Complementary DNA

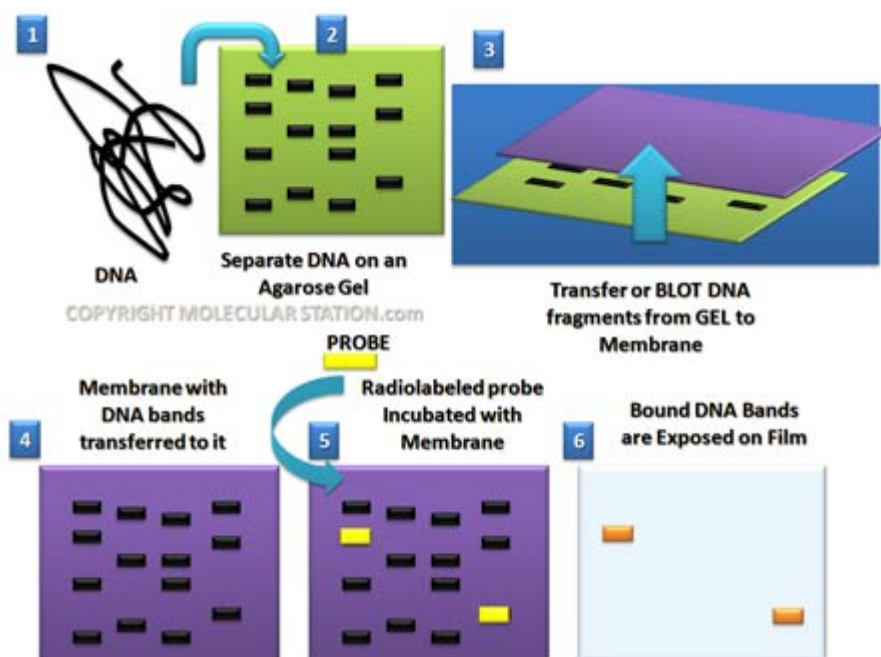
۱-۵-۳ - روش‌های هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک (بلاتینگ):

به طور کلی در ژنتیک مولکولی به عمل انتقال مولکول‌های تفکیک شده در الکتروفورز از ژل به روی یک غشاء، بلاتینگ یا بلات کردن گفته می‌شود. معنای واژه انگلیسی بلاتینگ، لکه‌گذاری است. برای انجام اعمالی مانند هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک و شناسایی پروتئین‌ها با پادتن‌ها، ژل محیط مناسبی نیست. علت اصلی این مسئله نفوذپذیری کم ژل و خروج کاوشگرها از ژل می‌باشد. از این رو در صورت انجام عمل آشکارسازی به کندی و با مشکل صورت می‌گیرد. اما غشاء، محیط مناسبی برای اعمال فوق فراهم می‌کند. در زیر به بررسی انواع روش‌های بلاتینگ می‌پردازیم.

۱-۵-۳-۱ - روش هیبریداسیون سادرن بلات^۱

روش سادرن بلات از روی نام مخترع آن به نام ادوین سادرن گرفته شده است. این روش تکنیکی است که از آن در بیولوژی مولکولی برای شناسایی یک بخش مشخص از DNA در کل DNA ژنومی استفاده می‌شود. همچنین با این روش می‌توان تعداد نسخ ژنی موجود در بافت‌های مورد نظر را تشخیص دهیم. برای این کار پس از استخراج DNA از نمونه هدف آن را با یک آنزیم برشی مناسب می‌بریم. سپس قطعات تفکیک شده بر روی ژل الکتروفورز را به روی یک غشای نایلونی منتقل می‌کنیم و سپس با انجام هیبریداسیون بین غشا و مولکول‌های کاوشگر می‌توان اقدام به آشکارسازی بخش مورد نظر نمود. سپس اگر در بالای فیلتر یک فیلم عکاسی قرار داده شود لکه‌های سیاهی بر روی آن مطابق با مولکول هیبرید مورد نظر نمایان خواهد شد (Southern, 1975).

1. Southern blot



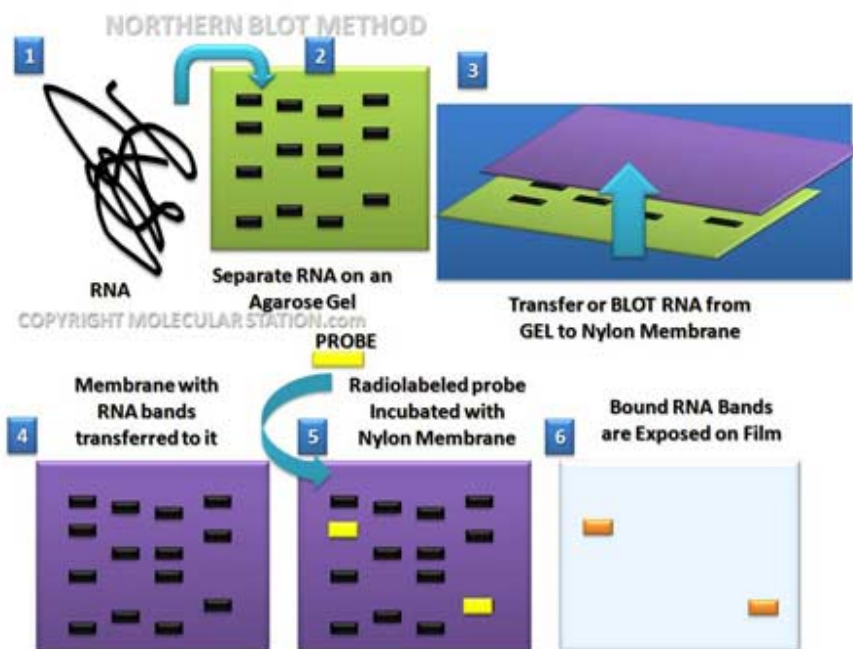
شکل ۱-۷: سادرن بلات یا هیبریداسیون DNA با DNA: ابتدا الگو با آنزیم برشی مناسب بریده می‌شود و سپس روی ژل آگارز بارگیری می‌گردد. در مرحله بعد ژل آگارز را که حاوی باندهای DNA از هم تفکیک شده بر اساس اندازه است به روی یک غشای نایلونی منتقل می‌کنیم. سپس از پروب‌های رادیو اکتیو بر روی غشا استفاده می‌شود تا آن‌ها به بخش‌های مکمل خود در DNA الگو متصل شوند سپس از یک فیلم رادیوگرافی برای مشاهده باندهای مورد نظر استفاده می‌گردد.

۱-۵-۲- نوردن بلات^۱

روش نوردن بلات به هیبریداسیونی اشاره می‌کند که در آن از RNA به عنوان مولکول هدف استفاده می‌شود. از این روش برای بررسی میزان بیان ژن‌ها با آشکارسازی RNA استفاده می‌شود همچنین برای

مشاهده بیان یک ژن خاص در یک بافت، اندام یا در هنگام وقوع تنش‌های محیطی به کار می‌رود. در این تکنیک، RNA را از بافت مورد نظر استخراج می‌کنیم و قطعات حاصل از آن را بر اساس اندازه با استفاده از الکتروفورز از هم تفکیک می‌کنیم. سپس این قطعات را به روی یک غشای نایلونی یا نیتروسلولازی منتقل کرده و سپس غشا را در یک محلول، که حاوی کاوشگر مورد نظر است قرار می‌دهیم و به کمک کاوشگر رادیواکتیو یا فلوروسانس به ردیابی RNA مورد نظر می‌پردازیم. حال پس از انجام اتورادیوگرافی می‌توان بر روی فیلم عکاسی لکه‌هایی را مطابق با هیبرید مورد نظر مشاهده کرد (Alberts et al, 2008).

1. Nourthern Blot



شکل ۱-۸: نوردن بلات: RNA استخراج می شود و روی ژل آگارز بارگیری می گردد. در مرحله بعد این ژل به روی یک غشای نایلونی منتقل می گردد. سپس پروب های مورد نظر با بخش های مکمل خود اتصال می یابند و با انجام رادیوگرافی می توان باندهای مورد نظر خود را مشاهده نمود.

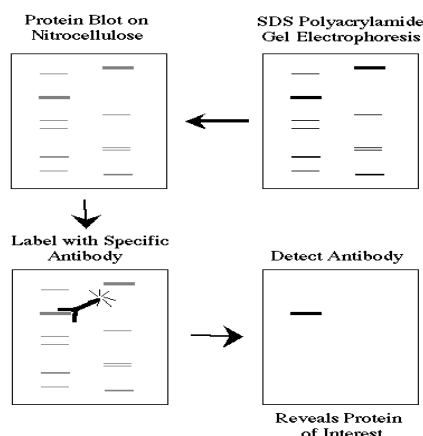
۱-۵-۳-۳- وسترن بلات^۱

وسترن بلات یکی از روش های بلاتینگ است که برای تشخیص و آنالیز پروتئین ها استفاده می شود. با روش وسترن بلات می توان با تولید آنتی بادی های اختصاصی چگونگی تنظیم بیان و کنترل متابولیکی پروتئین مورد نظر را بررسی کنیم.

وسترن بلات روشی دو مرحله ای است که طی آن ابتدا باندهای پروتئینی جدا شده بوسیله الکتروفورز از روی ژل SDS-PAGE به غشای دیگری که غالباً از جنس نیتروسلولوز می باشد انتقال می یابند و در مرحله دوم توسط آنتی بادی اختصاصی، پروتئین مورد نظر شناسایی می شود. بدین معنی که پس از استخراج پروتئین از بافت مورد نظر پروتئین های جدا شده در ژل پلی آکرلامید به غشای دیگری از جنس نیتروسلولوز منتقل می شوند. سپس برای آشکار شدن یک پروتئین خاص باید یک آنتی بادی برای آن پروتئین مورد نظر فراهم شود. تا پروتئین های مناسب آن آنتی بادی به آن متصل شوند و بقیه پروتئین ها بلوکه شوند. در مرحله بعد

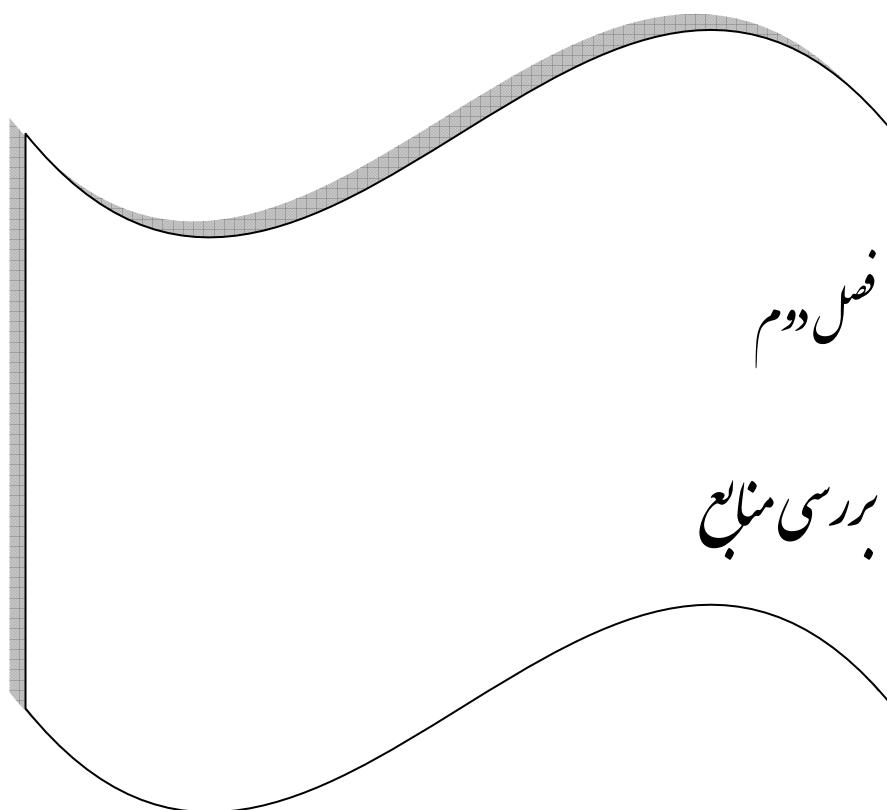
1. Western Blot

آنتی‌بادی ثانویه نشاندار شده با یک آنزیم (مثل الکلین فسفاتاز) نیز به آنتی‌بادی اولیه متصل می‌شود. در نهایت پس از شستشو و حذف آنزیم‌های متصل نشده سوپسترا به غشا اضافه می‌شود. سوپسترا در اثر آنزیم متصل شده به پروتئین، تغییر یافته و نوارهای رنگی بر روی غشا تولید می‌کند.



شکل ۹-۱: روش وسترن بلات- بعد از آنکه مخلوطی از پروتئین‌ها به غشای نیتروسلولوزی چسبیدند، پروتئین مورد نظر می‌تواند با استفاده از یک آنتی بادی مناسب آشکار گردد. آنتی بادی مورد نظر به پروتئین‌ها اضافه می‌گردد و به یک غشای نیتروسلولوزی منتقل می‌گردد. آنتی بادی مورد نظر به پروتئین مربوطه متصل می‌گردد. سپس از یک آنتی بادی ثانویه نیز برای اتصال به آنتی بادی اولیه استفاده می‌شود که باعث می‌شود تا پروتئین مورد نظر به صورت یک تگ باند مشخص گردد.

به طور کلی اطمینان از حضور ژن مورد نظر و بررسی بیان آن در نسل‌های مختلف و همچنین بررسی مسئله ارزیابی بیولوژیک (محصول تولیدی) از اهمیت بالایی در روش‌های مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی برخوردار است که این مسائل در این تحقیق بر روی ژن *AYT1* مورد بررسی قرار گرفته است. اثبات حضور و بیان ژن *AYT1* در نسل دوم (T_1) گندم تراریخته از طریق آنالیزهای مولکولی و نیز ارزیابی تاثیر ژن استیل ترانسفراز مخمری در سم زدایی توکسین DON از جمله اهداف این تحقیق می‌باشد. در این تحقیق با کشت بذور تراریخته نسل اول و به دست آوردن گیاهان تراریخت نسل دوم (T_1) در نظر است حضور و بیان ژن *AYT1* در نسل دوم از طریق آنالیزهای مولکولی همچون PCR، RT-PCR و تکنیک‌های هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک مورد ارزیابی قرار گیرد. ارزیابی کارایی این ژن در سم‌زدایی از توکسین DON و القای مقاومت به عامل بیماری بلایت فوزاریومی گندم نیز مورد نظر می‌باشد.



۲-۱- بلایت فوزاریومی سنبله گندم

این بیماری در مناطق مختلف دنیا مانند آمریکا و کانادا (Harriss et al, 1999)، اروپا (Burstmayr et al, 2003)، چین (Guihong et al, 2001) و هند (Parry et al, 1995) دیده شده و خسارات عمده‌ای به گندم وارد می‌کند و می‌تواند عملکرد گندم را ۳۰ تا ۷۰ درصد کاهش دهد (Parry et al, 1995). این بیماری در مناطق معتدله و نیمه حاره‌ای مرطوب شیوع بیشتری دارد. بلایت فوزاریومی سنبله گندم از سال‌ها پیش در ایران وجود داشته و یکی از عوامل خسارت‌زای گندم به ویژه در مناطق مازندران و گرگان به حساب می‌آید که عملکرد گندم را ۳۰ تا ۷۰ درصد کاهش می‌دهد (صفایی و همکاران، ۱۳۸۴).

بلایت فوزاریومی گندم نه تنها باعث کاهش چشمگیر کمیت محصول می‌گردد (کاهش وزن هزار دانه) بلکه به دلیل تولید مایکوتوکسین‌های خطرناک و تجمع آن‌ها در دانه‌ها سبب بروز بیماری‌ها و عوارض متعدد انسانی و دامی ناشی از مصرف دانه و فراورده‌های آلوده آن می‌شود (صفی پور افشار، ۱۳۸۴). مبارزه شیمیایی با این بیماری غالباً موثر واقع نشده و استفاده از قارچ‌کش‌ها اگرچه ممکن است در کوتاه مدت در کنترل اپیدمیک آن موثر باشد، اما باعث آلودگی زیاد محیط زیست شده و در عین حال نمی‌تواند مقدار توکسین‌های تولیدی قارچ را به مقدار قابل تحمل برای انسان پایین بیاورد. با توجه به اهمیت این بیماری و آثار نامطلوب توکسین‌های ناشی از قارچ عامل بیماری و نیز ناکارآمدی روش‌های مختلف کنترل این بیماری، توسعه و ارزیابی ژرم‌پلاسم و ایجاد ارقام متحمل از ضرورت ویژه‌ای برخوردار است.

فیتوتوکسین‌هایی که به وسیله این پاتوژن تولید می‌شود از دسته تریکوتسین‌ها^۱ می‌باشند که مهم‌ترین آن‌ها دی اکسی نیوالنول (DON)^۲، زرالنون (ZEN)^۳ و زرالنول^۴ است (Desjardins et al., 1997). تریکوتسین‌ها بزرگترین دسته مایکوتوسین‌های فوزاریوم را تشکیل می‌دهند که پس از شناسایی قارچ *Trichothecium roseom* با این عنوان نامیده شدند. تریکوتسین‌ها از جمله آنتی بیوتیک‌های سسکوئی‌ترین^۵ می‌باشند که

1. Trichothecenes 2. Dioxynivalenol
3. Zearalenone 4. Zearalenol
5. sesquiterpene

مهارکننده فعال مرکز پتیدیل ترانسفراز ریبوزوم‌های یوکاریوتی می‌باشند و از تولید پروتئین در مراحل طولی شدن و خاتمه جلوگیری می‌کنند (Poppenberger et al., 2003).

۲-۲- مکانیسم فعالیت تریکوتسین‌ها :

تریکوتسین‌ها بازدارنده سنتز پروتئین در یوکاریوت‌ها بوده و می‌توانند به ریبوزوم‌ها و پلی زوم‌ها متصل شده و اثر تخریبی بر روی سلول‌های در حال تقسیم بگذارند. به ازای هر ریبوزوم تنها یک جایگاه اتصال تریکوتسین وجود دارد که بر روی زیر واحد 60S واقع بوده و گمان می‌رود که در مرکز کاتالیتیک آنزیم پتیدیل ترانسفراز جای گرفته باشد. بعضی از انواع تریکوتسین‌ها بیشتر مراحل آغاز و طولی شدن پروتئین-سازی را متوقف می‌کنند، در حالی که بعضی دیگر مراحل طولی شدن و پایان پروتئین‌سازی را مهار می‌کنند (McLaughlin, 1977; Okubara et al, 2000).

کیمورا و همکارانش (۱۹۹۸) تریکوتسین‌ها را به دو دسته تقسیم نمودند. گروه اول d-type نامیده می‌شوند که فاقد گروه هیدروکسیل در کربن شماره ۳ هستند و دسته دوم t-type نامیده می‌شوند و دارای گروه هیدروکسیل در کربن شماره ۳ خود هستند. DON یا دی‌اکسی‌نیوالنول (α ، ۳، ۷-۱۵-تری هیدروکسی-۱۲ و ۱۳ اپوکسی تریکوتک-۹-ان-۸-ژن) از دسته t-type هاست. مکانیسم‌های مورد استفاده برای مقاومت در گونه‌های تولید کننده در برابر تریکوتسین‌های d-type احتمالاً متفاوت از تریکوتسین‌های t-type است. به نظر می‌رسد مکانیسم مقاومت در برابر d-type‌ها تغییر یا جایگزینی پروتئین هدف در ریبوزوم باشد همان طور که در *T. roseum* نیز دیده می‌شود. این در حالی است که مکانیسم مقاومت در برابر t-type‌ها تغییر گروه ۳- هیدروکسیل توسط آنزیم استیل ترانسفراز است، مانند آنچه که در *Fusarium sporotrichioides* دیده می‌شود.

همان گونه که ذکر شد، یکی از ترکیبات مهم تریکوتسینی شناخته شده، دی اکسی نیوالنول (DON) با نام شیمیایی (12,13-epoxy-3 α ,7 α ,15trihydroxy-trochothec-9-en-8-one) می‌باشد. محققین معتقدند که DON احتمالاً به عنوان فاکتوری بیماری‌زا عمل می‌کند و جلوتر از میسیلیوم‌های قارچی حرکت کرده و

بافت میزبان را جهت تجمع قارچ آماده می‌سازد (Mitterbauer et al., 2004). اهمیت ویژه DON، آثار بیماری‌زایی آن در انسان و حیوانات است. این مایکوتوکسین در حیوانات باعث بروز علایمی از قبیل اسهال، امتناع از خوردن غذا، آماس پوستی و در انسان نیز باعث بی‌اشتهایی، تشنج، تهوع و استفراغ، اختلالات عصبی و سیستم ایمنی می‌شود، به طوری که در کشورهای پیشرفته حداکثر مقدار قابل قبول آلودگی به DON در مورد گندم و جو (برای مصرف انسان و دام) ۲-۵ ppm است. لذا مبارزه با بیماری یا تلاش در جهت کم کردن مقدار توکسین موجود در دانه، ارزش ویژه‌ای در تولید غذای سالم در جوامع بشری دارد (Poppenberger et al., 2003).

تحقیقات نشان داده است که DON، رویش و رشد گندم را به تاخیر می‌اندازد و رشد دانه و بافت‌های کلئوپتیل را کاهش می‌دهد (Snijders and Perkowski, 1990). بر اساس مطالعات انجام گرفته، مشاهده شده است که DON با جلوگیری از بیان پروتئین‌های مقاومت در گیاه، در شدت بیماری‌زایی پاتوژن نقش دارد. شواهدی نیز دال بر وجود رابطه معنی‌دار بین تحمل سلولی فیتوتوکسین و افزایش مقاومت به بیماری در سطح مزرعه‌ای در گندم به دست آمده است (Adam and Hart, 2000). علاوه بر تشدید خاصیت بیماری‌زایی که این توکسین (DON) به قارچ عامل بیماری‌زا می‌بخشد، قارچ فوزاریوم با تولید این توکسین در شرایط تنش و کمبود مواد غذایی توانایی رقابت با سایر ارگانیسم‌ها و جانوران را ایجاد می‌کند. از آنجا که نزدیک به ۲۰ ppm از این توکسین باعث مرگ انسان و حیوان می‌شود لذا اگر جاننداری از سنبله آلوده استفاده کند دچار مسمومیت شدید می‌گردد پس منبع غذایی قارچ که همان سنبله گیاه است تنها در اختیار قارچ فوزاریوم قرار می‌گیرد و دیگر موجودات توانایی مصرف آن ماده غذایی را ندارند (Webb et al., 2010). این نکته نیز حایز اهمیت است که بدانیم میزان توکسین تولیدی توسط قارچ به میزان قارچ، غذا و زمان و شرایط مناسب در دسترس قارچ بستگی دارد و همیشه میزان مشخصی از توکسین توسط قارچ ترشح نمی‌شود (Adam and Hart, 2000).

علی رغم به کارگیری تمام روش‌های پیشگیری و گذشت بیش از یک قرن، هنوز راه حل مناسب و موثری برای مهار بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم (FHB) ارائه نشده است. هم اکنون دانشمندان با به کارگیری تکنیک‌های مهندسی ژنتیک سعی در شناخت مکانیسم‌های مولکولی مقاومت بر علیه این بیماری و توسعه ارقام مقاوم را دارند (سنجریان و همکاران، ۱۳۸۵). به طور کلی می‌توان مکانیسم‌های ایجاد مقاومت در برابر توکسین‌ها را به سه دسته تقسیم نمود:

۲- خارج کردن توکسین‌ها از محیط سلولی توسط ناقل‌های ABC^۱

۳- تغییر در جایگاه اتصال توکسین‌ها^۲

۴- سم زدایی توکسین‌ها^۳

شایان ذکر است که در این تحقیق از مکانیسم سوم در راستای ایجاد مقاومت به بیماری بلایت فوزاریومی گندم استفاده شده است و نحوه عمل این مکانیسم‌ها در ادامه به طور کامل توضیح داده شده است.

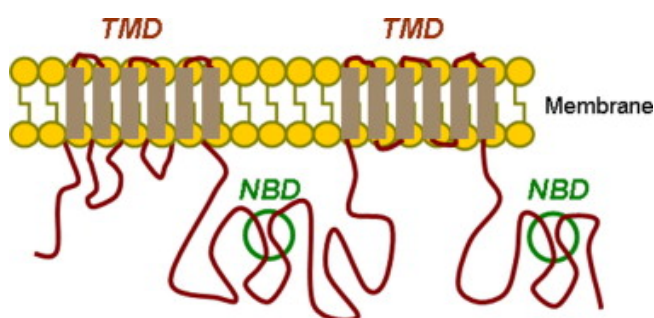
۲-۳- خارج کردن توکسین از محیط سلولی توسط ناقلین ABC

ناقلین سیتوپلاسمی یکی از خانواده‌های بزرگ پروتئینی هستند که توانایی انتقال طیف وسیعی از مواد شامل اسیدهای آمینه، یون‌ها، قندها، لیپیدها و داروها را از خلال غشا در هر دو جهت (از محیط بیرون به داخل یا برعکس) دارند. ساختمان آن‌ها از دو قسمت تشکیل شده است: قسمت اول بخش متصل شونده به نوکلئوتید (NBD)^۴ : برای تامین انرژی لازم برای انتقال فعال سوپسترا) و قسمت دوم که دارای دو بخش تراغشایی است و عبور مواد از خلال غشا را فراهم می‌کند. TMD^۵ها (دمینی از ناقل ABC است که از واحدهای α -helices تشکیل شده و در نقل و انتقال سوپسترا به داخل یا خارج سلول نقش دارد) سوپسترای

1. ATP Binding Cossette transporters
2. Modification of target site
3. Detoxification
4. Nucleotide Binding Domain
5. Trans Membrane Domain

اختصاصی داشته و جهت تسهیل انتقال نیاز به پروتئین‌های متصل به پری‌پلاسم دارند (شکل ۲-۱) (Davidson et al, 2008).

ناقل‌های ABC در محافظت از بعضی قارچ‌ها، در برابر توکسین‌هایی که خودشان تولید می‌کنند نیز نقش دارند مانند آنچه که در قارچ *Aspergillus nidulans* مشاهده شده است (Rees et al, 2009). به علاوه ژن *PDR5* مخمری نیز باعث مقاومت به مجموعه‌ای از توکسین‌های تولیدی توسط قارچ‌ها، فلزات سنگین و ترکیبات سمی سنتتیک می‌شود. مطالعات نشان داده است که ژن *PDR5* می‌تواند باعث پمپ کردن مایکوتوکسین‌ها به خارج از سلول و مقاومت مخمر به آن‌ها شود. میترباور و همکارانش (۲۰۰۰ و ۲۰۰۴) با از کار انداختن این ژن توانستند سویه‌ای از مخمر (YZRM7) را تولید کنند که حساسیت آن به ZEN ۵۰ برابر سویه وحشی است که این امر نشان از تاثیر فراوان این ژن برای ایجاد مقاومت در برابر توکسین‌ها است.



شکل ۲-۱: نمای شماتیک ناقل ABC.TMD، نواحی گذرنده از غشا و NBD نواحی متصل شونده به ATP

۲-۴- تغییر در جایگاه اتصال توکسین‌ها

همان‌گونه که گفته شد مکانیسم عمل تریکوتسین‌ها مهار سنتز پروتئین در یوکاریوت‌ها با اتصال به زیر واحد S ۶۰ ریبوزومی و مهار فعالیت پپتیدیل ترانسفراز است. L3 بزرگترین پروتئین ریبوزومی است که نقش اساسی در فعالیت پپتیدیل ترانسفراز ریبوزوم دارد (Meskauskas et al, 2005). اتصال توکسین تریکودرمین به این بخش از زیر واحد S ۶۰ ریبوزومی (RPL3) در مخمر نان باعث شد تا از فعالیت آنزیم پپتیدیل ترانسفراز و ترجمه پروتئین جلوگیری شود که محققین با ایجاد جهش‌هایی هدفمند توانستند در

مخمر نان مقاومتی نسبی به این توکسین ایجاد نمایند. (Barbacid and Vazquez, 1974; Rosado *et al*, 2007; Webb *et al*, 2010). با مقایسه توالی RPL3 طبیعی با مخمرهای جهش یافته‌ای که مقاومت نسبی به تریکودرمین نشان می‌دهند وجود ژن *TCM1* که مسئول مقاومت نسبی به تریکودرمین است به اثبات رسید. همچنین ماهیت این جهش که باعث مقاومت به تریکودرمین شده $W^{255}C$ تعیین شده است که منجر به تغییر تریپتوفان ۲۵۵ به سیستئین می‌شود. همچنین این جهش را در cDNA ژن RPL3 برنج اعمال و ژن جهش یافته را به گیاه توتون منتقل کردند که در کشت سوسپانسیون سلولی و ریزنمونه‌های برگ‌ی تفاوت قابل توجهی در سرعت رشد و توانایی تمایز یابی گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان واجد ژن طبیعی در حضور DON مشاهده نمودند (Harris and Gleddie, 2001). در مطالعه دیگری، ژن تغییر یافته RPL3 گوجه فرنگی به گیاه توتون وارد شد و مشاهده گردید که در حضور DON پروتئین تغییر یافته بیان شده و سبب ایجاد مقاومت در گیاهان توتون تراریخته می‌گردد (Mitterbauer and *et.al*, 2004). همچنین در تحقیقی که توسط صفی پور افشار و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شده جهش‌های دوگانه W258R/ H259Y که منجر به تغییر اسیدهای آمینه تریپتوفان به آرژنین و هیستیدین به تیروزین می‌شد، ایجاد شد. آزمایش نسل T₁ (تراریخته اول) گیاهچه‌های تراریخته با نوع جهش یافته RPL3 در حضور DON، سطوحی از مقاومت را در مقایسه با نوع وحشی دارای RPL3 تغییر نیافته نشان داد.

۲-۵- سم‌زدایی توکسین‌ها توسط آنزیم‌ها

تغییر در ساختمان تریکوتسین‌ها در جهت غیر فعال کردن یا کاهش سمیت، یکی از مکانیسم‌های سلول در برابر آن‌ها است (Mc Cormic *et al.*, 1999). سلول‌های دارای این توانایی ژن‌های مختلفی را برای رسیدن به این هدف دارند. برای مثال می‌توان به ژن تولید کننده آنزیم کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (*CAT*) اشاره کرد که یک گروه استیل به کلرامفنیکل اضافه کرده و باعث غیر فعال شدن آن می‌شود. میکروارگانیزم‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک، مکانیسم‌های مختلفی را برای حفاظت از خود در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط خود به کار می‌گیرند. یکی از راهکارها، متابولیسم آنتی‌بیوتیک‌ها در جهت کم کردن خاصیت سمی

آنهاست (Mc Cormick *et al.*, 1999). در فوزاریوم‌های تولید کننده مایکوتوکسین‌ها نیز آنزیم‌هایی جهت حفاظت از خود وجود دارد (Yoshizawa and Morooka, 1975) که می‌توانند برای انتقال به گندم به منظور ایجاد مقاومت مورد استفاده قرار می‌گیرند، از جمله راهکارهای سم‌زدایی، استیله کردن (Chen *et al.*, 2000) و گلیکوزیله کردن (Poppenberger *et al.*, 2003) است. انتقال یک گروه گلوکز از UDP- گلوکز به گروه ۳- هیدروکسیل DON توسط UDP- گلیکوزیل ترانسفراز *Arabidopsis thaliana* باعث کاهش سمیت توکسین در توتون‌های تراریخته با این آنزیم می‌شود. UDP- گلیکوزیل ترانسفراز بر روی مشتق استیله 15A-DON نیز اثر می‌کند و به نظر می‌رسد بتواند تمامی ساختمان‌های شبیه به نیوالنول را شناسایی و گلیکوزیله کند (Poppenberger *et al.*, 2003).

تغییر در گروه هیدروکسیل DON، باعث کمتر شدن سمیت آن می‌شود. در قارچ فوزاریوم، ژن *Tri101* یک آنزیم استیل ترانسفراز را کد می‌کند (Kimura *et al.*, 1998, Mc Cormic *et al.*, 1999) که در حفاظت از قارچ فوزاریوم در برابر توکسین‌های تولیدی خودش نقش دارد. این آنزیم استیله شدن گروه ۳-هیدروکسیل تریکوتسین‌ها را کاتالیز می‌کند و از سمیت آن‌ها می‌کاهد. DON، تحت تاثیر این آنزیم به ۳- استیل دی اکسی نیوالنول (3A-DON) تبدیل می‌شود (Kimura *et al.*, 2003). در دو مطالعه فعالیت استیل ترانسفرازی ژن *TRI101* در گیاهان گندم و جو مورد بررسی قرار گرفت (Miedaner *et al.*, 2007 and Manoharan *et al.*, 2006). آزمایشات مزرعه‌ای و گلخانه‌ای این دو آزمایش نشان دهنده تاثیر مناسب ژن *TRI101* برای ایجاد تحمل در برابر توکسین DON به دلیل اضافه کردن یک گروه استیل به ساختمان توکسین مورد نظر بود. در یک نوع واریته متحمل گندم به نام فرونتانا سم زدایی از DON توسط تغییر در ساختمان و اضافه شدن گروه استیل به جای گروه هیدروکسیل در کربن شماره ۳ گزارش شده است (Sewald *et al.*, 1992). همچنین در ذرت ژنی به نام *zhd101* وجود دارد که در کاهش خسارت ذرت زمانی که در معرض قارچ فوزاریوم و توکسین‌های آن قرار می‌گیرد نقش دارد. (Igawa *et al.*, 2006). همچنین شایان ذکر است که چون قارچ فوزاریوم به گیاهانی حمله می‌کند که اکثر آن‌ها هم به مصرف انسان و هم دام می‌رسند لذا سم- زدایی توکسین‌های خطرناک در این قارچ از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Wageha *et al.*, 2010).

۲-۶- مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم:

امروزه با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، ژن مسئول مقاومت می‌تواند از هر منبعی به گیاه زراعی انتقال داده شود که این امر باعث افزایش تعداد و گوناگونی ژن‌های مورد استفاده می‌شود. ژن‌های منتخب برای مقابله با بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم غالباً شامل ژن‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی قارچ و ژن‌های تقویت‌کننده پاسخ‌های مقاومتی میزبان می‌باشند (Kimura et al., 1998). از جمله ژن‌هایی که برای تشدید مقاومت از طریق کاهش سمیت DON مورد استفاده قرار گرفته است، ژن *Tri101* از قارچ *F. sporotrichioides* می‌باشد که محصول آن نوعی استیل ترانسفراز بوده که تریکوتسین را به ترکیباتی با سمیت کمتر تبدیل می‌کند. (Kimura et al., 1998) ژن *Tri101* به همراه ژن‌های دیگر (مانند *PDR5*، ژن کدکننده ناقل ABC) در مکانیسم افزایش تحمل به تریکوتسین‌ها نقش دارد. از لحاظ توالی بین ژن *Tri101* و سایر استیل ترانسفرازهای فوزاریومی شباهت چندانی وجود ندارد و این ژن از لحاظ اندازه و برخی از موتیف‌ها به استیل ترانسفرازهای گیاهی شبیه است (Alexander et al., 2002). استیل ترانسفرازها آنزیم‌هایی هستند که مسئول انتقال یک گروه استیل می‌باشند. استیل ترانسفرازها هم در بیوسنتز متابولیت‌های پیچیده و هم در سم‌زدایی متابولیت‌ها شرکت می‌کنند. در پروکاریوت‌ها استیل ترانسفرازها در سم‌زدایی آنتی بیوتیک‌هایی مثل کلرام فنیکول، پرومایسین و آمینوگلیکوسید دخالت دارند. سه استیل ترانسفراز *Tri3*، *Tri7* و *Tri101* در دو گونه از قارچ فوزاریوم یافت شده‌اند. این آنزیم‌ها در بیوسنتز و یا سم‌زدایی تریکوتسین‌ها که از خانواده متابولیت‌های ثانویه هستند، درگیر می‌باشند. (Nelson et al., 2013; Falasconi et al., 2005). الکساندر و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که نسخه استیله شده یک مولکول تریکوتسین در گروه هیدروکسیل کربن شماره ۳ میزان سم کمتری را در قارچ کلامیدوموناس دارد. تحقیقات نشان داد که استیله شدن موقعیت کربن شماره ۳ (C3) ایجاد ترکیباتی با میزان سمیت کمتر در مخمر می‌کند (Alexander et al., 2002). یکی از راههای تشخیص وارپته‌های متحمل در بین وارپته‌های مختلف به دست آمده از دورگ‌گیری، استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA است. پژوهش‌های مختلفی جهت شناسایی و توسعه نشانگرهای

مولکولی برای مقاومت به FHB در گندم‌های تراریخته، بر اساس ژن‌ها یا QTL‌ها صورت گرفته است. اصلی‌ترین QTL شناخته شده، 3BS است. منابع دیگری نیز برای مقاومت به FHB شناخته شده‌اند، اما تاثیر آنها کمتر از QTL 3BS است (Lemmens *et al*, 2005). نشان داده شده است که فنوتیپ متحمل به DON با QTL معروف 3BS به طور نزدیکی مرتبط است. بدین ترتیب احتمال داده شده است که این QTL آنزیم glucosyltransferase و یا آنزیمی شبیه به آن که موجب تغییر در گروه ۳- هیدروکسیل DON می‌شود را بیان و یا تنظیم می‌کند که نه تنها اهمیت تحمل به DON را در مقاومت به FHB می‌رساند بلکه احتمال وجود مکانیسم سم‌زدایی در گیاهان را نیز تقویت می‌کند. آنزیم‌های مسئول سم‌زدایی از توکسین‌های غیر تریکوتسینی فوزاریومی نیز گزارش شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به ZHD101 از *Clonostachys rosea* (یک گونه از قارچ‌ها از خانواده بیونکتریاسه^۱ از راسته آسکومیست‌ها) اشاره کرد که در سم‌زدایی از توکسین زیرالنون دخیل است (Higa *et al.*, 2003).

۷-۲- شناسایی ژن استیل ترانسفراز مخمری (*AYT1*) در مخمر *Saccharomyces cerevisiae*:

در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* ژنی به نام *AYT1* که محصول آن نوعی آنزیم استیل ترانسفراز است، شناسایی شده که به لحاظ ساختمانی و عملکردی شبیه به محصول ژن *Tri101* بوده و به نظر می‌رسد در حفاظت مخمر در برابر تریکوتسین‌ها نقش داشته باشد (Alexander *et al.*, 2002). در تحقیقی این ژن از مخمر جداسازی و به گندم هگزاپلوئید با روش بمباران ذره ای منتقل شده است (قرنجیک و همکاران، ۱۳۸۷). بر اساس نتایج این تحقیق و آنالیزهای مولکولی انجام گرفته بر روی گیاهان تراریخته نسل اول، حضور و بیان این ژن مورد تایید قرار گرفته است.

بر اساس جستجوی BLAST در بانک ژن مشاهده گردید که توالی ژن *Tri101* در *Fusarium sporotrichoides* مشابهت بالایی با توالی ژن *AYT1* در *Saccharomyces cerevisiae* دارد. با آنالیز ژن *AYT1* و اندازه گیری توانایی سلول در تبدیل تریکوتسین به ترکیبات غیر سمی، مشخص شد که ژن *AYT1*

1. Bionectriaceae

یک استیل ترانسفراز را کد می‌کند که توانایی استیله کردن موقعیت سوم تریکوتسین را دارد. مقایسه پروتئین‌ها، بین ژن *Tri101* در قارچ *Fusarium sporotrichoides* و *AYT1* در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* نشان دهنده ۴۵٪ یکنواختی^۱ و ۷۰٪ شباهت^۲ بین آن دو بود. موتیف حفظ شده HXXXD نیز در این دو استیل ترانسفراز وجود دارد که در بسیاری از استیل ترانسفرازها مانند CAT و DAT وجود دارد (-) (Alexander et al., 2002). در جدول زیر یک مقایسه بین استیل ترانسفراز مخمری و دیگر استیل ترانسفرازها صورت گرفته است (جدول ۱-۲) (Alexander et al., 2002).

جدول ۱-۲: مقایسه ژن های استیل ترانسفراز در برخی از موجودات

ژن	منبع	اندازه (bp)	تعداد اسیدهای آمینه	MW(kDa)	توالی همپوشان (HXXXDG)	توالی همپوشان (DFGWGKP)
<i>DAF</i>	گیاه	۱۳۱۷	۴۳۹	۵۰	<u>H</u> KVAD <u>G</u>	<u>D</u> FGW <u>G</u> KP
<i>AYT1</i>	مخمر	۱۴۲۲	۴۷۴	۵۴	<u>H</u> NIMDTT <u>G</u>	<u>D</u> ENL <u>G</u> L <u>G</u> KP
<i>Tri101</i>	قارچ‌ها	۱۳۷۷	۴۵۹	۵۰	<u>H</u> GAMDMT <u>G</u>	<u>D</u> FGF <u>G</u> L <u>G</u> KP
<i>Tri3</i>	قارچ‌ها	۱۵۵۱	۵۱۷	۵۸	<u>H</u> LFWD <u>G</u>	None

ژن *AYT1* مشابه استیل ترانسفراز فوزاریومی عمل کرده و DON را به 3A-DON تبدیل می‌کند که سمیت آن بسیار کمتر از DON است. مطالعات اخیر نشان داده است که بیان ژن *AYT1* موجب افزایش مقاومت به DON در توتون‌های تراریخته می‌شود (سنجریان و همکاران، ۱۳۸۵). همچنین شهبازی و همکاران (۲۰۰۹) تاثیر ژن *AYT1* و فعالیت استیل ترانسفرازی آن را برای ایجاد تحمل به سموم تولیدی توسط قارچ فوزاریوم بررسی کردند. مشاهدات این آزمایش حاکی از تحمل مناسب گیاهچه‌های تراریخته توتون به عنوان گیاه مدل در مقابل توکسین‌های تولیدی توسط قارچ عامل بیماری‌زا (*Fusarium graminearum*) بود. گزارشاتی نیز مبنی بر تشدید تحمل به DON در توتون‌های تراریخت شده با ژن *Fs Tri101* وجود دارد، اما برخی گزارشات نیز نشان دادند که لاین‌های گندم تراریخته شده با این ژن افزایش معنی‌داری در مقاومت به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم نشان نمی‌دهند که این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در جذب و

1. Identify
2. Similarity

متابولیسم DON در گیاهان مختلف و یا مقدار کم بیان این آنزیم در گیاهان تراریخته باشد که با استفاده از تشدیدکننده‌هایی سعی در غلبه بر این مشکل شده است به طوری که توانسته‌اند تولید پروتئین را در این لاین‌ها تا ۲۰ برابر افزایش دهند (Igawa T, 2006; Higa *et al*, 2003; Young JC, 2003).

از آنجایی که DON فاکتور تشدیدکننده بیماری شناخته شده است، به نظر می‌رسد بیشترین نقش ژن *AYT1* در تحمل به DON و مراحل بعد از آلودگی اولیه مشخص شود. به طور کلی، کم کردن مقدار DON از طریق سم‌زدایی آن، باعث افزایش کیفیت غلات شده و به نظر می‌رسد در مقاومت به قارچ *F. graminearum* نیز نقش بسزایی ایفا نماید.

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱- زمان و مکان انجام تحقیق

این تحقیق از بهمن ماه سال ۱۳۹۰ شروع شد و در بهمن ماه سال ۱۳۹۱ خاتمه یافت. کاشت گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود انجام گرفت.

۳-۲- شرایط کاشت بذور

در این تحقیق تعداد ۴۰ لاین گندم تراریخته (نسل دوم) حاوی ژن *AYT1* مورد مطالعه قرار گرفتند. بذور گندم مورد نظر در گلدان‌هایی با قطر ۲۵ سانتی‌متر کشت شدند. خاک گلدان‌ها از خاک موجود در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی با بافت لومی به همراه مقداری ماسه و کود دامی تامین شده است. این نکته نیز حایز اهمیت است که از هر لاین به تعداد ۴ عدد بذر در ۲ گلدان مورد کشت قرار گرفت تا تکرار پذیری کار افزایش یابد و در صورت سبز نشدن یا خراب شدن یک گلدان، گلدان دیگری را به عنوان جایگزین داشته باشیم. آبیاری گلدان‌ها در طی آزمایش هر هفته به صورت کاملاً یکنواخت و به مقدار مساوی آب برای هر گلدان استفاده می‌شد. از آنجا که گندم‌های مورد مطالعه بهاره بودند تمامی گلدان‌ها در محیط بیرون و در شرایط طبیعی قرار گرفتند (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱: گندم‌های کشت شده در گلدان‌های مورد نظر و قرار گرفتن آن‌ها در محیط بیرون

میانگین دمای شبانه روز در منطقه بسطام (۷ کیلومتری شاهرود) حدود 27 ± 2 می باشد. طول و عرض جغرافیایی محل بترتیب 54° و 58° شمالی و 36° و 25° شرقی و ارتفاع محل از سطح دریا ۱۳۴۹ متر می-

باشد. میانگین بارندگی سالیانه منطقه ۱۵۶/۵ میلی‌متر و میانگین دمای سالانه ۱۴/۴ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است.

۳-۳- نمونه‌گیری برگ

جهت انجام آنالیزهای مولکولی مورد نظر در مرحله چند برگ (۳ تا ۵ برگ) اقدام به گرفتن نمونه برگ تازه از برگهای پایینی گیاهان رشد کرده نمودیم. گیاهان جهت ادامه رشد و تولید بذر نگهداری شدند.

۳-۴- استخراج DNA از نمونه برگ

جهت استخراج DNA از گیاه از روش CTAB^۱ با اندکی تغییرات (Doyle et al., 1987) استفاده گردید که شامل مراحل زیر می‌باشد:

- ۱- ۲۰۰ میلی گرم بافت گیاهی را در ازت مایع و در داخل هاون چینی به خوبی می‌کوبیم و سپس آن را با قاشقک جمع کرده و داخل تیوب ۲ میلی‌لیتری می‌ریزیم.
- ۲- ۵۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (به عنوان یک ماده شوینده که با مولکول DNA کمپلکس تشکیل داده و آن را از موادی همچون کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها جدا می‌کند) به آن اضافه می‌نماییم.
- ۳- این مخلوط را به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم.
- ۴- این مخلوط را به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌نماییم.
- ۵- مایع رویی را برداشته و به آن به نسبت ۲۴ به ۱ کلروفرم و ایزوآمیل الکل اضافه می‌کنیم و سپس مخلوط حاصل را به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم.
- ۶- در این مرحله فاز شفاف و آبکی بالا را کشیده و به یک تیوب جدید منتقل می‌کنیم.
- ۷- به هر تیوب مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد اضافه می‌نماییم.
- ۸- تیوب‌ها را به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم.

1. Cetyltrimethyl ammonium bromide

۹- سپس تیوب‌ها را به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم و سپس آن‌ها را ۲ مرتبه با الکل ۷۰ درصد شستشو می‌دهیم.

۱۰- در این مرحله تیوب‌ها را به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم و سپس مایع رویی را حذف کرده و به مدت ۱۵ دقیقه صبر می‌کنیم تا رسوب DNA خشک گردد.

۱۱- رسوب DNA تشکیل شده را در آب مقطر استریل عاری از DNase حل می‌نماییم و تیوب‌ها را در دمای ۲۰- نگهداری می‌کنیم.

۳-۴-۱- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز جهت استخراج DNA

برای استخراج DNA نیاز به تهیه چند بافر است که روش تهیه هر کدام از آن‌ها به طور جداگانه در زیر شرح داده می‌شود.

الف - روش تهیه بافر CTAB (به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر)

۲ گرم پودر CTAB (Merck, Germany) را به همراه ۱۰ میلی لیتر تریس^۱ ۱ مولار و ۴ میلی لیتر EDTA^۲ نیم مولار و ۲۸ میلی لیتر NaCl ۵ مولار و ۱ گرم پودر PVP^۳ در ۴۰ میلی لیتر آب ۲ بار تقطیر حل می‌نماییم و سپس حجم کل را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم.

ب - طرز تهیه محلول NaCl ۵ مولار (۱۰۰ میلی‌لیتر)

۲۹/۲۲ گرم پودر NaCl (Merck, Germany) را در ۱۰۰ میلی لیتر آب ۲ بار تقطیر حل می‌نماییم.

پ - روش تهیه تریس ۱ مولار (۱۰۰ میلی‌لیتر)

۱۲/۱۱ گرم پودر تریس (CinaGen, iran) را در ۸۰ میلی لیتر آب ۲ بار تقطیر حل می‌کنیم. سپس pH را با استفاده از اسید کلریدریک به ۸ می‌رسانیم. سپس حجم کلی را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم.

1. Tris
2. Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
3. Poly Vinyl Pyrolidone

ت- روش تهیه محلول آمونیوم استات ۷/۵ مولار (۱۰۰ میلی لیتر)

۵۷/۸۱ گرم آمونیوم استات (Merck, Germany) را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل می نماییم.

ث- روش تهیه EDTA نیم مولار (۱ لیتر)

۱۸۶/۱۲ گرم پودر EDTA (CinaGen, iran) را به ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می نماییم. سپس pH

را با استفاده از قرص سدیم هیدروکسید (NaOH) به ۸ رسانده و در نهایت حجم کل را با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

جدول ۳-۱- بافر استخراج CTAB (۱۰۰ میلی لیتر)

مواد	مولاریته	مقدار مورد نیاز
NaCl	۵ مولار	۲۸ میلی لیتر
CTAB	۲ مولار	۱۵ میلی لیتر
Tris	۱ مولار	۱۰ میلی لیتر
EDTA	۰/۵ مولار	۷ میلی لیتر
H ₂ O		۴۰ میلی لیتر

۳-۴-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA

برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده گردید. تعیین کیفیت DNA استخراج شده از این جهت حایز اهمیت است که وجود شکستگی در رشته DNA را مشخص می کند همچنین میزان آلودگی در نمونه DNA استخراج شده را نیز تعیین می کند چون وجود آلودگی در نمونه استخراج شده باعث ایجاد خطا در کارهای مولکولی می شود. لذا تعیین کیفیت از اهمیت بالایی برخوردار است. در روش اسپکتروفتومتری از رقت ۱ به ۱۰۰ نمونه DNA در آب مقطر و

دستگاه اسپکتروفتومتر مدل ۶۱۰۵ (S 2000 UV/Vis) استفاده شد. مقدار اشعه ماوراء بنفش جذب شده توسط یک محلول با مقدار DNA موجود در نمونه نسبت مستقیم دارد. نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، خلوص DNA را نشان می‌دهد. این نسبت باید بین ۱/۸ تا ۲ باشد. اگر نسبت کوچک‌تر از ۱/۸ باشد، آلودگی DNA را با پروتئین یا فنل را نشان می‌دهد و نسبت بزرگ‌تر از ۲ به دلیل وجود آلودگی RNA در نمونه می‌باشد.

$$\text{فرمول (۱-۳)} \quad \text{ضریب رقت} / \text{OD } 260 \times 50 = \text{غلظت DNA}$$

در روش دوم برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده، پنج میکروگرم از نمونه‌های DNA همراه با نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰bp بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با استفاده از رنگ DNA safe stain (CinaGen, iran) صورت گرفت. پس از رنگ‌آمیزی، با استفاده از دستگاه عکس برداری ژل، (DNA Quantum st4 Vilber lourmat, Germany) مورد نظر از نظر عدم شکستگی بررسی شد.

۳-۴-۳- واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Takara, japan)

طول ژن *AYT1* مورد نظر در این تحقیق دارای ۱۴۰۰ جفت باز می‌باشد. برای طراحی آغازگر^۱ برای ژن *AYT1* در این تحقیق ابتدا توالی ژن *AYT1* مخمری با شماره دسترسی Z73168Y13138 از بانک ژن (-) سایت NCBI دریافت و سپس با استفاده از دو نرم افزار Primer 3 و Oligo analyzer اقدام به طراحی پرایمر نمودیم. پس از طراحی پرایمر سفارش آن به شرکت سینا کلون، ایران (تحت نظر Vivantis company, Indonesia) داده شد. توالی و مشخصات دو جفت آغازگر رفت و برگشت طراحی شده در جدول ۲-۳ نشان داده شده است. جفت پرایمر اول که از ابتدا و انتهای ژن *AYT1* طراحی شده است کل ژن را با اندازه ۱/۴ کیلو باز تکثیر می‌نماید و جفت پرایمر دوم که از بخش داخلی ژن^۲ طراحی گردیده است بخشی از ژن را با اندازه نزدیک به ۳۰۵ جفت باز تکثیر خواهد نمود.

1. Primer
2. internal primer

جدول ۳-۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای ژن *AYT1*

نوع آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)
<i>AYT1</i> Fw1	5' – ATCGAATTCGAAGGTAGATGGATGTTTAGAG-3'	۶۳
<i>AYT1</i> Re2	5' –TAGTCGACATATCATCATCCTATATGTGTAG- 3'	۶۱
<i>AYT1</i> -f6	5'- TTGCATCACAGATTCGCAGG- 3'	۵۷
<i>AYT1</i> - r6	5'- AAGGCAAAGAGCAACCACCA- 3'	۵۷

۳-۴-۱- مواد تشکیل دهنده واکنش PCR (برای حجم ۲۰ میکرولیتر)

جدول ۳-۳- غلظت مواد استفاده شده در واکنش PCR

نام ماده	حجم ماده
10X PCR Buffer	2μl
MgCl ₂ (50mM)	0.8μl
dNTP (10mM)	0.5μl
Forward Primer	1μl
Reverse Primer	1μl
DNA الگو	1μl
Taq DNA Polymerase	0.5μl
ddH ₂ O	13.2μl

۳-۴-۲- پروفایل دمایی مورد استفاده برای واکنش PCR

الف- پروفایل دمایی مورد استفاده برای تکثیر قطعه ۳۰۵ جفت بازی

جدول ۳-۴- برنامه زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به پرایمر *AYT1*f6/r6

زمان (ثانیه)	دما (°C)	مرحله واکنش	مرحله
۳۰۰	۹۴	واسرشت‌سازی اولیه	مرحله اول
۴۵	۹۴	واسرشت‌سازی	
۳۰	۵۵	اتصال	مرحله دوم (۳۵ سیکل)
۳۵	۷۲	بسط	
۶۰۰	۷۲	بسط نهایی	مرحله سوم

ب- پروفایل دمایی مورد استفاده برای تکثیر قطعه ۱/۴ کیلو باز

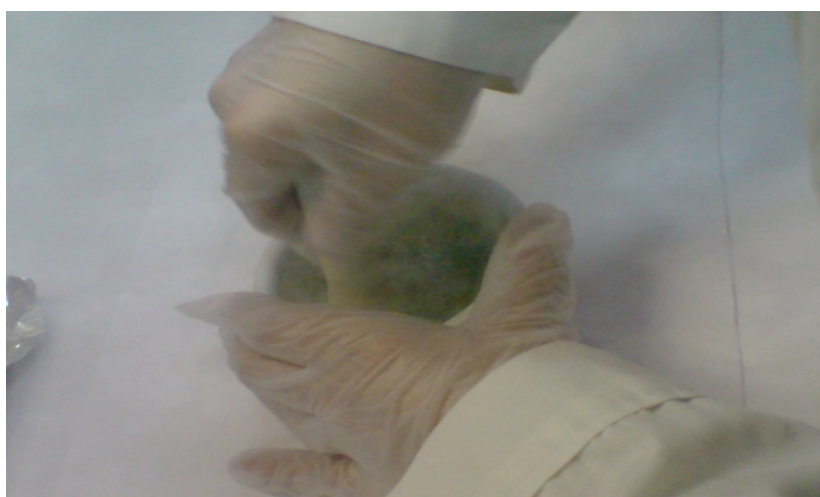
جدول ۳-۵- برنامه زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مربوط به پرایمر AYT1Fw1/Re2

زمان (ثانیه)	دما ($^{\circ}\text{C}$)	مرحله واکنش	مرحله
۳۰۰	۹۴	واسرشت‌سازی اولیه	مرحله اول
۴۵	۹۴	واسرشت‌سازی	
۳۰	۶۱	اتصال	مرحله دوم (۳۵ سیکل)
۹۰	۷۲	بسط	
۶۰۰	۷۲	بسط نهایی	مرحله سوم

۳-۵- استخراج RNA

در این پژوهش از کیت استخراج RNA (CinaGen, iran) برای استخراج RNA استفاده شد. استخراج بر طبق دستورالعمل شرکت CinaGen صورت پذیرفت که مراحل آن به شرح زیر می باشد:

- ۱- ۲۵ تا ۵۰ میلی گرم بافت تازه برگ را در حضور ازت مایع به خوبی می کوبیم سپس آن را در یک میکروتیوب ۲ میلی لیتری ریخته و به آن ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده^۱ اضافه می نماییم.



شکل ۳-۲- مرحله کوبیدن نمونه‌های گرفته شده در ازت مایع در آزمایشگاه

1. Lysis solution

۲- ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده^۱ به میکروتیوب اضافه کرده و آن را چندین بار مخلوط می-نماییم.

۳- مایع فوق را با سمپلر کشیده و آن را به درون ستون کیت اضافه می-نماییم.

۴- ستون را داخل یک میکروتیوب گذاشته و آن را به مدت ۱ دقیقه با تعداد دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می-نماییم.

۵- ستون را داخل یک میکروتیوب جدید قرار داده و به آن به میزان ۴۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی اول اضافه می-نماییم. سپس آن را در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می-نماییم.

۶- ستون را با بافر شستشوی دوم به میزان ۴۰۰ میکرولیتر شستشو می-دهیم و عمل سانتریفیوژ را با سرعت و زمان قبل انجام می-دهیم.

۷- مجدداً عمل شستشو با بافر شماره ۲ و انجام سانتریفیوژ را تکرار می-نماییم.

۸- ستون را در یک میکروتیوب جدید قرار داده و آن را به میزان ۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می-نماییم.

۹- ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل عاری از RNase را به مرکز ستون اضافه کرده و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می-نماییم.

۱۰- محلول حاصل که حاوی RNA می-باشد را پس از اندازه‌گیری کمیت و کیفیت آن در دمای 8°C - نگهداری می-کنیم.

۳-۵-۱- تعیین کمیت و کیفیت RNA

برای تعیین کمیت و کیفیت RNA از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده گردید. در روش اسپکتروفتومتری از رقت ۱ به ۱۰۰ نمونه RNA در آب مقطر و دستگاه اسپکتروفتومتر مدل 6105 (S 2000 UV/Vis) استفاده شد. غلظت و کیفیت آن مورد بررسی قرار گرفت. نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰، نیز خلوص RNA را نشان می-دهد. این نسبت باید حدود ۲ باشد.

1. Precipitation Solution

در روش دوم برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، پنج میکروگرم از نمونه‌های RNA همراه با نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰bp بر روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با استفاده از رنگ DNA safe stain صورت گرفت. پس از رنگ‌آمیزی، با استفاده از دستگاه عکس برداری ژل RNA استخراج شده از نظر عدم شکستگی بررسی شد.

۳-۵-۲- تیمار با DNaseI برای حذف آلودگی DNA

جهت از بین بردن DNA ژنومی در نمونه RNA از آنزیم DNaseI (Fermentase, MBI, Lithuania) استفاده گردید. که مراحل آن به شرح زیر است:

ابتدا کمیت هر نمونه RNA اندازه گیری می‌شود و به ازای هر یک میکروگرم RNA استخراج شده یک واحد از آنزیم DNaseI را به نمونه RNA اضافه می‌نماییم. سپس آن را به مدت ۳۰ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می‌دهیم. سپس برای غیر فعال شدن آنزیم آن را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده و در نهایت در فریزر ۸۰- نگهداری می‌شود.

۳-۶- ساخت cDNA

برای ساخت cDNA از کیت سنتز cDNA (Vivantis, Indonesia) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد که مراحل آن به شرح زیر می‌باشد:

جهت سنتز اولین رشته cDNA، به نمونه‌های RNA (پنج میکرولیتر) مقدار یک میکرولیتر آغازگر oligodT₁₈، یک میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی‌مولار dNTP و سه میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز افزوده شد تا به حجم ۱۰ میکرولیتر برسد. سپس به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس دو میکرولیتر بافر ساخت 10x cDNA و ۱۰۰ واحد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس^۱ افزوده شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و مخلوط واکنش به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در این مرحله سنتز اولین رشته cDNA^۲ خاتمه می‌پذیرد.

1. Reverse Transcriptase
2. Complementary DNA

۳-۶-۱- واکنش RT-PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر

در این واکنش نیز دقیقاً شبیه به واکنش PCR اقدام نمودیم. تنها تفاوت این واکنش با واکنش PCR در این است که بجای آنکه از DNA ژنومی استفاده کنیم از cDNA سنتز شده بهره می‌بریم و چون از روی رشته RNA اقدام به سنتز cDNA نمودیم پس نیاز به آنزیم نسخه‌برداری معکوس می‌باشد. طول قطعه تکثیری در این واکنش برای ژن *AYT1* ۱۴۰۰ جفت باز می‌باشد. البته از آغازگرهای داخلی نیز برای تکثیر قطعه‌ای کوتاه از ژن مورد مطالعه به اندازه ۳۰۵ جفت باز اقدام نمودیم. در این واکنش از همان پرایمرهای طراحی شده برای واکنش PCR استفاده شد.

۳-۶-۱-۱- مواد تشکیل دهنده واکنش RT-PCR (حجم ۲۰ میکرولیتر)

جدول ۳-۶- غلظت مواد استفاده شده در واکنش RT-PCR به همراه حجم

نام ماده	حجم ماده (μl)
10X PCR Buffer	2μl
MgCl ₂ (50mM)	0.8μl
dNTP (10mM)	0.5μl
Forward Primer	1μl
Reverse Primer	1μl
cDNA سنتز شده	1μl
Taq DNA Polymerase	0.5μl
ddH ₂ O	13.2μl

۳-۶-۱-۲- پروفایل دمایی مورد استفاده در واکنش RT-PCR (تکثیر قطعه ۳۰۵ جفت بازی)

جدول ۳-۷- برنامه زمانی واکنش RT-PCR مربوط به پرایمر *AYT1f6/r6*

زمان (ثانیه)	دما (°C)	مرحله واکنش	مرحله
۳۰۰	۹۴	واسرشت‌سازی اولیه	مرحله اول
۴۵	۹۴	واسرشت‌سازی	
۳۰	۵۵	اتصال	مرحله دوم (۳۵ سیکل)
۳۵	۷۲	بسط	
۶۰۰	۷۲	بسط نهایی	مرحله سوم

۳-۱-۶-۳ طراحی آغازگر برای ژن 18srRNA به عنوان کنترل مثبت در واکنش RT-PCR

از آنجا که RNA استخراج شده از لاین‌های مختلف از کیفیت یکسانی برخوردار نیست لذا باید آن را نسبت به یک ژن، که میزان بیان آن در تمامی بافت‌ها و سلول‌ها یکسان است استاندارد نمود تا از میزان کیفیت RNA استخراج شده مطمئن شویم. در این تحقیق از ژن 18srRNA استفاده شد. لذا توالی ژن 18srRNA را از بانک ژن دریافت و سپس با استفاده از دو نرم افزار Primer 3 و Oligo analyzer اقدام به طراحی آغازگر نمودیم. پس از طراحی آغازگر سفارش آن به شرکت فزاپژوه، ایران داده شد و این شرکت آغازگرهای سفارش داده شده را به صورت خشک شده^۱ ارسال نمود. پس از رقیق سازی آغازگر و ساختن محلول کاری^۲ آغازگرها آماده برای استفاده در واکنش RT-PCR می‌باشند. این آغازگر قطعه‌ای به طول ۶۰۰ جفت باز را تکثیر می‌نماید. توالی آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده برای ژن 18srRNA به شرح زیر است:

جدول ۳-۸- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای ژن 18srRNA

نوع آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)
18sfw	5' – CTTCTGGGATCGGAGTAATGATTAA- 3'	۵۹
18sRe	5' – GCCGAGAACATCTAAGGGCATCACAGA- 3'	۵۹

۳-۷- آنالیز دورگه‌سازی سادرین بلات^۳

به منظور تعیین تعداد نسخ ژنی وارد شده به گیاهان تراریخته مورد بررسی، از تکنیک هیبریداسیون سادرین بلات استفاده گردید.

۳-۷-۱- ساخت کاوشگر^۵

جهت ساخت کاوشگر برای ژن مورد نظر (AYT1)، از روش PCR به همراه Dig-dUTP (Roche, USA)

استفاده شد. مواد موجود در هر واکنش PCR به شرح زیر می باشد:

1. Lyophilized
2. Work Solution
3. Southern Blot Analysis
4. Copy Number
5. Probe

جدول ۳-۹- مواد مورد نیاز برای ساخت پروب توسط PCR

نام ماده	حجم ماده
10X PCR Buffer	2µl
MgCl ₂ (50mM)	0.8µl
Dig-dUTP	0.5µl
Forward Primer	1µl
Reverse Primer	1µl
Plasmid	1µl
Taq DNA Polymerase	0.5µl
ddH ₂ O	13.2µl

۳-۷-۲- هضم DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخته

برای انجام این کار از آنزیم *HindIII* (Fermentase) استفاده گردید. در این بخش سه لاین گندم تراریخته (GA75، GA400 و GA207) مورد آنالیز قرار گرفته است. بدین منظور ابتدا غلظت DNA مورد نظر با استفاده از اسپکتروفتومتر محاسبه گردید و سپس حدود ۳۰ میکروگرم از DNA ژنومی برای کار استفاده شد. حجم و مواد مورد نیاز برای هر واکنش هضم^۱ به شرح زیر می باشد:

جدول ۳-۱۰- مواد مورد نیاز برای انجام واکنش هضم آنزیمی

نام ماده	حجم ماده
۳۰ میکروگرم	DNA ژنومی
۰/۵ واحد / ۱ میکروگرم	آنزیم <i>HindIII</i>
۰/۱ حجم کل	بافر آنزیم
مقداری که حجم کل را به ۲۰۰ میکرولیتر برساند	آب دو بار تقطیر

حال هر واکنش را ابتدا ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم سپس دوباره به ازای هر یک میکروگرم DNA ۰/۵ واحد آنزیم اضافه می کنیم و یک شبانه روز آن را در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم.

1. Digest Reaction
2. Overnight

۳-۷-۳- رسوب دهی^۱ DNA هضم شده

مواد مورد نیاز برای انجام رسوب دهی به شرح زیر می باشد:

جدول ۳-۱۱- مواد مورد نیاز جهت رسوب DNA استخراج شده

نام ماده	حجم ماده
سدیم استات ۳ مولار	۰/۱ حجم کل
اتانول ۱۰۰ درصد	۲/۵ برابر حجم کل

سپس مخلوط حاصل را یک شبانه روز در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار می دهیم. سپس در روز بعد آن را ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ می نماییم سپس مایع رویی دور ریخته می شود و رسوب تشکیل شده را در آب استریل حل می نماییم.

۳-۷-۴- الکتروفورز محصول هضم آنزیمی DNA ژنومی

نمونه DNA هضم شده را بر روی ژل الکتروفورز ۰/۸ درصد بارگذاری می کنیم. پس از اتمام الکتروفورز، ژل را با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی کرده تا از صحت هضم مطمئن شویم. سپس ژل را ۱۵ دقیقه در اسیدکلریدریک (HCl) ۰/۲۵ مولار قرار می دهیم سپس آن را دو مرتبه با آب مقطر استریل می شویم. در مرحله بعد ژل را در محلول خنثی سازی به مدت ۱۵ دقیقه قرار می دهیم و سپس آن را با آب مقطر شستشو می دهیم.

جدول ۳-۱۲- مواد استفاده شده در بافر خنثی سازی

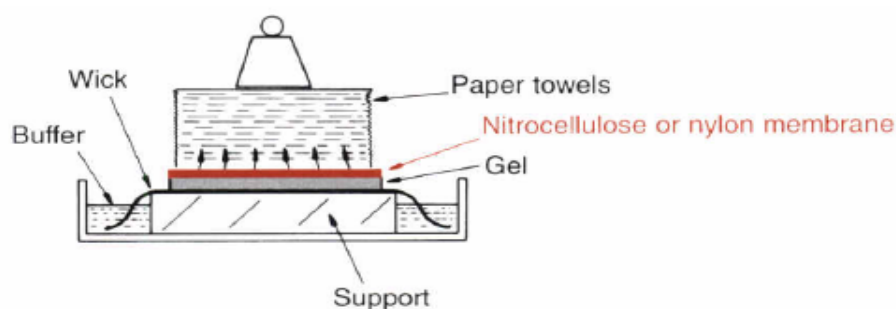
نام ماده	حجم ماده (مولار)
Tris	۱
NaCl	۰/۵

۳-۷-۵- انتقال نمونه DNA به غشا

برای انجام این کار ژل را در بافر 20XSSC و روی کاغذ واتمن قرار می‌دهیم سپس غشای نیتروسلولزی را به اندازه ژل بریده و روی ژل قرار می‌دهیم. سپس بر روی غشا دولایه کاغذ واتمن قرار داده و روی آن تعدادی دستمال کاغذی قرار می‌دهیم تا عمل انتقال به خوبی صورت گیرد. مدت زمان انتقال یک شب می‌باشد.

جدول ۳-۱۳- مواد مورد نیاز برای تهیه بافر SSC (برای حجم ۱ لیتر)

نام ماده	حجم ماده (گرم)
Na-citrate	۸۸/۲
NaCl	۱۷۵/۳



شکل ۳-۳- نحوه انتقال DNA به غشا

روز بعد غشا را داخل لوله هیبریداسیون قرار داده و روی آن بافر پیش هیبریداسیون به همراه پروب ریخته و آن را یک شبانه روز در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد داخل آون هیبریداسیون قرار می‌دهیم.

۳-۷-۶- آشکارسازی غشا

برای انجام این کار، غشا را یک ساعت در محلول بلوکه کننده قرار می‌دهیم و آن را یک ساعت در معرض آنتی بادی (Anti-Digoxigenin-AP, Roche) انکوبه می‌نماییم. سپس غشا را ۵ دقیقه در ۲۰ میلی لیتر بافر تشخیص قرار می‌دهیم و در نهایت آن را با استفاده از محلول سوبسترای رنگ موجود در کیت سادرین بلات رنگ آمیزی می‌نماییم

جدول ۳-۱۴ - مواد مورد نیاز برای تهیه محلول بلوکه کننده

نام ماده	حجم ماده (گرم)
پودر بلاک کننده	۱
مالٹیک اسید	۵

جدول ۳-۱۵ - مواد مورد نیاز برای تهیه بافر تشخیص

نام ماده	حجم ماده (مولار)
Tris	۰/۱
NaCl	۰/۱

۳-۸ - آنالیز TLC^۱

آنالیزهای PCR و RT-PCR تنها حضور و بیان ژن انتقال یافته را به اثبات می رسانند. ژن *AYT1* آنزیم استیل ترانسفراز را کد می کند و فعال بودن محصول ژن انتقال یافته، برای بروز مقاومت به توکسین DON ضروری می باشد. برای بررسی فعالیت محصول ژن انتقال یافته سنجش فعالیت آنزیمی لازم است. در این تحقیق بررسی فعالیت استیل ترانسفراز پروتئین نو ترکیب *AYT1* بر اساس روش TLC و طبق روش استفاده شده توسط اهاستو و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. مراحل انجام کار به شرح زیر می باشد:

۳-۸-۱ - استخراج پروتئین

استخراج پروتئین به روش زیر انجام شد:

۱- حدود یک گرم بافت تازه برگي پس از انجماد در نیتروژن مایع کاملاً پودر شد.

1. Thin Layer Chromatography

۲- ۵۰۰ μ l بافر استخراج (جدول ۳-۱۶) به آن اضافه و کاملاً ورتکس شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد.

جدول ۳-۱۶- ترکیب بافر استخراج پروتئین

ترکیبات	حجم (M)
Tris-HCl	1M (pH=8)
PVP	1 %
Glycerol	70 %
ddW	362 μ l

۳- مخلوط حاصل در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به ویال جدید منتقل و در دمای ۲۰°C - نگهداری گردید.

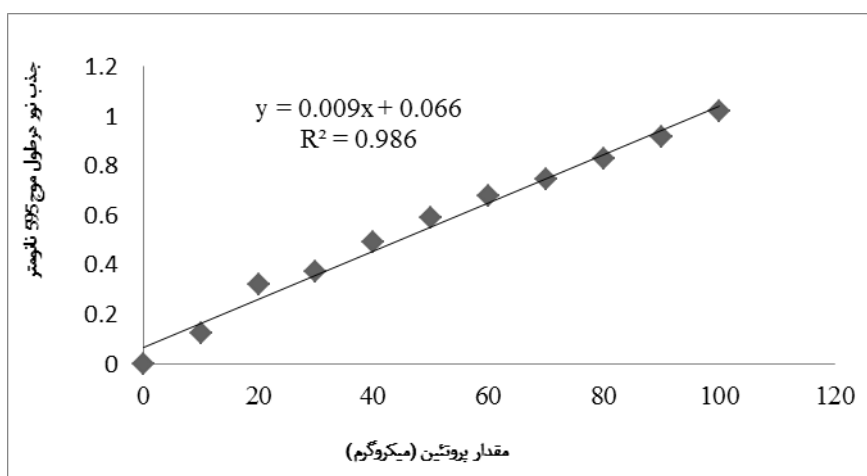
۳-۸-۲- اندازه گیری میزان پروتئین کل و رسم نمودار استاندارد پروتئین

در این تحقیق اندازه گیری پروتئین های محلول طبق روش براد فورد (۱۹۷۶) انجام گرفت. بدین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی با ۵ میلی لیتر معرف براد فورد در یک لوله آزمایش با هم مخلوط شده و محلول حاصل ورتکس شد. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شدند و سپس جذب نور آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (S 2000 UV/Vis) خوانده شد. مقدار پروتئین محلول نمونه ها با استفاده از مقادیر جذب نور مربوط به هر نمونه و نمودار استاندارد آلبومین محاسبه گردید. جهت رسم نمودار استاندارد پروتئین از محلول سرم آلبومین با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد. طبق جدول ۲-۱ مقادیر ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به لوله های آزمایش منتقل شده و حجم هر یک از نمونه ها با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانیده شد. در مرحله بعد ۵ میلی لیتر معرف برادفورد به هر یک از لوله های آزمایش اضافه شده و محلول های حاصل ورتکس شدند. بعد از مدت ۱۵ دقیقه مقدار جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه

اسپکتروفتومتر خوانده شد. نمودار استاندارد پروتئین براساس غلظت آلبومین و مقادیر جذب هر یک از آنها رسم گردید (جدول ۳-۱۷).

جدول ۳-۱۷- مقادیر مواد و محلول‌های مورد نیاز در رسم نمودار استاندارد آلبومین به روش برادفورد (۱۹۷۶)

شماره لوله آزمایش	مقدار محلول آلبومین (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	معرف براد فورد (میلی لیتر)	جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر
شاهد	۰	۱۰۰	۵	۰
۱	۱۰	۹۰	۵	۰/۱۲۵
۲	۲۰	۸۰	۵	۰/۳۲۱
۳	۳۰	۷۰	۵	۰/۳۷۲
۴	۴۰	۶۰	۵	۰/۴۹۳
۵	۵۰	۵۰	۵	۰/۵۹
۶	۶۰	۴۰	۵	۰/۶۷۷
۷	۷۰	۳۰	۵	۰/۷۴۷
۸	۸۰	۲۰	۵	۰/۸۲۸
۹	۹۰	۱۰	۵	۰/۹۱۵
۱۰	۱۰۰	۰	۵	۱/۰۲



شکل ۳-۴- نمودار استاندارد پروتئین به روش براد فورد (۱۹۷۶).

۳-۸-۳- سنجش فعالیت آنزیمی تراژن *AYT1* با استفاده از TLC

طبق روش اهاستو و همکاران (۲۰۰۷) ابتدا از ۲۵ عدد نمونه برگ گیاهان تراریختی که در آنالیزهای مولکولی تراریختی آنها اثبات شده بود، پروتئین استخراج شد. از برگ گیاه غیر تراریخته نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. میزان $100\mu\text{g}$ از پروتئین کل استخراج شده با $40\mu\text{g}$ DON مخلوط گردید و حجم

نهایی واکنش با Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 به $250\ \mu\text{l}$ رسانیده شد. ویالهای حاوی مخلوط فوق در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند تا آنزیم در دما و زمان مورد نیاز، استیلایسیون را بر روی سوبسترا (DON) به انجام برساند. سپس $250\ \mu\text{l}$ اتیل استات ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) به مخلوط اضافه شده و پس از سانتریفیوژ کردن در 5000 دور در ۵ دقیقه، روشناور برای لکه گذاری بر روی کاغذ TLC (۲۰×۲۰ cm Riedel-de Haen, Ca. No. 37364) برداشته شد. لکه گذاری در دو سانتی متر بالاتر از انتهای کاغذ انجام شد و انتهای آن در درون فاز متحرک کروماتوگرافی (شامل مخلوط ۱ به ۳ اتیل استات/تولون) قرار داده شد. پس از ۲۰ تا ۳۰ دقیقه فاز متحرک در طول فاز ثابت (کاغذ TLC) حرکت کرده و سپس کاغذ TLC در دمای اتاق خشک شد. آشکارسازی با مخلوط اتانول و اسید سولفوریک به نسبت ۱:۹ انجام شد.

۳-۹- بررسی میزان جوانه زنی بذور و ارتفاع گیاهچه در گیاهان نسل دوم گندم تراریخته در

حضور توکسین DON

برای تایید وراثت پذیری تراژن *AYT1* در لاینهای تراریختی که با آنالیزهای مولکولی بیان ژن مذکور در آن‌ها به اثبات رسیده است، میزان جوانه زنی بذور و ارتفاع گیاهچه در گیاهان نسل دوم گندم تراریخته در محیط حاوی توکسین DON مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، بذور گیاهان تراریخته در محیط MS $1/2$ حاوی $10\ \text{ppm}$ توکسین DON درون شیشه‌های مناسب کشت داده شدند و سپس به مدت یک هفته در شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی قرار گرفتند. همچنین بذور گیاهان غیرتراریخته نیز به عنوان کنترل منفی (شاهد) در محیط واجد توکسین کشت شدند و در همان شرایط گیاهان تراریخته قرار گرفتند. بعد از 10 روز میزان جوانه زنی بذور و ارتفاع گیاهچه در هر لاین به همراه گیاهان شاهد به صورت درصد مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۱۰- تهیه تیمار سوسپانسیون قارچ *Fusarium graminearum* و ایجاد آلودگی در سنبله

با توجه به اینکه دوره آسیب‌پذیری گندم به بیماری فوزاریومی سنبله در طول مرحله به سنبله رفتن است،

لذا جهت بررسی فعالیت ژن *AYT1* جهت ایجاد تحمل به این بیماری سنبله گندم‌های تراریخته با اسپورهای این قارچ تلقیح شدند.

۳-۱۰-۱- تهیه سوسپانسیون اسپور فوزاریوم

برای تهیه سوسپانسیون، اسپور فوزاریوم جدایه قارچ *F. graminearum* از مرکز اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شد. قارچ مورد نظر روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA)^۱ کشت گردید و درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از حدود یک هفته فوزاریوم کل سطح محیط کشت را پوشاند.

۵۰ گرم دانه برنج سفید با ۲۵ میلی لیتر آب مقطر درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری خیسانده شد و به میزان یک گرم ساکارز به آن اضافه گردید. درب ارلن‌ها با استفاده از پنبه و فویل آلومینیومی پوشانده شد و ارلن‌ها دو بار به فاصله ۲۴ ساعت به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر قرار داده شدند. پس از اتوکلاو، ارلن‌ها به زیر هود لامینارفلو منتقل شدند. پتری‌دیش حاوی قارچ فوزاریوم هم به زیر هود منتقل شد. پس از اینکه دمای ارلن‌ها به دمای معمولی اتاق رسید، درب پتری‌دیش با احتیاط در زیر هود باز شد و محیط کشت درون پتری‌دیش با استفاده از تیغ جراحی استریل خرد و به اندازه یک سانتی‌متر مربع از محیط به هر یک از ارلن‌ها منتقل شد. درب ارلن‌ها با پنبه پوشانده شد و ارلن‌ها به مدت ۹۶ ساعت روی انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از ۹۶ ساعت محیط درون ارلن‌ها در زیر هود با استفاده از پارچه ململ استریل صاف شد. از محیط صاف شده که به صورت یک سوسپانسیون به رنگ قهوه‌ای تیره بود نمونه‌گیری شد و با استفاده از لام هموسیتومتر غلظت سوسپانسیون بر حسب تعداد ماکروکنیدی‌ها در میلی‌لیتر تعیین شد. سوسپانسیون مورد نظر را می‌توان حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری کرد. با وجود این در این آزمایش، از سوسپانسیون تازه قارچ استفاده شد و از غلظت 1×10^5 اسپور برای تلقیح روی سنبله استفاده شد.

1. Potato Dextrose Agar

۳-۱۰-۲- تلقیح مصنوعی سنبله‌های گندم تراریخته حاوی ژن *AYT1* توسط اسپور

در این بررسی تلقیح با سوسپانسیون اسپور قارچ *F.graminearum* در مرحله سنبله‌دهی و با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر انجام گرفت. به این صورت که $20 \mu l$ مایع تلقیح توسط میکروپیپت در هر سنبله توسط گلچه میانی تزریق گردید. این عمل در ۱۵ عدد سنبله‌ای که واکنش TLC در آن‌ها جواب مثبت داده بود، صورت گرفت. پس از تلقیح سنبله با عصاره قارچ جهت مهیا کردن شرایط رطوبتی مناسب برای گسترش بیماری، سنبله‌ها هر ۲ تا ۳ ساعت یک بار به مدت ۲۴ ساعت توسط اسپری دستی آبپاشی شدند. در این آزمایش از گندم فاقد ژن *AYT1* نیز به عنوان کنترل استفاده شد.



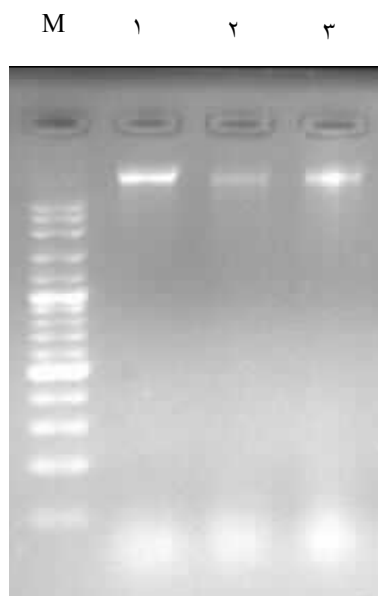
شکل ۳-۵- تهیه سوسپانسیون فوزاریوم: الف- کشت اسپور قارچ روی محیط کشت PDA ب- انتقال قارچ رشد کرده روی محیط کشت PDA به محیط حاوی برنج برای عصاره گیری

نتیجہ و بحث

در این فصل نتایج به دست آمده از آنالیزهای مولکولی جهت بررسی حضور ژن استیل ترانسفراز مخمری در لاین‌های نسل دوم گندم تراریخته نسل دوم گندم تراریخته تشریح خواهد شد. در ابتدا به نتایج آنالیز PCR و RT-PCR انجام شده در این تحقیق اشاره می‌شود. نتایج به دست آمده از این دو آنالیز نشان دهنده حضور و بیان مناسب ژن *AYT1* در لاین‌های نسل دوم گندم تراریخته است. در ادامه به نتایج آنالیز دورگه‌سازی سادرن اشاره می‌شود و در مرحله بعد به بررسی نتایج به دست آمده از آنالیز TLC جهت تعیین میزان فعالیت پروتئین تولیدی توسط ژن استیل ترانسفراز مخمری خواهیم پرداخت. با توجه به نتایج مربوط به آنالیزهای مولکولی، اقدام به انجام آزمون زیستی در لاین‌های تایید شده با آنالیزهای مولکولی نمودیم. لذا ابتدا به نتایج حاصل از میزان قدرت جوانه زنی و ارتفاع گیاهچه گندم در حضور توکسین DON اشاره می‌شود و در انتها به نتایج حاصل از تیمار سنبله با توکسین DON و عصاره استحصالی از قارچ فوزاریوم نیز اشاره می‌گردد.

۴-۱- تعیین کیفیت DNA

کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از دستگاه الکتروفورز و بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شدند تا هیچ گونه شکستگی در آنها وجود نداشته باشد. شکل زیر الگوی الکتروفورزی DNA استخراج شده برای سه نمونه از لاین های تراریخته را نشان می دهد (شکل ۴-۱).

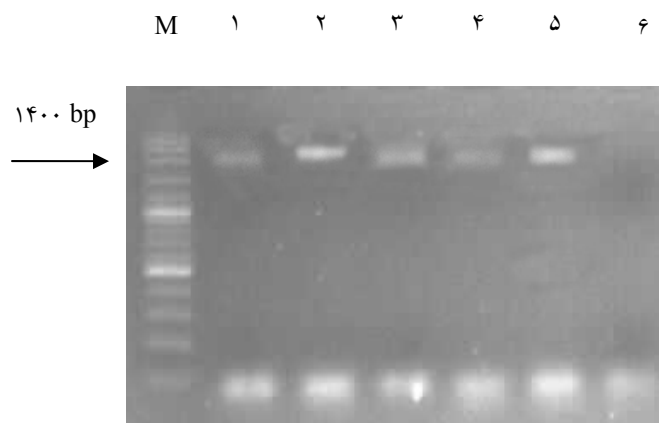


شکل ۴-۱- تعیین کیفیت DNA استخراج شده برای آنالیزهای مولکولی

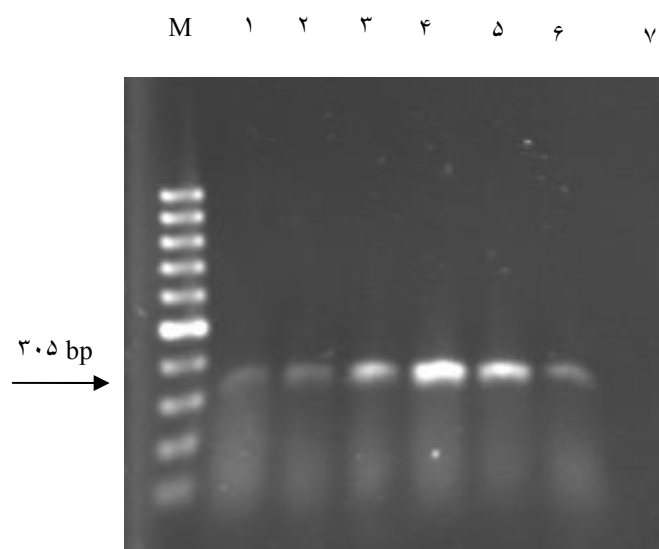
M : نشانگر اندازه (viavantis) 100bp ladder ، ۱ : لاین 75 GA ، ۲ : لاین 400 GA ، ۳ : لاین 207 GA

۴-۲- واکنش PCR

از DNA استخراج شده از گیاهان به کمک آغازگرهای اختصاصی *AYT1-Fw1* و *AYT1-Re2* با روشی که در بخش ۳-۴-۳ اشاره شد، PCR انجام پذیرفت و قطعه ای معادل ۱/۴Kb در ۳۷ لاین مشاهده شد که ورود ژن *AYT1* در آنها را اثبات می نماید (شکل ۴-۲). همچنین از آغازگرهای داخلی *AYT1-f6* و *AYT1-r6* نیز جهت اطمینان از کار خود استفاده گردید. این آغازگرها باعث تکثیر قطعه ای معادل ۳۰۵ جفت باز می گردند (شکل ۴-۳). نتایج مربوط به این PCR نیز نشان دهنده حضور ژن *AYT1* در ۳۷ لاین از ۴۰ لاین کشت شده بود.



شکل ۴-۲- الکتروفورز محصولات PCR برای تایید تراریختی گیاه گندم با استفاده از پرایمرهای *AYT1-Re2* و *AYT1-Fw1*
M : نشانگر اندازه 100bp ladder، ۱ : لاین GA30، ۲ : لاین GA76، ۳ : لاین GA19، ۴ : لاین GA171، ۵ : لاین GA15،
۶: کنترل منفی با گندم غیرتراریخته



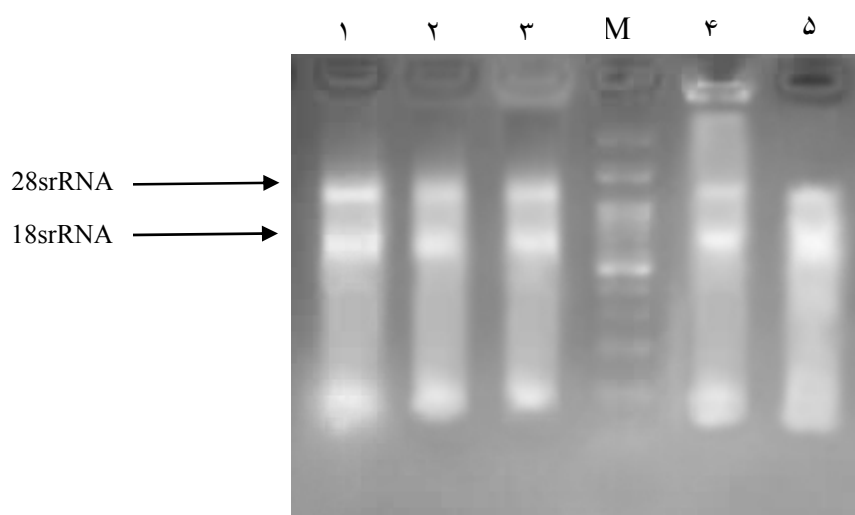
شکل ۴-۳- الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای داخلی
M : نشانگر اندازه 100 bp ladder، ۱ : لاین GA75، ۲ : لاین GA283، ۳ : لاین GA444، ۴ : لاین GA158، ۵ : لاین
GA60، ۶ : لاین GA42، ۷: کنترل منفی با گندم غیرتراریخته

جدول ۴-۱: اسامی لاین‌هایی که حضور ژن *AYT1* در آن‌ها توسط آنالیز PCR مورد تایید قرار گرفته است

GA15	GA60	GA158	GA100
GA19	GA61	GA171	GA400.1
GA23	GA61.1	GA207	GA408
GA30	GA62	GA233	GA422
GA30.1	GA62.1	GA260.1	GA444
GA30.2	GA75	GA283	GA451.1
GA30.3	GA76	GA284	GA460
GA31	GA105	GA370	
GA42	GA143	GA388	
GA44	GA157	GA467	

۴-۳- تعیین کیفیت RNA

RNA کل از برگ گیاهان گندمی که تراریختی آنها در مرحله قبل به اثبات رسیده است با روشی که در بخش ۳-۵ آمده است استخراج شد و کیفیت آن بر روی ژل اگارز ۲ درصد مشاهده گردید. وجود باندهای 28srRNA و 18srRNA به صورت مطلوب نشان از کیفیت بالای RNAهای استخراج شده داشت (شکل ۴-۴).

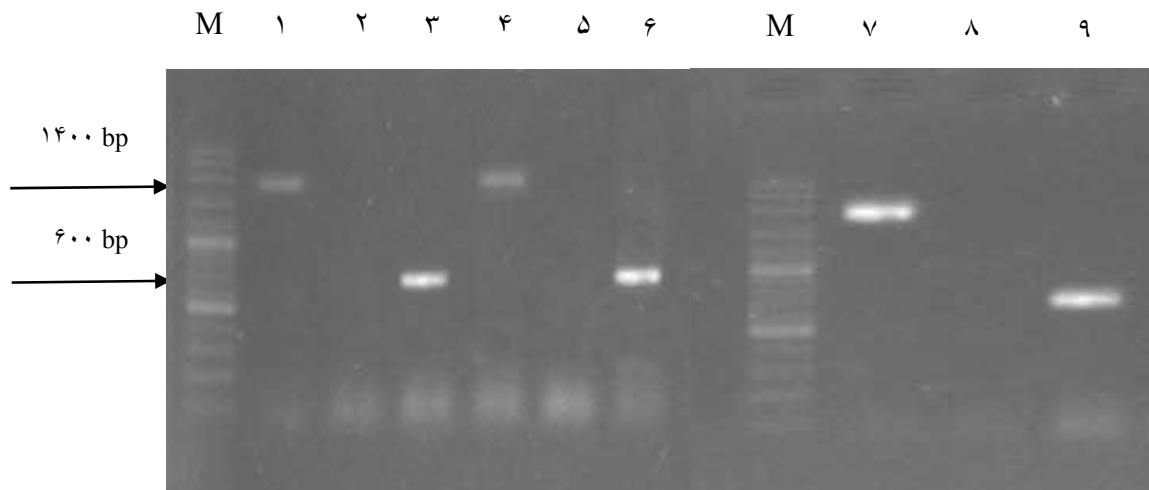


شکل ۴-۴- الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA کل استخراج شده از گیاهان تراریخته

M: نشانگر اندازه 100 bp ladder، ۱: لاین GA 30.1، ۲: لاین GA400، ۳: لاین GA105، ۴: لاین GA143، ۵: لاین GA260.1

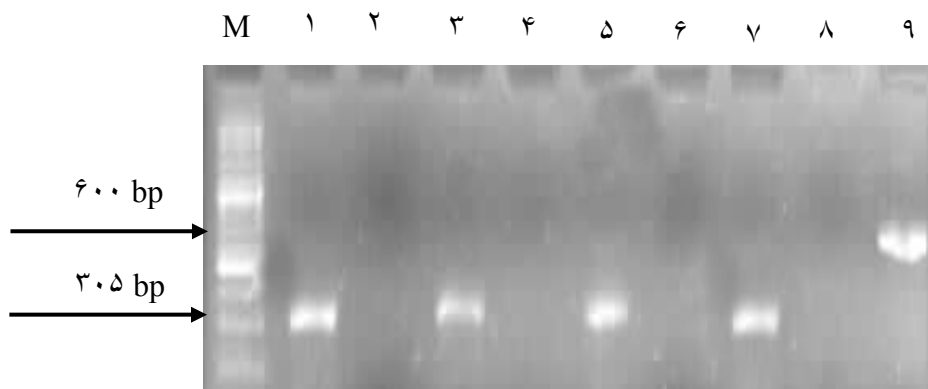
۴-۴- واکنش RT-PCR

واکنش RT-PCR از روی RNA استخراج شده از گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *AYT1-Fw1* و *AYT1-Re2* نیز باند مورد نظر (با اندازه ۱/۴Kb) را نشان می‌داد که نشانگر بیان و رونویسی ژن در سطح RNA در گیاهان تراریخته بود. نتایج حاصل از واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای *AYT1-Fw1* و *AYT1-Re2* برای سه لاین تراریخته حاوی ژن *AYT1* به همراه کنترل منفی مربوط به هر واکنش در شکل ۴-۵ نشان داده شده است. همچنین از پرایمرهای اختصاصی *AYT1-f6* و *AYT1-r6* نیز برای تکثیر بخش داخلی ژن استفاده شد که این واکنش نیز جواب واکنش RT-PCR قبل (شکل ۴-۵) را تایید می‌کند (شکل ۴-۶). از آنجا که در این مرحله، DNA ژنومی می‌تواند باعث جواب مثبت کاذب شود، لذا با استفاده از واکنش کنترل منفی، یعنی واکنش RT-PCR در غیاب آنزیم نسخه برداری معکوس مشخص شد که RNA استخراجی فاقد آلودگی با DNA است. همچنین برای واکنش کنترل مثبت از آغازگرهای اختصاصی 18srRNA استفاده گردید و با مشاهده قطعه ۶۰۰bp مورد نظر کیفیت RNA و واکنش RT-PCR مورد تایید قرار گرفت.



شکل ۴-۵- الکتروفورز نتایج حاصل از واکنش RT-PCR برای تایید نسخه برداری از ژن *AYT1* در گیاهان تراریخته با استفاده از پرایمرهای *AYT1-Fw1* و *AYT1-Re2*

M : نشانگر اندازه 100bp ladder، ۱ : لاین GA143، ۲ : کنترل منفی (- RT)، ۳ : کنترل مثبت، ۴ : لاین GA 30.1، ۵ : کنترل منفی (- RT)، ۶ : کنترل مثبت، ۷ : لاین GA75، ۸ : کنترل منفی (- RT)، ۹ : کنترل مثبت



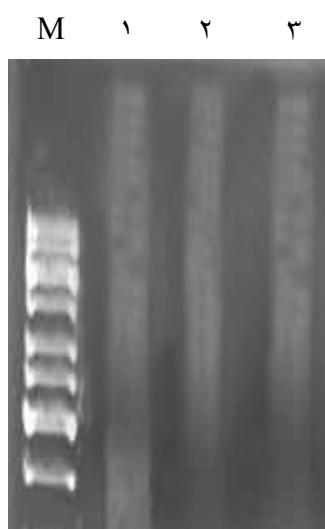
شکل ۴-۶- نتایج الکتروفورز حاصل از واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *AYT1-r6* و *AYT1-f6*

M : نشانگر اندازه 100bp ladder، ۱ : لاین GA15، ۲ : کنترل منفی (- RT)، ۳ : لاین GA44، ۴ : کنترل منفی (- RT)، ۵ : لاین GA19، ۶ : کنترل منفی (- RT)، ۷ : لاین GA61، ۸ : کنترل منفی (- RT)، ۹ : کنترل مثبت با پرایمر 18 s RNA و لاین GA15 با اندازه نزدیک به ۶۰۰ جفت باز

۴-۵- آنالیز دورگه سازی سادرن بلات

۴-۵-۱- نتایج هضم آنزیمی

DNA ژنومی استخراج شده از بافت برگي لاین‌های شماره ۷۵، ۴۰۰ و ۲۰۷ به همراه گیاه شاهد (غیرتراریخته) به وسیله آنزیم *HindIII* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند (شکل ۴-۷). این آنزیم کل DNA را به صورت کامل برش می‌دهد و آن را به قطعاتی با اندازه‌های مختلف تقسیم می‌نماید و سپس DNA هضم شده را به صورت هاله‌ای نمایش می‌دهد.

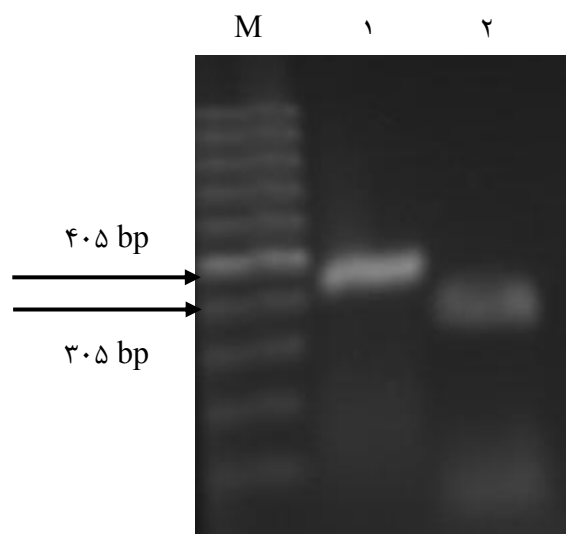


شکل ۴-۷- هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *HindIII* : M : نشانگر اندازه 1Kb ladder، ۱ : لاین ۷۵، ۲ : لاین ۴۰۰، ۳ : لاین ۲۰۷

۴-۵-۲- سنتز کاوشگر برای قطعه ۳۰۵ جفت بازی

برای مشخص شدن تعداد نسخ ژنی ورودی به گیاه تراریخته نیاز است که برای این ژن (*AYT1*) کاوشگری طراحی شود که این کاوشگر مکمل ژن *AYT1* می‌باشد و توانایی اتصال به آن را داراست. لذا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *AYT1-f6* و *AYT1-r6* و انجام واکنش PCR اقدام به تهیه کاوشگر نمودیم. در تهیه این کاوشگر بجای استفاده از عناصر رادیواکتیو برای نشاندار کردن توالی DNA مورد نظر از دنباله غیررادیواکتیو Dig-dUTP استفاده شد که خطرات ناشی از مواد رادیواکتیو را مرتفع می‌سازد. همان طور

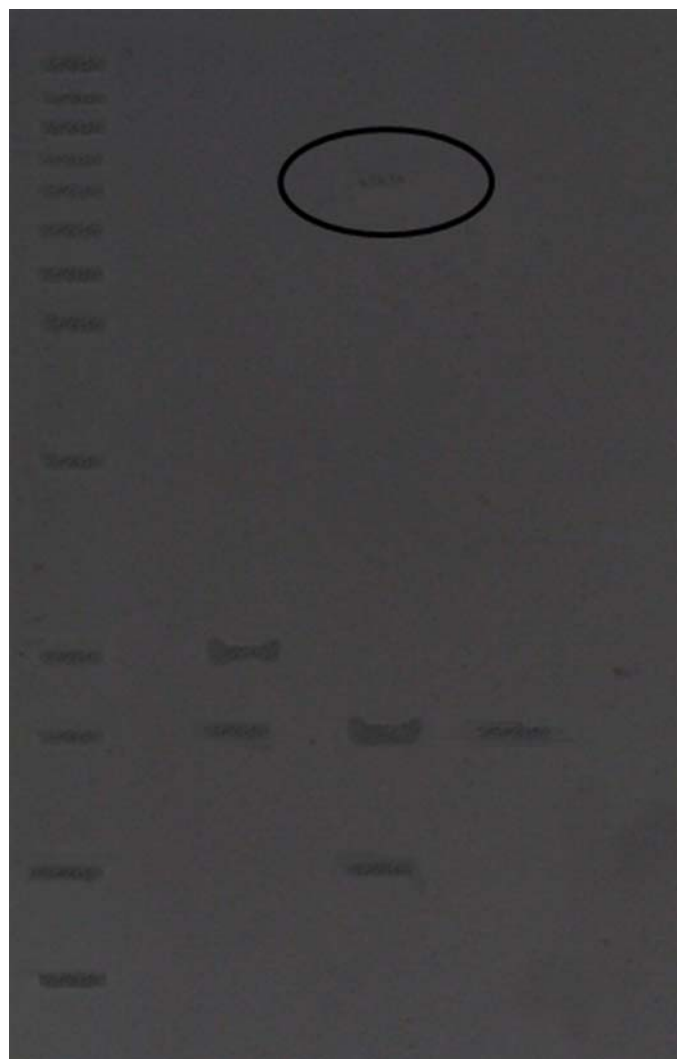
که در شکل ۴-۸ پیداست کاوشگر طراحی شده از اندازه بزرگتری (۴۰۵ جفت باز) نسبت به قطعه تکثیر شده توسط واکنش معمولی PCR برخوردار می‌باشد. (شکل ۴-۸).



شکل ۴-۸- کاوشگر سنتز شده برای ژن *AYT1* با اندازه بزرگتر از سایز معمول M : نشانگر اندازه 100bp ladder، ۱: کاوشگر طراحی شده به کمک Dig-dUTP، ۲: واکنش PCR معمولی

آنالیز دورگه سازی سادرن تعداد نسخ ژنی ورودی به هر لاین را مشخص نمود. بدین صورت که در لاین ۷۵ هیچ باندی مشاهده نشد ولی در لاین ۴۰۰ دو باند و در لاین ۲۰۷ سه باند دیده شد. کنترل منفی نیز هیچ باندی را نشان نداده است که این موضوع نشان از صحت این آنالیز می‌باشد. از پلاسمید حاوی ژن *AYT1* نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. لکه مشاهده شده در این بخش نیز نشان از صحت کار لکه گذاری بر روی غشا می‌باشد (شکل ۴-۹). نتایج مربوط به آنالیز دورگه سازی سادرن برای سه لاین تراریخته حاوی زن *AYT1* به همراه کنترل مثبت و منفی در شکل ۴-۹ نشان داده شده است. همان طور که در شکل پیداست لاین شماره ۴۰۰ و ۲۰۷ لکه‌هایی را روی غشا ایجاد نموده‌اند. تعداد این لکه‌ها نشان دهنده تعداد نسخ ژنی ورودی به داخل ژنوم گندم تراریخته می‌باشد. از آنجا که بین تعداد نسخ ژنی ورودی به ژنوم و ایجاد مقاومت در گیاه رابطه‌ای عکس برقرار است پس وجود یک نسخه از ژن در ژنوم گیاه بسیار مطلوب‌تر می‌باشد. در این آزمایش لاین ۴۰۰ که دو لکه بر روی غشا ایجاد کرده بود مقاومت خوبی را در برابر قارچ فوزاریوم از خود نشان می‌داد. همچنین لاین شماره ۲۰۷ نیز که سه لکه بر روی غشا ایجاد نموده بود نیز در برابر قارچ عامل بیماری از خود مقاومت نشان می‌دهد اما میزان مقاومت در لاین شماره ۴۰۰ بیشتر می‌باشد.

M ۱ ۲ ۳ ۴ ۵



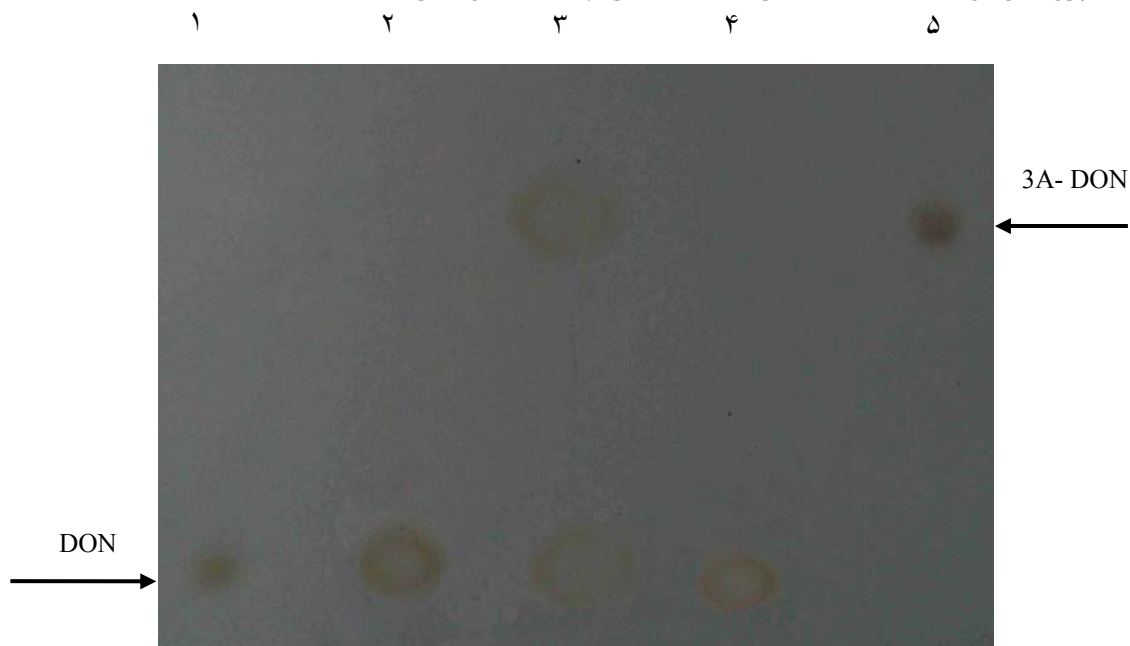
شکل ۴-۹- آنالیز سادرن بلات. M: نشانگر اندازه 1kb ladder، ۱: لاین ۷۵، ۲: لاین ۴۰۰، ۳: لاین ۲۰۷، ۴: کنترل مثبت
۵: کنترل منفی

۴-۶- سنجش فعالیت آنزیمی تراژن *AYT1* با آزمون TLC

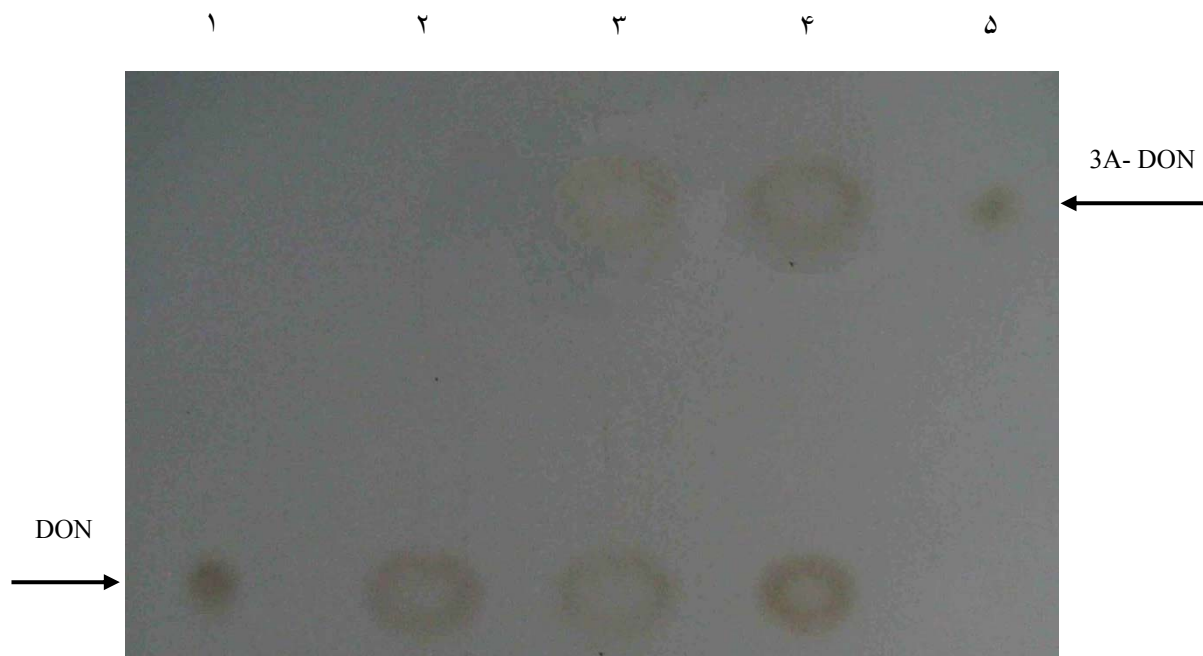
با استفاده از پروتئین استخراج شده از تعدادی از لاین‌های گندم تراریخته، فعالیت استیل ترانسفراز پروتئین *AYT1* در گیاهان تراریخته مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین استخراج شده از گیاهان غیرتراریخته نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نتایج آزمون TLC نشان داد که فعالیت استیل ترانسفراز پروتئین *AYT1* در ویال‌های حاوی پروتئین استخراج شده از تعدادی از لاین‌های گندم تراریخته قابل مشاهده است. لکه مربوط به فرم استیله سوبسترا 3A-DON در تعدادی از این لاین‌ها موید این مطلب می‌باشد (شکل ۴-۶).

۱۰ و ۴-۱۱). هر چند لکه مربوط به سوبسترا DON نیز در همه نمونه‌ها همچنان قابل مشاهده بود که نشان

می‌دهد پروتئین نوترکیب *AYT1* قادر به استیله کردن کامل سوبسترا نمی‌باشد.



شکل ۴-۱۰- فعالیت استیل ترانسفرازی *AYT1* در گیاهان تراریخته. ۱: DON خالص (استاندارد)، ۲: گیاه غیر تراریخته + DON، ۳: لاین شماره ۴۰۰ (تراریخته + DON)، ۴: لاین شماره ۷۵ (تراریخته + DON)، ۵: 3A-DON خالص (استاندارد)

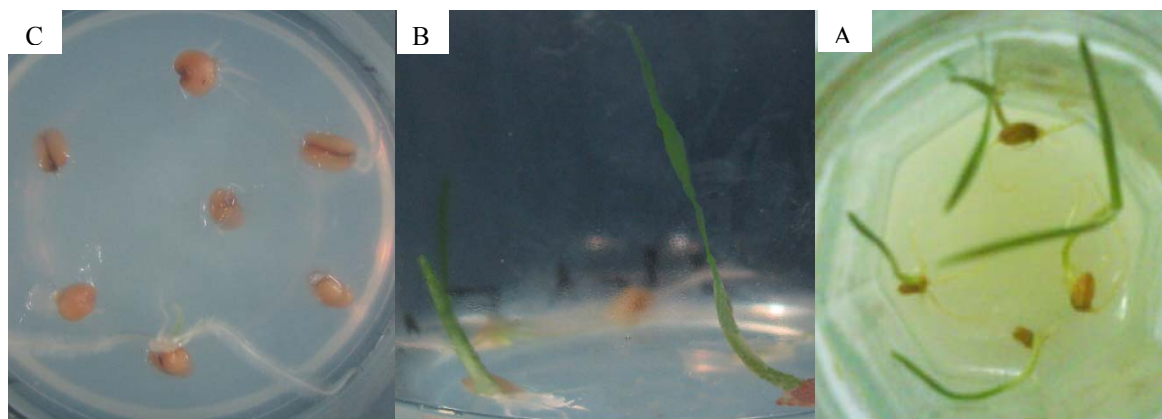


فعالیت استیل ترانسفرازی *AYT1* در گیاهان تراریخته. ۱: DON خالص (استاندارد)، ۲: گیاه غیر تراریخته + DON، ۳: لاین شماره ۲۸۳ (تراریخته + DON)، ۴: لاین شماره ۲۶۰/۱ (تراریخته + DON)، ۵: 3A-DON خالص (استاندارد)

۷-۴ - بررسی قدرت جوانه زنی و ارتفاع گیاهچه‌های گندم تراریخته حاوی ژن *AYT1* در محیط

حاوی توکسین DON

بذور گیاهان تراریخته در ظروف مناسب و در محیط کشت MS ۱/۲ به همراه ۱۰ ppm توکسین DON کشت شدند و پس از ۱۰ روز درصد جوانه زنی این بذور و ارتفاع گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاکی از مقاومت بسیار مناسب بذور گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان شاهد است و قدرت جوانه زنی در گیاهان تراریخته و ارتفاع گیاهچه در آنها نسبت به گیاهان شاهد بسیار بیشتر بود (شکل ۴-۱۱). همان طور که در جدول ۴-۱ مشاهده می‌شود درصد جوانه‌زنی در گیاه شاهد ۱۰ درصد می‌باشد که این میزان برای گیاهان تراریخته به طور میانگین ۶۵ درصد می‌باشد. کمترین درصد جوانه‌زنی در بین لاین‌های تراریخته ۲۵ درصد می‌باشد که این میزان نیز از درصد جوانه‌زنی گیاه شاهد بالاتر است. در مورد ارتفاع گیاهچه نیز میانگین ارتفاع گیاهچه در گیاهان تراریخته ۰/۵ سانتی‌متر بود که این میزان برای لاین‌های تراریخته به طور میانگین ۵/۲۵ سانتی‌متر می‌باشد. کمترین ارتفاع گیاهچه در بین لاین‌های تراریخته ۲/۵ سانتی‌متر می‌باشد که حتی این میزان نیز نسبت به گیاه شاهد از تفاوت محسوسی برخوردار است.



شکل ۴-۱۱ : قدرت جوانه زنی گیاهان تراریخته نسبت به گیاه شاهد در محیط حاوی توکسین DON A : گیاه شاهد در محیط فاقد توکسین B : گیاه تراریخته در محیط واجد توکسین C : گیاه شاهد در محیط واجد توکسین

جدول ۴-۲: مقایسه درصد جوانه زنی و ارتفاع گیاهچه های تراریخته و غیر تراریخته در حضور توکسین DON

لاین	درصد جوانه زنی در حضور DON برحسب درصد	میانگین ارتفاع گیاهچه در حضور DON برحسب سانتی متر
WT(فرم شاهد)	۱۰	۰/۵
GA30.1	۵۰	۵/۵
GA75	۵۰	۵
GA207	۷۵	۶/۵
GA260.1	۱۰۰	۷
GA283	۷۵	۶/۵
GA284	۴۰	۳/۵
GA370	۶۵	۶
GA388	۹۰	۴/۵
GA400	۷۵	۶/۵
GA400.1	۳۵	۶/۵
GA408	۵۵	۳
GA422	۸۵	۵/۵
GA15	۲۵	۲/۵
GA19	۴۵	۵/۵
GA23	۶۵	۴/۵
GA30	۵۵	۵/۵
GA30.2	۸۵	۵/۵
GA30.3	۴۵	۶/۵
GA61	۷۵	۵
GA62	۷۵	۷
GA105	۵۵	۵
GA157	۶۵	۴/۵
GA158	۸۵	۳/۵
GA460	۶۵	۳/۵
GA467	۶۵	۶/۵

۴-۸- اثرات آلودگی قارچ فوزاریوم روی سنبله گندم تراریخته با تراژن *AYT1*

پس از تلقیح سنبله های گیاهان تراریخته با عصاره قارچ فوزاریوم مشاهده کردیم که گیاهان تراریخته تحمل خوبی در برابر قارچ عامل بیماری در مقایسه با گیاه شاهد از خود نشان می دهند به طوری که در تعدادی از لاین های گندم تراریخته (۵ عدد) هیچ گونه آثار بیماری مشاهده نشد. در بقیه لاین های تراریخته (۱۰ عدد) آثار بیماری مشاهده گردید اما میزان آن در مقایسه با گیاه شاهد بسیار کمتر و سرعت تکثیر قارچ بسیار کند بود که این موضوع نیز ناشی از اثر ژن *AYT1* جهت ایجاد تحمل به قارچ فوزاریوم بود.



شکل ۴-۱۲- نتایج تیمار سنبله با قارچ فوزاریوم : الف- گیاه تراریخته تیمار شده با قارچ فوزاریوم ب- گیاه شاهد تیمار شده با قارچ فوزاریوم در مراحل ابتدایی ج- گیاه شاهد تیمار شده با قارچ فوزاریوم در مراحل انتهایی

بحث

گندم یکی از گیاهان استراتژیک می باشد که در ایران و جهان سطح زیر کشت وسیعی را به خود اختصاص داده است. این گیاه نزدیک به ۴۰ درصد غذای انسان ها را به ویژه در کشورهای در حال توسعه تشکیل می دهد. از آنجا که این محصول با تغذیه و سلامت انسان مرتبط است لذا توجه به کیفیت این محصول علاوه بر کمیت آن از اهمیت انکارناپذیری برخوردار است. این محصول مورد حمله تعداد زیادی از عوامل بیماری زا قرار می گیرد که یکی از مهمترین آنها قارچ *Fusarium graminearum* می باشد که باعث ایجاد بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم می شود. قارچ *F.graminearum* ترکیبات و متابولیت های ثانویه ای را تولید می کند که دارای سمیت زیادی برای انسان و همچنین گیاه هستند (علیزاده و سعیدی، ۱۳۸۳). بررسی ها

روی جدایه‌های جمع آوری شده از ایران نشان می‌دهد که آن‌ها قادر به تولید مخلوطی از میکوتوکسین‌ها از جمله زرانون و دی‌اکسی نیوالنول (DON) هستند (علیزاده و سعیدی، ۱۳۸۳). از آنجا که اکثر قارچ‌ها ترکیبات و مواد سمی خود را در فاز سکون جهت افزایش میزان فعالیت خود تولید می‌کنند پس می‌توان این سموم را به عنوان متابولیت‌های ثانویه در نظر گرفت اما توکسین DON در مراحل ابتدایی، برای تشدید بیماری‌زایی و کلونیزاسیون بیشتر توسط قارچ فوزاریوم تولید می‌شود پس می‌توان توکسین DON را در گروه متابولیت‌های اولیه نیز قرار داد اما در اکثر منابع از این توکسین به عنوان یک متابولیت ثانویه یاد شده است. تولید تریکوتسین‌ها تنها فاکتور بیماری‌زایی است که مکانیسم عمل آنها شناخته شده است و به همین دلیل اولین هدف در راهکارهای زیست فناوری جهت مقابله با قارچ محسوب می‌شود. اطلاعات موجود در مورد مکانیسم‌های مولکولی مقاومت در مراحل مختلف آلودگی با قارچ *F.graminearum* در گونه‌های غلات و ترکیبات کلیدی مربوط به پاسخ مقاومتی گیاه به آلودگی پاتوژن اندک هستند و بررسی دقیق‌تر مکانیسم‌های مقاومت به بیماری در سطح مولکولی جهت استفاده بهینه در ارقام حساس و همچنین بهره‌گیری از ژن‌های مفید متعلق به سایر ارگانیسم‌ها به شدت مورد نیاز هستند. همچنین در مورد مکانیسم عمل میکوتوکسین‌های فوزاریومی در گیاهان اطلاعات چندانی وجود ندارد. تریکوتسین‌ها تنها میکوتوکسین‌های فوزاریومی هستند که مکانیسم عمل آن‌ها شناخته شده است (Poppenberger et al., 2003) و از اینرو اهداف جذابی برای مطالعات مولکولی و فناوری زیستی هستند. یکی از عمده ترین تریکوتسین‌هایی که توسط قارچ *F.graminearum* تولید می‌شود، میکوتوکسین DON است (Dalcero et al., 1997; Bai and shaner, 2004; Goswami and kistler, 2004). مطالعات زیادی نشان می‌دهد که بین مقاومت گیاهچه‌ها به DON و مقاومت به آلودگی در گیاهان بالغ ارتباط مستقیم وجود دارد (Dalcero et al., 1997; Bai and Harris et al., 1999; shaner, 2004).

DON و تریکوتسین‌های دیگر، مهارکننده تولید پروتئین در یوکاریوت‌ها می‌باشند که از این نظر مانند آنتی بیوتیک‌ها عمل می‌کنند (Barbacid and Vazquez, 1974; Kimura et al, 1998). موجودات تولید

کننده آنتی بیوتیک جهت محافظت از خود از سه مکانیسم عمده استفاده می‌کنند که این سه مکانیسم عمده در موجودات مقاوم غیر تولیدکننده نیز مشاهده می‌شوند. این مکانیسم‌ها عبارتند از تغییر در محل هدف و عمل آنتی بیوتیک یا توکسین سلول، تغییر متابولیسم و آنزیمی آنتی بیوتیک یا توکسین و پمپ کردن آنتی بیوتیک یا توکسین به خارج از سلول توسط ناقلین غشایی. در این پژوهش اقدام به آنالیز گیاهان نسل دوم گندم (T_1) تراریخته‌ای شد که توسط مکانیسم دوم، به توکسین مقاوم شده بودند به عبارت دیگر در این مطالعه تاثیر و بیان ژن استیل ترانسفراز مخمری و تاثیر آن در سم‌زدایی توکسین DON در نسل دوم گندم تراریخته مورد بررسی قرار گرفت.

در مخمر نان مشاهده شده بود که ژن *AYT1* در حفاظت مخمر در برابر تریکوتسین‌ها نقش دارد (-). (Alexander et al., 2002). لذا این ژن از مخمر جدا و به گیاه توتون به عنوان گیاه مدل انتقال یافت (-). سنجریان و همکاران، ۱۳۸۵). اما از آنجا که گیاه هدف برای این ژن، گندم و قارچ هدف آن، قارچ *F.graminearum* است پس ژن *AYT1* از مخمر به گیاه گندم نیز انتقال یافت (قرنجیک و همکاران، ۱۳۸۷). در پروژه حاضر آنالیزهای مولکولی لازم بر روی گیاهان نسل دوم گندم تراریخته صورت پذیرفت و نتایج نشان از حضور و بیان مناسب ژن *AYT1* در نسل دوم گندم تراریخته بودند. البته در تعدادی از لاین‌های گندم تراریخته (۳ عدد) آنالیز PCR جواب مورد انتظار را نداد که این موضوع می‌تواند به این دلیل باشد که چون عمل انتقال ژن به جنین نارس صورت گرفته است لذا پس از تقسیم میوز در تشکیل میکروسپور و مگاسپور و ترکیب هسته زایشی میکروسپور با سلول تخم، برخی از گامت‌ها ژن مورد نظر را دریافت می‌کنند در حالی که بعضی دیگر فاقد ژن مورد نظر هستند پس بذر تشکیل شده که از آن برای آنالیز مولکولی استفاده شده است فاقد تراژن مورد نظر می‌باشد و نتیجه مورد انتظار را در این نسل نشان نمی‌دهد. در مورد آنالیز هیبریداسیون سادرن نیز این نکته حایز اهمیت است که یکی از لاین‌ها (GA75) هیچ گونه لکه‌ای را به ما نشان نداد (با توجه به اینکه نتایج آنالیز PCR و RT-PCR آن مثبت بود). این نکته را می‌توان از دو نظر تفسیر نمود. یکی آنکه ممکن است آنزیم متیل ترانسفراز ناحیه‌ای که توسط آنزیم

HindIII برش می‌خورد را متیله کرده باشد پس آن بخش، از برش آنزیم در امان می‌ماند. دلیل دیگر این می‌تواند باشد که تراژن *AYT1* وارد ناحیه هتروکروماتینی ژنوم شده باشد لذا بررسی محل قرار گرفتن ژن در ژنوم و اینکه بر روی کدام کروموزوم قرار گرفته است توسط آزمون FISH در مراحل بعدی این پژوهش پیشنهاد می‌گردد.

برخی از گزارشات نشان داده اند که هیچ یک از لاین‌های گندم تراریخته شده با ژن *Tri101* افزایش معناداری در مقاومت به FHB نشان نمی‌دهند که می‌تواند به دلیل تفاوت در جذب و متابولیسم DON در گیاهان مختلف (Higa et al., 2003) و یا مقدار کم بیان آنزیم (Dahleen et al., 2001) در گیاهان تراریخته باشد. با استفاده از برخی تشدید کننده‌ها سعی در غلبه بر این مشکل شده است و توانسته‌اند تولید پروتئین را در لاین‌های تراریخته تا ۲۰ برابر افزایش دهند (Higa et al., 2003). از آنجا که DON فاکتور تشدید بیماری است به نظر می‌رسد بیشترین نقش ژن *AYT1* در تحمل به DON در مراحل بعد از آلودگی اولیه مشخص می‌شود. در این مطالعه سعی بر آن بود تا فعالیت پروتئین تولیدی توسط تراژن *AYT1* نیز مورد بررسی قرار گیرد. این موضوع از این جهت مهم است که در صورتی تراژن انتقالی به گندم کاربرد مناسب خود را دارد، که فرایند ترجمه و تولید پروتئین به طور مناسبی انجام شود و پروتئین تولیدی از پیچش^۱ مناسب برخوردار باشد. لذا کارایی پروتئین^۲ توسط آنالیز کروماتوگرافی انجام پذیرفت. البته در ۱۱ لاین این آنالیز جواب مورد انتظار را نداد که این موضوع می‌تواند به دلیل عدم پیچش مناسب پروتئین تولیدی توسط تراژن *AYT1* باشد. نتایج آنالیز کروماتوگرافی که در این پژوهش به دست آمد با نتایج آزمایش شهبازی و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطابق است. شهبازی و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنزیمی ژن *AYT1* را بر روی گیاه توتون بررسی کرده بودند.

بسیاری از محققین تلاش کرده‌اند که از آزمون حساسیت به DON برای معرفی روشی سریع در غربالگری گیاهان مقاوم استفاده کنند. در این روش، از قابلیت DON در جلوگیری از رشد کالوس و پروتوپلاست و

1. Folding
2. Fuctional Protein

رشد ریشه، (Harris and Gleddie., 2001) رشد کلئوپتیل، (Snijder., 2004) باززایی قطعات برگ، -) (Poppenberger. et al., 2003) جوانه زنی بذر در محیط حاوی توکسین (Snijder., 2004) ; (Poppenberger. et al., 2003) استفاده شده است. این موضوع نشان می‌دهد که از توکسین DON می‌توان در غربال‌گری گیاهان تراریخته واجد ژن *AYT1* و گیاهان فاقد ژن که توانایی سم‌زدایی از توکسین DON را ندارند، استفاده نمود. لذا در مطالعه حاضر اثر ممانعت‌کنندگی توکسین بر روی جوانه زنی بذور و ارتفاع گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در این آزمایش با نتایج آزمایش‌سنجریان و همکاران (۱۳۸۵) و آزمایش شهبازی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت. همین‌طور از آنجا که هدف نهایی قارچ فوزاریوم و توکسین تولیدی توسط آن (DON) سنبله‌گندم می‌باشد لذا آزمون گلخانه‌ای در این رابطه صورت گرفت و نتایج به دست آمده حاکی از فعالیت مناسب ژن *AYT1* در ایجاد تحمل به قارچ فوزاریوم از طریق سم‌زدایی از توکسین DON بود. نتایج به دست آمده از آزمایش گلخانه‌ای با نتایج آزمایش میدانی و همکاران (۲۰۰۷) و آزمایش مانوهاران و همکاران (۲۰۰۶) مطابق بود. این دو آزمایش تاثیر استیل ترانسفراز ژن *TRI101* را در گیاه جو بررسی کرده بودند.

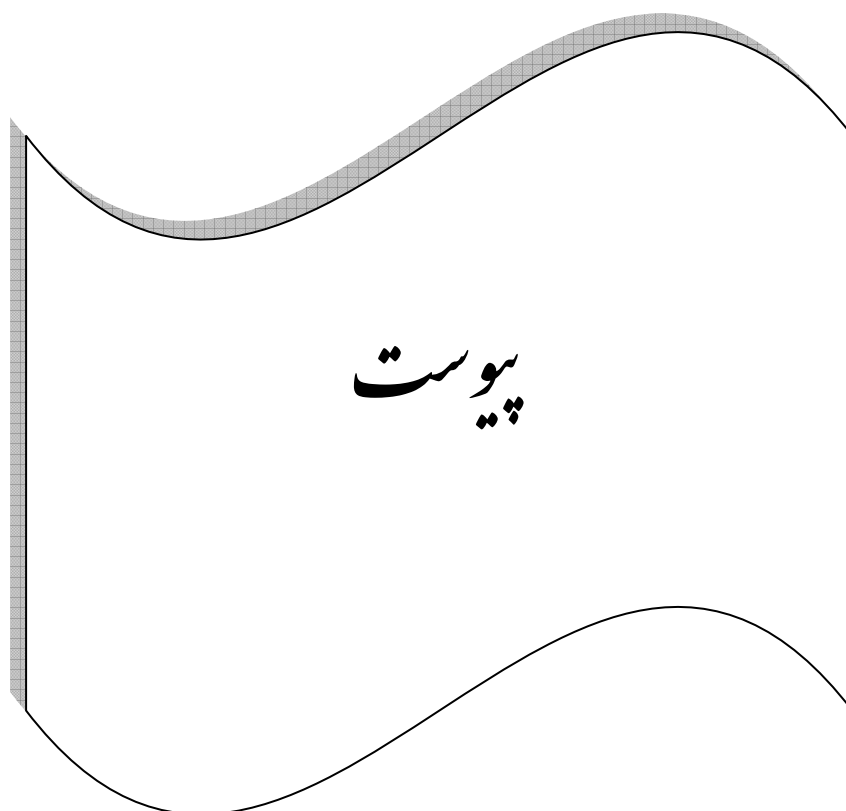
نکته دیگر اینکه توسعه غلات دانه ریز مقاوم به FHB از طریق تراریختی اگرچه جذاب و کارآمد به نظر می‌رسد اما نباید مشکلات زیادی از جمله انتخاب بهترین ژن‌ها، داشتن پروموتور کارا و سازگار، مارکرهای انتخاب‌گر مناسب و مشکلات تراریختی گیاهان خانواده غلات، تاثیر ژنوتیپ روی باززایی گیاه، تنوع سوماکلونی و سایر فاکتورهای ایجادکننده تنوع را از نظر دور داشت (Dahleen et al., 2001).

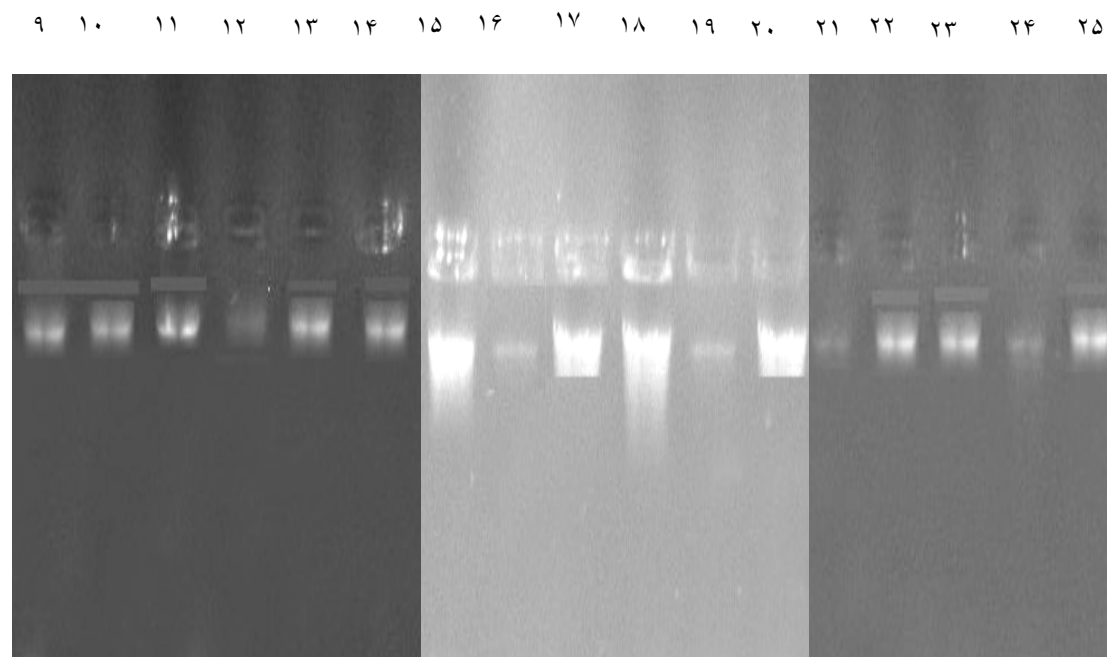
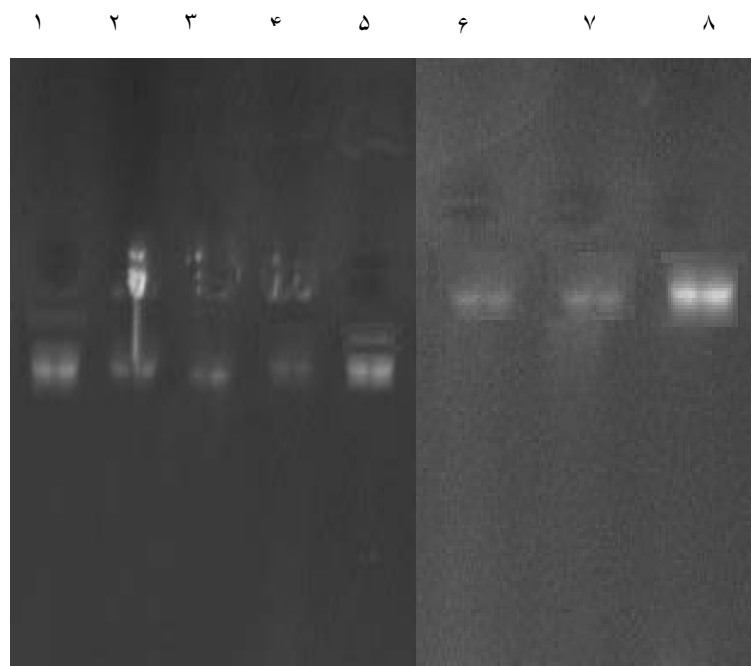
نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات

به طور کلی مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن *AYT1* از مخمر در گیاه موجب افزایش تحمل به قارچ فوزاریوم و توکسین DON در لاین‌های گندم تراریخته می‌شود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز صورت گرفته در این آزمایش نشان داد که ۳۷ لاین از ۴۰ لاین کشت شده (۹۲/۵ درصد) دارای ژن *AYT1* بودند. مطالعه RT-PCR لاین‌ها نیز نشان دهنده وقوع نسخه‌برداری در ۲۵ لاین (۶۲/۵ درصد) بود که می‌تواند حاکی از استقرار مناسب این ژن در ناحیه یوکروماتینی ژنوم در این ۲۵ لاین باشد. میزان فعالیت آنزیم استیل ترانسفراز مخمری در لاین‌هایی که آزمون RT-PCR بیان ژن در آنها را مورد تایید قرار داده بود با استفاده از آزمون TLC مورد بررسی قرار گرفت که این آنالیز نیز حاکی از فعالیت مناسب این آنزیم در برابر توکسین DON در تعدادی از لاین‌های تراریخته بود. آزمون قدرت جوانه زنی بذور گندم تراریخته و ارتفاع گیاهچه آنها در حضور توکسین DON و اثرات آلودگی قارچ فوزاریوم روی سنبله گندم تراریخته حاوی ژن *AYT1*، تحمل بالای گیاهان تراریخته حاوی ژن *AYT1* را در محیط حاوی توکسین DON نشان می‌دادند.

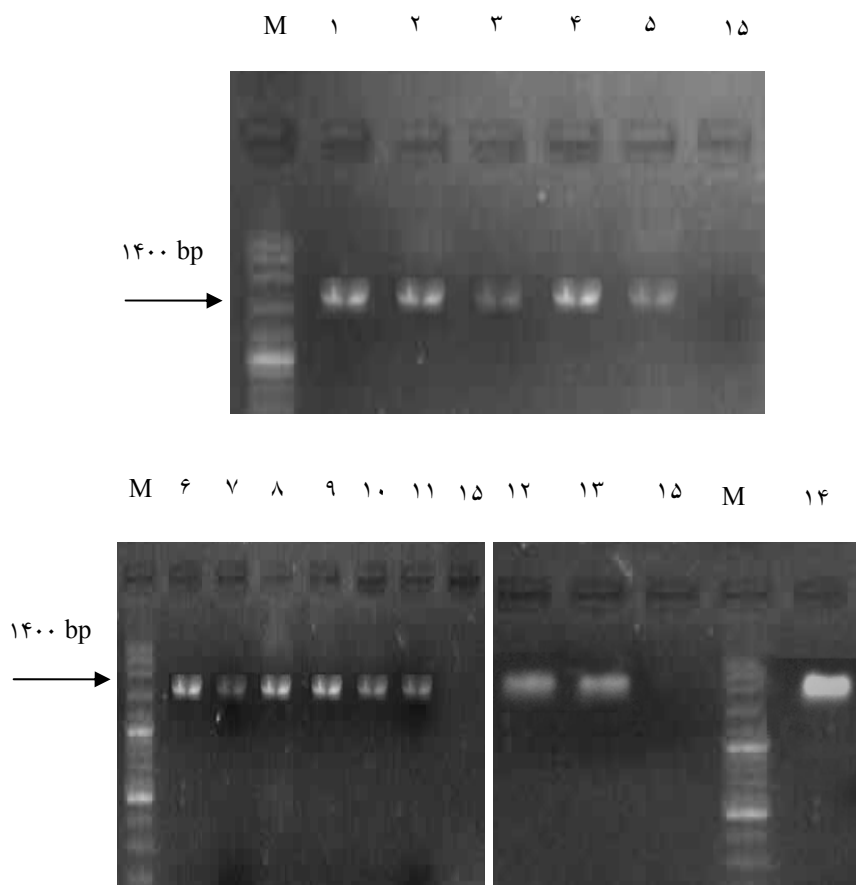
به منظور افزایش میزان بیان ژن در گیاهان تراریخته، طراحی سازه‌های ژنی جدید با پروموتورهای قوی تر (-) مثل actin1 (ذرت) در مراحل بعدی این پژوهش پیشنهاد می‌شود. همچنین کارهایی همچون انجام ارزیابی‌های مربوط به ایمنی زیستی در گیاهان تراریخته، اضافه کردن اپی‌توپ به ژن استیل ترانسفراز مخمری جهت مطالعات ایمونولوژیکی بیان ژن *AYT1*، بهینه سازی کدونی توالی ژن *AYT1* از مخمر برای ترجیح کدونی^۱ مناسب در گیاه گندم و ادامه انجام آنالیزهای مولکولی در نسل‌های بعدی پیشنهاد می‌گردد.

1. Codon Usage

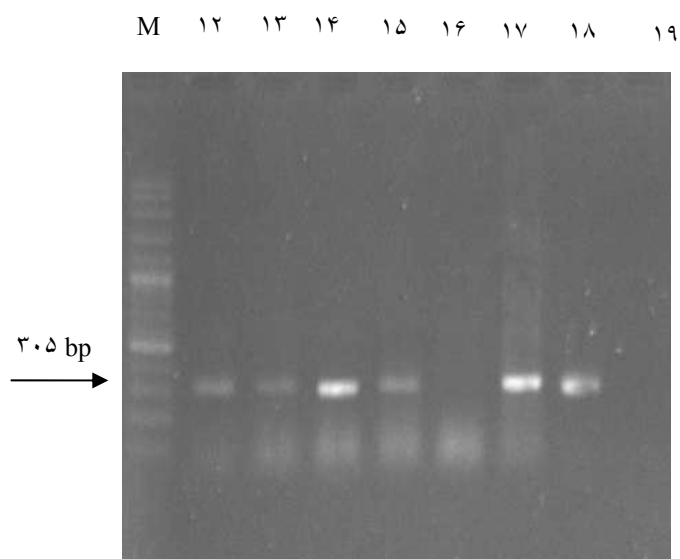
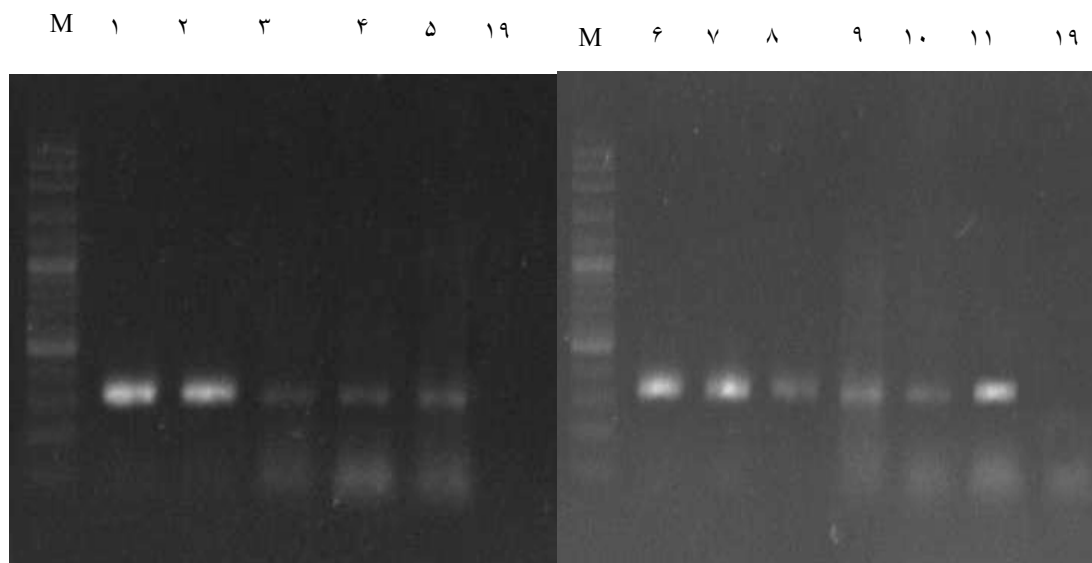




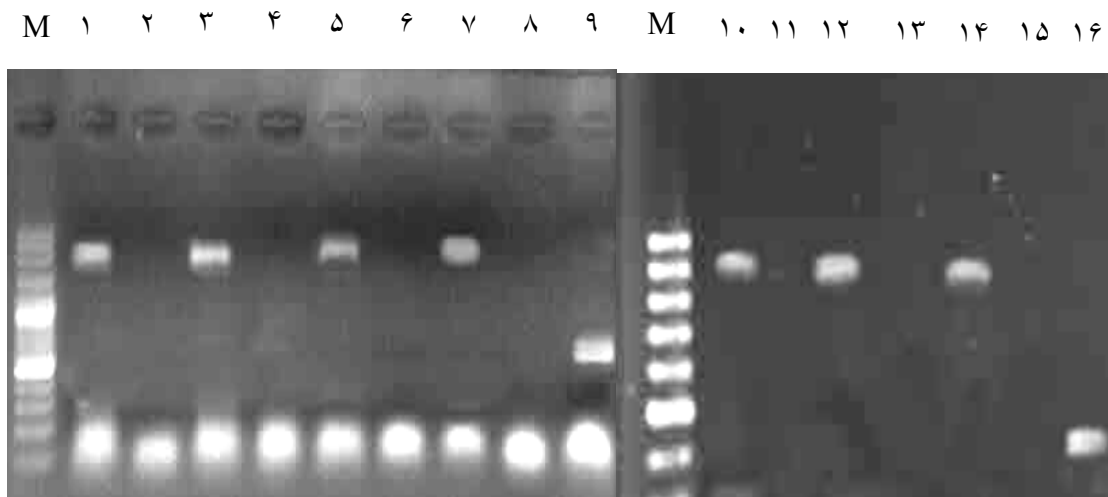
شکل پیوست ۱- تعیین کیفیت DNAهای استخراج شده برای آنالیزهای مولکولی ۱: لاین GA30، ۲: لاین GA76، ۳: لاین GA19، ۴: لاین GA171، ۵: لاین GA15، ۶: لاین GA283، ۷: لاین GA444، ۸: لاین GA158، ۹: لاین GA60، ۱۰: لاین GA42، ۱۱: لاین GA30.1، ۱۲: لاین GA105، ۱۳: لاین GA143، ۱۴: لاین GA260.1، ۱۵: لاین GA44، ۱۶: لاین GA61، ۱۷: لاین GA467، ۱۸: لاین GA62، ۱۹: لاین GA370، ۲۰: لاین GA408، ۲۱: لاین GA31، ۲۲: لاین GA30.2، ۲۳: لاین GA233، ۲۴: لاین GA30.3، ۲۵: لاین GA400.1



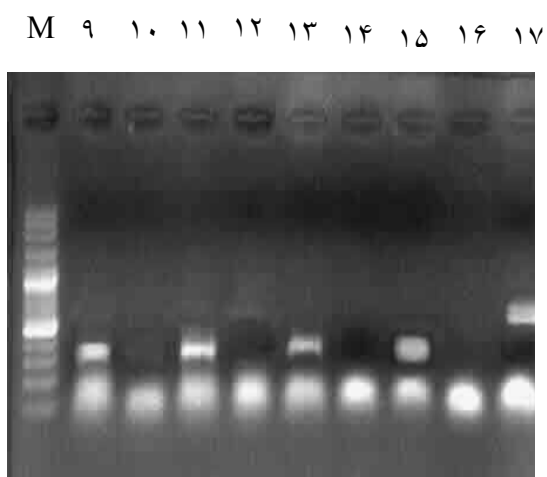
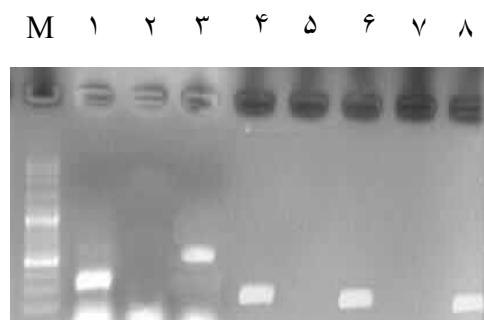
شکل پیوست ۲- الکتروفورز نتایج حاصل از PCR برای تایید تراریختی گیاه گندم با استفاده از پرایمرهای *AYT1*-*Fw1* و *AYT1*-*Re2* برای تکثیر قطعه ۱/۴ Kb و پرایمرهای *AYT1*-*f6* و *AYT1*-*r6* برای تکثیر قطعه ۳۰۵ bp (پرایمرهای داخلی) ۱: لاین GA400، ۲: لاین GA207، ۳: لاین GA62.1، ۴: لاین GA283، ۵: لاین GA444، ۶: لاین GA158، ۷: لاین GA60، ۸: لاین GA284، ۹: لاین GA30.1، ۱۰: لاین GA105، ۱۱: لاین GA42، ۱۲: لاین GA143، ۱۳: لاین GA260.1، ۱۴: لاین GA44، ۱۵: کنترل منفی (باگندم غیرتراریخته)



۱: لاین GA15، ۲: لاین GA400.1، ۳: لاین GA451.1، ۴: GA460، ۵: لاین GA23، ۶: لاین GA30، ۷: لاین
 GA30.1، ۸: لاین GA30.2، ۹: لاین GA30.3، ۱۰: لاین GA76، ۱۱: GA 105، ۱۲: لاین GA143، ۱۳: لاین GA157، ۱۴:
 لاین GA260.1، ۱۵: لاین GA284، ۱۶: لاین GA47 (یکی از سه لاینی که جواب PCR آن مثبت نبود)، ۱۷: لاین GA388،
 ۱۸: لاین GA467، ۱۹: کنترل منفی با گندم غیر تراریخته



شکل پیوست ۳- الکتروفورز نتایج حاصل از RT-PCR برای تایید نسخه برداری از ژن *AYT1* در گیاهان تراریخته با استفاده از پرایمرهای *AYT1-Fw1* و *AYT1-Re2* برای تکثیر قطعه ۱/۴ Kb و پرایمرهای *AYT1-f6* و *AYT1-r6* برای تکثیر قطعه ۳۰۵ bp (پرایمرهای داخلی) ۱: لاین GA61، ۲: کنترل منفی، ۳: لاین GA62، ۴: کنترل منفی، ۵: لاین GA370، ۶: کنترل منفی، ۷: لاین GA158، ۸: کنترل منفی، ۹: کنترل مثبت، ۱۰: لاین GA408، ۱۱: کنترل منفی (- RT)، ۱۲: لاین GA 30.2، ۱۳: کنترل منفی (- RT)، ۱۴: لاین GA30.3، ۱۵: کنترل منفی (- RT)، ۱۶: کنترل مثبت



۱: لاین GA467. ۲: کنترل منفی (- RT)، ۳: کنترل مثبت، ۴: لاین GA62، ۵: کنترل منفی (- RT)، ۶: لاین GA370،
 ۷: کنترل منفی (- RT)، ۸: لاین GA158، ۹: لاین GA408، ۱۰: کنترل منفی (- RT)، ۱۱: لاین GA30.2، ۱۲:
 کنترل منفی (- RT)، ۱۳: لاین GA30.3، ۱۴: کنترل منفی (- RT)، ۱۵: لاین GA388، ۱۶: کنترل منفی (- RT)، ۱۷:
 کنترل مثبت، ۱۸: لاین GA30، ۱۹: کنترل منفی، ۲۰: لاین GA207، ۲۱: کنترل منفی، ۲۲: لاین GA30.1، ۲۳: کنترل
 منفی (- RT)، ۲۴: کنترل مثبت

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰

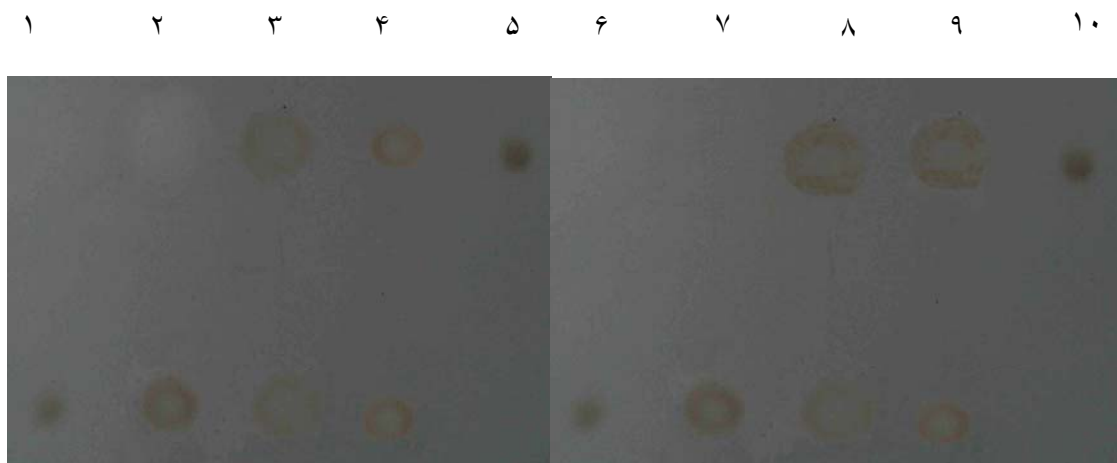


شکل پیوست ۴- فعالیت استیل ترانسفراز *AYT1* در گیاهان تراریخته ۱: DON خالص (استاندارد)، ۲: گیاه غیر تراریخته + DON، ۳: لاین شماره ۲۳ (تراریخته + DON)، ۴: لاین شماره ۳۸۸ (تراریخته + DON)، ۵: 3A-DON خالص (استاندارد)، ۶: DON خالص (استاندارد)، ۷: گیاه غیر تراریخته + DON، ۸: لاین شماره ۲۸۴ (تراریخته + DON)، ۹: لاین شماره ۳۰/۱ (تراریخته + DON)، ۱۰: 3A-DON خالص (استاندارد)

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰



فعالیت استیل ترانسفراز *AYT1* در گیاهان تراریخته ۱: DON خالص (استاندارد)، ۲: گیاه غیر تراریخته + DON، ۳: لاین شماره ۴۲۲ (تراریخته + DON)، ۴: لاین شماره ۱۵ (تراریخته + DON)، ۵: 3A-DON خالص (استاندارد)، ۶: DON خالص (استاندارد)، ۷: گیاه غیر تراریخته + DON، ۸: لاین شماره ۳۰/۲ (تراریخته + DON)، ۹: لاین شماره ۶۲ (تراریخته + DON)، ۱۰: 3A-DON خالص (استاندارد)



۱: DON خالص (استاندارد)، ۲: گیاه غیر تراریخته + DON، ۳: لاین شماره ۲۰۷ (تراریخته + DON)، ۴: لاین شماره ۳۷۰ (تراریخته + DON)، ۵: 3A-DON خالص (استاندارد)، ۶: DON خالص (استاندارد)، ۷: گیاه غیر تراریخته + DON، ۸: لاین شماره ۶۱ (تراریخته + DON)، ۹: لاین شماره ۴۸ (تراریخته + DON)، ۱۰: 3A-DON خالص (استاندارد)

پیوست ۵- توالی ژن *AYT1*

ATGTTTAGAGTCAAGATCATCTCTCAGAAACGTACAAAAAGTGTACAGATGCTA
GAAAACGATCAACTTGATATTTTGGGACAACAACCTTCGCTATACAACTATACA
CTCAAATATGCTCTATCTACCGTGTACCAGATCCTTCTGCTCATGACCATATCGTA
ATACCTTAACAAGAGGACTTGAAACATTGGCTAAAAATTTCCAGTGGCTAGCGA
AATGTCGTAAATGAAGGTGCTGACGAAGGTAACACTGGTACCTACAGAATTGTC
CCGTCAGACAAAATTCCACTTATCGTCCAAGATCTTCGAGAAGATCTGTCTGCCC
CAACAATGGATTCGCTTGAAAAAGCTGACTTTCCCTATCTACATGTTAGACGAAAA
GACTTTTGCGCCTTGCACTGACTATCAATCCACCTGGAAACACTATAGGTATGGCC
GCCAAGAGTGGGCCTGTATTTGCAGTTCAAGCAAACCTTTATCTCCGGCGGCCTCG
TCTTAATATTGTGCGGCAGCACAATATTATGGATATAACAGGACAGGAAGTATC
ATCAACTTGCTCAATAAATCTTGCCACCAAAAACCTTTCTCTGATGAAGAACTGC
TCATTGGAAATATAGATAAAAGCAAATCTATTCCTTTGTTTGATGAAACTTGGA
ACCCGACACCACGCTAGTTCATGAAATAGTGGAAACCTCTAGAAATACAAGTGG
AGAGGAAAAGGAACAGTCTTGTTCTTCGAACTCTACTTGGGCTTATGTTGAATT
TTCTGCTATCTCATTGCAGAATCTGAGGATTTTGGCAATGCAGACATGTACTTCTG
GCACAAAATTTGTCTCCACTGATGATATCGTCACTGCTTTCATCTGGAAATCAGT
TTCTCGAGCCCGTTTATCTCGACTTAAACCAGAAACGAAATCAAATTTAGGGCGT
GCTGTGGATGTTAGAAAACGGCTAGGATCCCCGAAACGTATCCAGGGTTATTAG
TCAACATGACCTTTAATACAGGTTCCCTGAAAAGCTTGGATCATAAAAGTTTGGG
CGTTCTTGCACTACAGATTTCGAGGAAGCTAGACCCTAAAGTCTTCGATTTGGCC
TATAATACATGCGCACTTGCTACGCTCCTTAGCCGATGCCCGGACAAGACTAAGG
TTTCTATACCTCAACCAATTGATACTTTATCTGGAATTATGGTCAGTTCGTGGGCA
AAAGTCAGCCTGTATGACGTTGATTTCAATCTAGGGCTTGGGAAGCCCAAGAGT
GTACGACGGCCGCGCTTCATTTCCCTTGAGAGCCTAATATATTTTATGCCTAGAT
CCTCCAGAGGTGAAATGGTGGTTGCTCTTTGCCTTAGAGATAAAGATTGGGAGTG
CCTGAATGCGGATAAAGAATGGACAAATTATGCTACACATATAGGATGA

منابع

- [۱]. احمدی خواه الف، (۱۳۸۹)، مبانی بیوتکنولوژی گیاهی، انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۲۴۵ صفحه.
- [۲]. الهی نیا ع، (۱۳۷۲)، قارچ شناسی و بیماری های گیاهی مقدماتی، انتشارات دانشگاه گیلان، ۳۲۵ صفحه.
- [۳]. آمار و اطلاعات وزارت کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و پشتیبانی، نشریه شماره ۸۲/۱۳.
- [۴]. ایران نژاد ح، (۱۳۷۹)، زراعت غلات، انتشارات دانشگاه تهران.
- [۵]. ایران نژاد ح، (۱۳۷۸)، اکولوژی گیاهان زراعی، مرکز تحقیقات مناطق کویری و بیابان های ایران، دانشگاه تهران.
- [۶]. ایران نژاد ح و شهبازیان ن، (۱۳۸۳)، زراعت غلات (گندم)، انتشارات دانشگاه تهران، ۲۷۱ صفحه.
- [۷]. رجبی غ و بهروزین م، (۱۳۸۴)، راهنمای آفات و بیماری های گندم و روش های مبارزه با آن ها، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، ۱۸۱ صفحه.
- [۸]. سنجریان ف، موسوی الف، علیزاده ع، ویندورفر ه و آدام گ، (۱۳۸۵)، ارزیابی استیل ترانسفراز مخمری در سم زدایی توکسین فوزاریومی دی اکسی نیوالنول در گیاهان تراریخت. مجله زیست شناسی ایران. ۱۹: ۲۳۱-۲۳۲.
- [۹]. صفایی ن، علیزاده ع، سعیدی ع، رحیمیان ح و آدام گ، (۱۳۸۴)، تشخیص مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های ایرانی *Fusarium graminearum* عامل بلایت سنبله گندم، مجله بیماری های گیاهی، ۴۱: ۲۲۹-۲۴۲.
- [۱۰]. صفی پور افشار، الف. (۱۳۸۴). تغییر در پروتئین ریپوزومی L3 از طریق جهش زایی با جایگاه مشخص در راستای ایجاد مقاومت به توکسین های فوزاریومی در گیاه توتون. پایان نامه دکتری. واحد علوم و تحقیقات. دانشگاه آزاد اسلامی. تهران.

[۱۱]. علیزاده ع و سعیدی ع، (۱۳۸۳)، اثر متابولیت‌های گیاهی بر روی توکسین در عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم و بررسی یک روش بیوکنترلی جدید، گزارش پیشرفت ملی فوزاریوم، SPII، کرج، ایران، ۲۲۶ صفحه.

[۱۲]. قرنچیک ش، معینی الف، موسوی الف و علیزاده ع، (۱۳۸۷)، طراحی و همسانه‌سازی ژن *AYT1* به منظور انتقال به گندم. دهمین کنگره ژنتیک، تهران، ایران.

[۱۳]. گلزار ح، فروتن ع و ترابی م، (۱۳۷۲)، بیماری پاخوره گندم در گرگان و مازندران، مجله آفات و بیماری‌های گیاهی، جلد ۶۱، شماره های ۱ و ۲.

[۱۴]. گلزار ح، (۱۳۶۸)، بیماری بلایت خوشه گندم (بررسی در مورد عامل بیماری و نحوه انتقال و آلودگی بذری)، مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۱۵.

[۱۵]. گلزار ح، (۱۳۷۲)، بررسی پراکندگی فوزاریوم خوشه گندم در منطقه گرگان و گنبد و میزان حساسیت ارقام تجاری گندم، یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.

[۱۶]. محمدی گل تپه الف، علیزاده ع و پورجم الف، (۱۳۶۴)، بیماری‌های مهم غلات دانه ریز، (ترجمه)، ۳۰۵ صفحه.

[17]. Adam G, and Hart L. P., (2000)., Role of deoxynivalenol and 15- acetyl deoxynivalenol in pathogenesis by *Gibberella zeae* as elucidated through protoplast fusion between toxigenic and non toxigenic strain., **Phytopathol.**, 79: 404-408.

[18]. Agrios G.N., (1997), **Plant Pathology**, 4th ed, Academic press, New York.

[19]. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K ,.Walter, P, (2008), Molecular Biology of the Cell, 5th ed. Garland Science, **Taylor & Francis Group**, NY, pp 538-539.

[20]. Alexander NJ, McCormic SP, Ziegenhorn SI, (1999), Phytotoxicity of selected trichothecenes using *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system, **Nat toxins** 7: 265-269.

[21]. Alexander NJ, McCormick S.P., Hohn T.M. (2002), The identification of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *AYT1*(ORF-YLL063c) encoding an acetyltransferase, **Yeast**.19:1425-30.

[22]. Alexander NJ, McCormic SP, Hohn TM, (1999), TRI12, a trichothecen efflux pump from *fusarium sporotrichoides*: gene isolation and expression in yeast, **Mol Gen Genet** 261: 977-984.

- [23]. Bai G. and Shaner G. (2004), Management and resistance in wheat and barley to fusarium Head Blight., **Annu. Rev. Phytopathol.** 42: 135-61.
- [24]. Bar N. L. (1968), Gramineaceae. In: Townsend C.C., G and E, Al-Raw A. (eds): **Flora of Iraq**,9.pp: 173-208.
- [25]. Barbacid, M. and Vazquez, D., (1974)., Binding of acetyl-C14 trichodermin to the peptidyl transferase center of eukaryotic ribosome, **Eur.J. Biochem.** 44 : 437-444.
- [26]. Bhattacharyya M, Martin C, and Smith A, (1993), The importance of starch biosynthesis in the wrinkled seed shape character of peas studied by Mendel, **Plant Molecular Biology** 22: 525-531.
- [27]. Blake T.K., Kadyrzhanova D., Shepherd K.W., Islam A.K.M.R., Langridge P.L., McDonald C.L., Erpelding J.,Larson S., Blake N.K., and Talbert L., (1996), STS-PCR markers appropriate for wheat-barley introgression, **Theoretical and Applied Genetics**, 93: 826-832.
- [28].Bradford, M.M. (1976), Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.** 72: 248–254.
- [29]. Brown DW, McCormic Sp, Alexander NJ, Proctor RH, Desjardins RE., (2001), A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichoides* and *Fusarium graminearum*, **fungal Genet boil** 32: 121-133.
- [30]. Brown T.A, (2010), Gene cloning and DNA analysis, Sixth edition. **Blackell published.** pp: 1-337.
- [31]. Bryan G.J., Collins A.J., Stephenson P., Orry A., Smith J.B., and Gale M.D., (1997), isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat, **Theoretical and Applied Genetics**, 94: 557-563.
- [32]. Burstmayr H, Steiner B, and Hartl L., (2003)., Molecular mapping of QTL for Fusarium Head Blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread., **Theor Appl., Genet.** 107:503-8.
- [33]. Burstmayr H, Lemmens M, Gransgruber H, Ruckenbaure P, (1996), Scab resistance of international germ plasm, **Cereal research Communication** 24(2): 197-202.
- [34]. Ceoloni C., Del signore G., Paquini M., and Testa A., (1988), transfer of mildew resistance from *Triticum longissimum* wheat by ph1 induced homoelogus recombination, In T.E. Miller and R.M.D. koebner (eds.) **proceedings of the 7th international wheat Genetics symposium**, Institute of plant science research, Cambridge laboratory, Cambridge, UK, pp: 221- 226.
- [35]. Chen J, Griffy C. A, Saghai Maroof M. A, Zhao W, Xie W, and Pridgen T., (2000)., Genetic analysis of resistance to Fusarium Head Blight in common wheat, in: R.W. Ward,

(ed.) Proc 2000, National FHB Forum. Erlanger , K. Y. 10-12 Dec. 2000, **Michigan state university, East lansing, MI**. P.19-24.

[36]. Clark D,(2010), Molecular biology. Academic cell update press. **Southern Illinois university**. pp:1-803.

[37]. Clausen M, Krauter R, Schachermayr G, Potrykus I, and Sautter C, (2000), Antifungal activity of a virally encoded gene in transgenic wheat, *Nat*, **Biothechnol**, 18: 446-449.

[38]. Crute I.R., and Pink D.A.C, (1996), Genetics and utilization of pathogen resistance in plants, **Plant Cell**, 8 : 1747-1755.

[39]. Dahleen L.S., Okubara P.A. and Blechl A.E., (2001), Transgenic approaches to combat fusarium Head Blight in wheat and barley. **Crop.Sci**. 41: 628-37.

[40]. Dalcero A., Torres A., Etcheverry M., Chulze S., Varsavsky E., (1997)., Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat food. **Addit Contam** 14:11-14.

[41].Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 72 (2): 317–64.

[42]. Desjardins E, and T.M, Hohn. Mycotoxins in plant pathogenesis. **Current Review**, (1997), **MPMI** Vol. 10, No. 2,pp:147-152.

[43]. Devos K.M., and Gale M.D., (1993), the genetic maps of wheat and their potential in plant breeding, **outlook in agriculture** 22: 93-99.

[44]. Doyle, J.J and Doyle J.L., (1987)., A rapid DNA isolation procedure for small quantites of fresh leaf tissue., **phytochem., Bulletin.**, 19:11-15.

[45]. Evans L.T., (1975), crops and world food supply, crop evolution and the origins of crop physiology, **Cambridge university Press**, Cambridge, UK, pp:1-22.

[46].Falasconi M., Gobbi E., Pardo M and Sberveglieri G., (2005)., Detection of toxigenic strains of *Fusarium verticillioides* in corn by electronic olfactory system., **Biochemical.**, 108: 250-257.

[47]. Guihong Y, Hongxiang M, Zhang X, Lijian R, Moping Z, and Weizhong L., (2001)., Cloning a DNA marker associated wheat scab resistance., **J.Appl. Genet.**, 15:17-25.

[48]. Gowsami R.S and Kistler H.C., (2004), Heading for disaster. *Fusarium graminearum* on cereal crops.*Mol.*, **Plant pathol.** 5:515-525.

[49]. Hancock J.F.,(1992), Cereal grains. In: plant evolution and the origin of crop species. **Eds. Huber L.A. prentice- Hall**, Inc. New Jersey.

[50]. Harlan J.R., (1981), The early history of wheat, **in: wheat science today and tomorrow**, Cambridge university Press, Cambridge, UK, pp: 1-19.

- [51]. Harris L.J, Desjardin. A.E., planter R.D,(1999), possible role in trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize, **Plant disease**, 83:954-960.
- [52]. Harris L.J. and Gleddie S.G., (2001), A modified RPL3 gene from rice confers tolerance to *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol in transgenic tobacco. **Physiol.Mol. plant. Pathol.** 58: 173-181.
- [53]. Hiei Y., Ohta S., Komari T., and Komashiro T., (1994), Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence-analysis of the boundaries of the T-DNA, **Plant journal** 6: 271-282.
- [54]. Higa A., Kimura A., Mimori K., Ochiaifukuda T., Tokai T., Takahashi- Ando N., Nihuchi T., Igawa T., Fujimura M., Hamamoto H., Usami R., Yamaguchi I., (2003), Expression in cereal plants of genes that inactivated *Fusarium* mycotoxins. **Bio.Sci.Biotechnol. Biochem.** 67: 914-918.
- [55]. Igawa T., Takahashi N., Ohsato S and Kimura M. (2006)., Reduced Contamination by the *Fusarium* Mycotoxin Zearalenone in Maize Kernels through Genetic Modification with a Detoxification Gene., **Plant Cell Rep.** 11:586-591.
- [56]. Jahne A., Becker D., Lorz H., (1995), Genetic engineering of cereal crop plants: A review, **Euphytica** 85: 35-44.
- [57]. Jenkinson P., Parry D.W, (1994), Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. **Mycol. Res.** 98:506-10.
- [58]. Jones D.A, Thomas K.E, Hammond-Kossack K, Balint-Kurti P.J, and Jones J.D.G, (1994), Isolation of tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* tagging, **Science** 266: 789-793.
- [59]. Kimura M, Anzai H, and Yamaguchi I., (2003)., Microbial toxin in plant- Pathogen interactions: Biosynthesis resistance mechanisms and significance., **J. Gen. Appl. Microbial.**, 47: 149-6.
- [60]. Kimura M, Kaneko I., Komiyama M, (1998), Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organisms and transformed yeast from related mycotoxins, **J.Biol.Chem** 273(3): 1654-1661.
- [61]. Klein, T. M, Wolf E. D, Wu R, and Sanford J. C., (1987), High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, 327:70-73.
- [62]. Knott D.R., (1961), the inheritance of rust resistance, VI. The transfer of stem rust resistance from *Agropyron elongatum* to common wheat. **Canadian journal of plant science** 41: 109-123.
- [63]. Lemmens M, Scholz V, Berthiller F, and Ollasta C, Koutnik A, Schalmache R, Adam G, Burstmayr H, Mesterhazy A, Krska R, Rukenbuer P., (2005)., The ability to detoxify the

mycotoxin deoxynivalenol co localizes with a major quantities trait locus for fusarium head blight resistance in wheat., *Mol Plant Microb Interact.*, 18:1318-214.

[64]. Lev-Yadun, S, Gopher, A, Abbo, S (2000). ,The cradle of agriculture, **Science** 288 (5471): 1602–3.

[65]. Lazzeri P.A., Barcelo P., Barro F., Rooke L., Cannel M.E., Rasco-Gaunt S., Tatham A., Fido R., and shewry P.R., (1997), Biotechnology of cereals: Genetic manipulation techniques and their use for the improvement of quality, resistance and input use efficiency traits, **Aspects of Applied Biology** 50: 1-8.

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

[67]. McCormick SP, Hohn TM, Desjardins AE, (1996), isolation and characterization of TRI3, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichoides*, **Appl Environ Microbiol** 62: 353-359.

[68]. McCormick SP, Alexander NJ, Trapp SE, and Hohn TM, (1999), Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichoides*, **Appl Environ Microbiol** 65: 5252-5256.

[69]. McLaughlin CS, Vaghn MH, Cambell HM, Wei CM, Stafford ME, (1977), inhibition of protein synthesis by trichothecene, in **Mycotoxins in Human and Animal Health**, Rodrichs JV, Hesseltine CW, Hehlman MA(eds), Pathotoxin publishers: Park forest, IL: 263-273.

[70]. Meskauskas A. Petrov A., and Dinman J.D., (2005), identification of functionally important amino acid of ribosomal protein L3 by saturation mutagenesis., **Mol. Cell. Biol.** 25: 10863-10874.

[71]. Miedaner T, Schneider B, and Geiger H. H., (2007)., Deoxynivalenol (DON) Content and Fusarium Head Blight Resistance in Segregating Populations of Winter Rye and Winter Wheat., **Crop Science.**, 43: 519-526.

[72]. Mitterbaure R. (2000), Molecular mechanisms of trichothecene resistance and development of a yeast-based bioassay for zearalenone., **Ph.D thesis., university of Agricultural science**, Vienna, Austria.

[73]. Mitterbaure R, Poppenberger B, Raditsching A, (2004), Toxin dependent utilization of engineered ribosomal protein L3 limits trichothecene resistance in transgenic plants, **Plant Biotechnol**, 2: 329-340.

[74]. Nakajima H, Muranaka T, Ishige F, Akatsu K, and Oeda K, (1997), fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme, **Plant Cell Rep**, 16: 674-679.

[75]. Nelson L. Brock and huss H., (2013)., Genetic Dissection of Sesquiterpene Biosynthesis by *Fusarium fujikuroi*., **ChemBioChem.**, 14: 311-315.

[76]. Neuhaus J.M, (1999), Plant chitinases in pathogenesis-related proteins in plants, Edited by S.K. Datta and S. Muthukrishnan, **CRS Press, Boca Raton, Fla**, PP: 77-105.

[77]. Ohasto M, Collins SR, Miller KM, Maas NL, Roguev A, Fillingham J, Chu CS, Schuldiner M, Gebbia M, Recht J, Shales M, Ding H, Xu H, Han J, Ingvarsdottir K, Cheng B, Andrews B, Boone C, Berger SL, Hieter P, Zhang Z, Brown GW, Ingles CJ, Emili A, Allis CD, Toczyski DP, Weissman JS, Greenblatt JF, Krogan NJ, (2007), Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map, **Nature**, 446(7137):806-10.

[78]. Okubara PA, AE, Blech., S.P. McCormic and N.J. Alexander. (2000), Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichotecen acetyl transferase gene. **Theor Appl Genet**, Vol.106 pp: 74-83.

[79]. Parry D. W, Bayles R. A, and Mcleod L., (1995)., Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals- a review., **Plant Pathol.**, 44: 207-238.

[80]. Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshin D, Siebere T, Schuhmacher R, Kuchler K, Luschning C, Adam G, (2003), Detoxification of Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by UDP-glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*, **J. Biol. Chem**, 278: 47905-47914.

[81]. Prandini A, Sigolo S, Filippi L, Battilani P, Piva G (2009), Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat, **Food Chem Toxicol** 47(5):927-31.

[82]. Punja Z. K, (2007), Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens (a review of progress and future prospects), **J. Plant Pathol.** 23: 216–235.

[83]. Rees DC, Johnson E, Lewinson O (2009). ABC transporters: the power to change. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 10 (3): 218–27.

[84]. Rider M, Plaschke J, Koenig S.U, Borner A, Sorrells M.E, Tanksley S.D, and Ganai M.W, (1995), Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat, **Molecular and General Genetics** 246:327-333.

[85]. Rosado IV, Kressler D, de la Cruz J. (2007)., Functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein Rpl3p in ribosome synthesis. **Nucleic Acids Res.** 35(12):4203-13.

[86]. Ruckebauer P., Buerstmayr H., Lemmens M, (2001), Present strategies in resistance breeding against scab. **Euphytica**, 119:121-127.

[87]. Safipour Afshar A., Mousavi A., Majd., Adam R and G, (2007). Double Mutation in Tomato Ribosomal Protein L3 cDNA Confers Tolerance to Deoxynivalenol (DON) in Transgenic Tobacco. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 10: 2327-2333.

- [88]. Sanford JC, Klein T. M, Wolf E. D, and Allen N., (1987), Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particulate Science and Technology** 5:27-37.
- [89]. Sewald N., Lepschy J., Gleissenthall V, (1992), Structure elucidation of a plant metabolite of 4- dioxynivalenol. **Tetrahedron: Asymmetry**. 3:953-60.
- [90]. Shahbazi S, Alizadeh A, Mousavi A, Safaie N, Sanjarian F, Aminian P., (2009)., transformed tobacco expressing *ScAYT1* detoxifies deoxynivalenol in extract of dsRNA and cured isolates *Fusarium graminearum*., **Trakia Journal of Sciences**., 7:18-27.
- [91]. Shaw MV, Leslie AGW, (1991), Chloramphenicol acetyltransferase, **Ann Rev Biophys Biophys chem**, 20: 363-386.
- [92]. Shewry P.R, Halford N.G, and Tatham A.S, (1989), The high-molecular-weight subunits of wheat, barley and rye: Genetics, Molecular biology, Chemistry and role in wheat gluten structure and functionality, in: B.J Mifflin(ed), **Oxford surveys of plant Molecular and Cell Biology**, Oxford university press, Oxford, PP: 163-219.
- [93]. Snijders G.H.A., (2004),, Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. **Toxicol. Letters**. 153: 37-46.
- [94].Southern, Edwin Mellor, (1975), Detection of specific sequences among DNA separated by gel "fragments electrophoresis, **Journal of Molecular Biology**, 98(3): 503-517.
- [95]. Takaichi M, Oeda K, (2000), Transgenic carrots with enhanced resistance against two major pathogens, *Erysiphe heraclei* and *Alternaria dauci*, **Plant Sci**, 153: 135- 144.
- [96].Tanno, K and Willcox, G (2006). How fast was wild wheat domesticated?. **Science** 311 (5769): 1886.
- [97]. Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M.B., Thornto S., and Brettell R., (1997), *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation, **Plant journal** 11: 1369-1376.
- [98].Urban M., Daniels S., Mott E., and Hammond – Kosack K., (2002), Arabidopsis is susceptible to cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*, **The plant J**, 32: 961-973.
- [99]. Van Loon L.C, and Van Strien E.A., (1999), The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiol, Mol, Plant pathol*, 55: 85-97.

- [100]. Wageha A. , Khaled Ghareeb, Josef Böhm and Jürgen Zentek., (2010)., Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation., **Food Additives & Contaminants**., 27: 159-171.
- [101]. Webb KJ, Zurita-Lopez CI, Al-Hadid Q, Laganowsky A, Young BD, Lipson RS, Souda P, Faull KF, Whitelegge JP, Clarke SG., (2010)., A novel 3-methylhistidine modification of yeast ribosomal protein Rpl3 is dependent upon the YIL110W methyltransferase. **J Biol Chem**., 26;285(48):37598-606.
- [102]. Weeks J.T., Anderson O.D., and Blechl A.E., (1993), Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat, **plant physiology** 102: 1077-1084.
- [103]. Wittwer S.H., (1980), The shape of the things to come, **in the biology of crop productivity**, Academic Press, Inc., New York, pp: 413-459.
- [104]. Worland A.J., and law C.N., (1991), Improving disease resistance in wheat by inactivating genes promoting disease susceptibility, **Mutation breeding Newsletter** 38: 2-5.
- [105]. Yoshizawa T., and Morooka N., (1975)., Biological modification of trichothecene mycotoxins: Acetylation and deacetylation of deoxynivalenols., **plant pathol.**, 50: 101-113.
- [106]. Young JC, Trenholm HL, Friend DW, Prelusky DB.,(2003)., Detoxification of deoxynivalenol with sodium bisulfite and evaluation of the effects when pure mycotoxin or contaminated corn was treated and given to pigs. **J Agric Food Chem**. 1987;35:259–261.
- [107].Zambryski, P.; Joos, H.; Genetello, C.; Leemans, J.; Montagu, M. V.; Schell, J. (2010), Transforming Plants - Basic Genetic Engineering Techniques, **The EMBO Journal** (12): 2143–2150.

Abstract

Wheat is an important cereal to be used as staple food and feed. Fusarium head blight (FHB, scab), caused by *Fusarium graminearum*, is a major disease, affecting wheat and other cereals particularly in places with relatively semi- to high humidity. FHB damages plants at heading stage, causing a large economic loss. The fungus produces a mycotoxin known as deoxynivalenol (DON) that affects grain yield and quality. Trichothecene mycotoxins (such as DON) are potent protein synthesis inhibitors with harmful effects on human and livestock. Chemical modification of DON could reduce its accumulation in grain. *AYT1* encodes an enzyme that transfers an acetyl moiety to the C₃ hydroxyl group of trichothecene. In this study, second-generation of seeds with *AYT1* were planted and the seedlings were tested for the presence of the gene via PCR and RT-PCR. Transgene copy number was established via Southern analysis that was indicative of having more than one copy number within the three transgenes tested. Moreover, thin layer chromatography (TLC) showed the presence of the encoded *AYT1* protein. Additionally, bioassay results demonstrated that treatment with the fungal pathogen causes DON detoxification and partial transgenic plant protection.

Keywords: Fusarium Head Blight, deoxynivalenol, acetyltransferase gene, transgenic wheat, molecular analysis.



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

Molecular analysis and evaluation of yeast acetyltransferase gene in second generation of transgenic wheat

Mehrdad Asadian

Supervisors:

Shahrokh Gharanjik

Amir Mousavi

Advisor:

Naser Farrokhi

2013