

اثرات ماده Trichostatin A، بازدارنده هیستون دی استیلاز، بر ریخت شناسی، کنیديوم‌زایی و رشد رویشی *Fusarium graminearum* عامل بلایت فوزاریومی سنبله

گندم

Effects of the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A on morphology, conidiation and vegetative growth of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat Fusarium head blight

شیوا امین^۱، سعید رضائی^{۲*}، امیر موسوی^۳ و حمیدرضا زمانی‌زاده^۴

دریافت: ۱۴۰۳/۴/۳

پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۲۱

چکیده

استیلاسیون یکی از مکانیسم‌های مهم تنظیم بیان ژن در سطح پس از ترجمه می‌باشد که توسط آنزیم‌های هیستون استیل ترانسفراز و هیستون دی استیلاز کنترل می‌شود. آنزیم‌های هیستون دی استیلاز قارچی در بیماری‌زایی، پاسخ‌گویی به تنش‌های محیطی و تولید متابولیت‌های ثانویه اهمیت دارند. بنابراین در این مطالعه، اثرات احتمالی بازدارنده هیستون دی استیلاز Trichostatin A (TSA) بر ریخت‌شناسی *Fusarium graminearum*، عامل بیماری بلایت فوزاریومی، مورد بررسی قرار گرفت. قارچ روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار حاوی TSA (۱/۵، سه و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت و سپس رشد رویشی و ریخت‌شناسی آن در روزهای سوم، پنجم و هفتم پس از کشت ارزیابی شد. رشد شعاعی قارچ پس از سه روز در حضور TSA کاهش یافت. کمترین میزان رشد ریشه‌ها نسبت به شاهد، در روز هفتم در محیط کشت حاوی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از TSA رخ داد. به‌علاوه، TSA موجب القای رشد ریشه‌های هوایی قارچ شد. در آزمون کنیدیوم‌زایی، مقایسه تیمار با شاهد نشان دهنده کاهش تولید کنیدیوم در پاسخ به تمام غلظت‌های TSA بود. کمترین میزان کنیدیوم‌زایی در حضور ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده بازدارنده اتفاق افتاد. نتایج نشان دهنده نقش تغییرات اپی ژنتیکی در تنظیم بیان ژن‌های *F. graminearum* می‌باشند و ممکن است در ارائه راهکارهای جدید برای مدیریت بیماری بلایت فوزاریومی کمک کنند.

واژگان کلیدی: اپی ژنتیک، دی استیلاسیون، کروماتین، *Triticum aestivum*، TSA

مقدمه

در سلول‌های یوکاریوت، اطلاعات ژنتیکی علاوه بر فاکتورهای نسخه‌برداری و توالی‌های تنظیمی در پروموتور ژن‌ها، توسط کروماتین نیز کنترل می‌شوند (Liu et al., 2022). کروماتین از DNA و کمپلکس‌های پروتئینی به نام نوکلئوزوم تشکیل شده است. دو تا از چهار هسته هیستونی H2A، H2B، H3 و H4 در یک اوکتامر قرار می‌گیرند و همراه با ۱۴۷ جفت باز DNA تشکیل یک نوکلئوزوم می‌دهند. تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها که در اثر تحریکات درون و برون سلولی آغاز

۱- دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲ و ۴- به ترتیب استادیار و استاد، گروه گیاهپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: srezaee@srbiau.ac.ir

می‌شوند در بسیاری از فعالیت‌های زیستی دخیل بوده و ارتباط نزدیکی با نسخه‌برداری ژن، تکثیر DNA، تراکم کروماتین و بازسازی آسیب DNA دارند (Song et al., 2023). استیلاسیون یکی از اشکال رایج تغییرات برگشت‌پذیر هیستونی در سطح پس از ترجمه می‌باشد که با فعالیت آنزاگونستی آنزیم‌های Histone acetyltransferases (HATs) و Histone deacetylases (HDACs) کنترل می‌شود (Ranjan et al., 2021). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که آنزیم‌های HDACs از طریق اثرگذاری بر تنظیم فعالیت نسخه‌برداری ژن‌ها، در فرآیندهای متنوع زیستی قارچ‌ها شامل بقا، رشد، بیماری‌زایی و تولید متابولیت‌های مهم مانند توکسین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها نقش بارز و مهمی را بر عهده دارند (Hu et al., 2017). لذا ژن‌های HDACs می‌توانند برای ترکیبات بازدارنده هیستون دی‌استیلاز به‌عنوان گروهی از داروهای جدید برای درمان بیماری‌ها، هدف بسیار مناسبی باشند. این بازدارنده‌ها با اثرگذاری روی پروموتورها و افکتورهای پایین دست به‌صورت انتخابی، بیان ژن‌ها را تغییر داده و موجب القای آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، توقف توسعه سلولی و تمایز می‌شوند (Furumai et al., 2001؛ Baidyaroy et al., 2002؛ Basimia et al., 2013؛ Brando et al., 2015؛ Bauer et al., 2016؛ Pidroni et al., 2018).

Trichostatin A یک آنتی‌بیوتیک طبیعی با فعالیت ضد قارچی است که به‌صورت تجاری از باکتری *Streptomyces hygroscopicus* جداسازی می‌شود (Gaikwad et al., 2015). این ماده با تقلید از لیزین و کلاته کردن اتم روی (Zn) از فعالیت آنزیم‌های هیستون دی‌استیلاز کلاس I و II جلوگیری می‌کند (Villota-Salazar et al., 2023). در گذشته دیده شده است که با اضافه کردن TSA به محیط کشت *Aspergillus fumigatus*، رشد و کنیدیوم‌زایی قارچ با تأخیر انجام می‌شود (Bauer et al., 2016).

قارچ *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorph: *Giberella zeae* (Schweinitz) Petch] در سراسر جهان عامل مهم بیماری بلایت فوزاریومی سنبله در گندم می‌باشد (Alisaac and Mahlein, 2023). این قارچ نه تنها می‌تواند موجب کاهش ۳۰ تا ۷۰ درصدی محصول گندم شود، بلکه می‌تواند توکسین‌های بسیار خطرناکی همچون Deoxynivalenol (DON) و Nivalenol (NIV) را تولید کند که باعث بروز بیماری‌های جدی در انسان و دام می‌شوند (Rezaeian Doloei et al., 2015). ژنوم این قارچ فاقد ترانسپوزون فعال و حاوی کمتر از ۰/۵ درصد عناصر تکراری می‌باشد. همچنین این ژنوم دارای مناطق غنی از ژن‌های منحصر به فردی است که در طول آلودگی میزبان، سطح بیان بالایی دارند. تعدادی از این ژن‌ها در واکنش‌های گیاه میزبان- قارچ بیمارگر درگیرند. این امر نشان می‌دهد که ساختار کروماتین و تغییرات آن در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با آلودگی در این قارچ نیز نقش مهمی دارند (Li et al., 2011). در تحقیقات پیشین، ژن‌های هیستون دی‌استیلازی *FTL1*، *HDF1* و *HP1* در ژنوم *F. graminearum* شناسایی شدند و مشاهده گردید که با حذف آن‌ها تولیدمثل جنسی و غیرجنسی قارچ مختل می‌شود. همچنین در این جهش یافته‌ها میزان تولید DON کاهش یافت، در حالی که میزان تولید Aurofusarin سه تا چهار برابر افزایش پیدا کرد (Ding et al., 2009؛ Li et al., 2011؛ Reyes-Dominguez et al., 2012). حذف ژن *Hep1* در این گونه موجب کاهش سطح نسخه‌برداری ژن‌های *Tri5* و *Tri6* و در نتیجه کاهش تولید توکسین DON می‌شود (Chen et al., 2019).

بنابراین با توجه به خسارت اقتصادی و بهداشتی بیماری بلایت فوزاریومی سنبله به محصول استراتژیک گندم، لزوم توسعه سموم زیستی جدید و مؤثر و توانایی تغییرات اپی‌ژنتیکی در مدیریت بیماری‌ها، باروری، بهره‌وری و سازگاری محیطی سلول‌های یوکاریوتیک (Ibeagha-Awemu et al., 2022)، در این تحقیق به بررسی اثرات احتمالی TSA (دارای پتانسیل معرفی شدن به‌عنوان یک ترکیب زیستی ضد قارچی) روی رشد، کنیدیوم‌زایی و ریخت‌شناسی قارچ عامل این بیماری پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی و شرایط کشت

پانزده جدایه قارچ *F. graminearum* از کلکسیون قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران تهیه گردیدند. به منظور تأیید شناسایی مولکولی گونه، جدایه‌ها پس از تک اسپور شدن، روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار کشت و به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس داخل انکوباتور قرار گرفتند.

شناسایی گونه *Fusarium graminearum* به روش مولکولی

ابتدا قرص‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت سه روزه جدایه‌ها برداشته و روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار قرار داده شدند. تشتک‌های پتری به مدت هفت روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. ریشه‌های قارچ در هاون سترون به کمک ازت مایع پودر شدند. سپس DNA ژنومی از ریشه‌های پودر شده با استفاده از روش مبتنی بر CTAB (Brandfass and Karlovsky, 2008) استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Fg16F و Fg16R (Nicholson *et al.*, 2004) در دستگاه Thermal Cycler مدل T100 ساخت Bio-Rad (California, USA) مطابق ۳۰ چرخه حرارتی، شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه سلسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و سپس پنج دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس، انجام شد. برای هر نمونه، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سه بار تکرار شد. محصول واکنش روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و با استفاده از الکتروفورز جداسازی شد. جهت بررسی اندازه قطعات از نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Thermo Scientific, USA) استفاده گردید. رنگ آمیزی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رنگ اتیدیوم بروماید صورت گرفت و سپس عکس‌برداری زیر نور UV در دستگاه ژل داک (Bio-Rad, USA) انجام شد.

بررسی وجود ژن HDAC در جدایه‌ها و انتخاب جدایه برای بررسی‌های بعدی

با توجه به نقش ژن‌های هیستون دی‌استیلاز در فرآیندهای زیستی قارچ‌ها، در این پژوهش برای تأیید وجود ژن HDAC در جدایه‌های *F. graminearum* و انتخاب جدایه مناسب برای بررسی اثرات احتمالی TSA بر ویژگی‌های مورد نظر قارچ، ابتدا آغازگرهای اختصاصی به شرح زیر بر اساس ترادف ژن مورد نظر (شماره دسترسی: NC_026474) در پایگاه NCBI و با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA X و Primer3 (v.0.4.0) طراحی شدند (Untergrasser *et al.*, 2012; Elias-Villalobos *et al.*, 2015):

HDAC-Forward: 5'-GCGACGACATTCGTGTTGAG-3'

HDAC-Reverse: 5'-TCTGGCGTGACTTTTTGCAG-3'

سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس و سپس ۳۰ چرخه حرارتی با ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه سلسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و در انتها، سه دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. برای هر نمونه، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سه بار تکرار و محصول آن روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

آماده‌سازی و بررسی اثر غلظت‌های TSA بر رشد شعاعی قارچ

در این تحقیق از Trichostatin A (TSA) به شماره کالانمای T8552، تولید شده توسط Sigma-Aldrich (St. Louise, USA)، استفاده گردید. طبق توصیه شرکت سازنده و با توجه به جرم مولکولی TSA ($302/4 \text{ g mol}^{-1}$)، میزان $3/333$ میلی‌لیتر از حلال Dimethyl sulphoxide (DMSO) به ویال یک گرمی TSA تزریق و محلول پایه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

به منظور ارزیابی اثر TSA بر رشد شعاعی قارچ، غلظت‌های $1/5$ ، ۳ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این ماده با استناد به پژوهش انجام شده توسط براندو و همکاران (Brando *et al.*, 2015) انتخاب شدند. سپس با توجه به حجم محیط کشت پایه (۴۵ میلی‌لیتر محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار) و غلظت مورد نظر، مقادیر مناسبی از محلول پایه TSA و همچنین

حلال DMSO (به‌عنوان شاهد) محاسبه و به محیط کشت‌ها در دمای ۵۰ درجه سلسیوس اضافه شدند. محیط‌کشت‌های آماده شده بین تشتک‌های پتری سترون تقسیم شدند. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. جهت بررسی دقیق‌تر تغییرات، سه تشتک پتری شاهد فاقد DMSO نیز تهیه شدند. سپس قرص‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت سه روزه جدایه منتخب برداشته و روی محیط‌کشت‌های مذکور قرار داده شدند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. در روزهای سوم، پنجم و هفتم پس از کشت، رشد شعاعی جدایه مذکور اندازه‌گیری شد (Brando et al., 2015) و سپس درصد تغییرات رشد آن در هر روز نسبت به شاهد فاقد DMSO (با توجه به عدم تفاوت آن با شاهد حاوی DMSO) طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد تغییرات رشد شعاعی نسبت به شاهد} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

C: رشد شعاعی جدایه در تشتک شاهد T: رشد شعاعی جدایه در تشتک حاوی TSA

بررسی اثر غلظت‌های TSA بر ریخت‌شناسی قارچ

جهت تعیین اثر غلظت‌های مختلف TSA بر ریخت‌شناسی قارچ، قرص‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت سه روزه آن برداشته و روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار حاوی غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده TSA و DMSO، تهیه شده مطابق با روش ذکر شده، قرار داده شدند. جهت بررسی دقیق‌تر تغییرات، سه تشتک پتری شاهد فاقد DMSO نیز تهیه شدند. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. رشد قارچ در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف DMSO و فاقد DMSO، در روزهای سوم، پنجم و هفتم پس از کشت مورد مقایسه قرار گرفت. سپس با توجه به متفاوت نبودن رشد قارچ در محیط کشت‌های دارا و فاقد DMSO، این ویژگی در تشتک‌های پتری حاوی غلظت‌های مختلف TSA با تشتک‌های پتری حاوی غلظت‌های متناظر DMSO مقایسه شد (بصیرنیا، ۱۳۹۲).

بررسی اثر غلظت‌های TSA بر کنیدیوم‌زایی قارچ

جهت تعیین اثر غلظت‌های مختلف TSA بر کنیدیوم‌زایی، ابتدا قارچ روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار به مدت سه هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نزدیک نور UV قرار گرفت. سپس سوسپانسیون اسپور با غلظت ۱۰^۶ اسپور بر میلی‌لیتر تهیه شد. از این سوسپانسیون روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار حاوی غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده TSA و DMSO کشت داده شد. جهت بررسی دقیق‌تر تغییرات، سه تشتک پتری شاهد فاقد DMSO نیز تهیه شدند. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد (بصیرنیا، ۱۳۹۲). تشتک‌های پتری به مدت سه هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نزدیک نور UV قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۱ روز، یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون به سطح تشتک‌ها اضافه شد. با استفاده از یک لوپ سترون سطح تشتک شسته و تعداد کنیدیوم‌در یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون با استفاده از لام هماسیتومتر محاسبه گردید (رستمی و صارمی، ۱۳۹۷).

تجزیه و تحلیل آماری

برای تحلیل آماری داده‌های حاصل از بررسی اثر مقادیر مختلف TSA بر رشد شعاعی و کنیدیوم‌زایی قارچ به ترتیب از نرم‌افزارهای SPSS و SAS استفاده شد. تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل با دو فاکتور غلظت‌های مختلف TSA و روزهای اندازه‌گیری هر کدام در سه سطح انجام شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مقایسه شدند.

نتایج

شناسایی گونه *F. graminearum* به روش مولکولی

استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه موجب تکثیر قطعات هدف در محدوده ۴۰۰-۵۰۰ جفت بازی در تمامی جدایه‌ها گردید که از طریق مقایسه آن با نتایج به دست آمده در گذشته (Nicholson *et al.*, 2004)، هویت تمامی جدایه‌ها به عنوان گونه *F. graminearum* مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱).

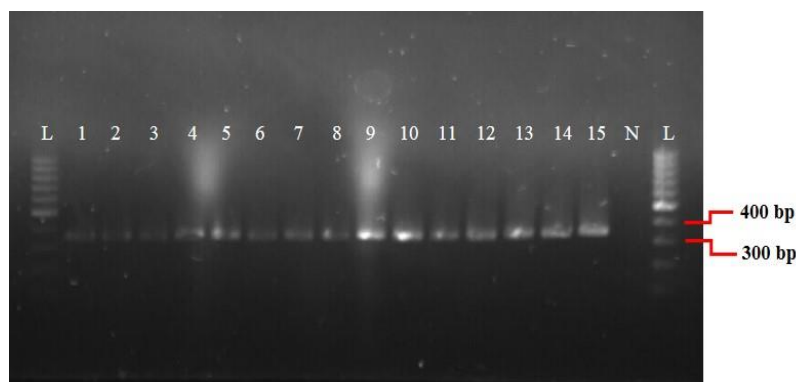


شکل ۱- الگوی الکتروفورزی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاصل از جدایه‌های *F. graminearum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Fg16F/Fg16R. L: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Thermo Scientific, SM0243); N: کنترل منفی (فاقد دی‌ان‌ای الگو); ۱-۱۵: جدایه‌های مختلف *F. graminearum*

Fig. 1. Electrophoretic pattern of Polymerase Chain Reactions products for *F. graminearum* isolates using Fg16F/Fg16R primers. L: 100bp molecular weight marker (Thermo Scientific, SM0243); N: Negative control (without DNA template); 1-15: Different isolates of *F. graminearum*

تأیید وجود ژن HDAC در جدایه‌ها

با هدف تأیید وجود ژن HDAC در جدایه‌ها، تکثیر اختصاصی قطعه هدف با اندازه ۳۴۷ جفت باز از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در تمام ۱۵ جدایه حاصل گردید که نشان‌دهنده وجود ژن مورد نظر در جدایه‌ها بود (شکل ۲). با توجه به حضور ژن HDAC در تمام جدایه‌ها، جدایه ۱۳ برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شد.



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن HDAC در جدایه‌های *F. graminearum*. L: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Thermo Scientific, SM0243); N: کنترل منفی (فاقد دی‌ان‌ای الگو); ۱-۱۵: جدایه‌های مختلف *F. graminearum*

Fig. 2. Electrophoretic pattern of Polymerase Chain Reactions products for HDAC gene in *F. graminearum* isolates. L: 100 bp molecular weight marker (Thermo Scientific, SM0243); N: Negative control (without DNA template); 1-15: Different isolates of *F. graminearum*

بررسی اثر غلظت‌های TSA بر رشد شعاعی قارچ

در جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) دیده می‌شود که چون مقدار صفر برای متغیر غلظت از مقدار ۰/۰۱ کمتر است، فرض صفر مبنی بر برابر بودن اثر بازدارندگی غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از TSA روی رشد شعاعی قارچ رد شده است. به عبارت دیگر واکنش قارچ به غلظت‌های مذکور متفاوت بوده است. همچنین چون مقدار ۰/۰۱۵ برای متغیر زمان از مقدار ۰/۰۱ کمتر است، فرض صفر مبنی بر برابر بودن اثر زمان بر رشد شعاعی *F. graminearum* مردود گردیده است. بنابراین واکنش قارچ در پاسخ به زمان‌های در نظر گرفته شده یکسان نبوده است. در بررسی نتایج اثر تعاملی بین زمان و غلظت، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (Sig> ۰/۰۱) و اثر متقابل بین این دو فاکتور اثبات نشد.

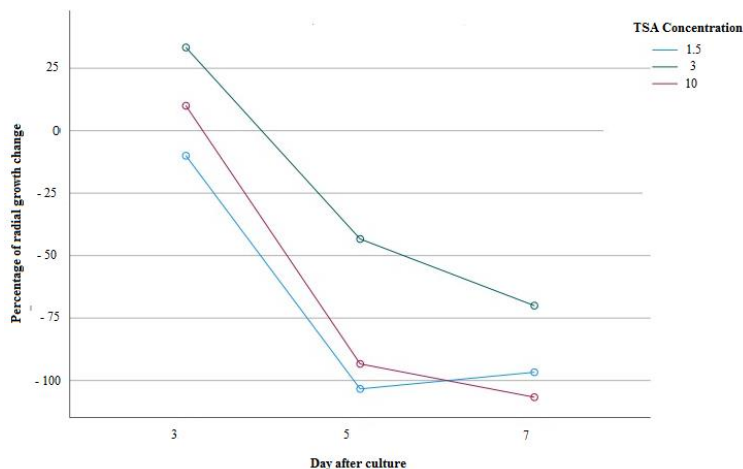
جدول ۱- تجزیه واریانس رشد شعاعی *F. graminearum* در محیط‌کشت حاوی ۱/۵، ۳ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده Trichostatin A در روزهای سوم، پنجم و هفتم پس از کشت

Table 1. Analysis of variance for radial growth changes of *F. graminearum* in culture medium containing 1.5, 3, and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Trichostatin A on days 3, 5, and 7 after inoculation

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آزمون F	معنی‌داری
Source	Sum of squares	df.	Mean square	FF-static	Sig.
روز	11.324	2	5.662	26.878	0.000
غلظت	1.960	2	0.980	4.652	0.015
غلظت×روز	0.276	4	0.069	0.327	0.858
خطا	9.480	45	0.211		
مجموع	23.040	53			

a. R Squared = .589 (Adjusted R Squared = .515)

مقایسه روند بازدارندگی TSA در غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (شکل ۳) نشان داد که این ماده اثر بازدارندگی خود را از روز سوم به بعد بر رشد شعاعی قارچ اعمال کرده است. در روز سوم در مقایسه با شاهد، غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده TSA، بیشترین اثر بازدارندگی را از خود نشان داد و رشد شعاعی قارچ حدود ۷ درصد بود. در حالی که رشد شعاعی میسلیوم‌ها در حضور غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده TSA در حدود ۳۰ درصد و در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حدود ۱۰ درصد بود.



شکل ۳- درصد تغییر رشد شعاعی ریشه *F. graminearum* نسبت به شاهد در پاسخ به غلظت‌های مختلف Trichostatin A

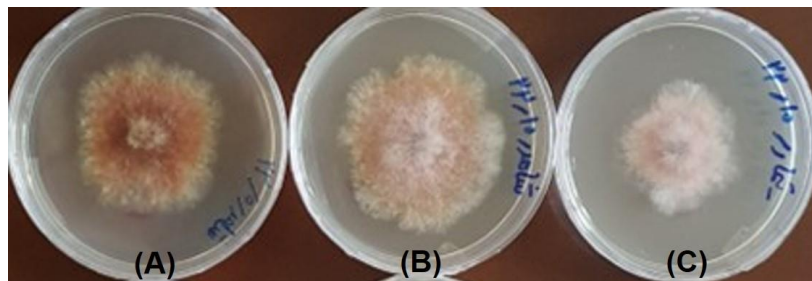
Fig. 3. Percentage change in the radial growth of *F. graminearum* hyphae in response to varying concentrations of Trichostatin A, compared to the control

از روز سوم تا پنجم، رشد شعاعی قارچ در پاسخ به حضور هر سه غلظت TSA در محیط کشت، نسبت به شاهد، کاهش یافت. اگرچه در طی مدت زمان ذکر شده کاهش میزان رشد شعاعی میسیلیوم در غلظت‌های ۱/۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با شیب تندی رخ داد، در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر روند کاهش به صورت تدریجی بود. در روز پنجم، TSA همچنان در غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نسبت به دو غلظت دیگر دارای بیشترین اثر بازدارندگی روی رشد شعاعی قارچ بود. در این روز، رشد شعاعی ریشه‌ها در غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً متوقف گردید ولی در غلظت‌های ۳ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از TSA به ترتیب در حدود ۵۵ و ۱۵ درصد بود.

از روز پنجم تا هفتم، همچنان رشد شعاعی میسیلیوم‌های قارچ در غلظت‌های ۳ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از TSA کاهش یافت. اما در طی این زمان، غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده بازدارنده باعث شد که رشد شعاعی ریشه‌ها کمی روند افزایشی پیدا کند و در روز هفتم، نسبت به شاهد، به حدود ۱۰ درصد برسد. همچنین در روز هفتم، TSA در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای کمترین و در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین اثر مهارکنندگی روی رشد شعاعی قارچ بود.

بررسی اثر غلظت‌های TSA بر ریخت‌شناسی قارچ

با بررسی پرگنه‌ها روی محیط کشت‌های شاهد و تیمار در روزهای سوم، پنجم و هفتم پس از کشت، دیده شد که در حضور غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده بازدارنده TSA، تراکم ریشه‌های هوایی نسبت به شاهد بیشتر است (شکل ۴).



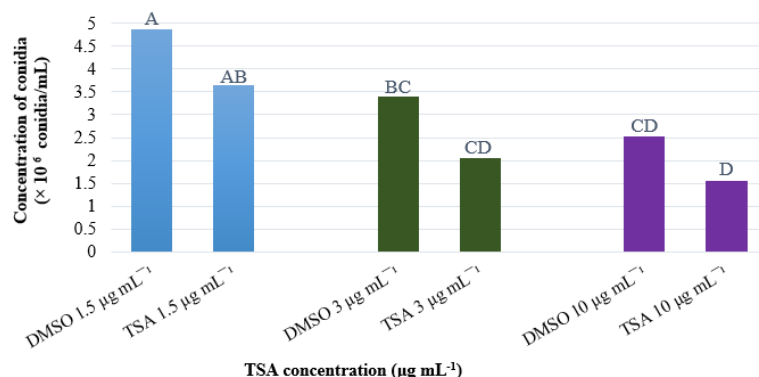
شکل ۴- تأثیر Trichostatin A (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر خصوصیات ریخت‌شناسی *F. graminearum* در روز پنجم پس از کشت. A: شاهد (فاقد DMSO)، B: شاهد (دارای DMSO)، C: تیمار

Fig. 4. Effects of Trichostatin A ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) on *F. graminearum* morphology characters on the fifth day after inoculation. A: Control (without DMSO), B: Control (with DMSO), C: Treatment

بررسی اثر غلظت‌های TSA بر کنیدیوم‌زایی قارچ

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به کنیدیوم‌زایی مشخص کرد که بین غلظت‌های مختلف TSA در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که غلظت‌های مورد بررسی در گروه‌های مختلف A، AB، BC، CD و D قرار گرفتند.

در شکل ۵ نیز اثر غلظت‌های متفاوت TSA بر کنیدیوم‌زایی قارچ در مقایسه با شاهد حاوی DMSO نشان داده شده است. هرچند که در تشتک‌های حاوی DMSO کنیدیوم‌زایی نسبت به تشتک‌های فاقد DMSO کاهش یافته بود (در نمودار نشان داده نشده است) اما بر اساس شکل، قدرت کنیدیوم‌زایی *F. graminearum* در محیط کشت‌های حاوی TSA در مقایسه با شاهد حاوی DMSO نیز کاهش یافته است و کمترین میزان اسپورزایی در حضور TSA با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رخ داد. مقایسه کنیدیوم‌زایی این گونه در تشتک‌های شاهد حاوی DMSO و سایر تیمارها نشان داد که در این آزمایش، غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر TSA در جلوگیری از کنیدیوم‌زایی مؤثرتر بود.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف Trichostatin A بر کنیدیوم‌زایی *F. graminearum*: DMSO: Dimethyl sulfoxide (شاهد)، Trichostatin A (تیمار)

Fig. 5. Effects of different Trichostatin A concentrations on *F. graminearum* conidiation. A-D: Statistical significance groups. DMSO: Dimethyl sulfoxide (Control), TSA: Trichostatin A (Treatment)

بحث

استفاده بی‌رویه و مداوم از قارچ‌کش‌ها در کشاورزی جهت تضمین تولید محصولات سالم و با کیفیت منجر به ظهور جدایه‌های مقاوم در قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی شده است که نسبت به سموم شیمیایی حساسیت کمتری را نشان می‌دهند. برای گریز از این امر و مقابله با چالش امنیت غذایی، توسعه ترکیبات ضد قارچی طبیعی و مؤثر که آنزیم‌ها و فاکتورهای بیماری‌زایی مهمی را در بیمارگر مورد هدف قرار دهند، بدون این که در میزبان گیاهی اثر منفی ایجاد کنند، ضروری به نظر می‌رسد (Sanches-Torres, 2021; Brauer et al., 2020).

مطالعات گوناگون نشان داده است در قارچ‌ها استیلاسیون پروتئین‌ها به صورت گسترده انجام شده و فرآیندهای چندگانه سلولی و تمام چرخه سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین بیان شده است که بازدارنده‌های HDACs می‌تواند دارای اثرات مثبت و هم‌افزایی مانند کاهش بیماری‌زایی، رشد یا کاهش مقاومت به داروهای ضد قارچی ایجاد کند (Pang et al., 2022). اولین بار در سال ۲۰۰۱ نقش HDACs در بیماری‌زایی قارچ‌ها مشخص گردید و این‌طور بیان شد که حذف ژن *HDC1* در قارچ *Cochliobolus carbonum* منجر به کاهش بیان دی‌پلیمرهای خارج سلولی و در نتیجه کاهش بیماری‌زایی روی ذرت می‌شود (Bauer et al., 2016). در سال‌های بعد عملکرد این ژن‌ها در سایر گونه‌های قارچی نیز مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان مثال در گونه *Magnaporthe oryzae* دو ژن *MoHst4* و *MoRpd3* شناسایی شدند که در تنظیم رشد ریشه‌ها، توسعه غیرجنسی و بیماری‌زایی مشارکت داشتند (Lin et al., 2021).

در تحقیق حاضر به بررسی اثرات احتمالی ماده TSA بر رشد، ریخت‌شناسی و کنیدیوم‌زایی قارچ *F. graminearum* پرداخته شد. نتایج نشان دادند که TSA بر خصوصیات این گونه اثر می‌گذارد، ولی عملکرد آن کاملاً تحت تأثیر زمان و غلظت مورد استفاده قرار دارد. در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار حاوی ماده بازدارنده TSA، رشد شعاعی ریشه‌ها در مقایسه با شاهد کاهش یافت. در حضور TSA با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، رشد شعاعی قارچ در روزهای سوم و پنجم، نسبت به شاهد، بسیار کند بود ولی از روز پنجم به بعد کمی افزایش یافت. این افزایش رشد شاید نشان دهد که نیمه عمر ماده بازدارنده در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار با گذشت زمان کاهش می‌یابد. محققین مشاهده کرده‌اند بوتیرات که امروزه به عنوان یک داروی ضد سرطان استفاده می‌شود، نیز در بیماران دارای نیمه‌عمر کوتاه می‌باشد (Zutz et al., 2013). در روزهای مورد بررسی، غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از TSA دارای کمترین اثر مهارکنندگی بر رشد شعاعی میسیلیوم‌های *F. graminearum* بود. شاید بتوان نتیجه گرفت که در این پژوهش، غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از TSA، غلظت آستانه

تحریک کننده نمی باشد. همچنین در این تحقیق مشاهد گردید که بیشترین اثر بازدارندگی TSA روی رشد شعاعی قارچ مربوط به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر در روز هفتم پس از کشت بوده است. این امر شاید نشان دهد که TSA در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اثر مهارکنندگی قوی است اما برای بروز اثر خود نیاز به گذشت زمان دارد. یافته های حاصل از بررسی اثرات TSA بر رشد شعاعی قارچ با مطالعات گذشته همسو می باشد. به عنوان مثال، در محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار در حضور ماده بازدارنده Dihydrocomarin، رشد پرگنه قارچ *M. ruber* روند کاهشی از خود نشان داد (Hu et al., 2017). در قارچ *F. pseudograminearum* حذف ژن *FpDeP1* به عنوان عضوی از کمپلکس هیستون دی استیلازی Rpd3L، منجر به اختلال در فعالیت درون بری سلولی، تولید گونه های اکسیژن فعال در مراحل اولیه آلودگی، کاهش رشد رویشی و کاهش تشکیل ریشه های هوایی در محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار پس از سه روز شد (Zhang et al., 2020). خاموشی ژن *cgHos2* در *Colletotrichum gloeosporioides*، کاهش رشد رویشی و تحمل نسبت به تنش ها و تولید کنیدیوم های غیرطبیعی را به همراه داشت. به علاوه به دلیل نقش مؤثر و مهم *cgHos2* در بیوسنتز ملانین، در جدایه های جهش یافته با کاهش سطح سنتز ملانین قدرت تشکیل اپرسوریوم و بیماری زایی کاهش یافت (Liu et al., 2022). همچنین مشاهده شده است که استفاده از TSA باعث کاهش رشد رویشی، تولید رنگدانه و اندازه میکرواسکلروت های قارچ *Macrophomina phaseolina* در محیط کشت جامد نسبت به شاهد می گردد (Villota-Salazar et al., 2023).

آزمون کنیدیوم زایی در مطالعه حاضر نشان داد که تولید مثل غیرجنسی *F. graminearum* در محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار حاوی TSA نسبت به شاهد کاهش یافت. کمترین میزان تولید کنیدیوم در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از ماده TSA رخ داد؛ لذا ممکن است در غلظت بالای TSA (۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ماده به جای اثرگذاری مستقیم بر کنیدیوم زایی بر زیستایی قارچ اثر گذاشته باشد. بدیهی است درستی این گمان نیاز به مطالعات بیشتر و کامل تر دارد. مشاهدات مشابه نتایج به دست آمده در این آزمون را پشتیبانی می کند. محققین مشاهده کردند که در محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار حاوی غلظت های دو میکرومول، ۱۰ میکرومول و ۵۰ میکرومول از ترکیب بازدارنده Suberanolhydroxamic acid (SAHA)، کمترین میزان تولید کنیدی گونه *A. flavus* متعلق به غلظت ۵۰ میکرومول بوده است. دلیل این امر به کاهش بیان ژن های هیستون دی استیلازی *HosA*، *HosB* و *Rpd1* نسبت داده شد (Basimia et al., 2013). جهش ژن های *HOS2* و *HDA1* باعث کاهش نرخ کنیدیوم زایی و رشد در جدایه های *M. oryzae* روی محیط کشت Oatmeal agar، Yeast glucose agar و Yeast glucose می شود (Izawa et al., 2009). تیمار جدایه های *A. fumigatus* توسط بازدارنده هیستون دی استیلاز TSA موجب کاهش تعداد کنیدیوم ها به دلیل تحت تأثیر قرار گرفتن ژن *Rpd3* گردید (Bauer et al., 2016). همچنین حذف ژن *HstD* (NAD⁺-dependent histone deacetylase) در گونه *Aspergillus terreus* همراه با کاهش کنیدیوم زایی، رشد رویشی و منشعب شدن ریشه ها نسبت به شاهد بود (Yao et al., 2023).

در بررسی تأثیر TSA بر ریخت شناسی *F. graminearum* دیده شد که این ماده موجب افزایش تراکم ریشه های هوایی قارچ در محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار می شود. این احتمال وجود دارد که TSA روی ژن مسئول تمایز سلولی ریشه ها اثر گذاشته و موجب ظهور فنوتیپی شبیه به فنوتیپ *Fluffy* شده باشد. در فنوتیپ *Fluffy*، ریشه های تمایز نیافته، بلند و غیرکنیدی را تشکیل می شوند که روی ریشه های کوتاه کنیدیوم را می پوشانند (Tamame et al., 1983). ظهور فنوتیپ *Fluffy* در محیط کشت قارچ *A. flavus* در پاسخ به حضور ماده SAHA گزارش گردید (Basimia et al., 2013). با توجه به مطالب ذکر شده، شاید بتوان نتیجه گرفت که در *F. graminearum* ژن *HDAC* به صورت مستقیم و غیرمستقیم از طریق دی استیلاسیون پروتئین های هیستونی یا غیرهیستونی موجب القای بیان ژن های درگیر در رشد ریشه و تولید

کنیدیوم می‌شود، زیرا آنزیم‌های دی‌استیلاز علاوه بر نقش کلاسیک خود در سرکوب بیان ژن‌ها، می‌تواند از طریق دی‌استیله کردن هیستون‌های استیله شده باعث القای نسخه‌برداری شوند. همچنین اثبات شده است که این آنزیم‌ها می‌توانند موجب تغییر پروتئین‌های غیرهیستونی مانند فاکتورهای نسخه‌برداری شوند (Pidroni et al., 2018). نتایج به‌دست آمده می‌تواند نشان دهنده اهمیت پدیده استیلاسیون در بیان ژن‌های *F. ginearum* باشد. داده‌های مولکولی به‌دست آمده توسط نویسندگان پژوهش پیش‌رو، نتایج این مطالعه را تأیید کردند. در جدایه‌های *F. ginearum* بیان ژن‌های HDAC و *Tri5* (کد کننده Trichodiene synthase در مسیر سنتز تریکوتسن‌ها) در محیط‌کشت‌های مایع سیب‌زمینی-دکستروز-براث حاوی غلظت‌های ۳ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از TSA تغییر یافت. در این آزمون، اثر بازدارندگی TSA نیز تحت تأثیر غلظت و زمان قرار داشت (Amin et al., 2024).

نتیجه‌گیری کلی

بررسی و کنترل تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها در تنظیم بیان ژن‌های قارچ‌های بیمارگر گیاهی در طول فرآیند آلوده‌سازی میزبان، زمینه‌ای در حال رشد است و هنوز در مراحل اولیه توسعه خود قرار دارد. نتایج این تحقیق گویای نقش احتمالی مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی در تنظیم بیان ژن‌های بیماری‌زایی گونه *F. graminearum* می‌باشد. این مطالعه شاید بتواند منجر به افزایش اطلاعات لازم برای تولید سموم زیستی جدید جهت کنترل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم شود.

سپاسگزاری

این تحقیق نتایج بخشی از رساله دکتری نگارنده اول است که با حمایت مالی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی انجام شده است. همچنین از زحمات آقای مهندس شهاب حاج منصور، مسئول آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی، مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی قدردانی می‌گردد.

References

منابع

- بصیرنیا، ط. ۱۳۹۲. مطالعه مولکولی و بیوشیمیایی نقش histone deacetylases در قارچ *Aspergillus flavus* عامل آلودگی پسته. پایان‌نامه دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران. ۱۵۱ صفحه.
- رستمی، ا. و صارمی، ح. ۱۳۹۷. بررسی تأثیر عامل‌های مؤثر در میزان تشکیل پروتوپلاست در قارچ *F. oxysporum* با هدف استفاده در امتزاج پروتوپلاست. دانش گیاهپزشکی ایران ۴۹(۱): ۱۶۴-۱۵۵.
- Alisaac, E. and Mahlein, A.K. 2023. Fusarium head blight on wheat: Biology, modern detection and diagnosis and integrated disease management. Toxins 15(3): 192. doi: 10.3390/toxins15030192.
- Amin, S., Rezaee, S., Mousavi, A. and Zamanizadeh, H. 2024. The histone deacetylase inhibitor Trichostatin-A modifies the expression of trichothecene mycotoxin regulatory gene *Tri5* in *Fusarium graminearum*. Iranian Journal of Biotechnology 22(3): 90-100. doi: 10.30498/ijb.2024.437331.3872.
- Baidyaroy, D., Brosch, G., Graessle, S., Trojer, D. and Walton, J. 2002. Characterization of inhibitor resistant histone deacetylase activity in plant pathogenic fungi. Eucaryotic Cell 1(4): 538-547. doi: 10.1128/EC.1.4.538-547.
- Basimia, T., Rezaee, S., Zamanizadeh, H. and Mousavi, A. 2013. SAHA, histone deacetylase inhibitor causes reduction of aflatoxin production and conidiation in the *Aspergillus flavus*. Iranian Journal of Biotechnology 3(12): 9-12.
- Bauer, I., Varadarajan, D., Pidroni, A., Gross, S., Vergeiner, S., Faber, B., Hermann, M., Tribus, M., Brosch, G. and Graessle, S. 2016. A class 1 histone deacetylase with potential as an antifungal target. mBio 7(6): e00831-16. doi: 10.1128/mBio.00831-16.

- Brandfass, C. and Karlovsky, P. 2008.** Upscaled CTAB-Based DNA extraction and Real-Time PCR assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in plant material with reduced sampling error. *International Journal of Molecular Science* 9: 2306-2321. doi: 10.3390/ijms9112306.
- Brando, F., Derengoski, L., Albuquerque, R., Nicola, A., Silva-Pereria, I. and Pocas-Fonseca, M.J. 2015.** Histone deacetylases inhibitors effect on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. *Virulence* 6(6): 618-30. doi: 10.1080/21505594.2015.1038014.
- Brauer, E.K., Subramaniam, R. and Harris, L.J. 2020.** Regulation and dynamics of gene expression during the life cycle of *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 110(8): 1368-1374. doi: 10.1094/PHYTO-03-20-0080-IA.
- Chen, Y., Kistler, H.C. and Ma, Z. 2019.** *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: biosynthesis, regulation, and management. *Annual Review of Phytopathology* 57: 15–39. doi: 10.1146/annurev-phyto-082718-100318.
- Ding, S., Mehrabi, R., Kotten, C., Kang, Z., Wei, Y., Seong, K., Kistler, H. and Xu, J. 2009.** Transducin Beta-like gene *FTL1* is essential for pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Eucaryotic Cell* 8(6): 867-876. doi:10.1128/EC.00048-09.
- Elias-Villalobos, A., Fernandez-Alvarez, A., Moreno-Sanchez, I., Helmlinger, D.I. and Ibeas, J. 2015.** The *Hos2* histone deacetylase controls *Ustilago maydis* virulence through direct regulation of mating-type genes. *Pathogens* 11(8): e1005134. doi: 10.1371/journal.ppat.1005134.
- Furumai, K., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M. and Horinouchi, S. 2001.** Potent histone deacetylase inhibitors built from Trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics inducing Trapoxin. *PANS* 98(1): 87-92. doi: 10.1073/pnas.98.1.87.
- Gaikwad, A., Sagar, V. and Pandey, A. 2015.** Natural HDAC Inhibitors: Nature's answer to the cancer. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 1(1): 26-36.
- Hu, Y., Zhou, Y., Mao, Z., Chen, F. and Shao, Y. 2017.** NAD⁺-dependent HDAC inhibitor stimulates *Monascus* pigment production but inhibits citrinin. *AMB Express* 7(1): 166. doi:10.1186/s13568-017-0467-1.
- Ibeagha-Awemu, E.M., Kiefer, H., McKay, S.E. and Liu, G. 2022.** Editorial: Epigenetic variation influences on livestock production and disease traits. *Frontiers in Genetic* 13: 942747. doi: 10.3389/fgene.2022.942747.
- Izawa, M., Takekawa, O., Arie, T., Teraoka, T., Yoshida, M., Kimura, M. and Kamakura, T. 2009.** Inhibition of histone deacetylase causes reduction of appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General and Applied Microbiology* 55: 489-498. doi.org/10.2323/jgam.55.489.
- Li, Y., Wang, C., Liu, W., Wang, G., Kang, Z., Kistler, H. and Xu, J. 2011.** The *HDF1* histone deacetylase gene is important for conidiation, sexual reproduction, and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 24(4): 487-496. doi: 10.1094/MPMI-10-10-0233.
- Lin, C., Cao, X., Qu, Z., Zhang, S., Naqvi, N. and Deng, Y. 2021.** The histone deacetylases *MoRpd3* and *MoHst4* regulate growth, conidiation, and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *mSphere* 6: e00118-21. doi: 10.1128/mSphere.00118-21.
- Liu, S., Wang, Q., Liu, N., Luo, H., He, C. and An, B. 2022.** The histone deacetylase *Hos2* controls pathogenicity through regulation of melanin biosynthesis and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathological Research* 4(1): 1-13. doi: 10.1186/s42483-022-00126-0.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Wilson, A.H., Chandler, E. and Thomsett, M. 2004.** Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small grain cereals. *European Journal of Plant Pathology* 110: 503-514. doi: 10.1023/B:EJPP.0000032390.65641.a7.
- Pang, N., Sun, J., Che, S. and Yang, N. 2022.** Structural characterization of fungus-specific histone deacetylase *Hos3* provides insights into developing selective inhibitors with antifungal activity. *Journal of Biological Chemistry* 298(7): 102068. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102068.
- Pidroni, A., Faber, B., Brosch, G., Bauer, I. and Graessle, S. 2018.** A class 1 histone deacetylase as a major regulator of secondary metabolite production in *Aspergillus nidulans*. *Frontier in Microbiology* 29: 2212. doi: 10.3389/fmicb.2018.02212.
- Ranjan, K., Brandao, F.V., Morais, J., Muehlmann, L., Silva-Pereira, I., Bocca, A., Matos, L. and Pocas-Fonseca, M. 2021.** The role of *Cryptococcus neoformans* histone deacetylase genes in the response to antifungal drugs, epigenetic modulators and to photodynamic therapy mediated by an aluminium

- phthalocyanine chloride nanoemulsion *in vitro*. Journal of Photochemistry and Photobiology 216: 112-131. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112131.
- Reyes-Dominguez, Y., Boedi, S., Sulyok, M., Wiesenberger, G., Stoppacher, N., Krska, R. and Strauss, J. 2012.** Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. Fungal Genetics and Biology 49: 39-47. doi: 10.1016/j.fgb.2011.11.002.
- Rezaeian Doloei, R., Rezaee, S., Mirabolfathy, M., Zamanizadeh, H., Razavi, M. and Karami-Osboo, R. 2015.** Genetic analysis of Deoxynivalenol and Nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* on wheat in Iran. Applied Entomology and Phytopathology 83(1): 1-11.
- Sanches-Torres, P. 2021.** Molecular mechanisms underlying fungicide resistance in *Citrus* Postharvest Green Mold. Journal of Fungi 7(9): 783. doi: 10.3390/jof7090783.
- Song, H., Shen, R., Liu, X., Yang, X. and Xie, K. 2023.** Histone post-translational modification and the DNA damage response. Genes and Diseases 10(4): 1429-1444. doi: 10.1016/j.gendis.2022.04.002.
- Tamame, M., Antequera, F.R., Villanueva, J. and Santos, T. 1983.** High-frequency conversion to a "Fluffy" developmental phenotype in *Aspergillus* spp. by 5-Azacytidine treatment: Evidence for involvement of a single nuclear gene. Molecular and Cellular Biology. 3(12): 2287-2297. doi: 10.1128/mcb.3.12.2287-2297.1983.
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J.C., Faircloth, B., Remm, M.G. and Rosen, S. 2012.** Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40(15): e115. doi: 10.1093/nar/gks596.
- Villota-Salazar, N., Ramos-Garcia, V., Gonzales-Prieto, G. and Hernandez-Delgado, S. 2023.** Effects of chemical inhibition of histone deacetylase proteins in the growth and virulence of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Revista Argentina de Microbiologia. 55(4): 296-306. doi: 10.1016/j.ram.2023.04.002.
- Yao, G., Han, N., Zheng, H. and Wang, L. 2023.** The histone deacetylase *HstD* regulates fungal growth, development, and secondary metabolite biosynthesis in *Aspergillus terreus*. International Journal of Molecular Science 24: 12569. doi:10.3390/ijms241612569.
- Zhang, N., Yang, Z., Zhang, Z. and Liang, W. 2020.** BcRPD3-mediated histone deacetylation is involved in growth and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. Frontier in Microbiology 11: 1832. doi: 10.3389/Ffmicb.2020.01832.
- Zutz, C., Gacek, A., Sulyok, M., Wanger, M., Strauss, J. and Rychli, K. 2013.** Small chemical chromatin effectors alter secondary metabolite production in *Aspergillus clavatus*. Toxins 5: 1723-1741. doi: 10.3390/toxins5101723.

Effects of the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A on morphology, conidiation and vegetative growth of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat Fusarium head blight

Sh. Amin¹, S. Rezaee^{2*}, A. Mousavi³ and H.R. Zamanizadeh⁴

Received: 23 Jun., 2024

Accepted: 11 Sep., 2024

ABSTRACT

Acetylation is an important mechanism to regulate gene expression at a post-translational level. The process is catalyzed by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). HDACs play an essential role in fungal pathogenesis, response to environmental stress, and production of secondary metabolites. Therefore, this study aims to investigate the possible effects of Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, on the morphology of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium Head Blight disease. The fungus was grown on PDA medium supplemented with TSA at different dosages of 1.5, 3, and 10 µg mL⁻¹. The vegetative growth and morphological characteristics of the fungi were evaluated on days 3, 5, and 7 after inoculation. Radial growth of the fungi was significantly suppressed by TSA after three days of exposure. Compared to the control, the lowest mycelial growth was observed in culture media supplemented with 10 µg mL⁻¹ TSA on day seven. Additionally, TSA caused aerial hyphae formation. Conidia production decreased in response to all concentrations of TSA, and the minimum conidiation occurred in the highest concentration (10 µg mL⁻¹). The results showed the role of epigenetic modifications in *F. graminearum* gene expression and may help to provide new strategies to manage Fusarium head blight disease.

Key words: Chromatin, Deacetylation, Epigenetics, *Triticum aestivum*, TSA

1. Ph. D. student, Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 and 4. Assistant Professor and Professor, respectively, Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Associate Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

Corresponding author: srezaee@srbiau.ac.ir