مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٢، تابستان ١٣٩٤، ١٧٦-١٦٥

تاثیر نانوذرات کبالت روی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز سزامین در کنجد (*Sesamum indicum* L.)

مریم حیدری فر .M.Sc[1]، فاطمه دهقان نیری .Ph.D[2]*

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی و مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، قزوین، ایران
۲- دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی و مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، قزوین، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: nayeri@ENG.ikiu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۶

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات کبالت بر میزان بیان ژن‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز سزامین شامل CYP81Q1، CYP81Q2، CYP81Q3 و C3H در کشت سوسپانسیون سلولی کنجد بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی کنجد انجام شد. برای این منظور از ریزنمونه هیپوکوتیل رقم کرج۱، ساکارز، ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد. الیسیتور نانوکبالت با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر در سوسپانسیون سلولی ۱۸ روزه اعمال شد و نمونه‌برداری در سه زمان ۲، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تیمار صورت گرفت. میزان بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزامین با روش Real-Time qRT-PCR اندازه‌گیری شد. آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از Excel انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که محیط MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، دمای ۲۶°C، سرعت شیکر ۱۳۰ دور در دقیقه و تاریکی برای تولید سوسپانسیون سلولی کنجد با غلظت بالای سلول‌ها شرایط مناسبی هستند. افزودن نانوذرات کبالت به کشت سوسپانسیون منجر به افزایش سطح بیان ژن‌ها در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور در زمان‌های مختلف گردید. از آنجائیکه هیچ یک از سطوح مورد استفاده برای غلظت الیسیتور تاثیر منفی روی بیان ژن‌های مذکور نداشتند می‌توان اثر غلظت‌های بالاتر را نیز روی میزان بیان این ژن‌ها بررسی کرد. تاثیر منفی الیسیتور به معنی کاهش بیان ژن‌هاو کاهش میزان سزامین است.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج حاصل نانوکبالت باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در سنتز سزامین می‌شود و بنابراین، از این الیسیتور می‌توان برای القای بیان بیشتر ژن‌های مذکور استفاده کرد.

واژگان کلیدی: کنجد، کشت سلولی، سزامین، نانوذرات، RT-PCR کمی

مقدمه

گیاهان دارای تنوع وسیعی از متابولیت‌های ثانویه هستند که بیشتر آن‌ها مستقیما در رشد و نمو دخالت ندارند. اغلب متابولیت‌های ثانویه با قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش‌های گوناگون تولید می‌شوند. کشت سوسپانسیون سلولی شامل توده‌های سلولی پراکنده و در حال رشد در محیط کشت مایع در حال تکان خوردن است. این کشت معمولا با انتقال قطعاتی از کالوس ترد و تمایز نیافته به یک محیط کشت مایع که به‌طور یکنواخت و مداوم تکان داده می‌شود، تهیه می‌شود. از کشت سوسپانسیون سلولی به‌عنوان ابزاری برای مطالعه سنتز بیوشیمیایی مواد طبیعی، تولید نیمه صنعتی برخی از ترکیبات طبیعی و تولید محصولات طبیعی دارویی استفاده می‌شود. روغن کنجد از روغن‌های نیمه خشک و با مرغوبیت زیاد است و به‌علت کیفیت عالی روغن، بوی مطبوع و مزه خوب آن، کنجد را ملکه دانه‌های روغنی می‌نامند. همچنین روغن کنجد در مقابل اکسیداسیون بسیار مقاوم می‌باشد که این ویژگی مربوط به ترکیب فنلی به‌نام سزامول است. روغن کنجد دارای مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع است. با وجود این، در مقایسه با سایر روغن‌های خوراکی در مقابل فساد اکسیداتیو بسیار مقاوم است. این پایداری اکسیداتیو تنها به‌دلیل وجود توکوفرول‌ها نیست و بیشتر مربوط به لیگنان‌ها است. لیگنان‌ها از اسیدآمینه فنیل-آلانین و با مزدوج شدن اکسیداتیو p– هیدروکسی‌فنیل‌پروپان تشکیل می‌شوند. در دانه کنجد خام سزامین و سزامولین دو لیگنان اصلی هستند. سزامین دارای خواص ضد سرطان، ضد حساسیت و آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد. این ماده در درمان سرطان پستان، پانکراس، روده، پروستات و ریه موثر است. بسیاری از ژن‌های مسیر تولید سزامین شناسایی شده‌اند. یکی از ژن‌های کلیدی در این مسیر ژن *CYP81Q1* است که با افزایش بیان آن در مراحل تشکیل دانه کنجد محتوای سزامین دانه افزایش می‌یابد (۱). روش **RT-PCR** کمی از حساس‌ترین و معتبرترین روش‌های اندازه‌گیری بیان ژن می‌باشد. اساس این روش بر پایه نسبت بیان ژن موردنظر به ژن خانه‌دار است. یکی از روش‌های نمایش داده‌های RT-PCR کمی روش CT مقایسه‌ای است که به‌عنوان روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (یا FC، (Fold change)، یعنی ژن موردنظر چند برابر ژن خانه‌دار بیان شده است) شناخته می‌شود (۲). از این روش برای بررسی بیان ژن در نمونه‌های مختلف نسبت به نمونه شاهد استفاده می‌شود (۳). از آنجائی‌که گزارش کاملی برای تولید سوسپانسیون سلولی کنجد وجود ندارد هدف از این مطالعه بهینه‌سازی شرایط کشت سوسپانسیون سلولی کنجد و سپس بررسی تاثیر الیسیتور نانوکبالت روی میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز سزامین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی کنجد بود.

مواد و روش‌ها

دانه کنجد رقم کرج۱ از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. در این مطالعه از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) به‌عنوان محیط کشت پایه جهت کشت دانه و تولید گیاه‌چه درون شیشه‌ای، کالوس‌زایی و تهیه سوسپانسیون سلولی استفاده شد.

دانه‌های کنجد ابتدا به‌مدت دو دقیقه در الکل اتانول ۷۰ درصد (v/v) ضدعفونی و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت‌سدیم ۲۰ درصد غوطه‌ور شد و در نهایت با آب مقطر اتوکلاو شده ۳ مرتبه و هر بار به‌مدت دو دقیقه شستشو شد. تمام مراحل ضدعفونی زیر لامینار ایرفلو (laminar air flow) و در ظروف استریل انجام گرفت. پس از ضدعفونی، دانه‌ها در شیشه‌های حاوی محیط MS فاقد هورمون و حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. pH محیط‌های کشت با استفاده از محلول‌های NaOHو HCl یک نرمال در ۵/۸ تنظیم شد. دانه‌ها به منظور جوانه‌زنی به‌مدت ۳ روز در تاریکی نگه‌داری و سپس به اتاق کشت با درجه حرارت ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

کالوس‌زایی کنجد: با توجه به اینکه برای تولید سوسپانسیون سلولی به کالوس با کیفیت بالا نیاز است، کالوس‌زایی با استفاده از هورمون‌های NAA، 2,4-D، BAP و Kin به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. در این پژوهش از هیپوکوتیل (به‌دو حالت عمودی و افقی) و کوتیلدون رقم کرج۱ به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. هر تیمار شامل ۳ پتری‌دیش و در هر پتری‌دیش ۷ ریزنمونه قرار داده شد. پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های کالوس‌زایی پتری‌های حاوی کشت در شرایط تاریکی در اتاقک رشد با حرارت ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. واکشت ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار انجام شد. در آزمایش کالوس‌زایی صفات وزن تر، رنگ و نوع کالوس مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه‌سازی محیط کشت سوسپانسیون سلولی کنجد: براساس نتایج حاصل از آزمایش کالوس‌زایی، کالوس‌های نرم و ترد انتخاب و به محیط مایع MS با ترکیبات مختلف هورمونی منتقل شدند. بعد از دستیابی به بهترین کالوس، آزمایش بهینه‌سازی شرایط سوسپانسیون سلولی انجام شد. در این آزمایش نوع ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون، منبع کربن گلوکز یا ساکارز، نوع و مقدار هورمون‌های NAA، Kin، BAP و 2,4-D، تاریکی یا روشنایی و سرعت شیکر مورد بررسی قرار گرفت.

منحنی رشد سوسپانسیون سلولی کنجد: به‌منظور به‌دست آوردن زمان مناسب جهت بازکشت سوسپانسیون سلولی و نیز زمان مناسب برای اعمال الیسیتور، منحنی رشد سلولی برای محیط‌های حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA رسم شد. وزن تر و وزن خشک سلول‌ها طی ۳۰ روز (هر دو روز یک بار) یادداشت‌برداری شد.

اعمال الیسیتور: برای القای بیان بیشتر ژن‌های مسیر سنتز سزامین از الیسیتور نانوکبالت (زیست شیمی آزما رشد) در محیط کشت سوسپانسیون سلولی کنجد استفاده شد. برای این منظور تیمار نانوکبالت با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر در روز هجدهم (فاز لگاریتمی) در کشت سوسپانسیون سلولی اعمال شد. نمونه‌برداری در ۴ زمان صفر، ۲، ۸ و ۲۴ ساعت انجام شد. آزمایش تیمار سوسپانسیون سلولی کنجد با الیسیتور نانوکبالت در سه تکرار مجزا صورت گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA نمونه‌برداری از کشت‌های سلولی در زمان‌های صفر، ۲، ۸ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیتور انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA کل در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. RNA با استفاده از روش فنل- کلروفرم از سوسپانسیون سلولی استخراج شد (۴). برای حذف آلودگی ژنومی از کیت آنزیم DNase I (شرکت سیناکلون) استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA با استفاده از ژل الکتروفورز و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید. در این روش میزان جذب نمونه RNA در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌منظور بررسی کیفیت RNA اندازه‌گیری شد. این نسبت برای نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌ها، بین ۱/۸ تا ۲ بود که نشانگر کیفیت مطلوب RNA استخراج شده است. cDNA طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (شرکت سیناکلون) تهیه شد. ترکیبات مورد نیاز برای سنتز cDNA در جدول ۱ آورده شده است.

درستی سنتز cDNA با استفاده از آغازگر ژن *18S rRNA* (ژن خانه‌دار) در واکنش PCR مورد تایید قرار گرفت. cDNA به‌دست آمده به‌عنوان الگو برای تکثیر ژن‌های موردنظر استفاده شد.

جدول ۱: مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA

مواد	حجم (۲۰ µl)
Oligo (dT) 100 µM	۱/۲ µl
RNA	۲ µg
DEPC Water	۱۲/۵ µl
reaction buffer 10X	۲ µl
dNTPs 10 mM	۲ µl
Ribolock RNase Inhibitor 2500 u	۰/۵ µl
M-MuL V Reverse transcriptase 10000 u	۱ µl

بررسی بیان ژن‌های دخیل در سنتز سزامین با روش RT-PCR کمی: آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی جهت انجام واکنش‌های PCR و RT-**PCR** کمی براساس توالی‌های موجود ژن‌های کنجد در بانک NCBI و با استفاده از نرم افزار Oligo5 طراحی شدند. صحت آغازگرهای طراحی شده از لحاظ عدم اتصال غیراختصاصی و دایمر آغازگر، با استفاده از Primer Blast در کل ژنوم و همچنین با PCR مورد تایید قرار گرفت. اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن جهت واکنش RT-PCR کمی

نام ژن	شماره دسترسی ژن در NCBI	توالی پرایمرهای رفت و برگشت(5'-3') F/R	Tm (ºC) پرایمر	% GC پرایمر	طول محصول (bp)
CYP81Q1	AB194714	F- TCTCGCTCTCACCTTCGCC R-CTGGGAGAAGTCGTATAGTG	۷۵/۴ ۶۰/۹	۶۰ ۵۰	۱۶۹
CYP81Q2	AB194715	F-CTCTCGCTCTCACCTTCGC R- GGGAGCAGTCGTATAGTGTT	۶۹/ ۶۲/۸	۶۳/۲ ۵۰	۱۶۸
CYP81Q3	AB194716.1	F- GGGAAGAGATACTATGGGGA R- AGCCAGCTTCTTCTCCAAC	۶۴ ۶۵/۷	۵۰ ۵۲/۶	۱۶۲
C3H	AY065995.1	F- GCCCCCACTATGTTAAGGTC R- GTATTCACGCAACACCAAAG	۶۶/ ۶۵/۲	۵۵ ۴۵/۶	۱۷۳
18S rRNA	AJ236041.1	F- TCTTAGTTGGTGGAGCGATT R- GAACATCTAAGGGCATCACA	۶۵/ ۴۶/۶	۴۵ ۴۵	۱۷۱

واکنش *RT-PCR* کمی: میزان بیان چهار ژن دخیل در سنتز سزامین شامل *CYP81Q1*، *CYP81Q2*، *CYP81Q3* و *C3H* با روش RT-PCR کمی مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان از آلوده نبودن ترکیبات به‌کار رفته در این واکنش از کنترل منفی استفاده شد. در این روش از معرف SYBR green (شرکت تاکارای ژاپن) و دستگاه ترمال سایکلر Rotor Gene Q (شرکت کیاژن) استفاده شد. واکنش RT-PCR کمی در میکروپلیت‌های ۷۲ چاهکی و در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. مواد استفاده شده در واکنش طبق جدول ۳ است. برنامه PCR مطابق جدول ۰ و در ۴۰ چرخه انجام شد.

جدول ۳: مواد لازم برای انجام RT-PCR کمی

مواد	حجم (µl)
SYBR green Master Mix (1×)	۷/۵
cDNA Tamplate (50 ng/ µl)	۲/۵
Primer (10 pM each) F/R	۰/۵ + ۰/۵
Distillated water	۴
Total volume	۱۵

جدول ۴: برنامه PCR جهت بررسی بیان ژن‌ها

متغیرها	چرخه اول	چرخه دوم			
	واسرشته‌سازی اولیه	واسرشته‌سازی	اتصال	طویل شدن	منحنی ذوب
دما (ºC)	۹۴	۹۴	۶۱	۷۲	۵۵ به ۹۴
زمان	۳۰ ثانیه	۱۰ثانیه	۲۰ثانیه	۲۰ثانیه	۰/۵ S/Cº (Ramping)

نتایج

انتخاب کالوس و استقرار سوسپانسیون سلولی

با توجه به این‌که برای تهیه سوسپانسیون سلولی به کالوس ترد و شکننده نیاز است کالوس‌های ترد و نرم با رنگ زرد مایل به سبز برای تهیه سوسپانسیون سلولی انتخاب شدند (شکل ۱، الف).

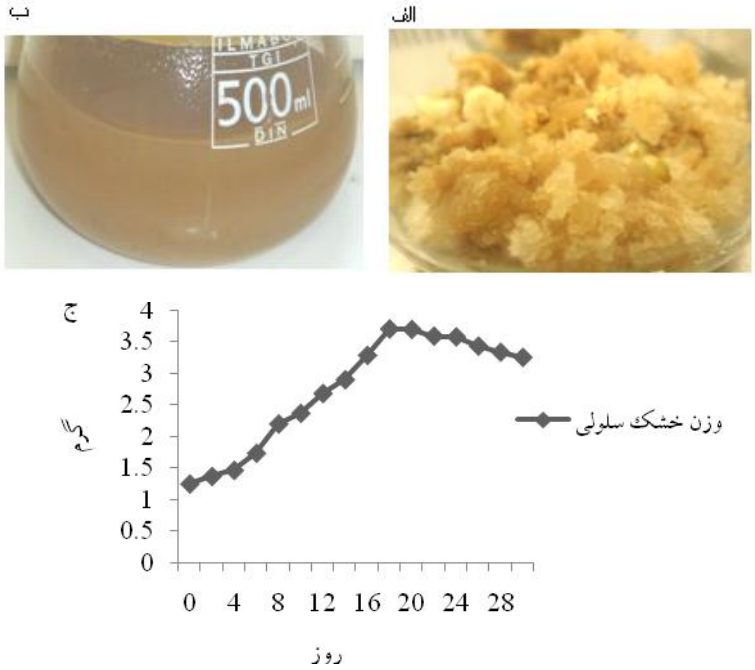
جهت بهینه‌سازی محیط کشت برای تولید سوسپانسیون سلولی با غلظت بالای سلول‌ها آزمایش‌های مختلفی انجام شد. در آزمایش اول بهترین کالوس‌ها از نظر ظاهر برای دو ریز نمونه انتخاب و سوسپانسیون سلولی با همان ترکیبات هورمونی مورد استفاده برای القای کالوس تولید شد. براساس نتیجه آزمایش اول، سوسپانسیون سلولی مطلوبی در هیچ یک از محیط‌های

استفاده شده به‌دست نیامد، مقدار سلول‌های موجود در کشت سوسپانسیون به‌طور چشمی بسیار کم بود و از این‌رو آزمایش جدیدی طراحی شد. در آزمایش دوم قندهای گلوکز و ساکارز با مقدارهای ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم و شرایط تاریکی و روشنایی برای هر دو رقم و هر دو ریزنمونه استفاده شدند. در آزمایش دوم ساکارز ۳۰ میلی‌گرم در لیتر و شرایط تاریکی نسبت به سایر آزمایش‌های انجام شده وضعیت بهتری داشت، اما این سوسپانسیون سلولی نیز از نظر تعداد سلول‌های تکثیر شده مطلوب نبود. در آزمایش سوم بهترین کالوس‌های به‌دست آمده از دو ریزنمونه بررسی و برای هر ریزنمونه ۸ تیمار با کالوس‌زایی مطلوب انتخاب و با به‌کار بردن بهترین کالوس (نرم و زرد روشن) سوسپانسیون سلولی تولید شد. در این آزمایش تیمار ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA سوسپانسیون مطلوبی را از نظر غلظت سلول‌ها تولید کرد. در ادامه برای بررسی این‌که آیا می‌توان با غلظت کمتر از این مقدار نیز سوسپانسیون مطلوبی به‌دست آورد، از غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد. براساس نتایج حاصل با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نیز می‌توان سوسپانسیون مطلوبی را به‌دست آورد ولی با توجه به این‌که بعد از چندین واکشت در این تیمار هورمونی سلول‌ها به سمت ریشه‌زایی تمایز پیدا کردند، لذا محیط حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA برای تهیه سوسپانسیون سلولی کنجد مورد استفاده قرار گرفت. در این تیمار بعد از گذشت ۱۰ ماه هیچ‌گونه تمایززایی مشاهده نشد. از آنجائی‌که هیپوکوتیل رقم کرج۱ نسبت به کوتیلدون آن پاسخ مطلوب‌تری را نشان داد برای تولید سوسپانسیون سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی رشد سلول‌ها در محیط کشت مایع

از سوسپانسیون سلولی در حال رشد هر ۲ روز یک بار نمونه‌برداری صورت گرفت و وزن خشک سلول‌ها برای رسم منحنی رشد سلولی اندازه‌گیری شد. براساس (شکل ۱، ب) در روز هجدهم (بیشترین میزان رشد سلولی) الیسیتور به سوسپانسیون سلولی اضافه شد.

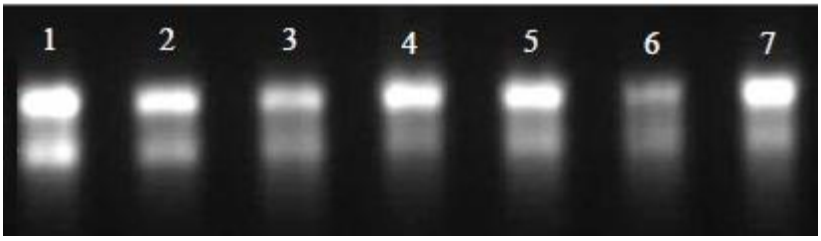
با انتقال کالوس‌های ترد و نرم به محیط MS تازه با ترکیبات قندی و هورمونی پس از یک ماه سوسپانسیون سلولی مناسبی به‌دست آمد. برای داشتن سوسپانسیون سلولی یکنواخت و غنی از سلول، هر ۱۴ روز یک بار واکشت انجام شد. بدین ترتیب بعد از حدود سه ماه سوسپانسیون سلولی متراکم و یکنواخت جهت تیماردهی تولید شد (شکل ۱، ج).



شکل ۱: الف) کالوس تولید شده از هیپوکوتیل رقم کرج۱ که برای تولید سوسپانسیون سلولی استفاده شد. ب) سوسپانسیون سلولی ۱۸ روزه به‌دست آمده از ریزنمونه هیپوکوتیل رقم کرج۱ در محیط حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA. ج) منحنی رشد سلول‌ها در محیط حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA.

استخراج RNA

RNA از نمونه‌های برداشت شده در ۳ تیمار زمانی و ۳ غلظت الیسیتور براساس روش فنل- کلروفرم استخراج شد. کیفیت RNAهای استخراجی با الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگار (w/v) ۱/۵ درصد بررسی شد. آلودگی ژنومی نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I حذف شد. شکل ۲ نمونه‌های RNA را بعد از تیمار با آنزیم DNase I نشان می‌دهد.



شکل ۲: RNA نمونه‌های تیمار شده با نانوکبالت پس از حذف آلودگی ژنومی

واکنش RT-PCR کمی

از روش RT-PCR کمی برای بررسی میزان بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سزامین استفاده شد. در این آزمایش میزان بیان ژن‌ها در همه نمونه‌ها و در ۳ تکرار تکنیکی با استفاده از دستگاه Rotor Gene Q بررسی شد. واکنش RT-PCR کمی در میکروپلیت‌های ۷۲ چاهکی و در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر با استفاده از معرف SYBR green انجام شد. نتایج به‌دست آمده از آنالیز منحنی ذوب نشان داد که تکثیر تمام ژن‌ها به‌صورت اختصاصی و بدون محصولات غیراختصاصی مثل دایمر آغازگر بود. در این آزمایش جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی در ترکیبات مورد استفاده در واکنش از کنترل منفی استفاده شد که نتایج غیرآلوده بودن ترکیبات مورد استفاده را نشان دادند. نرمال‌سازی داده‌های CT مربوط به نمونه‌های مختلف و نمونه شاهد با استفاده از CT ژن مرجع صورت گرفت (ΔCT). سپس ΔCT هر نمونه با ΔCT نمونه شاهد کالیبره شد و تغییر بیان ژن‌ها به‌صورت ΔΔCT- یا Log2FC گزارش گردید.

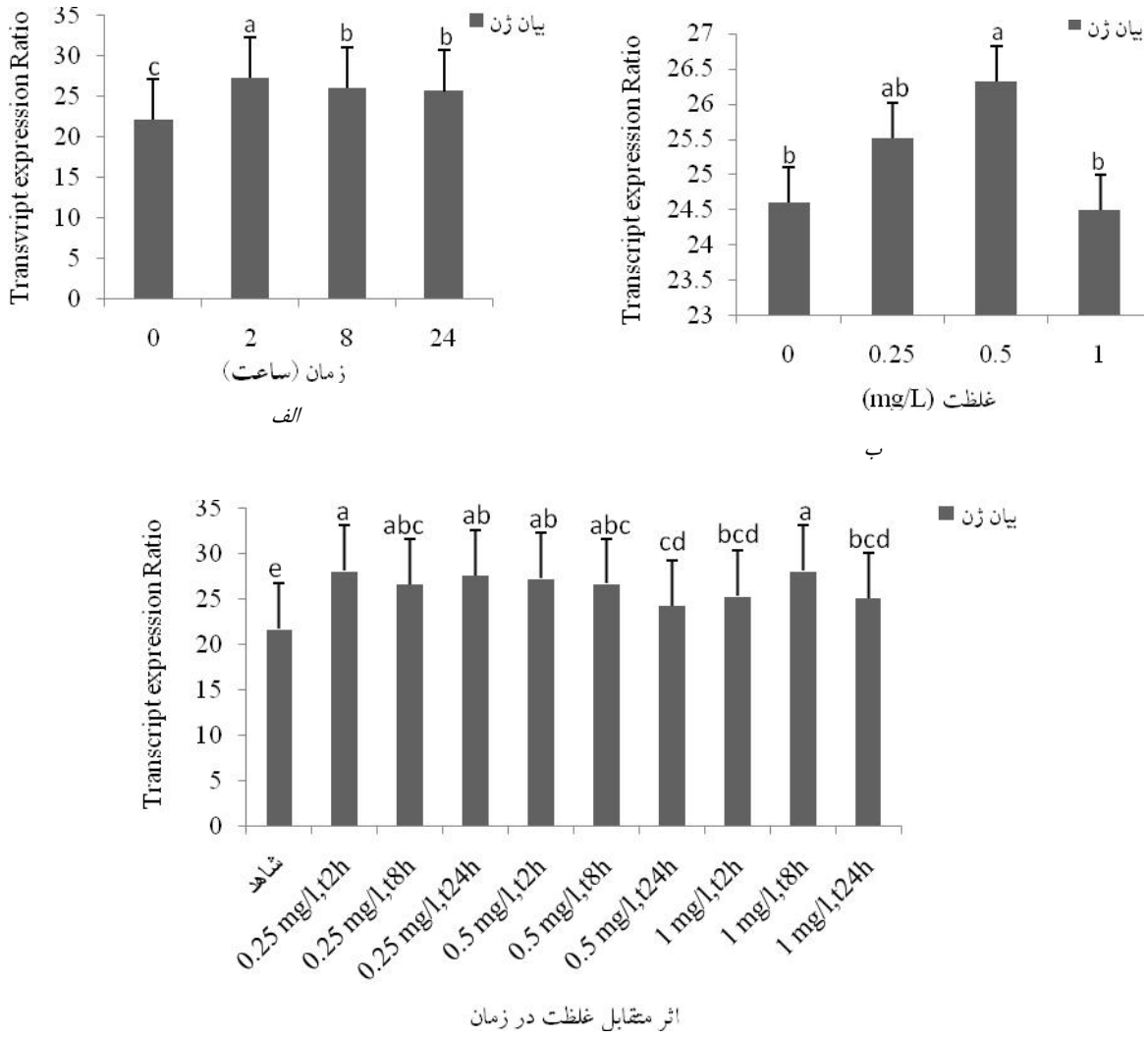
مقایسه میانگین بیان ژن‌ها

بیان ژن CYP81Q1

براساس نتایج مقایسه میانگین اثر زمان بر بیان و بدون در نظر گرفتن غلظت الیسیتور، ژن *CYP81Q1* بیشترین میزان بیان را ۲ ساعت بعد از اعمال الیسیتور داشت. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود اعمال الیسیتور پس از ۲، ۸ و ۲۴ ساعت باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* در مقایسه با نمونه شاهد شد. بین دو زمان ۸ و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری در بیان این ژن مشاهده نشد (شکل ۳، الف).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف الیسیتور بر بیان ژن *CYP81Q1* نشان داد که صرف نظر از زمان، بیشترین تغییر در بیان این ژن در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکبالت به‌دست آمد. براساس نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت بر بیان ژن، با اعمال ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوکبالت تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن نسبت به نمونه شاهد مشاهده نشد (شکل ۳، ب).

در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، بیشترین تغییر در بیان ژن، در زمان ۲ و ۸ ساعت به‌ترتیب بعد از اعمال ۰/۲۵ و ۱میلی‌گرم در لیتر نانوکبالت حاصل شد. اعمال الیسیتور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به نمونه شاهد گردید (شکل ۳، ج).



شکل ۳: الف) بیان ژن CYP81Q1 در تیمارهای زمانی مختلف الیسیتور. ب) بیان ژن CYP81Q1 در غلظت‌های مختلف الیسیتور. ج) اثر متقابل غلظت در زمان بر بیان ژن CYP81Q1.

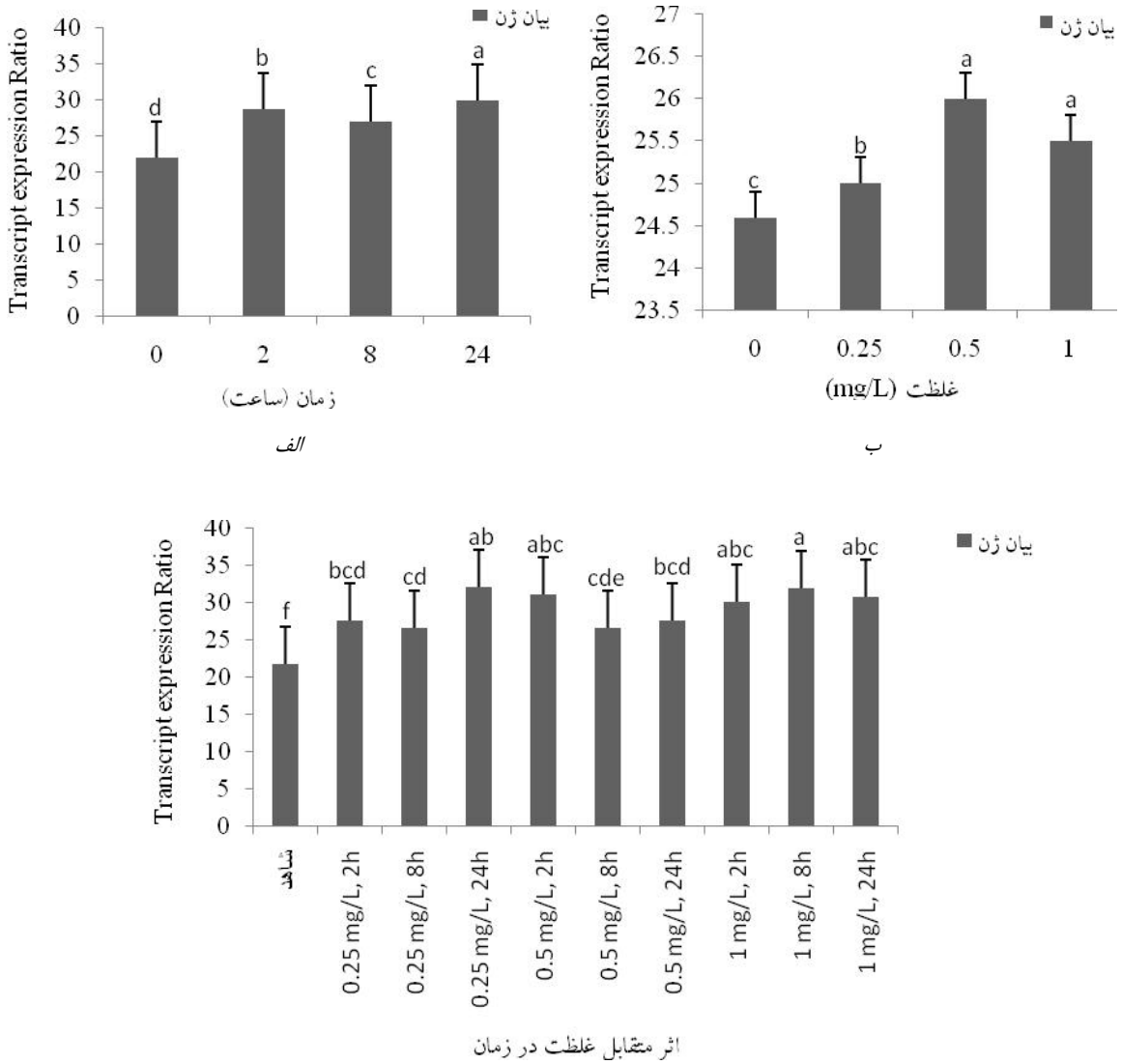
بیان ژن CYP81Q2

براساس نتایج مقایسه میانگین اثر زمان بر بیان ژن *CYP81Q2* بدون در نظر گرفتن غلظت نانوکبالت بیشترین میزان بیان این ژن ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیتور نسبت به سایر زمان‌ها و همچنین نمونه شاهد تعیین شد. با توجه به (شکل ۴، الف) بین بازه‌های زمانی بررسی بیان ژن بعد از اعمال الیسیتور اختلاف معنی‌دار مشاهده شد.

افزودن الیسیتور در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q2* نسبت به بیان آن در نمونه شاهد شد. تفاوت معنی‌دار بین اثر غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بر بیان این ژن مشاهده شد ولی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور تاثیر معنی‌داری روی بیان ژن *CYP81Q2* نسبت به شاهد نداشت (شکل ۴، ب).

در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، بیشترین میزان بیان ژن در زمان ۸ ساعت بعد از اعمال ۱ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور تعیین شد. اعمال الیسیتور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q2* نسبت به نمونه شاهد

گردید (شکل ۴، ج). به‌طورکلی اعمال الیسیتور نانوکبالت باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q2* نسبت به نمونه شاهد شد.



شکل ۴ : الف) اثر زمان بر بیان ژن CYP81Q2. ب) اثر غلظت الیسیتور بر بیان ژن CYP81Q2. ج) اثر متقابل غلظت در زمان بر بیان ژن CYP81Q2.

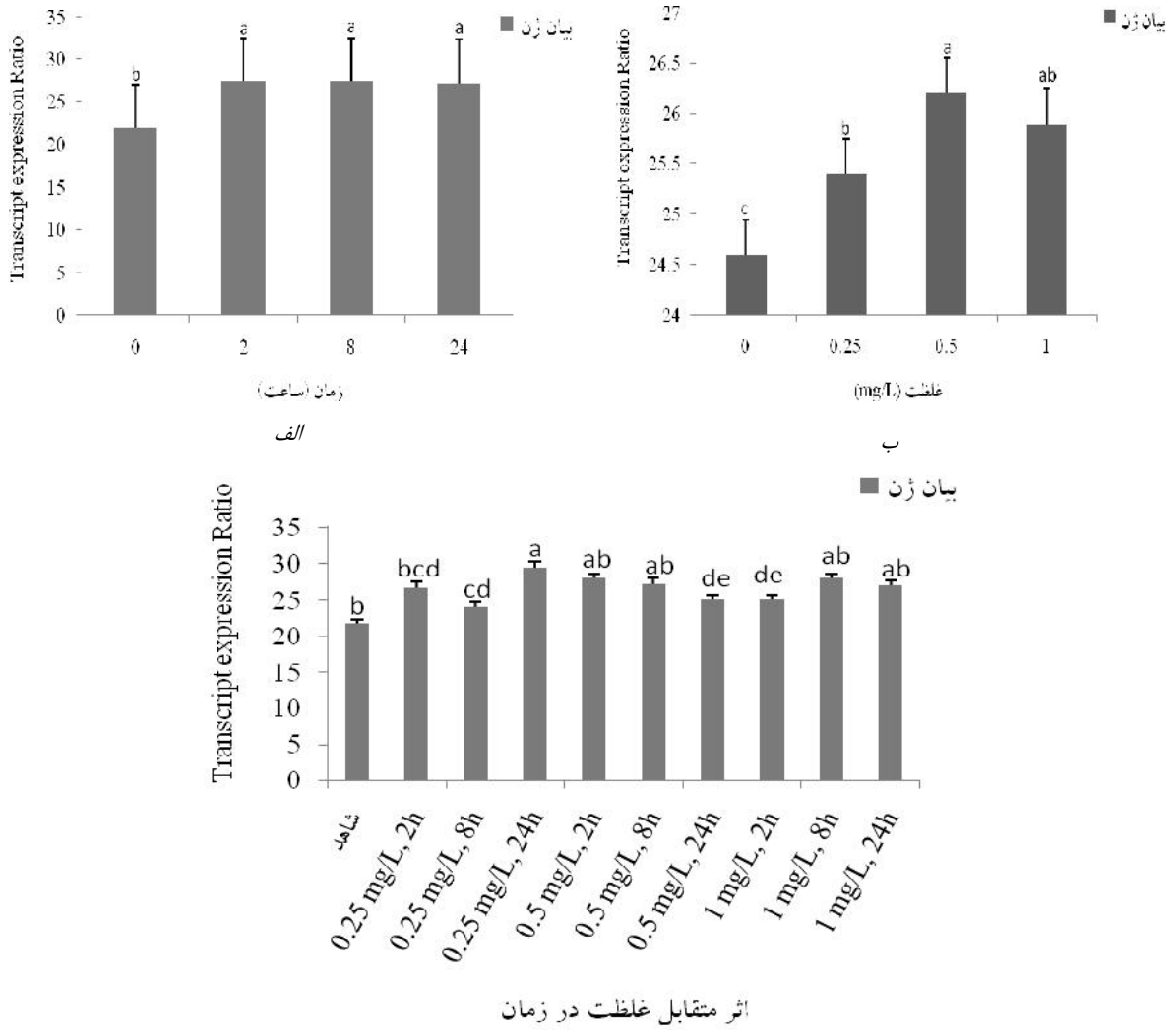
بیان ژن CYP81Q3

نتایج مقایسه میانگین اثر زمان بر بیان ژن *CYP81Q3* نشان داد که بدون در نظر گرفتن غلظت الیسیتور در زمان‌های ۲، ۸ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیتور نسبت به نمونه شاهد بیان این ژن افزایش یافت. با توجه به (شکل ۵، الف) میزان بیان این ژن در بازه‌های زمانی بعد از اعمال الیسیتور اختلاف معنی‌دار نداشت.

افزودن الیسیتور نانوکبالت در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q3* نسبت به نمونه شاهد شد. بیشترین میزان بیان ژن *CYP81Q3* بدون در نظر گرفتن زمان، با افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور حاصل شد (شکل ۵، ب).

در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، بیشترین میزان بیان ژن، در زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال ۰/۲۵ میلی‌گرم در

لیتر الیسیتور تعیین شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود اعمال الیسیتور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q3* نسبت به نمونه شاهد گردید (شکل ۵، ج).



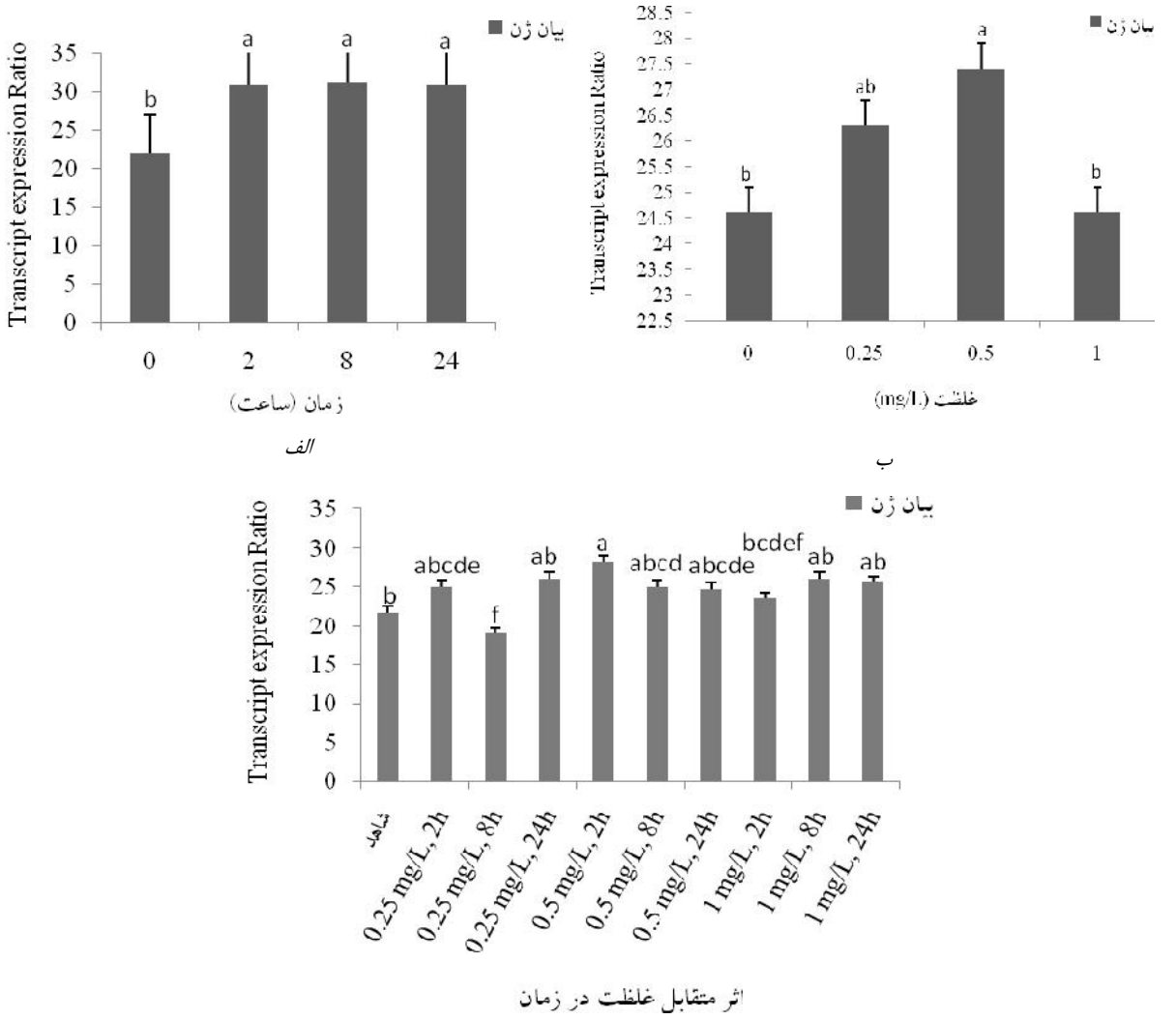
شکل ۵: الف) اثر زمان بر بیان ژن CYP81Q3. ب) اثر غلظت الیسیتور بر بیان ژن CYP81Q3. ج) اثرات متقابل غلظت در زمان بر بیان ژن CYP81Q3.

بیان ژن C3H

بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های RT-PCR کمی اثر زمان، غلظت و اثر متقابل زمان در غلظت الیسیتور معنی‌دار شده است. نتایج مقایسه میانگین اثر زمان بر بیان ژن *C3H* نشان داد که اعمال الیسیتور نانوکبالت در زمان‌های ۲، ۸ و ۲۴ ساعت باعث افزایش میزان بیان ژن *C3H* در مقایسه با نمونه شاهد می‌شود. با وجود این، بین زمان‌های۲، ۸ و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری در افزایش بیان ژن مشاهده نشد (شکل ۶، الف).

هرچند افزودن الیسیتور نانوکبالت در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش بیان ژن *C3H* نسبت به نمونه شاهد شد ولی بیشترین میزان بیان ژن *C3H* بدون در نظر گرفتن زمان، با افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور تعیین شد (شکل ۶، ب)

در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، بیشترین بیان ژن در زمان ۲ ساعت بعد از اعمال ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور حاصل شد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود کمترین میزان بیان ژن *C3H* در زمان ۸ ساعت بعد از اعمال ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور حاصل شد که از میزان بیان ژن در نمونه شاهد نیز کمتر بود (شکل ۶، ج).



شکل ۶: الف) اثر زمان بر بیان ژن C3H. ب) اثر غلظت الیسیتور بر بیان ژن C3H. ج) اثر متقابل غلظت در زمان بر بیان ژن C3H

بحث

در این تحقیق محیط‌ها و شرایط کشت مختلفی برای دستیابی به محیط کشت غنی از سلول مورد بررسی قرار گرفت که از میان آن‌ها بیشترین میزان تقسیم سلولی در محیط دارای ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. میزان بالای اکسین مورد نیاز احتمالا به‌دلیل پایین بودن اکسین داخلی در این گیاه است. رشد و تکثیر سلول‌ها در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، تاریکی و سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه به بالاترین میزان رسید که بیانگر فعالیت حداکثر ژن‌های کنترل کننده چرخه سلولی تحت این شرایط است. در بررسی تیمارهای مختلف نانوکبالت در غلظت‌ها و بازه‌های زمانی مختلف به طور جداگانه، افزایش بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به نمونه شاهد

مشاهده شد. با توجه به نتایج مقایسه میانگین، الیسیتور نانوکبالت باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* می‌شود، بنابراین با توجه به این‌که این ژن از ژن‌های اصلی مسیر سنتز سزامین می‌باشد می‌توان گفت که با اعمال این الیسیتور بیان این ژن افزایش می‌یابد و احتمال می‌رود که تولید لیگنان سزامین نیز بیشتر شود که باید اندازه‌گیری گردد. براساس نتایج بیشترین میزان بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و۲ ساعت بعد از اعمال نانو ذره کبالت تعیین شد و سپس در بازه زمانی ۸ و ۲۴ ساعت بعد از تیماردهی بیشترین تغییر در میزان بیان این ژن مشاهده شد. با توجه به منحنی رشد سلول‌ها (شکل ۱، ج) در بازه زمانی روز هجدهم تا بیستم سلول‌ها در مرحله رشد لگاریتمی هستند و از روز بیستم به بعد وارد فاز سکون و سپس مرگ می‌شوند. از آنجا که الیسیتورها درروز هجدهم اعمال شد و با توجه به این‌که افزایش بیان ژن تا ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیتور یعنی روز نوزدهم اتفاق افتاده است، می‌توان نتیجه گرفت که بهترین زمان برای اعمال الیسیتور جهت القای بیان ژن‌های مسیر سنتز سزامین، قبل از وارد شدن سلول‌ها به فاز سکون است. در تحقیقات انجام شده توسط میتوفر و همکاران (۵) فلزاتی مانند کبالت، نیکل، آهن و نقره باعث تحریک تولید دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند. ترجو و همکاران (۶) تاثیر پنج نانوذره مس، کبالت، آهن، منگنز و مولیبدن را در تولید بتالانین و رشد سوسپانسیون سلولی گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris*) بررسی کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که با افزایش کبالت از ۱ میکرومولار به ۵ میکرومولار می‌توان بتالانین را تا ۶۰ درصد افزایش داد (بیشترین میزان افزایش متابولیت) اما غلظت‌های بیشتر کبالت (۱۰ تا ۲۰ میکرومولار) باعث افزایش متابولیت و رشد سلولی نشد. براساس نتایج مثبت اثر کبالت بر تولید متابولیت‌های ثانویه سایر گیاهان همچنین افزایش تولید سزامین در اثر تحریک با این الیسیتور در تحقیق حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با افزودن الیسیتور نانوکبالت به محیط سوسپانسیون سلولی می‌توان میزان بیان ژن *CYP81Q2* را افزایش داد. ژن *CYP81Q2* از ژن‌های مسیر تولید سزامین در گونه *Sesamum radiatum* و از همولوگ‌های ژن *CYP81Q1* است. در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، بیشترین بیان ژن، در بازه زمانی ۸ ساعت بعد از اعمال ۱ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور حاصل شد. دو ژن همولوگ *CYP81Q2* و *CYP81Q1* به‌دو گونه مجزا تعلق دارند و رقم ایرانی کرج۱ دارای هر دو ژن می‌باشد و با اعمال الیسیتور می‌توان میزان بیان این دو ژن را در این رقم افزایش داد. ژن *CYP81Q3* از ژن‌های گزارش شده در گونه *Sesamum alatum* است. این ژن نیز از هومولوگ‌های ژن *CYP81Q1* است ولی در مسیر سنتز سزامین فعالیتی شبیه به فعالیت *CYP81Q1* و *CYP81Q2* نشان نمی‌دهد. اعمال الیسیتور باعث افزایش بیان این ژن نسبت به نمونه شاهد شد. در بررسی اثر متقابل متغیرها بیشترین میزان بیان این ژن در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر و ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیتور نانوکبالت مشاهده شد. این مقدار کمترین سطح الیسیتور است که پس از یک شبانه روز باعث افزایش بیان ژن شده است. این موضوع نشان می‌دهد که نوع الیسیتور و غلظت مورد استفاده آن جهت تغییر در میزان بیان ژن‌ها مؤثر است. پوتالون و همکاران (۷) نیز با اضافه کردن ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کایتوزان به کشت ریشه‌ی مویین گیاه آرتمیزیا (*Artemisia annua*) میزان تولید آرتمیزنین را تا ۶ برابر افزایش دادند. نتایج بررسی اثر الیسیتور بر افزایش بیان ژن *C3H* نشان داد که با افزودن الیسیتور به محیط سوسپانسیون سلولی می‌توان میزان بیان این ژن را افزایش داد. در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، بیشترین بیان ژن در زمان ۲ ساعت بعد از اعمال ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور حاصل شد. افزودن ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور بعد از ۸ ساعت منجر به کاهش بیان این ژن شد. سایر تیمارهای زمانی و غلظت‌های مختلف الیسیتوری منجر به افزایش بیان این ژن شدند. مسیر فنیل‌پروپانوئید در گیاهان منجر به تولید لیگنان‌ها و فلاونوئیدها می‌شود. ژن *C3H* از ژن‌های کلیدی در مسیر فنیل-پروپانوئید است که کافئیل‌شیکیمات را به P- کوماریل‌شیکیمات تبدیل می‌کند. این ترکیب در ادامه‌ی مسیر به لیگنان‌های گروه S و G تبدیل می‌شود. بنابراین می‌توان گفت با افزایش بیان این ژن شاید بتوان تولید لیگنان سزامین را افزایش داد. بهابادی و همکاران (۸) اثر عصاره قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* را به‌عنوان الیسیتور بر میزان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئیدها در کشت سلولی گیاه دارویی کتان (*Linum album*) بررسی کردند. مطالعه بیان ژن‌ها با روش RT-PCR کمی نشان داد که بیان ژن‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، سینامیل-الکل‌دهیدروژناز و سینامیل‌کوآنزیم‌آ ردوکتاز که در مراحل ابتدایی مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین نقش دارند و همچنین بیان پینورزینول‌لاریسی‌رزینول‌ردوکتاز، ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها، بعد از افزودن عصاره قارچ به محیط کشت به

طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آن‌ها بعد از گذشت دو تا سه روز مشاهده شد.

به‌طورکلی محیط پایه MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، سرعت شیکر ۱۳۰ دور در دقیقه و تاریکی برای دستیابی به تولید سوسپانسیون سلولی کنجد با غلظت بالای سلول‌ها توصیه می‌شوند. افزایش سطح بیان هر چهار ژن مورد مطالعه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور ولی در زمان‌های مختلف رخ داد. همچنین مشخص گردید که هیچ یک از سطوح مورد استفاده برای غلظت الیسیتور تاثیر منفی روی بیان ژن‌ها نداشتند و از این‌رو می‌توان اثر غلظت‌های بالاتر را مورد بررسی قرار داد. براساس رابطه مستقیم موجود بین بیان ژن‌های مسیر تولید سزامین و میزان تولید این ماده، تاثیر منفی الیسیتور روی بیان این ژن‌ها (کاهش بیان این ژن‌ها) به معنی کاهش میزان سزامین است.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج حاصل از این پژوهش الیسیتور نانوکبالت باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در سنتز سزامین شامل *CYP81Q1*، *CYP81Q2*، *CYP81Q3* و *C3H* در کشت سوسپانسیون سلولی کنجد می‌شود و بنابراین از این الیسیتور می‌توان برای افزایش بیان ژن‌های مذکور استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های کشت بافت و بیولوژی مولکولی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) و گروه بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Hata N, Okazawa A, Ono E. Comparison of sesamin contents and *CYP81Q1* gene expressions in aboveground vegetative organs between two Japanese sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties differing in seed sesamin contents. Plant Science. 2010; 178: 51-60.

2. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods. 2001; 25(4): 402-408.

3. Khodadadi A, Hamidi NM, Ghaforian M. Mohammadi AJ. Evaluation of real-time PCR efficiency by the use of two strategies: standard curve and linear regression. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2012; 1(76): 85-95.

4. Kansal R, Kuhar K, Verma I, Gupta RN, et al. Improved and convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysaccharide rich plant tissues. Indian Journal of Experimental Biology. 2008; 47: 842-845.

5. Mithöfer A, Schulze B, Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. FEBS Letters. 2004; 566(1): 1-5.

6. Trejo-Tapia G, Jimenez-Aparicio A, Rodriguez-Monroy M, De Jesus-Sanchez A, et al. Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of Beta vulgaris. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2001; 67(1): 19-23.

7. Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H, et al. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. Biotechnology Letters. 2007; 29(7): 1143-1146.

8. Bahabadi SE, Sharifi M, Safaie N, Murata J, et al. Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of Linum album by fungal extracts. Plant Biotechnology Reports. 2011; 5(4): 367-73.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2015; 6(2): 165-176

Original Article

Effects of Cobalt Nano Particles on Involved Genes Expression in Sesamin Biosynthesis Pathway in *Sesamum indicum* L.

Heidari far M, M.Sc.[1], Dehghan Nayeri F, Ph.D.[2*]

1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Faculty of Engineering and Technology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2. Agricultural Biotechnology, Faculty of Engineering and Technology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

* Email corresponding author: nayeri@ENG.ikiu.ac.ir

Received: 20 Oct. 2014 Accepted: 15 Feb. 2015

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigation cobalt nano-particles effects on expression level of key genes involved in sesamin biosynthetic pathway including CYP81Q1, CYP81Q2, CYP81Q3 and C3H in Sesamum indicum L. cell suspension culture.

Material and Methods: First sesame cell suspension culture was established. For this purpose, Karaj1 hypocotyle cultivar, 0.6 mgL-1 BAP, 3 mgL-1 NAA were used. Different concentrations of cobalt nano-particles elicitor including 0.25, 0.5 and 1 mgL-1 were added to the 18 days-old culture and sampling was carried out after 2, 8 and 24 hours post treatment. Expression level of mentioned genes was measured by the Real-Time qRT-PCR technique. Data analysis and figures depiction were done using Excel.

Results: Results showed that MS medium consisting of 0.6 mgL-1 BAP, 3 mgL-1 NAA and 30 gL-1 socrose, 26ºC, 130rpm and darkness condition are optimum situation for condensed sesame suspension production. Adding cobalt nano-particles to the suspension culture, led to increasing genes expression level, especially, at 0.5 mgL-1 elicitor concentration in different times. Since this elicitor had no negative effects on the mentioned genes expression, the effect of higher concentrations on these genes expression can be studied in the future. Negative effects of this elicitor on the expression of genes involved in sesamin biosynthesis means decreasing sesamin content.

Conclusion: Based on obtained results elicitation of sesame cell suspension culture by cobalt nano-particles led to the increasing genes expression involved in the sesamin biosynthetic pathway. Therefore, this elicitor can be used to induce higher expression levels of these genes.

Key words: Sesame, Cell suspension, Sesamin, Nano cobalt, Real-Time qRT- PCR