

بررسی تاثیر نانوذرات روی و کبالت بر بیان ژن های STR، DAT و D4H در سوسپانسیون سلولی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)

زهرا رضائی^۱، M.Sc.، رامین حسینی^{۲*}، بهور اصغری^۳ Ph.D.

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین، قزوین، ایران

۲- دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، قزوین، ایران

۳- دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین، گروه اصلاح نباتات، قزوین، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: raminh_2001@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی اثر دو نانو ذره به عنوان الیسیتور بر بیان سه ژن کلیدی این مسیر بود.

مواد و روش ها: به این منظور از غلظت های ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی گرم در لیتر نانو اکسید کبالت و نانو اکسید روی استفاده و در زمان های ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار، نمونه برداری انجام شد.

نتایج: بررسی بیان ژن ها به روش SQ-RT-PCR انجام شد. به طور کلی، هر دو الیسیتور مورد استفاده بر بیان ژن ها تاثیر داشتند. تاثیر نانو اکسید روی بر بیان ژن ها بیشتر از نانو اکسید کبالت بود. در مورد ژن STR و D4H بیشترین افزایش بیان مربوط به غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر و برای ژن DAT غلظت ۱ میلی گرم در لیتر نانو اکسید روی در بازه زمانی ۸ ساعت بود. نانو اکسید کبالت در اکثر غلظت ها و بازه های زمانی مورد استفاده باعث کاهش بیان ژن های مورد بررسی شد.

نتیجه گیری: هر دو نانو ذره نانو اکسید کبالت و روی توانستند بر بیان ژن های کلیدی مسیر وین بلاستین و وین کریستین تاثیر بگذارند.

واژگان کلیدی: پروانش، وین بلاستین، وین کریستین، بیان ژن، SQ-RT-PCR، نانوذرات

مقدمه

پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* از خانواده خرزهره (Apocynaceae) می‌باشد. این گیاه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که در سطح جهان به دلیل وجود خاصیت ضدسرطانی شناخته شده است (۱). پروانش گیاهی است درختچه‌ای، چندساله که البته در مناطق سرد به صورت یک‌ساله کشت می‌شود. منشاء این گیاه مناطق حاره و گرمسیر مانند جنوب هند، اندونزی و ماداگاسکار گزارش شده است و در دشت‌ها و تپه‌هایی که ۵۰۰ متر از سطح دریا ارتفاع دارند می‌روید. همچنین رویش این گیاه در قاره‌های آفریقا، آمریکا، آسیا، استرالیا و بعضی از جزایر اقیانوس آرام نیز گزارش شده است (۲). به علت وجود آلكالوئیدهای ارزشمند در پیکر رویشی و ریشه پروانش، در اکثر فارماکوپه‌ها به عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم معرفی و خواص آن نیز بیان شده است. این گیاه به علت دارا بودن آلكالوئیدهای مهم نظیر وین‌بلاستین و وین-کریستین که هر دو اثر آنتی‌نئوپلازی (ضد تومور) دارند، در صنایع داروسازی اهمیت بسیاری دارد. این مواد در شیمی-درمانی برخی سرطان‌ها نیز کاربرد دارند (۳، ۴). تاکنون ۱۳۰ نوع آلكالوئید از این گیاه استخراج شده است که مقدار آن را در پیکر رویشی ۰/۲ تا ۱ درصد گزارش کرده‌اند. آلكالوئیدهای پروانش همگی از گروه تریپتوفان می‌باشند. آلكالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین در برگ‌ها ساخته و ذخیره می‌شوند. مقدار این آلكالوئیدها در این گیاه بسیار کم است. به عنوان مثال، می‌توان از وین‌کریستین در برگ‌ها نام برد که مقدار آن به ۰/۰۳ درصد می‌رسد و یک تن از برگ‌های خشک پروانش، فقط حاوی ۳ گرم از این آلكالوئیدها می‌باشد (۵). وین‌بلاستین و وین‌کریستین به صورت تجاری از مقدار زیادی گیاه پروانش استخراج می‌شوند (۶). یکی از روش‌هایی که امروزه بیش از هر موضوع دیگر در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار دارد، روش کشت اندام، بافت و سلول گیاهی است. محققین با استفاده از این روش سعی می‌کنند تا شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز متابولیت‌ها و نیز مکانیسم تنظیمی آن به دست آورند و با این روش‌ها توانسته‌اند تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش را در گیاهان افزایش دهند (۷). برخی از این ترکیبات مانند: دیجی توکسین، شیکونین، عطر جاسمین و داروهای ضد سرطان مانند: وین‌بلاستین،

وین‌کریستین و تاکسول از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند و قیمت آن‌ها از چند دلار تا چند هزار دلار به‌ازای هر کیلو تغییر می‌کند. تولید انبوه و سریع این مواد پیچیده در مقیاس زیاد از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً مشکل و یا غیرممکن می‌باشد و از سویی محدودیت‌های مختلف مانع تامین این مواد از طبیعت است. استفاده از راه‌کارهای فناوری زیستی از جمله کشت سوسپانسیون سلولی، کشت اندام (کشت ریشه‌های موئین و ساقه) راه حلی مناسب برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۸). سوسپانسیون سلولی در گیاه پروانش برای تولید آجمالیسین، کاتارانتین، سرپنتین و بسیاری از تولیدات دارویی مهم دیگر استفاده شده است (۹). ایسیتورهای مختلف قارچی به منظور بهبود بخشیدن به تولید ایندول آلكالوئیدها در سوسپانسیون سلولی پروانش آزمایش شدند. نتایج نشان داد که میسلیم‌های قارچی مختلف تجمع انواع مختلفی از ایندول آلكالوئیدها (آجمالیسین، سرپنتین و کاتارانتین) را تحریک می‌کند که ۲ الی ۵ برابر بیشتر از شاهد است. افزودن ایسیتور در دوزهایی بین ۵ تا ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر کربوهیدرات، نتایج مشابهی در تجمع مقدار و تنوع ایندول آلكالوئیدها نشان داد (۱۰). در ده سال اخیر، اطلاعات قابل ملاحظه‌ای از رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله کشت سلول و بافت پروانش به دست آمده است (۱۱). بررسی اثر کادمیوم در تولید آجمالیسین در کشت سوسپانسیون سلولی پروانش نشان داد که کادمیوم، سطح رونویسی TDC، غلظت تریپتامین سلولی و تولید آجمالیسین را در سلول افزایش می‌دهد (۱۲). آنزیم استریکتوسیدین سینتاز (STR, synthase Strictosidine) در مسیر بیوسنتز ترپنوئید ایندول آلكالوئیدها باعث تبدیل تریپتامین و سکولوگانین به استریکتوسیدین می‌شود که پیش‌ماده تولید تمامی ترپنوئید ایندول آلكالوئیدهاست. همه آلكالوئیدها در یک قسمت از مسیر بیوشیمیایی تا تولید ماده استریکتوسیدین مشترک هستند و از این نقطه، مسیر در گونه‌های مختلف گیاهی تولیدکننده مواد آلكالوئیدی منشعب می‌شود (۱۳). D4H (Desacetoxyvindoline-4 hydroxylase) جزو آنزیم‌های نهایی در مسیر بیوسنتز ایندول آلكالوئیدهاست. در این مسیر D4H باعث تبدیل دی‌استوکسی ویندولین به دی‌استیل ویندولین می‌شود که

ها، وزن آن‌ها یادداشت گردید و سپس نمونه‌ها به‌منظور تثبیت به‌طور جداگانه در فویل آلومینیومی پیچیده شدند و در ازلت مایع قرار گرفتند و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-PLUS ساخت شرکت سیناکلون (تهران، ایران) طبق دستور شرکت سازنده انجام شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر تخمین زده شد و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۱/۵ درصد) بررسی شد. برای حذف آلودگی ژنومی از آنزیم DNase I ساخت شرکت سینا کلون استفاده شد. cDNA با استفاده از RNA کل، مخلوط dNTP و Oligo-dT Primer (شرکت سیناکلون) ساخته شد. جهت اطمینان از درستی سنتز cDNA ها واکنش PCR با استفاده از آغازگر rRNA ۱۸S انجام شد. سپس تمامی نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (w/v) الکتروفورز (شرکت پایا پژوهش، مشهد) شدند. کیفیت و درستی سنتز cDNA پس از عکس‌برداری از ژل توسط دستگاه مستند ساز ژل (Gel Documentation System, UVP, USA) تأیید شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: توالی آغازگر ژن‌های STR، D4H بر اساس تحقیق صورت گرفته توسط Wei (۴) ساخته شدند. توالی آغازگر برای ژن DAT با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 طراحی شد و از لحاظ عدم اتصال غیراختصاصی و تشکیل دایمر با استفاده از Primer blast مورد بررسی و تأیید قرار گرفت (جدول ۱).

برای بررسی بیان ژن از روش SQ-RT-PCR استفاده شد. به‌همین منظور ابتدا شرایط انجام واکنش PCR برای ژن خانه‌دار (18 SrRNA) بهینه شد. سپس واکنش PCR برای سایر ژن‌ها در شرایط تعیین شده صورت گرفت. شرایط انجام PCR (Techne, Germany) برای ژن خانه-دار از طریق تغییر دمای اتصال، زمان هر چرخه و نیز تعداد چرخه‌های واکنش بهینه شد. واکنش PCR با استفاده از PCR Master Kit محصول شرکت سیناکلون (تهران، ایران) و آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. برای بررسی محصولات واکنش SQ-RT-PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصولات PCR روی ژل، بارگذاری و الکتروفورز شد. سپس عکس‌برداری از ژل

از پیش‌ماده‌های ضروری برای تولید ویندولین است (۱۴). ژن DAT (Deacetyl vindoline-4-O-acetyl transferase) آنزیم استیل کوا را کد می‌کند. این ژن در آخرین مرحله از مسیر تولید ایندول آلکالوئیدها منجر به تولید ویندولین می‌شود (۱۵) با توجه به یافته‌های علمی صورت گرفته تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از نانوذرات به‌منظور بررسی تأثیر آن‌ها بر بیان ژن‌های گیاه پروانش صورت نگرفته است. بنابراین افزایش بیان ژن‌های STR، DAT و D4H در گیاه پروانش تحت تأثیر الیسیتورهای نانوکبالت و نانوروی هدف این پژوهش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گیاه پروانش از گلخانه دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین تهیه شد. از برگ‌های نزدیک گل و برگ‌های جوان به‌منظور تهیه کالوس نمونه‌برداری شد. برگ‌ها به روش احمدی و همکاران (۱۶) ضدعفونی گردید. از محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) در سال ۱۹۶۲ به‌عنوان محیط کشت پایه جهت کشت برگ‌ها، القا کالوس و ایجاد سوسپانسیون سلولی استفاده شد. در این آزمایش از دو هورمون 2,4-D (۱ mg/L) و BAP (۰/۵ mg/L) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون سلولی، حدود ۲ گرم از کالوس‌ها به ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری دارای ۱۰۰ میلی-لیتر محیط کشت منتقل شدند و در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد روی شیکر انکوباتور، با شدت ۱۲۰ دور در دقیقه و در تاریکی قرار گرفتند. تیمار هورمونی مشابه با تیمار کالوس‌زایی بود.

رسم منحنی رشد و اعمال الیسیتور: برای تعیین پیک رشد سلول‌ها به‌منظور اعمال الیسیتور نمونه‌برداری از سلول‌ها هر ۳ روز یک بار و در بازه‌های زمانی ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۱ و ۲۴ روز انجام گرفت و میزان وزن تر و وزن خشک سلول‌ها اندازه‌گیری و یادداشت شد. برای اعمال الیسیتورهای روی و کبالت، از محلول مادری که دارای غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود، استوک تهیه شد. پس از این که کشت‌های سوسپانسیون سلولی به بیشترین میزان رشد خود رسیدند، نانوذره‌های روی و کبالت در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به محیط‌ها اضافه شد. جهت بررسی بیان ژن، محتوای هر ارلن در تیمارهای زمانی ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار از صافی عبور داده شد و پس از خارج شدن آب اضافی نمونه-

انجام و شدت نسبی باندها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ افزار SPSS در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل سنجیده شد. آنالیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم- تصادفی و با استفاده از آزمون دانکن بررسی شد.

جدول ۱: لیست آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی بیان ژن

نام ژن و آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه (جفت باز)
STR آغازگر رفت	5'-tgacagtcccgaaggtgtgg-3'	۱۲۲
STR آغازگر برگشت	5'-cgccgggaacatgtagctct-3'	
D4H آغازگر رفت	5'-taccctgcatgccctcaacc-3'	۱۲۱
D4H آغازگر برگشت	5'-ttgaaggccgcaatttgat-3'	
DAT آغازگر رفت	5'-agaaaccaacggatcacac-3'	۹۶
DAT آغازگر برگشت	5'-tcaaaccctcttccaacc-3'	
۱۸SrRNA آغازگر رفت	5'-gcaacaaaccccgacttctg-3'	۱۰۲
۱۸SrRNA آغازگر برگشت	5'-tgcgatccgtcgagtatca-3'	

همچنین اثر متقابل زمان و غلظت در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. در مورد نانوآکسید کبالت اثر زمان معنی‌دار نبود و اثر غلظت در سطح ۵ درصد و اثر متقابل زمان و غلظت در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲ و ۳).

نتایج

تجزیه واریانس بیان ژن STR

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بیان ژن STR با استفاده از نانوآکسید روی نشان داد که اثر زمان، غلظت و

جدول ۲: مقایسه میانگین بیان ژن STR تحت تیمارهای مختلف نانوآکسید روی در زمان‌های مختلف

منبع تغییرات (S. O. V)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
زمان	۲	۲۰۳۲/۴۶۲	۱۰۱۶/۷۳۱	۲۶/۰۹۴***
غلظت	۲	۱۵۰۰/۶۷۱	۷۵۰/۳۳۶	۱۹/۲۵۷***
زمان × غلظت	۴	۲۴۱۶/۵۵۱	۶۰۴/۱۳۸	۱۵/۵۰۵***
خطا	۱۸	۷۰۱/۳۴۹	۳۸/۹۶۴	
کل	۲۶	۶۶۵۲/۰۳۴		

***: معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۳: مقایسه میانگین بیان ژن STR تحت تیمارهای مختلف نانوآکسید کبالت در زمان‌های مختلف

منبع تغییرات (S. O. V)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
زمان	۲	۵۲/۵۲۱	۲۶/۲۶۱	۴/۱۵۳ns
غلظت	۲	۱۲/۰۴۳	۶/۰۲۲	۰/۹۵۲*
زمان × غلظت	۴	۲۷۵/۰۰۵	۶۸/۷۵۱	۱۰/۸۷۲***
خطا	۱۸	۱۱۳/۸۲۷	۶/۳۲۴	
کل	۲۶	۴۵۳/۳۹۶		

***: معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد *; معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد ns: معنی‌دار نبودن

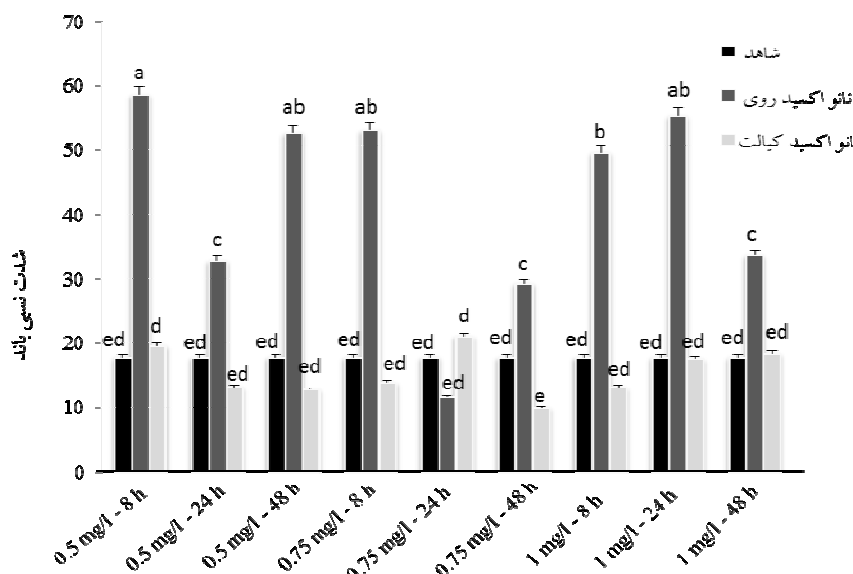
بررسی بیان ژن STR

دار در سطح ۱ درصد نشان داد. در بازه زمانی ۸ ساعت همه تیمارهای غلظتی نانوآکسید روی (۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش بیان ژن STR شدند.

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بیان ژن STR در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف نانوآکسید روی اختلاف معنی-

لیتر بود. نانوآکسید کبالت در بازه های زمانی و غلظت‌های مختلف اثر چشم‌گیری از خود نشان نداد. تنها در غلظت-های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۸ ساعت و غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر و ۲۴ ساعت باعث افزایش جزئی در بیان ژن شد. میزان بیان ژن STR و مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر شدت نسبی باند برای این ژن در تمام زمان‌ها تحت تأثیر نانوآکسید روی و کبالت در شکل ۱ آمده است.

بیشترین بیان مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و پس از آن غلظت‌های ۱ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر بود. در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمارها، غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوآکسید روی باعث افزایش در بیان ژن شدند ولی غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش بیان ژن شد در بازه زمانی ۴۸ ساعت، نانوآکسید روی در همه غلظت‌ها باعث افزایش در بیان ژن شد. بیشترین افزایش بیان به ترتیب مربوط به غلظت ۰/۵، ۱ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در



اثر متقابل غلظت و زمان

شکل ۱: مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر شدت نسبی باند برای ژن STR در تمام زمان‌ها، بعد از اعمال الیسیوتورها * حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی‌دار در آزمون دانکن است.

معنی‌دار نشد. در مورد نانوآکسید کبالت اثر زمان، غلظت و اثر متقابل زمان و غلظت در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۴ و ۵).

تجزیه واریانس بیان ژن DAT

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بیان ژن DAT با استفاده از نانوآکسید روی نشان داد که اثر زمان و همچنین اثر متقابل زمان و غلظت معنی‌دار شد ولی اثر غلظت

جدول ۴: مقایسه میانگین بیان ژن DAT تحت تیمارهای مختلف نانوآکسید روی در زمان‌های مختلف

F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (S. O. V)
۱۶/۷۹۹**	۴۱۶/۴۱۷	۸۳۲/۸۳۵	۲	زمان
۳/۲۴۲ns	۸۰/۳۶۸	۱۶۰/۷۳۶	۲	غلظت
۳/۳۴۰*	۸۲/۸۰۲	۳۳۱/۲۰۶	۴	زمان × غلظت
	۲۴/۷۸۹	۴۴۶/۱۹۵	۱۸	خطا
		۱۷۷۰/۹۷۲	۲۶	کل

** معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد * معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد ns: معنی‌دار نبودن

جدول ۵: مقایسه میانگین بیان ژن DAT تحت تیمارهای مختلف نانو اکسید کبالت در زمان‌های مختلف

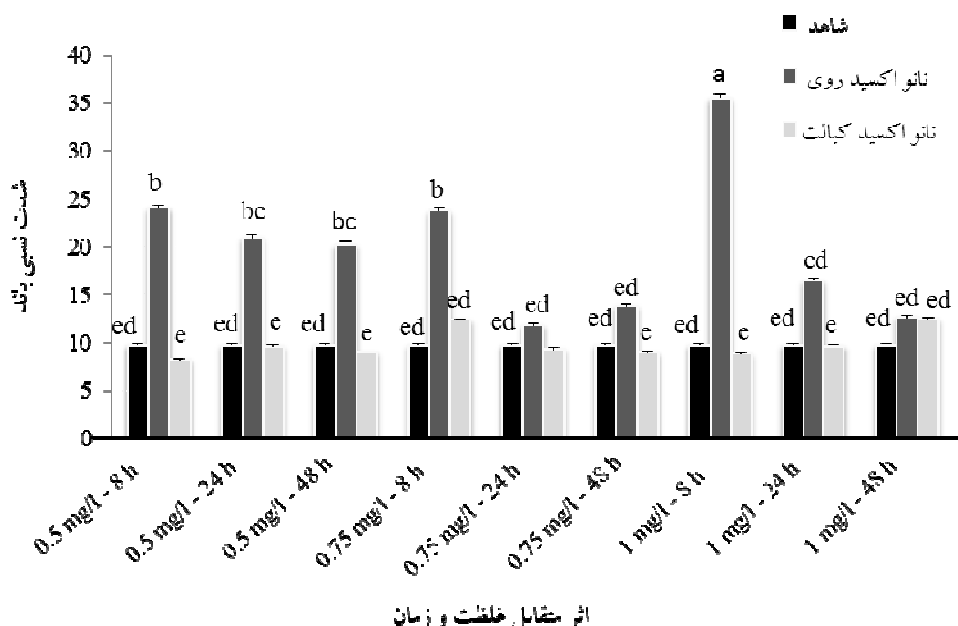
F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (S. O. V)
۶/۷۳۰***	۰/۸۹۴	۱/۷۸۹	۲	زمان
۳۸/۳۹۳***	۵/۱۰۲	۱۰/۲۰۴	۲	غلظت
۸۲/۸۵۹***	۱۱/۰۱۲	۴۴/۰۴۷	۴	زمان × غلظت
	۰/۱۳۳	۲/۳۹۲	۱۸	خطا
		۵۸/۴۳۲	۲۶	کل

***: معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد

تیمارهای نانو اکسید روی بیان ژن DAT را افزایش دادند. غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر را بر بیان این ژن داشت. نانو اکسید کبالت بیان ژن DAT را نسبت به شاهد کاهش داد تنها در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر پس از ۸ ساعت و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پس از ۲۴ ساعت بیان ژن را تا حد کمی افزایش داد ولی غلظت‌ها و بازه‌های زمانی دیگر بر بیان ژن DAT تأثیر منفی داشتند (شکل ۲).

بررسی بیان ژن DAT

در زمان ۸ ساعت بعد از اعمال تیمار، نانو اکسید روی در همه غلظت‌ها باعث افزایش بیان ژن شد. بیشترین افزایش بیان به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱، ۰/۵ و غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر بود. در بازه زمانی ۲۴ ساعت، هر سه غلظت مورد استفاده نانو اکسید روی بیان ژن DAT را افزایش دادند. بیشترین بیان مربوط به غلظت ۰/۵ و پس از آن به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر بود. در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارها، همه



اثر متقابل غلظت و زمان

شکل ۲: مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر شدت نسبی باند برای ژن DAT در تمام زمان‌ها، بعد از اعمال الیستورها * حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی‌دار در آزمون دانکن است.

نانو اکسید کبالت اثر زمان معنی‌دار نبود و اثر غلظت و اثر متقابل زمان و غلظت در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۶ و ۷).

تجزیه واریانس بیان ژن D4H

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بیان ژن D4H با استفاده از نانو اکسید روی نشان داد که اثر زمان، غلظت و همچنین اثر متقابل زمان و غلظت معنی‌دار شد. در مورد

جدول ۶: مقایسه میانگین بیان ژن D4H تحت تیمارهای مختلف نانو اکسید روی در زمان های مختلف

F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (S. O. V)
۱۳/۳۷۶**	۳۱۲/۹۳۵	۶۲۵/۸۷۰	۲	زمان
۳۱/۹۴۴**	۷۴۷/۳۶۲	۱۴۹۴/۱۴/۷۲۵	۲	غلظت
۳/۳۹۸*	۷۹/۵۰۳	۳۱۸/۰۱۰	۴	زمان × غلظت
	۲۳/۳۹۶	۴۲۱/۱۲۶	۱۸	خطا
		۲۸۵۹/۷۳۱	۲۶	کل

** معنی دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد * معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۷: مقایسه میانگین بیان ژن D4H تحت تیمارهای مختلف نانو اکسید کبالت در زمان های مختلف

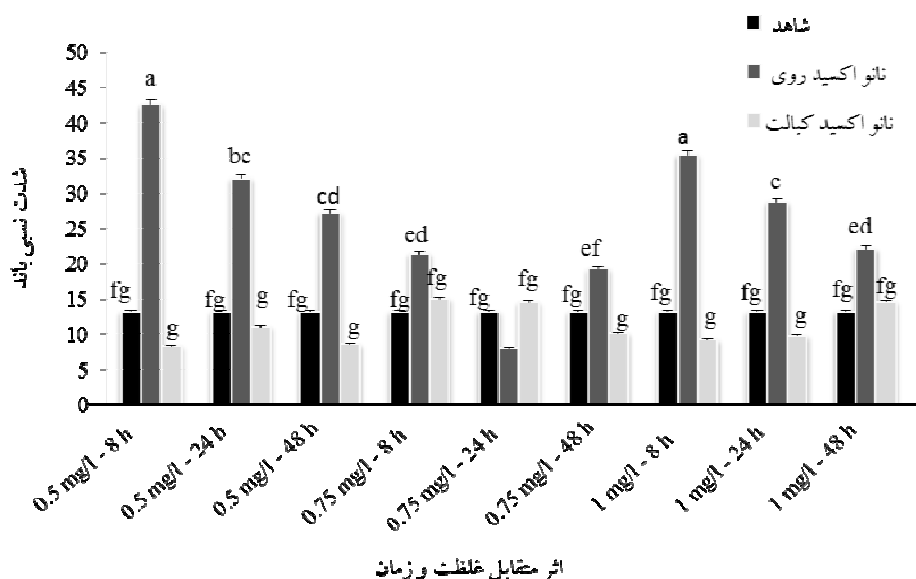
F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (S. O. V)
۱/۲۰۱ns	۱/۹۷۱	۳/۹۴۲	۲	زمان
۲۰/۹۹۴**	۳۴/۴۵۴	۶۸/۹۰۷	۲	غلظت
۱۶/۴۸۰**	۲۷/۰۴۵	۱۰۸/۱۸۱	۴	زمان × غلظت
	۱/۶۴۱	۲۹/۵۴۰	۱۸	خطا
		۲۱۰/۵۷۱	۲۶	کل

** معنی دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد ns معنی دار نبودن

D4H شد و در دو غلظت دیگر بیان ژن را افزایش داد. در بازه زمانی ۴۸ ساعت، نانو اکسید روی در هر سه غلظت، بیان ژن D4H را افزایش داد و بیشترین بیان مربوط به غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر بود. نانو اکسید کبالت بیان ژن را در تمام غلظت ها و بازه های زمانی یا اثری بر بیان ژن نشد یا اثر کاهشی داشت (شکل ۳).

بررسی بیان ژن D4H

در مورد نانو اکسید روی در زمان ۸ ساعت پس از اعمال تیمار، هر سه غلظت ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی گرم در لیتر بیان ژن D4H را افزایش دادند. بیشترین افزایش مربوط به غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر بود در بازه زمانی ۲۴ ساعت، نانو اکسید روی در غلظت ۰/۷۵ باعث کاهش بیان ژن



شکل ۳: مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر شدت نسبی باند برای ژن D4H در تمام زمان ها، بعد از اعمال الیسیتورها * حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

بحث

در این مطالعه مشخص شد که هر سه ژن STR، DAT و D4H تحت تأثیر نانوذرات قرار می‌گیرند. Liu و همکاران (۱) در مطالعه‌ای به بررسی اثرات UV روی تولید آلکالوئیدها و همچنین تأثیر آن روی بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها در برگ پروانش پرداختند. در مطالعه آن‌ها برای بررسی بیان ژن‌ها از SQ-RT-PCR استفاده شد. تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های DAT، D4H، STR، TDC و DAT بین نمونه‌های تیمار و شاهد مشاهده شد. بیان ژن STR در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار افزایش و بیان این ژن در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار کاهش یافت. بیان ژن‌های DAT و D4H در زمان ۱۲ و ۷۲ ساعت پس از تیمار افزایش و در سایر زمان‌ها کاهش یافت. نتایج این پژوهش نیز مشخص کرد که نانواکسید روی، بیان ژن STR را در همه غلظت‌ها افزایش داد. تنها استثنا در این مورد غلظت ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر پس از ۲۴ ساعت بود که باعث کاهش بیان شد. نانواکسید کبالت اثر متفاوتی از خود نشان داد. به‌طوری‌که باعث کاهش معنی‌دار در بیان ژن شد. درست در نقطه مقابل نانو اکسید روی، نانو اکسید کبالت در غلظت ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر پس از ۲۴ ساعت باعث افزایش بیان ژن STR شد اما این کاهش بیان معنی‌دار نبود. در مورد ژن DAT، هر دو نانو ذره اکسید روی و کبالت رفتارهای مشابه مورد ژن STR از خود نشان دادند. یعنی نانو اکسید روی توانست بیان ژن STR را افزایش دهد اما در مورد نانواکسید کبالت باعث کاهش بیان ژن DAT شد. نانو اکسید روی توانست بیان ژن STR را در چند غلظت تا شدت نسبی ۶۰ بالا ببرد اما این افزایش برای ژن DAT، تا شدت نسبی حدود ۴۰ بود. یعنی اثر نانواکسید روی بر ژن STR بیشتر از اثر آن بر ژن DAT بود. اما به‌هر صورت نانو اکسید کبالت در هر دو مورد بیان ژن‌های STR و DAT را کاهش داد. مشابه با ژن DAT، نانو ذره اکسید روی در همه غلظت‌ها بیان ژن D4H را افزایش داد. اما تنها در زمان ۲۴ ساعت و غلظت ۰/۷۵ باعث کاهش بیان این ژن شد. مانند دو ژن دیگر نانواکسید کبالت بیان ژن D4H را نیز کاهش داد. نتایج شعبانی و همکاران (۱۷) مشخص کرد که بیان ژن DAT در اثر تیمار با اتیلن در ۶

ساعت پس از تیمار ۵/۲ برابر شاهد بود. پس از ۱۲ ساعت میزان بیان این ژن به نصف شاهد رسید. در ۲۴ ساعت بعد از تیمار، میزان بیان در مقایسه با شاهد افزایش ۱/۴ برابری را نشان داد. در ۴۸ ساعت میزان بیان این ژن افزایش ۱/۰۵ را نسبت به شاهد نشان داد. در زمان ۷۲ ساعت سطح بیان این ژن کاهش و به ۰/۸ شاهد خود رسید. این یافته‌ها با نتایج این پژوهش در زمان‌های ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت توسط نانواکسید روی برای ژن DAT مشابه بود که بیان این ژن افزایش یافت. بیشترین میزان بیان ژن DAT مطابق نتایج شعبانی و همکاران (۱۷) در زمان ۶ ساعت پس از تیمار بود که این نتیجه با نتایج این پژوهش مطابقت داشت که بیشترین میزان بیان این ژن در زمان ۸ ساعت پس از تیمار یعنی ساعت‌های اولیه پس از تیمار بود. در تحقیق دیگری بررسی بیان ژن DAT در ریشه‌های موئین پروانش نشان داد که لاین‌های مختلف ریشه موئین در مقایسه با کشت-های ریشه موئین شاهد، سطح بیان بیشتری از ژن DAT را دارند (۱۸). بررسی اثرات متیل جاسمونیک اسید (MeJA) بر متابولیسم ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها (TIAS) و بیان ژن در گیاهچه‌های پروانش نشان داد که ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها تغییرات معنی‌داری در مقدار و زمان القا نشان می‌دهند. بیشترین میزان بیان ژن D4H در زمان ۰/۵ ساعت بعد از تیمار و غلظت ۲ میلی‌مولار بود که نزدیک دو برابر شاهد بود. افزایش معنی‌دار در بیان ژن STR در زمان ۳ ساعت بعد از تیمار بود که این افزایش در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت نیز ادامه داشت. بعد از ۲۴ ساعت بیان این ژن کاهش داشت (۴). در این مطالعه نیز مشخص شد که ژن STR در زمان ۴۸ ساعت توسط نانو اکسید روی افزایش بیان داشت که با نتایج Wei (۴) مغایرت داشت. در تحقیق دیگری Zhang و همکاران (۱۹) تأثیر نانوذرات نقره را بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه *Artemisia annua* بررسی کردند. نانوذرات نقره به‌عنوان الیسیستور به محیط کشت ریشه‌های موئین این گیاه افزوده شد. در این مطالعه محتوای آرتیمیزینین از mg/g ۱/۶۷ وزن خشک به ۲/۸۶ mg/g تغییر یافت. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که از نانوذرات نقره می‌توان به‌عنوان یک الیسیستور موثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده کرد. با توجه به این یافته‌ها و نتایج قبلی به‌نظر می‌رسد که افزایش در بیان این ژن‌ها تحت تأثیر

تشکر و قدردانی

این پژوهش با کمک مالی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انجام شد که بدین وسیله قدر دانی می‌شود.

منابع

1. Liu Y, Zhao D, Zu YT, Jiang, Y, et al. Effects of low light on terpenoid indole alkaloid accumulation and related biosynthetic pathway gene expression in leaves of *Catharanthus roseus* seedlings. *Botanical Studies*. 2010; 52: 191-196.
2. Mujib A, Ilah A, Aslam J, Fatima S, et al. *Catharanthus roseus* alkaloids: application of biotechnology for improving yield. *Plant Growth Regulation*. 2012; 68 (2): 111-127.
3. Omid Beigi R. *Production and Processing of Medicinal Plants*. Astan Ghods Razavi Publications. 2005; 3(15): 81-93.
4. Wei S. Methyl jasmonic acid induced expression pattern of terpenoid indole alkaloid pathway genes in *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Growth Regulation*. 2010; 61 (3): 243-251.
5. Liu DH, Ren WW, Cui LJ, Zhang LD, et al. Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10 (17): 3260-3268.
6. Vanisree M, Lee CY, LO SF, Nalawade SM, et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 2004; 45(1): 1-22.
7. Esmail Zadeh- Behabadi S, Sharifi M. Increasing plant secondary metabolites using bioelicitors. *Cell and Tissue*. 2013; 4 (2) 119-128.
8. Omidi M, Farzin N. Biotechnologic strategies for enhancing medicinal plants efficiency. 2009; *Regional Conference on Drug and Food*.
9. Ramani S, Jayabaskaran C. Enhanced catharanthine and vindoline production in production in suspension cultures of

الیسیتورهای مورد استفاده، ناشی از این امر باشد که گیاه برای مقابله با تنش از راه‌کار افزایش تولید متابولیت ثانویه استفاده می‌کند. متابولیت‌های ثانویه دارای عملکردهای اکولوژیکی مهم در گیاه هستند. محققین با استفاده از افزایش تولید متابولیت ثانویه سعی می‌کنند تا شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز متابولیت‌ها و نیز مکانیسم تنظیمی آن به‌دست آورند. مطالعات Dutta و همکاران (۱۴) در بررسی هم‌بستگی بین بیان ژن‌های مسیر ترپنوئید ایندول آلکالوئید (TIAs) و تولید و تجمع آلکالوئیدها نشان داد که هم‌بستگی مثبتی بین فراوانی رونویسی و تجمع آلکالوئیدهای مربوطه در ژنوتیپ‌های مختلف وجود دارد. به‌دلیل محدودیت‌های بیولوژیکی و تکنولوژی، کشت سلولی گیاه پروانش هنوز نمی‌تواند به‌صورت تجاری برای تولید آلکالوئیدهای مهم دارویی مثل وین‌بلاستین، کاتارانتین، آجمالیسین و سرپنتین به‌کار گرفته شود. مقدار کم این ترکیبات در کشت سلولی یکی از محدودیت‌های اصلی است. بنابراین بسیاری از روش‌ها برای بهبود تولید ایندول آلکالوئیدها در کشت سلولی پروانش استفاده می‌شود (۱۰). مطالعه حاضر در جهت افزایش بیان ژن‌های STR، DAT و D4H نیز در راستای تحقق این اهداف است. هر سه این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌ها افزایش بیان نشان می‌دهند و در بالا بردن زیست ساخت آلکالوئیدهایی مانند ویندولین نقش دارند. به‌عنوان نمونه Mao Jun و Fang (۲۰) توانستند با انتقال ژن Bax واکنش فوق حساسیت در گیاه پروانش ایجاد کنند و در نتیجه باعث افزایش بیان ژن STR شوند. در مطالعه دیگری (۲۱) دو ژن D4H و DAT در گیاه پروانش تحت تنش خشکی افزایش یافتند. همچنین افزایش بیان این دو ژن با بالا رفتن ویندولین در گیاه پروانش همراه بود (۲۲). وجود الیسیتور در محیط می‌تواند به‌عنوان یک عامل تنشی برای گیاه عمل کرده و سبب افزایش فعالیت سیستم دفاعی گیاه در غلظت‌های مختلف الیسیتور و در نتیجه باعث تحریک بیان برخی ژن‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه شود. در این پژوهش نیز نانو اکسید روی باعث افزایش بیان ژن‌های STR، DAT و D4H شد که می‌توان بنا بر اطلاعات ذکر شده انتظار بالا رفتن میزان متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند وین‌بلاستین و وین کریستین را نیز داشت.

16. Ahmadi J, Mohammadi R, Garoosi G, Hosseini R. Callogenesis and cell suspension optimisation in periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Agricultural Biotechnology*. 2012; 4(1): 1-18.
17. Shabani M, Farsi M, Mir-Samsi_Kakhki A. Investigation on the effect of ethylene on the expression of DAT, G10H, T16H and AVLBS in periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Modern Genetics*. 2013; 9(2): 151-160.
18. Magnotta M, Murata J, Chen J, De Luca V. Expression of deacetylindoline-4-O-acetyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Phytochemistry*. 2007; 68(14): 1922-1931.
19. Zhang B, Zheng LP, Li WY, Wang JW. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO₂ core-shell nanoparticles. *Current Nanoscience*. 2013; 9(3): 363-370.
20. Jun X, Fang D. Enhancing terpenoid indole alkaloid production by inducible expression of mammalian Bax in *Catharanthus roseus* cells. *Science in China*. 2007; 50(2): 234-241.
21. Mokhtari A, Ahmadi J, Mafakheri S. The expression profile of D4H and DAT genes in *Catharanthus roseus* in response to drought, salinity and alycyclic acid. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2013; 2(2): 38-46.
22. Wang X, Pan Y, Chang B, Ho Y, et al. Ethylene induced vinblastine accumulation is related to activated expression of downstream TIA pathway genes in *Catharanthus roseus*. *BioMed Research International*. vol. 2016, Article ID 3708187, 8 pages, 2016. doi:10.1155/2016/3708187.
- Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *Journal of Molecular Signaling*. 2008; 3: 90. Doi: 10.1186/1750-2187-3-9.
10. Zhao J, Zhu WH, Hu Q, HE XW. Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharanthus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose. *Plant Growth Regulation*. 2001; 33(1): 33-41.
11. Moreneo PR, Poulsen C, Van Der Heiden R, Verpoorte R. Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996; 18(2): 99-107.
12. Zheng Z, Wu M. Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant Science*. 2004; 166(2): 507-514.
13. Facchini P J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Biology*. 2001; 52(1): 29-66.
14. Dutta A, Batra J, Pandey-Rai S, Singh HD, et al. Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.). *Planta*. 2005; 220(3): 376-383.
15. Makhzoum A, Pett-Paly G, Pierre BS, Bernards MA. Functional analysis of the *DAT* gene promoter using transient *Catharanthus roseus* and stable *Nicotiana tabacum* transformation systems. *Plant Cell Reports*. 2011; 30(7): 1173-1182.

Evaluating the effect of zinc and cobalt nanoparticles on expression of *STR*, *DAT* and *D4H* genes in periwinkle (*Catharanthus roseus*) suspension culture

Zahra Rezaee M.Sc.¹, Ramin Hosseini Ph.D.^{2*}, Behvar Asghari Ph.D.³

1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2. Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
3. Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

* Email corresponding author: raminh_2001@yahoo.com

Received: 23 Aug. 2016

Accepted: 20 Jun. 2017

Abstract

Aim: Effects of two nanoparticles were investigated on the expression of STR, DAT and D4H genes in periwinkle.

Material and Methods: For this purpose, concentrations of 0.5, 0.75 and 1 mg per liter of cobalt and zinc oxide nanoparticles were used. Sampling was carried out at 0, 8, 24 and 48 hours after treatment.

Results: Gene expression analysis was performed by the SQ-RT-PCR method. In general, both elicitors influenced gene expression. But, the effects of zinc oxide nanoparticles on the gene expression were more pronounced than cobalt oxide nanoparticles. The highest expression of STR and D4H genes were occurred in 0.5 mg per liter of zinc oxide nanoparticles after 8 hours treatment, while in the case of DAT gene, it occurred in concentration of 1 mg per liter of this nanoparticle. Moreover, Cobalt oxide nanoparticles in most of the studied concentrations and time intervals caused decreases in gene expression.

Conclusion: Both nanoparticles had significant effects on gene expression of vinblastine and vincristine pathways.

Key words: *Catharanthus roseus*, vinblastine, vincristine, gene expression, SQ-RT-PCR, nanoparticles