

تأثیر نانوذرات کبالت روی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز سزامین در کنجد (*Sesamum indicum* L.)مریم حیدری فر^۱، M.Sc.، فاطمه دهقان نیری^۲ Ph.D.*

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 پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۱۰

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی تأثیر 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 کرج ۱، ساکارز، ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد. الیسیاتور 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 الیسیاتور در زمان‌های مختلف گردید. از آنجائیکه هیچ یک از سطوح مورد استفاده برای غلظت الیسیاتور تأثیر منفی روی بیان ژن‌های مذکور نداشتند می‌توان اثر غلظت‌های بالاتر را نیز روی میزان بیان این ژن‌ها بررسی کرد. تأثیر منفی الیسیاتور به معنی کاهش بیان ژن‌ها و کاهش میزان سزامین است.

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

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

مقدمه

کاملی برای تولید سوسپانسیون سلولی کنجد وجود ندارد هدف از این مطالعه بهینه‌سازی شرایط کشت سوسپانسیون سلولی کنجد و سپس بررسی تأثیر الیستور نانوکبالت روی میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز سزامین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی کنجد بود.

مواد و روش‌ها

دانه کنجد رقم کرج ۱ 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 به مدت دو دقیقه در الکل اتانول ۷۰ درصد (v/v) ضدعفونی و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد غوطه‌ور شد و در نهایت با آب مقطر اتوکلاو شده ۳ مرتبه و هر بار به مدت 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 NaOH و HCl یک نرمال در ۵/۸ تنظیم شد. دانه‌ها به منظور جوانه‌زنی به مدت ۳ روز در تاریکی نگهداری و سپس به اتاق کشت با درجه حرارت 25 ± 2 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 کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در این پژوهش از هیپوکوتیل (به‌دو حالت عمودی و افقی) و کوتیلدون رقم کرج ۱ 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 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار انجام شد. در آزمایش کالوس‌زایی صفات وزن تر، رنگ و نوع کالوس مورد بررسی قرار گرفت.

گیاهان دارای تنوع وسیعی از متابولیت‌های ثانویه هستند که بیشتر آن‌ها مستقیماً 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 معمولاً 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 ابزار 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 اسیدآمینو فیل-آلانین و با مزدوج شدن اکسیداتیو p-هیدروکسی‌فیل‌پروپان 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^{-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 آنجائی که گزارش

ساعت انجام شد. آزمایش تیمار سوسپانسیون سلولی کنجد با ایسیتور 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 ایسیتور 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 (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.

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 ایسیتور، منحنی رشد سلولی برای محیط‌های حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۳ میلی-گرم 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 ایسیتور: برای القای بیان بیشتر ژن‌های مسیر سنتز

سزامین از ایسیتور 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

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

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.

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

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 (°C) پرایمر	% GC پرایمر	طول محصول (bp)
<i>CYP81Q1</i>	AB194714	F- TCTCGCTCTCACCTTCGCC R-CTGGGAGAAGTCGTATAGTG	۷۵/۴ ۶۰/۹	۶۰ ۵۰	۱۶۹
<i>CYP81Q2</i>	AB194715	F-CTCTCGCTCTCACCTTCGC R- GGGAGCAGTCGTATAGTGTT	۶۹/۱ ۶۲/۸	۶۳/۲ ۵۰	۱۶۸
<i>CYP81Q3</i>	AB194716.1	F- GGGGAAGAGATACTATGGGGA R- AGCCAGCTCTTCTCCAAC	۶۴ ۶۵/۷	۵۰ ۵۲/۶	۱۶۲
<i>C3H</i>	AY065995.1	F- GCCCCCACTATGTAAAGGTC R- GTATTCACGCAACACCAAAG	۶۶/۱ ۶۵/۲	۵۵ ۴۵/۶	۱۷۳
<i>18S rRNA</i>	AJ236041.1	F- TCTTAGTTGGTGGAGCGATT R- GAACATCTAAGGGCATCACA	۶۵/۱ ۴۶/۶	۴۵ ۴۵	۱۷۱

واکنش RT-PCR کمی (شرکت تاکارای ژاپن) و دستگاه ترمال سایکلر Rotor Gene Q (شرکت کیزن) 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.

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 به کار رفته در این واکنش از کنترل منفی استفاده شد. در این روش از معرف SYBR green

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	طول شدن	منحنی ذوب
دما (°C)	۹۴	۹۴	۶۱	۵۵ به ۹۴
زمان	۳۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۲۰ ثانیه	۲۰ ثانیه (Ramping) S/C° ۰/۵

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

نتایج

انتخاب کالوس و استقرار سوسپانسیون سلولی

با توجه به این که 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).

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 تمایز زایی مشاهده نشد. از آنجائی‌که هیپوکوتیل رقم کرج ۱ 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.

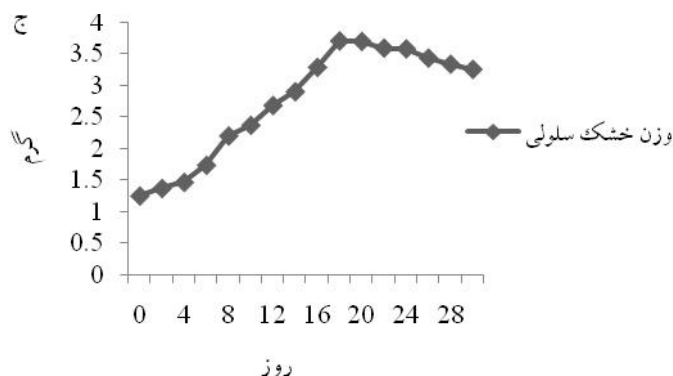
با انتقال کالوس‌های ترد و نرم به محیط MS تازه با ترکیبات قندی و هورمونی پس از یک ماه سوسپانسیون سلولی مناسبی به‌دست آمد. برای داشتن سوسپانسیون سلولی یکنواخت و غنی از سلول، هر ۱۴ روز یک بار واگشت انجام شد. بدین ترتیب بعد از حدود سه ماه سوسپانسیون سلولی متراکم و یکنواخت جهت تیماردهی تولید شد (شکل ۱، ج).

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 واگشت در این تیمار هورمونی سلول‌ها به

ب



الف

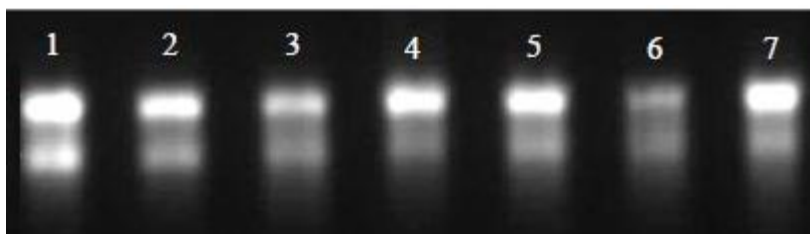


شکل ۱: الف) کالوس تولید شده از هیپوکوتیل رقم کرج ۱ که برای تولید سوسپانسیون سلولی استفاده شد. ب) سوسپانسیون سلولی ۱۸ روزه به‌دست آمده از ریزنمونه هیپوکوتیل رقم کرج ۱ در محیط حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA. ج) منحنی رشد سلول‌ها در محیط حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم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

استخراج RNA

۱/۵ درصد بررسی شد. آلودگی ژنومی نمونه‌های RNA با آنزیم DNase حذف شد. شکل ۲ نمونه‌های RNA را بعد از تیمار با آنزیم DNase I نشان می‌دهد.

از 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)



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

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 به دست 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).

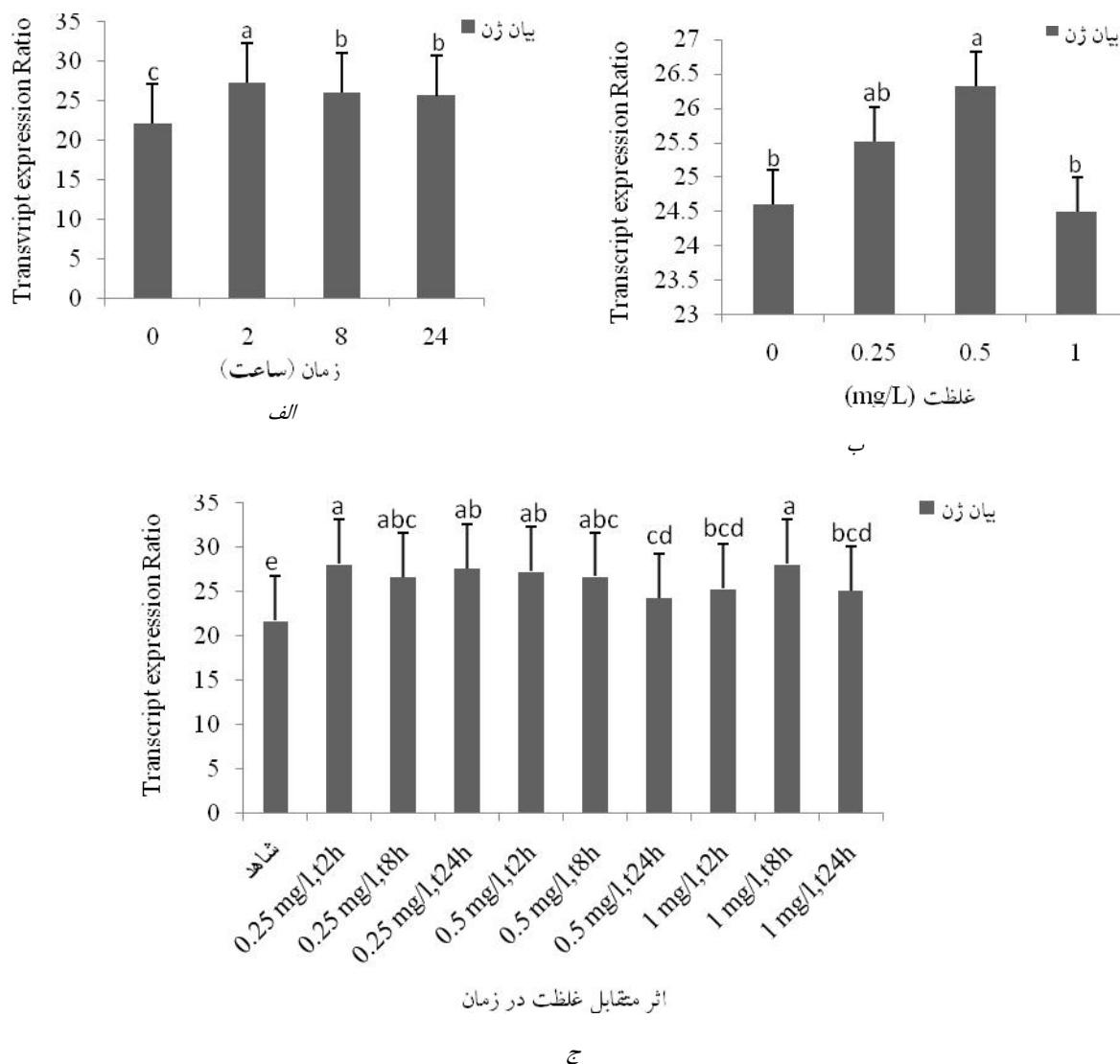
در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، بیشترین تغییر در بیان ژن، در زمان ۲ و ۸ ساعت به ترتیب بعد از اعمال ۰/۲۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوکبالت حاصل شد. اعمال الیسیتور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به نمونه شاهد گردید (شکل ۳، ج).

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 به دست آمده از آنالیز منحنی ذوب نشان داد که تکثیر تمام ژن‌ها به صورت 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 (CT). سپس CT هر نمونه با CT نمونه شاهد کالیبره شد و تغییر بیان ژن‌ها به صورت CT - یا \log_2FC 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



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

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

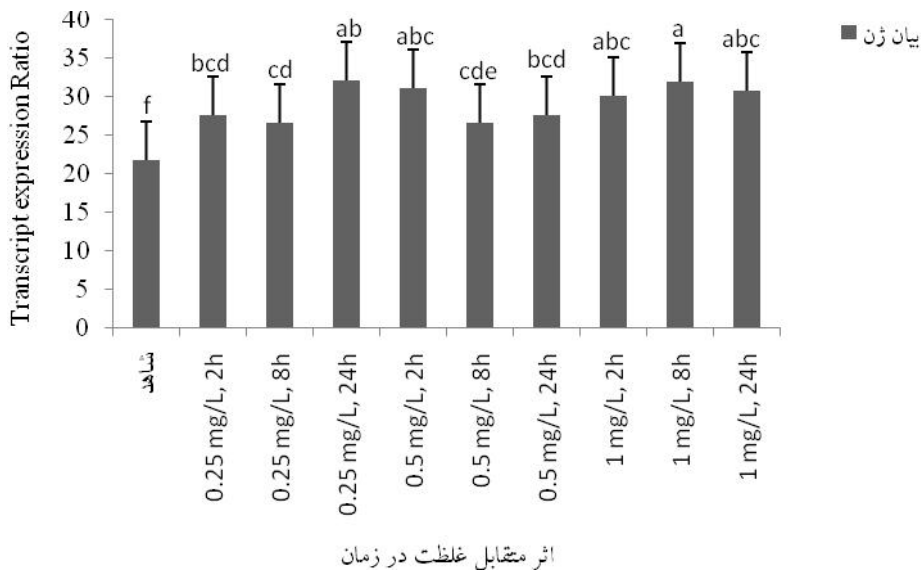
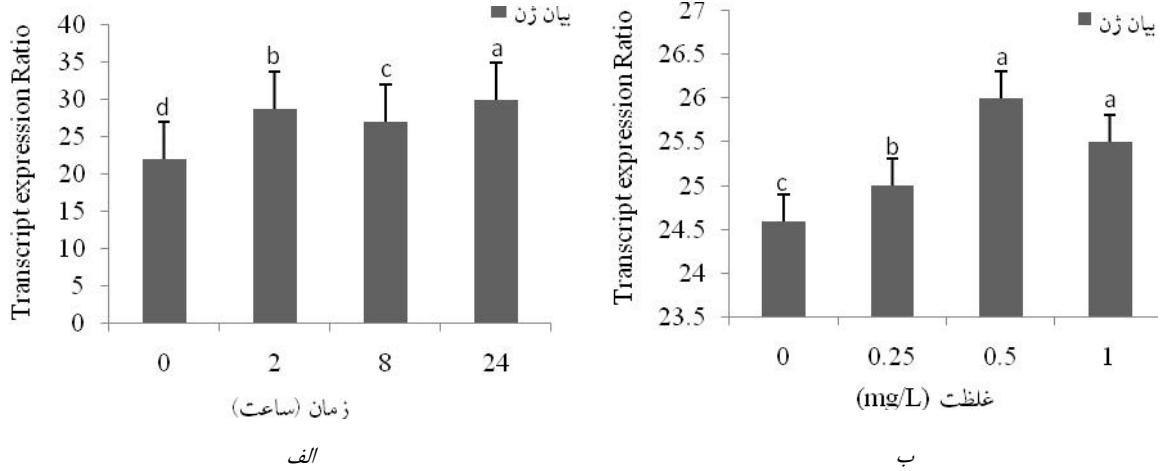
در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، بیشترین میزان بیان ژن در زمان ۸ ساعت بعد از اعمال ۱ میلی‌گرم در لیتر الیستور تعیین شد. اعمال الیستور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q2* نسبت به نمونه شاهد

بیان ژن *CYP81Q2*

بر اساس 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 الیستور 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 الیستور اختلاف معنی‌دار مشاهده شد.

افزودن الیستور در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q2* نسبت به بیان آن در نمونه

گردید (شکل ۴، ج). به‌طور کلی 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*.

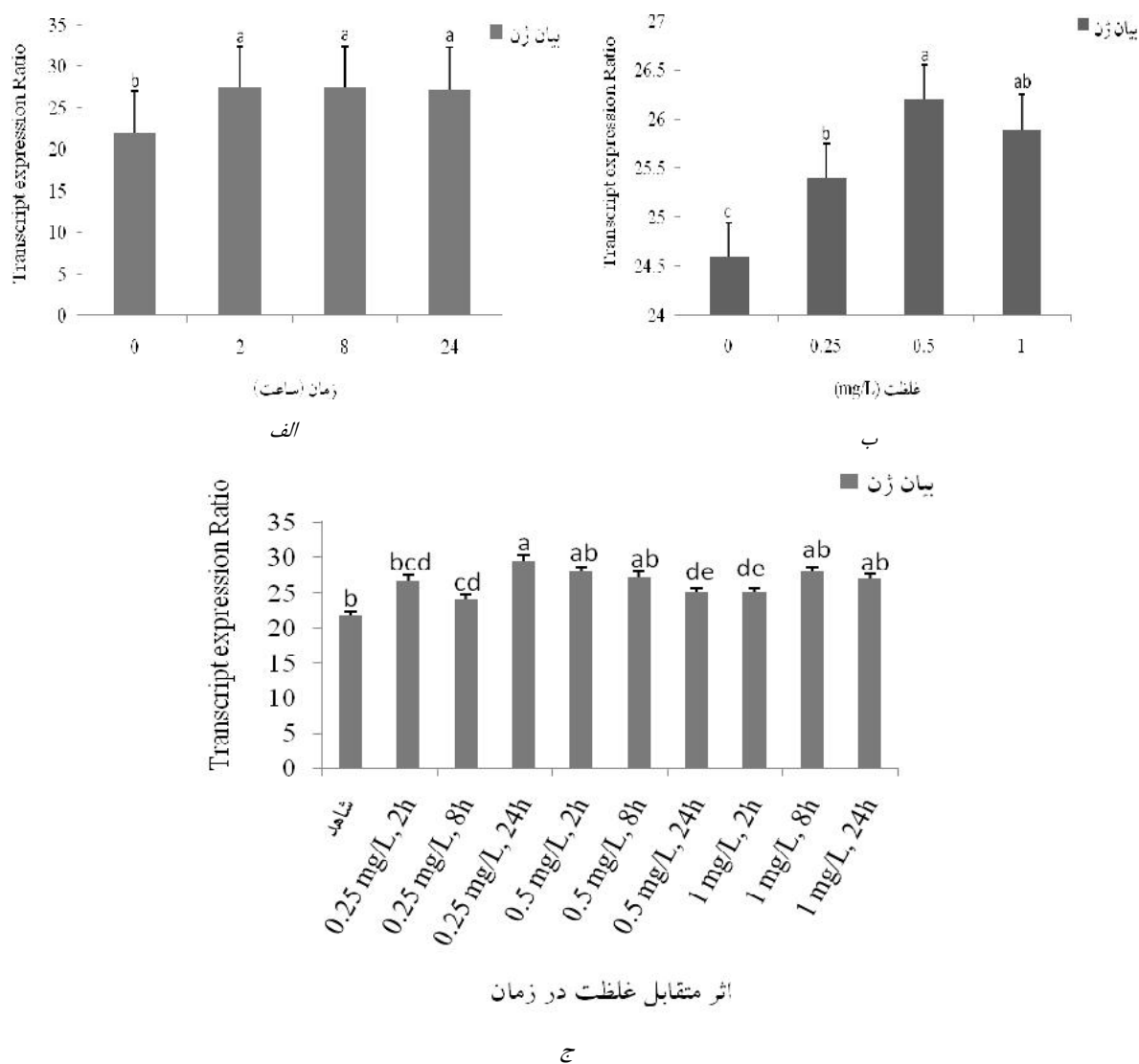
افزودن الیسیتور نانوکبالت در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی-گرم در لیتر باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q3* نسبت به نمونه شاهد شد. بیشترین میزان بیان ژن *CYP81Q3* بدون در نظر گرفتن زمان، با افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور حاصل شد (شکل ۵، ب).

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

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.

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*.

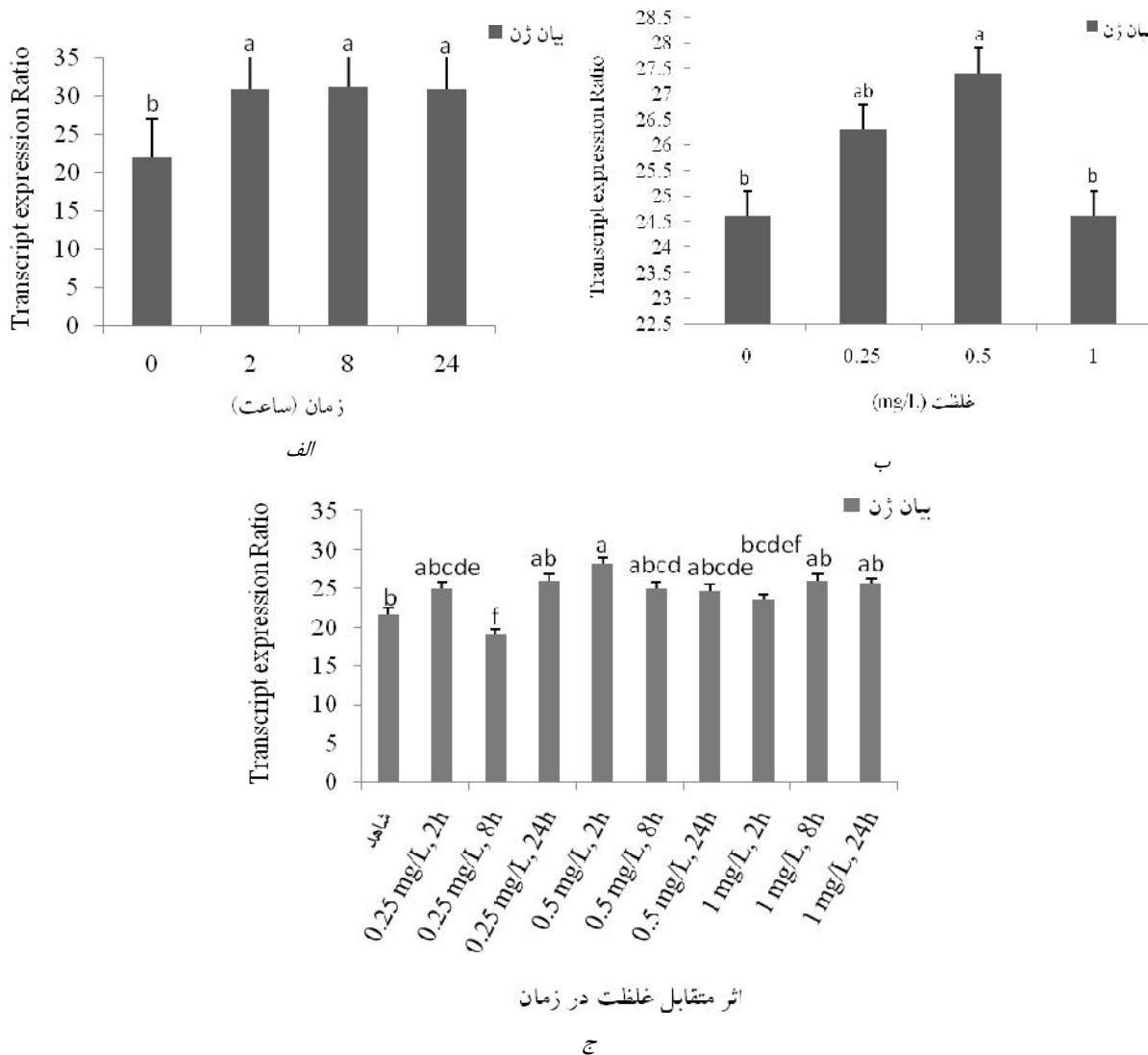
می‌شود. با وجود این، بین زمان‌های ۲، ۸ و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری در افزایش بیان ژن مشاهده نشد (شکل ۶، الف).

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).

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

در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، بیشترین بیان ژن در زمان ۲ ساعت بعد از اعمال ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیاتور 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 الیسیاتور 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 الیسیاتور بر بیان ژن *C3H*. ج) اثر متقابل غلظت در زمان بر بیان ژن *C3H*

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

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 احتمالاً به دلیل پایین

مشاهده شد. با توجه به نتایج مقایسه میانگین، الیسیاتور نانوکبالت باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* می‌شود، بنابراین با توجه به این که این ژن از ژن‌های اصلی مسیر سنتز سزامین می‌باشد می‌توان گفت که با اعمال این الیسیاتور 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 و ۲ 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 الیسیاتورها در روز هجدهم اعمال شد و با توجه به این که افزایش بیان ژن تا ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیاتور یعنی روز نوزدهم اتفاق افتاده است، می‌توان نتیجه گرفت که بهترین زمان برای اعمال الیسیاتور 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) تأثیر پنج نانوذره مس، کبالت، آهن، منگنز و مولیبدن را در تولید بتالاین و رشد سوسپانسیون سلولی گیاه چغندر قند (*Beta vulgaris*) بررسی کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که با افزایش کبالت از ۱ میکرومولار به ۵ میکرومولار می‌توان بتالاین 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 الیسیاتور در تحقیق حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با افزودن الیسیاتور 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 الیسیاتور حاصل شد. دو ژن همولوگ *CYP81Q1* و *CYP81Q2* به‌دو گونه مجزا تعلق دارند و رقم ایرانی کرج ۱ دارای هر دو ژن می‌باشد و با

اعمال الیسیاتور 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 همولوگ‌های ژن *CYP81Q1* است ولی در مسیر سنتز سزامین فعالیتی شبیه به فعالیت *CYP81Q1* و *CYP81Q2* نشان نمی‌دهد. اعمال الیسیاتور 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 الیسیاتور نانوکبالت مشاهده شد. این مقدار کمترین سطح الیسیاتور است که پس از یک شبانه روز باعث افزایش بیان ژن شده است. این موضوع نشان می‌دهد که نوع الیسیاتور 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 آرتمیسیا (*Artemisia annua*) میزان تولید آرتمیزین را تا ۶ برابر افزایش دادند. نتایج بررسی اثر الیسیاتور بر افزایش بیان ژن *C3H* نشان داد که با افزودن الیسیاتور 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 الیسیاتور حاصل شد. افزودن ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر الیسیاتور بعد از ۸ ساعت منجر به کاهش بیان این ژن شد. سایر تیمارهای زمانی و غلظت‌های مختلف الیسیاتوری منجر به افزایش بیان این ژن شدند. مسیر فنیل پروپانویید در گیاهان منجر به تولید لیگنان‌ها و فلاونوئیدها می‌شود. ژن *C3H* از ژن‌های کلیدی در مسیر فنیل-پروپانویید 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 الیسیاتور بر میزان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوییدها در کشت سلولی گیاه دارویی کتان (*Linum album*) بررسی کردند. مطالعه بیان ژن‌ها با روش RT-PCR کمی نشان داد که بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیلایز، سینامیل-الکل‌دهیدروژناز و سینامیل کوآنزیم‌آ ردوکتاز که در مراحل ابتدایی مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین نقش دارند و همچنین بیان پینورزینول لاریسی‌رزینول ردوکتاز، ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها، بعد از افزودن عصاره قارچ به محیط کشت به

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^{-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.

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

به‌طور کلی 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 ایسیستور ولی در زمان‌های مختلف رخ داد. همچنین مشخص گردید که هیچ یک از سطوح مورد استفاده برای غلظت ایسیستور 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 ایسیستور روی بیان این ژن‌ها (کاهش بیان این ژن‌ها) به معنی کاهش میزان سزامین است.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج حاصل از این پژوهش ایسیستور 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 ایسیستور 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

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 sucrose, 26°C, 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