

تأثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین روی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزامین در کنجد

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۶۶-۱۵۵

Effect of salicylic acid and phenylalanine on expression of key genes involved in the sesamin biosynthesis pathway in sesame

شهره امان‌الهی^۱، فاطمه دهقان نیری^{۲*}، میترا محمدی بازرگانی^۳

Shohreh Amanelahi¹, Fatemeh Dehghan Nayeri^{2*}, Mitra Mohammadi Bazrgani³

۱- کارشناس ارشد، ۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع

طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۳- استادیار پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

1. M.Sc. 2. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

3. Assistant Professor of Agriculture Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mitra_cb@yahoo.com

fatemeh_dn@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹)

چکیده

واژه‌های کلیدی

کنجد،

سزامین،

اسیدسالیسیلیک،

فنیل آلانین،

qRT-PCR

گیاه کنجد (*Sesamum indicum* L.) منبع مگنژ، مس و سرشار از کلسیم، منیزیم، آهن، فسفر، ویتامین B1، روی و فیبرهای غذایی است. همچنین حاوی دو ترکیب منحصر به فرد از فیبرهای ویژه مفید گروه لیگنان‌ها با نام‌های سزامین و سزامولین می‌باشد که باعث کاهش کلسترول در بدن انسان می‌شوند. در این تحقیق تأثیر الیستور اسیدسالیسیلیک و پیش ماده فنیل آلانین بر میزان بیان دو ژن کلیدی دخیل در بیوسنتز سزامین (*CYP81Q1* و *C3H*) در کشت سوسپانسیون سلولی کنجد بررسی گردید. تیمارهای اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین به ترتیب در غلظت‌های (۰/۱، ۰/۵ و ۱) و (۰/۱ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر استفاده گردید و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نمونه برداری انجام شد. بیان ژن‌ها با روش qRT-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز سزامین در همه نمونه‌های تیمار شده با اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین افزایش یافت. در مورد ژن *CYP81Q1* بیشترین افزایش بیان مربوط به غلظت ۱ میلی گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک در بازه زمانی ۷۲ ساعت و ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین در بازه زمانی ۷۲ ساعت بود. بیشترین افزایش بیان ژن *C3H* مربوط به غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک در بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین در بازه زمانی ۷۲ ساعت بود.

مقدمه

گیاهان دارویی از منابع قابل توجه در تهیه داروهای گیاهی و مصنوعی هستند و شرکت‌های داروسازی از بیش از ۲۵۰۰۰ گیاه برای تهیه داروها استفاده می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه مسئول خاصیت دارویی گیاهان هستند. 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. شروع این کشت معمولاً با انتقال قطعات کوچکی از کالوس ترد و تمایز نیافته به محیط کشت مایع است. ارلن‌های حاوی ریزنمونه یا کالوس روی یک شیکر به طور یکنواخت و مداوم تکان داده می‌شوند. تکان دادن محیط کشت با استفاده از شیکر با اعمال فشار ملایمی بر توده‌های سلولی آن‌ها را به توده‌های کوچک‌تر و سلول‌های انفرادی می‌شکند و پراکنش یکنواختی از سلول‌ها در محیط کشت ایجاد می‌شود. همچنین در اثر این حرکت، تبادل گازی مطلوبی بین محیط کشت و هوا برقرار می‌شود. از کشت سوسپانسیون سلولی برای بررسی ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی و نیز به عنوان منبعی برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش استفاده می‌شود. کنجد احتمالاً قدیمی‌ترین دانه روغنی است که توسط انسان شناخته و به عنوان یک منبع غذایی استفاده شده است. کنجد سرشار از منگنز، مس، کلسیم، منیزیم، آهن، فسفر، ویتامین B1، روی و فیبرهای غذایی است. به جز این مواد مغذی مهم، کنجد حاوی دو ترکیب منحصر به فرد از فیبرهای ویژه مفید به نام لیگنان‌ها شامل سزامین و سزامولین است که باعث کاهش کلسترول در بدن انسان می‌شوند، از فشار خون بالا جلوگیری می‌کنند و مشتقات ویتامین E را در حیوانات افزایش می‌دهند. روغن کنجد در بین روغن‌های خوراکی به ملکه روغن‌ها مشهور است (Wahid, 2007; Moazzami et al., 2006). روغن کنجد حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و تأثیر چشمگیری در پیشگیری از بیماری‌های مختلف دارد (Hirose, 1991).

(Kang et al., 1999). به دلیل کاربرد آن در درمان بیماری‌ها به خصوص سرطان‌ها در دهه گذشته تلاش‌های زیادی در راستای شناخت بیشتر فواید سزامین، ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز سزامین و افزایش میزان بیان ژن-های دخیل در مسیر بیوسنتز آن انجام شده است. یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر تولید سزامین ژن *CYP81Q1* است که با افزایش بیان آن در مراحل تشکیل دانه کنجد محتوای سزامین دانه افزایش می‌یابد. بطورکلی ترکیبی از انتقال ژن، نور، و الیستور یک استراتژی امیدوار کننده برای بهبود بیشتر تولید و بهره‌وری لیگنان‌ها از جمله سزامین می‌باشد (Satake et al., 2015). که از سه عامل نام برده شده تا کنون فقط اثر دوره روشنایی بر رشد گیاهان، و محتوای سزامین و بیان ژن *CYP81Q1* در گیاه کنجد بررسی شده است (Hata et al., 2012). سنتز سزامین از پینورزینول توسط ژن *CYP81Q1* طی دو مرحله صورت می‌گیرد (Hata et al., Ono et al., 2006). روش RT-PCR کمی از معتبرترین روش‌های اندازه‌گیری بیان ژن می‌باشد. اساس این روش بر پایه نسبت بیان ژن موردنظر به بیان ژن خانه‌دار است. یکی از روش‌های نمایش داده‌های RT-PCR کمی روش CT مقایسه‌ای است که به عنوان روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ شناخته می‌شود. در این روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ به عنوان Fold Change (FC) است یعنی ژن موردنظر چند برابر ژن خانه‌دار بیان شده است. از این روش برای بررسی بیان ژن در نمونه‌های مختلف نسبت به نمونه شاهد استفاده می‌شود. طی دهه-های اخیر تحقیق روی آنتی‌اکسیدان‌ها اهمیت زیادی پیدا کرده و مطالعه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در غذا و فواید سلامتی بالقوه آنها مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Qusti et al., 2010). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین روی میزان بیان دو ژن دخیل در سنتز سزامین (*C3H* و *CYP81Q1*) در محیط کشت سوسپانسیون سلولی کنجد است.

مواد و روش ها

کشت سوسپانسیون سلولی

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) به عنوان محیط کشت پایه جهت کشت دانه و تولید گیاهچه درون شیشه‌ای، کالوس‌زایی و تهیه سوسپانسیون سلولی استفاده شد. برای این منظور دانه‌های کنجد ابتدا به مدت دو دقیقه در الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد غوطه‌ور شدند و در نهایت با آب مقطر اتوکلاو شده ۳ مرتبه و هر بار به مدت دو دقیقه شستشو شدند. تمام مراحل ضدعفونی زیر هود لامینار و در ظروف استریل انجام گرفت. پس از ضدعفونی، دانه‌ها در ظروف کشت حاوی محیط MS فاقد هورمون و حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم شد. دانه‌ها به منظور جوانه‌زنی ۳ روز در تاریکی نگهداری و سپس به اتاق کشت با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. در این پژوهش از هیپوکوتیل گیاهچه‌های ۱۸ روزه رقم کرج ۱ به عنوان ریزنمونه استفاده شد. هیپوکوتیل به قطعات یک سانتی‌متری برش داده شد و به حالت افقی و به صورت جداگانه روی محیط کشت قرار گرفت. پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های کالوس‌زایی پتری‌های حاوی کشت در شرایط تاریکی در اتاقک رشد با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هر دو هفته یک بار واگشت ریزنمونه‌ها انجام شد. برای تهیه سوسپانسیون سلولی، در یک ارلن متناسب با حجم تیمارها، ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر، به عنوان منبع کربن در آب مقطر به وسیله همزن مغناطیسی حل شد. سپس نمک‌های محیط MS به محلول اضافه و با آب مقطر به حجم نهایی رسانده شد. پس از اضافه کردن

هورمون‌ها، با استفاده از آب مقطر حجم نهایی هر ارلن تعیین و pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم شد و برای ضدعفونی اتوکلاو گردید. سپس از محیط‌های به دست آمده به میزان ۳۰ میلی‌لیتر به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌-لیتری منتقل شد. به ارلن‌ها ۰/۵ گرم کالوس انتقال داده شد. ارلن‌های حاوی سوسپانسیون سلولی روی شیکر با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند.

اعمال محرک (الیستور)

جهت افزایش تولید سزامین، از الیستور اسیدسالیسیلیک و پیش ماده فنیل آلانین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی استفاده شد. برای این منظور تیمارهای اسیدسالیسیلیک با غلظت‌های (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و فنیل آلانین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، در روز هجدهم در کشت سوسپانسیون سلولی اعمال شدند. نمونه‌برداری در ۳ بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. آزمایش تیمار سوسپانسیون سلولی کنجد با الیستورها در سه تکرار مجزا صورت گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA

نمونه‌برداری از کشت‌های سلولی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال الیستور انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA کل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-PLUS (ساخت شرکت سیناکلون) انجام شد. قبل از ساخت cDNA، جهت حذف آلودگی احتمالی RNA با DNA ژنومی، از آنزیم DNaseI (شرکت سیناکلون) استفاده شد. 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 به منظور 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) سنتز

آغازگرهای طراحی شده از لحاظ عدم اتصال غیر اختصاصی و تشکیل دایمر با استفاده از Primer blast مورد بررسی و تایید قرار گرفتند. اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

شد. جهت اطمینان از سنتز cDNA ها، با استفاده از آغازگر ژن *18S rRNA* (ژن خانه‌دار) واکنش PCR انجام شد و درستی ساخت آنها مورد تایید قرار گرفت. با استفاده از توالی ژن‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و نرم‌افزار Oligo5 آغازگرهای موردنظر طراحی شدند.

جدول ۱- طراحی آغازگرهای واکنش qRT-PCR

Table 1. Primer design for qRT-PCR

شماره دسترسی ژن accession number	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای ذوب Tm (°C)	% GC	اندازه محصول PCR PCR product size
KP771974	CYP81Q1 F	5'-TCTCGCTCTCACCTTCGCC-3'	57.4	60	169 bp
	CYP81Q1 R	5'-CTGGGAGAAGTCGTATAGTG-3'	60.9	50	
AY065995	C3H F	5'-GCCCCACTATGTTAAGGTC-3'	66.8	55	173 bp
	C3H R	5'-GTATTCACGCAACACCAAAG-3'	65.2	45.6	
AJ236041	18SrRNA F	5-TCTTAGTTGGTGGAGCGATT-3	65.9	45	171 bp
	18SrRNA R	5-GAACATCTAAGGGCATCACA-3	64.6	45	

شد. وجود دو باند مربوط به *18S rRNA* و *28S rRNA* و عدم کشیدگی باندها نشان‌دهنده کیفیت مطلوب RNA بود. از این RNA برای سنتز cDNA و بررسی بیان ژن استفاده شد. تمام cDNAهای سنتز شده (با غلظت ۱ میکروگرم در میکرولیتر) به میزان ۱۵ برابر رقیق شدند و در واکنش qRT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش qRT-PCR

برای بررسی میزان بیان دو ژن دخیل در مسیر سنتز سزامین از روش qRT-PCR استفاده شد. جهت اطمینان برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. برای انجام این آزمایش از معرف SYBR Green در میکروپلیت‌های ۷۲ چاهکی و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده گردید. 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

واکنش qRT-PCR

میزان بیان دو ژن دخیل در مسیر سنتز سزامین شامل *CYP81Q1* و *C3H* در میکروپلیت‌های ۷۲ چاهکی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با روش qRT-PCR بررسی شد. برای اطمینان از آلوده نبودن ترکیبات بکار رفته در این واکنش از کنترل منفی استفاده شد. در این روش از معرف SYBR Green (شرکت امینسان) و دستگاه ترمال سایکلر Rotor Gene Q (شرکت کیاژن) استفاده شد. برنامه PCR در ۴۰ چرخه انجام شد.

نتایج

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از نمونه های تیمار شده با کیت-RNX PLUS (شرکت سیناکلون) انجام شد. به منظور اطمینان یافتن از کیفیت RNAها مقدار ۳ میکرولیتر از RNAهای استخراج شده روی ژل آگارز ۱/۵٪ (w/v) الکتروفورز

منفی استفاده شد که نتایج غیرآلوده بودن ترکیبات مورد استفاده را نشان دادند. نرمال سازی داده های CT مربوط به نمونه های مختلف و نمونه شاهد با استفاده از روش CT ژن مرجع و صورت گرفت. بیان ژن ها در نمونه های مختلف تیمار شده با الیستورها به صورت FC گزارش شد.

مقایسه میانگین بیان ژن ها

تأثیر الیستور اسیدسالیسیلیک بر میزان بیان ژن

CYP81Q1

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای مختلف زمانی الیستور اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می دهد که بدون در نظر گرفتن غلظت الیستور، بین زمان های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اعمال الیستور اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی داری وجود دارد. بیشترین میزان بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال الیستور و کمترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال الیستور اسیدسالیسیلیک به دست آمد (شکل ۱- الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت های مختلف الیستور اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می دهد که بین غلظت های مختلف الیستور اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی داری وجود دارد. بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک و کمترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت الیستور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *CYP81Q1* نشان داد که افزایش غلظت تا حدی باعث افزایش بیان ژن نسبت به شاهد شده است و هرچه غلظت از مقدار مشخصی بیشتر شده است بیان ژن به همان نسبت افزایش پیدا نکرده بلکه به مقدار کمی کاهش یافته است که این نشان می دهد همیشه افزایش غلظت الیستور باعث

افزایش بیان ژن به همان نسبت نمی شود بلکه ممکن است تأثیرات منفی نیز داشته باشد. به عبارتی رابطه مستقیم بین غلظت اسیدسالیسیلیک و میزان بیان ژن وجود ندارد (شکل ۱-ب).

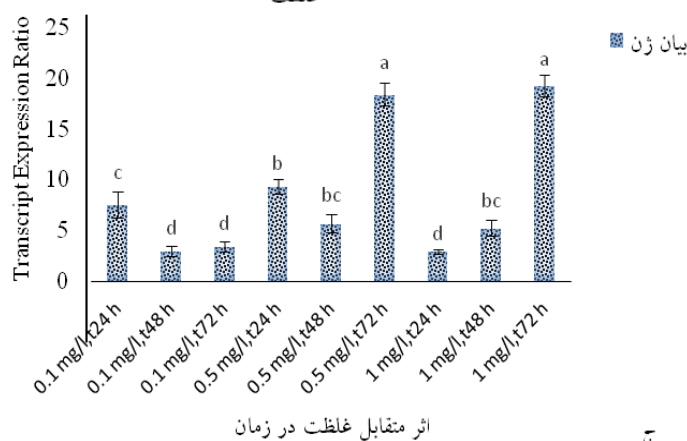
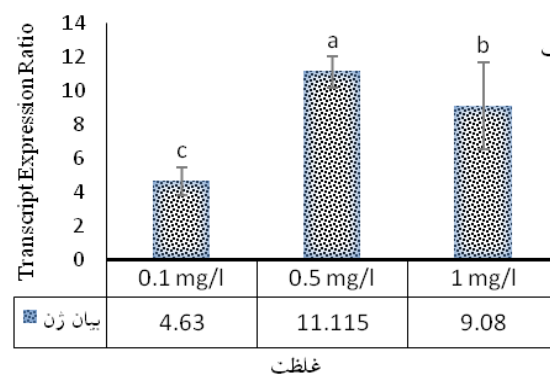
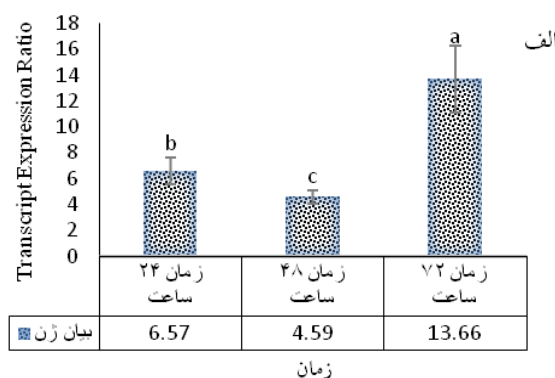
نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان الیستور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد نشان می دهد بیشترین تغییر در بیان ژن، در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال الیستور اسیدسالیسیلیک در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر الیستور اسیدسالیسیلیک حاصل شد به طوری که این دو تیمار تفاوت معنی داری با هم نداشتند و کمترین تغییر در بیان ژن، در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب در غلظت های ۱ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر و ۷۲ ساعت بعد از اعمال الیستور اسیدسالیسیلیک در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر حاصل شد به طوری که این تیمارها تفاوت معنی داری با هم نداشتند. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود اعمال الیستور در غلظت ها و زمان های مختلف باعث افزایش بیان ژن نسبت به شاهد شده است (شکل ۱-ج).

تأثیر الیستور اسیدسالیسیلیک بر میزان بیان ژن

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در تیمارهای مختلف زمانی اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می دهد که بدون در نظر گرفتن غلظت الیستور بین زمان های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اعمال اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی داری وجود دارد ولی زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی داری با هم نداشتند بطوریکه بیشترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت و کمترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال اسیدسالیسیلیک به دست آمد (شکل ۲-الف).

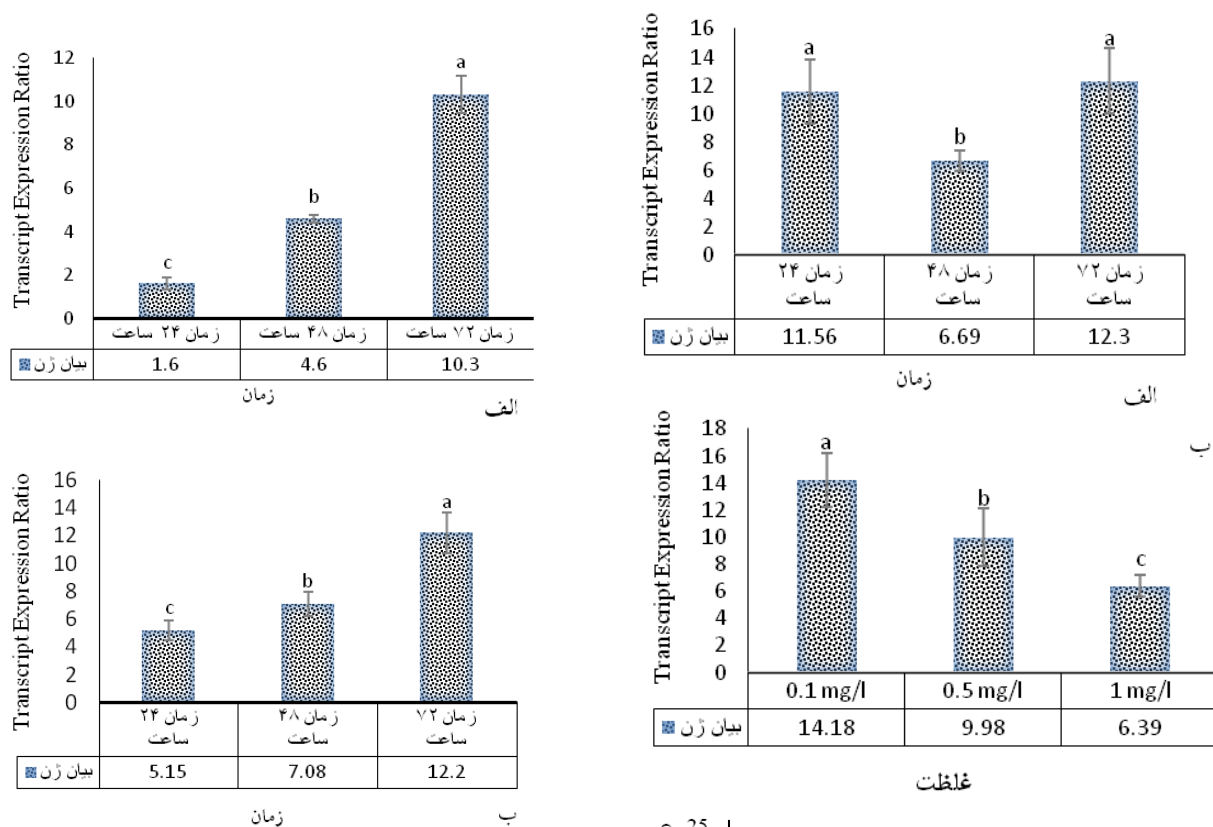
نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می دهد که بین غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی داری وجود دارد. بیشترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر و کمترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر بدست آمد. نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *C3H* نشان داد که افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک باعث کاهش بیان این ژن نسبت به شاهد شده است. در نتیجه همیشه افزایش غلظت الیستور باعث افزایش بیان یک ژن به همان نسبت نمی شود و رابطه مستقیم بین آنها وجود ندارد (شکل ۲-ب).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، الیستور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد نشان می دهد که بیشترین تغییر در میزان بیان ژن بعد از اعمال ۰/۱ میلی گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک در بازه زمانی ۲۴ ساعت حاصل شد و کمترین تغییر در میزان بیان ژن، در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال اسیدسالیسیلیک در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر حاصل شد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود اعمال الیستور در غلظت ها و زمان های مختلف باعث افزایش بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد شده است و تیمارها تفاوت معنی دار با هم داشتند (شکل ۲-ج).



شکل ۱- بیان ژن *CYP81Q1* (الف) تیمارهای زمانی مختلف بعد از تیمار با اسیدسالیسیلیک. (ب) غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک. (ج) اثر متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک در زمان. داده ها $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$ هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهند.

Figure 1. CYP81Q1 gene expression at A) Different times after treatment with salicylic acid. B) Different concentrations of salicylic acid. C) Interaction of salicylic acid concentrations and time. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$.

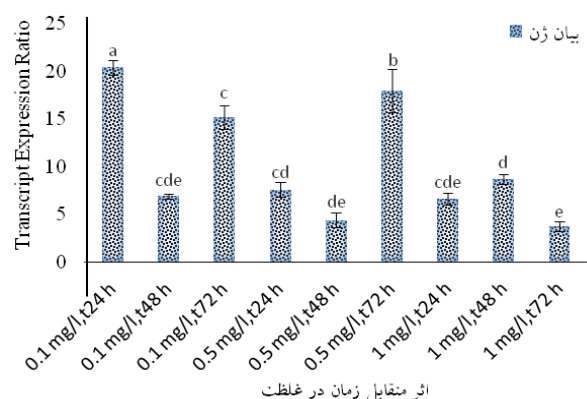


شکل ۳- بیان ژن های *CYP81Q1* (الف) و *C3H* (ب) در تیمارهای زمانی مختلف بعد از تیمار با فنیل آلانین. داده ها $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$ هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهند.

Figure 3. *CYP81Q1* and *C3H* genes expression at different times after treatment with phenylalanine. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$

تأثیر فنیل آلانین بر میزان بیان ژن های *CYP81Q1* و *C3H*

آنالیز داده های تأثیر فنیل آلانین در زمان های مختلف در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بر میزان بیان ژن *CYP81Q1* به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس تأثیر فنیل آلانین در زمان های مختلف بر میزان بیان ژن *CYP81Q1* نشان از معنی دار بودن اثر زمان در سطح یک درصد داشت. براساس نتایج حاصل دو تیمار زمانی با هم اختلاف معنی دار بر بیان ژن *CYP81Q1* دارند.



شکل ۲- بیان ژن *C3H* در (الف) تیمارهای زمانی مختلف بعد از تیمار با اسیدسالیسیلیک. (ب) غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک. (ج) اثر متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک در زمان. داده ها $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$ هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهند.

Figure 2. *C3H* gene expression at A) Different times after treatment with salicylic acid. B) Different concentrations of salicylic acid. C) Interaction of salicylic acid concentrations and time. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$

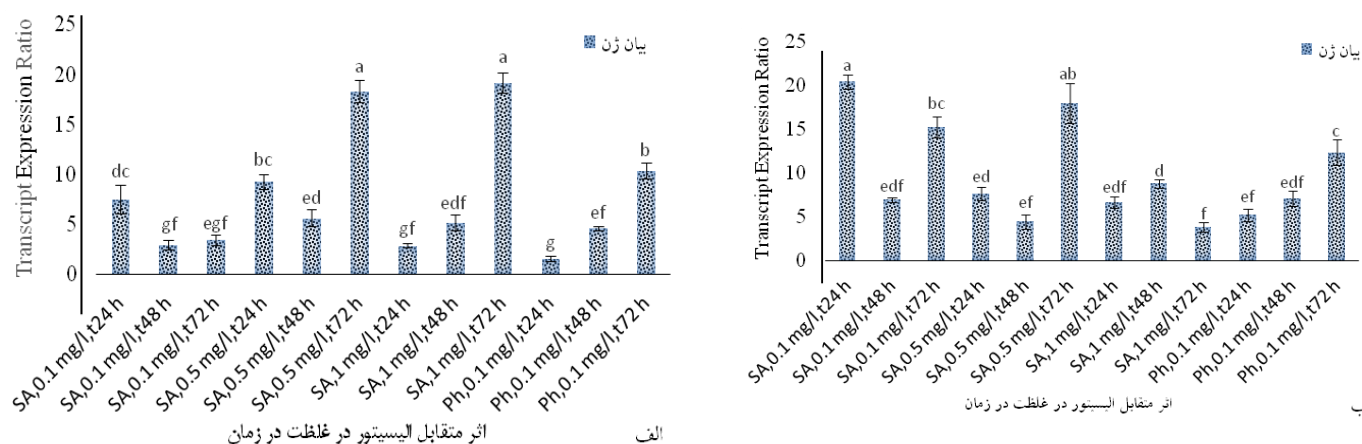
تأثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین در غلظت در زمان

بر میزان بیان ژن های *CYP81Q1* و *C3H*

نتایج مقایسه میانگین اثر اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین در غلظت در زمان بر بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد نشان می دهد بیشترین میزان بیان ژن در تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت ۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار بدست آمد به طوری که این دو تیمار تفاوت معنی داری با هم نداشتند. کمترین میزان بیان ژن، در تیمار فنیل آلانین در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از اعمال آن حاصل شد. همان طور که در نمودار زیر مشاهده می شود اعمال اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد شده است. معنی دار شدن اثر الیستور در غلظت در زمان نشان دهنده تأثیر متفاوت غلظت ها و زمان های مختلف تیمار با اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین بر بیان ژن *CYP81Q1* می باشد (شکل ۴-الف). نتایج مقایسه میانگین اثرهای اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین در غلظت در زمان بر بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد نشان می دهد که بیشترین میزان بیان ژن در تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت ۰/۱ و پس از آن در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر به ترتیب در دو بازه زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار بدست آمد به طوری که این دو تیمار تفاوت معنی داری نداشتند. کمترین میزان بیان ژن در تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت ۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر به ترتیب در دو بازه زمانی ۷۲ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال الیستور حاصل شد به طوری که این دو تیمار تفاوت معنی داری با هم نداشتند. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود اعمال اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین باعث افزایش بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد شده است. معنی دار شدن اثرهای الیستور در غلظت در زمان نشان دهنده تأثیر متفاوت اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین با غلظت ها و زمان های مختلف بر بیان ژن *C3H* می باشد (شکل ۴-ب).

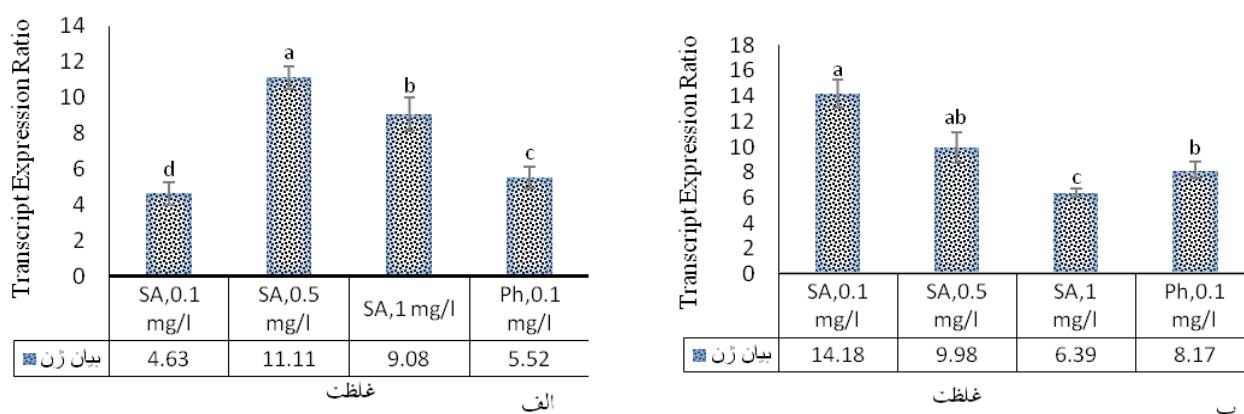
نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل آلانین نسبت به شاهد نشان می دهد که بین زمان های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین تفاوت معنی داری وجود دارد. بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل آلانین و به ترتیب بعد از آن زمان ۴۸ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال فنیل آلانین بیشترین تأثیر را داشتند. بعبارت دیگر هرچه زمان بیشتری از اعمال فنیل آلانین می گذرد بیان ژن *CYP81Q1* افزایش بیشتری پیدا کرده است. میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین نسبت به شاهد نشان می دهد که بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده و تفاوت معنی داری با آن دارد. (شکل ۳-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل آلانین نسبت به شاهد نشان می دهد که در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین بین زمان های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل آلانین تفاوت معنی داری وجود دارد ولی زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال فنیل آلانین تفاوتی معنی داری با هم نداشتند. بیشترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل آلانین و کمترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال فنیل آلانین به دست آمد. بیان ژن *C3H* تحت تأثیر فنیل آلانین روند تصاعدی نشان داد بطوری که هرچه از زمان اعمال فنیل آلانین می گذرد بیان ژن *C3H* افزایش بیشتری پیدا کرده است. میانگین بیان ژن *C3H* در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین نسبت به شاهد نشان می دهد که بیان ژن *C3H* در غلظت مورد استفاده نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده است و تفاوت معنی داری با آن دارد (شکل ۳-ب).



شکل ۴- تغییر بیان ژن های *CYP81Q1* (الف) و *C3H* (ب) در اثر متقابل زمان و غلظت اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین. داده ها $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$ هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهند.

Figure 4. Changes in *CYP81Q1* and *C3H* genes expression at the interaction of time and concentration of salicylic acid and phenylalanine elicitors. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$



شکل ۵- تغییر بیان ژن های *CYP81Q1* (الف) و *C3H* (ب) در غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین. داده ها $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$ هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهند.

Figure 5. Changes in *CYP81Q1* and *C3H* genes expression at different concentrations of salicylic acid and phenylalanine elicitors. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$

ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک رخ داده است به طوری که این دو تیمار تفاوت معنی داری با هم نداشتند و کمترین میزان بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین به دست آمد به-

تأثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین در غلظت های مختلف بر میزان بیان ژن های *CYP81Q1* و *C3H* نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین نسبت به شاهد نشان می دهد که بین غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین تفاوت معنی داری وجود دارد. بیشترین بیان

طوری که این دو تیمار تفاوت معنی داری با هم نداشتند (شکل ۵-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین نسبت به شاهد نشان می دهد که بین غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین تفاوت معنی داری وجود دارد. بیشترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک و کمترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد به ترتیب در غلظت ۱ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر بود (شکل ۵-ب).

بحث

بررسی بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین

در مطالعه تیمارهای مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین در غلظت های مختلف و بازه های زمانی مختلف به طور جداگانه، افزایش بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به نمونه شاهد مشاهده گردید. با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین، اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* می شوند، در نتیجه به دلیل افزایش بیان این ژن در اثر اعمال الیستور، افزایش احتمالی لیگنان سزامین مورد انتظار است زیرا ژن *CYP81Q1* از ژن های اصلی مسیر سنتز سزامین می باشد. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان الیستور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد نشان می دهد که بیشترین تغییر در بیان ژن، در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال الیستور اسیدسالیسیلیک در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک حاصل شد به طوری که این دو تیمار تفاوت معنی داری با هم نداشتند. نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل-آلانین نسبت به شاهد نشان می دهد که در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین بین زمان های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل آلانین تفاوت معنی داری وجود دارد و بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد

در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال آن مشاهده گردید. هرچه زمان اعمال فنیل آلانین بیشتر شده است بیان ژن *CYP81Q1* افزایش پیدا کرده است. از آنجایی که فنیل آلانین پیش ماده تولید سزامین است می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که افزایش پیش ماده (فنیل آلانین) در محیط سبب القای بیان ژن و تولید آنزیم لازم (*CYP81Q1*) برای تبدیل آن به ماده نهایی (سزامین) می شود. با توجه به منحنی رشد سلول ها در بازه زمانی روزهای ۱۸ تا ۲۲ سلول ها در مرحله رشد لگاریتمی هستند و سپس وارد فاز سکون می شوند (Heidarifar and Dehghan Nayeri, 2015). همچنین طبق تحقیقات به عمل آمده اسیدسالیسیلیک باعث افزایش تقسیم سلولی می شود (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). بر اساس منحنی رشد سلول های کنجد، تکثیر سلول ها به طور طبیعی تا حدود روز ۲۲ ادامه دارد که در حضور اسیدسالیسیلیک افزایش می یابد و در نتیجه نسخه های بیشتری از ژن در محیط کشت تولید می شوند و از سوی دیگر تأثیر مثبت الیستور روی القای احتمالی بیان ژن طی ۷۲ ساعت که می توانند دلایل افزایش بیان ژن طی این مدت باشند. تحقیقات کمی در مورد تأثیر اسیدسالیسیلیک بر عملکرد نهایی گیاهان صورت گرفته است از جمله در آزمایشی، محلول پاشی برگ های گیاهان ۳۰ روزه *Brassica juncea* با غلظت ۰/۰۱ میلی مولار این ماده، موجب افزایش غلاف ها (۱۳/۷۸ درصد) و افزایش عملکرد دانه (۸/۴ درصد) گردید که نشان دهنده این واقعیت است که ترکیبات فنلی در انتقال دادن مواد فتوسنتزی به سمت مقصد دخالت می کنند. ضمن اینکه افزایش ماده خشک نیز از طریق افزایش در میزان فتوسنتز خالص، بازده کربوکسیلاسیون و افزایش در فعالیت نیترا تریدوکناز و کربنیک آنهیدراز در مقایسه با گیاهان شاهد در این گیاه گزارش شده است. فعالیت بالاتر آنزیم کربنیک آنهیدراز به طور معنی داری با فتوسنتز خالص همبستگی نشان داده است. فتوسنتز خالص بالاتر کسب شده از کاربرد غلظت های پایین اسیدسالیسیلیک، به طور

طبیعی در رشد بهتر گیاهان و افزایش تولید ماده خشک منعکس گردیده است. از طرفی ترکیبات فنلی و از جمله سالیسیلات ها مانع اکسیداسیون اکسین می گردند. به این ترتیب کاهش در محتوای اکسین اکسید شده نیز دلیل دیگری است که منجر به افزایش فتوسنتز خالص می گردد (Fariduddin et al., 2003).

بررسی بیان ژن *C3H* در تیمارهای اسیدسالیسیلیک و فنیل آلانین

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان الیستور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد نشان می دهد که بیشترین تغییر در بیان ژن، در بازه زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از افزودن ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر این الیستور به محیط کشت سلولی کنگد حاصل شد به طوری که این دو تیمار تفاوت معنی داری با هم نداشتند. الیستورهای زیستی و غیرزیستی تولید متابولیت های ثانویه گیاهی را از طریق تنظیم سرعت بیوسنتز آنها، ذخیره و انتقال واکوئلی، تجزیه و یا تغییر و تبدیل آنها تحت تأثیر قرار می دهند (Jeong and Park, 2006). براساس تحقیقات انجام شده ترشح جنیستین از ریشه های گیاه لوپن زرد توسط اسیدسالیسیلیک، کیتوزان و سیانیدپتاسیم افزایش می یابد. به عبارتی پیش ماده های مسیرهای بیوسنتزی می توانند جهت افزایش تولید متابولیت های ثانویه در کشت سوسپانسیون گیاه مورد استفاده قرار گیرند (Zhang et al., 2006). در این رابطه در این تحقیق نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل آلانین نسبت به شاهد نشان داد که در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین بین زمان های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل -

آلانین تفاوت معنی داری وجود دارد ولی زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال فنیل آلانین تفاوتی معنی داری با هم نداشتند. بیشترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل آلانین به دست آمد. با افزایش زمان اعمال فنیل آلانین بیان ژن *C3H* نیز افزایش پیدا کرده است. ژن *C3H* از ژن های کلیدی در مسیر فنیل پروپانویید است که کافنیل شیکیمات را به P-کوماریل شیکیمات تبدیل می کند. این ترکیب در ادامه ی مسیر به لیگنان های گروه S و G تبدیل می شود (Ralph et al., 2006). بنابراین می توان گفت که احتمالاً با افزایش بیان ژن *C3H* تحت تأثیر الیستور می توان تولید سزامین و دیگر لیگنان ها را افزایش داد.

براساس نتایج حاصل از این تحقیق بنظر می رسد که وجود پیش ماده فنیل آلانین در غلظت بکار رفته برای کشت سوسپانسیون سلولی کنگد سمی نبوده است و براحتی در اختیار سلول ها قرار گرفته و سبب القای بیان دو ژن کلیدی در مسیر تولید سزامین شده است. از اینرو احتمالاً می توان از این ماده برای افزایش سزامین استفاده کرد که برای اثبات این موضوع باید مقدار سزامین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی تیمار شده و نمونه شاهد اندازه گیری شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه های کشت بافت و بیولوژی مولکولی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) و گروه بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می شود.

منابع

Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* 41: 281-284.

Hata N, Hayashi Y, Okazawa A, Ono E, Satake H, Kobayashi A. 2012. Effect of photoperiod on growth of the plants, and sesamin content and CYP81Q1 gene expression in the leaves of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Environmental and experimental botany* 75: 212-219.

- Hata N, Hayashi Y, Okazawa A, Ono E., Satake H, Kobayashi A. 2010.** 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* 178: 510-516.
- Heidarifar M, Dehghan Nayeri F. 2015.** Establishment of callus and suspension culture in *Sesamum indicum* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(4): 255-258.
- Hirose NIT, Nishihara K, Sugano M, Akimoto K, Shimizu S, Yamada H. 1991.** Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. *Journal of Lipid Research* 32: 629-638.
- Jeong GT, Park DH. 2006.** Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system: effect of abiotic elicitors. *Applied biochemistry and biotechnology* 29(132): 436-46.
- Kang MH, Kawai Y, Naito M, Osawa T. 1999.** Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. *The Journal of Nutrition* 129: 1885-1890.
- Moazzami AA, Andersson RE, Kamal Eldin A. 2006.** HPLC analysis of sesaminol glucosides in sesame seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 633-638.
- Ono E, Nakai M, Fukui Y, Tomimori N., Fukuchi Mizutani M, Saito M, Satake H, Tanaka T, Katsuta M, Umezawa T. 2006.** Formation of two methylenedioxy bridges by a *Sesamum CYP81Q* protein yielding a furofuran lignan, (+)-sesamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10116-10121.
- Qusti S, Abo Khatwa A, Lahwa M. 2010.** Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holy Quran. *Journal of Biological Sciences* 2: 40-51.
- Ralph J, Akiyama T, Kim H, LU F, Schatz PF, Marita JM, Ralph SA, Reddy MS, Chen F, Dixon RA. 2006.** Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure. *Journal of Biological Chemistry* 281: 8843-8853.
- Rivas San Vicente M, Plasencia J. 2011.** Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 62(10): 3321-3338.
- Satake H, Koyama T, Bahabadi SE, Matsumoto E, Ono E, Murata J. 2015.** Essences in metabolic engineering of lignan biosynthesis. *Metabolites*. 5(2): 270-290.
- Wahid OARA. 2007.** El-Bramawy, Resistance of some sesame (*Sesamum indicum* L.) collections against root rot disease (*Rhizoctonia solani* Kühn) under field conditions. *Journal of Plant Protection Research* 47: 321-327.
- Zhang B, Hettiarachchy N, Chen P, Horax R, Cornelious B, Zhu D. 2006.** Influence of the application of three different elicitors on soybean plants on the concentrations of several isoflavones in soybean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (15): 5548-5554.