

Sulforaphane Content and Genes Expression Level of *CYP79F1* and Myrosinase in Treated *Lepidium Draba* Seedlings with Different Concentrations of Zinc Oxide

Ali Riahi-Madvar

*Associate Professor, Biotechnology Department, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. Tel: +983433776610, Email: riahi.ali@gmail.com

Mahshid Ghazizadeh Ahsaei

Former M.Sc. Student, Biotechnology Department, Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. Email: mah.ghz@gmail.com

Fereshteh Jadid Bonyad

Former M.Sc. Student, Biotechnology Department, Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. Email: fereshtehjadidbonyad@gmail.com

Fatemeh Rezaee

Former Ph.D. Student, Biology Department, Faculty of science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Email: acer.rezaee@yahoo.com

Abstract

Objective

Sulforaphane with several pharmaceutical effects is an isothiocyanate which derived of glucosinolate glucoraphanin under myrosinase hydrolysis activity. This glucosinolate is found in huge scale in *Lepidium draba* plant from the brassicaceae family.

Materials and Methods: In this research, sulforaphane production and the gene expression level of *CYP79F1* (one of the critical enzyme in glucoraphanin biosynthesis pathway) and myrosinase were investigated in *Lepidium draba* seedlings under treatment with different concentrations of ZnO (0, as a control, 25, 100, 500 and 1000 mg/L).

Results

The results showed that sulforaphane content in treated seedling significantly increased in comparison with the control in the presence doses more than 100 mg/L ZnO. Based on the results, gene expression level of *CYP79F1* decreased by the increase of ZnO concentration in media, and the increment was significant at the 5% level in the presence of the highest dose in compared to the control. In contrast, the myrosinase gene expression level evaluated by increasing ZnO concentrations in media and the increment was significantly at the doses more than 500 mg/L ZnO concentration.

Conclusions

According to the results, it seems that evaluating of the sulforaphane production level in the treated seedlings is more attributed to the increased gene expression level of myrosinase which resulted in the enhanced enzyme production.

Keywords: Gene Expression, Myrosinase, Sulforaphane, ZnO.

Citation: Riahi-Madvar A, Ghazizadeh Ahsaei M, Jadid Bonyad F, Rezaee F (2019) Sulforaphane Content and Genes Expression Level of *CYP79F1* and Myrosinase in Treated *Lepidium Draba* Seedlings with Different Concentrations of Zinc Oxide. *Agricultural Biotechnology Journal* 11(3), 37-56.

Agricultural Biotechnology Journal 11(3), 37-56.

DOI: 10.22103/jab.2019.13915.1128

Received: May 31, 2019; Accepted: September 14, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

محتوای سولفورافان و بیان ژن های *CYP79F1* و میروزیناز در گیاهچه های تیمار شده

ازمک با غلظت های مختلف اکسید روی

علی ریاحی مدوار

* نویسنده مسول، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. تلفن: ۰۳۴۳۳۳۷۶۶۱۰، ایمیل: riahi.ali@gmail.com

مهشید قاضی زاده احساسایی

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. ایمیل: mah.ghz@gmail.com

فرشته جدید بنیاد

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. ایمیل: fereshtehjadibonyad@gmail.com

فاطمه رضائی

دانش آموخته دکتری، گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران. ایمیل: acer.rezaee@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۳

چکیده

هدف: سولفورافان یک ایزوتیوسیانات مشتق شده از گلوکوزینولات گلکورافانین تحت هیدرولیز آنزیمی میروزیناز می باشد که اثرات درمانی متعددی دارد. این گلوکوزینولات به فراونی در گیاه ازمک از خانواده براسیکاسه یافت می شود.

مواد و روش ها: در این تحقیق، تولید سولفورافان، بیان ژن *CYP79F1* (یکی از آنزیم های کلیدی در بیوسنتز گلکورافانین) و بیان ژن میروزیناز در گیاهچه های ازمک تیمار شده با غلظت های مختلف (صفر (به عنوان شاهد)، ۲۵، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/L) اکسید روی بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که محتوای سولفورافان گیاهچه های تیمار شده بصورت معنی داری نسبت به شاهد افزایش (در غلظت های بالاتر از ۱۰۰ mg/L) یافته است. بر اساس نتایج حاصله، بیان ژن *CYP79F1* با افزایش غلظت اکسید روی در محیط به

صورت خطی کاهش نشان داد و این کاهش در حضور بالاترین غلظت، در سطح ۵ درصد نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار می‌باشد. در مقابل، بیان ژن آنزیم میروزیناز با افزایش غلظت اکسید روی در محیط به صورت گرادیان افزایش نشان داد و این افزایش در حضور غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ mg/L نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، چنین بنظر می‌رسد که افزایش تولید سولفورافان در گیاهچه‌های تحت تیمار، بیشتر به دلیل افزایش بیان و در نتیجه تولید بیشتر آنزیم میروزیناز بوده است.

کلمات کلیدی: اکسید روی، بیان ژن، میروزیناز، سولفورافان.

مقدمه

گیاه از مک (*Lepidium draba*) یک علف هرز چندساله با سیستم ریشه عمیق و متعلق به خانواده براسیکاسه است که توسط بذر و قطعات ریشه تکثیر می‌شود. این گیاه بومی جنوب غرب آسیا از جمله ایران و همچنین جنوب شرق اروپا است و خاک‌هایی با بافت سنگین و حاصلخیز را ترجیح می‌دهد (Jacobs 2007). این گیاه منبعی غنی از گلوکوزینولات گلوکورافانین است (Powell et al. 2005). گلوکوزینولات‌ها ترکیبات گوگرد و نیتروژن داری هستند که متعلق به راسته *capparales* است و در بافت‌های زایشی و رویشی خانواده براسیکا و ۱۵ خانواده دولپه از جمله *Brassicaceae* و *Capparidaceae* و در خانواده‌های دیگری همچون *Euphorbiaceae* وجود دارند (Yan & Chen 2007). تعداد بیش از ۱۲۰ نوع گلوکوزینولات مختلف تاکنون گزارش شده است (Fahey et al. 2001) که از اسیدهای آمینه مختلف مشتق می‌شوند و گزارش شده است که وجود این ترکیبات در گیاهان موجب افزایش مقاومت آن‌ها در برابر تنش‌های می‌شود (Brader et al. 2006; Hopkins et al. 2009; Hirayama and Shinozaki, 2010).

این متابولیت‌ها در واکنش سلول‌های تولید کننده ذخیره می‌شوند و آسیب بافت گیاهی در نتیجه زخم، حشرات و یا حمله پاتوژن‌ها، آنها را در معرض یک تیوگلوکوزیداز بنام میروزیناز (EC 3.2.3.1) قرار می‌دهد. هیدرولیز این متابولیت‌ها به وسیله این آنزیم، گلوکز، سولفات و یک ترکیب حدواسط ناپایدار بنام آگلیکون می‌شود. آگلیکون به صورت خودبخودی و بر حسب شرایط محیطی محصولات مختلفی از قبیل ایزوتیوسیانات، نیتریل، اپی‌تیونیتریل و تیوسیانات تولید می‌نماید (Andreasson et al. 2000; Rask et al. 2000).

۴-متیل سولفینیل بوتیل گلوکوزینولات (گلوکورافانین) از گروه گلوکوزینولات‌های آلیفاتیک است که از اسید آمینه متیونین مشتق می‌شود. در مسیر بیوسنتز گلوکوزینولات‌های کوتاه زنجیره آلیفاتیک مثل گلوکورافانین که تنها از دو متیونین مشتق می‌شود آنزیم *CYP79F1* از خانواده سیتوکروم P450 نقش کلیدی دارد (Mikkelsen et al. 2002). این گلوکوزینولات پس از هیدرولیز توسط آنزیم میروزیناز تولید ایزوتیوسیاناتی بنام سولفورافان (۱-ایزوتیوسیانات-۴-متیل سولفونیل

بوتان) می‌کند (Traka and Mithen, 2009). سولفورافان ویژگی‌های درمانی متفاوتی از قبیل خواص ضد باکتری‌ها (Fahey et al. 2002) و آنتی‌اکسیدانی (Gao et al. 2001; Yeh and Yen, 2009) از خود نشان می‌دهد. این ایزوتیوسیانات به دلیل توانایی تنظیم همزمان اهداف سلولی چندگانه درگیر در پیشرفت سرطان از جمله توقف چرخه سلولی و آپوپتوز توجه محققین را جلب کرده است (Han & Row 2011). سولفورافان به دلیل خواص پیشگیری و درمانی بر روی سرطان‌های مختلف امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Radonic et al. 2011; Liang & Yuan, 2012). مطالعات انجام شده نشان داده است که گیاه از مک به دلیل داشتن دو گلوکوزینولات عمده، منبع مناسبی جهت استخراج گلوکورافانین (پیش‌ساز سولفورافان) می‌باشد (Powell et al. 2005). مطالعات اخیر نشان داده است که بیشترین محتوای این ایزوتیوسیانات در گیاهچه‌های ۳ تا ۷ روزه از مک مشاهده می‌شود (Mohammadi et al., 2104).

بطور کلی استفاده از ایسیتورها یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. تحقیقات زیادی بر روی مکانیسم عمل ایسیتورها صورت گرفته است و ثابت شده ایسیتورها سیگنالی تولید می‌کنند که به وسیله گیرنده‌های موجود در سطح غشاء پلاسمایی دریافت شده و یک سیگنال هدایت شبکه ایجاد می‌کنند که بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی و به علاوه آنزیم‌های کلیدی که بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه هدف را کاتالیز می‌کنند، تنظیم می‌کنند (Radman et al. 2003; Namdeo 2007). تاکنون تاثیر ایسیتورهای مختلف از قبیل متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید، یون مس و روی (Mohammadi et al. 2014) و گلوکز (Rezaee et al. 2018) بر تولید سولفورافان در گیاه از مک مورد آنالیز قرار گرفته است. علاوه بر این، مطالعات انجام شده نشان داده است که این گیاه توانایی تجمع، فلزات سنگین از قبیل مس و روی را از محیط دارد (Chehregani et al. 2007). مطالعات انجام شده توسط محمدی و همکاران بر روی گیاه از مک نشان داد که محتوای سولفورافان این گیاه در حضور یون روی و مس بطور مثبت تحت تاثیر قرار گرفته است (Mohammadi et al. 2014). همچنین نشان داده شده است که آهن (Aminizadeh et al. 2014) و حتی نانوذرات اکسید مس و اکسید آهن (Aminizadeh et al. 2016) بر محتوای سولفورافان در این گیاه تاثیر مثبت دارند. در مجموع این مطالعات پیشنهاد داند که افزایش محتوای سولفورافان تحت شرایط تیمار می‌تواند به دلیل جذب یون مربوطه، تنش اکسیداتیو حاصل از تولید ROSها و فعال شدن مسیر سیگنالینگ باشد.

با توجه به اینکه اکسید روی و همچنین نانوذرات آن در صنایع مختلف از قبیل آرایشی و بهداشتی و دارویی، لاستیک سازی، کاشی و سرامیک، رنگ سازی و غیره کاربردهای فراوانی داشته (Ji and Ye, 2008) که این مساله در نهایت منجر به رها شدن آن‌ها در محیط زیست می‌شوند و با نظر به اینکه گیاه از مک تجمع کننده فلزات سنگین از قبیل روی می‌باشد (Chehregani et al. 2007) و اثرات مثبت یون روی بر تولید سولفورافان در گیاه از مک نشان داده شد (Mohammadi et al. 2014)، در این مطالعه، تاثیر غلظت‌های مختلف اکسید روی بر تولید سولفورافان مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این تاثیر آن بر بیان ژن‌های دخیل در تولید این ایزوتیوسیانات شامل *CYP79F1* و میروزیناز در گیاهچه‌های هفت روزه از مک مورد آنالیز قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق بذرهای گیاهان رشد یافته در اطراف کرمان در اواخر بهار جمع‌آوری گردیدند. در ابتدا بذرها ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم (۲/۵ درصد) و پس از چهار مرتبه آبکشی با آب مقطر استریل بمدت ۴۵ ثانیه در معرض الکل (۷۰ درصد) قرار داده شدند. بذرها پس از آبکشی در پتری دیش‌های نه سانتی‌متری در محیط کشت MS (Murashige & Skoog 1962) با pH برابر ۷ که با استفاده از آگار (۸/۰ درصد) جامد شده بودند و با غلظت‌های مختلف اکسید روی تیمار شده بودند قرار گرفتند. غلظت‌های مختلف اکسید روی شامل غلظت صفر (به عنوان شاهد)، ۲۵، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. پتری دیش‌ها ابتدا در انکوباتور در تاریکی مطلق در دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد و با رطوبت نسبی 55 ± 5 درصد قرار گرفتند. در ادامه پس از گذشت دو روز پتری دیش‌ها به ژرمیناتور با دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی و با رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. گیاهچه جمع‌آوری شده پس از گذشت پنج روز بعد از شسته شو (با آب مقطر استریل)، اندام‌های هوایی آنها جدا و با قرار گرفتن در داخل فویل آلومینیوم استریل، جهت انجماد سریع در داخل ازت مایع قرار گرفتند و تا زمان استفاده به فریزر -80 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

عصاره‌گیری و تعیین غلظت سولفورافان در گیاهچه‌های تیمار شده طبق روش Liang و همکاران (۲۰۰۶) با کمی تغییرات انجام شد (Liang et al. 2006). بمنظور عصاره‌گیری، مقدار ۰/۵ گرم از اندام هوایی درون هاون سرد کاملاً ساییده شد. در ادامه مقدار یک میلی‌لیتر آب با pH برابر ۵ به آن اضافه گردید و به مدت دو ساعت در دمای 42 ± 2 °C انکوبه شد. سپس ۵ ml استونیتریل به آن اضافه و بمدت ۴ دقیقه در مجاورت یخ سونیکیت گردید. مخلوط حاصله در دمای 4 °C بمدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس محلول رویی از فیلتر $0.2 \mu\text{m}$ عبور داده شد و در دمای آزمایشگاه به ستون (C18) متصل به دستگاه HPLC (1100 Series شرکت Agilent) تزریق گردید. برای تفکیک سولفورافان از یک حلال دو فازی شامل آب ۳۵ درصد و استونیتریل ۶۵ درصد استفاده شد. جهت شناسایی سولفورافان از استاندارد آن (Sigma-Aldrich) و اندازه‌گیری جذب آن در طول موج ۲۵۴ نانومتر ستون استفاده شد.

بمنظور بررسی بیان نیمه کمی ژن‌ها مذکور، پس از استخراج RNA کل از گیاهچه‌ها، کتابخانه cDNA سنتز و پس از تکثیر، میزان بیان آنها پس از نرمال کردن با بیان ژن کنترل داخلی مورد آنالیز قرار گرفتند (Nasiri-Bezenjani et al. 2013; Rezaee et al. 2014).

بمنظور استخراج RNA کل از گیاهچه‌ها، ابتدا مقدار یک گرم از اندام هوایی گیاهچه‌ها در حضور نیتروژن مایع به طور کامل ساییده شد تا پودر سفید رنگی بدست آید. پودر بدست آمده به میکروتیوب فاقد RNase (۱/۵ میلی‌لیتری) منتقل شد. پس از اضافه نمودن یک میلی‌لیتر از محلول RNX-plus به پودر، میکروتیوب ورتکس شد و به مدت ۶۰ دقیقه بر روی یخ نگهداری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به سوسپانسیون حاصله اضافه و میکروتیوب بشدت تکان داده شد. در ادامه عمل سانتریفیوژ به

مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول به آن اضافه گردید و سپس به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. بار دیگر، سانتریفیوژ با شرایط مذکور انجام شد و پس از حذف محلول رویی، به رسوب بدست آمده اتانول ۷۰ درصد (یک میلی‌لیتر) اضافه گردید و میکروتیوب‌ها با دور ۷۵۰۰ بر دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه، محلول رویی خارج شد بمنظور تبخیر باقی‌مانده الکل از رسوب، درب میکروتیوب باز نگاه‌داشته شد. در انتها به رسوب بدست آمده، مقدار ۳۰ میکرولیتر آب (DEPC^۱) (۰/۱ درصد) اضافه شد (مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده کیت استخراج RNA، RNX-Plus سیناژن) و در انتها، نمونه‌ها تا زمان استفاده به فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

جهت تعیین کیفیت (نسبت میزان RNA به پروتئین) و کمیت (میزان غلظت) RNA استخراج شده از دو روش اندازه‌گیری الکتروفورز RNA بر روی ژل آگارز یک درصد و اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۶۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری انجام شد.

از کیت DNase I (Fermentas) بمنظور حذف DNA ژنومی از RNA تخلیص شده، استفاده شد. به این منظور در یک میکروتیوب مقدار ۴ میکروگرم RNA استخراج شده، یک میکرولیتر از آنزیم DNase و یک میکرولیتر از بافر آن اضافه گردید و با استفاده از آب DEPC زده حجم نهایی به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. به منظور غیرفعال نمودن آنزیم DNase، یک میکرولیتر از EDTA ۲۵ میلی‌مولار به میکروتیوب اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. جهت ادامه آزمایش‌ها، نمونه‌ها به فریزر -۲۰ منتقل شدند.

بمنظور سنتز کتابخانه cDNA، مقدار یک میکروگرم از RNA کل به یک میکرولیتر پرایمر الیگو dT و ۰/۵ میکرولیتر از مهار کننده RNase^۲ (۴۰ U/μL) اضافه شد. سپس میکروتیوب‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. در ادامه میکروتیوب‌ها به روی یخ منتقل و مقدار ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰ X) RT^۳، ۰/۸ میکرولیتر dNTPها، ۱ میکرولیتر از آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) (۲۰۰ U/μL; MMuLV) و ۰/۵ میکرولیتر مهار کننده RNase و در نهایت آب دیونیزه استریل (فاقد RNase) تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به تیوب‌ها اضافه شد. پس از مخلوط نمودن محتویات میکروتیوب‌ها، به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در ادامه واکنش، به منظور حذف اثر RT، میکروتیوب‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند.

توالی پرایمرهای مربوط به ژن میروزیناز بر اساس توالی ثبت‌شده در وب سایت GenBank از NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) از گیاه *Armoracia rusticana* با شماره دسترسی AY822710.1

¹Diethylpyrocarbonate

²RNase Inhibitor

³Reverse Transcriptase

و توالی پرایمرهای مربوط به ژن *CYP79F1* بر اساس توالی ثبت شده در وب سایت GenBank از گیاه ازمک با شماره دسترسی KT626603 و همچنین توالی آغازگرهای مربوط به ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی از روی توالی ژن آن در گیاه *Armoracia rusticana* (جدول ۱) با استفاده از نرم افزار Gene Runner طراحی و توسط شرکت MWG ساخته شدند. واکنش تکثیر این ژن‌های با استفاده از آنزیم Taq پلیمرز و در حضور پرایمرهای اختصاصی مطابق جدول ۲ در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf و بر اساس پروتکل حرارتی نشان داده شده در جدول ۳ انجام شد. در ادامه، الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش تکثیر بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد و سپس ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و در زیر نور UV در دستگاه Gel documentation مشاهده شدند.

بمنظور بررسی نیمه کمی بیان ژن‌های مذکور در غلظت‌های مختلف اکسید روی از مقایسه شدت باند تکثیر شده (حاصل از بارگذاری پنج میکرولیتر) از محصول PCR مربوط به هر نمونه بر روی ژل آگارز یک درصد، نسبت به بیان ژن GAPDH، از نرم افزار TotalLap TL120 استفاده گردید.

جدول ۱. توالی آغازگرها مربوط به کنترل داخلی (GAPDH)، *CYP79F1* و میروزیناز

Table 1. Primers sequences related to the internal control (GAPDH), *CYP79F1* and Myrosinase

G	Tm (C°)	توالی آغازگرها Primers sequence	نام آغازگر Primer name
C			
(%)			
45.	60.3	5'- AAGAAAGCTGGTATGATCCCTC - 3'	F-GAPDH
4			
50	58.4	5'-TACCTTAACCGCAGTGCATC-3'	R-GAPDH
45.	63.5	5'- CACTCTATGTATAAACGGTCCGAG -3'	F- <i>CYP79F1</i>
83			
45	56.4	5'- TTCCGCCTTTCCTAATCTTC -3'	R- <i>CYP79F1</i>
57.	66.3	5'- AGA TGC ACC CGG TCG ATG TTC - 3'	F- Myrosinase
14			
45.	60.3	5'- ACC ATT TGC CAG ATG CTT TGA G - 3'	R- Myrosinase
45			

جدول ۲. نوع و مقدار مواد مورد استفاده در واکنش PCR

Table 2. Kind and amount of used materials in PCR reaction

محلول پایه	غلظت محلول پایه	حجم محلول پایه در ۲۵ میکرولیتر
Solution stock	Concentration of solution stock	Volume of solution stock in 25 μ L
PCR Buffer	10 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5
dNTP _{mix}	10 mM	0.6
Forward Primer	10 pmol/ μ l	0.6
Reverse Primer	10 pmol/ μ l	0.6
Template	40 ng/ μ l	2
DNATaq	1 Unit/ μ l	0.5
Polymerase		
Water (ddw)	-	16.7

جدول ۳. پروفایل حرارتی واکنش PCR

Table 3. Thermal profile of PCR reaction

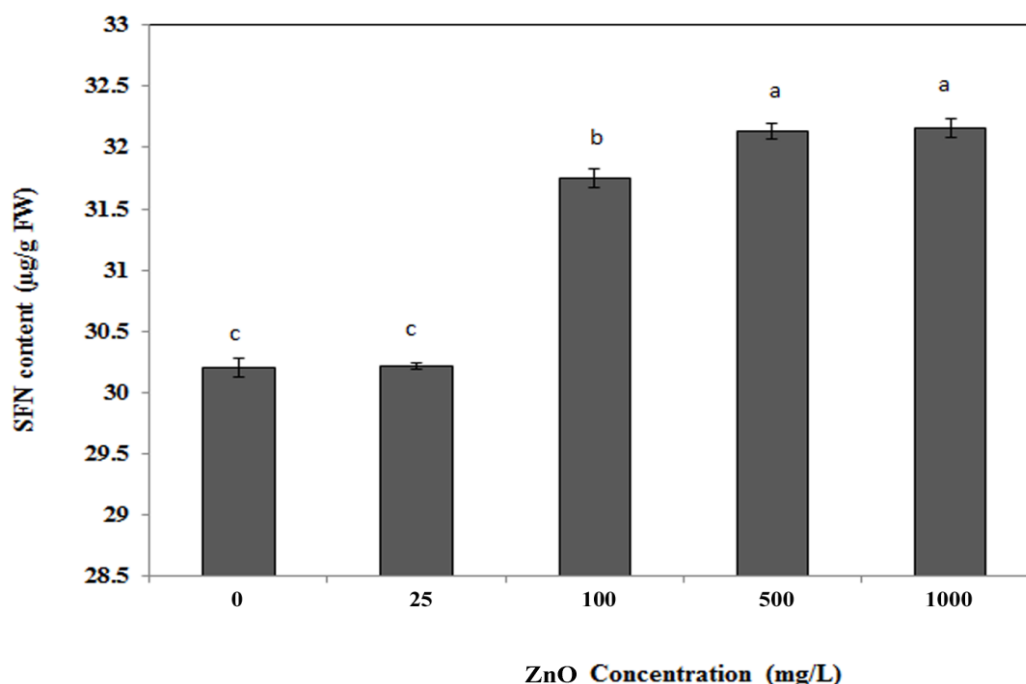
سیکل	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	مراحل PCR
Cycle	Time (Minute)	Temperature ($^{\circ}$ C)	PCR protocol
1	5	95	واسرشت سازی اولیه Initial denaturation
30	1	95	واسرشت سازی هر چرخه Denaturation of cycle
	0.5	55	اتصال آغازگر Annealing
	1	72	بسط Extension
1	10	72	بسط نهایی Final extension

تمام آزمایشات با سه تکرار مستقل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS و توسط آزمون دانکن با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد تجزیه واریانس واریانس یک عاملی قرار گرفتند.

نتایج

تعیین محتوای سولفورافان

جهت تعیین غلظت سولفورافان در گیاهچه‌های تیمار شده و تعیین زمان نگهداری نمونه در ستون، از استاندارد سولفورافان استفاده شد. همانطور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، محتوای این ایزوتیوسیانات در گیاهچه‌های تیمار شده نسبت به شاهد بطور معنی‌داری افزایش نشان یافته است (بجز غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر که مشابه نمونه شاهد می‌باشد).



شکل ۱. محتوای سولفورافان در گیاهچه‌های ازمک تیمار شده با غلظت‌های مختلف اکسید روی. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد می‌باشند.

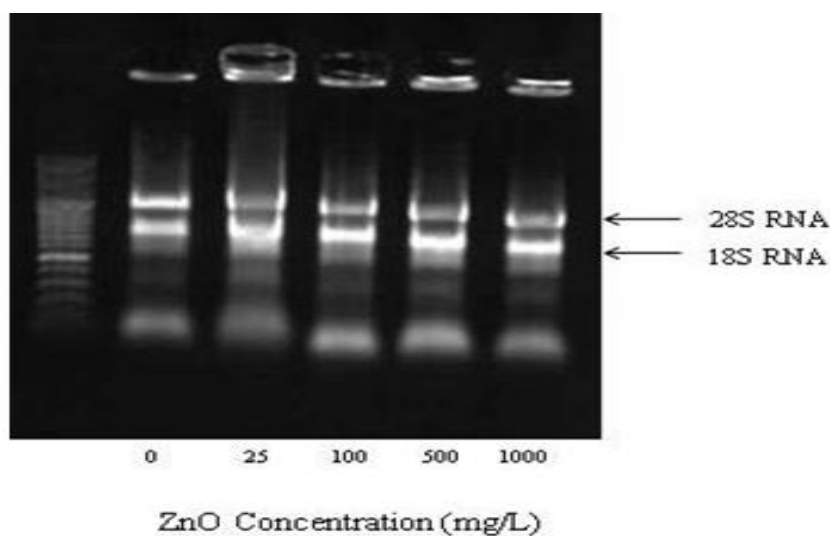
Figure 1. Sulfur content in treated *Lepidium draba* seedlings with different concentrations of ZnO. Signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

آنالیز بیان ژن‌های *CYP79F1* و *میروزیناز*

استخراج RNA کل و سنتز cDNA

کیفیت مناسب RNA استخراج شده را می‌توان از مشاهده باندهای ۲۸S و ۱۸S مربوط به RNA ریبوزومی بر روی ژل آگارز یک درصد مشاهده نمود (شکل ۲). به منظور بررسی بیان این ژن‌ها، با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) و

پرایمرهای Oligo dT از روی RNA استخراج شده، کتابخانه cDNA سنتز شد.



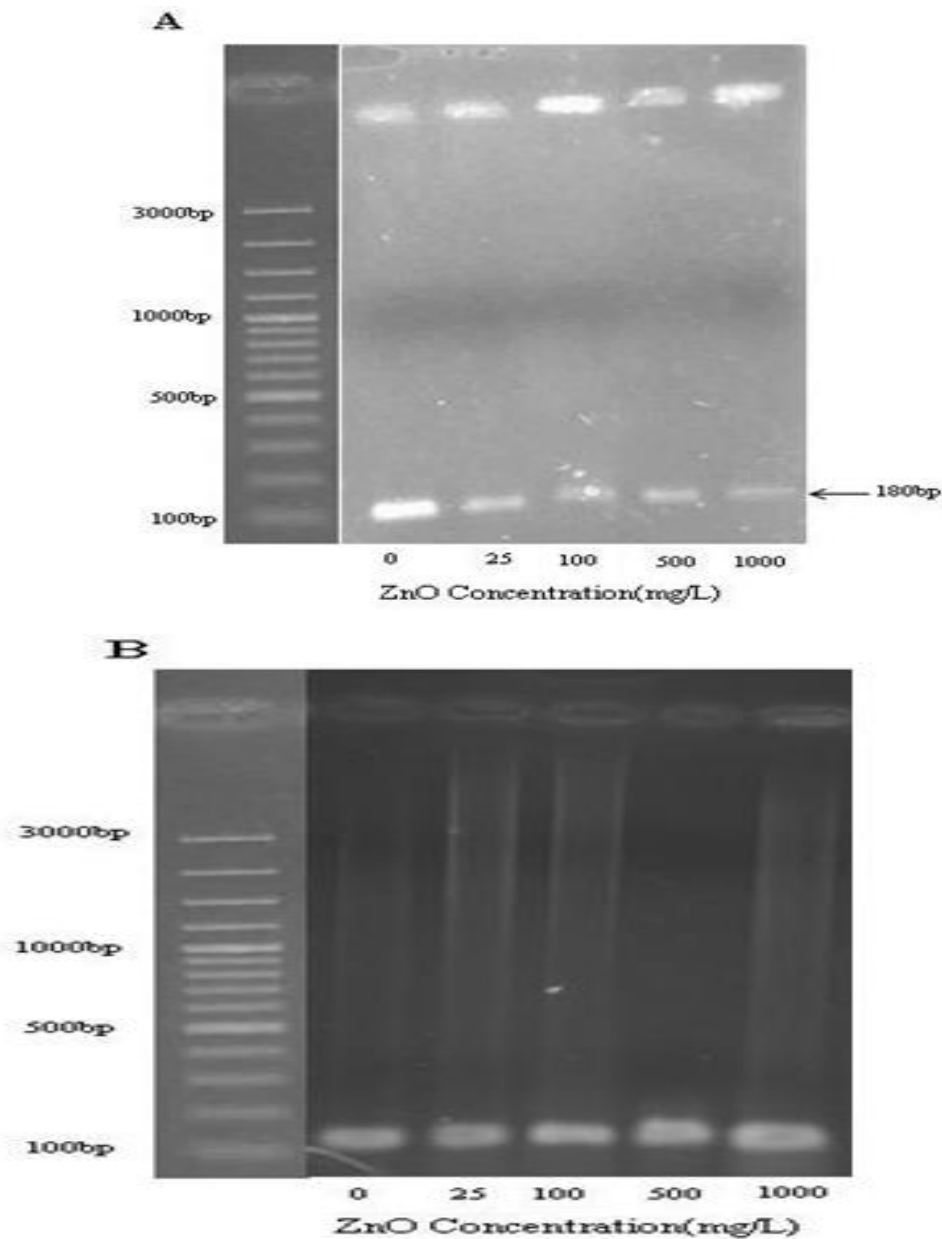
شکل ۲. نمونه‌ای از ژل آگارز یک درصد مربوط به RNAهای استخراج شده از گیاهچه‌های از مک در تیمار شده با غلظت‌های مختلف اکسید روی.

Figure 2. Sample of 1% agarose gel related to the RNA extracted of *Lepidium draba* seedlings with different concentrations of ZnO.

بیان ژن *CYP79F1*

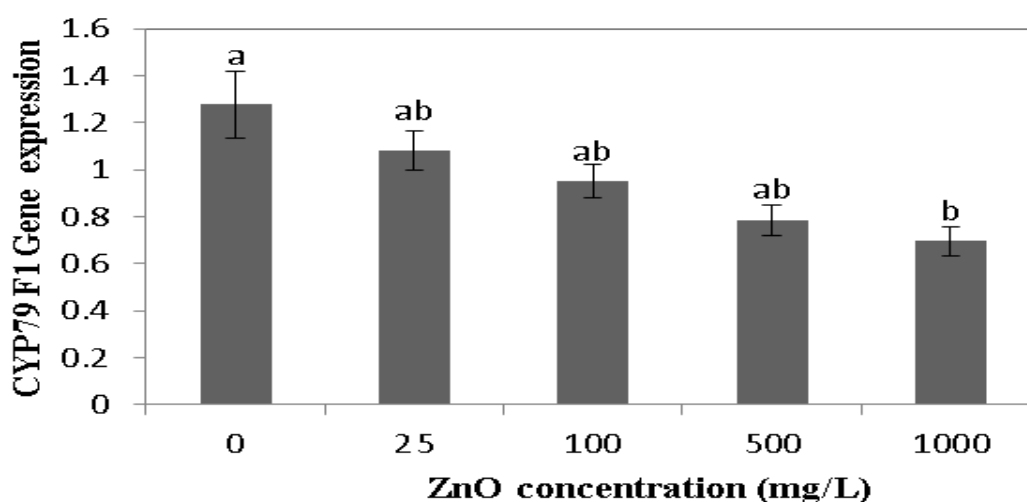
تکثیر ژن‌های *GAPDH* و *CYP79F1* در حضور پرایمرهای اختصاصی و با استفاده از کتابخانه cDNA و آنزیم Taq پلیمرز انجام شد. همانطور که در شکل ۳ قابل مشاهده است طول قطعه تکثیر شده مربوط به ژن *CYP79F1* ، ۱۸۰ bp ، به دست آمد.

نتایج مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف اکسید روی بر بیان ژن *CYP79F1* در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، میزان بیان این ژن نسبت به نمونه شاهد بطور گرادیان کاهش می‌یابد و تنها در حضور بالاترین غلظت اکسید روی ، میزان کاهش بیان نسبت به نمونه شاهد در سطح پنج درصد معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۳. نمونه‌ای از ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن *CYP79F1* (A) و تکثیر ژن *GAPDH* (B) در حضور غلظت‌های مختلف اکسید روی.

Figure 3. Sample of agarose gel related to the amplified *CYP79F1* gene (A) and amplified *GAPDH* (B) gene in the presence of different concentrations of ZnO.

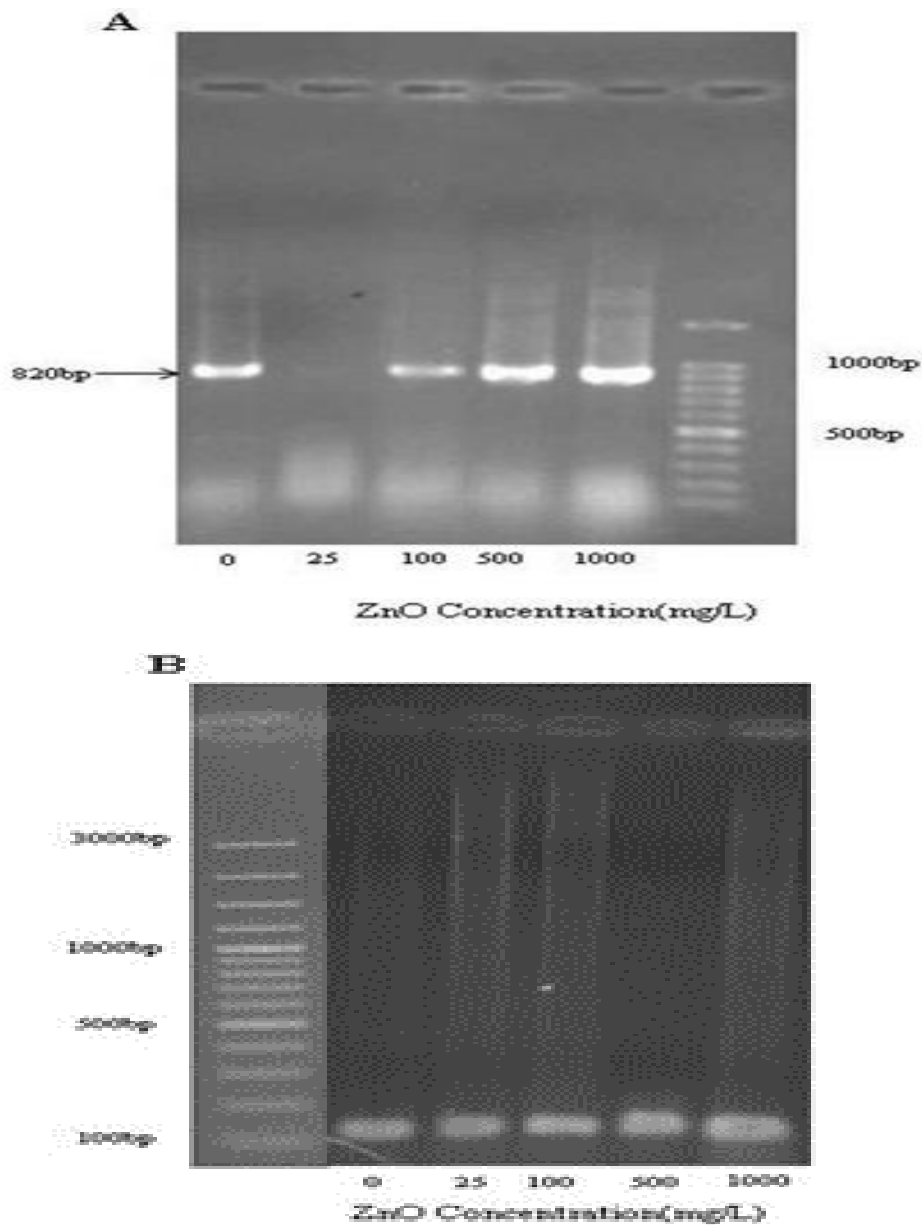


شکل ۴. مقایسه بیان ژن CYP79F1 در گیاهچه‌های تیمار شده از مک با غلظت‌های مختلف اکسید روی. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح پنج درصد است.

Figure 4. Comparison of CYP79F1 gene expression in treated *Lepidium draba* seedlings with different concentrations of ZnO. Signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

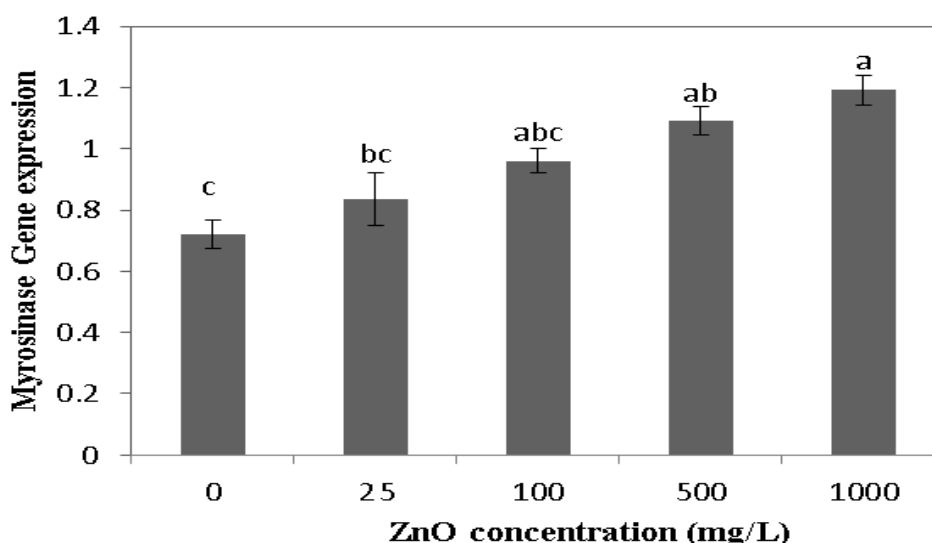
بیان ژن میروزیناز

طول قطعه تکثیر شده مربوط به ژن میروزیناز در ژل یک درصد، ۸۲۰ bp به دست آمد (شکل ۵). تأثیر غلظت‌های مختلف اکسید روی بر میزان بیان این ژن در شکل ۶ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود در تیمار گیاهچه‌ها با غلظت‌های مختلف اکسید روی بیان این ژن افزایش یافته است که در غلظت‌های بیش از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار است. بیشترین میزان بیان ژن میروزیناز مربوط به غلظت ۱۰۰۰ mg/L می‌باشد.



شکل ۵. نمونه‌ای از ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن میروزیناز (A) و تکثیر ژن GAPDH (B) در حضور غلظت‌های مختلف اکسید روی.

Figure 5. Sample of agarose gel related to the amplified myrosinase gene (A) and amplified GAPDH (B) gene in the presence of different concentrations of ZnO.



شکل ۶. مقایسه بیان ژن میروزیناز گیاهچه‌های تیمار شده از مک با غلظت‌های مختلف اکسید روی. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح پنج درصد است.

Figure 6. Comparison of myrosinase gene expression in treated *Lepidium draba* seedlings with different concentrations of ZnO. Signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

بحث

همانطور که در نتایج نشان داده شد، محتوای سولفورافان در تیمار با اکسید روی افزایش یافته است. این مشاهدات با نتایج مطالعات انجام شده توسط محمدی و همکاران بر روی این گیاه مطابقت دارد. آنها نشان دادند که محتوای سولفورافان این گیاه در حضور یون روی افزایش می‌یابد (Mohammadi et al. 2014). در این مطالعه، به منظور بررسی تاثیر اکسید روی بر تولید سولفورافان، بیان ژن *CYP79F1* که یکی از آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز گلوکوزینولات‌های آلیفاتیک می‌باشد (Chen et al. 2003) و بیان ژن میروزیناز که آنزیم اختصاصی هیدرولیز گلوکوزینولات‌ها و تولید ایزوتیوسیانات‌ها می‌باشد (Rask et al. 2000) در گیاهچه‌های تیمار شده مورد آنالیز قرار گرفتند. همانطور که در نتایج نشان داده شده است، بیان ژن *CYP79F1* در تیمار با اکسید روی تا غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد ندارد و تنها در بالاترین غلظت مورد استفاده (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) کاهش معنی‌دار آن مشاهده گردید (شکل ۴). مطالعات انجام شده توسط Li و همکاران نشان داد که در گیاه *broccoli florets* ارتباط معنی‌داری بین تولید سولفورافان و بیان ژن *CYP79F1* وجود ندارد. آنها نشان دادند در حالیکه بیان ژن *CYP79F1* در جوانه‌های رسیده بیش از ۹۰ درصد کاهش می‌یابد، میزان کاهش محتوای سولفورافان کمتر از ۵۰ درصد بود (Li et al. 20019). در هر صورت، این نتایج با یافته‌های Rezaee و همکاران در سال ۲۰۱۸ همخوانی ندارد.

آنها گزارش کردند که افزایش تولید سولفورافان در این گیاه تحت تیمار با گلوکز با بیان این ژن هماهنگ است (Rezaee et al. 2018). همچنین مطالعات Mikkelsen و همکاران بر روی اثر اکسین در غلظت‌های مختلف در گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که رابطه مستقیمی بین تولید گلوکوزینولات‌های آلیفاتیک کوتاه زنجیره با بیان ژن *CYP79F1* وجود دارد (Mikkelsen et al. 2003). این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل، تفاوت در نوع الیسیاتور، نوع گیاه مورد مطالعه و زمان اعمال تیمار باشد. در مقابل، بیان ژن *CYP79F1* در تیمار با اکسید روی افزایش نشان داد. این مشاهده با نتایج گزارش شده توسط Rezaee و همکاران که نشان دادند افزایش تولید سولفورافان در گیاه از مک تحت تیمار با گلوکز با بیان ژن *CYP79F1* همخوانی دارد (Rezaee et al. 2018). علاوه بر این، محمدی و همکاران نیز نشان دادند که فعالیت آنزیم *CYP79F1* در این گیاه در حضور یون روی (غلظت ۸ میکرومولار) افزایش می‌یابد (Mohammadi et al. 2016). ثابت شده است که گلوکوزینولات‌ها (از جمله گلوکورافانین) پس از سنتز در واکوئل تجمع می‌کنند (Rask et al. 2000)، لذا بنظر می‌رسد افزایش محتوای سولفورافان در مقابل کاهش بیان ژن *CYP79F1* به این دلیل است که تجمع گلوکورافانین در طی چند روز صورت گرفته و افزایش بیان آنزیم *CYP79F1* در مدت تیمار نمی‌باشد. از طرف دیگر، ثابت شده است که آنزیم *CYP79F1* استخراج شده از گیاه *Sinapis alba* حاوی یون روی می‌باشد (Burmeister et al. 1997) بنابراین احتمال دارد که این یون یا دیگر یون‌های فلزی در ساختار *CYP79F1* سایر اعضای خانواده براسیکاسه نیز وجود داشته و نقش مهمی را در تجزیه گلوکوزینولات‌ها ایفا می‌کند. Liang و همکاران گزارش کردند که یون روی در گیاه بروکلی باعث افزایش تولید سولفورافان می‌شود و همچنین بر فعالیت آنزیم *CYP79F1* اثر تحریکی دارد (Liang et al. 2006). از طرف دیگر، Prakash و همکاران تاثیر منفی یون روی را بر فعالیت آنزیم *CYP79F1* جداسازی شده از گیاه بروکلی مشاهده کردند. آنها مغایرت نتایج بدست آمده با نتایج Liang و همکاران را به تفاوت غلظت یون و همچنین زمان در معرض قرار گرفتن آنزیم نسبت دادند (Prakash et al. 2013). بر اساس نتایج حاصله در این پژوهش چنین بنظر می‌رسد که تولید آنزیم *CYP79F1* با افزایش بیان ژن *CYP79F1* در حضور اکسید روی تحت تاثیر قرار می‌گیرد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصله، چنین استنباط می‌شود که افزایش محتوای سولفورافان تحت این شرایط به دلیل افزایش میزان بیان ژن *CYP79F1* و در نتیجه تولید و فعالیت بیشتر این آنزیم مرتبط می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته با قرارداد شماره ۷/ص/۹۵/۳۴۳۴ انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

منابع

محمدی مهدی، ریاحی مدوار علی، پورسیدی شهرام، امینی‌زاده مریم (۱۳۹۵) بررسی اثر یون‌های مس و روی بر فعالیت آنزیم میروزیناز و تشکیل سولفارافان در گیاه *Lepidium draba*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۸ (۱)، ۸۱-۹۴.

References

- Aminizadeh M, Riahi-Madvar A, Mohammadi M (2014) Effects of iron and copper ions on sulforaphane content and peroxidase activity in *Lepidium draba* seedlings. EPP 1, 8–14.
- Aminizadeh M, Riahi-Madvar A, Mohammadi M (2016) Nano-Metal oxides induced sulforaphane production and peroxidase activity in seedlings of *Lepidium draba* (Brassicaceae), PBioSci 6, 75-83.
- Andreasson E, Wretblad S, Granér G et al. (2001) The myrosinase-glucosinolate system in the interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. Mol Plant Pathol 2, 281-286.
- Brader G, Mikkelsen MD, Halkier BA, Tapio PE (2006) Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. Plant J 46, 758–767.
- Burmeister WP, Cottaz S, Driguez H, et al. (1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl–enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. Structure 5, 663-676.
- Chehregani AB, Malayeri, E B (2007). Removal of heavy metals by native accumulator plants. Int J Agric Biol 9, 462-465.
- Chen S, Glawischnig E, Jørgensen K et al. (2003) CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. Plant J 33, 923–937.
- Daxenbichler ME, Spencer GF, Carlson DG et al. (1991) Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. Phytochemistry 30, 2623-2638.
- Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM et al. (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo [a] pyrene-induced stomach tumors. PNAS 99, 7610-7615.

- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5-51.
- Gao X, Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2001) Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. *PNAS* 98, 15221-15226.
- Han D, Row KH (2011) Separation and purification of sulforaphane from broccoli by solid phase extraction. *Int J Mol Sci* 12, 1854-1861.
- Hirayama T, Shinozaki K (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* 61, 1041-1052.
- Hopkins RJ, van Dam NM, Van Loon JJ (2009) Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annu Rev Entomol* 54, 57-83.
- Jacobs J (2007) Ecology and Management of Whitetop (*Cardaria Draba* (L.) Desv.), US Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- Ji S, Ye C (2008). Synthesis, growth mechanism, and applications of zinc oxide nanomaterials. *J Mater Sci Technol* 24, 457.
- Li Z, Liu Y, Li L, et al. (2019) Transcriptome reveals the gene expression patterns of sulforaphane metabolism in broccoli florets. *PLoS ONE* 14, e0213902.
- Liang H, Yuan Q (2012) Natural sulforaphane as a functional chemopreventive agent: including a review of isolation, purification and analysis methods. *Crit Rev Biotechnol* 32, 218-234.
- Liang H, Yuan QP, Dong HR, Liu YM (2006) Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *J Food Comp Anal* 19, 473-476.
- Mikkelsen MD, Petersen BL, Glawischnig E et al. (2003) Modulation of CYP79 Genes and Glucosinolate Profiles in Arabidopsis by Defense Signaling Pathways. *Plant Physiol.* 131, 298-308.
- Mohammadi M, Riahi-Madvar A, Pourseyedi S (2014) Elicitors Induced Sulforaphane Production in *Lepidium draba*. *AJBPS* 4, 64-70.
- Mohammadi M, Riahi-Madvar A, Pourseyedi S, Aminizadeh M (2016) The study of Zn²⁺ and Cu²⁺ effects on myrosinase activity and sulforaphane production in *Lepidium draba*. *Agricultural Biotechnology Journal* 8, 81-94. (In Persian).
- Mikkelsen MD, Petersen BL, Olsen CE, Halkier BA (2002) Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino acids* 22, 279-295.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15, 473-497.
- Namdeo AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review.

- Pharmacogn Rev 1, 69-79.
- Nasiri-Bezenjani M, Riahi-Madvar A, Baghizadeh A, Ahmadi A (2014) Rosmarinic acid production and expression of tyrosine aminotransferase gene in *Melissa officinalis* seedlings in response to yeast extract. JAST 16, 921-930.
- Powell EE, Hill GA, Juurlink BH, Carrier DJ (2005) Glucoraphanin extraction from *Cardaria draba*: Part 2. Countercurrent extraction, bioactivity and toxicity testing. J Chem Technol Biotechnol 80, 992-997.
- Prakash O, Rai AK, Singh J, Singh P (2013). Effect of Heavy Metal Ions and Carbohydrates on the Activity of Cauliflower (*Brassica oleracea* Var. botrytis) Myrosinase. J Stress Physiol Biochem 9, 108-117.
- Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnol Appl Biochem 37, 91-102.
- Radonic A, Blazevic I, Mastelic J et al. (2011) Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Cardaria draba* (L.) Desv. volatiles. Chem Biodivers 8, 1170–1181.
- Rask L, Andréasson E, Ekblom B et al. (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. Plant Molecular Evolution, Springer: 93-113.
- Rezaee F, Ghanati F, Behmanesh M (2013) Antioxidant activity and expression of catalase gene of (*Eustoma grandiflorum* L) in response to boron and aluminum. S Afr J Bot 84 13-18.
- Rezaee F, Lahouti M, Maleki M, Ganjeali A (2018) Comparative proteomics analysis of whitetop (*Lepidium draba* L.) seedlings in response to exogenous glucose. Int J Biol Macromol 120, 2458–2465.
- Stiehl B, Bible B (1989) Reaction of crop species to thiocyanate ion toxicity. HortScienc 24, 99-101.
- Traka M, Mithen R (2009) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. Phytochemistry Reviews 8, 269-282.
- Yan X, Chen S (2007) Regulation of plant glucosinolate metabolism. Planta 226, 1343-1352.
- Yeh CT, Yen GC (2009) Chemopreventive functions of sulforaphane: A potent inducer of antioxidant enzymes and apoptosis. J Funct Foods 1, 23-32.

