Crop Biotech.
Winter (2015) 12: 11-23.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره دوازدهم، زمستان ۱۳۹۴ (۲۳-۱۱)

بیان ژن‌های خانواده *CYP* دخیل در سنتز سزامین در دانه ارقام مختلف کنجد (*Sesamum indicum* L.)

آزاده ریانی[۱] و فاطمه دهقان نیری[۲*]

۱. کارشناس‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران
۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۸/۳۰- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۱۲/۲۱)

Expression of CYP genes involved in sesamin biosynthesis pathway in different varieties of sesame seeds (*Sesamum indicum* L.)

Azadeh Rayani[1], Fatemeh Dehghan Nayeri[2*]
1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.
2. Assistance Professor of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.
(Received: Dec. 20, 2015 - Accepted: Mar. 11, 2016)

چکیده

کنجد (*Sesamum indicum* L.) با داشتن مقادیر زیاد آنتی‌اکسیدان و متابولیت ثانویه منبع تغذیه‌ای مهمی در تامین و حفظ سلامت انسان است. اهمیت ویژه دانه کنجد به‌دلیل وجود آنتی‌اکسیدان طبیعی مهمی به نام سزامین **است**. به‌دلیل کاربرد این آنتی‌اکسیدانت در پیشگیری از بروز بیماری‌ها به‌خصوص سرطان‌ها تلاش‌های زیادی در راستای شناخت بیشتر ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز این ماده و افزایش سطح بیان ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های مربوطه انجام شده است. در این مطالعه سطح بیان ژن‌های کلیدی *CYP81Q1*، *CYP81Q2*، *CYP81Q3* و *C3H* دخیل در بیوسنتز سزامین در دانه ۱۰ رقم کنجد شامل رقم یکتا، زودرس فلسطینی، ناز تک شاخه، ناز چند شاخه، اولتان، جیرفت، دشتستان ۵، دشتستان ۲، ورامین و کرج ۱ با روش QRT-PCR و ژن خانه‌دار *18S rRNA* بررسی شد. براساس نتایج حاصله سطح بیان ژن *CYP81Q1* در رقم زودرس فلسطینی پایین بوده و بعلت پایین بودن مقدار سزامین آن، این رقم را نمی‌توان در مقایسه با سایر ارقام به‌عنوان یک رقم روغنی مطلوب از نظر کیفیت معرفی کرد. رقم یکتا در بین ارقام بیشترین سطح بیان ژن *CYP81Q1* را داشت و یکی از بهترین ارقام در تولید روغن از نظر کیفی و کمی است. ژن *CYP81Q2* در رقم ناز چند شاخه بیشترین و ژن *CYP81Q3* در رقم زودرس فلسطینی کمترین سطح بیان را داشتند. همچنین ارقام کرج ۱، یکتا و دشتستان ۵ بیشترین سطح بیان ژن *C3H* و اولتان کمترین سطح بیان را داشتند. ارقام کرج ۱، یکتا و دشتستان ۵ جزء ارقام تقریباً دیررس هستند. ارقام دیررس دارای روغن بیشتر و محتوای سزامین بالاتری در مقایسه با ارقام زودرس هستند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، سزامین، کنجد، QRT-PCR.

Abstract

Sesame (*Sesamum indicum* L.) is one of the oldest oilseed crops that has been a main food source providing beneficial nutritional outcomes to human health due to its high contents of antioxidants and secondary metabolites. The importance of sesame arises from presence of antioxidant sesamin. Over recent decades, due to being used in cancer cases, there have been numerous efforts aimed at better understanding of the genes underlying sesamin biosynthesis and increasing their expression. In this research, expression levels of the key genes in sesamin biosynthesis pathway including *CYP81Q1, CYP81Q2, CYP81Q3* and *C3H* genes were measured in 10 sesame cultivars seeds (Yekta, early Palestinian, Naz tak shakheh, Naz chand shakheh, Oltan, Jiroft, Dashtestan 5, Dashtestan 2, Varamin and Karaj 1) by QRT-PCR technique and *18S rRNA* gene as reference gene. Our findings showed that the level of *CYP81Q1* gene expression was low in Early Palestinian that has low sesamin content. Therefore, this might not be considered as a qualitatively desired oil cultivar compared to others, whereas Yekta had the highest level of *CYP81Q1* expression the best varieties for oil production both qualitatively and quantitatively. The highest expression level of *CYP81Q2* was observed in Naz chand shakheh, while the lowest *CYP81Q2* expression was found in Early Palestinian. Karaj1, Yekta and Dashtestan 5 showed the highest whereas Oltan had the lowest expression level of *C3H*. Karaj 1, Yekta and Dashtestan 5 were relatively from the late mature group that was reported to have higher contents of oil and sesamin than early ones.

Keywords: Sesame, Sesamin, QRT-PCR, Gene expression

* نویسنده مسئول: فاطمه دهقان‌نیری
E-mail: nayeri@eng.ikiu.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌دلیل اهمیت زیاد در سلامتی انسان بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و تحقیقات گسترده‌ای به‌منظور بکارگیری آن‌ها در مواد غذایی به‌جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی انجام شده است. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نه تنها فاقد اثرات زیان‌آور آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی هستند (به‌عنوان مثال سرطان‌زایی) بلکه باعث حفظ و تامین سلامت بیشتر انسان می‌شوند. یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی سزامین است که به‌وفور در مواد غذایی به‌ویژه در روغن کنجد وجود دارد. روغن کنجد در بین روغن‌های خوراکی به ملکه روغن‌ها مشهور است (Wahid and El-Bramawy, 2007)، حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و تاثیر چشمگیری در پیشگیری از بیماری‌های مختلف دارد (Hirose *et al*., 1991). خاصیت آنتی‌اکسیدانی روغن کنجد سبب جلوگیری از سرطان‌های دستگاه گوارش، پروستات و پستان و باعث از بین رفتن سرطان‌های خفته در بدن می‌شود (Kuzhuvelil *et al*., 2010). همچنین این روغن به‌دلیل دارا بودن ویتامین E موجب شفافیت و لطافت پوست می‌گردد (Nakano *et al*., 2003). روغن‌ها با گذشت زمان و به‌ویژه تحت تاثیر شرایط نامطلوب نگهداری اکسیده می‌شوند و در نتیجه علاوه بر کاهش ارزش غذایی، مخاطراتی را برای سلامتی انسان به‌وجود می‌آورند. به‌دلیل اثر نامطلوبی که اکسیداسیون روغن در ایجاد طعم بد مواد غذایی دارد این پدیده مورد تحقیق گسترده‌ای قرار گرفته است و لذا استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در روغن ضروری به‌نظر می‌رسد. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور موثر و به شیوه‌های مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد دارای اکسیژن و نیتروژن فعال با مولکول‌های زیستی (نظیر پروتئین، اسیدهای‌آمینه، لیپید و DNA) جلوگیری می‌کنند و مانع مرگ سلولی، کاهش سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شوند (Kuzhuvelil *et al*., 2010).

کنجد گیاه یک‌ساله، دولپه‌ای و متعلق به خانواده پدالیاسه[1] است. جنس *Sesamum* حدود ۳۵ گونه وحشی را شامل می‌شود و تنها گونه قابل کشت و خوراکی آن *Sesamum indicum* است. کنجد احتمالاً قدیمی‌ترین دانه روغنی است که توسط انسان شناخته و به‌عنوان یک منبع غذایی استفاده شده است. دانه کنجد حاوی ۲۵٪ پروتئین و ۵۰٪ روغن است (Moazzami *et al*., 2006). دانه کنجد حاوی گروهی از ترکیبات به‌نام لیگنان[2] است که از متابولیت‌های ثانویه به‌شمار می‌روند. لیگنان‌ها ترکیباتی هستند که به‌مقدار کم و به‌صورت متصل با فیبر وجود دارند (Osawa *et al*., 1985). لیگنان‌ها شبیه هورمون استروژن هستند و خاصیت ضد اکسیداسیون دارند، به‌طوری‌که از اکسیداسیون چربی‌ها و تولید ترکیبات مضری مثل رادیکال‌ها و اسیدهای چرب آزاد جلوگیری می‌کنند (Kamal-Eldin *et al*., 2000). سزامین[3] و سزامولین[4] لیگنان‌های اصلی محلول در روغن دانه کنجد هستند (Namiki, 1995). بیشتر خصوصیات غیر معمول روغن کنجد مربوط به‌وجود همین ترکیبات غیر قابل صابونی منحصر بفرد موجود در آن شامل سزامول، سزامین و سزامولین است (Katsuzaki *et al*., 1992) این مواد طبیعی سبب پایداری زیاد روغن کنجد در مقابل فساد ناشی از اکسیداسیون می‌شوند. روغن کنجد در مقایسه با سایر روغن‌های گیاهی، مواد غیرقابل صابونی (حدود ۲٪) بیشتری دارد (Jeng, 2005; Hemalatha, 2004). فواید سزامین شامل خاصیت ضد آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطان (Tsai *et al*., 2006)، ضد فشارخون

1. Pedaliacese
2. Lignan
3. Sesamin
4. Sesamolin

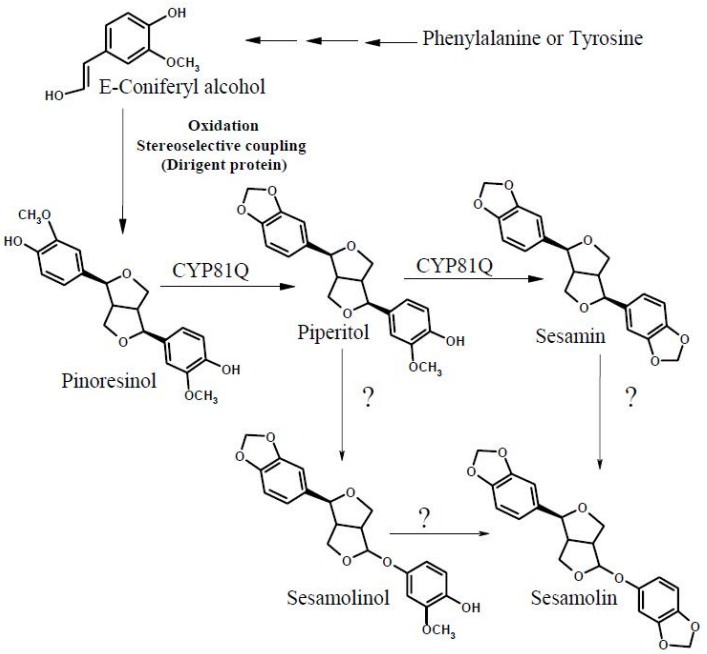
(Sansen *et al.*, 2007; Nakai *et al.*, 2003)، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با تولید محصولات پراکسیدان، افزایش فعالیت اکسیدانی اسیدهای چرب (Qusti *et al.*, 2010)، ضد خواص اشتعالی (Miyawaki *et al.*, 2009)، محافظت در برابر الکل، خطرات هپاتیت و کبد چرب، تحریک متابولیسم الکل (Kilkkinen *et al.*, 2006) و در نهایت کاهش فعالیت کلسترول (Lim *et al.*, 2007) است. همچنین از ویژگی‌های مفید سزامین کنجد خاصیت حشره‌کشی آن است (Fuss, 2003). در مسیر بیوسنتز سزامین، کونیفریل‌الکل از اسیدآمینه فنیل‌آلانین تولید می‌شود و خود منجر به تولید پینورزینول[1] در دانه کنجد می‌شود. در ادامه پینورزینول در دانه‌های بالغ به پایپریتول[2] و سزامین تبدیل می‌شود (شکل ۱) (Kamal-Eldin *et al.*, 2000). تشکیل لیگنان‌ها و تکامل آنها کاملاً تنظیم شده است و بستگی به‌مرحله بلوغ دانه دارد. در دانه‌های بالغ پینورزینول در مدت ۸ هفته به پایپریتول و سزامین تبدیل می‌شود در حالی‌که در دانه‌های جوان‌تر به سزامولین تبدیل می‌شود. همچنین مقدار سزامینول در پایان بلوغ دانه بسیار زیاد است و سنتز سزامین از پینورزینول توسط ژن *CYP81Q1* (از ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های سیتوکروم P450) و طی دو مرحله صورت می‌گیرد (Ono *et al.*, 2006). آنزیم‌های سیتوکروم P450 (CYP450) وظیفه تسریع اکسیداسیون ترکیبات آلی را بر عهده دارند و برای اکسیداسیون ترکیبات از آهن استفاده می‌کنند (Saxena *et al.*, 2013). سوبسترای این آنزیم‌ها لیپیدها، هورمون‌های استروئیدی و سایر مواد شیمیایی هستند (Mansuy, 1998; Fischer, 2007). بررسی بیان ژن‌های دخیل در یک مسیر متابولیکی در شناسایی و چگونگی تنظیم آن مسیر متابولیکی کمک شایانی می‌کند. یکی از روش‌های دقیق برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده از روش PCR کمی[3] است. تمامی اصول و واکنش‌گرهایی که برای یک PCR معمولی نیاز است در این تکنیک هم به‌کار می‌رود. اما علاوه بر آن یک گزارشگر فلورسنت مانند SYBER Green نیز در واکنش حضور دارد. کاربرد نشانگرهای فلوروژنیک و روش‌های حساس آشکارسازی تابش آنها باعث افزایش کارایی این سیستم نسبت به سیستم PCR معمولی شده است (Khodadadi *et al.,* 2011). هدف از انجام این تحقیق بررسی سطح بیان ژن‌های خانواده *CYP* دخیل در سنتز سزامین در دانه ارقام مختلف کنجد بود که برای این منظور از تکنیک QRT-PCR استفاده شد. ارقام مورد استفاده شامل زودرس فلسطینی، ناز تک شاخه، ناز چند شاخه، اولتان، جیرفت، دشتستان ۵، دشتستان ۲، ورامین، کرج ۱ و یکتا هستند که از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه اصلاح وتهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند. ارقام مذکور به‌عنوان ارقام مهم مورد استفاده برای کشت در استان‌های مختلف کشور از طرف مسئولین بخش تحقیقات دانه‌های روغنی این موسسه معرفی شدند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل دانه ۱۰ رقم مختلف کنجد (جدول ۱) بود که از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد.

1. Pinoresinol
2. Piperitol
3. Quantitative Real Time PCR



شکل ۱. مسیر بیوسنتز سزامین (Ono *et al*., 2006)

جدول ۱. ارقام مختلف کنجد مورد استفاده در این تحقیق

جیرفت (Jiroft)	ناز تک شاخه (Naz tak shakheh)
یکتا (Yekta)	ناز چند شاخه (Naz chand shakheh)
ورامین (Varamin)	زودرس فلسطینی (Early Palestinian)
کرج ۱ (Karaj1)	دشتستان ۵ (Dashtestan5)
یلووایت (Yellow white)	دشتستان ۲ (Dashtestan2)

استخراج RNA و بررسی کمیت و کیفیت آن

برای استخراج RNA همه وسایل مورد نیاز با محلول دی‌اتیل‌پیروکربنات (DEPC) ۰/۱ درصد ضدعفونی شدند. RNA از دانه‌های روغنی کنجد بدون استفاده از کیت و با روش بهینه شده توسط Rayani و Dehghan Nayeri (۲۰۱۵) استخراج شد (Rayani and Dehghan Nayeri, 2015). RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل VVD3200 ساخت شرکت لبومد آلمان) غلظت‌سنجی شد. سلامت نمونه‌های RNA استخراج شده با استفاده از بارگیری روی الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد (W/V) مورد بررسی قرار گرفت. قبل از ساخت cDNA، برای حذف آلودگی احتمالی RNA با DNA ژنومی، از آنزیم *DNase* I (شرکت فرمنتاز) استفاده شد و مجددا با نانودراپ و الکتروفورز بررسی گردید.

واکنش نسخه‌برداری معکوس: سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم RNA و آنزیم RevertAid M-MuLVReverse Transcriptase (شرکت سیناکلون) صورت گرفت. به‌منظور اطمینان از درستی سنتز نمونه‌های cDNA، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *18S rRNA* انجام شد. با استفاده از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل اگارز ۲٪ (وزنی/ حجمی) و مشاهده باند مربوط به تکثیر ژن *18S rRNA* درستی سنتز cDNA مورد تایید قرار گرفت.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای واکنش QRT-PCR

نام آغازگرها	شماره دسترسی ژن	توالی آغازگرها	Tm (°C)	% GC	اندازه محصولات PCR (bp)
CYP81Q1 F	AB194714	5'-TCTCGCTCTCACCTTCGCC-3'	75.4	60	169
CYP81Q1 R		5'-CTGGGAGAAGTCGTATAGTG-3'	60.9	50	
CYP81Q2 F	AB194715	5'- GGGAAGAGATACTATGGGGA-3'	64	50	162
CYP81Q2 R		5'-AGCCAGCTTCTTCTCCAAC-3'	65.7	52.6	
CYP81Q3 F	AB194716	5'-CTCTCGCTCTCACCTTCGC-3'	69.9	63.2	168
CYP81Q3 R		5'-GGGAGCAGTCGTATAGTGTT-3'	62.8	50	
C3H F	AY065995	5'-GCCCCCACTATGTTAAGGTC-3'	66.8	55	173
C3H R		5'-GTATTCACGCAACACCAAAG-3'	65.2	45.6	
18SrRNA F	AJ236041	5-TCTTAGTTGGTGGAGCGATT-3'	65.9	45	171
18SrRNA R		5-GAACATCTAAGGGCATCACA-3	46.6	45	

طراحی آغازگرهای واکنش QRT-PCR

برای طراحی آغازگرهای نوکلئوتیدی جهت انجام واکنش QRT-PCR ابتدا توالی ژن‌های مورد مطالعه گیاه کنجد از بانک اطلاعاتی NCBI گرفته شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار Oligo 5,v3.0 آغازگرهای موردنظر طراحی شدند (جدول ۲). آغازگرهای طراحی شده برای هر ژن به‌منظور اطمینان از اتصال مناسب، عدم اتصال غیراختصاصی و عدم تشکیل دایمر آغازگر به وسیله PCR بررسی و مورد تایید قرار گرفتند.

واکنش QRT-PCR

سطح بیان چند ژن دخیل در مسیر بیوسنتز سزامین در کنجد به وسیله تکنیک QRT-PCR بررسی شد. تمام cDNAهای ساخته شده (با غلظت ۱ میکروگرم در میکرولیتر) به‌مقدار ۱۵ برابر رقیق شدند. از ژن *18S rRNA* به‌عنوان ژن مرجع (خانه‌دار) برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. در این آزمایش از معرف SYBER Green (شرکت امینسان) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و در میکروپلیت‌های ۷۰ چاهکی استفاده گردید و برای هر نمونه ۳ تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. برای بررسی بیان ژن در نمونه‌های مختلف در غیاب نمونه شاهد از فرمول ۴۰−ΔCT استفاده شد که در آن ۴۰ تعداد سیکل PCR و ΔCT داده‌های CT نرمال شده هر ژن با استفاده از CT ژن خانه‌دار هستند (Wong and Medrano, 2005).

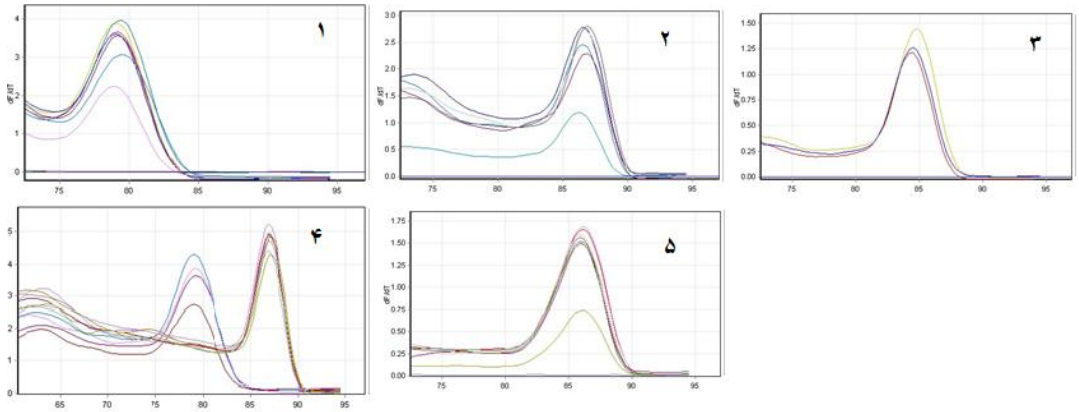
نتایج

در این تحقیق سطح بیان ژن‌های CYP دخیل در بیوسنتز سزامین شامل ژن‌های *CYP81Q1*، *CYP81Q2*، *CYP81Q3* و *C3H* در دانه ۱۰ رقم کنجد شامل رقم یکتا، زودرس فلسطینی، ناز تک شاخه، ناز چند شاخه، اولتان، جیرفت، دشتستان۵، دشتستان۲، ورامین و کرج۱ با روش QRT-PCR بررسی شد. داده‌های CT بدست آمده با استفاده از CT ژن خانه‌دار *18S rRNA* نرمال‌سازی (ΔCT) و به‌صورت ۴۰−ΔCT گزارش شدند. منحنی ذوب ژن‌های مورد مطالعه در شکل ۲ نشان داده شده است. براساس منحنی ذوب، تکثیر همه ژن‌ها به‌صورت اختصاصی صورت گرفته و فاقد محصولات غیراختصاصی مثل دایمر آغازگر است.

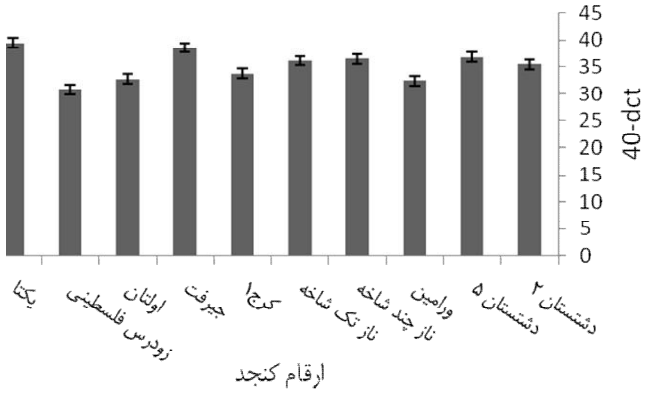
بررسی بیان ژن *CYP81Q1*

ژن *CYP81Q1* از ژن‌های گروه ۷۱ سیتوکروم P450، خانواده CYP81 و زیرخانواده CYP81Q1 با طول ۱۵۲۱ جفت باز است. با مقایسه داده‌های مربوط به بیان ژن *CYP81Q1* در ارقام مختلف کنجد مشخص گردید که ژن *CYP81Q1* در همه ارقام بیان شده است با این تفاوت که رقم یکتا بیشترین سطح بیان ژن و رقم زودرس فلسطینی کم‌ترین سطح بیان ژن را نشان دادند (شکل ۳). براساس منابع موجود، ژن

CYP81Q1 تنها ژن مسئول سنتز سزامین از پیش ماده پینورزینول در دانه کنجد می‌باشد و سطح بیان این ژن در دانه کنجد، تعیین کننده محتوای سزامین دانه در این گیاه است.



شکل ۲. منحنی ذوب ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از تکنیک QRT-PCR، ۱- ژن *CYP81Q1*، ۲- ژن *CYP81Q2*، ۳- ژن *18S rRNA*، ۴- ژن *CYP81Q3* و ۵- ژن *C3H*.



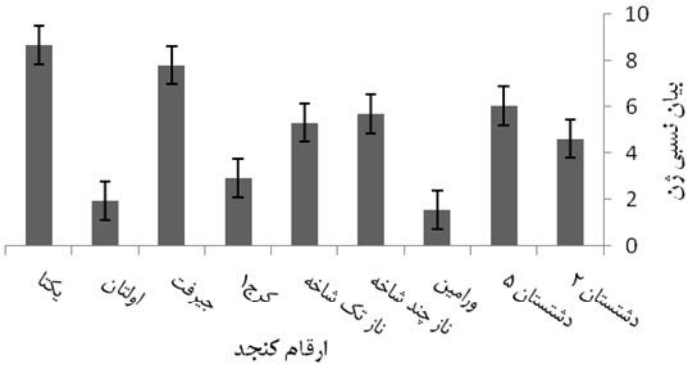
شکل ۳. بیان ژن *CYP81Q1* در دانه ارقام مختلف کنجد. (داده‌ها mean ±SD و n=3).

با بررسی سطح بیان ژن *CYP81Q1* در دانه ۱۰ رقم مختلف کنجد مشخص گردید که بیان این ژن در رقم زودرس فلسطینی کمتر از سایر ارقام است (شکل ۲)، از این‌رو رقم زودرس فلسطینی به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و سطح بیان ژن *CYP81Q1* در سایر ارقام نسبت به این رقم مقایسه شد. با مقایسه داده‌های مربوط به‌بیان ژن *CYP81Q1* در ارقام مختلف کنجد مشخص گردید که سطح بیان این ژن در دانه رقم یکتا حدود ۹ برابر و در دانه رقم جیرفت ۸ برابر بیشتر از شاهد بود. این ژن در دانه ارقام دشتستان ۵، ناز چند شاخه و ناز تک شاخه حدود ۶ برابر و در دانه رقم دشتستان ۲ حدود ۵ برابر بیشتر از رقم شاهد بیان می‌شود. ارقام ورامین، اولتان و کرج ۱ به‌ترتیب کمترین سطح بیان ژن *CYP81Q1* را نشان دادند (شکل ۴).

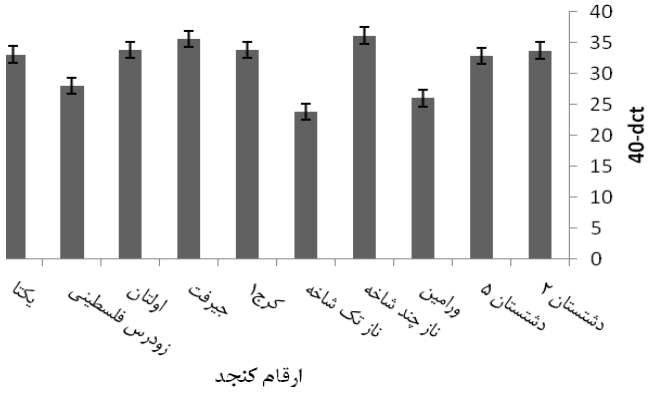
بررسی بیان ژن *CYP81Q2*

ژن *CYP81Q2* از ژن‌های گروه ۷۱ سیتوکروم P450، خانواده CYP81 و زیرخانواده CYP81Q1 با طول ۱۵۲۱ جفت باز است. این ژن از همولوگ‌های ژن *CYP81Q1* می‌باشد. با مقایسه داده‌های مربوط به بیان ژن *CYP81Q2* در دانه ارقام مختلف کنجد

مشخص گردید، که بین ارقام برای سطح بیان این ژن در دانه اختلاف وجود دارد به طوری‌که رقم ناز چند شاخه بیشترین سطح بیان و رقم ناز تک شاخه کمترین سطح بیان ژن *CYP81Q2* را نشان دادند. این دو رقم از نظر سطح بیان ژن *CYP81Q1* مشابه بودند (شکل۵).



شکل ۴. بیان ژن *CYP81Q1* در دانه ارقام مختلف کنجد نسبت به شاهد (رقم زودرس فلسطینی). (داده‌ها mean ±SD و n=3).

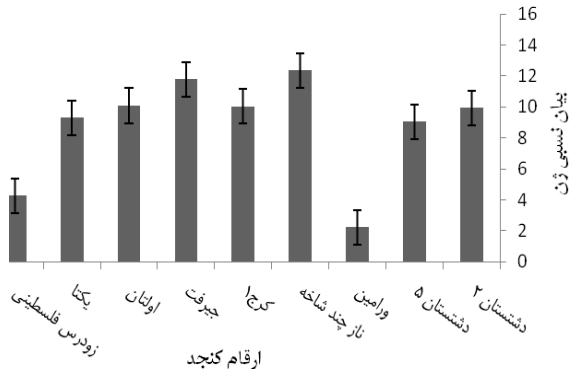


شکل ۵. بیان ژن *CYP81Q2* در دانه ارقام مختلف کنجد. (داده‌ها mean ±SD و n=3).

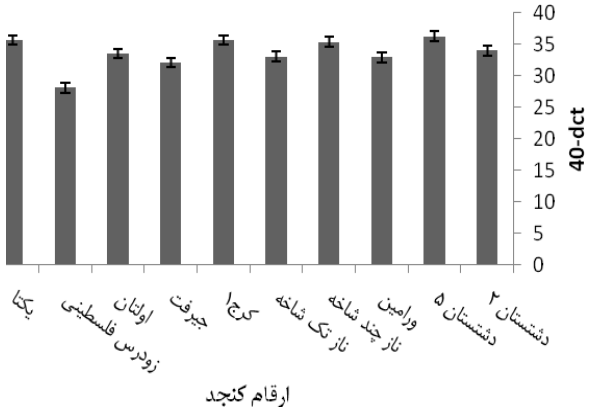
در بررسی بیان ژن *CYP81Q2* در دانه ۱۰ رقم مختلف کنجد مشخص گردید که بیان ژن در رقم ناز تک شاخه کمتر از سایر ارقام است (شکل ۵). از این‌رو، رقم ناز تک شاخه به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و سطح بیان ژن *CYP81Q2* در سایر ارقام نسبت به رقم ناز تک شاخه مقایسه شد. با مقایسه داده‌های مربوط به بیان ژن *CYP81Q2* در ارقام مختلف کنجد مشخص گردید که سطح بیان این ژن در دانه رقم ناز چند شاخه حدود ۱۲ برابر و در دانه رقم جیرفت ۱۱ برابر بیشتر از شاهد بود. این ژن در دانه ارقام دشتستان ۲، کرج ۱ و اولتان حدود ۱۰ برابر و در دانه یکتا و دشتستان ۵ حدود ۹ برابر بیشتر از رقم شاهد بیان می‌شود. ارقام زودرس فلسطینی و ورامین کمترین سطح بیان ژن *CYP81Q2* را نسبت به رقم شاهد نشان دادند (شکل ۶).

بررسی بیان ژن *CYP81Q3*

ژن *CYP81Q3* در ارقام دیررس شامل یکتا، کرج ۱ و دشتستان ۵ بیشتر و در رقم زودرس فلسطینی کمتر بیان می‌شود. این ژن در سایر ارقام مورد مطالعه در سطوحی تقریباً مشابه بیان می‌شود (شکل ۷).



شکل ۶. بیان ژن *CYP81Q2* در دانه ارقام مختلف کنجد نسبت به شاهد (رقم ناز تک شاخه). (داده‌ها mean ±SD و n=3).



شکل ۷. بیان ژن *CYP81Q3* در ارقام مختلف کنجد. (داده‌ها mean ±SD و n=3).

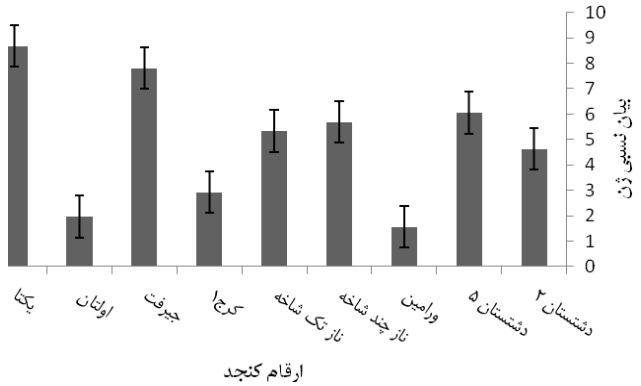
پس از بررسی سطح بیان ژن *CYP81Q3* در دانه ۱۰ رقم کنجد مشخص گردید که بیان این ژن در رقم زودرس فلسطینی کمتر از سایر ارقام است (شکل ۷). از این رو سطح بیان ژن *CYP81Q3* در سایر ارقام نسبت به رقم زودرس فلسطینی بعنوان شاهد مقایسه شد. با مقایسه داده‌های مربوط به بیان ژن *CYP81Q3* در ارقام مختلف کنجد مشخص گردید که سطح بیان این ژن در دانه رقم یکتا حدود ۹ برابر و در دانه رقم جیرفت ۸ برابر بیشتر از شاهد است و این ژن در دانه ارقام دشتستان ۵، ناز تک شاخه و ناز چند شاخه حدود ۶ برابر و در رقم دشتستان ۲ حدود ۵ برابر بیشتر از رقم شاهد بیان می‌شود. ارقام ورامین، اولتان و کرج ۱ به‌ترتیب کمترین سطح بیان ژن *CYP81Q3* را نشان دادند (شکل ۸). با توجه به نتایج، بیان ژن *CYP81Q3* در ارقام مختلف کنجد با سطح بیان ژن *CYP81Q1* مشابه بود و برای بررسی هر دو ژن، رقم زودرس فلسطینی به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

بررسی بیان ژن *C3H*

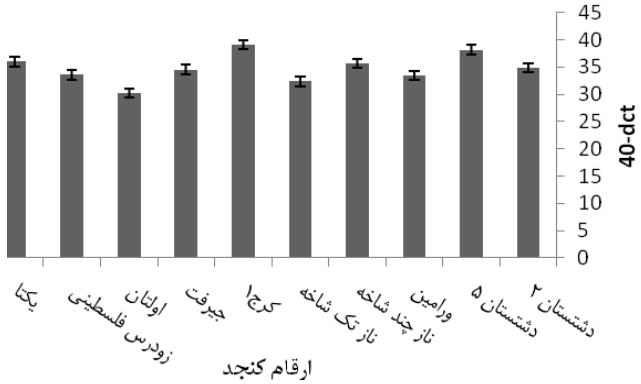
مقایسه داده‌های مربوط به بیان ژن *C3H* در دانه ارقام مختلف کنجد نشان داد که ارقام کرج۱، یکتا و دشتستان۵ بیشترین سطح بیان ژن *C3H* و اولتان کمترین سطح بیان را دارند (شکل ۹).

با بررسی سطح بیان ژن *C3H* بعنوان یکی از ژن‌های مهم مسیر سنتز سزامین در دانه کنجد مشخص گردید که بیان این ژن در رقم اولتان کمتر ار سایر ارقام است (شکل ۹). از این رو رقم اولتان به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و سطح بیان ژن *C3H* در سایر ارقام نسبت به این رقم مقایسه

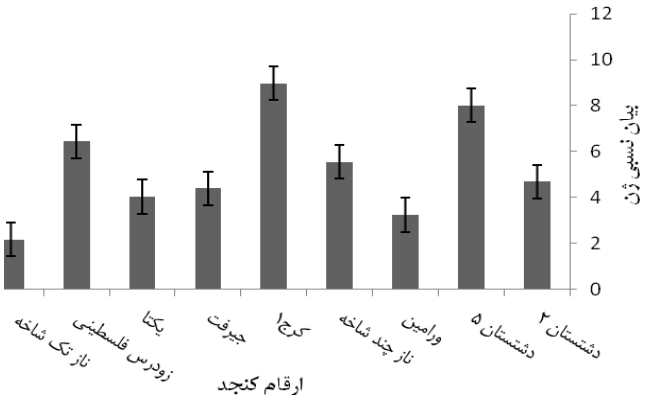
شد. با مقایسه داده‌های مربوط به بیان ژن *C3H* در ارقام مختلف کنجد مشخص گردید که سطح بیان این ژن در دانه رقم کرج ۱ حدود ۹ برابر، در دانه رقم دشتستان ۵، ۸ برابر، در رقم زودرس فلسطینی حدود ۷ برابر و در رقم ناز چند شاخه حدود ۶ برابر بیشتر از شاهد بود. این ژن در دانه ارقام دشتستان ۲ و جیرفت حدود ۵ برابر و در دانه رقم یکتا حدود ۴ برابر بیشتر از رقم شاهد بیان می‌شود. ارقام ناز تک شاخه و ورامین به‌ترتیب کمترین سطح بیان ژن *C3H* را نشان دادند (شکل ۱۰).



شکل ۸. بیان ژن *CYP81Q3* در دانه ارقام مختلف کنجد نسبت به شاهد (رقم زودرس فلسطینی). (داده‌ها mean ±SD و n=3).



شکل ۹. بیان ژن *C3H* در دانه ارقام مختلف کنجد. (داده‌ها mean ±SD و n=3).



شکل ۱۰. بیان ژن *C3H* در دانه ارقام مختلف کنجد نسبت به شاهد (رقم اولتان). (داده‌ها mean ±SD و n=3).

بحث و نتیجه‌گیری

روغن کنجد به‌عنوان بهترین روغن شناخته شده است. اهمیت ویژه روغن کنجد به‌دلیل وجود آنتی‌اکسیدان طبیعی مهمی به‌نام سزامین است که به‌وفور در دانه آن وجود دارد (Wahid and El-Bramawy, 2007). از بین لیگنان‌های موجود در دانه کنجد، سزامین مهم‌ترین لیگنان معرفی شده است (Hata *et al*., 2010). مقدار روغن و لیگنان‌های موجود در دانه کنجد با یکدیگر همبستگی مثبت معنی‌دار دارند (Hwan Lee *et al*., 2008). روغن دانه کنجد بسته به رقم کنجد و سطح بیان ژن‌ها متفاوت است. همچنین ژن‌های دخیل در مقدار روغن با مقدار سزامین و سزامولین نیز ارتباط دارند (Wei *et al*., 2015). ارقام کنجد با دانه‌های روشن مقدار روغن کمتری نسبت به‌ارقام با دانه‌های تیره دارند ولی کیفیت روغن در آنها بهتر است (Mukhopadhyay and Ray 1999). همچنین ارقام دارای دانه روشن مقدار سزامین بیشتری نسبت به ارقام با دانه‌های تیره دارند (Wang *et al*., 2013). ارقام دیررس‌تر کنجد دارای روغن بیشتر و مقدار سزامین بالاتری در دانه هستند (Hata *et al*., 2010). براساس مطالعه انجام شده روی تعدادی از ارقام کنجد موجود در ایران، ارقام دیررس (ارقام کرج ۱، یکتا و دشتستان ۵) دارای روغن بیشتر و محتوای سزامین بالاتری در مقایسه با ارقام زودرس هستند. ارقام زودرس کم‌ترین مقدار روغن را دارند و به‌دلیل داشتن طعم مطلوب برای استفاده در نانوایی و شیرینی‌پزی و نیز در تهیه کنجاله جهت مصرف دام توصیه شده‌اند (Dini Torkamani and Karaptyan, 2007). بر اساس منابع موجود، بیان ژن CYP81Q1 در دانه کنجد باعث تولید لیگنان‌های موجود در دانه می‌شود به طوری‌که با افزایش بیان این ژن مقدار لیگنان‌ها نیز افزایش می‌یابد. ژن CYP81Q1 در دانه کنجد به فراوانی بیان می‌شود ولی در گونه و ارقام مختلف کنجد مقدار بیان آن متفاوت است. افزایش بیان ژن *CYP81Q1* روی کیفیت، کمیت و بهبود خصوصیات شیمیایی روغن تاثیر مثبت دارد و آن را افزایش می‌دهد (Hata *et al.,* 2010; One *et al.,* 2006). در این تحقیق سطح بیان متفاوتی از ژن *CYP81Q1* در ارقام مختلف کنجد مشاهده شد. سطح بیان این ژن در رقم زودرس فلسطینی پایین‌تر از سایر ارقام بود. از آنجائی‌که مقدار سزامین این رقم نیز پایین گزارش شده است و با استناد اینکه بیان متفاوت ژن *CYP81Q1* یکی از مهمترین عوامل موثر روی اختلافات ژنوتیپی ارقام از نظر محتوای سزامین دانه است (Hata *et al*., 2010)، احتمالاً یکی از دلایل مقدار سزامین کم دانه در رقم زودرس فلسطینی را می‌توان به سطح بیان پایین ژن *CYP81Q1* در دانه این رقم نسبت داد. رقم زودرس فلسطینی در مقایسه با سایر ارقام کمترین مقدار روغن را دارد، فاقد کیفیت روغن جهت مصرف خوراکی بوده و صرفاً برای تغذیه دام معرفی شده است (Dini Torkamani and Karaptyan, 2007).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، در بین ارقام مختلف کنجد دو رقم یکتا و جیرفت بیشترین سطح بیان ژن *CYP81Q1* را داشتند. رقم یکتا در بین ارقام کنجد بیشترین مقدار روغن و محتوای سزامین را دارد و یکی از بهترین ارقام در تولید روغن از نظر کمی و کیفی است (Dini Dini Torkamani & Karaptyan, 2007). همچنین بر اساس اطلاعات حاصل از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، بالاترین مقدار سزامین مربوط به ارقام یکتا و جیرفت است و این دو رقم در صنعت روغن‌کشی کشور از ارقام مهم مورد استفاده هستند. همبستگی مثبت بین سطح بیان ژن *CYP81Q1* و مقدار سزامین گزارش شده است به‌طوری‌که هرچه سطح بیان ژن *CYP81Q1* بالاتر باشد مقدار سزامین روغن و در نتیجه کیفیت آن افزایش می‌یابد (Ono *et al*., 2006; Hata *et al*.,

2010). بنابراین یکی از دلایل بالا بودن کیفیت روغن در این ارقام را می‌توان به بیان بالای این ژن در آنها نسبت داد. ژن *CYP81Q2* همولوگ فعال ژن *CYP81Q1* در گونه *Sesamum radiatum* است. این ژن در دانه بیان می‌شود ولی در برگ، ساقه و گل بیان نمی‌شود. بیان این ژن در دانه نسبت به ژن *CYP81Q1* کمتر است و سزامین کمتری تولید می‌کند (Hata *et al.,* 2010; One *et al.,* 2006). در این تحقیق سطح بیان دو ژن *CYP81Q1* و *CYP81Q2* در ارقام مورد مطالعه روند مشابهی نشان دادند که احتمالاً می‌تواند دلیلی بر مشارکت هر دو ژن در تولید سزامین دانه باشد. ژن *CYP81Q3* از گروه ۷۱ سیتوکروم P450، خانواده CYP81 و زیرخانواده CYP81Q با طول ۱۵۲۴ جفت باز است. *CYP81Q3* همولوگ ژن *CYP81Q1* است ولی از نظر توالی پروتئینی شباهت کمتری با آن دارد. ژن *CYP81Q3* نسخه غیرفعال *CYP81Q1* است و در سه جفت باز با آن تفاوت دارد. این ژن از گونه *Sesamum alatum* که یک گونه وحشی آفریقایی است جداسازی شده است. ژن *CYP81Q3* در دانه کنجد بیان می‌شود. ولی در تولید سزامین دانه کنجد نقشی ندارد. در گونه مذکور بیان ژن *CYP81Q1* باعث تولید سزامین می‌شود (Ono *et al*., 2006). از آنجایی‌که در این تحقیق در رقم یکتا با محتوای سزامین بالا بیان ژن *CYP81Q3* از همه کمتر و بیان ژن *CYP81Q1* بیشتر است احتمالاً در ارقام ایرانی نیز ژن *CYP81Q1* در تولید سزامین نقش اصلی را ایفا می‌کند. همچنین از آنجایی که بر اساس منابع ژن *CYP81Q3* به‌دلیل غیرفعال بودن پروتئین آن نقشی در تولید سزامین دانه ندارد با غیرفعال کردن آن در دانه کنجد و جلوگیری از بیان آن می‌توان به مطالعه بیشتر نقش آن پرداخت. ژن *C3H*[1] از ژن‌های خانواده CYP (با نام CYP98A20) و دارای ۱۵۳۰ جفت باز است. برخلاف ژن *CYP81Q1* که در همه اندام‌های کنجد بیان نمی‌شود ژن *C3H* به طور دائم و در همه اندام‌ها بیان می‌شود. آنزیم C3H از آنزیم‌های مهم مسیر فنیل‌پروپانوئید است که نقش مهمی در تولید لیگنان‌ها دارد (Anterola *et al*., 2002). در این تحقیق سطح بیان ژن *C3H* در ارقام دیررس حاوی روغن بیشتر و محتوای سزامین بالاتر (ارقام کرج ۱، یکتا و دشتستان ۵) بیشتر از سایر ارقام بود. از آنجایی که این ژن از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزامین است بیان بیشتر آن در ارقام دارای سزامین بالا دور از انتظار نیست.

REFERENCES

Anterola AM, Jeon JH, Davin LB, Lewis NG (2002) Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda* factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. J. Biol. Chem. 277: 18272-18280.

Dini Torkamani M, Karaptyan Z (2007) The amount and variety of proteins in seeds of ten cultivars of sesame (*Sesamum indicum* L.). J. Sci. Technol. Agr. Nat. Res. Soil Wat. Sci. 2(40): 225-231.

Fischer M, Knoll M, Sirim D, Wagner F, Funke S, Pleiss J (2007) The cytochrome P450 engineering database: a navigation and prediction tool for the cytochrome P450 protein family. Bioinformatics 23: 2015-2017.

Fuss E (2003) Lignans in plant cell and organ cultures: an overview. Phytochem. Rev. 2: 307-320.

Hata N, Hayashi Y, Okazawa A, Ono E, Satake H, Kobayashi A (2010) Comparison of sesamin contents and CYP81Q1 gene expressions in

1. P-coumarate 3 hydroxylase

aboveground vegetative organs between two Japanese sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties differing in seed sesamin contents. Plant Sci. 178: 510-516.

Hwan Lee J, Baek IY, Ko JM, Shim KB, Kang NS, Kim HT (2008) Correlation of lignan contents with protein and oil contents in the seeds of *Sesamum indicum* L. J. Appl. Biol. Chem. 51(1): 20-27.

Hemalatha S (2004) Lignans and tocopherols in Indian sesame cultivars. J. Am. Oil. Chem. Soc. 81: 467-470.

Hirose N, Nishihara K, Sugano M, Akimoto K, Shimizu S,Yamada H (1991) Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. J. Lipid Res. 32: 629-638.

Jeng KC (2005) Sesamin and sesamolin: Nature's therapeutic lignans. *Curr. Enz. Inhib.* 1: 11-20.

Kamal-Eldin A, Frank J, Razdan A, Tengblad S, Basu S, Vessby B (2000) Effects of dietary phenolic compounds on tocopherol, cholesterol, and fatty acids in rats. Lipids 35: 427-435.

Katsuzaki H, Kawasumi M, Kawakishi S, Osawa T (1992) Structure of novel antioxidative lignan glucosides isolated from sesame seed. Biosci. Biotech. Bioch. 56: 2087-2088.

Khodadadi A, Hamidinia M, Boroujerdnia M, Mohammadi J (2011) The impact of real-time PCR method using a standard curve and linear regression approach. J. Jondi Shapour. 11(76): 85-95.

Kilkkinen A, Erlund I, Virtanen MJ, Alfthan G, Ariniemi K, Virtamo J (2006) Serum enterolactone concentration and the risk of coronary heart disease in a case-cohort study of Finnish male smokers. Am. J. Epidemiol. 163: 687-693.

Kuzhuvelil B. Harikumar, Sung B, Tharakan ST, Pandey MK, Joy B, Guha S, Krishnan S, Aggarwal BB (2010) Sesamin manifests chemopreventive effects through suppression of NF-κB-regulated cell survival, proliferation, invasion and angiogenic gene products. *Mol. Cancer Res.* 8: 751-761.

Lim JS, Adachi Y, Takahashi Y, Ide T (2007) Comparative analysis of sesame lignans (sesamin and sesamolin) in affecting hepatic fatty acid metabolism in rats. Brit. J. Nutr. 97: 85-95.

Mansuy D (1998) The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 121: 5-14.

Miyawaki T, Aono H, Toyoda-Ono Y, Maeda H, Kiso Y, Moriyama K (2009) Antihypertensive effects of sesamin in humans. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 55: 87-91.

Moazzami AA, Andersson RE, Kamal-Eldin A (2006) HPLC analysis of sesaminol glucosides in sesame seeds. J. Agr. Food Chem. 54: 633-638.

Mukhopadhyay N, Ray AK (1999) Effect of fermentation on the nutritive value of sesame seed meal in the diets for rohu, Labeo rohita (Hamilton), fingerlings. Aquacult. Nutr. 5 (4): 229-236.

Nakai M, Harada M, Nakahara K, Akimoto K, Shibata H, Miki W, Kiso Y (2003) Novel antioxidative metabolites in rat liver with ingested sesamin. J. Agr. Food Chem. 51: 1666-70.

Nakano D, Itoh C, Ishii F, Kawanishi H, Takaoka M, Kiso Y, Tsuruoka N, Tanaka T, Matsumura Y (2003) Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Biol. Pharm. Bull. 26: 1701-1705.

Namiki M (1995) The chemistry and physiological functions of sesame. Food Rev. Int. 11: 281-329.

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. Proc. Natl. Acad. Sci. 103: 10116-10121.

Osawa T, Nagata M, Namiki M, Fukuda Y (1985) Sesamolinol, a novel antioxidant isolated from sesame seeds. Agric. Biol. Chem. 49: 3351-3352.

Qusti S, Abo-Khatwa A, Lahwa M (2010) Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holly Quran. J. Biol. Sci. 2: 40-51.

Rayani A, Dehghan Nayeri F (2015) An improved method for extraction of high-quality total RNA from oil seeds. Biotechnol. Lett. 37: 927-933.

Sansen S, Yano JK, Reynald RL, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF (2007) Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. J. Biol. Chem. 282: 14348-14355.

Saxena A, Singh P, Yadav DK, Sharma P, Alam S, Khan F, Thul ST, Shukla RK, Gupta V, Sangwan NS (2013) Identification of cytochrome P450 heme motif in plants proteome. Plant Omics J. 6(1): 1-12.

Tsai SC, Liu YC, Li CP, Huang TS, Lee CC (2006) Sesamin inhibits vascular endothelial cell growth and angiogenic activity of lung adenocarcinoma cells. J. Cancer Mol. 2: 199-205.

Wahid OARA, El-Bramawy MAS (2007) Resistance of some sesame (*Sesamum indicum* L.) collections against root rot disease (*Rhizoctonia solani* Kühn) under field conditions. *J. Plant Prot.* Res. 47: 321-327.

Wang L, Li P, Zhang W, Wang X, Qi X, Zhang X, Zhang Y (2013) Variation of sesamin and sesamolin contents in sesame cultivars from China. Pak. J. Bot. 45(1): 177-182.

Wei X, Liu K, Zhang Y, Feng Q, Wang L, Zhao Y, Li D (2015) Genetic discovery for oil production and quality in sesame. Nat. Commun. 6: 8609-8618.

Wong, ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 39:1-75.