

مطالعه گوگردزدایی زیستی و تغییر بیان برخی ژن‌های مرتبط با آن

در کشت سوسپانسیون توتون (*Nicotiana tabacum*)

Study of biodesulfurization and changes in the expression of some related genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) suspension culture

سمیرا ملکی^۱، خدیجه باقری^{۲*}، سیده مهری جوادی^۳، احسان محسنی فرد^۴، ندا زند^۴

۱- دانشجوی دکتری گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲- دانشیاران، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳- استادیار، گروه پژوهشی میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی سازمان جهاد دانشگاهی، دانشگاه

شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- محقق، تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، آموزش و

ترویج کشاورزی، زنجان، ایران

Maleki S¹, Bagheri Kh^{*2}, Javadi SM³, Mohsenifard E², Zand N⁴

1- PhD Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

2- Associate Professors, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

3- Assistant Professor, Research Group on Petroleum Microbiology, Research Institute of Applied Basic Sciences, Shahid Beheshti Branch, ACECR, Tehran, Iran

4- Researcher, Department of Plant Production, Zanjan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۴)

چکیده

گوگردزدایی از سوخت‌های فسیلی به منظور کاهش انتشار آلاینده‌های زیست‌محیطی، یکی از چالش‌های پیشروی صنعت پالایش نفت محسوب می‌شود. این مطالعه به بررسی پتانسیل سیستم کشت سوسپانسیون سلولی توتون در فرآیند گوگردزدایی زیستی و سازوکارهای مولکولی پاسخ به دی‌بنزوتیوفن (DBT) به عنوان مدل ترکیبات گوگردی پرداخت. سلول‌های سوسپانسیونی در محیط کشت فاقد گوگرد با غلظت‌های ۰، ۳۰ و ۲۰۰ ppm از DBT تیمار و در بازه‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت نمونه‌برداری شدند. تغییرات بیان ژن‌های کلیدی مسیر متابولیسم گوگرد، شامل ATP سولفوریلاز ۲ (APS2)، سولفیت اکسیداز (SO)، ناقل سولفات (SULTR) و APS کیناز ۳ (APK3)، با استفاده از روش Real-time PCR کمی تحلیل شد. بیان ژن APS2 در تمامی تیمارها کاهش معناداری نشان داد و بیان ژن SULTR نیز عمده‌تاً کاهش یافت، به جز در زمان ۲۴ ساعت با غلظت ۳۰ ppm که افزایش اندکی ثبت شد. الگوی بیان ژن SO در مقایسه با شاهد تغییر محسوسی نداشت، در حالی که ژن APK3 در اکثر تیمارها به ویژه در زمان‌های طولانی‌تر (۲۴ و ۴۸ ساعت)، افزایش بیان را نشان داد. در مجموع، کشت سوسپانسیون سلولی توتون قادر به درک حضور منابع گوگرد غیرمتعارف بوده و از طریق تنظیم مناسب مسیرهای متابولیکی گوگرد به آن واکنش نشان می‌دهد. از این رو، این سامانه می‌تواند به عنوان یک مدل گیاهی مناسب برای مطالعه فرآیند گوگردزدایی زیستی و نیز کاربردهای مهندسی متابولیک مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

APS کیناز ۳

ATP سولفوریلاز ۲

Real-time PCR

سولفیت اکسیداز

ناقل‌های سولفات

مقدمه

نفت خام به عنوان یکی از مهم ترین منابع انرژی جهان، نقش حیاتی در تامین تقاضای روزافزون انرژی ایفاء می کند (Tripathi and Singh 2021). با این حال، وجود ترکیبات گوگردی در این ماده حیاتی و فرآورده های حاصل از آن، چالش های زیادی برای صنعت پالایش و محیط زیست ایجاد کرده است (Choi et al. 2022; Mohammed et al. 2024). احتراق این ترکیبات، منجر به انتشار اکسیدهای گوگرد (SO_x) می شود که عامل اصلی باران های اسیدی، آلودگی هوا و مشکلات تنفسی در انسان ها هستند. در پاسخ به این معضل، مقررات سختگیرانه ای در سطح جهانی برای کاهش میزان گوگرد در سوخت ها وضع شده است (Pant et al. 2012; Mohammed et al. 2024). در میان ترکیبات گوگردی، گونه های مقاوم و آروماتیک مانند دی بنزوتیوفن^۱ (DBT) و مشتقات آن، به دلیل ساختار شیمیایی پایدار، به سختی توسط فرآیند صنعتی متداول گوگردزدایی هیدروژنی^۲ (HDS) حذف می شوند (Babich and Moulijn 2003; Srivastava 2012; Mohebbali and Ball 2016). این محدودیت، نیاز مبرمی به توسعه روش های مکمل و کارآمد را آشکار ساخته است. در این میان، گوگردزدایی زیستی^۳ (BDS) به عنوان یک فناوری نوین، پایدار و دوستدار محیط زیست، توجهات فراوانی را به خود جلب کرده است (Sadare et al. 2017). گوگردزدایی زیستی با بهره گیری از توانایی ذاتی میکروارگانیسم ها یا سیستم های زیستی در تجزیه هدفمند ترکیبات گوگردی، در شرایط دما و فشار ملایم و بدون نیاز به گاز هیدروژن پرهزینه عمل می کند و از این رو، از دیدگاه اقتصادی و اکولوژیکی حائز اهمیت است (Mohebbali and Ball 2016). از سوی دیگر، گیاه پالایی^۴ به عنوان شاخه ای امیدوارکننده در علوم زیست محیطی، بر قابلیت ذاتی گیاهان در جذب، تجزیه و سم زدایی آلاینده ها استوار است (Sharma et al. 2014). در این حوزه، کشت بافت و سلول های گیاهی ابزاری قدرتمند برای مطالعه سازوکارهای مولکولی حذف آلاینده ها محسوب می شوند، چرا که امکان بررسی این فرآیندها را بدون پیچیدگی های گیاه

¹ Dibenzothiophene² Hydrodesulfurization³ Biodesulfurization⁴ Phytoremediation

کامل فراهم می آورند. سیستم هایی نظیر کالوس و سوسپانسیون های سلولی با حذف موانع فیزیکی، بستر ایده آلی برای پژوهش های پایه و کاربردی ایجاد کرده اند (Doran 2009; Couselo et al. 2012). در این میان، گیاه توتون با پیشینه طولانی به عنوان مدل گیاهی در کشت بافت و مهندسی ژنتیک، پتانسیل قابل توجهی در فرآیندهای گیاه پالایی از خود نشان داده است (Zamani 2010). برای نمونه، سلول های توتون توانایی حذف آلاینده های آلی مانند بنزوفنون و بیسفنول A را دارند (Shimoda et al. 2009). همچنین، با بهره گیری از مهندسی ژنتیک، کالوس های تراریخت توتون بیان کننده ژن *MerB* برای تجزیه متیل جیوه و پالایش محیط ایجاد شده اند (Nagata et al. 2010). گوگرد علاوه بر نقش آلاینده گی، یک عنصر ضروری برای متابولیسم گیاهان محسوب می شود و در ساختار ترکیبات حیاتی مانند اسیدهای آمینه (سیستئین و متیونین)، کوآنزیم ها و متابولیت های ثانویه نقش اساسی ایفاء می کند (Nakajima et al. 2019; Alvi et al. 2023). مسیرهای پیچیده جذب (از طریق ناقل های سولفات موسوم به *SULTR*)، احیاء و ادغام گوگرد در متابولیسم گیاهان به خوبی مطالعه شده است (Kataoka et al. 2004; Wang et al. 2021). آنزیم های کلیدی مانند ATP سولفوریلاز (*ATPS*) اولین گام را در مسیر کاهش کاتالیز می کنند (Kopriva et al. 2009). آدنوزین ۵'-فسفوسولفات (*APS*) حاصل از این واکنش، می تواند به سمت تولید سیستئین (توسط *APS* ردوکتاز) پیش برود یا توسط *APS* کیناز (*APK*) برای سولفوریلایسون متابولیت های ثانویه به ۳'-فسفوآدنوزین ۵'-فسفوسولفات (*PAPS*) تبدیل شود (Kopriva 2006; Mugford et al. 2009). آنزیم میتوکندریایی سولفیت اکسیداز (*SO*) به عنوان کاتالیزور مرحله نهایی کاتابولیسم اکسیداتیو سیستئین عمل کرده و سولفیت را به سولفات اکسید می کند (Hille 2023; Mendel and Schwarz 2023). مطالعات ترنسکریپتومیکس روی گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* نشان داده که مواجهه با DBT می تواند بیان ژن های کلیدی متابولیسم گوگرد را به طور قابل توجهی تغییر دهد (Yaqoub 2013).

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی پتانسیل کشت سوسپانسیون توتون در فرآیند گوگردزدایی زیستی طراحی شد. بدین منظور، الگوی

ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری (حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط) انتقال یافته و در شیکر انکوباتور (۱۲۰ rpm، $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ، تاریکی) قرار گرفتند. سوسپانسیون سلولی هر ۳ هفته با نسبت ۱:۳ (v/v) در محیط تازه واکشت گردید. محیط کشت عاری از گوگرد (SFM)^۱، کلیه ترکیبات حاوی گوگرد در محیط MS با ترکیبات مشابه فاقد گوگرد جایگزین می شوند تا نیازهای تغذیه ای گیاه را بدون حضور این عنصر تأمین کنند. ترکیبات تشکیل دهنده محیط SFM (برحسب mg/l) در جدول ۱ ارائه شده است:

¹ Naphthalene Acetic Acid

² Sulfur-Free MS Medium

جدول ۱- مقادیر عناصر مورد استفاده در تهیه محیط کشت SFM با غلظت ۱X

SFM Component	Concentration (mg/l)
Macronutrient stock 1X	
Ammonium Nitrate (NH_4NO_3)	۱۶۵۰
Calcium Chloride, Anhydrous (CaCl_2)*	۳۳۲/۲۰
Magnesium Chloride, Anhydrous (MgCl_2)*	۱۴۲/۹۳۰
Potassium Nitrate (KNO_3)	۱۹۰۰
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous (KH_2PO_4)	۱۷۰
Micronutrient stock 1X	
Copper II Chloride, Anhydrous (CuCl_2)*	۰/۰۱۳
Cobalt Chloride, Hexahydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	۰/۰۲۵
Boric Acid (H_3BO_3)	۶/۲
Zinc Chloride, Anhydrous (ZnCl_2)*	۴/۰۸۰
Manganese Chloride, Tetrahydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)*	۱۹/۷۹
Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	۰/۲۵
Potassium Iodide (KI)	۰/۸۳
Iron stock 1X	
Iron III Chloride, Anhydrous (FeCl_3)*	۱۶/۲۲
EDTA, Disodium, Dihydrate ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	۳۷/۲۶۰
Vitamines stock 1X (Tissue Culture)	
Nicotinic acid (B_3)	۱
Pyridoxine-HCL (B_6)	۱
Glycine	۲

ماده های علامت دار با ستاره (*) به دلیل جلوگیری از تداخل گوگرد در محیط، با ماده ای فاقد گوگرد جایگزین شدند.

بیان ژن های کلیدی متابولیسم گوگرد، شامل APS2 (از خانواده APS)، *SULTR*، *SO*، *APK3* و *ATPS* (از خانواده کیناز) در پاسخ به مواجهه با DBT بررسی می شود.

مواد و روش ها

در این مطالعه، بذور توتون (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) پس از استریل سازی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۳ درصد (v/v) و شستشو با آب مقطر استریل، در محیط کشت پایه MS (حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۸ گرم بر لیتر آگار و pH=۵/۸) کشت شدند. گیاهچه های حاصل پس از ۶-۸ هفته نگهداری در شرایط کنترل شده (دمای $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ، شدت نور ۱۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی) برای تهیه ریزنمونه های برگي مورد استفاده قرار گرفتند. جهت القای کالوس، نمونه های برگي (۱-۰/۵ سانتی متر) به محیط کشت MS + 0/5 mg/l

cDNA، یک میکروگرم از RNA با آنزیم DNase I (کد محصول: MO5402، شرکت ندای فن، ایران) تیمار شد تا آلودگی DNA ژنومی حذف گردد. سنتز cDNA با یک میکروگرم RNA و با استفاده از کیت سنتز cDNA (کد محصول: YT4500، یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام شد.

با در نظر گرفتن نوآوری پژوهش حاضر و نبود پیشینه‌ای در مورد ژن‌های کلیدی فرآیند گوگردزدایی زیستی، ژن‌های مؤثر در متابولیسم گوگرد که در برگ گیاه مدل *A. thaliana* بیان می‌شوند، بر پایه ویژگی‌های ثبت‌شده در پایگاه UniProt انتخاب شدند. توالی ژن‌های کاندید (شامل *SULTR*، *APK3*، *APS2* و *SO*) از Genbank دریافت شد. شناسایی و استخراج توالی‌های همولوگ این ژن‌ها در گیاه توتون نیز با استفاده از ابزار tBLASTn انجام پذیرفت. همزمان، توالی ژن *Actin* از همین گونه به عنوان ژن کنترل داخلی^۱ برای نرمال‌سازی داده‌های بیان نسبی، از پایگاه NCBI اخذ شد (Wawrzyńska et al. 2005; Wawrzyńska et al. 2010; Li et al. 2020; Cheng et al. 2024). در مرحله بعد، طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر هر یک از ژن‌ها با ابزار Primer3Plus انجام پذیرفت. اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده با بهره‌گیری از ابزار Primer-BLAST در پایگاه NCBI تأیید شد (جدول ۲). در نهایت سنتز تمامی الیگونوکلوئوتیدها توسط شرکت زیست‌فناوری (پیشگام، ایران) صورت گرفت.

برای انجام واکنش‌های Real-Time PCR، از دستگاه Bioneer-ExicyclerTM96 و کیت SYBR Green qPCR MasterMix 2X (کد محصول: YT2551، یکتا تجهیز آزما، ایران) استفاده شد. مخلوط واکنش با ترکیب ۵ میکرولیتر از مخلوط 2X SYBR Green qPCR، ۰/۲ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیش‌رو^۲ و پس‌رو^۳ (با غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۱/۵ میکرولیتر از cDNA (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم) و آب مقطر استریل تا حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر آماده‌سازی شد. برنامه‌ی چرخه دمایی - زمانی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه تنظیم شد.

برای تهیه محلول ذخیره DBT ابتدا ۰/۱ گرم از ماده جامد DBT در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول خالص حل شد تا محلولی با غلظت ppm ۱۰۰۰۰ حاصل گردد. انتخاب اتانول به‌عنوان حلال، به‌دلیل نامحلول بودن DBT در آب و حلالیت مطلوب آن در محیط اتانولی بود. فرآیند انحلال تحت شرایط دمایی ۳۷°C و هم‌زدن مداوم با سرعت rpm ۱۸۰ به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه انجام شد تا اطمینان از حل شدن کامل ماده حاصل شود.

کالوس‌های توتون به قطعات ۵۰-۱۰۰ میلی‌گرمی تقسیم شده و در مجموع ۲ گرم کالوس در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع SFM حاوی ۰/۵ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l Kinetin کشت شدند. غلظت‌های مختلف DBT شامل ۰-۴۰۰-۲۰۰-۳۰۰ ppm در سه تکرار استفاده شدند. کشت‌ها در شیکر انکوباتور با سرعت rpm ۱۲۰، دمای ۲۳ ± ۲°C و در شرایط تاریکی کامل نگهداری شدند. نمونه‌برداری از کالوس‌ها در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با DBT انجام شد و نمونه‌ها بلافاصله برای آنالیز Real-Time PCR آماده‌سازی شدند. همچنین به موازات آزمایش اصلی، زنده‌مانی سلول‌ها در گستره غلظتی ۰ تا ۱۰۰ ppm از DBT ارزیابی شد. نمونه‌های تیمار شده با DBT (در غلظت‌های ۰، ۳۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ ppm) به محیط کشت SFM منتقل شدند و تغییرات مورفولوژیکی در بازه‌های زمانی ۱۰، ۱۵ و ۳۰ روز پس از انتقال، مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور استخراج RNA، نمونه‌های کالوس در نیتروژن مایع با استفاده از هاون چینی پودر شدند. استخراج RNA کل با کیت RNX-Plus (کد محصول: EX6101، سیناکلون، ایران) انجام شد. برای حذف کامل پروتئین‌ها و DNA ژنومی، مرحله کلروفرم تکرار شد و در نمونه‌های دارای آلودگی پلی‌ساکاریدی، تخلیص مجدد با لیتیم کلرید ۸ مولار صورت گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با اسپکتروفتومتر NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) ارزیابی شد. معیارهای خلوص شامل نسبت‌های A_{260}/A_{280} در محدوده ۲/۰ - ۱/۸ و A_{260}/A_{230} بیشتر از ۲ بود. یکپارچگی RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و مشاهده باندهای واضح rRNA (۲۸S و ۱۸S) و عدم حضور اسمیر ارزیابی شد. پیش از سنتز

^۱ Internal control gene

^۲ Forward

^۳ Reverse

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در Real-Time PCR برای تکثیر ژنهای *SULTR*، *APK3*، *APS2*، *SO* و *Actin*.

طول قطعه تکثیر شونده (bp)	GC %	دمای اتصال °C	طول آغازگر	توالی (3' → 5')	شناسه دسترسی	نام ژن هدف
100	41	60	22	Fw AGATGTGCTTTTGAACAACCTGG	XM_016627474.1	<i>SULTR</i>
	48	60	23	Rev TCTCACCTTCTCTGTATACAGCC		
169	53	60	21	Fw ATTCTCCGCCCTTGTCTCACT	XM_016645764.1	<i>APK3</i>
	48	60	23	Rev AGAAAGCGTTATCCCTCCTGTGA		
90	48	60	23	Fw CCTCCAGATGGTTTTATGTGTCC	XM_016598148.2	<i>APS2</i>
	50	60	20	Rev AGAGTTTTGTACGCCGTCCT		
168	55	60	20	Fw TCCACAGAGTGC GGAGATAG	XM_016619757.2	<i>SO</i>
	55	60	20	Rev GCCCAACACATGAACACAGC		
112	55	60	20	Fw CGCATCCCTTAGCACATTCC	NM_001425880.1	<i>Actin</i>
	45	60	22	Rev AGTAAAAATAGCAGCACC GCCT		

در ادامه، ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشت سازی در ۹۵°C به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در ۶۰°C به مدت ۱۵ ثانیه و تکثیر در ۷۲°C به مدت ۲۵ ثانیه اجرا شد. بررسی بیان ژنهای هدف در سه تکرار زیستی و دو تکرار تکنیکی برای هر تیمار انجام شد. پس از اتمام واکنش، به منظور بررسی اختصاصیت محصولات PCR و شناسایی احتمالی دایمرهای آغازگر، منحنی ذوب در دمای ۵۰ تا ۹۵°C ترسیم شد. آنالیز بیان ژن ها با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد (Livak and Schmittgen 2001). آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار Excel 2021 و به کارگیری آزمون t-test برای هر تیمار با گروه شاهد انجام شد. سطح معنی داری برای آزمون ها در دو سطح ۵ و ۱ درصد در نظر گرفته شد.

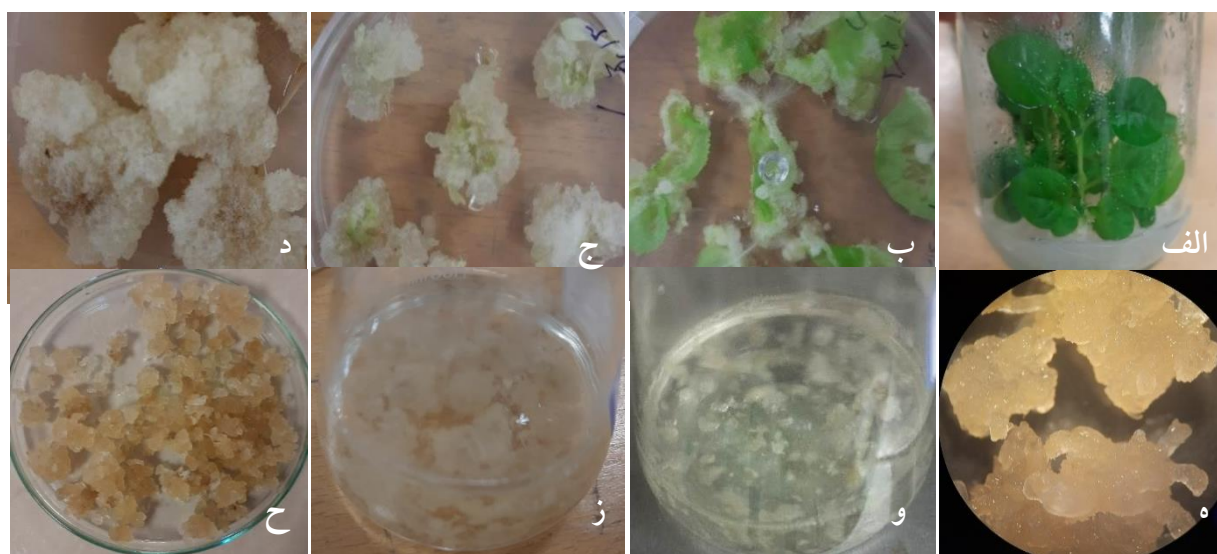
نتایج و بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که محیط کشت MS حاوی غلظت های متعادل NAA و Kinetin (هر کدام با غلظت ۱ mg/l) به طور مؤثری القای کالوس را از لبه ریزنمونه های برگ ری رقم *Xanthi* در بازه هفته دوم تا سوم پس از کشت امکان پذیر ساخت (شکل ۱-الف). این موفقیت، اصل کلاسیک اسکوگ و میلر مبنی بر ضرورت وجود نسبت مناسب اکسین به سیتوکینین برای القای تقسیم سلولی و تشکیل کالوس را تأیید می کند (Skoog 1957). بازه زمانی مشاهده شده با گزارش های مشابه در توتون همخوانی دارد؛ به طور مثال، در مطالعه ای، القای کالوس در محیطی حاوی ۱ mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BAP نیز حدود ۱۴ روز طول کشید

(Ali et al. 2007). شکل گیری اولیه کالوس های نامنظم از لبه های برشی، پدیده ای متداول است که ناشی از تمایزدایی و تکثیر سلول های این ناحیه در پاسخ مستقیم به آسیب وارده و محرک هورمونی است. این الگوی مکانی با گزارشی بر روی گونه *Nicotiana rustica* که از محیطی مشابه (۱ mg/l NAA و ۱ mg/l Kinetin) استفاده کردند، هم سو است (Toghyani et al. 2016). با این حال، اختلاف در زمان آغاز (یک هفته در مطالعه مذکور در مقابل ۲-۳ هفته در اینجا) به طور محتمل ناشی از تفاوت در گونه/رقم گیاهی، غلظت متفاوت NAA، یا شرایط فیزیکی و شیمیایی خاص محیط های کشت است. یکی از چالش های اصلی در کشت بافت توتون، پدیده قهوه ای شدن ناشی از اکسیداسیون ترکیبات فنولی است که می تواند منجر به نکروز بافت شود (Liu et al. 2024). پروتکل واکشت دوره ای هر ۳ تا ۴ هفته در این مطالعه، به طور مؤثری از تجمع این ترکیبات بازدارنده جلوگیری کرد (شکل ۱-ج و د). این استراتژی با توصیه های استاندارد برای حفظ سلامت کشت های طولانی مدت که بر انتقال بافت ها به محیط تازه قبل از ورود به فاز سکون تأکید دارند، مطابقت دارد. پایداری و یکنواختی مورفولوژیکی مشاهده شده در کالوس ها پس از ۲ تا ۳ دور واکشت، نشان دهنده استقرار یک خط کالوس ژنتیکی پایدار است. این پایداری، پیش نیاز اساسی برای مرحله بعدی، یعنی ایجاد سوسپانسیون سلولی یکنواخت، محسوب می شود. دستیابی به یک سوسپانسیون سلولی با رشد پایدار و یکنواخت، دستاورد کلیدی این پژوهش بود (شکل ۱-۱)

بازدارنده‌ای که سلول‌ها ترشح می‌کنند. اهمیت این مدیریت به‌ویژه در فاز رشد خطی کشت‌های سوسپانسیون آشکار است، جایی که مطالعات نشان داده‌اند تقسیم سلولی می‌تواند به دلیل کمبود منابع (مانند هورمون اکسین) محدود شود (Koens et al. 1995). بنابراین، واکشت منظم نه تنها تراکم سلولی مطلوب را حفظ می‌کند، بلکه پایداری و قابلیت تکرارپذیری سیستم را به‌عنوان یک ابزار تحقیقاتی تضمین می‌نماید (شکل ۱)

و). موفقیت در این مرحله مستقیماً وابسته به کیفیت و یکنواختی کالوس‌های اولیه شکننده بود. زمان‌بندی دقیق واکشت هر سه هفته یکبار، عاملی تعیین‌کننده در حفظ رشد پایدار این سوسپانسیون بود (شکل ۱- ز و ح). این بازه بهینه، با جلوگیری از ورود کشت به فاز سکون، دو چالش عمده را مدیریت می‌کند: اول، تأمین مجدد مواد مغذی و هورمون‌های ضروری که در حین رشد مصرف می‌شوند، و دوم، رقیق‌سازی و حذف متابولیت‌های



شکل ۱- مراحل مختلف کالوس‌زایی و کشت سوسپانسیون در توتون؛ الف) گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط درون‌شیشه‌ای، ب) تشکیل کالوس اولیه از لبه‌های ریزنمونه‌های برگ‌ی ۲-۳ هفته پس از کشت، ج) کالوس‌های توسعه‌یافته پس از یک ماه کشت، د و ه) کالوس‌های کاملاً توسعه‌یافته، دو ماه پس از کشت، و) کشت اولیه کالوس در محیط سوسپانسیونی در روز اول، ز و ح) رشد و تکثیر کالوس‌ها سه هفته پس از انتقال به محیط سوسپانسیونی.

اثر DBT یک ترکیب آلی گوگرددار سه‌حلقه‌ای (Ho 2004) به‌عنوان یک منبع احتمالی گوگرد در محیط کشت سوسپانسیون سلولی توتون، درک ما از سازگاری سلول‌های گیاهی با منابع گوگرد غیرمتعارف را گسترش می‌دهد.

تفسیر یافته‌های کلیدی این مطالعه سازوکارهای احتمالی جالبی را در تعامل سلول‌های گیاهی با DBT آشکار می‌سازد. در غلظت پایین (۳۰ ppm)، DBT موجب القای تغییر شکل کالوس‌ها از ساختاری نامنظم به ساختار کروی و سازمان‌یافته همراه با تغییر رنگ به کرم-قهوه‌ای شد (شکل ۲- ح و خ). این پدیده می‌تواند نشان‌دهنده فعال‌شدن مسیرهای تمایز سلولی و تجمع ترکیبات ثانویه فنولی باشد، مشابه پاسخی که کالوس‌ها به محرک‌های محیطی یا الیستورهای شیمیایی نشان می‌دهند. در مقابل، در

گوگرد یکی از عناصر ضروری برای ساختار و عملکرد سلول‌های گیاهی به شمار می‌رود. این عنصر در ترکیب آمینواسیدهای حاوی گوگرد مانند سیستئین و متیونین، کوآنزیم‌هایی نظیر کوآنزیم A و همچنین آنتی‌اکسیدان کلیدی گلوتاتیون (GSH) نقش بنیادین دارد (Hatzfeld et al. 1998). در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای، کمبود گوگرد به سرعت موجب کاهش ذخایر این ترکیبات، افزایش استرس اکسیداتیو و در نهایت نکروز سلولی می‌شود. مطالعات پیشین بر روی سلول‌های توتون نشان داده‌اند که انتقال سولفات به شدت تحت تاثیر وضعیت تغذیه گوگرد قرار داشته و در شرایط کمبود، نرخ انتقال آن تا ۱۰ برابر افزایش می‌یابد (Smith 1980). در چنین شرایطی، تأمین یک منبع گوگرد قابل دسترس برای بقا و رشد سلول‌ها ضروری است. مطالعه حاضر با بررسی

غلظت‌های بالاتر (۶۰-۱۰۰ ppm)، DBT نقش محافظتی بارزی ایفاء کرده و از بروز نکروز جلوگیری نمود. این اثر نجات‌بخش به احتمال قوی ناشی از تأمین گوگرد مورد نیاز برای بیوسنتز مولکول‌های دفاعی حیاتی مانند گلوتاتیون (GSH) است. گلوتاتیون که اصلی‌ترین آنتی‌اکسیدان درون سلولی محسوب می‌شود، برای خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ضروری است و وابستگی سنتز آن به گوگرد به خوبی مستند شده است (Noctor et al. 2014). الگوی زمانی مشاهده‌شده در بروز نکروز جزئی نیز سازوکار عمل وابسته به غلظت DBT را تقویت می‌کند؛ به‌طوری که تأخیر در ظهور نکروز در تیمار ۸۰ ppm (روز ۱۵) نسبت به ۶۰ ppm (روز ۱۵)، نشان می‌دهد که غلظت‌های بالاتر با فراهم آوردن ذخایر متابولیکی بیشتر (مانند پیش‌سازهای آمینواسیدی یا آنتی‌اکسیدانی)، مدت زمان تحمل سلول‌ها به تنش حاصل از کمبود گوگرد را افزایش می‌دهند. در نهایت، واکنش کالوس‌ها پس از انتقال به محیط کشت کامل (MS)، نقش کلیدی DBT در تأمین نیازهای پایه برای تکثیر سلولی را تأیید می‌کند. وابستگی مطلق بقای سلول به یک منبع گوگرد با نکروز کامل نمونه‌های شاهد پس از انتقال (فاقد DBT) به وضوح تأیید می‌شود (شکل ۲-ت و ج). حفظ ساختار کروی و تمامیت سلولی در کالوس‌های تیمار شده با ۳۰ ppm در دو هفته اول پس از انتقال به محیط MS علیرغم عدم رشد آشکار نشان از آمادگی متابولیک و قابلیت بقای این سلول‌ها دارد. رشد قابل توجه و تقریباً ۱/۵ برابری این نمونه‌ها پس از ۳۰ روز، به طور قانع‌کننده‌ای اثبات می‌کند که تیمار اولیه با DBT، نیازهای متابولیکی ضروری (احتمالاً از طریق تأمین گوگرد) برای بازیابی و تقسیم سلولی موفقیت‌آمیز را برطرف ساخته است (شکل ۲-ح و خ). یافته اصلی این مطالعه مبنی بر وابستگی بقای سلول به منبع گوگرد، کاملاً با بدیهیات فیزیولوژی گیاهی همسو است. تحقیقات قدیمی‌تر بر روی سلول‌های توتون نشان داده که در شرایط کمبود گوگرد، سطح درون‌سلولی سولفات، سیستین، متیونین و گلوتاتیون به سرعت کاهش می‌یابد (Smith 1980). بنابراین، عملکرد محافظتی DBT در غلظت‌های بالا را می‌توان به توانایی آن در پرکردن این ذخایر حیاتی نسبت داد.

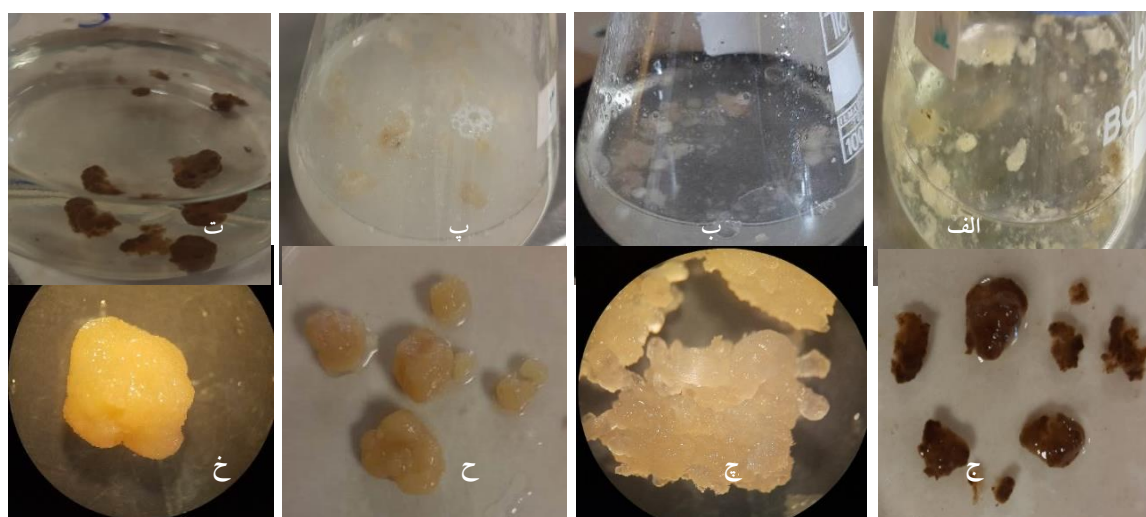
یک سؤال کلیدی در تفسیر نتایج این مطالعه، امکان متابولیسم مستقیم DBT به‌عنوان منبع گوگرد توسط سلول‌های توتون است. مسیرهای شناخته شده برای تجزیه کامل مولکول‌های DBT، مانند مسیر 4S، عمدتاً محدود به باکتری‌های تخصص‌یافته‌ای است که آنزیم‌های کلیدی مانند DBT مونوکسیژناز را دارا هستند (Gallagher et al. 1993). تاکنون شواهد محکمی دال بر وجود چنین سیستم آنزیمی کارآمدی در گیاهان عالی گزارش نشده است. این تناقض ظاهری بین اثرات مشاهده‌شده و نبود مسیر متابولیک شناخته شده، موجب می‌شود تا سازوکارهای غیرمستقیم مورد توجه قرار گیرند. یک احتمال قوی، تجزیه غیرآنزیمی DBT در محیط کشت است. عواملی مانند pH محیط، نور یا واکنش‌های شیمیایی با سایر ترکیبات می‌توانند به تدریج باعث شکستن ساختار DBT و آزادسازی اشکال ساده‌تر و قابل جذب گوگرد، نظیر یون سولفات، شوند. در این سناریو، سلول‌ها نه مستقیماً خود DBT، بلکه محصولات تجزیه آن را جذب و مورد استفاده قرار می‌دهند. روشن‌سازی این سازوکار، چه از طریق ردیابی ایزوتوپ‌های پایدار گوگرد و چه تجزیه شیمیایی محیط کشت، برای درک دقیق‌تر پایه مولکولی یافته‌ها ضروری است.

مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های توتون می‌توانند از آمینواسیدهایی مانند سیستین به عنوان منبع گوگرد استفاده کنند، اما افزودن سیستین نیز مانند سولفات با سازوکار فیدبک منفی، نرخ انتقال سولفات را تا ۸۰ درصد کاهش می‌دهد (Smith 1980). اگر DBT نیز به شکل مشابهی متابولیزه شود، می‌توان انتظار داشت که جذب سولفات را مهار کند. این پدیده می‌تواند یکی از سازوکارهای غیرمستقیم حفاظت سلولی باشد. اگرچه نتایج این مطالعه اثرات سودمند DBT را نشان می‌دهد، اما نباید از این واقعیت غافل شد که DBT یک ترکیب هتروسیکلیک گوگردی آروماتیک چندحلقه‌ای^۱ (PASH) طبقه‌بندی می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که برخی از PASH‌ها، از جمله مشتقات بنزوتیوفن و DBT، می‌توانند دارای اثرات سمی، جهش‌زایی و سرطان‌زایی باشند (Andersson et al. 2006). بنابراین، پاسخ دوگانه مشاهده‌شده (محرک تمایز در غلظت پایین، عامل محافظ در غلظت متوسط) می‌تواند نتیجه تعادل ظریف بین سیگنال‌دهی

¹ Polycyclic Aromatic Sulfur Heterocycles

شد. قابل ذکر است که غلظت ppm ۰ همان نمونه شاهد (کنترل) می‌باشد. بررسی کیفیت RNA با دو روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و سنجش طیف‌سنجی نانودراپ نشان داد که نمونه‌ها از کیفیت و کمیت مطلوبی برای انجام مراحل بعدی برخوردار بودند.

مفید و سمیت بالقوه این ترکیب باشد. تعیین دقیق محدوده غلظتی سودمند و بررسی نشانگرهای استرس اکسیداتیو در آینده ضروری است. استخراج RNA از نمونه‌های کالوس توتون تحت تیمار با DBT در غلظت‌های ۲۰۰-۳۰۰-۰ ppm و در بازه‌های زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت با موفقیت انجام شد، به دلیل عدم موفقیت در استخراج RNA از تیمار ۴۰۰ ppm، این نمونه از مطالعه حذف



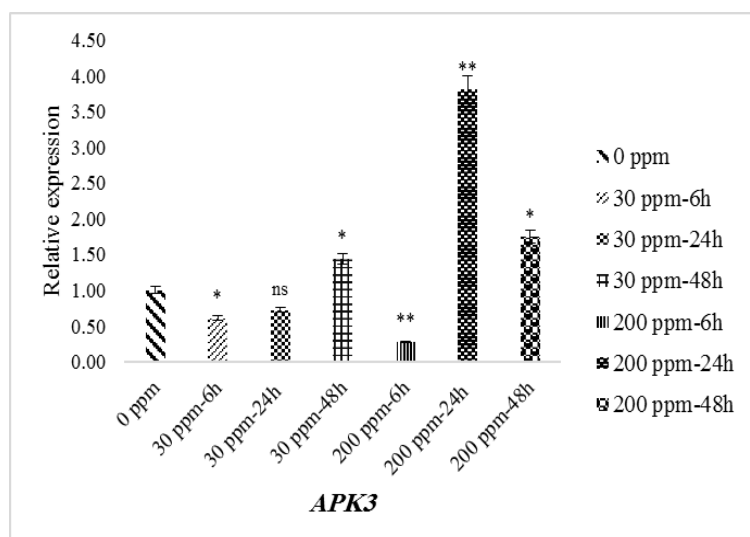
شکل ۲- تأثیر تیمار DBT بر مورفولوژی و بقای سلول‌های توتون؛ (الف) کالوس‌های نامنظم در محیط SFM پیش از تیمار؛ (ب) کالوس‌ها در محیط SFM پس از تیمار ۳۰ ppm؛ (پ) کالوس‌ها در محیط SFM پس از تیمار ۱۰۰ ppm؛ (ت و ج) نکروز کامل در نمونه‌های فاقد گوگرد (۰ ppm)؛ (ج) کالوس معمولی در محیط MS؛ (ح و خ) تشکیل کالوس‌های کروی در تیمار ۳۰ ppm پس از انتقال به محیط MS.

نمونه‌ها در منحنی ذوب پیک‌های واضحی را نمایش دادند و کنترل‌های منفی فاقد پیک بودند که کیفیت و اختصاصی بودن واکنش‌های PCR را تأیید می‌کند. نمودارهای تغییرات بیان با استفاده از نرم‌افزار Excel 2021 (Microsoft, USA) ترسیم شدند. در شرایط کشت سوسپانسیون توتون در محیط SFM و با حضور DBT به عنوان تنها منبع گوگرد، آنالیز qRT-PCR (Real-Time PCR) نشان داد که بیان ژن *APK3* تحت تأثیر غلظت و زمان تیمار DBT قرار گرفت (شکل ۳). در گیاهان، آنزیم آدنوزین ۵'-فسفوسولفات کیناز (*APK*)، فسفریلاسیون *APS* را برای تولید *PAPS* کاتالیز می‌کند. *PAPS* به عنوان یک دهنده اصلی سولفات برای سولفاتسازی متابولیت‌های ثانویه مهمی مانند گلوکوزینولات‌ها و فیتوسولفوکین‌ها عمل می‌کند. در *Arabidopsis*، ایزوفرم *APK3* یک پروتئین سیتوزولی است و با ایزوفرم‌های کلروپلاستی *APK1* و *APK2* تفاوت دارد (Mugford et al. 2009). نتایج حاضر نشان می‌دهد که پاسخ ژن *APK3* به DBT کاملاً وابسته به غلظت و زمان است. در غلظت ۳۰ ppm، بیان *APK3* پس از ۶ ساعت به طور معنی‌داری به میزان ۱/۶۸ برابر کاهش یافت. پس از ۲۴ ساعت تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (۱/۳۸ برابر کاهش). این روند کاهشی پس از ۴۸ ساعت به افزایش ۱/۴۵ برابری در بیان ژن منجر شد که می‌تواند نشانگر فعال شدن تدریجی یک پاسخ تطبیقی برای استفاده بهینه از منبع محدود گوگرد باشد. این الگوی افزایش تدریجی، مشابه سازوکار تنظیم افزایشی ناقل‌های سولفات با میل پیوند بالا در شرایط کمبود گوگرد است که توسط شبکه‌های تنظیمی مرکزی هماهنگ می‌شود (Sirko et al. 2009). در مقابل، تیمار با غلظت ۲۰۰ ppm یک الگوی سه‌فازی معنی‌دار را آشکار ساخت: کاهش شدید بیان در ۶ ساعت اول (۳/۵۶ برابر)، افزایش چشمگیر در ۲۴ ساعت (۳/۸۱ برابر) و سپس تعدیل نسبی در ۴۸ ساعت (۱/۷۵ برابر).

نتایج حاصل از تیمار DBT در غلظت ۳۰ ppm پس از ۶ ساعت به میزان ۱/۶۸ برابر کاهش یافت. پس از ۲۴ ساعت تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (۱/۳۸ برابر کاهش). این روند کاهشی پس از ۴۸ ساعت به افزایش ۱/۴۵ برابری در بیان ژن منجر شد که می‌تواند نشانگر فعال شدن تدریجی یک پاسخ تطبیقی برای استفاده بهینه از منبع محدود گوگرد باشد. این الگوی افزایش تدریجی، مشابه سازوکار تنظیم افزایشی ناقل‌های سولفات با میل پیوند بالا در شرایط کمبود گوگرد است که توسط شبکه‌های تنظیمی مرکزی هماهنگ می‌شود (Sirko et al. 2009). در مقابل، تیمار با غلظت ۲۰۰ ppm یک الگوی سه‌فازی معنی‌دار را آشکار ساخت: کاهش شدید بیان در ۶ ساعت اول (۳/۵۶ برابر)، افزایش چشمگیر در ۲۴ ساعت (۳/۸۱ برابر) و سپس تعدیل نسبی در ۴۸ ساعت (۱/۷۵ برابر).

همانگی بیان ژن‌ها ایفاء می‌کنند (Sirko et al. 2009). پویایی مشاهده شده در بیان *APK3* همچنین با مفهوم اختلال در همانگی متابولیک تحت شرایط تنش سازگار است (Samuilov et al. 2018) و قابلیت انعطاف‌پذیری متابولیک سلول را نشان می‌دهد. از این منظر، ماهیت سیتوزولی *APK3* (Mugford et al. 2010) می‌تواند به‌عنوان یک سازوکار جبرانی برای حفظ هموستاز گوگرد عمل کرده و انعطاف‌پذیری مشاهده شده در پاسخ به DBT را توجیه کند. در مجموع، این یافته‌ها نه تنها درک ما را از سازوکارهای بنیادی پاسخ گیاهان به منابع جایگزین گوگرد عمیق می‌سازد، بلکه کاربردهای بالقوه‌ای در مهندسی متابولیک برای بهبود کارایی استفاده از گوگرد و افزایش ارزش تغذیه‌ای گیاهان دارد (Sirko et al. 2009).

این الگوی نوسانی بیانگر پیچیدگی تنظیم ژن *APK3* در مواجهه با تنش ناشی از غلظت بالای منبع گوگرد است. کاهش اولیه احتمالاً بازتاب شوک متابولیک اولیه و سرکوب موقت مسیرهای مصرف گوگرد تحت تنش است. افزایش ناگهانی بیان در ۲۴ ساعت ممکن است نیاز فوری سلول به تولید PAPS برای فرآیندهای سولفات‌سازی و سازوکارهای سم‌زدایی را منعکس کند. کاهش مجدد سطح بیان در ۴۸ ساعت، ضمن حفظ سطوح بالاتر از پایه، احتمالاً نشان‌دهنده فعال شدن سازوکارهای بازخورد منفی و برقراری مجدد هموستاز سلولی است. شباهت این الگوی پیچیده با پاسخ‌های مشاهده شده در شرایط کمبود کوتاه‌مدت گوگرد در توتون (Wawrzyńska et al. 2005) تأیید می‌کند که *APK3* بخشی از یک شبکه یکپارچه پاسخ به وضعیت گوگرد است. در این شبکه، فاکتورهای رونویسی مانند SLIM1 نقش محوری در



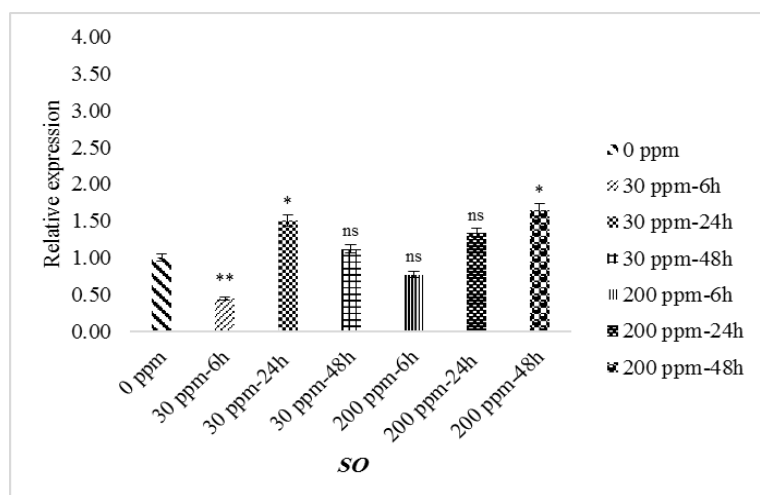
شکل ۳- تغییرات بیان نسبی ژن *APK3*: مقادیر بیان ژن پس از تیمار با غلظت‌های ۰، ۳۰ و ۲۰۰ ppm در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش Real-time PCR. اندازه‌گیری شدند. ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

متابولیسم DBT است (Leustek et al. 2000; Saito 2004). این افزایش در ۴۸ ساعت به سطح پایه بازگشت و تغییر معنی‌داری نشان نداد (۰/۹ برابر) که بیان‌گر ماهیت گذرای این پاسخ است. در غلظت ۲۰۰ ppm، الگوی متفاوتی مشاهده شد. برخلاف ppm ۳۰، کاهش اولیه در ۶ ساعت به سطح معنی‌داری نرسید (۱/۳ برابر). در ۲۴ ساعت نیز تغییر معنی‌داری ثبت نشد (۱/۳۴ برابر کاهش بیان). تنها در ۴۸ ساعت کاهش معنی‌داری به میزان ۱/۶۵ برابر مشاهده گردید که می‌تواند نشان‌دهنده غلبه تدریجی تنش و

پاسخ مولکولی به تیمار DBT در محیط فاقد گوگرد، الگوی بیانی وابسته به غلظت و زمان را برای ژن *SO* نشان داد (شکل ۴). در غلظت ۳۰ ppm، کاهش اولیه معنی‌داری در ۶ ساعت به میزان ۲/۲ برابر مشاهده شد که می‌تواند بازتاب یک پاسخ سریع سرکوب‌گر به حضور DBT در محیط فاقد سولفات باشد. این کاهش اولیه با یک افزایش جبرانی معنی‌دار در ۲۴ ساعت همراه بود (۱/۵۷ برابر) که نشان‌دهنده فعال‌سازی موقت مسیر سمیت‌زدایی سولفیت و تلاش سلول برای مقابله با سولفیت تولیدشده از

محیطی هم‌خوانی دارد (Pfanz 1990; Jolivet et al. 1995a; Jolivet et al. 1995b). چنین انعطاف‌پذیری متابولیکی برای حفظ بقا و عملکرد گیاه در محیط‌های پرنوسان ضروری است. علاوه بر این، الگوی مشاهده‌شده با نقش محافظتی آنزیم SO در شرایط تنش اکسیداتیو یا متابولیک (Johnson and Rajagopalan 1980) و نیز با درک کنونی از مسیرهای کاهشی جذب و متابولیسم گوگرد (Brychkova et al. 2007) سازگاری دارد. نوسان در سطح بیان ژن SO می‌تواند بازتابی از تلاش سلول برای حفظ تعادل بین نیاز به گوگرد برای سنتز متابولیت‌های ضروری (مانند آمینواسیدهای حاوی گوگرد) و نیاز به دفع یا سم‌زدایی ترکیبات گوگردار غیرمعارف مانند DBT باشد.

اختلال در مکانیسم‌های سمیت‌زدایی در مواجهه با غلظت بالای DBT باشد. این الگوی متفاوت بین دو غلظت، وجود آستانه‌ای برای تحمل و پاسخ‌های متمایز مولکولی وابسته به دوز را برجسته می‌کند. همسویی الگوی مشاهده‌شده با عملکرد کلیدی آنزیم SO در متابولیسم گوگرد، به‌ویژه تحت شرایط تنش (Heber and Hueve 1997; Hänsch et al. 2006)، اعتبار نتایج حاضر را تقویت می‌کند. کاهش اولیه در سطح بیان ژن می‌تواند نشان‌دهنده‌ی یک پاسخ تنظیمی یکپارچه به محدودیت گوگرد و/یا حضور یک آنالوگ ساختاری (DBT) باشد. علاوه بر این، توانایی گیاه در تعدیل پویای سطوح بیان این ژن حتی در محیط تنش‌زا، با شواهد پیشین مبنی بر فعال‌شدن مسیرهای متابولیکی جایگزین و سیستم‌های آنزیمی کمکی در مواجهه با چالش‌های



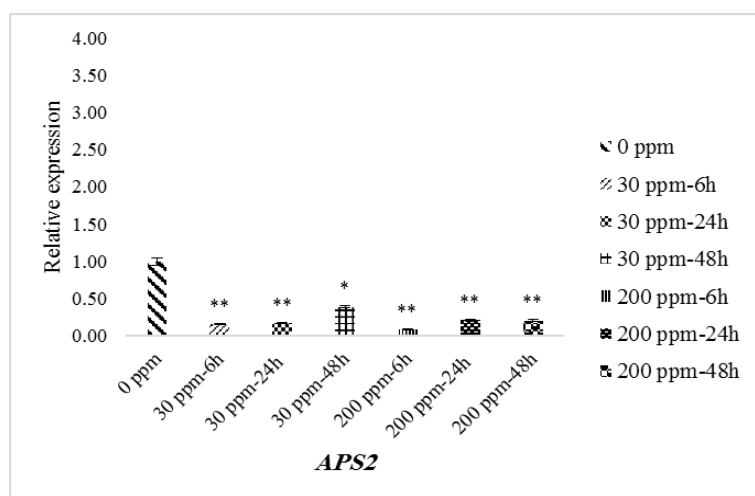
شکل ۴- تغییرات بیان نسبی ژن SO: مقادیر بیان ژن پس از تیمار با غلظت‌های ۰، ۳۰ و ۲۰۰ ppm در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شدند. ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌دار و معنی‌دار بودن در در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

آلی (DBT)، که ممکن است مستقیماً در مسیر اصلی احیای سولفات قرار نگیرد، با کاهش بیان *APS2*، از هزینه‌های سنتز ترکیبات سولفون‌شده ثانویه کاسته و هموستاز گوگرد را حفظ می‌کند. این فرضیه با ماهیت وابسته به غلظت پاسخ همخوانی دارد؛ به‌طوری که غلظت بالاتر (۲۰۰ ppm) DBT کاهش بسیار معنی‌داری در بیان ژن (به ترتیب ۱۲/۲۸، ۴/۹۰ و ۴/۹۹ برابر در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) القا کرد. اگرچه این نتایج با پیچیدگی شناخته‌شده تنظیم متابولیسم گوگرد همسو است. برای مثال، گزارش شده است که بیان ایزوفرم‌های مختلف ATP

یافته‌های حاصل از آنالیز Real-Time PCR در این مطالعه نشان داد که تیمار با DBT به‌عنوان تنها منبع گوگرد منجر به کاهش وابسته به غلظت و زمان در بیان ژن *APS2* می‌شود (شکل ۵). کاهش مشاهده‌شده در بیان *APS2* را می‌توان با نقش متمایز ایزوفرم سیتوزولی آنزیم ATP سولفوریلاز (*APS2*) در متابولیسم گوگرد تفسیر نمود. برخلاف ایزوفرم پلاستیدی *APS1* که مسیر احیای سولفات به سمت بیوسنتز سیستئین را هدایت می‌کند، *APS2* عمدتاً در تولید PAPS در سیتوزول نقش دارد (Ai et al. 2016). بنابراین، به‌نظر می‌رسد سلول‌ها در مواجهه با منبع گوگرد

تمایز و مدل آزمایشی وابسته است. الگوی زمانی پاسخ نیز قابل تأمل است. کاهش بسیار معنی‌داری در میزان مهار در تیمار ۶ ساعته (۶/۷۹ برابر) با غلظت پایین (۳۰ ppm)، می‌تواند حاکی از فعال شدن تدریجی سازوکارهای جبرانی سلول برای بازگرداندن هموستاز یا شروع انطباق متابولیک با DBT باشد. در مقابل، تداوم کاهش شدید بیان پس از ۲۴ ساعت (۶/۱۶ برابر) و ۴۸ ساعت (۲/۵۹ برابر) در غلظت ۳۰ ppm، احتمالاً نشان‌دهنده ظرفیت محدود سلول برای تطابق با این سطح از تنش یا انباشت احتمالی متابولیت‌های واسطه است که سیگنال مهار را تداوم می‌بخشد (Chen et al. 2008; Abin-Fuentes et al. 2013). لازم به ذکر است که استفاده از سیستم کشت سوسپانسیون سلولی، اگرچه کنترل دقیق شرایط آزمایش را ممکن می‌سازد، فاقد پیچیدگی‌های بافت‌شناسی و انتقال سیگنال درون‌ارگانی یک گیاه کامل است و این موضوع می‌تواند توضیح‌دهنده بخشی از تفاوت‌های مشاهده‌شده با مطالعات روی گیاهان کامل باشد (Doran 2009; Couselo et al. 2012).

سولفوریلاز (APS) در طول نمو برگ می‌تواند به صورت متقابل تنظیم شود؛ به گونه‌ای که با افزایش سن برگ، ایزوفرم پلاستییدی کاهش و ایزوفرم سیتوزولی افزایش می‌یابد (Rotte and Leustek 2000). که نشان‌دهنده وجود سازوکارهای ظریف و بافت خاص برای کنترل این مسیر است. اما با برخی گزارش‌های پیشین تفاوت دارد، همانند مطالعه‌ای که افزایش بیان APS2 را در ریشه گیاه چای تحت تیمار سلیوم گزارش کرد (Tao et al. 2011)، که با کاهش مشاهده‌شده در پژوهش حاضر در تضاد است. این تناقض می‌تواند ناشی از تفاوت در سیستم بیولوژیک (گیاه کامل تمایز یافته در مقابل سلول‌های سوسپانسیون تمایز نیافته) و ماهیت محرک (سلیوم به عنوان یک عنصر شبه‌گوگرد در مقابل DBT به عنوان منبع آلی) باشد. نتایج ما همچنین در تضاد با مطالعه‌ای است، که افزایش بیان APS2 و ژن‌های خانواده *SULTR* را تحت تیمار نانوذرات سلیوم نشان داد (Kang et al. 2024)، این تفاوت‌ها به وضوح بر این نکته تأکید دارند که پاسخ شبکه ژنی متابولیسم گوگرد نه تنها به نوع محرک، بلکه به بافت، وضعیت



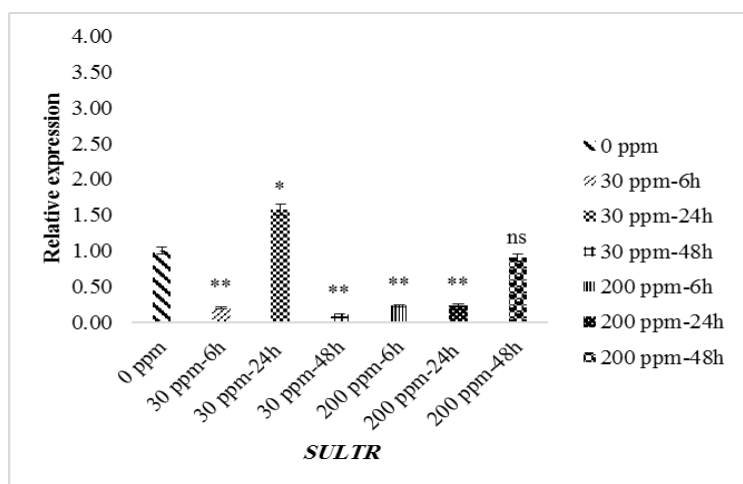
شکل ۵- تغییرات بیان نسبی ژن APS2 مقادیر بیان ژن پس از تیمار با غلظت‌های ۰، ۳۰ و ۲۰۰ ppm در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شدند. ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌دار و معنی دار بودن در در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

اختصاصی و پویا بروز می‌دهد. خانواده‌ی ژن *SULTR* نقش محوری در جذب، توزیع و هموستاز گوگرد در گیاهان ایفاء می‌کند. بیان این ژن‌ها به‌طور پیچیده‌ای توسط وضعیت تغذیه‌ای گوگرد تنظیم می‌شود، به‌طور معمول، کمبود سولفات معمولاً منجر به افزایش بیان ایزوفرم‌های خاصی مانند *SULTR1;1* و

با تحلیل داده‌های حاصل از Real-Time PCR، الگوی بیان وابسته به غلظت و زمان ژن‌های خانواده *SULTR* تحت تیمار DBT به عنوان تنها منبع گوگرد در محیط کشت فاقد گوگرد مشخص گردید (شکل ۶). این نتایج حاکی از آن است که سیستم انتقال سولفات در گیاهان در مواجهه با منبع گوگرد آلی DBT، پاسخی

مطالعات پیشین در *Arabidopsis* تأیید کرده‌اند که ژن‌های خانواده *SULTR* از الگوهای بیان بسیار تخصص‌یافته و نظام‌مندی برخوردارند. برای نمونه، ایزوفرم‌های *Sultr1;1* و *Sultr1;2* که به‌عنوان انتقال‌دهنده‌های با میل بالا در اپیدرم و کورتکس ریشه عمل می‌کنند، مسئول جذب اولیه سولفات از محیط ریزوسفر هستند. با این حال، این دو ایزوفرم از نظر القایپذیری تفاوت دارند؛ به‌طوری که *Sultr1;1* به شدت تحت شرایط کمبود گوگرد القا می‌شود، در حالی که بیان *Sultr1;2* حتی در شرایط غنی از گوگرد نیز پایدار باقی می‌ماند (Yoshimoto et al. 2002). این تمایز تنظیمی می‌تواند به تبیین پاسخ پیچیده و وابسته به غلظت مشاهده‌شده تحت تیمار DBT کمک کند. بنابراین، الگوی وابسته به غلظت DBT ممکن است بازتابی از درگیری رقابتی و متفاوت این ایزوفرم‌ها باشد. به‌عبارت دیگر، ممکن است DBT در غلظت‌های مختلف، سیگنال‌هایی شبیه به «کمبود ظاهری» یا «سمیت» تولید کند که اولویت بیان را بین ایزوفرم‌ها تغییر می‌دهد. علاوه بر این، ایزوفرم‌های درون‌گیاهی مانند *Sultr1;3* که در توزیع سولفات از اندام‌های منبع به مصرف نقش دارند (Yoshimoto et al. 2003)، ممکن است در این پاسخ سیستمیک دخیل باشند و نوسانات مشاهده‌شده را تشدید کنند.

SULTR1;2 در ریشه می‌شود تا جذب سولفات را بهبود بخشد (Honsel et al. 2012). مطالعات گسترده در گونه‌های مختلف، از جمله *Arabidopsis*، براسیکا و گندم، این الگوی پاسخ به کمبود را تأیید کرده و نشان می‌دهند که گیاهان برای حفظ هموستاز گوگرد، یک شبکه‌ی تنظیمی دقیق دارند (Buchner et al. 2004; Puresmaeli et al. 2023). با این وجود، پاسخ این سیستم به منابع گوگرد آلی، به‌ویژه ترکیبات آروماتیک مانند DBT، کمتر مطالعه شده است. در غلظت ۳۰ ppm، سطح بیان ژن پس از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌داری به میزان ۱/۵۷ برابر نشان داد، درحالی که در زمان‌های ۶ و ۴۸ ساعت کاهش‌های بسیار معنی‌داری (به‌ترتیب ۴/۹۸ و ۸/۴۸ برابر) ثبت شد. این الگوی بیان وابسته به زمان و غلظت، دیدگاه جدیدی از انعطاف‌پذیری سیستم انتقال سولفات گیاهان در برابر یک منبع گوگرد غیرمعارف ارائه می‌دهد. در غلظت بالاتر (۲۰۰ ppm)، در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت، کاهش‌های بسیار معنی‌داری به میزان ۴/۳۳ و ۴/۱۸ برابر مشاهده شد که با گزارش افزایش پایدار بیان ژن‌های *SULTR* تحت تیمار نانوذرات سلنیوم (Kang et al. 2024) متفاوت است. این تفاوت نشان‌دهنده سازوکار عمل منحصر به فرد DBT در مسیر گوگردزدایی زیستی است.



شکل ۶- تغییرات بیان نسبی ژن *SULTR*: مقادیر بیان ژن پس از تیمار با غلظت‌های ۳۰، ۲۰۰ و ۴۸ ساعت با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شدند. ns، * و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده غیر معنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

می‌شود. بهبود نسبی بقای سلول‌ها و کاهش شدت نکروز در تیمارهای حاوی DBT حاکی از آن است که این ترکیب می‌تواند تا حدودی پیامدهای ناشی از تنش کمبود گوگرد را تعدیل نماید.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که کشت سوسپانسیون سلولی توتون در مواجهه با DBT دچار تغییرات فیزیولوژیک و مولکولی

گیاهی تأکید دارد. با وجود این یافته‌ها، سازوکارهای دقیق دخیل در جذب، متابولیسم یا سمیت‌زدایی DBT در گیاهان عالی همچنان ناشناخته است. از این‌رو، انجام مطالعات تکمیلی در سطوح بیوشیمیایی، متابولیک و بهره‌گیری از ردیابی ایزوتوپی برای روشن شدن این مسیرها ضروری به نظر می‌رسد. به‌طور کلی، این پژوهش کارایی سیستم کشت سلولی گیاهی را به‌عنوان مدلی ساده، کنترل‌پذیر و کارآمد برای بررسی پاسخ گیاهان به منابع نوین گوگرد تأیید کرده و چشم‌انداز تازه‌ای را برای مطالعات آتی در این حوزه می‌گشاید.

منابع

Abin-Fuentes A, Mohamed ME-S, Wang DI, Prather KL (2013) Exploring the mechanism of biocatalyst inhibition in microbial desulfurization. *Applied and environmental microbiology* 79:7807-7817.

Ai Q, Liang G, Zhang H, Yu D (2016) Control of sulfate concentration by miR395-targeted APS genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant diversity* 38:92-100.

Ali G, Hadi F, Ali Z, Tariq M, Khan MA (2007) Callus induction and in vitro complete plant regeneration of different cultivars of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) on media of different hormonal concentrations. *Biotechnology* 6:561-566.

Alvi AF, Iqbal N, Albaqami M, Khan NA (2023) The emerging key role of reactive sulfur species in abiotic stress tolerance in plants. *Physiologia plantarum* 175: e13945.

Andersson JT, Hegazi AH, Roberz B (2006) Polycyclic aromatic sulfur heterocycles as information carriers in environmental studies. *Analytical and bioanalytical chemistry* 386:891-905.

Babich I, Moulijn J (2003) Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: a review☆. *Fuel* 82:607-631.

Brychkova G, Xia Z, Yang G, Yesbergenova Z, Zhang Z, Davydov O, Fluhr R, Sagi M (2007) Sulfite oxidase protects plants against sulfur dioxide toxicity. *The Plant Journal* 50:696-709.

Buchner P, Stuijver CEE, Westerman S, Wirtz M, Hell Rd, Hawkesford MJ, De Kok LJ (2004) Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiology* 136:3396-3408.

Chen H, Zhang WJ, Cai YB, Zhang Y, Li W (2008) Elucidation of 2-hydroxybiphenyl effect on dibenzothiophene desulfurization by *Microbacterium* sp. strain ZD-M2. *Bioresour Technol* 99:6928-6933.

به‌نظر می‌رسد DBT به‌عنوان یک منبع غیرمعارف گوگرد، توانایی فعال‌سازی پاسخ‌های سلولی جایگزین را دارد. در سطح مولکولی، تغییرات بیان ژن‌های کلیدی متابولیسم گوگرد، پویایی این شبکه تنظیمی را در برابر DBT آشکار می‌سازد. کاهش بیان ژن‌های دخیل در جذب و فعال‌سازی سولفات (مانند *APS2*) در کنار افزایش بیان ژن *APK3* نشان‌دهنده تغییر اولویت‌های متابولیکی سلول به سمت حفظ هموستاز و سازگاری با شرایط جدید است. همچنین وابستگی این پاسخ‌های رونویسی به غلظت و مدت تیمار، بر پیچیدگی و حساسیت سامانه تنظیم گوگرد در سلول

Cheng J, Zhang Z, Gao Y, Dong Y, Xian X, Li C, Ding L, Wang Y (2024) Overexpressing ATP Sulfurylase Improves Fe-Deficiency Tolerance in Apple Calli and Tobacco. *Agronomy* 14:404.

Choi AES, Roces SA, Dugos NP, Wan MW (2022) Ultrasound assisted oxidative desulfurization: A comprehensive optimization analysis using untreated diesel oil. *Computers & Chemical Engineering* 166:107965.

Couselo JL, Corredoira E, Vieitez AM, Ballester A (2012) Plant tissue culture of fast-growing trees for phytoremediation research. In: *Plant Cell Culture Protocols*, 247-263.

Doran PM (2009) Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnology and bioengineering* 103:60-76.

Gallagher JR, Olson ES, Stanley DC (1993) Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiology Letters* 107:31-35.

Hänsch R, Lang C, Riebeseel E, Lindigkeit R, Gessler A, Rennenberg H, Mendel RR (2006) Plant sulfite oxidase as novel producer of H₂O₂: combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. *Journal of Biological Chemistry* 281:6884-6888.

Hatzfeld Y, Cathala N, Grignon C, Davidian J-C (1998) Effect of ATP sulfurylase overexpression in bright yellow 2 tobacco cells: regulation Of ATP sulfurylase and SO₄²⁻ transport activities. *Plant Physiology* 116:1307-1313.

Heber U, Hueve K (1997) Action of SO₂ on plants and metabolic detoxification of SO₂. In: *International Review of Cytology*, 255-286. Elsevier.

Hille R (2023) Xanthine oxidase—a personal history. *Molecules* 28:1921.

Ho TC (2004) Deep HDS of diesel fuel: chemistry and catalysis. *Catalysis Today* 98:3-18.

Honsel A, Kojima M, Haas R, Frank W, Sakakibara H, Herschbach C, Rennenberg H (2012) Sulphur limitation and early sulphur deficiency responses in poplar:

- significance of gene expression, metabolites, and plant hormones. *Journal of experimental botany* 63:1873-1893.
- Johnson JL, Rajagopalan K (1980) The oxidation of sulphite in animal systems. In: *Proceedings of Ciba Foundation Symposium 72-Sulphur in Biology*.
- Jolivet P, Bergeron E, Meunier J-C (1995a) Evidence for sulphite oxidase activity in spinach leaves. *Phytochemistry* 40:667-672.
- Jolivet P, Bergeron E, Zimierski A, Meunier J-C (1995b) Metabolism of elemental sulphur and oxidation of sulphite by wheat and spinach chloroplasts. *Phytochemistry* 38:9-14.
- Kang Y, Qin H, Wang G, Lei B, Yang X, Zhong M (2024) Selenium nanoparticles mitigate cadmium stress in tomato through enhanced accumulation and transport of sulfate/selenite and polyamines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 72:1473-1486.
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16:2693-2704.
- Koens K, Nicoloso F, Van Vliet TB, Harteveld M, Boot C, Van Iren F, Mulder P, Libbenga K, Kijne J (1995) Kinetics of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid content in an auxin-dependent suspension culture of *Nicotiana tabacum* cells. *Journal of plant physiology* 147:383-390.
- Kopriva S (2006) Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Annals of botany* 97:479-495.
- Kopriva S, Mugford SG, Matthewman C, Koprivova A (2009) Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Reports* 28:1769-1780.
- Leustek T, Martin MN, Bick J-A, Davies JP (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual review of plant biology* 51:141-165.
- Li Q, Jin C, Wang G, Ji, Guan C, Li X (2020) Enhancement of endogenous SA accumulation improves poor-nutrition stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a SA-binding protein gene. *Plant Science* 292:110384.
- Liu C, Fan H, Zhang J, Wu J, Zhou M, Cao F, Tao G, Zhou X (2024) Combating browning: mechanisms and management strategies in in vitro culture of economic woody plants. *Forestry Research* 4:e032.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods* 25:402-408.
- Mendel RR, Schwarz G (2023) The history of animal and plant sulfite oxidase—a personal view. *Molecules* 28:6998.
- Mohammed AE, Ghani SA, Mohammed WT, Ahmed SM, Aqar DY, Mohammed HR, Ali MM, Mohammed MH, Karakullukcu NT, Hmood HM (2024) Agricultural waste-based microporous catalysts for oxidative desulfurization of highly sour heavy gas oil. *Diamond and Related Materials* 142:110723.
- Mohebbi G, Ball AS (2016) Biodesulfurization of diesel fuels—past, present and future perspectives. *International Biodeterioration & Biodegradation* 110:163-180.
- Mugford SG, Matthewman CA, Hill L, Kopriva S (2010) Adenosine-5'-phosphosulfate kinase is essential for *Arabidopsis* viability. *FEBS letters* 584:119-123.
- Mugford SG, Yoshimoto N, Reichelt M, Wirtz M, Hill L, Mugford ST, Nakazato Y, Noji M, Takahashi H, Kramell R (2009) Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites. *The Plant Cell* 21:910-927.
- Nagata T, Morita H, Akizawa T, Pan-Hou H (2010) Development of a transgenic tobacco plant for phytoremediation of methylmercury pollution. *Applied microbiology and biotechnology* 87:781-786.
- Nakajima T, Kawano Y, Ohtsu I, Maruyama-Nakashita A, Allahham A, Sato M, Sawada Y, Hirai MY, Yokoyama T, Ohkama-Ohtsu N (2019) Effects of thiosulfate as a sulfur source on plant growth, metabolites accumulation and gene expression in *Arabidopsis* and rice. *Plant And Cell Physiology* 60:1683-1701.
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology* 164:1636-1648.
- Pant D, Joshi D, Upreti MK, Kotnala RK (2012) Chemical and biological extraction of metals present in E waste: a hybrid technology. *Waste management* 32:979-990.
- Pfanz H (1990) Detoxification of sulfur dioxide by apoplastic peroxidases. In: *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher plants; Fundamental, Environmental and Agricultural Aspect*, 229-233.
- Puresmaeli F, Heidari P, Lawson S (2023) Insights into the sulfate transporter gene family and its expression patterns in durum wheat seedlings under salinity. *Genes* 14:333.
- Rotte C, Leustek T (2000) Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylsulfate reductase during ontogenesis of *Arabidopsis* leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. *Plant Physiology* 124:715-724.
- Sadare OO, Obazu F, Daramola MO (2017) Biodesulfurization of petroleum distillates—current status, opportunities and future challenges. *Environments* 4:85.
- Saito K (2004) Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology* 136:2443-2450.
- Samuilov S, Brilhaus D, Rademacher N, Flachbart S, Arab L, Alfarraj S, Kuhnert F, Kopriva S, Weber AP, Mettler-Altmann T (2018) The photorespiratory BOU gene mutation alters sulfur assimilation and its crosstalk with carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science* 9:1709.
- Sharma S, Chatterjee S, Datta S, Mitra A, Vairale MG, Veer V, Chaurasia A, Gupta DK (2014) In vitro selection of plants for the removal of toxic metals from contaminated soil: Role of genetic variation in phytoremediation. In: Gupta DK, Chatterjee S (Eds.) *Heavy Metal Remediation Transport and Accumulation in Plants*, 155-177.
- Shimoda K, Hamada H, Hamada H (2009) Phytoremediation of benzophenone and bisphenol A by glycosylation with immobilized plant cells. *Environmental Health Insights* 3:EHI.S897.

- Sirko A, De Kok L, Haneklaus S, Hawkesford M, Rennenberg H, Saito K, Schnug E, Stulen I (2009) Sulfur Metabolism in Plants: Regulatory Aspects, Significance of Sulfur in the Food Chain, Agriculture and the Environment. In: Proceedings of 7th International Workshop on Sulfur Metabolism in Plants.
- Skoog F (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. In: Proceedings of Symp. Soc. Exp. Biol.
- Smith IK (1980) Regulation of sulfate assimilation in tobacco cells: effect of nitrogen and sulfur nutrition on sulfate permease and O-acetylserine sulfhydrylase. *Plant Physiology* 66:877.
- Srivastava VC (2012) An evaluation of desulfurization technologies for sulfur removal from liquid fuels. *Rsc Advances* 2:759-783.
- Toghyani MA, Ehsanpour AA, Shariati M, Emamzadeh R (2016) The study of Auxin and Cytokinin changes and somaclonal variation in regenerated plant and callus of tobacco (*Nicotiana rustica* L.). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)* 29:385-394. (In Farsi).
- Tripathi D, Singh RK (2021) Oxidative desulfurization of dibenzothiophene using cobalt (II) complexes with substituted salen-type ligands as catalysts in model fuel oil. *Catalysis Letters* 151:713-719.
- Wang L, Chen K, Zhou M (2021) Structure and function of an *Arabidopsis thaliana* sulfate transporter. *Nature communications* 12:4455.
- Wawrzyńska A, Lewandowska M, Hawkesford MJ, Sirko A (2005) Using a suppression subtractive library-based approach to identify tobacco genes regulated in response to short-term sulphur deficit. *Journal of experimental botany* 56:1575-1590.
- Wawrzyńska A, Lewandowska M, Sirko A (2010) *Nicotiana tabacum* EIL2 directly regulates expression of at least one tobacco gene induced by sulphur starvation. *Journal of experimental botany* 61:889-900.
- Yaqoub Z (2013) Biocatalyst Development for Biodesulfurization. Dissertation, University of Manchester, United Kingdom.
- Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T, Takahashi H (2003) Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1; 3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131:1511-1517.
- Yoshimoto N, Takahashi H, Smith FW, Yamaya T, Saito K (2002) Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 29:465-473.
- Zamani P (2010) Agronomy and curing of tobacco. Tehran Behandishan, Tehran, Iran. (In Farsi).