ژنتیک نوین
دوره بیستم، شماره٤، زمستان ١٤٠٤
صفحه ٢٨٩ - ٢٧٥

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[1]، خدیجه باقری*[2]، سیده مهری جوادی[3]، احسان محسنی فرد[2]، ندا زند[4]

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

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

٣- استادیار، گروه پژوهشی میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی سازمان جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

٤- محقق، تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران

Maleki S[1], Bagheri Kh*[2], Javadi SM[3], Mohsenifard E[2], Zand N[4]

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: ١٤٠٥/٠١/١٧ - تاریخ پذیرش: ١٤٠٥/٠٤/٢٤)

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 ٠، ٣٠ و ٢٠٠ ppm از DBT تیمار و در بازه‌های ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت نمونه‌برداری شدند. تغییرات بیان ژن‌های کلیدی مسیر متابولیسم گوگرد، شامل *ATP* سولفوریلاز ٢ (*APS2*)، سولفیت اکسیداز (*SO*)، ناقل سولفات (*SULTR*) و APSکیناز ٣ (*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 عمدتاً کاهش یافت، به جز در زمان ٢٤ ساعت با غلظت ٣٠ 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 (٢٤ و ٤٨ 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 به‌عنوان یک مدل گیاهی مناسب برای مطالعه فرآیند گوگردزدایی زیستی و نیز کاربردهای مهندسی متابولیک مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

APSکیناز ٣
***ATP* سولفوریلاز ٢**
Real-time PCR
سولفیت اکسیداز
ناقل‌های سولفات

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

مقدمه

نفت خام به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع انرژی جهان، نقش حیاتی در تامین تقاضای روزافزون انرژی ایفاء می‌کند (Tripathi and Singh 2021). با این حال، وجود ترکیبات گوگردی در این ماده حیاتی و فرآورده‌های حاصل از آن، چالش‌های زیادی برای صنعت پالایش و محیط‌زیست ایجاد کرده است (Choi et al. 2022; Mohammed et al. 2024). احتراق این ترکیبات، منجر به انتشار اکسیدهای گوگرد (SO_x) می‌شود که عامل اصلی باران‌های اسیدی، آلودگی هوا و مشکلات تنفسی در انسان‌ها هستند. در پاسخ به این معضل، مقررات سختگیرانه‌ای در سطح جهانی برای کاهش میزان گوگرد در سوخت‌ها وضع شده است (Pant et al. 2012; Mohammed et al. 2024). در میان ترکیبات گوگردی، گونه‌های مقاوم و آروماتیک مانند دی‌بنزوتیوفن[1] (DBT) و مشتقات آن، به‌دلیل ساختار شیمیایی پایدار، به‌سختی توسط فرآیند صنعتی متداول گوگردزدایی هیدروژنی[2] (HDS) حذف می‌شوند (Babich and Moulijn 2003; Srivastava 2012; Mohebali and Ball 2016). این محدودیت، نیاز مبرمی به توسعه روش‌های مکمل و کارآمد را آشکار ساخته است. در این میان، گوگردزدایی زیستی[3] (BDS) به‌عنوان یک فناوری نوین، پایدار و دوستدار محیط‌زیست، توجهات فراوانی را به خود جلب کرده است (Sadare et al. 2017). گوگردزدایی زیستی با بهره‌گیری از توانایی ذاتی میکروارگانیسم‌ها یا سیستم‌های زیستی در تجزیه هدفمند ترکیبات گوگردی، در شرایط دما و فشار ملایم و بدون نیاز به گاز هیدروژن پرهزینه عمل می‌کند و از این رو، از دیدگاه اقتصادی و اکولوژیکی حائز اهمیت است (Mohebali and Ball 2016). از سوی دیگر، گیاه‌پالایی[4] به‌عنوان شاخه‌ای امیدوارکننده در علوم زیست‌محیطی، بر قابلیت ذاتی گیاهان در جذب، تجزیه و سم‌زدایی آلاینده‌ها استوار است (Sharma et al. 2014). در این حوزه، کشت بافت و سلول‌های گیاهی ابزاری قدرتمند برای مطالعه سازوکارهای مولکولی حذف آلاینده‌ها محسوب می‌شوند، چرا که امکان بررسی این فرآیندها را بدون پیچیدگی‌های گیاه کامل فراهم می‌آورند. سیستم‌هایی نظیر کالوس و سوسپانسیون‌های سلولی با حذف موانع فیزیکی، بستر ایده‌آلی برای پژوهش‌های پایه و کاربردی ایجاد کرده‌اند (Doran 2009; Couselo et al. 2012). در این میان، گیاه توتون با پیشینه طولانی به‌عنوان مدل گیاهی در کشت بافت و مهندسی ژنتیک، پتانسیل قابل توجهی در فرآیندهای گیاه‌پالایی از خود نشان داده است (Zamani 2010). برای نمونه، سلول‌های توتون توانایی حذف آلاینده‌های آلی مانند بنزوفنون و بیسفنول A را دارند (Shimoda et al. 2009). همچنین، با بهره‌گیری از مهندسی ژنتیک، کالوس‌های تراریخت توتون بیان کننده ژن *MerB* برای تجزیه متیل جیوه و پالایش محیط ایجاد شده‌اند (Nagata et al. 2010). گوگرد علاوه بر نقش آلایندگی، یک عنصر ضروری برای متابولیسم گیاهان محسوب می‌شود و در ساختار ترکیبات حیاتی مانند اسیدهای آمینه (سیستئین و متیونین)، کوآنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه نقش اساسی ایفاء می‌کند (Nakajima et al. 2019; Alvi et al. 2023). مسیرهای پیچیده جذب (از طریق ناقل‌های سولفات موسوم به *SULTR*)، احیاء و ادغام گوگرد در متابولیسم گیاهان به خوبی مطالعه شده است (Kataoka et al. 2004; Wang et al. 2021). آنزیم‌های کلیدی مانند ATP سولفوریلاز (*ATPS*) اولین گام را در مسیر کاهشی کاتالیز می‌کنند (Kopriva et al. 2009). آدنوزین ′۵–فسفوسولفات (APS) حاصل از این واکنش، می‌تواند به سمت تولید سیستئین (توسط APS ردوکتاز) پیش برود یا توسط APS کیناز (APK) برای سولفوریلاسیون متابولیت‌های ثانویه به ′۳–فسفوآدنوزین ′۵–فسفوسولفات (PAPS) تبدیل شود (Kopriva 2006; Mugford et al. 2009). آنزیم میتوکندریایی سولفیت اکسیداز (*SO*) به‌عنوان کاتالیزور مرحله نهایی کاتابولیسم اکسیداتیو سیستئین عمل کرده و سولفیت را به سولفات اکسید می‌کند (Hille 2023; Mendel and Schwarz 2023). مطالعات ترنسکریپتومیکس روی گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* نشان داده که مواجهه با DBT می‌تواند بیان ژن‌های کلیدی متابولیسم گوگرد را به‌طور قابل توجهی تغییر دهد (Yaqoub 2013).

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

[1] Dibenzothiophene
[2] Hydrodesulfurization
[3] Biodesulfurization
[4] Phytoremediation

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، بذور توتون (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) پس از استریل‌سازی 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. گیاهچه‌های حاصل پس از ۸–٦ هفته نگهداری در شرایط کنترل‌شده (دمای ۲۳±۲°C، شدت نور ۱۰۰۰ لوکس و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی) برای تهیه ریزنمونه‌های برگی مورد استفاده قرار گرفتند. جهت القای کالوس، نمونه‌های برگی (۱– ۰/۵ سانتی‌متر) به محیط کشت MS + 0/5 mg/l NAA[1] + 0/5 mg/l Kinetin منتقل و در تاریکی کامل (۲۳±۲°C) نگهداری شدند. کالوس‌های تشکیل‌شده هر ٤–۳ هفته بر روی محیط تازه واکشت شدند. برای ایجاد سوسپانسیون سلولی، ۵۰۰ میلی‌گرم از کالوس‌های ترد (هر قطعه به اندازه‌ی ۱۰۰–۵۰ میلی‌گرم) به محیط کشت مایع MS با ترکیب هورمونی مشابه در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری (حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط) انتقال یافته و در شیکر انکوباتور (۱۲۰ rpm، ۲۳±۲°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)[2]، کلیه ترکیبات حاوی گوگرد در محیط MS با ترکیبات مشابه فاقد گوگرد جایگزین می‌شوند تا نیازهای تغذیه‌ای گیاه را بدون حضور این عنصر تأمین کنند. ترکیبات تشکیل‌دهنده 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)	١٦٥٠
Calcium Chloride, Anhydrous ($CaCl_2$)*	٣٣٢/٢٠
Magnesium Chloride, Anhydrous ($MgCl_2$)*	١٤٢/٩٣٠
Potassium Nitrate (KNO_3)	١٩٠٠
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous (KH_2PO_4)	١٧٠
Micronutrient stock 1X	
Copper II Chloride, Anhydrous ($CuCl_2$)*	٠/٠١٣
Cobalt Chloride, Hexahydrate ($CoCl_2.6H_2O$)	٠/٠٢٥
Boric Acid (H_3BO_3)	٦/٢
Zinc Chloride, Anhydrous ($ZnCl_2$)*	٤/٠٨٠
Manganese Chloride, Tetrahydrate ($MnCl_2.4H_2O$)*	١٩/٧٩
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	٠/٢٥
Potassium Iodide (KI)	٠/٨٣
Iron stock 1X	
Iron III Chloride, Anhydrous ($FeCl_3$)*	١٦/٢٢
EDTA, Disodium, Dihydrate ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$)	٣٧/٢٦٠
Vitamines stock 1X (Tissue Culture)	
Nicotinic acid (B_3)	١
Pyridoxine-HCL (B_6)	١
Glycine	٢

ماده‌های علامت‌دار با ستاره (*) به‌دلیل جلوگیری از تداخل گوگرد در محیط، با ماده‌ای فاقد گوگرد جایگزین شدند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 ۱۸۰ rpm به مدت ۳۰ تا ٦۰ دقیقه انجام شد تا اطمینان از حل شدن کامل ماده حاصل شود.

کالوس‌های توتون به قطعات ۱۰۰–۵۰ میلی‌گرمی تقسیم شده و در مجموع ۲ گرم کالوس در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع SFM حاوی 0/5 + 0/5 mg/l NAA Kinetin mg/lکشت شدند. غلظت‌های مختلف DBT شامل ppm٤۰۰–۲۰۰–۳۰–۰ در سه تکرار استفاده شدند. کشت‌ها در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ rpm، دمای ۲°C ± ۲۳ و در شرایط تاریکی کامل نگهداری شدند. نمونه‌برداری از کالوس‌ها در زمان‌های ٦، ۲٤ و ٤۸ 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 ppm ۱۰۰ از DBT ارزیابی شد. نمونه‌های تیمارشده با DBT (در غلظت‌های ۰، ۳۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ ppm) به محیط کشت SFM منتقل شدند و تغییرات مورفولوژیکی در بازه‌های زمانی ۱۰، ۱۵و 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 استخراج‌شده 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 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[1] 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 طراحی‌شده با بهره‌گیری از ابزار Primer-BLAST در پایگاه NCBI تأیید شد (جدول ۲). در نهایت سنتز تمامی الیگونوکلئوتیدها توسط شرکت زیست‌فناوری (پیشگام، ایران) صورت گرفت.

برای انجام واکنش‌های Real-Time PCR، از دستگاه Bioneer-ExicyclerTM96 و کیت YTA 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[2] و پس‌رو[3] (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.

[1] Internal control gene
[2] Forward
[3] Reverse

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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

نام ژن هدف	شناسه دسترسی	توالی ('3 → '5)	طول آغازگر	دمای اتصال °C	GC %	طول قطعه تکثیر شونده (bp)
SULTR	XM_016627474.1	Fw AGATGTGCTTTTGAACAACTGG	۲۲	٦۰	٤۱	
		Rev TCTCACCTTCTCTTGATACAGCC	۲۳	٦۰	٤۸	۱۰۰
APK3	XM_016645764.1	Fw ATTCTCCGCCCTTGTCTCACT	۲۱	٦۰	٥۳	
		Rev AGAAAGCGTTATCCCTCCTGTGA	۲۳	٦۰	٤۸	۱٦۹
APS2	XM_016598148.2	Fw CCTCCAGATGGTTTTATGTGTCC	۲۳	٦۰	٤۸	
		Rev AGAGTTTTGTACGCCGTCCT	۲۰	٦۰	٥۰	۹۰
SO	XM_016619757.2	Fw TCCACAGAGTGCGGAGATAG	۲۰	٦۰	٥٥	
		Rev GCCCAACACATGAACACAGC	۲۰	٦۰	٥٥	۱٦۸
Actin	NM_001425880.1	Fw CGCATCCCTTAGCACATTCC	۲۰	٦۰	٥٥	
		Rev AGTAAAAATAGCAGCACCGCCT	۲۲	٦۰	٤٥	۱۱۲

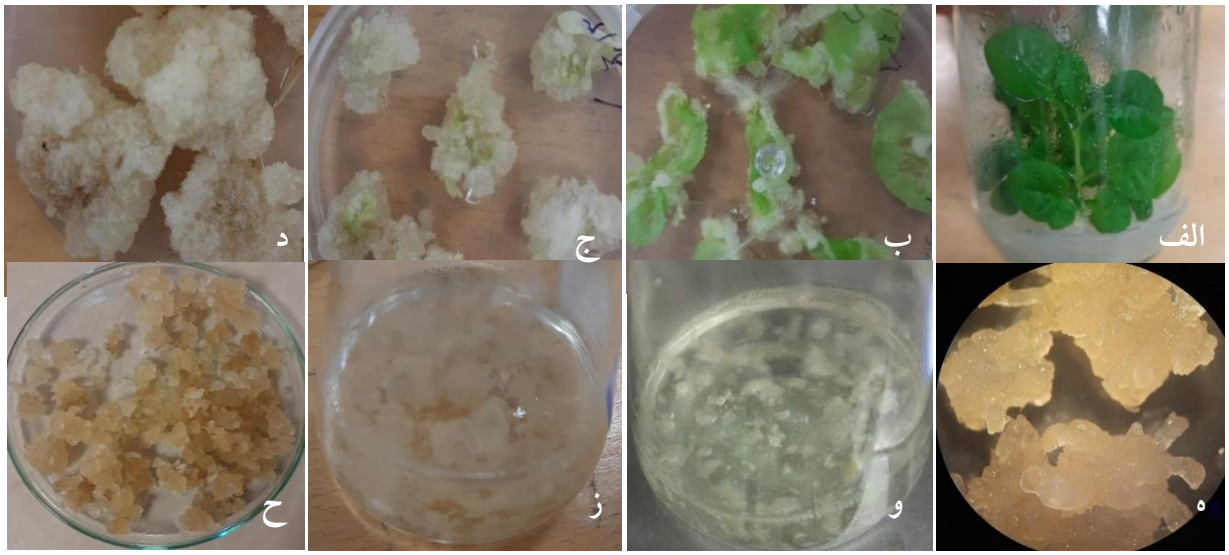
در ادامه، ٤۰ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در ۹٥°C به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در ٦۰°C به مدت ۱٥ ثانیه و تکثیر در ۷۲°C به مدت ۲٥ ثانیه اجرا شد. بررسی بیان ژن‌های هدف در سه تکرار زیستی و دو تکرار تکنیکی برای هر تیمار انجام شد. پس از اتمام واکنش، به‌منظور بررسی اختصاصیت محصولات PCR و شناسایی احتمالی دایمرهای آغازگر، منحنی ذوب در دمای ٥۰ تا ۹٥°C ترسیم شد. آنالیز بیان ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد (Livak and Schmittgen 2001). آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2021 و به‌کارگیری آزمون t-test برای هر تیمار با گروه شاهد انجام شد. سطح معنی‌داری برای آزمون‌ها در دو سطح ٥ و ۱ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متعادل NAA و Kinetin (هر کدام با غلظت ۰/٥ mg/l) به‌طور مؤثری القای کالوس را از لبه ریزنمونه‌های برگی رقم *Xanthi* در بازه هفته دوم تا سوم پس از کشت امکان‌پذیر 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 می‌کند (Skoog 1957). بازه زمانی مشاهده‌شده با گزارش‌های مشابه در توتون همخوانی دارد؛ به‌طور مثال، در مطالعه‌ای، القای کالوس در محیطی حاوی ۱ mg/l NAA و ۰/٥ mg/l BAP نیز حدود ۱٤ روز طول کشید (Ali et al. 2007). شکل‌گیری اولیه کالوس‌های نامنظم از لبه‌های برشی، پدیده‌ای متداول است که ناشی از تمایززدایی و تکثیر سلول‌های 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 ۰/٥ mg/l Kinetin) استفاده کردند، هم‌سو است (Toghyani et al. 2016). با این حال، اختلاف در زمان آغاز (یک هفته در مطالعه مذکور در مقابل ۳-۲ هفته در اینجا) به‌طور محتمل ناشی از تفاوت در گونه/رقم گیاهی، غلظت متفاوت NAA، یا شرایط فیزیکوشیمیایی خاص محیط‌های کشت است. یکی از چالش‌های اصلی در کشت بافت توتون، پدیده قهوه‌ای‌شدن ناشی از اکسیداسیون ترکیبات فنولی است که می‌تواند منجر به نکروز بافت شود (Liu et al. 2024). پروتکل واکشت دوره‌ای هر ۳ تا ٤ هفته در این مطالعه، به‌طور مؤثری از تجمع این ترکیبات بازدارنده جلوگیری کرد (شکل ۱- ج و د). این استراتژی با توصیه‌های استاندارد برای حفظ سلامت کشت‌های طولانی‌مدت که بر انتقال بافت‌ها به محیط تازه قبل از ورود به فاز سکون تأکید دارند، مطابقت دارد. پایداری و یکنواختی مورفولوژیکی مشاهده‌شده در کالوس‌ها پس از ۲ تا ۳ دور واکشت، نشان‌دهنده استقرار یک خط کالوس ژنتیکی پایدار است. این پایداری، پیش‌نیاز اساسی برای مرحله بعدی، یعنی ایجاد سوسپانسیون سلولی یکنواخت، محسوب می‌شود. دستیابی به یک سوسپانسیون سلولی با رشد پایدار و یکنواخت، دستاورد کلیدی این پژوهش بود (شکل ۱-

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

و). موفقیت در این مرحله مستقیما 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 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 پایایی و قابلیت تکرارپذیری سیستم را به‌عنوان یک ابزار تحقیقاتی تضمین می‌نماید (شکل ۱)



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 ۳-۲ 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.

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 درون شیشه‌ای، 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 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 الیسیتورهای شیمیایی نشان می‌دهند. در مقابل، در

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

غلظت‌های بالاتر (ppm ۱۰۰–۶۰)، 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 درون‌سلولی 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 ppm ۸۰ (روز ۱۵) نسبت به ppm ۶۰ (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 تیمارشده با ppm ۳۰ 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 تقریبا 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، سیستئین، 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.

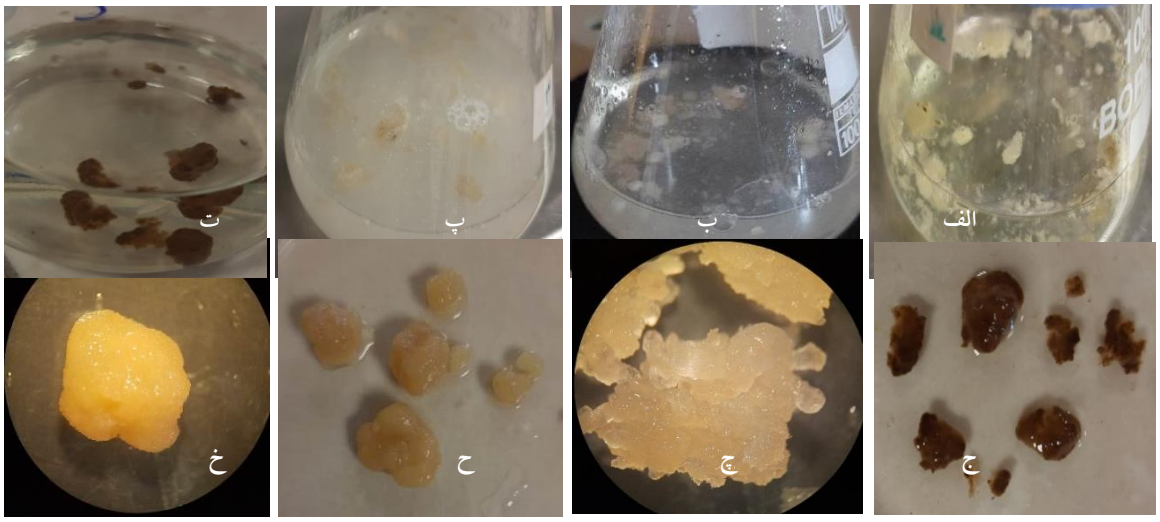
یک سؤال کلیدی در تفسیر نتایج این مطالعه، امکان متابولیسم مستقیم DBT به‌عنوان منبع گوگرد توسط سلول‌های توتون است. مسیرهای شناخته شده برای تجزیه کامل مولکول‌های DBT، مانند مسیر 4S، عمدتاً محدود به باکتری‌های تخصص‌یافته‌ای است که آنزیم‌های کلیدی مانند DBT مونوکسیژناز را دارا هستند (Gallagher et al. 1993). 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 سیستئین به عنوان منبع گوگرد استفاده کنند، اما افزودن سیستئین 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[1] (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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 ۲۰۰ppm-۳۰-۰ و در بازه‌های زمانی ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت با موفقیت انجام شد، به دلیل عدم موفقیت در استخراج RNA از تیمار ٤٠٠ppm، این نمونه از مطالعه حذف 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.

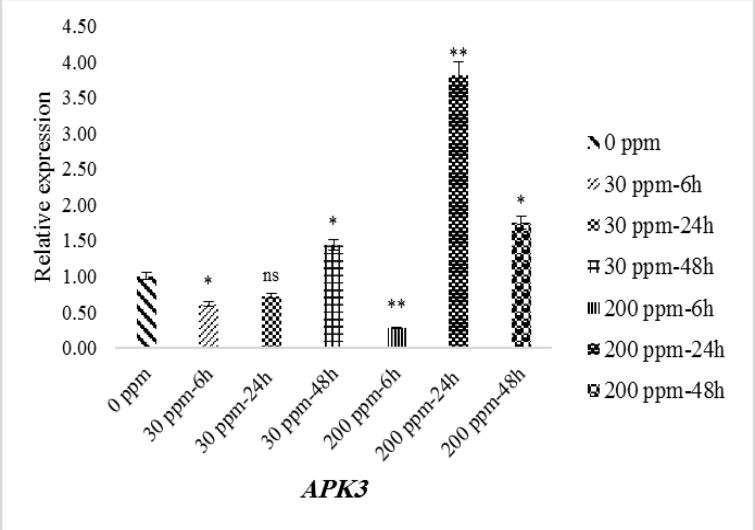


شکل ۲- تأثیر تیمار DBT بر مورفولوژی و بقای سلول‌های توتون؛ (الف) کالوس‌های نامنظم در محیط SFM پیش‌از تیمار؛ (ب) کالوس‌ها در محیط SFM پس‌از تیمار ۳۰ppm؛ (پ) کالوس‌ها در محیط SFM پس‌از تیمار ۱۰۰ppm؛ (ت و ج) نکروز کامل در نمونه‌های فاقد گوگرد (۰ppm)؛ (چ) کالوس معمولی در محیط MS؛ (ح و خ) تشکیل کالوس‌های کروی در تیمار ppm ۳۰ پس‌از 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 به‌عنوان تنها منبع گوگرد، آنالیز Real-Time PCR (qRT-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 به‌عنوان یک دهنده اصلی سولفات برای سولفاته‌سازی 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 ppm ۳۰، بیان *APK3* پس از ٦ ساعت به‌طور معنی‌داری به میزان ۱/٦٨ برابر کاهش یافت. پس از ٢٤ ساعت تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (۱/۳۸ برابر کاهش). این روند کاهشی پس از ٤٨ ساعت به افزایش ۱/٤٥ 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 میل‌پیوند بالا در شرایط کمبود گوگرد است که توسط شبکه‌های تنظیمی مرکزی هماهنگ می‌شود (Sirko et al. 2009). در مقابل، تیمار با غلظت ۲۰۰ppm یک الگوی سه‌فازی معنی‌دار را آشکار ساخت: کاهش شدید بیان در ٦ ساعت اول (۳/٥٦ برابر)، افزایش چشمگیر در ٢٤ ساعت (۳/۸۱ برابر) و سپس تعدیل نسبی در ٤٨ ساعت (۱/۷٥ برابر).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

این الگوی نوسانی بیانگر پیچیدگی تنظیم ژن *APK3* در مواجهه با تنش ناشی از غلظت بالای منبع گوگرد است. کاهش اولیه احتمالا بازتاب شوک متابولیک اولیه و سرکوب موقت مسیرهای مصرف گوگرد تحت تنش است. افزایش ناگهانی بیان در ٢٤ ساعت ممکن است نیاز فوری سلول به تولید PAPS برای فرآیندهای سولفاته‌سازی و سازوکارهای سم‌زدایی را منعکس کند. کاهش مجدد سطح بیان در ٤٨ 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 هماهنگی بیان ژن‌ها ایفاء می‌کنند (Sirko et al. 2009). پویایی مشاهده شده در بیان *APK3* همچنین با مفهوم اختلال در هماهنگی 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).

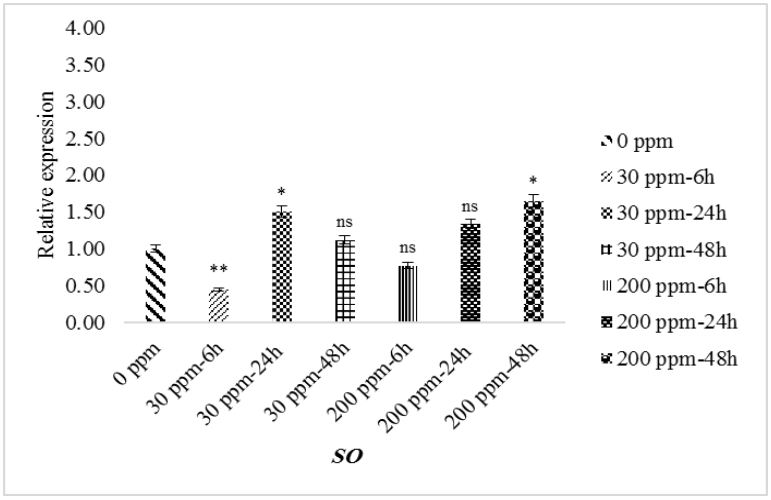


شکل ٣- تغییرات بیان نسبی ژن *APK3*: مقادیر بیان ژن پس از تیمار با غلظت‌های ٠، ٣٠ و ٢٠٠ ppm در زمان‌های ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شدند. ns، * و ** به‌ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌دار و معنی دار بودن در در سطوح احتمال ٥ و ١ درصد است.

پاسخ مولکولی به تیمار DBT در محیط فاقد گوگرد، الگوی بیانی وابسته به غلظت و زمان را برای ژن *SO* نشان داد (شکل ٤). در غلظت ppm ٣٠، کاهش اولیه معنی‌داری در ٦ ساعت به میزان ٢/٢ 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 ٢٤ ساعت همراه بود (١/٥٧ برابر) که نشان‌دهنده فعال‌سازی موقت مسیر سمیت‌زدایی سولفیت و تلاش سلول برای مقابله با سولفیت تولیدشده از متابولیسم DBT است (Leustek et al. 2000; Saito 2004). این افزایش در ٤٨ ساعت به سطح پایه بازگشت و تغییر معنی‌داری نشان نداد (٠/٩ برابر) که بیان‌گر ماهیت گذرای این پاسخ است. در غلظت ppm ٢٠٠، الگوی متفاوتی مشاهده شد. برخلاف ppm ٣٠، کاهش اولیه در ٦ ساعت به سطح معنی‌داری نرسید (١/٣ برابر). در ٢٤ ساعت نیز تغییر معنی‌داری ثبت نشد (١/٣٤ برابر کاهش بیان). تنها در ٤٨ ساعت کاهش معنی‌داری به میزان ١/٦٥ برابر مشاهده گردید که می‌تواند نشان‌دهنده غلبه تدریجی تنش و

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 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 گوگرددار غیرمتعارف مانند DBT باشد.

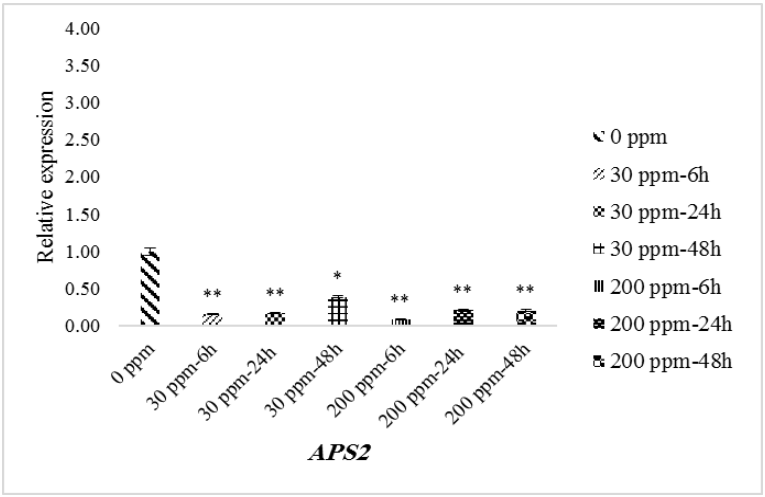


شکل ٤- تغییرات بیان نسبی ژن *SO*؛ مقادیر بیان ژن پس از تیمار با غلظت‌های ۰، ۳۰ و ppm ۲۰۰ در زمان‌های ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شدند. ns، * و ** به‌ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌دار و معنی دار بودن در در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

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 مشاهده شده 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 می‌کنند، *APS2* عمدتا در تولید PAPS در سیتوزول نقش دارد (Ai et al. 2016). بنابراین، به‌نظر می‌رسد سلول‌ها در مواجهه با منبع گوگرد آلی (DBT)، که ممکن است مستقیما در مسیر اصلی احیای سولفات قرار نگیرد، با کاهش بیان *APS2*، از هزینه‌های سنتز ترکیبات سولفونه‌شده ثانویه کاسته و هموستاز گوگرد را حفظ می‌کنند. این فرضیه با ماهیت وابسته به غلظت پاسخ همخوانی دارد؛ به‌طوری که غلظت بالاتر (۲۰۰ppm) DBT کاهش بسیار معنی‌داری در بیان ژن (به‌ترتیب ۱۲/۲۸، ٤/۹۰ و ٤/۹۹ برابر در زمان‌های ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت) القا کرد. اگرچه این نتایج با پیچیدگی شناخته‌شده تنظیم متابولیسم گوگرد همسو است. برای مثال، گزارش شده است که بیان ایزوفرم‌های مختلف ATP

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

سولفوریلاز (APS) در طول نمو برگ می‌تواند به صورت متقابل تنظیم شود؛ به گونه‌ای که با افزایش سن برگ، ایزوفرم پلاستیدی 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 سلنیوم 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 تمایزیافته در مقابل سلول‌های سوسپانسیون تمایزنیافته) و ماهیت محرک (سلنیوم به‌عنوان یک عنصر شبه‌گوگرد در مقابل DBT به‌عنوان منبع آلی) باشد. نتایج ما همچنین در تضاد با مطالعه‌ای است، که افزایش بیان *APS2* و ژن‌های خانواده *SULTR* را تحت تیمار نانوذرات سلنیوم 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 تمایز و مدل آزمایشی وابسته است. الگوی زمانی پاسخ نیز قابل تأمل است. کاهش بسیار معنی‌داری در میزان مهار در تیمار ٦ ساعته (٦/٧٩ برابر) با غلظت پایین (ppm ٣٠)، 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 ٢٤ ساعت (٦/١٦ برابر) و ٤٨ ساعت (٢/٥٩ برابر) در غلظت ppm ٣٠، 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).



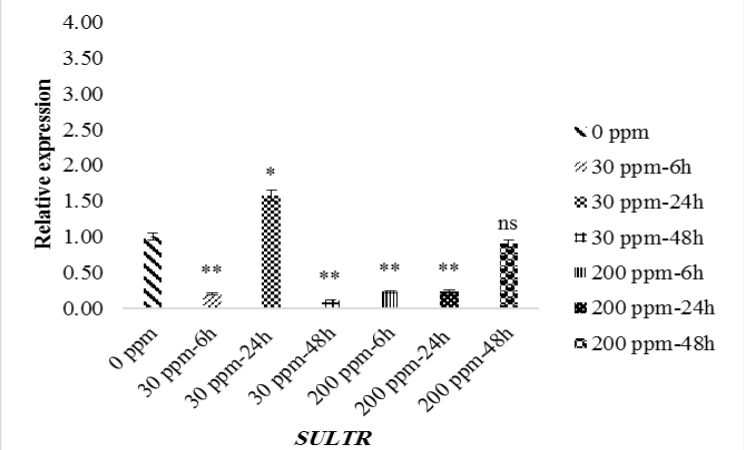
شکل ٥- تغییرات بیان نسبی ژن *APS2*: مقادیر بیان ژن پس از تیمار با غلظت‌های ٠، ٣٠ و ppm ٢٠٠ در زمان‌های ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شدند. ns، * و ** به‌ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌دار و معنی دار بودن در در سطوح احتمال ٥ و ١ درصد است.

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 ٦). این نتایج حاکی از آن است که سیستم انتقال سولفات در گیاهان در مواجهه با منبع گوگرد آلی DBT، پاسخی اختصاصی و پویا بروز می‌دهد. خانواده‌ی ژن *SULTR* نقش محوری در جذب، توزیع و هموستاز گوگرد در گیاهان ایفاء می‌کنند. بیان این ژن‌ها به‌طور پیچیده‌ای توسط وضعیت تغذیه‌ای گوگرد تنظیم می‌شود، به‌طور معمول، کمبود سولفات معمولا منجر به افزایش بیان ایزوفرم‌های خاصی مانند *SULTR1;1* و

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 ۳۰ppm، سطح بیان ژن پس از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌داری به میزان ۱/۵۷ برابر نشان داد، درحالی‌که 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 غیرمتعارف ارائه می‌دهد. در غلظت بالاتر (۲۰۰ppm)، 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 منحصربه‌فرد DBT در مسیر گوگردزدایی زیستی است.

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 القاپذیری تفاوت دارند؛ به‌طوری که *Sultr1;1* به شدت تحت شرایط کمبود گوگرد القا می‌شود، در حالی‌که 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.



شکل ٦- تغییرات بیان نسبی ژن *SULTR*: مقادیر بیان ژن پس از تیمار با غلظت‌های ۰، ۳۰ و ۲۰۰ ppm در زمان‌های ٦، ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شدند. ns، * و ** به‌ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌دار و معنی دار بودن در در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

نتیجه‌گیری کلی

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

به‌نظر می‌رسد DBT به‌عنوان یک منبع غیرمتعارف 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 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، متابولومیک 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, Stuiver 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.

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:

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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, Gheni 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.
Mohebali 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, Maruyuama-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′-adenylylsulfate 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, Chattejee 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 studuy 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).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]