

جداسازی ژن *CFS* (*Cheilanthifoline synthase*) از مامیران کبیر و

بررسی الگوی بیانی آن تحت تاثیر نانوذرات TiO_2 و CeO_2

Isolation of CFS (*Cheilanthifoline synthase*) gene from *chelidonium majus* and investigation of its expression pattern under CeO_2 and TiO_2 nanoparticles

صالحه درگاهی^۱، صدیقه فابریکی اورنگ^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

Salehe Dargahi¹, Sedigheh Fabriki-Ourang^{2*}

1. M.Sc. Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

2. Associate Pro. Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ourang@eng.ikiu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۲۱)

چکیده

آنزیم *Cheilanthifoline synthase* (*CFS*) از اعضای خانواده پروتئینی *CYP719*، در مراحل تبدیل آنزیمی رتیکولین به سنگوئینارین در گیاهان فعالیت می‌کند. سنگوئینارین یک آلکالوئید بنزوفنانتریدين می‌باشد که به‌طور گسترده در گیاهان خانواده پاپاوراسه، فاماریاسه و روتاسه یافت می‌شود. در پژوهش حاضر، cDNA کدکننده *CFS* از ریشه گیاه مامیران کبیر جداسازی شد. در بررسی توالی جداسازی شده، شناسایی ناحیه آروماتیک، ناحیه متصل شونده به گروه هم و موتیف حفاظت شده EXXR در ناحیه مارپیچ K تایید کننده تعلق آنزیم *CFS* به خانواده پروتئینی سیتوکروم P450 بود. الگوی تغییرات بیانی ژن *CFS* در ریشه، ساقه و برگ مامیران تیمار شده با نانوذره‌های دی‌اکسیدسیریم و دی‌اکسیدتیتانیوم در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. در گیاهان تیمار شده با دی‌اکسیدسیریم، بیشترین میزان بیان ژن *CFS* ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در اندام ریشه و کمترین میزان بیان در ساقه مشاهده گردید. در محلول‌پاشی گیاهان با نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم، زمان ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین افزایش بیان ژن *CFS* در ریشه را نشان داد و نیز کمترین میزان بیان در ساقه مشاهده گردید. نتایج این تحقیق نشان دهنده افزایش رونویسی ژن *CFS* در پاسخ به نانوذره‌های دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدسیریم در مامیران کبیر می‌باشد؛ بنابراین اطلاعات بدست آمده از ساختار ژن و نیز موثر بودن محرک‌های مورد استفاده می‌تواند در راستای افزایش میزان آلکالوئید سنگوئینارین از طریق مهندسی متابولیک مفید واقع گردد.

واژه‌های کلیدی

آلکالوئید
بنزوفنانتریدين
سنگوئینارین
سیتوکروم P450
نانوذرات

مقدمه

مامیران کبیر با نام علمی *Chelidonium majus* L. از خانواده خشخاش (Papaveraceae) گیاه دارویی چندساله با شیرابه زرد- نارنجی در ریشه و اندام‌های هوایی است که به این گیاه خواص ضدالتهابی، ضدعفونی و ضدسرطانی می‌بخشد. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که خواص دارویی و درمانی شیرابه مامیران کبیر به دلیل آلکالوئیدهای موجود در اندام‌های این گیاه می‌باشد. این گیاه محتوی مقدار زیادی آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین از جمله سنگوئینارین، کاپتیسین، بربرین، کلریتین و کلیدونین می‌باشد که خاصیت آنتی‌باکتریال، ضدتومور، ضد میکروبی، ضدقارچی و ضدالتهابی دارند (Ghorbanli et al., 2009). سنگوئینارین متعلق به آلکالوئیدهای گروه بنزوفنانتریدين است که بیشتر در ریشه گیاهان خانواده خشخاش یافت می‌شود و به عنوان عاملی بازدارنده در برابر گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زا شناخته شده است (Park et al., 2012; Trujillo and villanueva et al 2003). بنزوفنانتریدين‌ها زیرگروهی از بنزیل ایزوکوئینولین‌ها می‌باشند که از پیش‌ماده‌های (اس)-تیکولین و (اس)-اسکولرین ساخته می‌شوند (Kutchan, zenk, 1993 and). (اس)-رتیکولین سبب تولید مورفین (1986 Weiczorek et al.,) می‌شود و (اس)-اسکولرین به عنوان پیش‌ماده تولید سنگوئینارین (Cline and Coscia 1988) عمل می‌کند (Cline and Coscia 1988; Frenzel et al. 1988). قابلیت انعطاف مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها منجر به تولید آلکالوئیدهای مختلف شده است. بیوسنتز آلکالوئیدها از مواد مختلفی بهره می‌جوید و به همین دلیل است که آلکالوئیدهای مختلفی در خشخاش و سایر گیاهان یافت می‌شود (Bird 2001; Facchini 1998). (اس)-اسکولرین توسط آنزیم *Cheilanthalifoline synthase* (CFS) به (اس)-شیلانتیفولین، پیش‌ماده سنتز سنگوئینارین تبدیل می‌شود (Hagel and Facchini 2010). این آنزیم به خانواده پروتئینی CYP719 تعلق دارد که ژن‌های رمزکننده آن از خشخاش کالیفرنیا جداسازی شده است (Ikezawa et al. 2008). محرک‌های زیستی و غیرزیستی متعددی برای تحریک بیانی ژن-های مسیر تولید آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدين نظیر سنگوئینارین

مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج مطالعات مختلف بیانگر این مطلب است که علاوه بر نوع گیاه و بافت هدف، نوع محرک، غلظت آن و مدت زمان مواجهه گیاه با این ترکیبات، میزان تولید متابولیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این رابطه اثر چندین محرک قارچی به همراه محرک‌های غیرزیستی سالیسیلیک اسید، پراکسید هیدروژن و دی اکسیدکربن بر بهبود تولید سنگوئینارین در خشخاش بررسی و مشخص شده است که به دنبال افزایش بیان هشت الی نه برابری ژن‌های *STS*، *TNMT*، *P6H* و *CFS*، تولید سنگوئینارین در کشت‌های سلولی خشخاش افزایش یافته و در میان محرک‌های غیرزیستی، سالیسیلیک اسید مؤثرتر گزارش شده است (Verma et al. 2014). نانومواد بر پایه فلزاتی مانند دی‌اکسیدتیتانیوم (nTiO_2) و دی‌اکسید سیریم (nCeO_2) اثرات قابل توجهی بر صفاتی مانند جوانه‌زنی، رشد ریشه و طول ساقه دارند (Thul et al. 2013). همچنین پاسخ ژنومی به این نانوذرات به صورت افزایش بیان ژن‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو و همچنین رشد و توسعه سریع‌تر گیاهچه گزارش شده است. واکنش متفاوت بیان ژن در پاسخ به nTiO_2 و nCeO_2 نشان می‌دهد که حالت‌های عمل برای دو NP اکسید فلزی ممکن است متفاوت باشد و عملی تحریک کننده برای تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند (Andersen et al 2016).

مطالعه چگونگی تنظیم مسیرهای بیوسنتزی و شناسایی عوامل تاثیرگذار در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از گام‌های مهم در جهت مهندسی متابولیک می‌باشد که استفاده از محرک‌ها از روش‌های مؤثر در افزایش تولید محسوب می‌گردد. در این راستا در پژوهش حاضر، پس از جداسازی و شناسایی ژن کدکننده *Cheilanthalifoline synthase*؛ اثربخشی محرک‌های نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدسیریم بر الگوی بیان ژن *CFS* در اندام‌های مختلف مامیران کبیر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

بذر گیاه دارویی مامیران کبیر (*Chelidonium majus L.*) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با کد دسترسی IBRC P1006625 (استان گلستان) تهیه و در شرایط دمایی $25 \pm 2^\circ\text{C}$ و شرایط ۱۶ h روشنایی / ۸ h تاریکی در گلخانه کشت گردید. به منظور بررسی تغییرات بیان ژن CFS^۱ در مامیران کبیر، از نانوالیسیستورهای دی اکسیدتیتانیوم و دی اکسیدسیریم در دو آزمایش جداگانه در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک های کامل تصادفی با چهار تکرار استفاده گردید. فاکتورهای مورد بررسی در آزمایش اول شامل دی اکسیدتیتانیوم در چهار سطح (غلظت ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر به همراه تیمار شاهد (غلظت صفر))، فاکتور مرحله محلول پاشی در دو سطح (اول و دوم) و فاکتور زمان نمونه گیری پس از القای الیسیستور در سه سطح (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بودند. فاکتورهای مورد بررسی در آزمایش دوم شامل محلول پاشی یک مرحله ای دی اکسیدسیریم در چهار سطح (غلظت ۲۰۰، ۳۰۰، ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر به همراه تیمار شاهد (غلظت صفر)) و فاکتور زمان پس از القای الیسیستور در چهار سطح (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت) بودند. محلول پاشی نانوذرات به گیاهچه های سه هفته ای انجام گرفت و محلول پاشی TiO_2 در دو مرحله با فاصله زمانی ۷۲ ساعت بود. به منظور افزایش میزان نفوذپذیری، به هنگام محلول پاشی از Tween 80 (یک درصد، Scharlu) استفاده گردید و گیاهان شاهد (غلظت صفر) با آب دیونیزه حاوی Tween محلول پاشی شدند. نمونه های برگگی از تیمارهای مختلف در زمان های مشخص شده هر دو آزمایش پس از هر محلول پاشی تهیه و برای بررسی های ملکولی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین پس از آخرین نمونه گیری برگگی در زمان ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی دوم آزمایش اول و زمان ۱۲۰ ساعت پس از محلول پاشی آزمایش دوم، به منظور مقایسه میزان بیان ژن ها در اندام های مختلف، نمونه گیری از سه اندام ریشه، ساقه و برگ انجام گردید.

طراحی آغازگر برای جداسازی cDNA رمز کننده آنزیم CFS با استفاده از کتابخانه های EST^۲ گیاه مامیران صورت گرفت.

^۱ Cheilanthifoline synthase ; CFS

^۲ Expression Sequence Tag; EST

اطلاعات این کتابخانه ها و توالی های EST آن ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI^۳ بدست آمد. از Blastn^۴ جهت پیدا کردن توالی های EST مرتبط با ژن CFS استفاده شد. از این رو از توالی های ژن CFS در گیاهان دیگر خانواده خشخاش که اطلاعات آنها در NCBI موجود بود به عنوان Query استفاده گردید. در مرحله بعد EST هایی که با توالی مورد نظر ما شباهت بالای ۶۰٪ داشتند انتخاب شد و توسط نرم افزار Egassembler^۵ سرهم سازی شد. از میان کانتیگ های ساخته شده توسط برنامه، بلندترین کانتیگ انتخاب شد و چارچوب قرائت باز توالی توافقی با برنامه ORF finder^۶ بدست آمد. برای اطمینان از صحت کانتیگ بدست آمده و چارچوب قرائت باز، Blastp^۷ انجام گرفت. براساس توالی توافقی بدست آمده، آغازگرهای مورد نیاز جداسازی ژن CFS از گیاه مامیران طراحی شد (جدول ۳-۲). بررسی خصوصیات آغازگرها از لحاظ ساختارهای ثانویه، همودایمر و هتروداایمر، دمای ذوب و درصد GC با Oligo analyzer^۸ صورت گرفت و سنتز آغازگرها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شد (جدول ۱).

استخراج RNA کل با محلول RNX-Plus (Sinaclon) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت و در ادامه از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری (Nanodrop Thermo scientific) برای سنجش کیفیت و کمیت RNA استفاده شد.

برای حذف آلودگی احتمالی RNA با DNA ژنومی، نمونه های RNA با آنزیم DNase I (Fermentas) تیمار شدند و سپس واکنش ساخت cDNA با کیت (601-602) Hyper Script شرکت GeneAll مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

واکنش Real Time-PCR برای بررسی میزان بیان نسبی ژن مورد مطالعه، با Amplicon Cyber green (Amplicon) در چهار تکرار در دستگاه BioRad (MiniOpticon, USA) انجام گرفت.

برنامه دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی (Real time PCR) به صورت پنج دقیقه در دمای 94°C

^۳ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

^۴ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

^۵ <http://www.genome.jp/tools/egassembler>

^۶ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>

^۷ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

^۸ <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

خانواده پروتئینی heme- و aromatic region, helix K region binding region می‌باشند که در یوکاریوت‌ها حفاظت شده‌اند (Takemura et al., 2013). از ویژگی‌های خانواده پروتئینی P450 دنباله آمینواسیدی Gly/Ala در ناحیه helix I می‌باشد؛ از سوی دیگر دنباله Thr در این ناحیه در پروتئین‌های منواکسیژناز P450 حفاظت شده است (شکل ۱)؛ بنابراین وجود این دنباله‌های آمینواسیدی حفاظت شده در helix I بیانگر این است که پروتئین موردنظر به عنوان یک آنزیم از نوع منواکسیژناز فعالیت دارد (Takemura et al., 2013). اعضای زیرخانواده پروتئینی CYP719A، جایگزینی منحصر به فرد ترئونین (T) محافظت‌شده با آمینوسید سرین (S) و همچنین اتصال گلیسین (G) محافظت شده به لوسین (L) را نشان دادند (ناحیه خط چین شکل ۱) (Ikezawa et al., 2003, 2007). پس از هم‌ردیف‌سازی توالی CFS از مامیران کبیر با دیگر پروتئین‌های خانواده P450؛ به‌ویژه آن‌دسته از پروتئین‌هایی که در بیوسنتز آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین نقش دارند و بررسی روابط فیلوژنی (شکل ۲)؛ توالی پروتئینی CFS بیشترین شباهت را به AmCYP719A14 از گیاه *Argemone mexicana* داشت، که هر دو به زیرخانواده CYP719 تعلق دارند.

برای واسرشته‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه شامل ۲۰ ثانیه در دمای ۹۴ °C (واسرشته‌سازی)، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸ °C (اتصال آغازگرها) و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ °C (بسط) و در نهایت افزایش دما برای ترسیم منحنی ذوب از ۶۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس انجام گرفت. واکنش RT-PCR، در چهار تکرار (دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی) اجرا شد. میزان بیان نسبی ژن مورد بررسی با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001) محاسبه شد. تجزیه آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با نرم‌افزار MSTAT-C و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel (ver. 2010) انجام شد.

نتایج و بحث

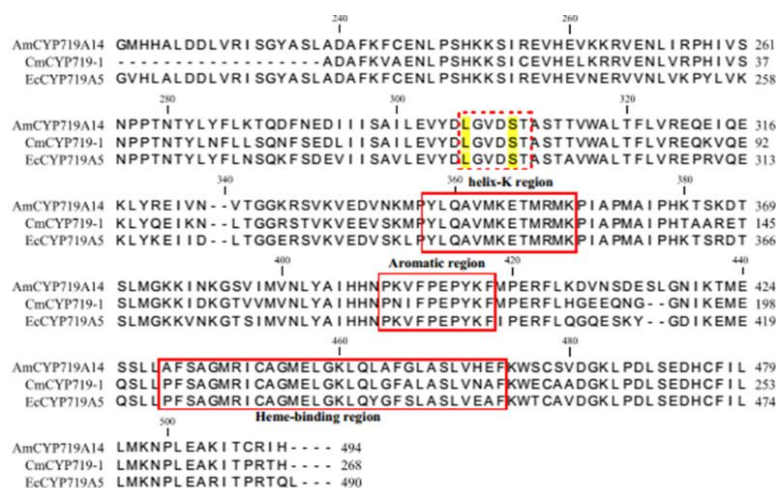
جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی توالی آمینواسیدی ژن رمز

کننده آنزیم Cheilanthifoline synthase (CFS)

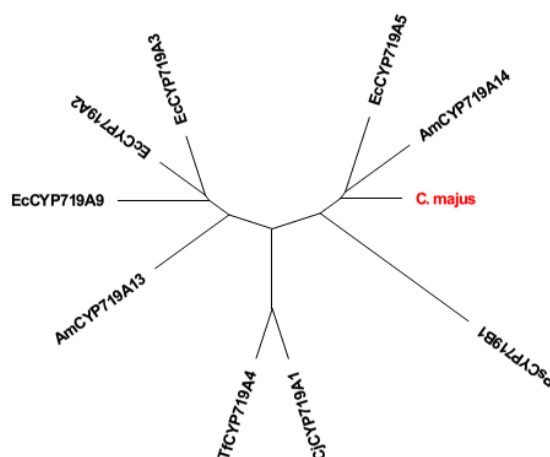
جداسازی cDNA رمزکننده CFS از بافت ریشه مامیران انجام شد. پس از تایید همسانه‌های نو ترکیب با PCR، توالی‌یابی و تایید اطلاعات به دست آمده، ژن CFS با طول ۸۱۴ جفت باز با شماره دسترسی MG918088 در پایگاه NCBI ثبت گردید. دامین اصلی p450 در توالی پروتئینی ژن مورد نظر نشان دهنده این است که پروتئین مورد مطالعه به خانواده پروتئینی Cytochrome-P450 و زیرخانواده CYP719 تعلق دارد. دامین‌های اختصاصی این

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده برای جداسازی cDNA رمزکننده آنزیم CFS و مطالعه بیانی آن

طول قطعه تکثیری (bp)	دمای اتصال (درجه سلسیوس)	توالی آغازگرها (5'→3')	نام آغازگر
۸۱۴	۵۷/۶	TCATACTTAATGGGTGCGA G	CFS F
		TGCTGATGCTTTCAAAGTC G	CFS R
۱۹۰	۶۰	ATGGGAATGTGCTGCTGAT G	qCFS-F
		ACTTAATGGGTGCGAGGAG T	qCFS-R
-	۶۰	GCCCCTAGCAGCATGAAGA T	Actin F
		GCACTTCCTGTGGACAATG G	Actin R



شکل ۱- هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی آمینواسیدی CFS و تعدادی از پروتئین‌های خانواده P450 با نرم‌افزار Clustalw.



شکل ۲- درخت فیلوژنی توالی‌های پروتئینی اعضای خانواده سیتوکروم P450 با الگوریتم Neighbor Joining (NJ). پروتئین کدشده ژن CFS از گیاه مامیران رنگی مشخص شده است.

پاسخ بیانی ژن CFS به نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم

در نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) مشخص گردید نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف، و نیز در دو مرحله محلول‌پاشی، تاثیر معنی‌داری ($P < 0/01$) بر بیان ژن CFS مامیران داشتند، لذا مشخص شد بیان ژن مذکور نه تنها تحت تاثیر

این محرک قرار می‌گیرد بلکه زمان اثر این ماده و همچنین غلظت‌های مختلف آن نیز می‌تواند میزان بیان این ژن را تحت تاثیر قرار دهد. همچنین نتایج تجزیه واریانس بیانگر معنی‌دار بودن اثرات متقابل غلظت‌های دی‌اکسیدتیتانیوم در زمان‌های مختلف پس از اعمال تیمار بر میزان بیان ژن CFS بود، به طوری که

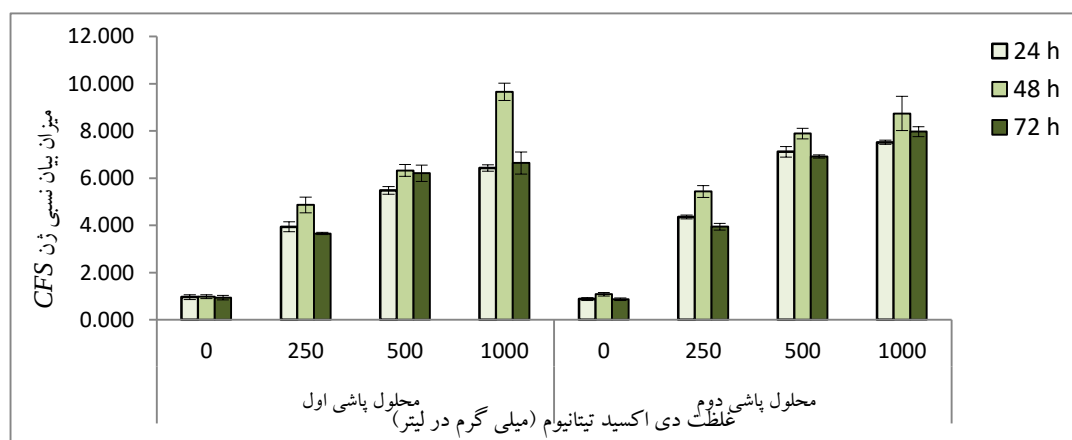
بیشترین میزان بیان ژن CFS مربوط به غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار بود و کمترین میزان بیان مربوط به عدم استفاده این ماده (تیمار شاهد) بود. همچنین نتایج مقایسه میانگین بیانگر افزایش میزان بیان ژن CFS با گذشت زمان بود به طوری که افزایش بیان تا ۴۸ ساعت ادامه داشته و حداکثر میزان بیان ژن در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد (شکل ۳). در همین راستا نتایج حاصل از مطالعه اثر محرک زیستی بر بیان ژن $DIOX_2$ (از ژنهای موثر در سنتز سنگوئینارین) حاکی از روند کاهشی بیان ژن مذکور در ساعات پایانی القاء به دلیل مواجهه طولانی با محرکها در سوسپانسیون سلولی می باشد (Hagel and Facchini, 2010). اثرات متقابل غلظت های مختلف

دی اکسیدتیتانیوم و تعداد دفعات محلول پاشی در سطح احتمال یک درصد بر میزان بیان ژن CFS معنی دار بود (جدول ۲)، به طوری که بیشترین میزان بیان ژن CFS مربوط به غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر در دومین مرحله از محلول پاشی بود (شکل ۳). اثرات متقابل مرحله محلول پاشی در زمان های مختلف نیز به طور معنی داری بر بیان ژن CFS معنی دار بود، به طوری که بیشترین میزان بیان ژن CFS مربوط به ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی دوم و کمترین میزان بیان آن ۲۴ ساعت پس از گذشت اولین محلول پاشی بود. در اثر متقابل سه جانبه نیز بیشترین میزان بیان ژن CFS مربوط به ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی اول در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر مشاهده گردید (شکل ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات غلظت، مدت زمان و تعداد محلول پاشی با نانوذره دی اکسیدتیتانیوم بر میزان بیان ژن CFS در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*)

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
بلوک	۳	۰/۰۱۲ ^{ns}
غلظت	۳	۲۲۰/۳۷ ^{**}
زمان	۲	۱۰/۸۶ ^{**}
غلظت × زمان	۶	۲ ^{**}
محلول پاشی	۱	۷/۳۱ ^{**}
غلظت × محلول پاشی	۳	۱/۸۱ ^{**}
زمان × محلول پاشی	۲	۰/۳۸ ^{**}
غلظت × زمان × محلول پاشی	۶	۱/۰۹ ^{**}
خطای آزمایش	۶۹	۰/۰۶۷

ns و **: به ترتیب عدم اختلاف و اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۳- تغییرات بیان نسبی ژن CFS در زمان ها و غلظت های مختلف دی اکسید تیتانیوم طی دو بار محلول پاشی در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*)

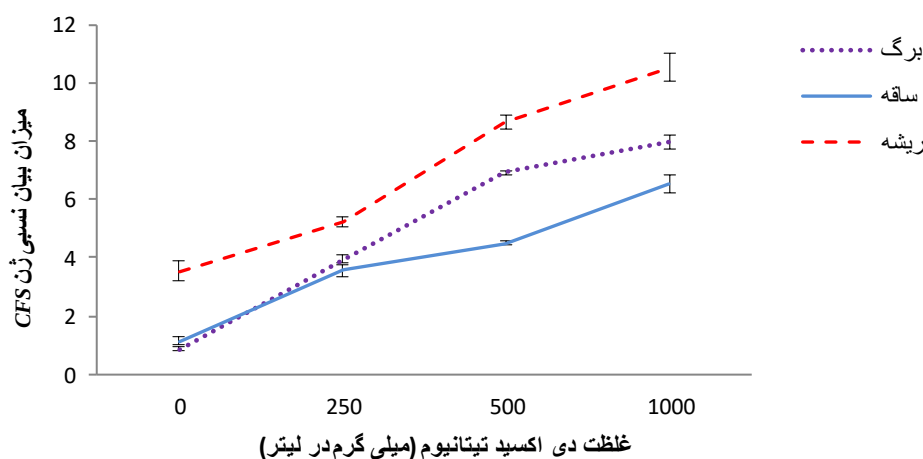
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) مشخص نشان داد که منبع تغییر اندام‌های مختلف مامیران (ریشه، برگ و ساقه) بر میزان تغییرات بیان ژن CFS تاثیر معنی‌داری ($P < 0/01$) داشته و بیانگر تفاوت اثر اندام بر بیان این ژن می‌باشد. بیشترین میزان بیان این ژن در ریشه مشاهده شد به طوری که بیان ژن CFS در ریشه حدوداً ۱/۵ برابر برگ و ۱/۸ برابر ساقه بود (شکل ۳). در توافق با نتایج

حاصل از این تحقیق، در گیاه خشخاش نیز بالا بودن فراوانی نسبی رونوشت‌های ژن MSH در ریشه و به دنبال آن تجمع سنگوئینارین در ریشه‌های این گیاه گزارش شده است؛ به طوری که رونوشت‌های این ژن در تمام اندام‌ها وجود دارد ولی در ریشه تجمع بیشتری داشته است (Beaudoin and Facchini 2013).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات غلظت و اندام گیاهی در تیمار با نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم بر بیان ژن CFS در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*)

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
بلوک	۳	۰/۰۷۱ ^{ns}
غلظت	۳	۹۷/۰۸ ^{**}
اندام	۲	۳۸/۹۶ ^{**}
غلظت × اندام	۶	۲/۱۹ ^{**}
خطای آزمایش	۳۳	۰/۰۵۳

ns و **: به ترتیب عدم اختلاف و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۴- تغییرات بیان نسبی ژن CFS در ریشه، برگ و ساقه گیاه مامیران کبیر (*Chelidonium majus*) در پاسخ به تیمار دی‌اکسیدتیتانیوم

پاسخ بیانی ژن CFS به نانوذره دی اکسید سریم

با بررسی نتایج تجزیه واریانس مشخص شد که دی اکسید سریم بیان ژن CFS را در مامیران کبیر (با اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد) تحت تاثیر قرار داد، به گونه ای که بیان این ژن نه تنها تحت تاثیر این نانوذره قرار گرفت؛ بلکه زمان اثر این ماده و غلظت های مختلف آن نیز (اثر متقابل غلظت در زمان) پاسخ بیانی متفاوتی را نشان دادند (جدول ۴). در مقایسه میانگین بیان ژن CFS (شکل ۵)، غلظت های استفاده شده نانوذره دی اکسید سریم

افزایش بیان ژن نسبت به شاهد را نشان دادند. بیشترین میزان بیان در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین آن در غلظت صفر میلی گرم در لیتر (شاهد) مشاهده شد و غلظت های بالاتر از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر روند کاهش بیان این ژن نشان داد (شکل ۵). میزان بیان این ژن با گذشت زمان تا ۷۲ ساعت افزایشی بود به طوری که، با گذشت ۷۲ ساعت از اعمال ۱۰۰ میلی گرم در لیتر دی اکسید سریم حداکثر میزان بیان مشاهده گردید و پس از آن روند کاهشی بیان اتفاق افتاد (شکل ۵).

جدول ۴- تجزیه واریانس اثرات غلظت و زمان در تیمار با

نانوذره دی اکسید سریم بر بیان ژن CFS در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*)

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
بلوک	۳	۰/۰۱۲ ^{ns}
غلظت	۳	۴۰/۹۱**
زمان	۳	۲/۰۶**
غلظت × زمان	۹	۰/۶۵**
خطای آزمایش	۴۵	۰/۰۲۲

ns و **: به ترتیب عدم اختلاف و اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۵- میزان تغییرات بیان نسبی ژن CFS در زمان های متفاوت و غلظت های مختلف دی اکسید سریم

در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*)

تجزیه واریانس مشخص نمود که میزان تغییرات بیان ژن CFS در اندام های مختلف گیاه (ریشه، برگ و ساقه) نیز دارای اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد ($P < 0/01$) می باشند (جدول

۵). بر اساس نتایج مقایسه میانگین (شکل ۶) بیشترین بیان این ژن در ریشه مشاهده شد و میزان بیان در ریشه بیشتر از برگ و در برگ بیشتر از ساقه بود، به طوری که بیان این ژن در ریشه حدودا

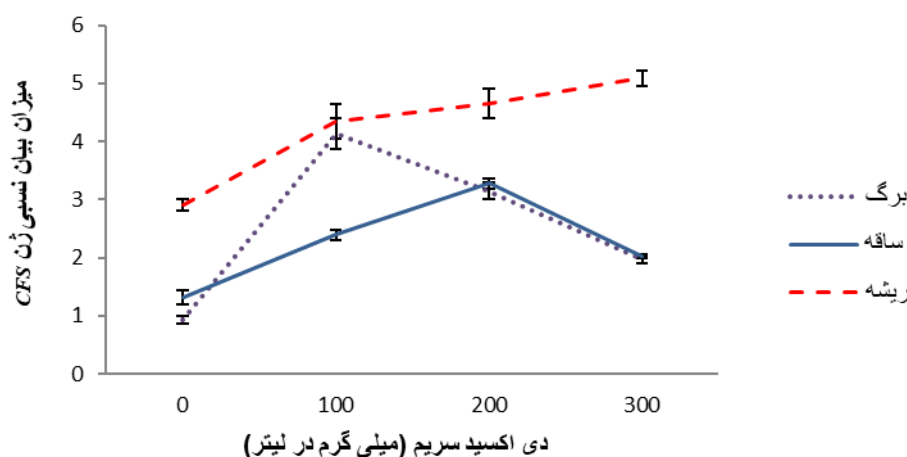
۱/۷ برابر برگ و ۱/۸ برابر ساقه بود (شکل ۶). با توجه به اینکه میزان بیان این ژن در اندام‌های مختلف متفاوت و حداکثر در ریشه بود، این می‌تواند بیانگر میزان فعالیت بیشتر آنزیم تولید شده از ژن CFS در ریشه باشد. در تایید این موضوع نتایج تحقیق دیگری نشان داده است که، میزان رونوشت‌های ژن STS که جزء خانواده پروتیینی CYP719 است نیز تحت تاثیر محرک‌های غیرزیستی در ریشه افزایش یافته است (verma et al., 2014). نتایج مطالعات مختلف در خشخاش و شقایق کالیفرنیا نیز نشان

می‌دهند که سنگوئینارین در ریشه این گیاهان تجمع می‌یابد که این به دنبال تجمع مقادیر قابل ملاحظه‌ای از رونوشت ژن‌های STS (verma et al., 2014)، BBE (Hagel et al., 2012)، MSH (Beaudoin and Facchini., 2013) و P6H (Blechert et al., 1995) اتفاق می‌افتد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ژن-های مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین دارای سیستم بیانی بافت اختصاصی (Tissue-specific) می‌باشند.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثرات غلظت و اندام گیاهی در تیمار با نانوذره دی‌اکسیدسیریم بر بیان ژن CFS در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*)

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
بلوک	۳	۰/۰۱۲ ^{ns}
غلظت	۳	۱۰/۰۳**
اندام	۲	۱۸/۵۸**
غلظت × اندام	۶	۱/۹۸**
خطای آزمایش	۳۳	۰/۰۲۷

ns و **: به ترتیب عدم اختلاف و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۶- تغییرات بیان نسبی ژن CFS در اندام‌های مختلف مامیران کبیر (*Chelidonium majus*) تحت تیمار با دی‌اکسیدسیریم

متابولیت‌های ثانویه با عملکردهای اکولوژیکی مهم در گیاهان؛ در حفاظت گیاهان در برابر گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زای

میکروبی، به عنوان جذب گرده‌افشان‌ها و جانوران منتشرکننده بذر، رقابت گیاه با گیاه و همزیستی گیاه با میکروب نقش

دارند. عموماً متابولیت‌های ثانویه در سه خانواده مولکولی بزرگ، گروه ترکیبات نیتروژن‌دار، ترپن‌ها و فنل‌ها در نظر گرفته می‌شوند. در این میان موادی که تحت عنوان آلکالوئیدها طبقه بندی می‌شوند، از جمله متابولیت‌های ثانویه گیاهی، میکروبی و حتی جانوری با خواص فارماکولوژیکی گسترده محسوب می‌شوند و گیاهان خانواده پاپاوراسه به دلیل تنوع محتوای آلکالوئیدی، دارای جایگاه ویژه‌ای در میان گیاهان دارویی می‌باشند (Bourgaud et al., 2001).

مامیران کبیر حاوی میزان زیادی آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین از جمله سنگوئینارین، کاپتیسین، بربرین، کلرترین، کلیدونین با خاصیت آنتی‌باکتریال، ضدتومور، ضد میکروبی، ضدقارچی و ضد التهابی می‌باشد (Ghorbanli et al., 2009; Zare Shahneh et al 2013). بیوستز سنگوئینارین در مامیران کبیر در مسیری متشکل از هفت مرحله آنزیمی از (S)-reticuline انجام می‌گیرد. آنزیم Cheilanthifoline (CFS) synthase (اس)-اسکولرین را به (اس)-شیلانتیفولین که پیش ماده سنتز سنگوئینارین است تبدیل می‌کند (Hagel and Facchini 2010). در توافق با نتایج حاصل از این پژوهش، اثربخشی محرک‌های زیستی (عصاره مخمر) و غیر زیستی (نانو ذره TiO_2) بر افزایش و بهبود تولید انواع آلکالوئیدهای ارزشمند بنزوفناتریدین (تبائین و سنگوئینارین) در خشخاش گزارش شده است (Khodayari et al 2015). بنابراین با کاربرد محرک‌ها می‌توان چرخه بیوستزی تولید و تجمع متابولیت‌هایی مانند تبائین و سنگوئینارین را القاء نمود و این القاء می‌تواند در قسمت‌های مختلف گیاه مؤثر و حتی با یکدیگر متفاوت باشد. در مطالعه بیان ژن‌های *tydc7*، *DBOX*، *DIOX2* و *bbe1* (فعال در مسیر سنگوئینارین) در سوسپانسیون‌های ریشه و مریستم خشخاش تیمار شده با نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم، مؤثر بودن این محرک بر بیان این ژن‌ها نیز گزارش شده است. به طوری که پس از روند

افزایشی بیان ژن‌ها، مواجهه طولانی مدت گیاه با محرک‌ها سبب تاثیر منفی و کاهش سطح رونویسی گردید (Khodayari et al., 2015). در پژوهش حاضر نیز بیشترین میزان بیان ژن CFS ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی دی‌اکسیدتیتانیوم مشاهده گردید و باگذشت زمان بیشتر از ۷۲ ساعت که در تیمار دی‌اکسید سریم بررسی شد، موجب کاهش بیان ژن مذکور شد. با توجه به تجمع سنگوئینارین در ریشه مامیران کبیر (Samanani et al., 2010; al., Holkova et al 2004) سطح بالای رونوشت ژن‌های کنترل‌کننده این مسیر از جمله CFS در ریشه آن قابل انتظار بود البته رونوشت‌های این ژن در ساقه و برگ که سنگوئینارین قابل تشخیصی در آن‌ها تجمع نمی‌یابد نیز وجود دارد. در واقع به نظر می‌رسد محل سنتز سنگوئینارین منحصر به ریشه که در آن تجمع می‌یابد نباشد و ممکن است در ساقه نیز سنتز شود. در تایید این موضوع می‌توان به تولید مرفین در ساقه اشاره کرد، با وجود اینکه مرفین فقط در اندام هوایی در کپسول تجمع می‌یابد. اما آنزیم سالوتاردینول سنتتاز که در تولید مرفین نقش دارد به‌طور گسترده در ریشه و ساقه حتی فعال‌تر از کپسول وجود دارد و نشان‌دهنده این موضوع است که مرفین در ریشه و ساقه سنتز شده و توسط شیره گیاهی به کپسول منتقل می‌شود (Gerardy & Zenk, 1993b; Facchini & De Luka, 1995). در واقع بیان یک ژن در یک اندام الزاما به معنای تجمع مواد تولیدی آن در همان اندام نیست. در این راستا، انتقال نیکوتین و هیوسیامین از ریشه توسط آوند چوبی به برگ‌ها یک مثال مشهود از آلکالوئیدهایی است که در ریشه سنتز می‌شوند و در اندام‌های هوایی ذخیره می‌شوند Hashimoto (& Yamada, 1992). با توجه به اطلاعات فوق می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است چنین مکانیسمی برای سنگوئینارین نیز در مامیران وجود داشته باشد به این صورت که سنگوئینارین سنتز شده در ساقه به سمت ریشه انتقال بیابد. الگوی بیانی مختص بافت در ژن‌های مسیر بیوستزی سنگوئینارین در مطالعات

al., 2007). بنابراین امید می‌رود استفاده از محرک‌های بیانی و تحریک سیگنال‌های سلولی سبب افزایش و بهبود تولید انواع آلکالوئیدهای ارزشمند گردد.

متعددی گزارش شده است؛ بنابراین تعداد بالای رونوشت ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های مسیر مربوطه نظیر CFS در بافت ریشه حاکی از تجمع بالای این ماده در این بافت می‌باشد؛ و نتایج مشابه در مطالعات مختلف تایید کننده نتایج حاصل می‌باشد (Ikezawa et

منابع

Bird DA, Facchini PJ (2001) Berberine bridge enzyme, a key branch-point enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, contains a vacuolar sorting determinant. *Planta* 213: 888-897.

Blechert S, Brodschelm W, Holder S, Kammerer L, Kutchan TM, Mueller MJ, Xia ZQ, Zenk MH (1995) The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 4099-4105.

Cline SD, Coscia CJ (1988) Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum*. *Plant physiology* 86: 161-165.

Facchini PJ, De Luca V (1995) Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry* 269:26684-26690.

Facchini PJ, Penzes-Yost C, Samanani N, Kowalchuk B (1998) Expression patterns conferred by tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase promoters from opium poppy are conserved in transgenic tobacco. *Plant Physiology* 118: 69-81.

Frenzel T, Beale JM, Kobayashi M, Zenk MH, Floss HG (1988) Stereochemistry of enzymic formation of the berberine bridge in protoberberine alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* 110: 7878-7880.

Gerardy R, Zank, MH (1993) Formation of salutaridine from (R)- reticuline by amembrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *papaver somniferum*, *Phytochemistry* 32: 79-86.

Ghorbanli M, Fani P, Sateei A (2009). Seasonal changes of alkaloids and phenolic compounds in *Chelidonium majus* L. in two habitats. *Journal on Plant Science Researches* 15: 65-74.

Hagel JM, Facchini PJ (2010) Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology* 6: p.273.

Hashimoto T, Yamada Y (1992) Tropane alkaloid biosynthesis: regulation and application. In proceedings of the 7th Annual Pennsylvania State Symposium on plant physiology. *American Society of Plant Physiologists* 122-134.

Holkova I, Bezakova L, Sek Bilka. F, Bala_zova. A, Blanárikova V (2010) Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver*

somniferum suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:887-892.

Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2007) Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylopine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *The Federation of European Biochemical Societies* 274: 1019-1035.

Ikezawa. N, Iwasa K, Sato F (2008) Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C-C phenol coupling of (S)-reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells. *Journal of Biological Chemistry* 283: 8810-8821.

Khodayari M, Omid M, Shahnejat Booshehri AA, Yazdani D, Naghavi MR (2015) Gene expression involved in sanguinarine biosynthesis is affected by nano elicitors in *Papaver somniferum* L. *Journal of Medicinal Plants* 14: 41-54. (In Farsi)

Kutchan TM, (1993) Enzymology and molecular biology of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Journal of Plant Research* 3:165-173.

Park SU, Johnson AG, Penzes-Yost C, Facchini PJ (1999) Analysis of promoters from tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberine bridge enzyme genes involved in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Molecular Biology* 40:121-131.

Samanani N, Liscombe DK, Facchini PJ (2004). Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal* 40: 302-313.

Takemura T, Ikezawa. N, Iwasa K, Sato F (2012) Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells. *Phytochemistry* 2: 123-133.

Trujillo-Villanueva K, Rubio-Pina J, Monforte-Gonzalez M, Ramirez-Benitez E, Vazquez-Flota F (2012) The sequential exposure to jasmonate, salicylic acid and yeast extract promotes sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnology Letters* 34:379-385.

Verma P, Khan SA, Mathur AK, Ghosh S, Shanker K, Kalra A (2014). Improved sanguinarine production via biotic and abiotic elicitations and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum* with their gene expression studies and upscaling in bioreactor. *Protoplasma* 251:1359-1371.