

## جداسازی ژن *CFS* (*Cheilanthifoline synthase*) از مامیران کبیر و بررسی الگوی بیانی آن تحت تاثیر نانوذرات $\text{TiO}_2$ و $\text{CeO}_2$

### Isolation of *CFS* (*Cheilanthifoline synthase*) gene from *chelidonium majus* and investigation of its expression pattern under $\text{CeO}_2$ and $\text{TiO}_2$ nanoparticles

صالحه درگاهی<sup>۱</sup>، صدیقه فابریکی اورنگ<sup>۲\*</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌زادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران  
۲- دانشیار، گروه ژنتیک و به‌زادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

Salehe Dargahi<sup>1</sup>, Sedigheh Fabriki-Ourang<sup>2\*</sup>

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 بنزوفنانتری‌دین 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 ماریج 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 دی‌اکسیدسربیم و دی‌اکسیدتیتانیوم در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. در گیاهان تیمار شده با دی‌اکسیدسربیم، 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 دی‌اکسیدسربیم 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  
بنزوفنانتری‌دین  
سنگوئینارین  
سیتوکروم P450  
نانوذرات

## مقدمه

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 می دهد. در این رابطه اثر چندین محرک قارچی به همراه محرک های غیرزیستی سالیسیلیک اسید، پراکسید هیدروژن و دی اکسید کربن بر بهبود تولید سنگوئینارین در خشخاش بررسی و مشخص شده است که به دنبال افزایش بیان هشت الی نه برابری ژن های *STS*، *TNMT*، *P6H* و *CFS*، تولید سنگوئینارین در کشت های سلولی خشخاش افزایش یافته و در میان محرک های غیرزیستی، سالیسیلیک اسید مؤثرتر گزارش شده است (Verma et al. 2014). نانومواد بر پایه فلزاتی مانند دی اکسید تیتانیوم ( $nTiO_2$ ) و دی اکسید سرب ( $nCeO_2$ ) اثرات قابل توجهی بر صفاتی مانند جوانه زنی، رشد ریشه و طول ساقه دارند (Thul et al. 2013). همچنین پاسخ ژنومی به این نانوذرات به صورت افزایش بیان ژن ها در برابر تنش های اکسیداتیو و همچنین رشد و توسعه سریع تر گیاهچه گزارش شده است. واکنش متفاوت بیان ژن در پاسخ به  $nTiO_2$  و  $nCeO_2$  نشان می دهد که حالت های عمل برای دو NP اکسید فلزی ممکن است متفاوت باشد و عملی تحریک کننده برای تولید متابولیت های ثانویه محسوب می شوند (Andersen et al 2016).

مطالعه چگونگی تنظیم مسیرهای بیوستتزی و شناسایی عوامل تاثیرگذار در افزایش تولید متابولیت های ثانویه از گام های مهم در جهت مهندسی متابولیک می باشد که استفاده از محرک ها از روش های مؤثر در افزایش تولید محسوب می گردد. در این راستا در پژوهش حاضر، پس از جداسازی و شناسایی ژن کدکننده *Cheilanthisfoline synthase*؛ اثربخشی محرک های نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و دی اکسید سرب بر الگوی بیان ژن *CFS* در اندام های مختلف مامیران کبیر مورد بررسی قرار گرفت.

مامیران کبیر با نام علمی *Chelidonium majus* L. از خانواده خشخاش (Papaveraceae) گیاه دارویی چندساله با شیرابه زرد- نارنجی در ریشه و اندام های هوایی است که به این گیاه خواص ضدالتهابی، ضد عفونی و ضد سرطانی می بخشد. نتایج تحقیقات مختلف نشان می دهد که خواص دارویی و درمانی شیرابه مامیران کبیر به دلیل آلکالوئیدهای موجود در اندام های این گیاه می باشد. این گیاه محتوی مقدار زیادی آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین از جمله سنگوئینارین، کاپتیسین، بربرین، کلریتین و کلیدونین می باشد که خاصیت آنتی باکتریال، ضدتومور، ضد میکروبی، ضد قارچی و ضدالتهابی دارند (Ghorbanli et al., 2009). سنگوئینارین متعلق به آلکالوئیدهای گروه بنزوفناتریدین است که بیشتر در ریشه گیاهان خانواده خشخاش یافت می شود و به عنوان عاملی بازدارنده در برابر گیاه خواران و عوامل بیماری زا شناخته شده است (Park et al. 2012; Trujillo and villanueva et al 2003). بنزوفناتریدین ها زیرگروهی از بنزیل ایزوکوئینولین ها می باشند که از پیش ماده های (اس) - تیکولین و (اس) - اسکولرین ساخته می شوند (Kutchan and zenk, 1993). (اس) - رتیکولین سبب تولید مورفین (1986 Weiczorek et al.,) می شود و (اس) - اسکولرین به عنوان پیش ماده تولید سنگوئینارین (Cline and Coscia 1988) عمل می کند (Cline and Coscia 1988; Frenzel et al. 1988). قابلیت انعطاف مسیر بیوستتزی آلکالوئیدها منجر به تولید آلکالوئیدهای مختلف شده است. بیوستتزی آلکالوئیدها از مواد مختلفی بهره می جوید و به همین دلیل است که آلکالوئیدهای مختلفی در خشخاش و سایر گیاهان یافت می شود (Bird 2001; Facchini 1998). (اس) - اسکولرین توسط آنزیم *Cheilanthisfoline synthase* (CFS) به (اس) - شیلانتیفولین، پیش ماده سنتز سنگوئینارین تبدیل می شود (Hagel and Facchini 2010). این آنزیم به خانواده پروتئینی CYP719 تعلق دارد که ژن های رمزکننده آن از خشخاش کالیفرنیا جداسازی شده است (Ikezawa et al. 2008). محرک های زیستی و غیرزیستی متعددی برای تحریک بیانی ژن های مسیر تولید آلکالوئیدهای بنزوفناتریدین نظیر سنگوئینارین

## 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<sup>۱</sup> در مامیران کبیر، از نانوالیسیستورهای دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدسیریم در دو آزمایش جداگانه در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار استفاده گردید. فاکتورهای مورد بررسی در آزمایش اول شامل دی‌اکسیدتیتانیوم در چهار سطح (غلظت ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه تیمار شاهد (غلظت صفر))، فاکتور مرحله محلول‌پاشی در دو سطح (اول و دوم) و فاکتور زمان نمونه‌گیری پس از القای الیسیستور در سه سطح (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بودند. فاکتورهای مورد بررسی در آزمایش دوم شامل محلول‌پاشی یک مرحله‌ای دی‌اکسیدسیریم در چهار سطح (غلظت ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میلی‌گرم 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. محلول‌پاشی نانوذرات به گیاهچه‌های سه هفته‌ای انجام گرفت و محلول‌پاشی  $\text{TiO}_2$  در دو مرحله با فاصله زمانی ۷۲ ساعت بود. به منظور افزایش میزان نفوذپذیری، به هنگام محلول‌پاشی از Tween 80 (یک درصد، Scharlu) استفاده گردید و گیاهان شاهد (غلظت صفر) با آب دیونیزه حاوی Tween محلول‌پاشی شدند. نمونه‌های برگ‌گی از تیمارهای مختلف در زمان‌های مشخص شده هر دو آزمایش پس از هر محلول‌پاشی تهیه و برای بررسی‌های ملکولی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین پس از آخرین نمونه‌گیری برگ‌گی در زمان ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی دوم آزمایش اول و زمان ۱۲۰ ساعت پس از محلول‌پاشی آزمایش دوم، به منظور مقایسه میزان بیان ژن‌ها در اندام‌های مختلف، نمونه‌گیری از سه اندام ریشه، ساقه و برگ انجام گردید.

طراحی آغازگر برای جداسازی cDNA رمز کننده آنزیم CFS با استفاده از کتابخانه‌های EST<sup>۲</sup> گیاه مامیران صورت گرفت.

<sup>۱</sup> Cheilanthifoline synthase ; CFS

<sup>۲</sup> Expression Sequence Tag; EST

اطلاعات این کتابخانه‌ها و توالی‌های EST آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI<sup>۳</sup> بدست آمد. از Blastn<sup>۴</sup> جهت پیدا کردن توالی‌های EST مرتبط با ژن CFS استفاده شد. از این رو از توالی‌های ژن CFS در گیاهان دیگر خانواده خشخاش که اطلاعات آنها در NCBI موجود بود به‌عنوان 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<sup>۵</sup> سرهم‌سازی شد. از میان کانتیگ‌های ساخته شده توسط برنامه، بلندترین کانتیگ انتخاب شد و چارچوب قرائت باز توالی توافقی با برنامه ORF finder<sup>۶</sup> بدست آمد. برای اطمینان از صحت کانتیگ بدست آمده و چارچوب قرائت باز، Blastp<sup>۷</sup> 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<sup>۸</sup> صورت گرفت و سنتز آغازگرها توسط شرکت Bioneer (کره‌جنوبی) 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، نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I (Fermentas) تیمار شدند و سپس واکنش ساخت cDNA با کیت Hyper Script (602-601) 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 زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real time PCR) به صورت پنج دقیقه در دمای  $94^\circ\text{C}$

<sup>۳</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<sup>۴</sup> <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

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

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

<sup>۷</sup> <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

<sup>۸</sup> <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 آمینواسید 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 آن دسته 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

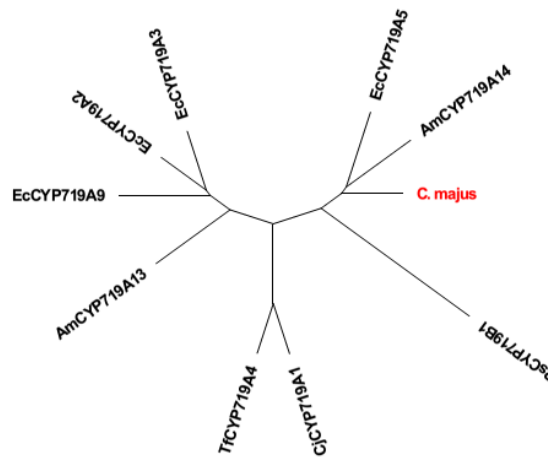
جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی توالی آمینواسیدی ژن رمزکننده آنزیم *Cheilanthifoline synthase (CFS)* جداسازی cDNA رمزکننده CFS از بافت ریشه مامیران انجام شد. پس از تایید همسانه‌های نو ترکیب با PCR، توالی‌یابی و تایید اطلاعات به دست آمده، ژن CFS با طول ۸۱۴ جفت باز با شماره دسترسی MG918088 در پایگاه NCBI 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

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



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

دی‌اکسیدتیتانیوم و تعداد دفعات محلول‌پاشی 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 میلی‌گرم در لیتر در دومین مرحله از محلول‌پاشی بود (شکل ۳). اثرات متقابل مرحله محلول‌پاشی در زمان‌های مختلف نیز به طور معنی‌داری بر بیان ژن *CFS* معنی‌دار بود، به طوری که بیشترین میزان بیان ژن *CFS* مربوط به ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی دوم و کمترین میزان بیان آن ۲۴ ساعت پس از گذشت اولین محلول‌پاشی بود. در اثر متقابل سه جانبه نیز بیشترین میزان بیان ژن *CFS* مربوط به ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی اول در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید (شکل ۳).

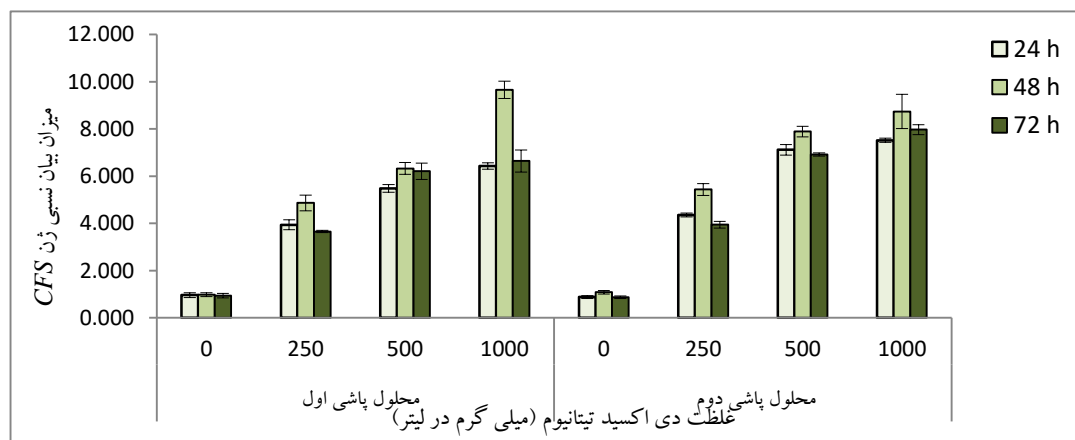
بیشترین میزان بیان ژن *CFS* مربوط به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار بود و کمترین میزان بیان مربوط به عدم استفاده این ماده (تیمار شاهد) بود. همچنین نتایج مقایسه میانگین بیانگر افزایش میزان بیان ژن *CFS* با گذشت زمان بود به طوری که افزایش بیان تا ۴۸ ساعت ادامه داشته و حداکثر میزان 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 می‌باشد (Hagel and Facchini, 2010). اثرات متقابل غلظت‌های مختلف

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات غلظت، مدت زمان و تعداد محلول‌پاشی

با نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم 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 <sup>ns</sup>
غلظت	۳	۲۲۰/۳۷ <sup>**</sup>
زمان	۲	۱۰/۸۶ <sup>**</sup>
غلظت × زمان	۶	۲ <sup>**</sup>
محلول‌پاشی	۱	۷/۳۱ <sup>**</sup>
غلظت × محلول‌پاشی	۳	۱/۸۱ <sup>**</sup>
زمان × محلول‌پاشی	۲	۰/۳۸ <sup>**</sup>
غلظت × زمان × محلول‌پاشی	۶	۱/۰۹ <sup>**</sup>
خطای آزمایش	۶۹	۰/۰۶۷

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



شکل ۳- تغییرات بیان نسبی ژن *CFS* در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف دی‌اکسید تیتانیوم طی دو بار محلول‌پاشی

در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*)

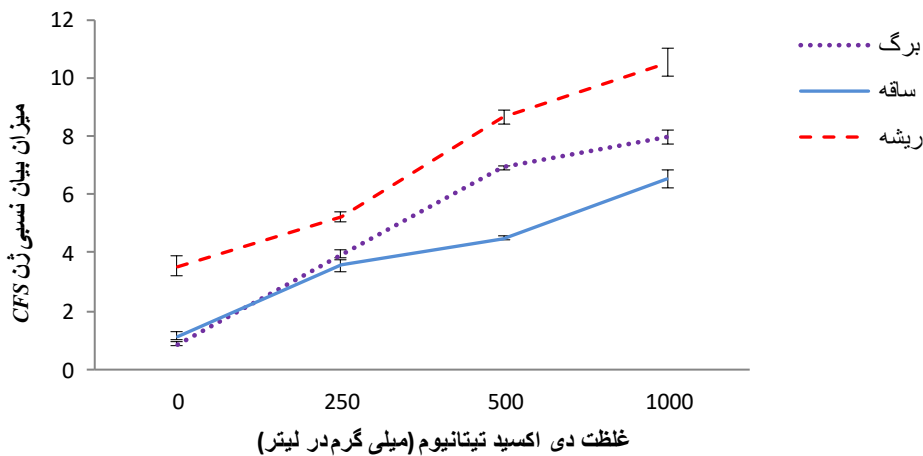
حاصل از این تحقیق، در گیاه خشخاش نیز بالا بودن فراوانی نسبی رونوشت‌های ژن *MSH* در ریشه و به دنبال آن تجمع سنگوئینارین در ریشه‌های این گیاه گزارش شده است؛ به طوری که رونوشت‌های این ژن در تمام اندام‌ها وجود دارد ولی در ریشه تجمع بیشتری داشته است (Beaudoin and Facchini 2013).

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

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 <sup>ns</sup>
غلظت	۳	۹۷/۰۸ <sup>**</sup>
اندام	۲	۳۸/۹۶ <sup>**</sup>
غلظت × اندام	۶	۲/۱۹ <sup>**</sup>
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 نانوذر 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 نانوذر 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 نانوذر 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

نانوذر 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 <sup>ns</sup>
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*)

(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 حدوداً

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

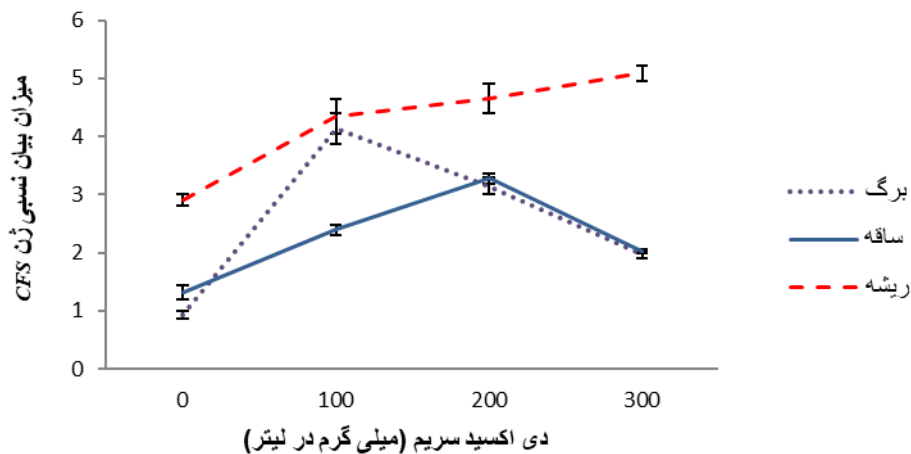
می‌دهند که سنگوئینارین در ریشه این گیاهان تجمع می‌یابد که این به‌دنبال تجمع مقادیر قابل ملاحظه‌ای از رونوشت ژن‌های *STS* (verma et al., 2014)، *BBE* (Hagel et al., 2012)، *MSH* (Beaudoin and Facchini., 2013) و *P6H* (Blechert et al., 1995) اتفاق می‌افتد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ژن‌های مسیر بیوستزی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

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 پروتئینی 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

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 <sup>ns</sup>
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

میکروبی، به‌عنوان جذب کرده‌افشان‌ها و جانوران متشرکننده بذر، رقابت گیاه با گیاه و همزیستی گیاه با میکروب نقش

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

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., 2010; Holkova et al 2004) سطح بالای رونوشت ژن‌های کنترل-کننده 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 آکالوئیدهایی 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 این‌صورت که سنگوئینارین سنتز شده در ساقه به سمت ریشه انتقال بیابد. الگوی بیانی مختص بافت در ژن‌های مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین در مطالعات

دارند. عموماً متابولیت‌های ثانویه در سه خانواده مولکولی بزرگ، گروه ترکیبات نیتروژن‌دار، ترپن‌ها و فنل‌ها در نظر گرفته می‌شوند. در این میان موادی که تحت‌عنوان آکالوئیدها 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 آکالوئیدی، دارای جایگاه ویژه‌ای در میان گیاهان دارویی می‌باشند (Bourgaud et al., 2001).

مامیران کبیر حاوی میزان زیادی آکالوئیدهای ایزوکوئینولین از جمله سنگوئینارین، کاپتیسین، بربرین، کلریتین، کلیدونین با خاصیت آنتی‌باکتریال، ضدتومور، ضد میکروبی، ضدقارچی و ضدالتهابی می‌باشد (Ghorbanli et al., 2009; Zare Shahneh et al 2013). بیوسنتز 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 آکالوئیدهای ارزشمند بنزوفناتریدین (تبائین و سنگوئینارین) در خشخاش گزارش شده است (Khodayari et al 2015). بنابراین با کاربرد محرک‌ها می‌توان چرخه بیوسنتزی 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، موثر بودن این محرک بر بیان این ژن‌ها نیز گزارش شده است. به طوری که پس از روند

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

### منابع

Bird DA, Facchini PJ (2001) Berberine bridge enzyme, a key branch-point enzyme in benzyloisoquinoline 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, Satei 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 7<sup>th</sup> 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*

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

*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, Omidi 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 benzyloisoquinoline 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 benzyloisoquinoline 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.