ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۴۴۷-۴۳۷

جداسازی ژن *CFS* (*Cheilanthifoline synthase*) از مامیران کبیر و بررسی الگوی بیانی آن تحت تاثیر نانوذرات CeO2 وTiO2

Isolation of CFS (Cheilanthifoline synthase) gene from chelidonium majus and investigation of its expression pattern under CeO2 and TiO2 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 Dargahi [1], 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 اعضاء 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 مارپیچ K تایید کننده تعلق آنزیم CFS به خانواده پروتیینی سیتوکروم P450 بود. الگوی تغییرات بیانی ژن *CFS* در ریشه، ساقه و برگ مامیران تیمار شده با نانوذره‌های دی‌اکسیدسریم و دی‌اکسیدتیتانیوم در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. در گیاهان تیمار شده با دی‌اکسید سریم، 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 دی‌اکسیدسریم در مامیران کبیر می‌باشد؛ بنابراین اطلاعات بدست آمده از ساختار ژن و نیز موثر بودن محرک‌های مورد استفاده می‌تواند در راستای افزایش میزان آلکالویید سنگوئینارین از طریق مهندسی متابولیک مفید واقع گردد.

واژه‌های کلیدی

آلکالوئید
بنزوفنانتریدین
سنگوئینارین
سیتوکروم P450
نانوذرات

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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 می بخشد. نتایج تحقیقات مختلف نشان می دهد که خواص دارویی و درمانی شیرابه مامیران کبیر به‌دلیل آلکالوئیدهای موجود در اندام‌های این گیاه می باشد. این گیاه محتوی مقدار زیادی آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین از جمله سنگوئینارین، کاپتیسین، بربرین، کلریترین وکلیدونین می‌باشد که خاصیت آنتی‌باکتریال، ضدتومور، ضدمیکروبی، ضدقارچی و ضدالتهابی دارند (Ghorbanli et al., 2009).سنگوئینارین متعلق به آلکالوئیدهای گروه بنزوفنانتریدین است که بیشتر در ریشه گیاهان خانواده خشخاش یافت می‌شود و به‌عنوان عاملی بازدارنده در برابر گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زا شناخته‌شده‌است (Park et al. 2003; Trujillo and villanueva et al 2012). بنزوفنانتریدین‌ها زیرگروهی از بنزیل‌ایزوکوئینولین‌ها می باشند که از پیش‌ماده‌های (اس)- تیکولین و (اس)-اسکولرین ساخته می‌شوند (Kutchan and 1993 ,zenk). (اس)-رتیکولین سبب تولید مورفین (1986 ,.Weiczorek et al) می‌شود و (اس)-اسکولرین به‌عنوان 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 به‌همین دلیل است که آلکالوئیدهای مختلفی در خشخاش و سایر گیاهان یافت می شود (Bird 2001; Facchini 1998).

(اس)-اسکولرین توسط آنزیم Cheilanthifoline 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 ژن‌های رمزکننده آن از خشخاش کالیفرنیا جداسازی شده‌است (Ikezawa et al. 2008).

محرک‌های زیستی و غیرزیستی متعددی برای تحریک بیانی ژن-های مسیر تولید آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین 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، پراکسیدهیدروژن و دی اکسیدکربن بر بهبود تولید سنگوئینارین در خشخاش بررسی و مشخص شده است که به‌دنبال افزایش بیان هشت الی نه برابری ژن‌های *P6H*، *TNMT*، *STS* 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 سریم ($nCeO_2$) اثرات قابل توجهی بر صفاتی مانند جوانه‌زنی، رشد ریشه و طول ساقه دارند (Thul et al. 2013). همچنین پاسخ ژنومی به این نانوذرات به‌صورت افزایش بیان ژن‌ها دربرابر تنش‌های اکسیداتیو و همچنین رشد و توسعه سریع‌تر گیاهچه گزارش‌شده‌است. 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 گام های مهم در جهت مهندسی متابولیک می‌باشد که استفاده از محرک‌ها از روش های مؤثر در افزایش تولید محسوب می‌گردد. در این راستا در پژوهش حاضر، پس از جداسازی و شناسایی ژن کدکننده *Cheilanthifoline synthase*؛ اثربخشی محرک‌های نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدسریم بر الگوی بیان ژن *CFS* در اندام‌های مختلف مامیران کبیر مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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 ۲ ± ۲۵ °C و شرایط ۱۶ h روشنایی/ ۸ h تاریکی در گلخانه کشت گردید. به منظور بررسی تغییرات بیان ژن *CFS*[1] در مامیران کبیر، از نانوالیسیتورهای دی‌اکسیدتیتانیوم و دی‌اکسیدسریم 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 الیسیتور در سه سطح (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بودند. فاکتورهای مورد بررسی در آزمایش دوم شامل محلول‌پاشی یک مرحله‌ای دی‌اکسیدسریم در چهار سطح (غلظت ۱۰۰،۲۰۰،۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه تیمار شاهد (غلظت صفر) و فاکتور زمان پس از القای الیسیتور در چهار سطح (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت) بودند. محلول‌پاشی نانوذرات به گیاهچه‌های سه هفته‌ای انجام گرفت و محلول‌پاشی TiO2 در دو مرحله با فاصله زمانی ۷۲ ساعت بود. به‌منظور 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 برگی 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 برگی در زمان ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی دوم آزماشی اول و زمان ۱۲۰ ساعت پس از محلول پاشی 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[2] گیاه مامیران صورت گرفت. اطلاعات این کتابخانه‌ها و توالی‌های EST آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI[3] بدست آمد. از Blastn[4] 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 افزارEgassembler[5] سرهم‌سازی شد. از میان کانتیگ‌های ساخته شده توسط برنامه، بلندترین کانتیگ انتخاب شد و چارچوب قرائت باز توالی توافقی با برنامه ORF finder[6] بدست آمد. برای اطمینان از صحت کانتیگ بدست آمده و چارچوب قرائت باز، Blastp[7] 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 هترودایمر، دمای ذوب و درصد GC با Oligo analyzer[8] 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 RNAبا آنزیم DNase I (Fermentas) تیمار شدند و سپس واکنش ساختcDNA با کیت Hyper Script (602 -601) شرکت GeneAllمطابق با دستوالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

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

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real time PCR) به صورت پنج دقیقه در دمای ۹۴°C

[1] Cheilanthifoline synthase ; CFS
[2] Expression Sequence Tag; EST

[3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov
[4] https://blast.ncbi.nlm.nih.gov
[5] http://www.genome.jp/tools/egassembler
[6] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder
[7] https://blast.ncbi.nlm.nih.gov
[8] https://eu.idtdna.com/calc/analyzer

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

برای واسرشته سازی 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. واکنشRT-PCR، در چهار تکرار (دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی) اجرا شد. میزان بیان نسبی ژن مورد بررسی با روش $^{\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001) محاسبه شد. تجزیه آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با نرم‌افزار MSTAT-C و رسم نمودارها با نرم‌افزارExcel (ver. 2010) انجام شد.

نتایج و بحث

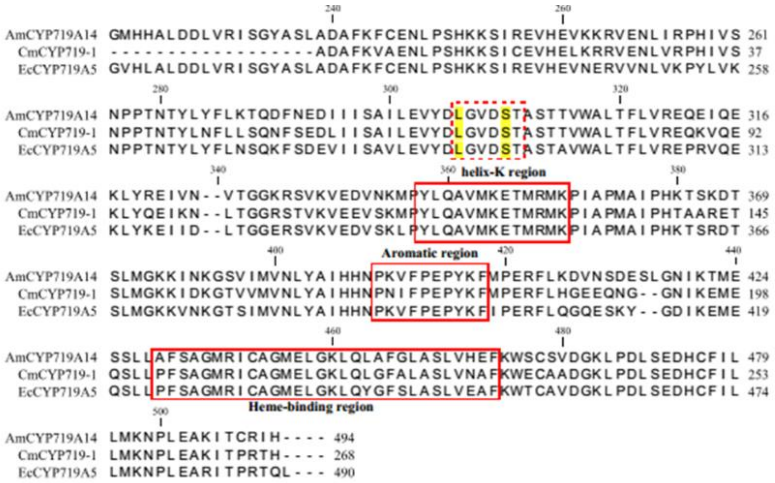
جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی توالی آمینواسیدی ژن رمز کننده آنزیم Cheilanthifoline synthase (CFS)

جداسازی cDNA رمزکننده CFS از بافت ریشه مامیران انجام شد. پس ازتایید همسانه‌های نوترکیب با PCR، توالی‌یابی و تایید اطلاعات به‌دست 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 خانواده پروتیینی helix K region، aromatic region و-heme 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 شکل۱) (Ikezawa et al., 2003, 2007). پس از هم‌ردیف‌سازی توالی*CFS* از مامیران‌کبیر با دیگر پروتئین‌های خانواده P450؛ به‌ویژه آن‌دسته از پروتئین‌هایی که در بیوسنتز آلکالوییدهای ایزوکوئینولین نقش دارند و بررسی روابط فیلوژنی (شکل۲)؛ توالی پروتئینی CFS بیشترین شباهت را به AmCYP719A14 از گیاه *Argemone mexicana* داشت، که هر دو به زیرخانواده CYP719 تعلق دارند.

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

نام آغازگر	توالی آغازگرها (3′→5′)	دمای اتصال (درجه سلسیوس)	طول قطعه تکثیری (bp)
CFS F	TCATACTTAATGGGTGCGAG	۵۷/۶	۸۱۴
CFS R	TGCTGATGCTTTCAAAGTCG		
qCFS-F	ATGGGAATGTGCTGCTGATG	۶۰	۱۹۰
qCFS-R	ACTTAATGGGTGCGAGGAGT		
Actin F	GCCCCTAGCAGCATGAAGAT	۶۰	-
Actin R	GCACTTCCTGTGGACAATGG		

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



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



شکل۲- 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 تأثیر قراردهد. 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

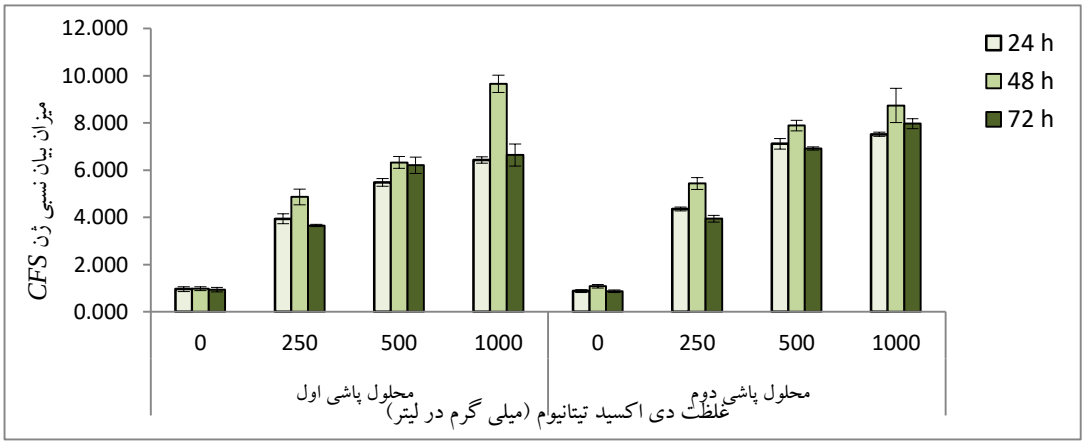
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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 به‌طوری 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 غلظت‌های مختلف 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).

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^{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× محلول‌پاشی	۶	۱/۰۹**
خطای آزمایش	۶۹	۰/۰۶۷

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



شکل ۳- تغییرات بیان نسبی ژن CFS درزمان‌ها و غلظت‌های مختلف دی اکسید تیتانیوم طی دو بار محلول‌پاشی در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*)

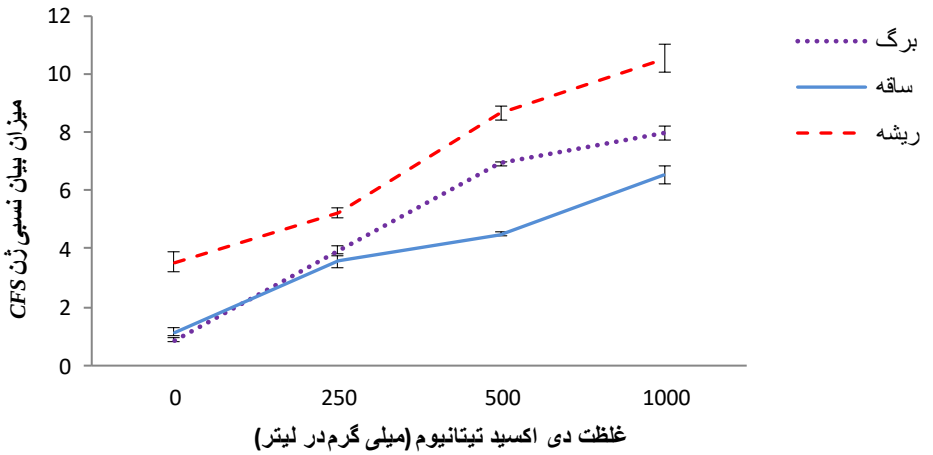
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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 به‌طوری که بیان ژن *CFS* در ریشه حدودا ۱/۵ برابر برگ و ۱/۸ برابر ساقه بود (شکل۳). 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 ** : به‌ترتیب 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

پاسخ بیانی ژن *CFS* به نانوذره دی‌اکسید سریم

با بررسی نتایج تجزیه واریانس مشخص شد که دی‌اکسیدسریم بیان ژن *CFS* را در مامیران کبیر (با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد) تحت تاثیر قرار داد، به‌گونه‌ای که بیان این ژن نه‌تنها تحت تاثیر این نانوذره قرار گرفت؛ بلکه زمان اثر این ماده و غلظت‌های مختلف آن نیز (اثرمتقابل غلظت در زمان) پاسخ بیانی متفاوتی را نشان دادند (جدول ۴). در مقایسه میانگین بیان ژن *CFS* (شکل ۵)، غلظت‌های استفاده شده نانوذره دی‌اکسید سریم افزایش بیان ژن نسبت به شاهد را نشان دادند. بیشترین میزان بیان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کمترین آن در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر (شاهد) مشاهده شد و غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روند کاهش بیان این ژن نشان داد (شکل ۵). میزان بیان این ژن با گذشت زمان تا ۷۲ ساعت افزایشی بود به‌طوری که، با گذشت ۷۲ ساعت از اعمال ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر دی‌اکسید 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 دی‌اکسیدسریم 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 ** : به‌ترتیب عدم اختلاف و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۵- میزان تغییرات بیان نسبی ژن CFS درزمان‌های متفاوت و غلظت‌های مختلف دی اکسید سریوم در مامیران کبیر (***Chelidonium majus***)

تجزیه واریانس مشخص نمود که میزان تغییرات بیان ژن *CFS* در اندام‌های مختلف گیاه (ریشه، برگ و ساقه) نیز دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد (P<0/01) می‌باشند (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، به‌طوری که بیان این ژن در ریشه حدودا

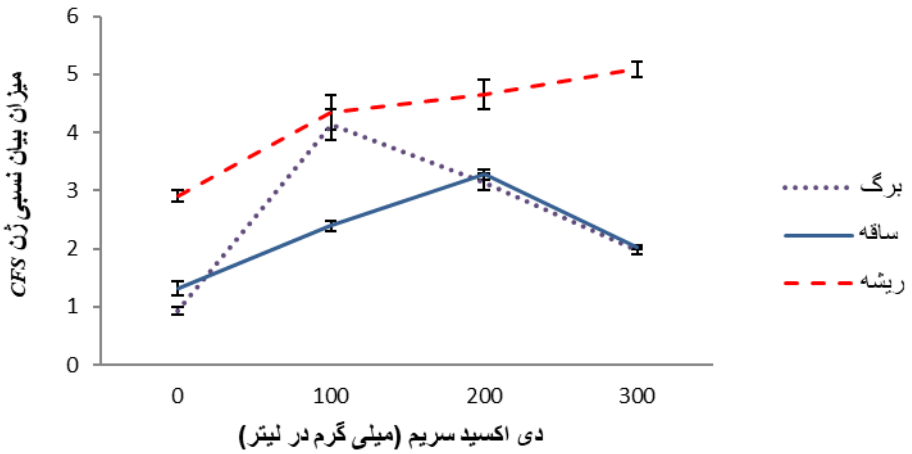
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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 بیشترآنزیم 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 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 بیوسنتزی سنگوئینارین دارای سیستم بیانی بافت اختصاصی (Tissue-specific) می‌باشند.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثرات غلظت و اندام گیاهی در تیمار با نانوذره دی‌اکسیدسریم 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 ** : به‌ترتیب 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 دی اکسیدسریم

متابولیت‌های ثانویه با عملکردهای اکولوژیکی مهم در گیاهان؛ در حفاظت گیاهان در برابر گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زای میکروبی، به‌عنوان جذب گرده‌افشان‌ها و جانوران منتشرکننده بذر، رقابت گیاه با گیاه و همزیستی گیاه با میکروب نقش

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

دارنـد. عمومـاً متابولیت‌های ثانویه در سه خانواده مولکولی بزرگ، گـروه ترکیبـات نیتروژن‌دار، ترپن‌ها و فنل‌ها درنظر گرفتـه مـی‌شـوند. در این میان موادی که تحت‌عنوان آلکالوئیدها طبقه بندی می‌شوند، از جمله متابولیت‌های ثانویه گیاهی، میکروبی و حتی جانوری با خواص فارماکولوژیکی گسترده محسوب می-شوند و گیاهان خانواده پاپاوراسه به‌دلیل تنوع محتوای آلکالوئیدی، دارای جایگاه ویژه‌ای در میان گیاهان دارویی می‌باشند (Bourgaud et al., 2001).

مامیران کبیر حاوی میزان زیـادی آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین از جملـه سـنگوئینـارین، کاپتیسـین، بربـرین، کلریتـرین، کلیـدونین با خاصـیت آنتـی‌باکتریـال، ضدتومور، ضـدمیکروبی، 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) reticulinانجام می گیرد. آنزیم Cheilanthifoline (CFS) synthase، (اس)-اسکولرین را به (اس)-شیلانتیفولین که پیش ماده سنتز سنگوئینارین است تبدیل می کند (Hagel and Facchini 2010). در توافق با نتایج حاصل از این پژوهش، اثربخشی محرک‌های زیستی (عصارهٔ مخمر) و غیر زیستی (نانو ذره TiO_2) بر افزایش و بهبود تولید انواع آلکالوئیدهای ارزشمند بنزوفنانتریدین (تبائین و سنگوئینارین) در خشخاش گزارش شده است (Khodayari et al 2015). بنابراین با کاربرد محرک‌ها می‌توان چرخهٔ 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 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 (Holkova et al 2004 ; al., 2010; Samanani et al.,) سطح بالای رونوشت ژن‌های کنترل-کننده این مسیر ازجمله *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 به‌نظر 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 سالوتاردینول‌سنتتاز 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 این‌صورت که سنگوئینارین سنتز شده در ساقه به سمت ریشه انتقال بیابد. الگوی بیانی مختص بافت در ژن‌های مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین در مطالعات

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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 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 benzylisoquinoline 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, Omidi M, Shahnejat Booshehri AA, Yazdani D, Naghavi MR (2015) Gene expression involved in sanguinarine biosynthes 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 benzylisoquinoline 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 benzylisoquinoline 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]