بررسی تغییر بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز سنگوئینارین تحت تأثیر نانوالیسیتورها در گیاه *Papaver somniferum* L.

مهدیه خدایاری[۱]، منصور امیدی[۲*]، علی‌اکبر شاه‌نجات‌بوشهری[۳]، داراب یزدانی[٤]، محمدرضا نقوی[٥]

۱- دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳- دانشیار گروه اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران
٤- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان داویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
٥- استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران
*آدرس مکاتبه: کرج، سه راه دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، تلفن و نمابر: ۳۲۲۳۲۱۸۷ (۰۲٦)
پست الکترونیک: momidi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۸ **تاریخ تصویب:** ۹٤/۳/٦

چکیده

مقدمه: گیاه پاپاور یکی از منابع مهم تولید متابولیت ضدمیکروبی و ضدسرطانی سنگوئینارین، در صنعت داروسازی می‌باشد.

هدف: این پژوهش، با هدف افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر سنتز این متابولیت ارزشمند توسط نانوالیسیتورها در سوسپانسیون سلولی گیاه پاپاور انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه اثر دو نانوالیسیتور (نانونقره و نانودی‌اکسیدتیتانیوم)، بر تغییر بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی متابولیت سنگوئینارین (*tydc7*، *bbe1*، *DIOX2* و *DBOX*) در محیط کشت سوسپانسیون سلولی دو ریزنمونه حاصل از مریستم ساقه و ریشه، در پنج بازه زمانی (٦، ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ١٦٨ ساعت) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: تمام ژن‌های مورد مطالعه بیشترین تغییرات بیانی را در ساعت‌های اولیه پس از تیمار با نانوالیسیتورها در هر دو ریزنمونه نشان دادند که پس از گذشت زمان، بیان آنها به طور معنی‌داری کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد کوچک بودن این ذرات، نفوذ آنها را به درون سلول تسریع کرده تا در کوتاه‌ترین زمان (٦ تا ٢٤ ساعت) بیشترین تأثیر را بر بیان ژن‌های بیوسنتزی سنگوئینارین داشته باشند؛ در سایر پژوهش‌ها این افزایش پس از گذشت ٤٨ ساعت از زمان تیمار قابل مشاهده بود. این بررسی در دو بافت نامتمایز کالوس حاصل از مریستم و ریشه انجام شد اما نکته قابل توجه تفاوت بیان ژن‌ها در هر دو ریزنمونه با یکدیگر بود؛ به عبارتی تفاوت بیان در کالوس‌های حاصل از ریشه و مریستم، اثری از حافظه سلولی را، با توجه به پروفایل بیان ژن در گیاه (خواستگاه ریزنمونه) به همراه داشت.

گل‌واژگان: *Papaver somniferum* L.، بیان ژن، ریزنمونه، نانوالیسیتور

مقدمه

پاپاور با نام علمی *Papaver somniferum* L. متعلق به خانواده Papaveraceae گیاهی است دیپلوئید (۲n=۲x=۲۲)، علفی و یک‌ساله که بومی غرب آسیا و جنوب‌شرقی اروپا می‌باشد و تاریخچه استفاده از آن به عنوان گیاه دارویی به بیش از ۳۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح برمی‌گردد [۱]. خصوصیات دارویی این گیاه مربوط به قابلیت تولید و بیوسنتز گروهی از آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین از زیر گروه آلکالوئیدهای بنزیل-ایزوکوئینولین‌ها (Benzylisoquinoline) می‌باشد که بسیاری از آنها دارای خصوصیات و فعالیت‌های مهم دارویی می‌باشند و برخی نیز به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ از جمله این داروها می‌توان به مسکن‌هایی نظیر مورفین (Morphine) و کدئین (Codeine)، آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سنگوئینارین (Sanguinarine) با خاصیت ضدمیکروبی و ضدالتهابی، نوسکاپین (Noscapine)، با خاصیت ضدسرفه و ضد توموری، پاپاورین (Papaverine) به عنوان گشادکننده رگ‌ها و توبوکورارین، شل‌کننده عضلات، اشاره نمود [۲].

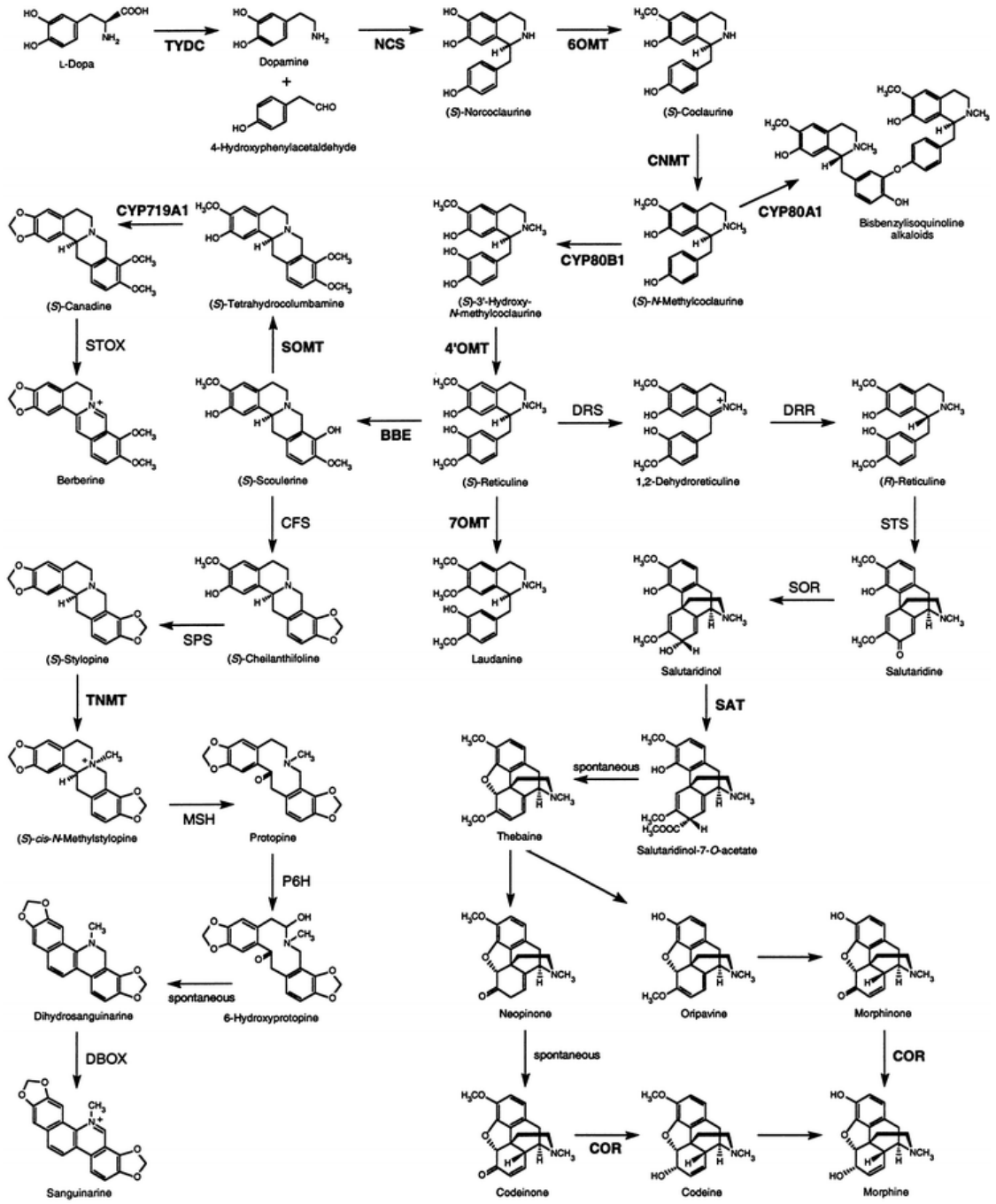
در این مطالعه بیان نسبی چهار ژن کلیدی مسیر بیوسنتز سنگوئینارین در گیاه پاپاور، با انجام واکنش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. این روش یکی از دقیق‌ترین روش‌ها برای بررسی تغییرات بیان ژن است که در آن تعداد مهم نیست بلکه افزایش و یا کاهش بیان ژن مهم می‌باشد که این تغییرات را با یک کنترل داخلی که ژن استاندارد یا مرجع است، مقایسه شده و مقدار نرمال شده‌ی CT نسبت به یک نمونه‌ی تیمار نشده سنجیده می‌شود [۳]. ژن Elongation factor α 1 (*elf-alpha 1*) که در این مطالعه از آن استفاده شده است، یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ترجمه در یوکاریوت‌ها بوده و از انواع ژن‌های مرجع می‌باشد که در همه سلول‌ها با تعداد کپی یکسان بیان شده و بیان آن تحت شرایط تنش تغییر نمی‌کند [٤، ۳].

شناسایی مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین و ژن‌های دخیل در این مسیر در گیاه پاپاور تا حدود زیادی صورت گرفته است (شکل شماره ۱) [۵]. بیوسنتز بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها با تبدیل تیروزین به دوپامین و ٤- هیدروکسی فنیل استالدئید (4-Hydroxy phenylacetaldehyde) (با شبکه‌ای از دکربوکسیلاسیون، اورتوهیدروکسیلاسیون و دآمیناسیون) آغاز می‌شود. آلکالوئیدهای پاپاور از دو مولکول اسید آمینه L- تیروزین در طی چندین واکنش اکسیداتیو پیوسته، که اولین آن تیروزین دکربوکسیلاز می‌باشد، سنتز می‌شوند. تیروزین دکربوکسیلاز (TYDC) یک L- آمینو اسید دکربوکسیلاز حلقوی رایج و عمومی در گیاهان می‌باشد که در گونه‌های مختلف گیاهی بیوسنتز تعداد زیادی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه به آن وابسته می‌باشد [٦] و با حذف یک گروه کربوکسیل از تیروزین و دی‌هیدروکسی فنیل‌آلانین (دوپا) آنها را به ترتیب به تیرامین و دوپامین تبدیل می‌کند تاکنون هشت ژن جداسازی شده و بر اساس شباهت توالی، به دو زیرخانواده‌ی *TYDC1* و *TYDC2* تقسیم شدند. در این دسته‌بندی *tydc1*، *tydc4*، *tydc6*، *tydc8* و *tydc9* در یک گروه و *tydc2*، *tydc3* و *tydc7* در گروه دیگر قرار گرفتند [٦].

اولین قدم در بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین، تبدیل (S) رتیکولین به (S) اسکولرین توسط آنزیم BBE1 می‌باشد [۷] (S) اسکولرین، پیش ماده بیوسنتزی گروه بزرگی از بنزوفنانتریدین‌ها از جمله سنگوئینارین است. به نظر می‌سد که *bbe1* نقش کلیدی را در تنظیم تجمع آلکالوئیدها در محیط کشت بازی کند [۸].

DIOX2، ژن مؤثر در مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین است که در تبدیل اسکولرین به (S) شیلانتیفولین پیش‌ماده سنتز سنگوئینارین نقش دارد [۵]. دیگر ژن مورد بررسی در این مطالعه ژن کلیدی و مهم *DBOX* بوده که مسئول تنظیم آستانه تحمل سلولی به سمیت سنگوئینارین است و با افزایش سنگوئینارین در سلول، بیان این ژن کاهش یافته تا سلول‌ها را از سمیت این ماده دور نگه دارد [۹].

مطالعه نحوه تنظیم این مسیر و شناسایی مراحل تأثیرگذار بر سرعت تولید این متابولیت‌های ارزشمند جز اولین و مهم‌ترین گام‌ها در جهت مهندسی متابولیک به منظور افزایش تولید آنها می‌باشد. تحریک آنزیمی به کمک الیسیتورها یکی از این روش‌ها است. الیسیتورها ترکیباتی با منشاء زیستی و یا



شکل شماره ۱- مسیر بیوسنتزی بنزیل‌ایزوکوئینولین آلکالوئیدها. اختصارات آنزیمی بدین شرح است:

6OMT: نورکوکلارین ٦ اُمتیل ترنسفراز؛ **4OMT**: ۳ هیدروکسیNمتیل کوکلارین ٤-اُ-ترنسفراز؛ **7OMT**: رتیکولین ۷-اُ-متیل ترنسفراز؛ **BBE**: بربرین بریدج آنزیم؛ **CFS**: شیلانتیفولین سینتاز؛ **CNMT**: کوکلارین N متیل ترنسفراز؛ **COR**: کدئین ردوکتاز **CYP719A1**: کانادین سینتاز؛ **CYP80A1**: برباموئین سینتاز؛ **CYP80B1**: N-متیل کوکلارین-۳ – هیدروکسیلاز؛ **DBOX**: دی هیدروبنزوفنانتریدین اکسیداز؛ **DRR**: ۱.۲ دهیدرو رتیکولین ردوکتاز؛ **DRS**: ۱.۲ دهیدرو رتیکولین سینتاز؛ **MSH**: N- متیل استیلوپین ١٤- هیدروکسیلاز؛ **NCS**: نورکوکلارین سینتاز؛ **P6H**: پروتوپین ٦- هیدروکسیلاز؛ **SAT**: سالوتاردینول ۷-اُ-استیل ترنسفراز **SOMT**: اسکولرین ۹- اُ- متیل ترنسفراز؛ **SOR**: سالوتاردین؛ **NADPH**: ۷- اکسیدوردوکناز، **SPS**: استیلوپین سینتاز؛ **STOX**: (S)- تتراهیدروکسی پروتوبربرین اکسیداز؛ **STS**: سالوتاردین سینتاز؛ **TNMT**: تتراهیدروپروتوبربرین سیس-N- متیل ترنسفراز؛ **TYDC**: تیروزین دکربوکسیلاز (٤)

غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند [۱۱ – ۱۰]. استفاده از نانوذرات به عنوان الیسیتور در سال‌های اخیر نیز گزارش شده است. راعی و همکاران (۲۰۱۳)، توانستند با استفاده از نانوذرات نقره و دی‌اکسید تیتانیوم موجب افزایش میزان آلوئین در کشت سوسپانسیون سلولی *Aloe vera* شوند [۱۲]. نانو ذره دی‌اکسید تیتانیوم در گیاهان از طریق افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز بر متابولیسم نیتروژن اثر گذاشته و باعث افزایش رشد و میزان فتوسنتز می‌شود؛ همچنین به خاطر اندازه کوچک آن، به سرعت به درون سلول نفوذ کرده و منجر به افزایش میزان پروتئین و تحریک بیان ژن در سلول‌های گیاهی می‌شود [۱۳]. ذرات نانونقره ذراتی آبدوست با خواص ویژه و قطری در حدود یک تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشند که هسته آن را فلز نقره و اطراف آن را اکسیدنقره در بر گرفته است [۱٤]. استفاده از نانوذرات توسط بنداریان و همکاران (۲۰۱۳)، نیز گزارش شده است که با استفاده از سه نانوذره مس، آهن و سیلسیوم، موفق به افزایش متابولیت‌های پاپاورین، تبائین و کدئین در سوسپانسیون سلولی پاپاور شدند [۱۵]. در گیاه پاپاور، سنگوئینارین بیشترین ماده تولید شده در ریشه‌ها می‌باشد که در محیط کشت‌های سلولی تمایز نیافته پاپاور، پس از تیمار با الیسیتور قارچی، شناسایی شده است [۱۸ – ۱٦].

با توجه به اهمیت دارویی گیاه پاپاور در صنعت داروسازی، به نظر می‌رسد بتوان با استفاده از نانو الیسیتورها در کشت‌سلولی، بیان ژن‌های دخیل در مسیر تولید متابولیت‌های مهم آن را تغییر داد و شاهد افزایش آنها بود. در این راستا اثر دو نانوالیسیتور مختلف بر تغییر بیان ژن‌های مسئول بیوسنتز سنگوئینارین در دو ریزنمونه ریشه و مریستم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور *P. somniferum* L.، در سال ۱۳۸۹ از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی واقع در مجتمع تحقیقاتی در کیلومتر ۵۵ جاده تهران – قزوین تهیه شد. برای به دست آوردن گیاهچه‌های سترون، بذور با الکل ۷۰ درصد به مدت ٦۰ ثانیه و هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵ درصد به مدت ده دقیقه در شرایط سترون، ضدعفونی سطحی شده و پس از ۵ – ۳ بار شستشو با آب مقطر دو بار سترون در ظروف سترون حاوی محیط کشت ½MS فاقد هورمون با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار و pH: ۵/۸، کشت شدند و به مدت دو هفته در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به اتاق کشت با دمای ۲ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱٦ ساعت روشنایی (حدود ٦۰۰۰ لوکس) و هشت ساعت تاریکی انتقال یافتند [۲]. جوانه‌زنی بذور بعد از گذشت سه هفته آغاز شد. پس از دست‌یابی به گیاهچه‌هایی به ارتفاع حدوداً ۱۰ – ۸ سانتی‌متر، ریزنمونه‌های مناسب از ناحیه مریستم انتهایی ساقه، دمبرگ، برگ، طوقه و ریشه برای مرحله کال‌زایی، انتخاب و به محیط کال‌زایی، یعنی محیط ½MS با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار به همراه تیمارهای هورمونی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (6-Benzylaminopurine, Sigma, B3408, USA) و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (Sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate monohydrate, Sigma, D6649,USA)، منتقل شدند. کالوس‌های مورد نظر پس از دو بار واکشت چهار هفته‌ای، مورد ارزیابی قرار گرفتند و کالوس‌های ریشه و مریستم ساقه به عنوان بهترین کالوس‌ها، به محیط سوسپانسیون ½MS (فاقد آگار) (در ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری) با همان ترکیب هورمونی محیط کال‌زایی (مخصوص مریستم و ریشه) منتقل شده و در شیکر یخچال‌دار در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. پس از بررسی روند رشد کالوس‌ها در محیط کشت مایع در سه تکرار و مشخص شدن زمان مناسب رسیدن به رشد مطلوب در فاز نمایی، سوسپانسیون‌هایی با رشد یکنواخت کالوس انتخاب و با نانوالیسیتورها تیمار شدند؛ برای تیمار هر نمونه، یک میلی‌لیتر از الیسیتورهای نانودی‌اکسیدتیتانیوم (به صورت محلول، تهیه شده از دانشکده علوم و فنون دانشگاه تهران) و نانو نقره (به صورت محلول، تهیه شده از دانشکده بیوشیمی دانشگاه بوعلی همدان) به

ترتیب با غلظت‌های ۱۲۰ گرم در لیتر و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر آب مقطر دوبار سترون، در شرایط سترون و در زیر هود لامینار به هر ارلن به عنوان واحدهای آزمایشی، اضافه شد. برای استفاده از الیسیتورها در محیط کشت، غلظت‌ها بر طبق مطالعات قبلی انتخاب شدند [۱۸، ۱۲]. هر سوسپانسیون به عنوان یک نمونه و برای هر بازه زمانی نیز یک شاهد در نظر گرفته شد و سوسپانسیون‌های شاهد با یک میلی‌لیتر آب سترون دوبار تقطیر در همان شرایط سترون مورد تیمار قرار گرفتند. این آزمایش در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی بیان ژن‌های کلیدی مسیر تولید سنگوئینارین

طراحی آغازگرها (Primers)

برای بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی آلکالوئید سنگوئینارین، در پاسخ به الیسیتورهای استفاده شده، آغازگرهایی برای ژن‌های *tydc7*، *DBOX*، *DIOX2* و *bbe1* و ژن خانه‌دار *Elongation Factor1-alpha* (ژن فاکتور رونویسی آلفا ۱) طراحی و توسط شرکت Eurofins MWG Opron ساخته شد (جدول شماره ۱). برای طراحی این آغازگرها از نرم‌افزارهای Primer3 وOligo Calc استفاده شد و از نظر تکثیر اختصاصی ژن‌های مزبور در بانک اطلاعاتی NCBI و به کمک Primer BLAST مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند و عملکرد آنها با PCR نیز بررسی شد.

استخراج RNA

برای استخراج RNA از روش تغییر یافته ترایزول (Modified Trizol (MT))، استفاده شد [۱۹]. به منظور اطمینان از کیفیت مطلوب RNA استخراج شده و تعیین غلظت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ، غلظت RNA های استخراجی در ٦، ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ١٦٨ ساعت پس از اعمال تیمار و در دو ریزنمونه مریستم و ریشه، در نسبت جذب ٢٦٠ به ٢٨٠ نانومتر و ٢٦٠ به ٢٣٠ نانومتر خوانده شد. غلظت هر نمونه محاسبه و برای کنترل کیفی و کمی RNA کل استخراج شده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز (۱/۲ درصد) استفاده شد. به منظور حذف وجود احتمالی آلودگی DNA ژنومی در نمونه‌های RNA استخراج شده و جلوگیری از ایجاد اختلال در انجام واکنش Real-time PCR، از تیمار DNase I بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده و تیوب‌ها جهت نگهداری طولانی مدت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای ساخت cDNA، با توجه به نتایج حاصل از نانودراپ، از هر نمونه RNA به میزان یک میکروگرم برداشته و با استفاده از کیت (BioRT cDNA first strand synthesis) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Bioer Technology, Hangzhou, China) برای کلیه نمونه‌ها، cDNA ساخته شد؛ سپس با استفاده از آغازگرهای ژن مرجع *ef-1alpha*، بر روی همه cDNA های ساخته شده، واکنش PCR انجام شد. در این واکنش ۱/۲ میکرولیتر از هر آغازگر یک میکرولیتر از cDNA و ۱۲/۵ میکرولیتر از MasterMix استفاده شده و حجم واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسید. برنامه دمایی PCR به این شرح بود: واسرشت اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد و ۲۸ چرخه چرخه بدین صورت در نظر گرفته شد: واسرشت‌سازی ٤٥ ثانیه در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد؛ اتصال ٤٠ ثانیه در دمای ٥٧ درجه سانتی‌گراد و بسط یک دقیقه در دمای ٧٢ درجه سانتی‌گراد؛ بسط نهایی هفت دقیقه با دمای ٧٢ درجه سانتی‌گراد.

واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت 5x HOT FIREPol EvaGreen®qPCR Mix Plus (ROX) تهیه شده از شرکت Solis Biodyne و دستگاه Applied BioSystem, StepOne PCR و طبق شرایط شرکت سازنده انجام شد. به این منظور cDNA های استفاده شده هم غلظت شدند و برای تمام آغازگرها مقدار یک میکروگرم در میکرولیتر از آن استفاده شد. در نهایت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش مقایسه‌ای $۲^{-\Delta\Delta CT}$ [۲۰] انجام و داده‌های به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شدند. بررسی آماری داده‌های حاصل با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین به وسیله آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد، با نرم‌افزارSPSS ver.17 و رسم نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel, 2010 انجام شد.

جدول شماره ۱- توالی جفت آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

ژن هدف	GenBank accession number	طول قطعه تکثیری	توالی آغازگرها
DBOX (ADOX5)	JX390714.1	۱۲۳	F 5` CACCCAACTCAACACAAACAC 3` R 5` CATGACCACCACTTCGTACTT 3`
DIOX2	GQ500140.1	۹۰	F 5` TGTGAGAAACTGAAGAACACACAAT 3` R 5` AAGGACTCAGACCACTGAAAGACG 3`
tydc7	AF025434.1	۱۰۲	R 5`TCCACACCCAACTCATCATTC 3` R 5`ACCTACCACTGCCACAAATAC 3`
bbe1	AF025430.1	۱۰۷	F 5`GAGAACTGAGATAGCACCAGAAC 3` R` 5`GTCTGATTACATCGCCCTACAA 3`
ef-1alpha	KF033667.1	۱۱۱	F 5`AGATGATTCCAACCAAGCCCA 3` R 5` CCTTGATGACACCAACAGCAACT 3`

نتایج

القا کالوس

درصد جوانه‌زنی بذور خشخاش در محیط ½MS فاقد هورمون پس از گذشت ١٤ روز از زمان کشت و نگهداری در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، حدود ۹۰ درصد به دست آمد. پس از دستیابی به گیاهچه‌هایی با ارتفاع مناسب ۷ تا ۱۰ سانتی‌متری، ریزنمونه‌هایی از ناحیه مریستم انتهایی ساقه، دمبرگ، برگ، طوقه و ریشه تهیه شد. ۱۰ روز پس از کشت در تمام ریزنمونه‌ها تشکیل کالوس مشاهده شد. این کالوس‌ها در ریزنمونه ریشه در تمام قسمت‌ها به شکل نرم و آبکی و کرم-قهوه‌ای رنگ ظاهر شدند. بر اساس مصرف مواد مغذی توسط ریزنمونه‌ها، هر چهار هفته یک‌بار، عمل واکشت انجام شد. انجام عمل واکشت در زمان کمتر، باعث ایجاد شوک و کندی رشد در کالوس‌ها می‌شد. این یافته مطابق با نظر کریمانه و همکاران [۲۱]، بود. پس از دو بار واکشت، و در این زمان با درنظر گرفتن معیارهایی نظیر رنگ تیره کالوس، حداکثر حجم، وزن و اندازه آن، بهترین ریزنمونه‌ها یعنی ریزنمونه‌ی ریشه و مریستم انتهایی ساقه برای ادامه مطالعه انتخاب شدند. بهترین کالوس برای ریزنمونه ریشه در محیط ½MS و تیمارهای هورمونی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به دست آمد که مطابق با نتیجه به دست آمده توسط کریمانه و همکاران [۲۱]، بود. بهترین کالوس ریزنمونه مریستم

در محیط MS ½ با تغییر در نمک‌های ماکرو (استفاده از مقدار نمک ماکرو در MS پایه) و تیمار هورمونی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. پس از اندازه‌گیری وزن تر کالوس‌ها پس از گذشت چهار هفته در سوسپانسیون سلولی، حداکثر رشد آنها را در فاز لگاریتمی پس از گذشت ۲۰ روز از زمان کشت در سوسپانسیون سلولی، به دست آمد (شکل شماره ۲).

برای بررسی تغییرات بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای مزبور در پاسخ به نانوالیسیتورها RNA آنها استخراج شد. غلظت RNA های استخراجی در نسبت جذب ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر در دستگاه نانودراپ بین ۱/۹ تا دو و در نسبت جذب ۲۳۰ به ۲٦۰ نانومتر، بین دو تا ۲/۲ خوانده شد که نشان دهنده خلوص مناسب RNA استخراج شده بود. غلظت RNA ها در کل نمونه‌ها بین ۵۰۰ – ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده در بانک اطلاعاتی NCBI و در بخش Nucleotide blast (Blastn)، مورد بررسی قرار گرفت؛ این آغازگرها تنها با یک توالی (مربوط به ژن مورد نظر) از توالی‌های ثبت شده گیاه پاپاور در بانک اطلاعاتی BLAST، مطابقت داشتند. پس از سنتز cDNA برای کلیه نمونه‌ها، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ژن مرجع *ef-1alpha*، بر روی همه cDNA های ساخته شده، انجام شد و در تمامی واکنش‌ها تنها یک قطعه تکثیری بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد مشاهده شد که بیانگر عمل اختصاصی آغازگرها در اتصال به نواحی هدف بود. پس از آن واکنش Real-time PCR، اجرا شده و داده‌های حاصل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

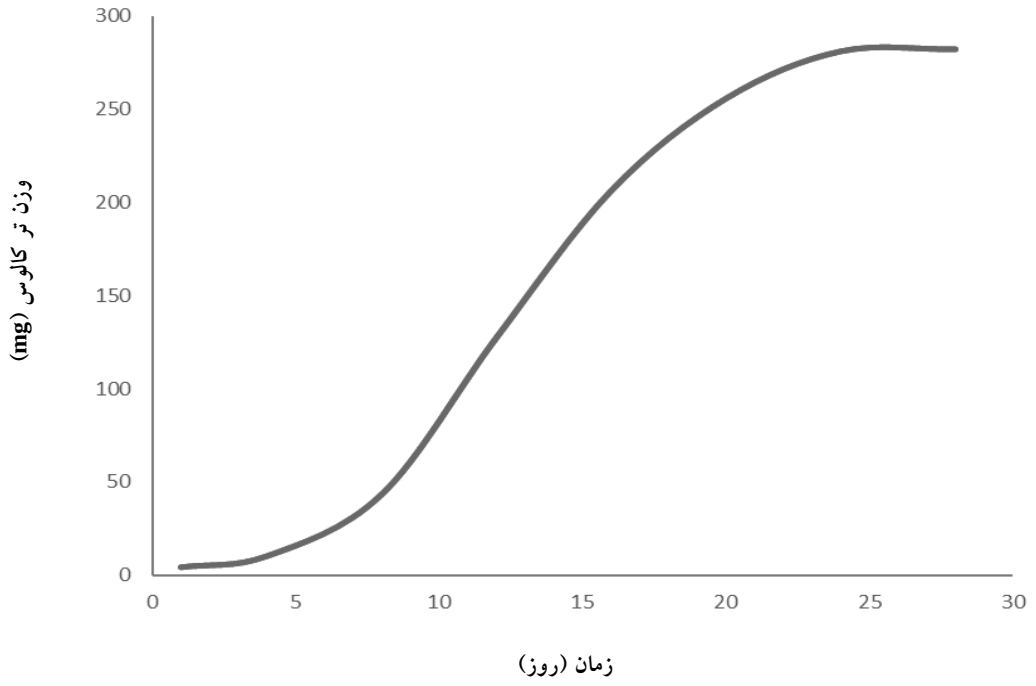
تأثیر نانوالیسیتور نقره بر سوسپانسیون‌های سلولی ریشه و مریستم

تجزیه آماری بیان ژن‌ها در سوسپانسیون‌های ریشه تیمار شده با نانو الیسیتور نقره، نشان داد که این الیسیتور به طور بسیار معنی‌داری بر تغییر بیان ژن‌های *tydc7*، *DBOX*، *DIOX2* و *bbe1* مؤثر بود. در این سوسپانسیون‌ها در شش ساعت اولیه تیمار، ژن *bbe1* هفت برابر و *tydc7* پنج برابر افزایش بیان را نسبت به شاهد نشان دادند. در ۲٤ ساعت پس از القای الیسیتور ژن *DBOX*، به حداکثر بیان خود با چهار برابر افزایش رسید. در ۷۲ ساعت پس از گذشت اعمال تیمار الیسیتوری، کلیه ژن‌ها به طور معنی‌داری کاهش بیان را نسبت به شاهد نشان دادند و پس از ۱٦۸ ساعت بیان کلیه ژن‌ها به صفر نزدیک شد. در کل ژن *bbe1*، بیشترین تغییرات بیان را و ژن *tydc7* و *DIOX2* کمترین تغییرات بیان را نشان دادند (شکل شماره ۳).

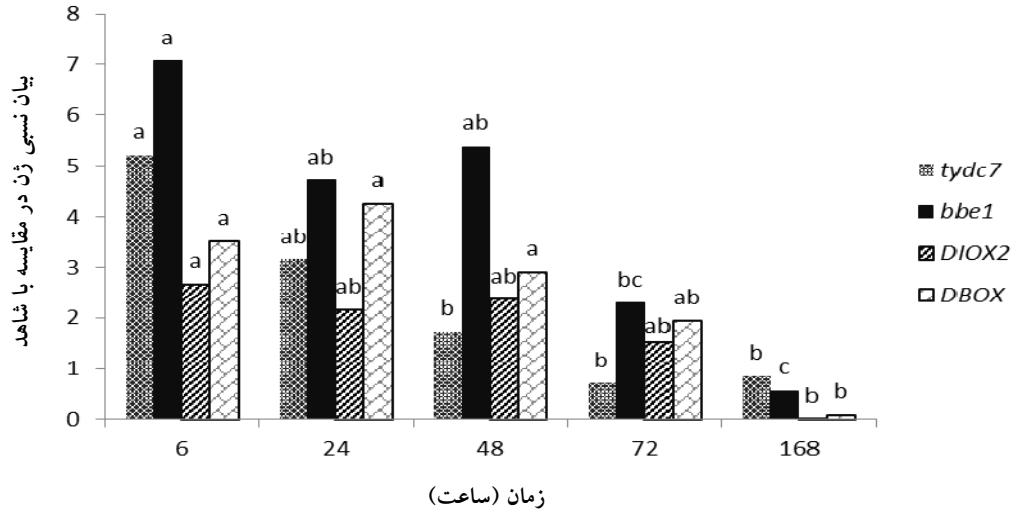
در سوسپانسیون‌های مریستم تیمارشده با الیسیتور نانو نقره، تغییر بیان در کلیه ژن‌های مورد مطالعه مشاهده شد. در این سوسپانسیون‌ها روند افزایشی در بیان ژن‌های *bbe1* و *DBOX* در شش ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد. پس از گذشت ٤۸ ساعت از تیمار سطوح بیان ژن‌ها به جز ژن *DBOX* نسبت به شاهد رو به کاهش نهاد. در ۷۲ ساعت پس از تیمار ژن *DBOX* با ۱/۷ برابر افزایش و ژن *DIOX2* با ۰/٤ برابر کاهش نسبت به شاهد به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار بیان را نشان دادند. در ۱٦۸ ساعت پس از اعمال تیمار، ژن *DBOX*، با ۱/۱ برابر افزایش، همچنان بیشترین بیان را نسبت به شاهد نشان داد (شکل شماره ٤).

تأثیر نانو الیسیتور دی اکسید تیتانیوم در سوسپانسیون‌های سلولی ریشه و مریستم

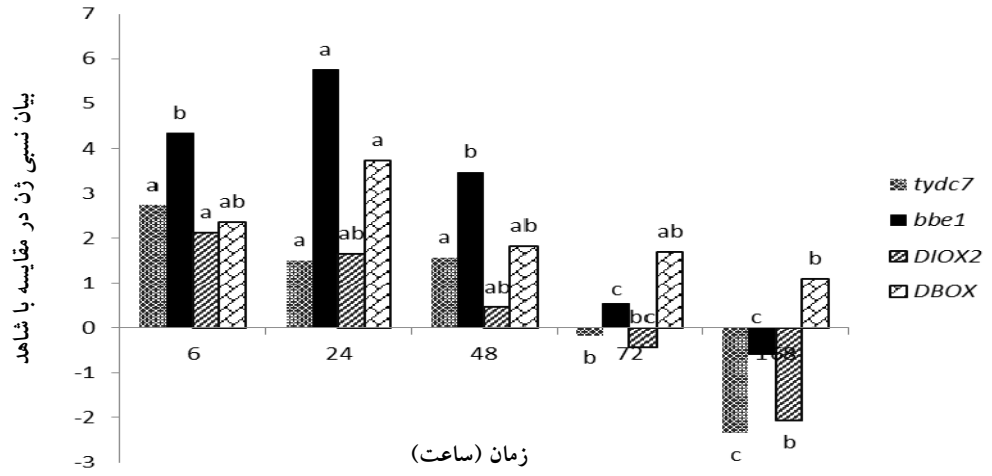
تجزیه آماری بیان ژن‌ها در سوسپانسیون‌های ریشه و مریستم تیمارشده با نانو الیسیتور دی اکسیدتیتانیوم، نشان داد که این الیسیتور به طور بسیار معنی‌داری بر تغییر بیان ژن‌های *DBOX*، *DIOX2*، *tydc7* و *bbe1* مؤثر است. در سوسپانسیون‌های ریشه در شش ساعت اولیه تیمار کلیه ژن‌ها افزایش بیان را نسبت به شاهد نشان دادند. ژن *bbe1* در این زمان شش برابر افزایش بیان داشت. پس از گذشت ٤۸ ساعت، کاهش معنی‌داری در بیان کلیه ژن‌ها به جز *DBOX*، مشاهده شد. در ۱٦۸ ساعت کلیه ژن‌ها بیان منفی را در تیمار با این نانوالیسیتور نسبت به شاهد نشان دادند. در این بازه زمانی، ژن *tydc7* کمترین تغییرات بیان و ژن *bbe1* بیشترین تغییرات بیان را نشان داد (شکل شماره ۵).



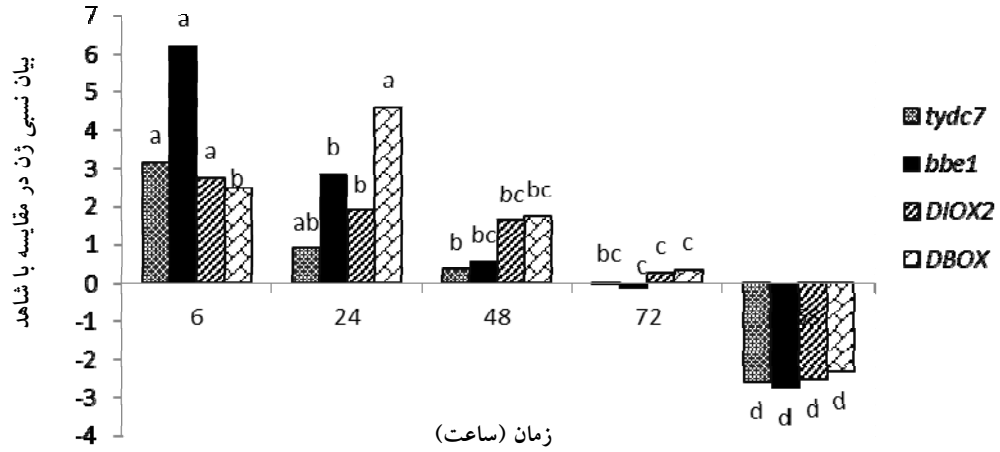
شکل شماره ۲- روند تغییرات رشد کالوس‌های *P. somniferum* L. در سوسپانسیون سلولی محتوی محیط کشت مایع ½ MS طی گذشت ۳۰ روز در سه تکرار



شکل شماره ۳- بیان نسبی ژن‌های *tydc7, bbe1, DIOX2, DBOX* در سوسپانسیون سلولی ریشه *P. somniferum* L. تیمار شده با نانو الیسیتور نقره (۲۵ mg/l) در پنج بازه زمانی مختلف

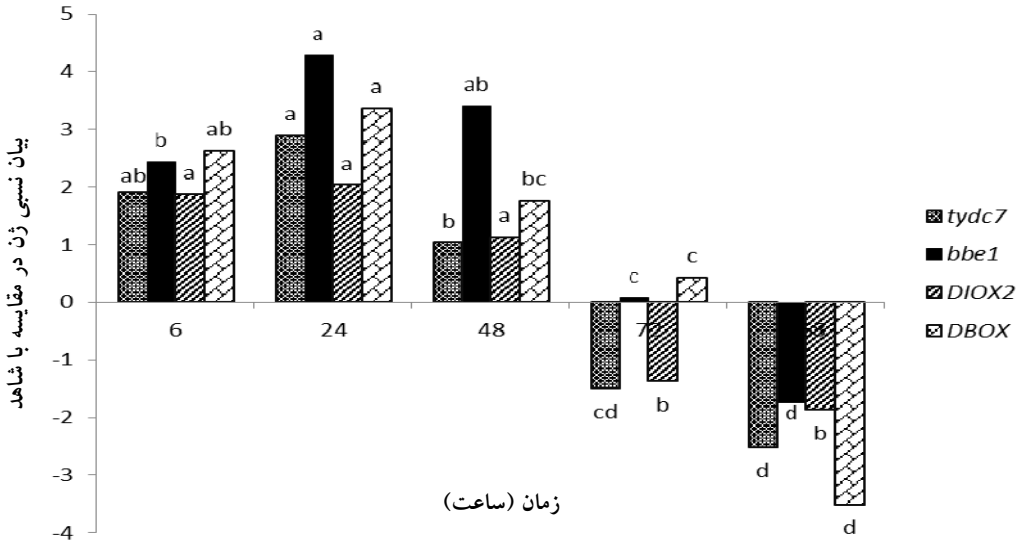


شکل شماره ٤- بیان نسبی ژن‌های *tydc7, bbe1, DIOX2, DBOX* در سوسپانسیون سلولی مریستم *P. somniferum* L. تیمارشده با نانو الیسیتور نقره (۲۵ mg/l) در پنج بازه زمانی مختلف



شکل شماره ٥- بیان نسبی ژن‌های *tydc7, bbe1, DIOX2, DBOX* در سوسپانسیون سلولی ریشه *P. somniferum* L. تیمار شده با نانو الیسیتور دی اکسیدتیتانیوم (۱۲۰ g/l) در پنج بازه زمانی مختلف

در سوسپانسیون‌های مریستم تیمار شده با این الیسیتور روند افزایشی در بیان ژن‌ها در شش ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد. در این زمان بیشترین بیان نسبت به شاهد مربوط به ژن‌های *bbe1* و *DBOX* بود. پس از گذشت ٢٤ ساعت از تیمار با این الیسیتور، در ژن‌های *DBOX* و *bbe1* نسبت به شاهد تا سه برابر افزایش بیان مشاهده شد. در ٤٨ ساعت پس از استفاده از نانوالیسیتور دی اکسید تیتانیوم، سطوح رونویسی کلیه ژن‌ها بالاتر از شاهد بود. در ٧٢ ساعت ژن‌های *tydc7* و *DIOX2*، بیان منفی (نزدیک به دو برابر کاهش بیان) را نسبت به شاهد نشان دادند. با گذشت زمان این کاهش بیان در تمام ژن‌ها مشاهده شد تا جایی که در ١٦٨ ساعت پس از اعمال تیمار، کلیه ژن‌ها بیان منفی نسبت به شاهد نشان دادند. در این سوسپانسیون‌ها، ژن‌های *DBOX* و *bbe1* بیشترین تغییرات و ژن *DIOX2* کمترین تغییرات بیان را نشان دادند (شکل شماره ٦).



شکل شماره ٦- بیان نسبی ژن‌های *tydc7, bbe1, DIOX2, DBOX* در سوسپانسیون سلولی مریستم *P. somniferum* L. تیمار شده با نانو الیسیتور دی اکسید تیتانیوم (۱۲۰ g/l) در پنج بازه زمانی مختلف

بحث

به دست آوردن محیط کشت مناسب برای ریزنمونه ریشه و همچنین تعداد واکشت مناسب برای این گیاه مطابق با نتیجه به دست آمده توسط کریمانه و همکاران (۲۰۰۹) بود [۲۱]. کالوس‌های مریستم انتهای ساقه و ریشه، به محیط سوسپانسیون، با همان ترکیب هورمونی منتقل شدند و با توجه به ساختارشان، در محیط مایع، سلول‌ها به خوبی از یکدیگر جدا شده و در زمان تکثیر در فاز نمایی، با الیسیتورها مورد تیمار قرار گرفتند. این زمان مطابق با اکثر مطالعات صورت گرفته بود؛ در این بررسی‌ها آمده است که بهترین زمان اضافه نمودن الیسیتورها زمانی است که سلول‌ها به حداکثر فعالیت آنزیمی رسیده‌اند و این حالت در فاز نمایی (Exponential phase) رخ می‌دهد که شروع پاسخ سلول‌ها به الیسیتورها است [۱۲، ۱۱]. در ادامه برای بررسی تغییرات بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای مزبور در پاسخ به نانو الیسیتورها در ٦، ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ١٦٨ ساعت پس از اعمال تیمار از روش Real-time PCR استفاده شد. غلظت RNA های استخراجی در نسبت‌های جذب نامبرده نیز خلوص RNA استخراج شده را نشان می‌داد [۲۲]. تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها تغییرات بیانی را در ژن‌های *tydc7*، *bbe1*، *DBOX* و *DIOX2* در هر دو سوسپانسیون سلولی نشان داد. در این مطالعه در ابتدا ژن‌های مختلفی از خانواده *TYDC* بررسی شدند (*tydc1*، *tydc2* و *tydc9*) که در کشت سوسپانسیون بیان خود را نشان ندادند. از این‌رو بیان ژن *tydc7* مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه انجام شده توسط فاچینی و دلوکا (۱۹۹۵)، نشان داد که اعضای خانواده *TYDC1* به مقدار زیاد در ریشه و اعضای خانواده‌ی *TYDC2* هم در ریشه و هم در ساقه بیان می‌شوند [۲۳]. از آنجایی که ژن *tydc7* هم در اندام هوایی و هم در ریشه بیان می‌شود، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت و در هر دو سوسپانسیون تغییرات بیان را نشان داد. تغییرات بیانی *tydc7*، نیز گزارش شده است اما الگوی بیانی آن را نسبت به خانواده ژنی *TYDC1* کمتر گزارش کرده‌اند [٦]. نتایج به دست آمده از این مطالعه نیز بیان بیشتر این ژن را در ریزنمونه ریشه نسبت به ریزنمونه مریستم که از بافت تمایز یافته‌تری حاصل شده است، نشان می‌دهد.

دیگر ژن مرتبط با مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین یعنی *bbe1* نیز به طور معنی‌داری تغییرات بیان را در هر دو سوسپانسیون و حداکثر بیان را در ٤٨ ساعت بعد از القای الیسیتور نشان داد.

مشابه این مطالعه آلکانتارا و همکاران (۲۰۰۵)، حداکثر بیان ژن *bbe1* را در تیمار الیسیتوری *Eschscholzia californica*، ۵۰ ساعت پس از القای الیسیتور اعلام کردند [۱۷]. لیسکامب و فاچینی (۲۰۰۷)، شروع بیان این ژن را دو ساعت پس از اضافه نمودن الیسیتور و حداکثر بیان آن را پس از گذشت ۱۰ ساعت از القای الیسیتوری اعلام کردند [۲٤]؛ به گفته آنها، بیان این ژن پس از گذشت ۸۰ ساعت در محیط کشت ادامه داشت و پس از آن کاهش یافت؛ که این بیان را متناسب با نوع و مقدار الیسیتور دانسته‌اند. به نظر می‌سد که *bbe1* نقش کلیدی را در تنظیم تجمع آلکالوئیدها در محیط کشت بر عهده دارد [۸]. به گفته فاچینی و همکاران (۱۹۹٦)، در گیاه پاپاور رونوشت‌های این ژن در ریشه بیشتر از اندام هوایی مشاهده شده است. آنچه که در این مطالعه مشاهده شد نیز مشابه با این یافته بود. بیان این ژن در سوسپانسیون سلولی ریشه بیشتر از مریستم بود [۸].

رونوشت دیگر مؤثر در مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، *DIOX2* بود. مطالعات انجام شده توسط هاگل و فاچینی (۲۰۱۰)، بیانگر عدم تأثیر خاموشی این ژن در تجمع آلکالوئیدهای پاپاور است. در مطالعه حاضر این ژن تغییرات بیانی چندانی را تیمار با نانوالیسیتورها در مقایسه با سایر ژن‌ها نشان نداد و فقط در ساعت‌های پایانی کاهش شدید بیان را به دنبال داشت که علت آن می‌تواند مرگ سلولی به خاطر طولانی شدن زمان مواجهه با نانوالیسیتورها در سوسپانسیون سلولی باشد. در مورد نحوه و مقدار بیان این ژن در سوسپانسیون سلولی مطالعه‌ای صورت نگرفته و این گزارش اولین مورد نحوه بیان این ژن در برابر الیسیتورها می‌باشد [۵].

ژن *DBOX*، دیگر ژن مؤثر در مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین بود که مسئول تنظیم آستانه تحمل سلولی به سمیت سنگوئینارین است. آنزیم دی‌هیدروبنزوفنانتریدین اکسیداز، تبدیل دی‌هیدروسنگوئینارین به سنگوئینارین را بر عهده دارد که با افزایش سنگوئینارین در سلول، بیان این ژن کاهش یافته تا سلول‌ها را از سمیت این ماده دور نگه دارد [۹]. همچنین سنگوئینارین موجب کاهش شدید میکروتوبول‌ها می‌شود و به نظر می‌رسد با توجه به pKa پایین آن بتواند غشای پلاسمایی را سوراخ کرده و موجب مرگ سلولی شود [۲۵]. در تجزیه و تحلیل آلکالوئیدهای حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی مریستم ساقه و ریشه، میزان تولید سنگوئینارین در ساعت‌های اولیه تیمار افزایش و سپس کاهشی را به دنبال داشت (داده‌ها نشان داده نشده‌اند.) که به نظر می‌رسد فعالیت این ژن موجب کاهش این متابولیت در محیط کشت سوسپانسیون سلولی شده است؛ به عبارتی بیان این ژن رابطه معکوسی را با مقدار تولید سنگوئینارین در سلول نشان داد که منطبق با نتایج به دست آمده از تحقیق یونگ چوآ و همکاران (۲۰۰۸) بود [۹]. از آنجایی‌که سنگوئینارین جز ترکیبات بسیار سمی در میان بنزوفنانتریدین‌هاست تجمع آن به طور موقت و با تغییر سریع انجام می‌پذیرد و زمانی که الیسیتور به محیط سلولی اضافه می‌شود سنگوئینارین افزایش یافته و با ترشح به محیط کشت سلولی، موجب افزایش دی‌هیدروسنگوئینارین در سلول می‌شود. به نظر می‌رسد نتایج به دست آمده، نشان دهنده ظرفیت تحمل سلول‌ها در برابر سمیت سنگوئینارین باشد. در مطالعه صورت گرفته، در هر دو سوسپانسیون سلولی مریستم و ریشه می‌توان اثر بازخوردی تجمع سنگوئینارین را در کاهش بیان این ژن مشاهده کرد همچنین تغییرات بیان این ژن در سوسپانسیون سلولی ریشه بیشتر از مریستم بود.

در مجموع، تغییرات بیانی ژن‌ها در پاسخ به نانوالیسیتورها به نحوی بود که در ساعت‌های اولیه تمامی ژن‌ها افزایش بیان و در ساعت‌های پایانی تمام ژن‌ها بیان منفی را نشان دادند. این موضوع را می‌توان با اثر سمیت نانو ذرات بر شاخص میتوزی و ژنومی مرتبط دانست [۲٦]؛ به طوری که در هر دو نوع سوسپانسیون میزان بیان ژن‌ها در ساعات اولیه افزایش چشمگیری داشت مخصوصاً در مورد ژن *bbe1* که پس از گذشت زمان روند کاهشی در بیان این ژن ملاحظه شد. چه و همکاران (۲۰۱۱)، مطالعه‌ای را بر روی اثر نانوذرات آهن بر سوسپانسیون سلولی تنباکو انجام دادند و درصد زنده‌مانی سلول‌ها را با این نانو ذره، پس از گذشت ۱۲۰ ساعت از القای الیسیتور، ۹٦ درصد اعلام کردند [۲۷]. هرچند که در تیمار با دیگر نانوذرات تغییر یافته این زنده‌مانی به ٤۵ درصد رسید؛ این نتایج سمیت این ذرات و تغییرات احتمالی آنها را در موجودات زنده بیان می‌کنند. در مطالعه حاضر، پس از گذشت

۷۲ ساعت از القای نانو الیسیتور دی‌اکسیدتیتانیوم و با توجه به بیان رونوشت‌هایی نظیر *DBOX* و *bbe1* می‌توان از زنده بودن سلول‌ها اطمینان داشت. به عقیده نیر و همکاران (۲۰۱۰)، در تمام این مطالعات خصوصیات نانوذره، غلظت آن و بافت مورد استفاده نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند [۲۸]. از آنجایی که در مورد استفاده از نانوذرات در گیاهان اطلاعات زیادی موجود نمی‌باشد، تصمیم‌گیری در مورد عملکرد آنها در سلول‌های گیاهی نیازمند مطالعات بیشتری است. کاربرد نانوذرات ممکن است ایجاد استرس‌های اکسیداتیو کرده و با آزادسازی رادیکال‌های اکسیژن خسارت‌هایی را به مولکول‌های زیستی وارد سازند همچنین خود این ذرات نیز یون‌هایی را به محیط وارد می‌کنند [۲۹]. اثر این ذرات بر بیان ژن‌ها بررسی نشده است اما افزایش بیان ژن‌های مرتبط با استرس مانند *Lepqp2* در تیمار با این ذرات گزارش شده است [۳۰]. یکی از دلایل دیگر کاهش بیان را می‌توان به خاطر سمیت سنگوئینارین و افزایش ناگهانی آن در محیط کشت دانست که کاهش بیان ژن *DBOX* به منظور جلوگیری از تجمع بیش از اندازه سنگوئینارین و اثر بازخوردی آن مؤید این مطلب است [۹].

باید توجه داشت که در گیاه پاپاور و در شرایط *in vivo*، بیوسنتز و تجمع آلکالوئیدهای بنزیل‌ایزوکوئینولین، هفت مرحله بیوسنتزی در عناصر غربالی و سه نوع سلول را در بر می‌گیرد [۲٤] اما همین مراحل در کشت سلولی، در یک مدل سلول اتفاق می‌افتد. اما آنچه که در این تحقیق مشاهده شد تفاوت بیان ژن‌ها در سوسپانسیون‌های سلولی مریستم و ریشه با یکدیگر بود و به نظر می‌رسد که خواستگاه ریزنمونه در این تفاوت مؤثر بوده و گویا ژن‌ها برای بیان خود، از یک حافظه سلولی با توجه به خواستگاه خود بهره برده‌اند که این مطلب نیازمند مطالعه بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که می‌توان از نانوالیسیتورها برای افزایش بیان ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون سلولی پاپاور استفاده کرد و باید توجه داشت که استفاده از راهکار افزایش بیان توسط الیسیتورها باید با احتیاط بیشتری صورت گیرد زیرا پس از گذشت زمان راهکاری نظیر استفاده از الیسیتور، به علت حضور مداوم الیسیتور در محیط کشت، خود موجب کاهش بیان ژن‌های مطلوب ما خواهد شد. هرچند یکی دیگر از دلایل این کاهش می‌تواند افزایش حضور آلکالوئیدها در محیط کشت، در نتیجه افزایش بیان ژن مربوط به آن باشد؛ از آنجایی که این متابولیت‌ها در واکنش‌های دفاعی در سلول تولید می‌شوند افزایش آنها منجر به یک سری تغییرات سلولی، واکنش‌های فوق حساسیت و درنهایت مرگ سلولی می‌شود. در پایان باید گفت که در مقایسه با دیگر مطالعات، استفاده از الیسیتورهایی نظیر نانونقره در غلظت مناسب در کشت سوسپانسیون سلولی، می‌تواند با تأثیر بر ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای پاپاور، موجب افزایش سریع بیان ژن‌ها در ساعت‌های اولیه تیمار شود که این افزایش بیان خود تولید متابولیت‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن و قبل از شروع واکنش‌های بازخوردی در سلول را به همراه خواهد داشت. به عبارتی با توجه به راهکارهایی نظیر استفاده از الیسیتورها و با مهندسی متابولیک هدف‌دار در آینده‌ای نه چندان دور به این ترکیبات دارویی ارزشمند در کشت‌های وسیع و بیوراکتورها دست یافت؛ دیگر دستاورد این مطالعه حضور ردپایی از حافظه سلولی در کالوس‌ها بود؛ زیرا مقدار بیان ژن در سوسپانسیون‌های ریشه و مریستم با یکدیگر متفاوت و مشابه با الگوی بیان آن در گیاه کامل بود. به عبارتی به همراه کالوس تمایز نیافته حافظه‌ی سلولی بود که خواستگاه بیان ژن، تولید و تجمع متابولیت در گیاه کامل را به همراه داشت؛ که با مطالعه بیشتر در این زمینه می‌توان گفت در آینده‌ای نزدیک قادر به تولید متابولیت‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی و با توجه به خواستگاه آن در گیاه خواهیم بود.

منابع

1. El-Ahmadi S.H and Nessler C.L. Cellular localization of tyrosin decarboxylase expression in transgenic opium poppy and tobacco. *Plant Cell Rep*. 2001; 20: 313 - 7.

2. Facchini PJ and Park SU. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in Opium Poppy. *Phytochem*. 2003; 64: 177 - 86.

3. Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in Real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29: 2002 - 7.

4. Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L and Everse D. Housekeeping gene selection for Real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot*. 2005; 56 (421): 2907 - 14.

5. Hagel and Facchini P. dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nat. Chem. Biol*. 2010; (6) 4: 273 - 375.

6. Facchini P, Penzes-Yost C, Samanani N and Kowalchuk B. Expression Patterns Conferred by Tyrosine/Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase Promoters from Opium poppy Are Conserved in Transgenic Tobacco. *Plant Physiol*. 1998; 118 (1): 69 - 81.

7. Park S, Johnson A, Penzes-Yost C and Facchini P. Analysis of promoters from tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberine bridge enzyme genes involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in Opium Poppy. *Plant Mol. Biol*. 1999; 40: 121 - 31.

8. Facchini PJ, Penzes C, Johnson AG and Bull D. Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from Opium poppy. *Plant Physiol*. 1996; 112: 1669 - 77.

9. Young Cho H, Young Sona S, Soon Rheea H, Sung-Yong H, Yoonb Carolyn W, Parsonsc L and Parka M. Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *J. Biotech*. 2008; 135: 117 - 22.

10. Zhao J, Davis L and Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 2005; 23: 283 - 333.

11. Namdeo A G. Plant Cell Elicitation for Production of secondary metabolites review. *Pharm. Rev.* 2007; 1: 69 - 79.

12. Raie M, Omidi M and Torabi S. The effect of abiotic elicitors on *Aloe vera* tissue culture. Msc thesis. Azad university of Tehran. 2013, (In Persian).

13. Yang H, Sun CH, Zhang S, Qiao J, Zou G, Liu S, Smith H, Cheng M and GQ L. Anatase TiO2 single crystals with a large percentage of reactive facets. *Nature*. 2008; 453, 638 - 41.

14. Park H J, Kim S H, Kim H.J and Choi S H. A new composition of nanosized silica–silver for control of various plant diseases. *Plant Pathol. J.* 2006; 22: 295 - 302.

15. Bondarian F, Omidi M and Torabi S. The effect of nanoelicitors on alkaloid production of *Papaver somniferum* in suspension cell culture. Msc thesis Azad university of Tehran. 2013, (In Persian).

16. Ziegler J, Voigtiander S, Schmidt J, Kramell R, Miersch O, Ammer C, Gesell A and Kutchan T.M. Comparative transcript and alkaloid profiling in Papaver species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *Plant J*. 2006; 48: 177 - 92.

17. Alcantara J, Bird D.A, Franceschi V.R and Facchini P.J. Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured Opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiol.* 2005; 138: 173 - 83.

18. Mande M, Omidi M, Maali A. The Cytogenetic study of *Ferula assa foetida*. Msc thesis,

University of Tehran. 2012, (In Persian).

19. Qin Li L, Hua Fu, Fang Z, Xia J, Juan W and Long-Jiang Y. Efficient Extraction of RNA and Analysis of Gene Expression in a Long-TermTaxusCell Culture Using Real-time RT-PCR, *Asian J. Chem*. 2009; 23 (3): 2373 - 80.

20. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402 - 8.

21. Karimaneh Z, Omidi M, Khialparast F and Sabokdast M. The Study on the effect of plant growth regulators, concentration, medium and explants on the callus induction, regeneration and suspension culture of *Papaver somniferum* L. M.Sc Thesis. Faculty of agriculture and natural resources, University of Tehran, Iran. 2009, (In Persian).

22. NanoDrop technical support bullten. NanoDrop technologies Wilmington, *Delaware USA NanoDrop technologies.* 2007, Inc www.nanodrop.com.

23. Facchini P. and De Luca V. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell*. 1995; 7: 1811 - 21.

24. Liscombe D.K and Facchini P.J. Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Curr. Opin. Biotech*. 2008; 19: 173 - 80.

25. Weiss D, Baumert A, Vogel M and Roos W. Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant Cell Environ*. 2006; 29: 291 - 302.

26. Castiglione R, Giorgetti M, Geri L and Cremonini C. The effects of nano-TiO2 on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *J. Nanopart Res*. 2011; 13: 6 - 7.

27. Che J H, Fang R, Luk B and Zhang L. Nanoparticle-detained toxins for safe and effective vaccination, *Nat. Nanotechnol.* 2013; 8: 933 - 8.

28. Nair R, Varghese S H, Nair B G, Maekawa D, Yoshida Y and Sakthi KumarD. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Sci.* 2010; 179: 154 - 63.

29. Chomoucka J, Drbohlavova J, Huska D, Adam V, Kizek R and Hubalek J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacol. Res*. 2010; 62: 144 - 9.

30. Khodakovskaya M, de Silva K, Nedosekin D, Dervishi E, BirisShashkov EV, Galanzha EI and Zharov VP. AComplex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2011; 108: 1028 - 33.

Gene Expression Involved in Sanguinarine Biosynthes is Affected by Nano Elicitors in *Papaver somniferum* L.

Khodayari M (Ph.D.)[1], Omidi M (Ph.D.)[2*], Shahnejat Booshehri AA (Ph.D.)[2], Yazdani D (Ph.D.)[3], Naghavi MR (Ph.D.)[4]

1- Graduated from Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2- Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
1- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
4-Department of Biotechnology, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
*Corresponding author: Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
Tel & Fax: +98-26-32232187
E.mail: momidi@ut.ac.ir

Abstract

Background: Elicitors are biotic or abiotic molecules that have effectively stimulated the production of plant secondary metabolites in plant, cell and organ cultures.

Objective: Opium poppy serves as one of the particular commercial source of sanguinarine, as an anticancer and antimicrobial metabolite in the pharmaceutical industry;This study was done by the aim of increasing in expression of genes involve in the synthesis ofthisvaluablemetaboliteinplantcell suspension culture.

Methods: In this study, the effects of two abiotic nano elicitors (nano TiO_2 and nano-Silver), were studied on the expression of genes involve in sanguinarine biosynthesis pathway (*tydc7*, *bbe1*, *DIOX2* and *DBOX*) at different time points (6, 24, 48, 72 and 168 hours) following treatments on shoot meristem and root suspension cell cultures using Real-time PCR.

Results: All of these genes were expressedmost abundantly6 and 24 hours after treatment with nano elicitors in both root and meristem suspension cell cultures. After time all the genes expression were significantly decreased.

Conclusion: Comparing the results of this study with the findings of other major studies on the effect of elicitors on papaver gene expression, indicated that because of the small sizes of nano particles, they may cause the rapid induction of sanguinarine biosynthesis genes expression in the shortest possible time. Nevertheless other investigations showed the highest increasing in gene expression, 48hours after elicitation. Given that, this study was conducted on callus with dedifferentiated cells from two different organs, but remarkable distinction were observed in gene expression profile in both explant tissues. In the other words the trace of cellular memory, was seen in dedifferentiated cells regards to the origin of explants.

Keywords: ***Papaver somniferum* L., Explant, Gene expression, Nano elicitor**