

## اثر نانومحرک‌ها بر بیان ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدهای شقایق شرقی (*Papaver orientale* L.)

محسن رحیمی شرباف مقدس<sup>۱</sup>، محمدرضا نقوی\*<sup>۲</sup>، منیژه سبکدست نودهی<sup>۱</sup>، الهه معتمدی<sup>۳</sup>، جابر نصیری<sup>۳</sup>  
۱-۳ و ۲- به ترتیب کارشناس ارشد، استاد، و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،  
۴- استادیار، گروه نانوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج. ۵- استادیار، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه  
علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج - ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۲۹)

### چکیده

خصوصیات دارویی گیاهان خانواده خشخاش، مربوط به قابلیت تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین (BIAs) است. آلکالوئیدهای BIA گروه متنوعی از ترکیبات نیتروژن دار هستند که پراکنش محدودی در بین گیاهان دارند. این آلکالوئیدها علاوه بر خاصیت دارویی، در مکانیسم دفاعی گیاه نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند. در این پژوهش، اثر محرک (الیستور)های نانوذره نقره سبز و نقره شیمیایی، نانولوله‌های کربنی، گرافن با پوشش نانوذره نقره شیمیایی و همچنین اثر ترکیبی گرافن و نانوذره نقره سبز بر میزان بیان نسبی ژن‌های مسیر زیست‌ساخت (بیوسنتز) بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها (*T6ODM* و *COR*، *DBOX*) در دروایه‌ی (سوسپانسیون) یاخته‌ای *Papaver orientale* L. با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال محرک (الیستور) مورد بررسی قرار گرفت. تحت تأثیر این محرک‌ها، بیان نسبی ژن‌ها به شدت تغییر کرد، به طوری که در هر دو ژن *DBOX* و *COR* بیشترین میزان بیان نسبی در ۴۸ ساعت پس از تیمار گرافن با پوشش نانوذره نقره شیمیایی، به ترتیب ۵۷/۹۶ و ۸/۳۴ به دست آمد. در ژن *T6ODM* بیشترین بیان نسبی مربوط به تیمار محرک ترکیبی گرافن به همراه نانوذره نقره سبز، به میزان ۴۵/۷۷ برابر بود. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که محرک‌های مختلف، تأثیرات متفاوتی بر میزان ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدهای این گیاه دارند. این محرک‌ها بسته به میزان سمیت و مسیرهای سیگنالینگ که در سلول فعال می‌کنند، بیان ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدها را تحت تأثیر خود قرار دادند.

**واژه‌های کلیدی:** آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین، شقایق شرقی، کشت دروایه یاخته‌ای، نانومحرک‌ها، qRT-PCR.

## The effect of nano elicitors on the expression of the genes involved in alkaloids biosynthetic pathway in *Papaver orientale* L. suspension culture

Mohsen Rahimi Sharbaf Moqadas<sup>1</sup>, Mohammad Reza Naghavi\*<sup>1</sup>, Manijeh Sabokdast Noudehi<sup>1</sup>,  
Elaheh Motamedi<sup>2</sup>, Jaber Nasiri<sup>3</sup>

1. Agronomy and Plant Breeding Department, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, 2. Nanotechnology Department, Iranian Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj. 3. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOL, Karaj, Iran

(Received: July 14, 2019 - Accepted: April 17, 2020)

### ABSTRACT

Pharmacological properties of *Papaver* family plants referred to Benzyloisoquinoline alkaloid (BIAs) production. The BIAs alkaloids are a diverse group of nitrogenous compounds which have a limited distribution among various plant species. In addition to their medicinal properties, they have a crucial role in the plant defense mechanisms. In the current study, the effects of elicitors including green silver nanoparticles, chemical silver nanoparticles, carbon nanotubes, graphene coated with chemical silver nanoparticles, and combination of graphene and green silver nanoparticles were investigated on the relative expression of BIAs biosynthesis pathway genes (*DBOX*, *COR*, and *T6ODM*) in the *Papaver orientale* L. cell suspension of with the concentration of 50 mg/L at 48 and 72 h after the elicitor applications. There were significant changes in the relative expression of these genes due to elicitor applications. However, the highest transcriptional activity of *DBOX* and *COR* genes observed at 48 h after utilization of graphene coated with chemical silver nanoparticles with the values of 57.96 and 8.34 fold-change, respectively. While, there was an up-regulation of *T6ODM* gene in the combination application of graphene and Green silver nanoparticles (45.77 fold). These results suggested that the application of various elicitors in this plant could accompany by diverse changes in the expression of alkaloids biosynthetic genes, which depends on the toxicity level of elicitors and elicitors' mediated-activation of signaling paths.

**Keywords:** Benzyloisoquinoline alkaloids, cell suspension, gene expression, green silver nanoparticles synthesis, *Papaver orientale* L.

\* Corresponding author E-mail: mnaghavi@ut.ac.ir

## مقدمه

متابولیت‌های ثانویه گیاهی، از متابولیت‌های اولیه با فعالیت‌های مختلف فیزیولوژیکی می‌باشند. این متابولیت‌های ثانویه، نقش مهم و کلیدی در بقا و سازگاری گیاه دارند. اگرچه متابولیت‌های ثانویه، تأثیر آنی در بقای گیاه ندارند، اما اثرات طولانی مدت دارند (Verma & Shukla, 2015). شقایق شرقی (*Papaver orientale* L.) از خانواده *Papaveraceae* و گیاهی تتراپلوئید ( $2n=4x=28$ ) است. این گونه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است، زیرا غنی از متابولیت‌های بنزیل‌ایزوکوئینولین مانند تبائین (۰.۹٪) و اورپاویون (۰.۲۰٪) است (Shafiee et al., 1975). سه گونه *P. bracteatum*، *P. pseudo-orientale* و *P. orientale* در گروه اکسیتونا<sup>۱</sup> طبقه‌بندی می‌شوند که بسیار شبیه به هم می‌باشند. نواحی پراکنش این گیاه، نواحی شمال غرب کشور ایران، شمال شرق کشور ترکیه و جنوب قفقاز است (Nyman & Bruhn, 1979). کشت سوسپانسیون<sup>۲</sup> سلول گیاهی، منابعی از سلول‌های یکنواخت از لحاظ ژنتیکی و فیزیولوژیکی را فراهم می‌کند که می‌تواند به‌سادگی توسط روش‌های الیسیتیشن<sup>۳</sup> دست‌کاری شود و به این دلیل پتانسیل زیادی برای کاربردهای صنعتی مانند تولید متابولیت‌های ثانویه و ریزازدیادی دارد. آن‌ها همچنین چندین مزیت دیگر از جمله مطالعه پاسخ‌های سلولی، چرخه سلولی، تکثیر و رشد در غیاب فرایندهای توسعه‌یافته‌ای که در گیاهان کامل و اندام‌های گیاهی رخ می‌دهد، بر گیاه کامل دارند، (Lee et al., 2007). محرک (الیسیتور)، به مولکول‌هایی با منشأ زیستی یا غیر زیستی اطلاق می‌شود که با تحریک سیگنال‌های سلولی و برهم‌کنش مولکولی میان گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلولی یا سیتوپلاسمی و محرک، موجب شناسایی آن‌ها می‌شوند. در نتیجه سیگنال دریافتی توسط سلول‌های گیاهی، بیان ژن‌های مرتبط در مسیر را تحریک می‌کنند و موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان یا کشت سلولی آن‌ها می‌شوند.

علاوه بر روش‌های سنتز شیمیایی، روش‌های زیست ساخت، توجه زیادی را به‌خود جلب کرده‌اند، زیرا رویکرد طرفدار محیط‌زیستی و ساده‌ای دارد (Goudarzi et al., 2016). استفاده از نانوذره نقره و نانو ذره دی‌اکسید تیتانیوم در کشت دروایه (سوسپانسیون) یاخته‌ای شقایق شرقی، منجر به افزایش بیان نسبی ژن‌های *COR*، *DBOX* و *T6ODM* می‌شود (Shirvani & Naghavi, 2017). همچنین در

<sup>1</sup> Oxytona

<sup>2</sup> Suspension

<sup>3</sup> Elicitation

<sup>4</sup> multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)

کالزایی، یعنی محیط MS کامل با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار به همراه تیمار هورمونی یک میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP منتقل شدند. پس از چند مرتبه واكشت، کالوس ریشه به عنوان بهترین کالوس برای کشت دروایه یاخته‌ای انتخاب شد و به محیط کشت دروایه یاخته‌ای MS کامل با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ولی بدون آگار با همان غلظت هورمونی منتقل شد. کالوس‌های انتخابی در شرایط کاملاً سترون و در زیر هود لامینار، به صورت خیلی خردشده به هر ارلن به عنوان یک واحد آزمایشی به مقدار ۰/۵ گرم اضافه شد. ارلن‌ها به شیکر انکوباتور با دمای  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  و ۱۳۰ rpm در شرایط کاملاً تاریک منتقل شدند. پس از تکثیر کالوس‌ها و رسیدن به رشد مطلوب در فاز نمایی، تمامی ارلن‌ها با نانومحرک‌ها (نانوذره نقره سبز، نانوذره نقره شیمیایی، نانولوله‌های کربنی، گرافن با پوشش نانوذره نقره و گرافن به همراه نانوذره نقره سبز) با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر تیمار شدند. هر دروایه به منزله یک نمونه و برای هر بازه زمانی نیز یک شاهد در نظر گرفته شد و به دروایه شاهد، یک میلی-لیتر آب مقطر اضافه شد. برای بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های دخیل در تولید آلکالوئیدها، کالوس‌های رشد یافته در دروایه یاخته‌ای در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

#### استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت P-Biozol انجام شد. بدین منظور، ۰/۱ گرم از کالوس‌های ساییده شده با نیتروژن مایع برای استخراج RNA استفاده شد. برای اطمینان از کیفیت مطلوب RNA استخراج شده و تعیین غلظت آن، از دستگاه نانودراپ استفاده شد؛ علاوه بر این، به منظور بررسی کیفیت، RNA کل استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ برده و الکتروفورز شد و برای حذف DNA ژنومی، نمونه‌ها مطابق با روش شرکت فرمنتاز، با استفاده از آنزیم *DNase I* تیمار شدند. برای ساخت cDNA، یک میکروگرم از هر نمونه RNA انتخاب و سپس با

مطالعه‌ای دیگر، تیمار متیل جاسمونات (MJ) و سالیسیلیک اسید (SA) بر ریشه‌های موئین گیاه شقایق شرقی، باعث افزایش میزان آلکالوئیدها شد، به طوری که محرک MJ در ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک، باعث بیشترین میزان تجمع آلکالوئیدها شد (Hashemi & Naghavi, 2015).

با توجه به این که در گیاه شقایق شرقی، پتانسیل این نانوذرات مورد بررسی قرار گرفته است، در این تحقیق تلاشی صورت گرفت تا اثر نانوذرات مختلفی نظیر نانوذرات نقره سبز<sup>۱</sup>، نانوذره نقره شیمیایی، گرافن و نانولوله‌های کربنی در میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها مورد بررسی قرار گیرد. اهمیت این موضوع به این خاطر است که این ژن‌ها، آنزیم‌هایی را کد می‌کنند تا این مسیر را تنظیم کنند. بنابراین افزایش یا کاهش بیان آن‌ها می‌تواند منجر به کاهش و یا افزایش میزان تولید آلکالوئیدهای مدنظر باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### کشت بافت

بذرهای گیاه شقایق شرقی (*P. orientale* L.) از شرکت سوئیسی Botanik samen تهیه شد. برای به دست آوردن گیاهچه‌های سترون، بذرها با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس با هیپوکلریت ۲/۵ درصد به مدت شش تا هفت دقیقه تحت شرایط سترون، ضد عفونی شدند و پس از سه بار شستشو با آب مقطر دوبار سترون، در محیط کشت MS<sup>۱</sup>/۲ فاقد هورمون با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار و همچنین یک گرم در لیتر زغال فعال در ظرف سترون کشت شدند و به اتاق کشت با دمای  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل شدند (Shirvani & Naghavi, 2017). جوانه‌زنی بذرها پس از هفت روز آغاز شد. پس از دستیابی به گیاهچه‌هایی به ارتفاع ۸ تا ۱۰ سانتی‌متر، ریز نمونه‌های مناسب از ناحیه برگ‌های حقیقی، ریشه و طوقه برای فاز کالزایی انتخاب شدند و به محیط

<sup>۱</sup> Green synthesis of silver nanoparticles

تکنیکی انجام شد. برای منظور، cDNA های استفاده شده هم غلظت شدند و برای تمام آغازگرها (جدول ۱) میزان ۴۰۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد. کنترل برای کمیت سنجی با کالوس هایی انجام شد که هیچ گونه تیمار ایستوری بر آن‌ها اعمال نشد. در نهایت، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش مقایسه‌ای Efficiency<sup>ΔΔCT</sup> انجام شد.

استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده برای کلیه نمونه‌ها، cDNA ساخته شد. با استفاده از آغازگر ژن مرجع *Actin* روی تمام cDNA های ساخته شده، واکنش PCR انجام شد. پس از اطمینان از cDNA ساخته شده، واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت 5x HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) و با دو تکرار بیولوژیک و سه تکرار

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای qRT-PCR در گیاه *P. orientale* L.  
Table 1. Name and sequence of primers used in qRT-PCR for *P. orientale*

Primer	Accession no.	Sequence
<i>COR</i> -F	FJ624147	TTGATTGGGAACTAACGGCAGAAG
<i>COR</i> -R		TGAAAAGGTCCAGTCGGTGATAACA
<i>T6ODM</i> -F	GQ500139	AAAACCTCCCAGTGCCTCTCA
<i>T6ODM</i> -R		ACCCCTAATCTCGGCTGCTT
<i>DBOX</i> -F	GQ500140	TGTGAGAACTGAAGAACACACAAT
<i>DBOX</i> -R		AAGGACTCAGACCACTGAAAAGACG
<i>Actin</i> -F	AB574417.1	GCAATCCTCCGTTTGAATCTTGCTG
<i>Actin</i> -R		AATTCCCGTTCCGCAGTGGTG

درحالی که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به ۴/۷۶ برابر رسید. بیان نسبی ژن *COR* پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک، ۱/۰۲ برابر افزایش داشت، درحالی که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به ۲۴/۸۵ برابر رسید. بیان ژن *T6ODM* پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک، ۲/۶۴ برابر افزایش داشت، درحالی که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به ۴/۰۲ برابر رسید (شکل ۲).

#### اثر محرک گرافن با پوشش نانوذره نقره

نتایج نشان داد که بیان ژن *DBOX* ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک، ۸/۳۴ برابر افزایش داشت، درحالی که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به ۴/۷۸ برابر رسید. ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک، بیان ژن *COR* ۵۷/۹۶ برابر افزایش داشت، درحالی که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به ۱۲/۲۰ برابر رسید. بیان نسبی ژن *T6ODM* پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک، نتیجه‌ای به همراه نداشت، درحالی که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به ۱/۶۸ برابر رسید (شکل ۳).

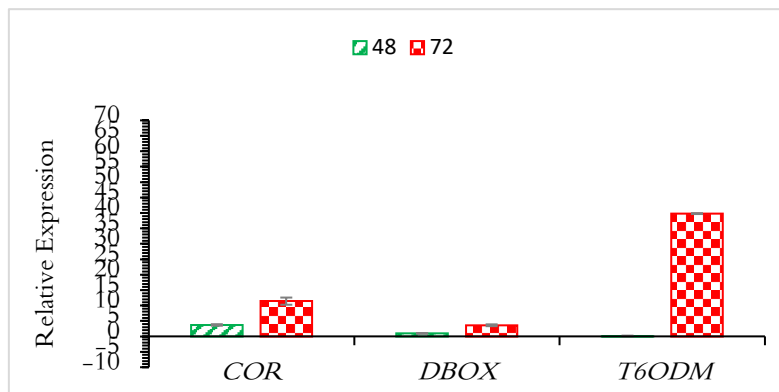
#### نتایج و بحث

##### بررسی بیان نسبی ژن‌های دخیل در مسیر زیست ساخت آلکالوئیدها اثر نانوذره نقره گیاهی

نتایج نشان داد که ژن *DBOX* پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک، ۰/۹۶ برابر افزایش بیان نسبی داشت، درحالی که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن افزایش یافت و به ۳/۶ برابر رسید. بیان نسبی ژن *COR* پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک، ۳/۷ برابر افزایش نشان داد، در حالی که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن افزایش یافت و به ۱۱/۴۱ برابر رسید. بیان نسبی ژن *T6ODM* پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک، ۰/۰۷ برابر نشان داد، در حالی که در زمان ۷۲ ساعت میزان بیان نسبی این ژن نسبت به شاهد افزایش یافت و به ۳۹/۷۹ برابر رسید (شکل ۱).

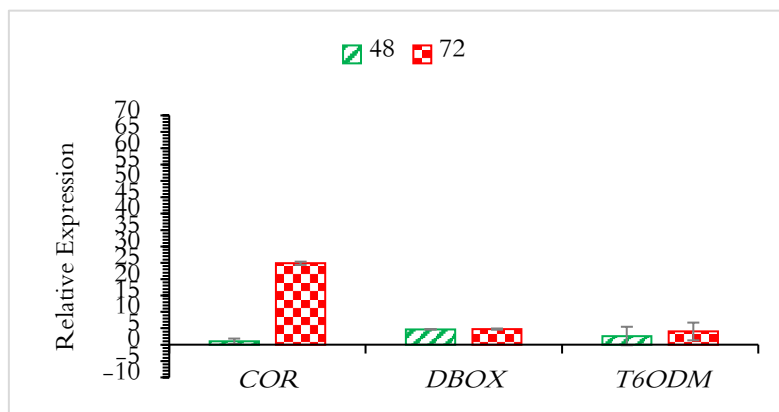
##### اثر نانوذره نقره شیمیایی

نتایج نشان داد که بیان ژن *DBOX* پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک، ۴/۶۹ برابر افزایش داشت،



شکل ۱- اثر نانوذره نقره گیاهی بر بیان نسبی ژن های *COR*، *DBOX* و *T6ODM* در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت برای کالوس‌های به‌دست آمده از گیاه *P. orientale*

Figure 1. Effect of green silver nano particle on *COR*, *DBOX* and *T6ODM* gene expressions in *P. orientale* L. suspension culture.



شکل ۲- اثر نانوذره نقره شیمیایی بر بیان نسبی ژن های *COR*، *DBOX* و *T6ODM* در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت برای کالوس‌های به‌دست آمده از گیاه *P. orientale*

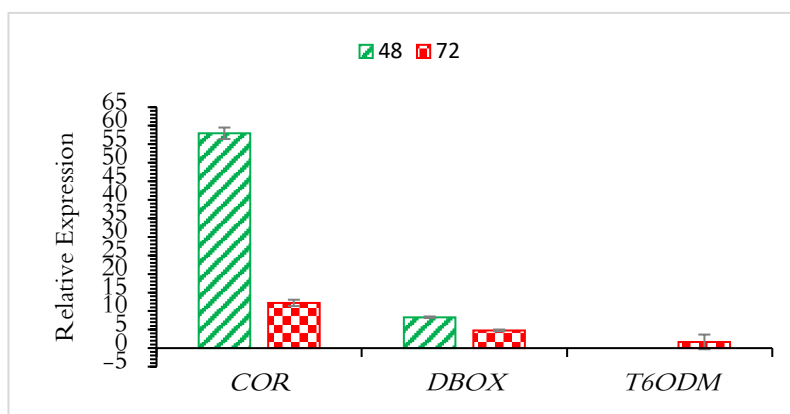
Figure 2. Effect of chemical silver nano particle on *COR*, *DBOX* and *T6ODM* gene expressions in *P. orientale* L. suspension culture.

#### اثر محرک گرافن به همراه نانوذره نقره گیاهی

نتایج نشان داد که پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک، بیان ژن *DBOX*،  $3/82$  برابر افزایش یافت، درحالی‌که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به  $3/31$  برابر رسید. بیان ژن *COR* پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک،  $50/63$  برابر بیان افزایش داشت، درحالی‌که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به  $1/75$  برابر رسید. پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک، بیان ژن *T6ODM*  $45/77$  برابر شد، درحالی‌که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به  $1/61$  برابر رسید (شکل ۵).

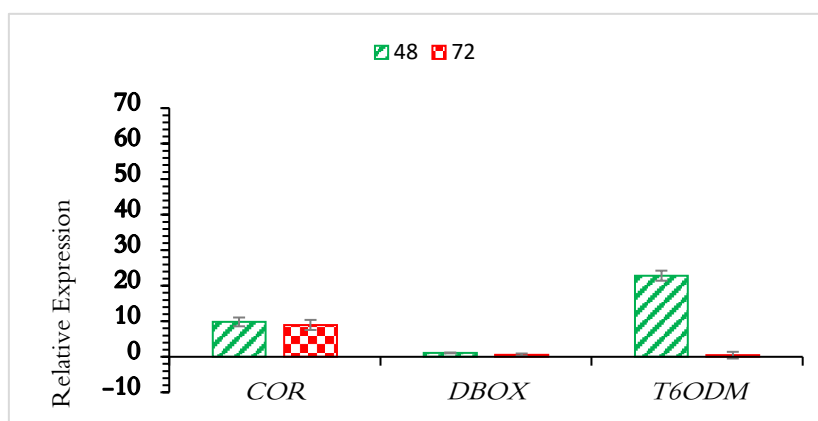
#### اثر نانولوله‌های کربنی

نتایج نشان داد که بیان ژن *DBOX* پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال محرک،  $1/096$  برابر افزایش داشت، درحالی‌که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به  $0/56$  برابر رسید.  $48$  ساعت پس از اعمال محرک، بیان نسبی ژن *COR*  $9/82$  برابر افزایش داشت، درحالی‌که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به  $8/97$  برابر رسید.  $48$  ساعت پس از اعمال محرک، بیان نسبی ژن *T6ODM*  $22/83$  برابر افزایش داشت، درحالی‌که در زمان ۷۲ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به  $0/45$  برابر رسید (شکل ۴).



شکل ۳- اثر محرک گرافن با پوشش نانوذره نقره بر بیان نسبی ژن‌های *COR*، *DBOX* و *T6ODM* در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت برای کالوس‌های به‌دست آمده از گیاه *P. orientale*

Figure 3. Effect of graphene coated with chemical silver nanoparticles on *COR*, *DBOX*, and *T6ODM* gene expressions in *P. orientale* L. suspension culture.



شکل ۴- اثر نانولوله‌های کربنی بر بیان ژن‌های *COR*، *DBOX* و *T6ODM* در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت برای کالوس‌های به‌دست آمده از گیاه *P. orientale*

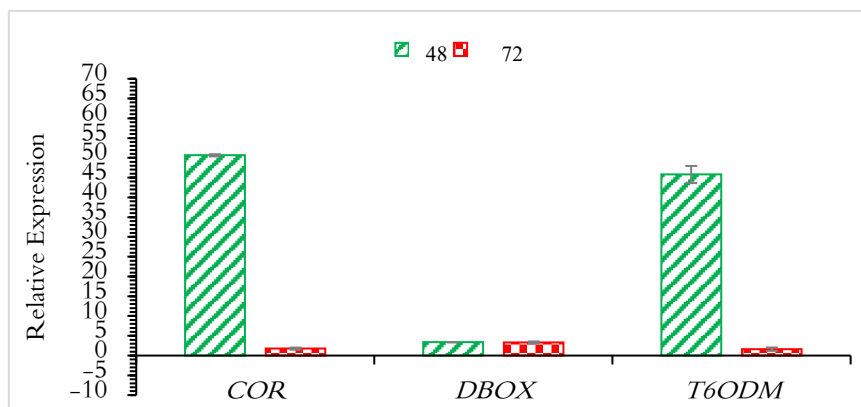
Figure 4. Effect of carbon nanotubes on *COR*, *DBOX* and *T6ODM* gene expressions in *P. orientale* L. suspension culture.

نقره گیاهی، پس از ۴۸ ساعت، علاوه بر کنترل نسبت به زمان ۷۲ ساعت، بیان ژن‌ها افزایش یافت. این موضوع را می‌توان با اثر سمیت بیشتر نانوذرات کربنی بر شاخص میتوزی و ژنومی مرتبط دانست (Castiglione *et al.*, 2010). از آن‌جا که اطلاعات زیادی در مورد استفاده از نانوذرات در گیاهان موجود نمی‌باشد، تصمیم‌گیری در مورد عملکرد آن‌ها در سلول‌های گیاهی، نیازمند مطالعات بیشتری است. کاربرد نانوذرات ممکن است سبب بروز استرس‌های

نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که نانومحرک‌های مختلف، اثرات متفاوتی در بیان ژن‌های دخیل در مسیر تولید آلکالوئیدهای مختلف در کشت دروایه یاخته‌ای گیاه شقایق شرقی دارد. همچنین میزان بیان نسبی ژن‌های اندازه‌گیری شده در نانومحرک نقره گیاهی و شیمیایی پس از ۷۲ ساعت، افزایش داشته است، درحالی‌که در نانومحرک‌های کربنی مانند گرافن با پوشش نانوذره نقره، نانولوله‌های کربنی و همچنین ترکیب گرافن به همراه نانوذرات

که این نانوذره، با تولید یون نقره و یا به صورت نانوذره، بر یاخته تاثیر می‌گذارد. یون نقره با اتصال به پروتئین‌های سیستئین‌دار در غشا، پلاسمایی، منجر به آسیب‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی غشا و دیواره یاخته ای می‌شود (Levine *et al.*, 1994; Gajjar *et al.*, 2009; Ocoy *et al.*, 2013).

اکسیداتیو شوند و با آزادسازی رادیکال‌های اکسیژن، خسارت‌هایی را به مولکول‌های زیستی وارد سازند؛ همچنین خود این ذرات نیز یون‌هایی را به محیط وارد می‌کنند (Chomoucka *et al.*, 2010). نانو نقره، فعالیت ضد میکروبی دارد. گرچه سازوکار سمیت این نانوذره بخوبی شناسایی نشده است، اما به نظر می‌رسد



شکل ۵- اثر محرک گرافن به همراه نانوذره نقره گیاهی بر بیان ژن‌های *COR*، *DBOX* و *T6ODM* در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت برای کالوس‌های به دست آمده از گیاه *P. orientale*

Figure 5. Effect of graphene and green silver nanoparticles combination on *COR*, *DBOX* and *T6ODM* gene expressions in *P. orientale* L. suspension culture.

نتیجه، به معنای همبستگی مثبت بین ژن *DBOX* و آلکالوئید متناظر آن است. همچنین Cho *et al.* (2008)، بیان داشتند که با افزایش سنگوئینارین در سلول، بیان این ژن کاهش پیدا می‌کند تا سلول‌ها را از سمیت دورنگه دارد. از آن‌جا که سنگوئینارین جزو ترکیبات بسیار سمی در میان بنزوفنانتری‌دین‌هاست، تجمع آن به طور موقت و با تغییر سریع انجام می‌پذیرد و زمانی که الیستور به محیط سلولی اضافه می‌شود، سنگوئینارین افزایش می‌یابد و با ترشح به محیط کشت سلولی، موجب افزایش دی‌هیدروسنگوئینارین در سلول می‌شود. بنابراین و با توجه به این‌که در این تحقیق، متابولیت‌ها اندازه‌گیری نشدند، می‌توان با استناد به تحقیقات پیشین این‌گونه پنداشت که محرک گرافن با پوشش نانوذره نقره، برای بهره‌برداری بیشتر از این متابولیت در شرایط *in vitro* کارایی بیشتری داشته باشد.

*COR*، آنزیم پیشین مسیر مورفین است که کدئینون

ژن *DBOX* در مسیر زیست ساخت تولید پاپورین و سنگوئینارین شناخته شده است (Beaudoin & Facchini, 2014). سنگوئینارین دارای خاصیت آنتی اکسیدانتی، ضد میکروبی و ضد التهابی است (Young, 2008). نسخه‌های *DBOX* به طور انحصاری در ریشه‌های خشخاش بیان می‌شوند که امکان انتقال سیستماتیک پاپورین را از ریشه به اندام‌های هوایی می‌دهد (Beaudoin & Facchini, 2014). این ژن، مسئول تنظیم آستانه تحمل سمیت سنگوئینارین در سلول است. آنزیم دی-هیدروبنزوفنانتری‌دین اکسیداز، تبدیل دی-هیدروسنگوئینارین به سنگوئینارین را بر عهده دارد که با افزایش سنگوئینارین در سلول، بیان این ژن کاهش می‌یابد تا سلول‌ها را از سمیت این ماده دور نگه دارد (Cho *et al.*, 2008). در مطالعه بیان نسبی ژن *DBOX* و آلکالوئید متناظر آن، پاپورین با محرک نانوذره نقره افزایش پیدا کرد (Shirvani & Naghavi, 2017). این

۴۸ *T6ODM* ترکیب GO با نانوذره گیاهی در زمان ساعت بهترین حالت بود و بنابراین با توجه به این که *T6ODM* مشابه با *COR* کدئین و مورفین را کنترل می‌کند و برای *COR* هم GO همراه با نانوذره نقره گیاهی پیشنهاد شده بود، در اینجا نیز ترکیب GO همراه با نانوذره نقره گیاهی، به‌عنوان مناسب‌ترین گزینه پیشنهادی می‌تواند برای تحقیقات بعدی به‌کار گرفته شود.

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که احتمالاً ژن‌های *DBOX*، *T6ODM* و *COR* و آلکالوئیدهای متناظر آن، در تیمار با محرک گرافن با پوشش نانوذره نقره شیمیایی برای بهره‌برداری بیشتر از این متابولیت‌ها در شرایط *in vitro* کارایی بیشتری داشته باشد. البته با توجه به این که نانوذره نقره گیاهی در مقایسه با نانوذره نقره شیمیایی از لحاظ زیست محیطی مطلوب‌تر است، بنابراین بهتر است GO با Ag گیاهی مورد استفاده قرار گیرد. اگر چه در تحقیق حاضر بهتر بود بررسی بیان ژن به همراه ثبت ترکیباتی مانند مورفین، کدئین، تبائین و سنگوئینارین با دستگاه HPLC در تیمارهای مختلف الیستوری انجام می‌گرفت تا مقایسه بین تغییرات در میزان ترکیبات مذکور با بیان ژن‌های دخیل بررسی شود، ولی به واسطه کم بودن میزان سوسپانسیون سلولی برای هر تیمار، امکان هر دو مورد ثبت ترکیبات به همراه استخراج RNA و بررسی بیان ژن وجود نداشت.

را به کدئین تبدیل می‌کند (Huang & Kutchan, 2000). این آنزیم همچنین در مسیر دیگری، مورفینان را به مورفین تبدیل می‌کند (Beaudoin & Facchini, 2014). در این تحقیق، از بین محرک‌های مختلف، محرک نانوذره GO با پوشش نانوذره نقره و همچنین GO به همراه نانوذره نقره گیاهی، هر دو باعث افزایش بیشتر بیان نسبی ژن در زمان ۴۸ پس از اعمال محرک شدند. نتایج مطالعه Allen et al. (2008) نشان داد که افزایش ژن *COR* می‌تواند میزان تجمع کدئین و مورفین را افزایش دهد. بنابراین و با توجه به این که افزایش فعالیت این ژن، باعث افزایش این متابولیت‌ها می‌شود، می‌توان GO با پوشش نانوذره نقره را پیشنهاد نمود؛ البته با توجه به این که نانوذره گیاهی در مقایسه با نانوذره شیمیایی از لحاظ زیست محیطی مطلوب‌تر است، بنابراین بهتر است GO و Ag گیاهی در مطالعات بعدی استفاده شوند.

ژن *T6ODM* یکی از ژن‌های کلیدی در زیست ساخت مورفین است (Beaudoin & Facchini, 2014). آنزیم *T6ODM*، تبائین تولید شده را در فرآیند یک واکنش سریع به کدئینون تبدیل می‌کند و سپس کدئینون توسط *COR* به کدئین تبدیل می‌شود. این دو آنزیم در مسیر دیگری که از تبائین انشعاب گرفته و اورپیاوین را به مورفین تبدیل می‌کند نیز نقش دارند (Beaudoin & Facchini, 2014). Hegal & Facchini (2010)، با خاموش سازی دو ژن *T6ODM* و *CODM* مشاهده کردند که خاموش سازی ژن *T6ODM* منجر به کاهش میزان مورفین و کدئین می‌شود. در ژن

### REFERENCES

- Allen, R. S., Miller, J. A., Chitty, J. A., Fist, A. J., Gerlach, W. L. & Larkin, P. J. (2008). Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in opium poppy. *Plant Biotechnology Journal*, 6(1), 22-30.
- Beaudoin, G. A. & Facchini, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240(1), 19-32.
- Castiglione, M. R., Giorgetti, L., Geri, C. & Cremonini, R. (2011). The effects of nano-TiO<sub>2</sub> on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(6), 2443-2449.
- Cho, H. Y., Son, S. Y., Rhee, H. S., Yoon, S. Y. H., Lee-Parsons, C. W. & Park, J. M. (2008). 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. *Journal of Biotechnology*, 135(1), 117-122.
5. Chomoucka, J., Drbohlavova, J., Huska, D., Adam, V., Kizek, R. & Hubalek, J. (2010). Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*, 62(2), 144-149.
  6. Gajjar, P., Pettee, B., Britt, D. W., Huang, W., Johnson, W. P. & Anderson, A. J. (2009). Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Biological Engineering*, 3(1), 9.
  7. Ghorbanpour, M. & Hadian, J. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon*, 94, 749-759.
  8. Goudarzi, M., Mir, N., Mousavi-Kamazani, M., Bagheri, S. & Salavati-Niasari, M. (2016). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles prepared from two novel natural precursors by facile thermal decomposition methods. *Scientific Reports*, 6, 32539.
  9. Hashemi, S. M., & Naghavi, M. R. (2016). Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(1), 31-41.
  10. Hagel, J. M. & Facchini, P. J. (2010). Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology*, 6(4), 273-5.
  11. Huang, F. C. & Kutchan, T. M. (2000). Distribution of morphinan and benzo [c] phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 53(5), 555-564.
  12. Lahiani, M. H., Dervishi, E., Ivanov, I., Chen, J. & Khodakovskaya, M. (2016). Comparative study of plant responses to carbon-based nanomaterials with different morphologies. *Nanotechnology*, 27(26), 265102. Chicago.
  13. Lee, H., Bae, E. K., Park, S. Y., Sjödin, A., Lee, J. S., Noh, E. W. & Jansson, S. (2007). Growth-phase-dependent gene expression profiling of poplar (*Populus alba* × *Populus tremula* var. *glandulosa*) suspension cells. *Physiologia Plantarum*, 131(4), 599-613.
  14. Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583-593.
  15. Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacogn Review*, 1(1), 69-79.
  16. Nyman, U. & Bruhn, J. G. (1979). *Papaver bracteatum*—a summary of current knowledge. *Planta Medica*, 35(02), 97-117.
  17. Ocoy, I., Paret, M. L., Ocoy, M. A., Kunwar, S., Chen, T., You, M. & Tan, W. (2013). Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas perforans*. *Acs Nano*, 7(10), 8972-8980.
  18. Shafiee, A., Lalezari, I., Nasser Nouri, P. & Asgharian, R. (1975). Alkaloids of *Papaver orientale* and *Papaver pseudo orientale*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(9), 1570-1572.
  19. Shirvani, S. & Naghavi, M. (2017). Effect of nano elicitors on alkaloids production and genes expression in *Papaver orientale* suspension culture. *Iranian Journal of field Crop Science*. 48(3), 625-636. (In Persian).
  20. Suzuki, K., Fukuda, Y. & Shinshi, H. (1995). Studies on elicitor-signal transduction leading to differential expression of defense genes in cultured tobacco cells. *Plant and Cell Physiology*, 36(2), 281-289.
  21. Verma, N. & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.
  22. Zhao, J., Davis, L. C. & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.