

## اثر الیسیستور زیستی و نانوالیسیستور بر افزایش تولید برخی آلکالوئیدها در گیاه خشخاش (*Papaver somniferum* L.)

مهديه خداياري<sup>۱</sup>، منصور اميدي<sup>۲\*</sup>، علي اکبر شاهنجات بوشهري<sup>۳</sup>، داراب يزداني<sup>۴</sup>، محمدرضا نقوي<sup>۵</sup>  
و زهره کدخدای<sup>۶</sup>

۱. ۲، ۳ و ۵. دانشجوی سابق دکتری مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، استاد، دانشیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۴ و ۶. استادیار و کارشناس گروه فارماکوتکونوزی و داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی  
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۱۷ - تاریخ تصویب: ۹۲/۵/۶)

### چکیده

به منظور افزایش و بهبود تولید انواع آلکالوئیدهای ارزشمند بنزوفناتریدین در گیاه خشخاش، مهندسی‌های متابولیت فراوانی انجام شده است که یکی از آنها استفاده از الیسیستورهاست که با تحریک سیگنال‌های سلولی موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان یا کشت سلولی آنها می‌شوند. در این مطالعه با توجه به اهمیت ویژه خشخاش در صنعت داروسازی به‌منزله تنها منبع تجاری تولید آلکالوئیدهای مورفین و سنگوئینارین و مشکل بودن سنتز شیمیایی این ترکیبات ارزشمند، پس از بهینه‌سازی محیط کشت کال‌زایی و انتخاب بهترین ریزنمونه، اثر دو الیسیستور عصاره مخمر و نانو  $TiO_2$  در دو زمان مختلف در کشت سوسپانسیون سلولی مریستم و ریشه در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی شد. این الیسیستورها در سوسپانسیون‌های سلولی مریستم و ریشه موجب تجمع سنگوئینارین و تبائین شدند که بیشترین مقدار سنگوئینارین و تبائین در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار با الیسیستور عصاره مخمر به ترتیب ۲/۲ و ۳/۴ برابر نسبت به شاهد در همین زمان به دست آمد. نانو الیسیستور  $TiO_2$  توانست در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار موجب افزایش دو آلکالوئید مزبور تا ۲/۱ برابر نسبت به شاهد شود که با گذشت زمان این مقدار کاهش پیدا کرد. آنچه در این مطالعه مشاهده شد، تحریک‌پذیری زیاد سلول‌های مریستمی در برابر تیمار با هر دو الیسیستور و اثر آن در تجمع هر دو متابولیت بود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که با استفاده از الیسیستورها و مخصوصاً نانوالیسیستورها می‌توان چرخه بیوسنتزی تولید و تجمع متابولیت‌های تبائین و سنگوئینارین را در این گیاه تحریک کرد و این القا می‌تواند در هر دو ریزنمونه ریشه و مریستم مؤثر و حتی با یکدیگر متفاوت باشد.

واژه‌های کلیدی: تبائین، سنگوئینارین، عصاره مخمر، نانو  $TiO_2$

آلکالوئید مختلف از کلاس تتراهیدروبنزیلیزوکوئینولین‌ها<sup>۱</sup>

### مقدمه

خشخاش (*Papaver somniferum* L.)، یکی از گیاهان دارویی مهمی است که قابلیت بیوسنتز بیش از ۸۰

1. Tetrahydrobenzylisoquinolines  
E-mail: momidi@ut.ac.ir

را داراست (Weid *et al.*, 2004). بنزیل ایزوکوئینولین‌ها<sup>۱</sup>، گروه بزرگی از آلکالوئیدهای نیتروژن دار هستند که بیش از ۲۵۰۰ ساختار از آن‌ها در چهار خانواده گیاهی از جمله *Papaveraceae* شناسایی شده است (Ziegler & Facchini, 2008). تیروزین<sup>۲</sup> نقطه آغازین چرخه بیوسنتزی این متابولیت‌هاست (Facchini *et al.*, 1995). متابولیت‌هایی نظیر مورفین<sup>۳</sup> با خاصیت مسکن و ضد درد، کدئین<sup>۴</sup> با خاصیت ضد سرفه، پاپاورین<sup>۵</sup> و توبوکورارین<sup>۶</sup> به‌منزله شل‌کننده عضلات، بربرین<sup>۷</sup> داروی پایین‌آورنده کلسترول، سنگوئینارین<sup>۸</sup> به‌منزله ترکیب ضد میکروبی و ضد التهابی (Zdařilová *et al.*, 2006) و نوسکاپین<sup>۹</sup> داروی فرونشاندنده سرفه و ضد سرطان (Dumontet & Jordan, 2010) در گروه بنزیل ایزوکوئینولین‌ها قرار دارند. سنتز و ذخیره‌سازی آلکالوئیدها در خشخاش با همکاری سه نوع سلول در آوند آبکش انجام می‌شود. ژن‌های سنتزکننده این آلکالوئیدها در سلول‌های همراه بیان شده، آنزیم‌های حاصل پس از تجمع در آن‌ها به عناصر غربالی منتقل می‌شوند و پس از تولید آلکالوئیدها در این سلول‌ها توسط وزیکل‌هایی به سلول‌های لاتیسفر<sup>۱۰</sup>، در مجاورت عناصر غربالی آوند آبکش، منتقل می‌شوند و در سیتوپلاسم یا لاتکس این سلول‌ها تجمع می‌یابند (Liscombe & Facchini, 2008). تجمع آلکالوئیدهای ضد میکروبی نظیر سنگوئینارین در ریشه و در ارتباط با سلول‌هایی به غیر از سلول‌های لاتیسفر است. این ماده در شبکه آندوپلاسمی سنتز شده و در واکوئل‌ها ذخیره می‌شود که با توجه به سمی بودن آن برای گیاه، می‌تواند ترشح شده یا به دی‌هیدروسنگوئینارین که سمیت کمتری دارد تبدیل شود (Kavalco *et al.*, 2007).

تلاش‌های زیادی برای افزایش تولید متابولیت‌های گیاه خشخاش (*P. somniferum*) اجرا شده و از الیستورهای مختلف در زمان‌های متفاوتی برای مشاهده تأثیر آن‌ها بر افزایش این آلکالوئیدها استفاده شده است. در بررسی اثر الیستورها در میزان تجمع آلکالوئیدها، Facchini *et al.* (1996) نشان دادند که پس از گذشت پنج تا ده ساعت از اضافه‌کردن قارچ *Botrytis sp.* به کشت سوسپانسیون خشخاش، میزان سنگوئینارین آن، به‌طرز چشمگیری افزایش یافت. Byun *et al.* (1992) زمان اعمال الیستور را در افزایش تولید و تجمع سنگوئینارین در خشخاش کالیفرنایی بسیار مهم دانستند. اثر ۱۲ عنصر بر تجمع آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین *P. somniferum* L. توسط Lovkova *et al.* (2005) مطالعه شد و تأثیر عناصر مس، کبالت، مولیبدن، کروم و تنگستن به‌منزله فعال‌کننده و عناصر کلسیم، منگنز، بر، آهن و وانادیوم به‌منزله بازدارنده در این مسیر مشخص شد. Holkova *et al.* (2010) اثر الیستورهای زیستی (*Botrytis cinerea*) و غیرزیستی

به‌منظور افزایش تولید انواع آلکالوئیدهای ارزشمند بنزوفنانتیریدین<sup>۱۱</sup> در گیاه خشخاش، مهندسی‌های متابولیت فراوانی انجام شده است که یکی از این روش‌ها استفاده از الیستورهاست (Archambault *et al.*, 1996; Holkova

1. Benzyloquinolines
2. Tyrosine
3. Morphine
4. Codeine
5. Papaverine
6. Tubocurarine
7. Berberin
8. Sanguinarine
9. Noscapine
10. Laticifer
11. Benzophenanthridine

تبائین به‌منزله ماده اولیه داروهای اکسی‌کدون<sup>۳</sup> و نالتراکسون<sup>۴</sup> و همچنین کاربرد سنگوئینارین در داروهای ضد میکروبی (Decker et al., 2000; Chatterjee et al., 2010) انجام شده است که در آن اثر دو الیسیاتور زیستی (عصاره مخمر) و غیرزیستی (نانو  $\text{TiO}_2$ )، بر روی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های ریشه و مریستم انتهایی ساقه گیاه خشخاش *P. somniferum* L. در شرایط *in vitro* در دو زمان مختلف بعد از اعمال الیسیاتور، با هدف افزایش تولید ترکیبات دارویی ارزشمند سنگوئینارین و تبائین، بررسی شد. نانو ذره  $\text{TiO}_2$ ، که در این مطالعه به‌منزله الیسیاتور غیرزیستی از آن استفاده شد خواص نوری، الکتریکی و کاتالیستی بسیار عالی و در صنایع مختلف و همچنین کشاورزی کاربردهای فراوانی دارد (Gottschalk et al., 2009). در گیاه اسفناج این نانو ذره از طریق افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز بر متابولیسم نیتروژن اثر می‌گذارد و سبب افزایش رشد و میزان فتوسنتز می‌شود (Yang et al., 2006). همچنین با جذب نور قادر به تولید رادیکال‌های سوپراکسیددسموتاز و هیدروکسید است و به این ترتیب موجب تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌شود (Hong et al., 2005; Lei et al., 2008). عصاره مخمر دیگر الیسیاتور استفاده‌شده در این مطالعه، حاصل سلول‌های اتولیزشده مخمر است که محلول در آب است و استفاده از آن به‌منزله الیسیاتور زیستی، موجب تحریک سازوکار دفاعی گیاهان و تجمع فیتوالکسین‌ها می‌شود (Hahn & Albersheim, 1981) و تأثیر آن بر افزایش آلکالوئیدهای خشخاش کالیفرنایی در کشت سلولی ذکر شده است (Young Cho et al., 2008).

### مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** بذور خشخاش (*P. somniferum* L.) جمع‌آوری شده از مزارع خشخاش در کابل، در سال ۱۳۸۹ از پژوهشکده گیاهان دارویی تحویل گرفته شد. برای به‌دست‌آوردن گیاهچه‌های سترون، بذور با الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ده دقیقه تحت شرایط سترون ضد عفونی سطحی شده و پس از ۳-۵ بار شست‌وشو با آب مقطر دو بار

(متیل جاسمونات)<sup>۱</sup> و فنیدون<sup>۲</sup> (بازدارنده اختصاصی آنزیم لیبواکسیژناز)، را در میزان تأثیر آنزیم لیبواکسیژناز بر تولید سنگوئینارین، در محیط کشت، بررسی و میزان افزایش مقدار آن را در محیط کشت تحریک‌شده توسط متیل جاسمونات پس از گذشت ۱۰ ساعت، ۹/۸ برابر و پس از تحریک توسط *B. cinerea*، ۲/۹ برابر، گزارش کردند که به دنبال آن تجمع سنگوئینارین به‌ترتیب به میزان  $12/5 \pm 169/5$  و  $10/0 \pm 288/0$  میکروگرم بر گرم وزن خشک سلولی رسید. در پژوهشی دیگر Archambault et al. (1996) توانستند با استفاده از کیتوزان میزان سنگوئینارین، را در خشخاش به‌دو برابر افزایش دهند. Balažová et al. (2008)، ترکیبی از الیسیاتورزیستی (قارچ *Botrytis cinerea*) و غیرزیستی ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) را به‌منظور افزایش سنگوئینارین در خشخاش کالیفرنایی پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از اعمال الیسیاتور بررسی کردند و بالاترین میزان سنگوئینارین را ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از استفاده از غلظتی معادل هزار برابر  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  نسبت به کنترل ذکر کردند.

Young Cho et al. (2008) با استفاده از تیمار ترکیبی الیسیاتورهای عصاره مخمر، متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید موفق به افزایش ۲/۵ برابری هیدروسنگوئینارین و ۵/۵ برابری سنگوئینارین در ۹۲ ساعت پس از اعمال تیمار در گیاه خشخاش شدند. Alcantara et al. (2005) نشان دادند که برخلاف گیاه خشخاش، آلکالوئیدهای مورفینان، در کشت سلولی تولید نمی‌شوند اما سنگوئینارین در واکوئل‌ها در کشت سلولی خشخاش و در پاسخ به الیسیاتور قارچی افزایش و تجمع می‌یابد. البته در مطالعات انجام‌شده تفاوت‌های زیادی در بیان ژن‌های بیوسنتزی آلکالوئیدها، تولید و تجمع آن‌ها در کشت سلولی خشخاش قابل مشاهده است که می‌توان آن را با نوع الیسیاتور، زمان استفاده از آن، مدت‌زمانی که سلول‌ها در معرض این الیسیاتورها قرار دارند، نوع و غلظت مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت و نهایتاً سن کالوس مرتبط دانست (Namdeo, 2007).

پژوهش حاضر با توجه به اهمیت ویژه خشخاش در صنعت داروسازی جهان و استفاده از آلکالوئیدهایی نظیر

3. Oxycodone  
4. Naltrexone

1. Metyl jasmonate  
2. Phenidone

این گیاه از روش Young Cho *et al.* (2008) استفاده شد. کالوس‌های جمع‌آوری‌شده کشت سلولی (۰/۱ گرم از کالوس‌های فریزشده) را با یک میلی‌لیتر متانول حاوی ۰/۵ درصد HCl (حجمی/حجمی) مخلوط و پس از ۶۰ دقیقه تیمار در حمام اولتراسونیک، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جمع‌آوری و از فیلتر عبور داده شد.

**شرایط دستگاه HPLC:** برای اندازه‌گیری تبائین و سنگوئینارین از دستگاه HPLC مدل Knauer، ستون C18 (۲۵۰×۴/۶mm, TeknokRoma) و دکتور (UV Detector K-2501-Wellchrom) استفاده شد که این آلکالوئیدها در طول موج ۲۸۳nm شناسایی شدند. از ترکیب متانول: آب (۳:۷ حجمی/حجمی) حاوی تری‌اتیل‌آمین (۰/۲ درصد حجمی/حجمی) به‌منزله فاز متحرک و با جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه به‌صورت ایزوکراتیک استفاده شد. برای اندازه‌گیری کمی آلکالوئیدها، مقدار ۵۰ μl از غلظت‌های (۰/۲۵ mg/ml)، ۰/۵، ۱/۷۵ و ۱، استاندارد هر یک از آلکالوئیدهای سنگوئینارین و تبائین (Sigma, St. Louis, USA) استفاده و هر یک در سه تکرار به دستگاه HPLC تزریق شد (شکل‌های ۱ و ۲).

**آنالیز داده‌ها:** در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی برای انجام همه آزمایش‌ها استفاده و برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار SAS نسخه 9.2 استفاده شد. میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مقایسه شدند.

### نتایج و بحث

درصد جوانه‌زنی بذور خشخاش در محیط MS ۱/۲ فاقد هورمون پس از گذشت ۱۴ روز کشت در یخچال و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حدود ۹۰ درصد به دست آمد. پس از دستیابی به گیاهچه‌هایی با بنیه قوی و مناسب، ریزنمونه‌هایی از ناحیه مرستم انتهایی ساقه، ساقه، برگ، طوقه و ریشه تهیه و پس از کال‌زایی، با در نظر گرفتن حداکثر حجم، وزن، اندازه کالوس و درصد کال‌زایی، (داده‌ها نشان داده نشده‌اند)، ریزنمونه‌های ریشه و مرستم انتهایی ساقه برای ادامه مطالعه انتخاب شدند.

سترون به محیط کشت MS ۱/۲ فاقد هورمون با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار منتقل شد. برای جوانه‌زنی بهتر، بذور کشت‌شده به مدت دو هفته در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به اتاق کشت با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی (حدود ۶ هزار لوکس) و هشت ساعت تاریکی منتقل شدند (Park & Facchini, 2000). جوانه‌زنی بذور بعد از گذشت سه هفته آغاز شد. پس از دستیابی به گیاهچه‌هایی به ارتفاع حدوداً ۸-۱۰ سانتی‌متر، ریزنمونه‌های مناسب از ناحیه مرستم انتهایی ساقه، ساقه، برگ، طوقه و ریشه برای فاز کال‌زایی، انتخاب و به محیط کال‌زایی، یعنی محیط MS ۱/۲ با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار به همراه هورمون‌های BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر)، منتقل شدند. کالوس‌های مورد نظر پس از دو بار واکنش سه‌هفته‌ای، از نظر درصد کال‌زایی، حجم و وزن کالوس ارزیابی شدند و کالوس‌های ریشه و مرستم ساقه به‌منزله بهترین کالوس‌ها، به محیط سوسپانسیون MS ۱/۲ (محیط فاقد آگار) با همان ترکیب هورمونی (مخصوص مرستم و ریشه) منتقل و در شیکر یخچال‌دار در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از تکثیر کالوس‌ها و رسیدن به رشد مطلوب در فازنمایی، تمام سوسپانسیون‌ها با محلول عصاره مخمر (Sigma, St. Louis, USA) به میزان ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر (۰/۲ گرم از عصاره مخمر در یک لیتر آب حل و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد (Young Cho *et al.*, 2008) و نانو TiO<sub>2</sub> (تهیه‌شده از دانشکده علوم و فنون دانشگاه تهران)، به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر، تیمار شدند. هر سوسپانسیون به‌منزله یک نمونه و برای هر بازه زمانی نیز یک شاهد در نظر گرفته شد و به سوسپانسیون‌های شاهد ۱CC آب مقطر در هر زمان اضافه شد. کالوس‌های رشدیافته در سوسپانسیون‌های سلولی در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار برای اندازه‌گیری آلکالوئیدهای تبائین و سنگوئینارین با استفاده از کاغذ صافی جمع‌آوری و برای آنالیزهای بعدی در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

**سنجش آلکالوئیدها:** برای اندازه‌گیری آلکالوئیدهای

سوسپانسیون سلولی خشخاش نشان داد که اثر هر یک از عوامل الیسیستور، زمان و نوع ریزنمونه به‌تنهایی و اثر متقابل آن‌ها در سطح ۱ درصد معنادار است (جدول ۱).

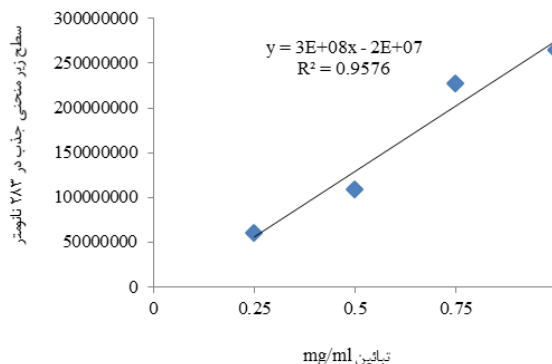
جدول ۱. تجزیه واریانس تغییرات میزان آلکالوئیدهای سنگوئینارین و تبائین در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش

منابع تغییرات	درجه آزادی	سنگوئینارین	تبائین
زمان	۱	۵۶۲/۲۰**	۱/۹۸**
الیسیستور	۲	۸۷۳/۷۸**	۳۳/۲۸**
ریزنمونه	۱	۱۱۰/۴۱**	۳۳/۱۷**
زمان × الیسیستور	۲	۶۲۸/۹۲**	۶/۲۷**
زمان × ریزنمونه	۱	۰/۱۰**	۵/۱۳**
الیسیستور × ریزنمونه	۲	۱۱۲/۲۰۷**	۱۰/۷۵**
زمان × الیسیستور × ریزنمونه	۲	۳۵/۹۹**	۸/۶۷**
خطای آزمایش	۲۴	۰/۸۶۷	۰/۰۸۰۹
ضریب تغییرات (درصد)		۳/۳۲	۹/۷۴

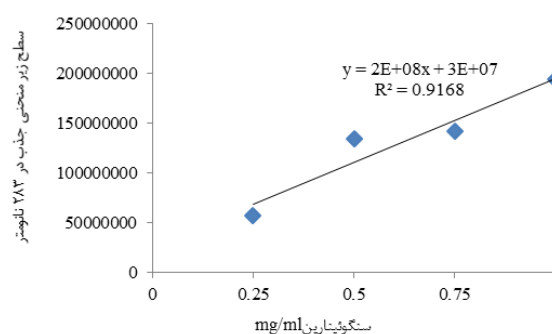
\*\* اختلاف معنادار در سطح احتمال ۱ درصد.

در مقایسه اثر متقابل الیسیستورها در زمان‌های مختلف بر تولید متابولیت‌های سنگوئینارین و تبائین در سوسپانسیون سلولی، بیشترین مقدار سنگوئینارین و تبائین در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار با الیسیستور عصاره مخمر به‌ترتیب ۲/۲ و ۳/۴ برابر نسبت به شاهد به دست آمد. نانو الیسیستور TiO<sub>2</sub> توانست در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار موجب افزایش دو آلکالوئید مزبور تا ۲/۱ برابر شود که با گذشت زمان این مقدار کاهش پیدا کرد. می‌توان این کاهش را با اثر سمیت نانو ذرات بر شاخص میتوزی (ژنوتوکسیک) (Castiglione et al., 2011) مرتبط دانست.

مقایسه اثر متقابل زمان و ریزنمونه و معنادار شدن سطوح آن نشان می‌دهد که تجمع متابولیت‌ها با گذشت زمان و در ریزنمونه‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد؛ هرچند که (Rush et al., 1985)، نوع ریزنمونه را در تجمع متابولیت‌ها بی‌تأثیر دانسته‌اند اما در این مطالعه (و با در نظر گرفتن سایر شرایط که در ادامه به آن اشاره می‌شود)، تأثیر ریزنمونه را به‌وضوح می‌توان مشاهده کرد. اثر متقابل الیسیستور و ریزنمونه نیز بررسی شد، مقایسه میانگین آن‌ها نشان داد که نانو الیسیستور TiO<sub>2</sub> به‌طور معناداری موجب افزایش تبائین در هر دو ریزنمونه نسبت به شاهد شده است اما تفاوت معناداری در مقدار



شکل ۱. نمودار استاندارد تبائین



شکل ۲. نمودار استاندارد سنگوئینارین

بهترین کالوس برای ریزنمونه ریشه در محیط MS ۱/۲ و تیمارهای هورمونی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به دست آمد که نتایج منطبق با نتیجه به‌دست‌آمده توسط Karimaneh et al. (2009) بود. بهترین کالوس ریزنمونه مریستم در محیط MS ۱/۲ 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. در ادامه اثر الیسیستورهای عصاره مخمر و نانو TiO<sub>2</sub> بر میزان تغییرات آلکالوئیدهای تبائین و سنگوئینارین در سوسپانسیون سلولی دو ریزنمونه مریستم و ریشه بررسی شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. فاکتور الیسیستور در سه سطح (شاهد، عصاره مخمر و نانو TiO<sub>2</sub>)، فاکتور ریزنمونه در دو سطح (مریستم ساقه و یشه) و فاکتور زمان (در دو سطح ۲۴ و ۴۸ ساعت) بر دو متابولیت سنگوئینارین و تبائین بررسی شد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان تغییرات آلکالوئیدهای سنگوئینارین و تبائین در کشت

کالوس ریشه نسبت به کالوس مریستم سرعت بیشتری داشت (شکل ۳).

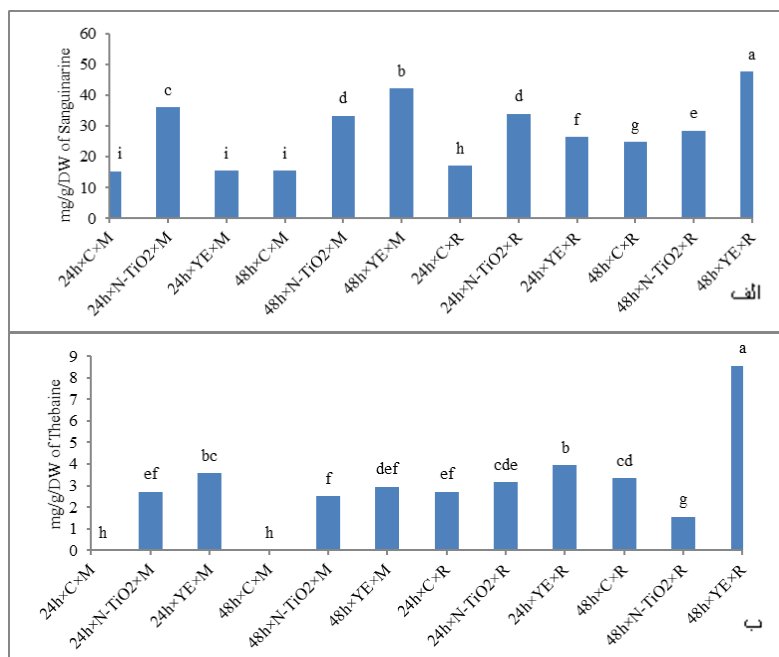
مطالعات انجام شده در زمینه تأثیر نانو  $TiO_2$  در گیاهان نشان داده است که این الیسیستور از طریق افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز بر متابولیسم نیتروژن اثر می‌گذارد و سبب افزایش رشد و میزان فتوسنتز می‌شود. همچنین نانو  $TiO_2$  با تأثیر بر افزایش متابولیسم نیتروژن و تحریک تولید پیش‌ماده، به افزایش میزان پروتئین و تحریک بیان ژن در سلول‌های گیاهی منجر می‌شود (Yang et al., 2008; Fan et al., 2007) که با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که در مسیر سنتز سنگوئینارین و تبائین، نانو  $TiO_2$  با افزایش تولید تیروزین به منزله پیش‌ماده می‌تواند بر افزایش تولید این متابولیت‌ها مؤثر باشد، اما با گذشت زمان به نظر می‌رسد به علت اثر سمیت نانوذرات بر شاخص میتوزی (ژنوتوکسیک) (Castiglione et al., 2011) موجب کاهش تجمع متابولیت‌های سنگوئینارین و تبائین شود.

حداکثر میزان سنگوئینارین و تبائین در ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره مخمر در هر دو ریزنمونه به دست آمد. سنگوئینارین در مریستم ۲/۷ برابر و در ریشه ۱/۹ برابر افزایش نشان داد. تبائین در مریستم پس از تیمار الیسیستوری تولید شد و در ریشه افزایش ۲/۵ برابری نسبت به شاهد نشان داد. به نظر می‌رسد عصاره مخمر با تحریک سازوکار دفاعی موجب افزایش سنگوئینارین در کالوس شده باشد. Abraham et al. (2011) نیز گزارش کرده‌اند که استفاده از عصاره مخمر به منزله الیسیستور زیستی موجب افزایش بیوماس و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. برای تصمیم‌گیری درباره مقدار افزایش و احتمال ادامه این روند و همچنین پایداری این متابولیت در محیط کشت نیاز به اعمال زمان‌های بیشتری است. از آنجا که سنگوئینارین یکی از سمی‌ترین ترکیبات بنزوفنانتری‌دین در سلول است (Slaninova et al., 2001) به نظر می‌رسد افزایش آن پایدار نیست و برحسب استراتژی سلول برای مقابله با سمیت آن یا باید به خارج از سلول ترشح شود یا با تبدیل به دی‌هیدروسنگوئینارین از مرگ سلولی جلوگیری کند (Weiss et al., 2006).

تبائین بین ریزنمونه مریستم و ریشه مشاهده نشد. این در حالی بود که در نمونه شاهد مریستمی، هیچ‌گونه اثری از تبائین مشاهده نشد. از طرفی عصاره مخمر موجب افزایش معنادار سنگوئینارین در هر دو ریزنمونه نسبت به شاهد و در مقایسه با یکدیگر شد. این الیسیستور همچنین موجب افزایش سنگوئینارین و تبائین در ریزنمونه ریشه به ترتیب ۱/۷ و ۲ برابر نسبت به شاهد شد.

در پژوهش‌های انجام شده، تولید سنگوئینارین و بیوسنتز مورفین را در گیاه *P. somniferum* تشخیص داده‌اند، اما تجمع مورفین و کدئین در کشت سوسپانسیون سلولی را ناممکن دانسته و تجمع آن را وابسته به سیستم تمایز شیرابه در این گیاه دانسته‌اند (Facchini et al., 2000; Huang & Kutchan, 2008; al., 1996). با توجه به نظر Rush et al. (1985) مبنی بر وجود ارتباط میان به وجود آمدن سلول‌های شیرابه و حضور تبائین در جوانه‌ها و همچنین تأثیرنداشتن نوع ریزنمونه بر روی مقدار آلکالوئیدهای مشاهده شده در مطالعات کشت کالوس در *P. somniferum*، تجمع تبائین به منزله پیش‌ماده سنتز مورفین در تیمار با هر دو الیسیستور و در هر دو ریزنمونه در این مطالعه را می‌توان با نوع محیط کشت، نوع و غلظت الیسیستور (Angelova et al., 2006) و همچنین فعال بودن ریزنمونه‌های مریستمی و تحریک‌پذیری بالای ژن‌های آن‌ها در برابر الیسیستورها به دلیل تمایز نداشتن، مرتبط دانست که البته این مورد، به بررسی بیشتری نیاز دارد.

میانگین اثر متقابل سه‌گانه زمان، الیسیستور و ریزنمونه نیز در سطح ۱ درصد معنادار شد (شکل ۳). آنالیز مقایسه میانگین آن‌ها نشان داد که در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار نانو  $TiO_2$  بیشترین میزان سنگوئینارین در کالوس مریستم (۲/۳ برابر) و بیشترین میزان تبائین در کالوس ریشه (۱/۲ برابر) به دست آمد. در همین زمان حداکثر تبائین در هر دو ریزنمونه توسط عصاره مخمر حاصل شد؛ این در حالی است که در ریزنمونه مریستمی شاهد، تبائین حضور نداشته و پس از تحریک توسط الیسیستورها تولید شده است. در ۴۸ ساعت پس از اعمال نانو الیسیستور، روند کاهش در میزان آلکالوئیدهای سنگوئینارین و تبائین مشاهده شد که این کاهش در



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه زمان (h)، الیسیاتور (عصاره مخمر (YE) و نانو TiO<sub>2</sub>) و ریزنمونه (مریستم (M) و ریشه (R)) بر میزان تجمع سنگوئینارین (الف) و تبائین (ب). حروف مشترک بیانگر نبود تفاوت معنادار در میانگین تیمار است.

مرتبط در قسمت‌های مختلف گیاه *in vivo* مرتبط دانست (Facchini *et al.*, 1995; Milo *et al.*, 2005).

#### نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که با استفاده از الیسیاتورها و مخصوصاً نانو الیسیاتورها می‌توان چرخه بیوسنتزی تولید و تجمع متابولیت‌های تبائین و سنگوئینارین را تحریک کرد و این القا می‌تواند در هر دو ریزنمونه ریشه و مریستم مؤثر و حتی با یکدیگر متفاوت باشد. همچنین با استفاده از این الیسیاتورها می‌توان در کالوس حاصل از مریستم یعنی ریزنمونه‌ای که در آن ژن‌های مولد تبائین فعال نیستند چرخه بیوسنتزی این متابولیت را تحریک کرد.

پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که آلكالوئیدهای بنزیل‌ایزوکوئینولین در کشت‌های سلولی به دلیل ساختار تمایز نیافته این سلول‌ها تولید نمی‌شود اما در پاسخ به الیسیاتورهای قارچی این سلول‌ها تحریک به بیوسنتز سنگوئینارین می‌شوند (Desgagné-Penix *et al.*, 2010; Facchini *et al.*, 1996) که در این مطالعه نیز تجمع این متابولیت در پاسخ به الیسیاتور مخمر و TiO<sub>2</sub> مشاهده شد. آنچه در این مطالعه مشاهده شد تحریک‌پذیری بالاتر سلول‌های مریستمی نسبت به سلول‌های ریشه در برابر تیمار با هر دو الیسیاتور و اثر آن در تجمع هر دو متابولیت بود. اما با این وجود تجمع این متابولیت‌ها در ریزنمونه ریشه بیشتر از ریزنمونه مریستم بود که می‌توان علت آن را با تفاوت در میزان فعالیت و بیان ژن‌های

#### REFERENCES

- Karimaneh, Z., Omidi, M., Khialparast, F. & Sabokdast, M. (2009). 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. (In Farsi)
- Abraham, F., Bhatt, A., Keng, Ch., Indrayanto, G. & Sulaiman, Sh. (2011). Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of *Curcuma mangga* *in vitro* plantlets. *African Journal of Biotechnology*, 10 (40), 7787-7795.
- Alcantara, J., Bird, D.A., Franceschi, V.R. & Facchini, P.J. (2005). Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiology*, 138, 173-183.
- Angelova, Z., Georgiev, S. & Roos, W. (2006). ELICITATION OF PLANTS. *Biotechnology & biotechnology*, PP, 72-83.

5. Archambault, J., Williams, R.D. & Chavarie, C. (1996). Production of sanguinarine by elicited plant cell culture I. Shake flask suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 46, 95-105.
6. Balažová, A., Blanáriková, V., Bilka, F. & Bilková, A. (2008). Effect of Combined Biotic and Abiotic elicitor on the Sanguinarine Formation in Cell Suspension Cultures of *Eschscholtzia californica*. *ACTA Facultatis Pharmaceuticae*, 55, 58-63.
7. Byun, S.Y., Ryu, Y.W., Kim, C. & Pedersen, H. (1992). Elicitation of sanguinarine production in two-phase cultures of *Eschscholtzia californica*. *Journal of Ferment Bioengineer*, 73, 380-385.
8. Castiglione, R., Giorgetti, M., Geri, L. & Cremonini, C. (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, 6-7.
9. Chatterjee, A., Shukla S., Mishra, P., Rastogi, A. & Singh, S.P. (2010). Prospects of *in vitro* production of thebaine in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Industrial Crops and Products*, 32(3), 668-670.
10. Decker, G., Wanner, G., Zenk, M.H. & Lottspeich, F. (2000). Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis*, 21, 3500-3516.
11. Desgagné-Penix, I., Khan, M., Schriemer, D., Cram, D., Nowak, J. & Facchini, P. (2010). Integration of deep transcriptome and proteome analyses reveals the components of alkaloid metabolism in opium poppy. *Cell cultures*, 10, 252-268.
12. Dumontet, C. & Jordan, MA. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature Review Drug Discovery*, 9(10), 790-803.
13. Facchini, P. & De Luca, V. (1995). Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell*, 7, 1811-1821.
14. Facchini, P., Penzes, C., Johnson, A. & Bull, D. (1996). Molecular Characterization of Berberine Bridge Enzyme Genes from Opium Poppy. *Plant physiology*, 112, 1669-1 677.
15. Fan, Y., Chao, Liu., Fengqing, G., Mingyu, S., Xiao, W., Lei, Z., Fashui, H. & Ping, Y. (2007). The Improvement of Spinach Growth by Nano-anatase TiO<sub>2</sub> Treatment Is Related to Nitrogen Photoreduction. *Biological Trace Element Research*, 119, 77-88.
16. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W. & Nowack B. (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology*, 43, 9216-9222.
17. Hahn, MG & Albersheim, P. (1981). Host-pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology*, 68, 1161-1169.
18. Holková, I., Bezáková, L., Sek Bilka, F., Bala\_zová, A. & Blanáriková, V. (2010). Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 887-892.
19. Hong, F.S., Yang, F., Liu, C., Gao, Q., Wan, Z.G., Gu, F.G., Wu, C., Ma, Z.N., Zhou, J. & Yang, P. (2005). Influences of nano-TiO<sub>2</sub> on the chloroplast ageing of spinach under light. *Biological trace element research*, 104(3), 249-260.
20. Huang, F. & Kutchan, T. M. (2000). Distribution of morphinan and benzophenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 53, 555-564.
21. Kavalco, R., Prioli, K., Pinto, S., Prioli, A. & Bertollo, L. (2007). Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 843-851.
22. Lei, Z., Mingyu, S., Chao, L., Liang, C., Hao, H., Xiao, W., Xiaoqing, L., Fan, Y., Fengqing, G. & Fashui, H. (2008). Effects of Nanoanatase TiO<sub>2</sub> on photosynthesis of spinach chloroplasts under different light illumination photoreduction. *Biological Trace Element Research*, 119(1), 68-76.
23. Liscombe, D.K. & Facchini, P.J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 173-180.
24. Lovkova, M., Buzuk, G.N. & Solkolova, S.M. (2005). Regulatory Role of Elements in the Formation and Accumulation of Alkaloids in *Papaver somniferum* L. Seedlings. *BMC Plant Biology*, 10, 252-255.
25. Milo, J., Levy, A. & Palevitch D. (2006). *An alternative raw- the cultivation breeding of Papaver bracteatum*, The Genus *Papaver*. Hardwood. Academic Publishers.
26. Namdeo, A. G. (2007). Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites Review. *Pharmacognosy Reviews*, 1, 69-79.
27. Radman, R., Saez, T., Bucke, C. & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 91-102.
28. Rush, M. D., Kutchan, T. M., & Coscia, C. J. (1985). Correlation of the appearance of morphinan alkaloids and latifer cells in germinating *Papaver bracteatum* seedlings. *Plant Cell Report*, 4, 237-240.
29. Weid, M., Ziegler, J. & Kutchan, T.M. (2004). The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 13957-13962.



30. Weiss, D., Baumert, A., Vogel, M. & Roos, W. (2006). Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant Cell Environment*, 29, 291–302.
31. Yang, H., Sun, CH., Zhang, Qiao., Zou, J., Liu, G. & Smith, S.C., et al. (2008). Anatase TiO<sub>2</sub> single crystals with a large percentage of reactive facets. *Nature*, 453, 638-641.
32. Young, Choa, H., Young Sona, S., Soon Rhea, H., Sung-Yong, H., Yoonb Carolyn, W.T., Parsonsc Jong, L. & Parka 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, 117–122.
33. Zdařilová, A., Malíková, J., Dvořák, Z., Ulrichová, J. & Šimánek, V. (2006). Quaternary isoquinoline alkaloids sanguinarine and chelerythrine *In vitro* and *in vivo* effects. *Chemicke Listy*, 100, 30-41.
34. Zhao, J. & Sakai, K. (2003). Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor-induced beta-thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica*. *cell cultures*, 4, 647-656
35. Ziegler, J. & Facchini, P. (2008) Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59,735-69.