ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٥
صفحه ٤٩٠ - ٤٨٣

# تاثیر الیسیتورهای غیر زیستی بر بیان ژن آلکالوئیدهای گیاه شقایق ایرانی (*Papaver bracteatum*)

# The effect of abiotic elicitors on the gene expression of some alkaloids of *Papaver bracteatum*

مرجان بهزادی‌راد[1]، محمدرضا نقوی[1]، علی‌اکبر شاه نجات بوشهری*[1]

١- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری، استادان، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

**Behzadirad M[1], Naghavi MR[1], Shahnejat Bushehri AA*[1]**

1- Graduated PhD Student, Professors, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ashah@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٤/٣/٦ - تاریخ پذیرش: ٩٤/٧/١٩)

## چکیده

**خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*)، گونه‌ای مهم از خانواده پاپاوراسه است که دارای ترکیبات آلکالوئیدی با ارزش دارویی می‌باشد. الیسیتورها ابزار مناسبی جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان با تحریک سیگنال‌های سلولی می‌باشند. در این مطالعه به منظور افزایش تولید آلکالوئیدهای گیاه خشخاش ایرانی اثر دو الیسیتور سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر روی کشت سلولی ریزنمونه ریشه این گیاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق، مورفین را به‌عنوان آلکالوئید غالب در خشخاش ایرانی نشان داد. هم‌چنین عامل زمان، اثر زیادی بر روی تیمارها در هر دو الیسیتور داشت. به‌طورکلی تیمار با الیسیتور متیل جاسمونات سبب افزایش بیش‌تر میزان مورفین نسبت به الیسیتور سالسیلیک اسید در کشت سلولی ریشه شد. هم‌چنین بیش‌ترین میزان تجمع مورفین تحت تاثیر تیمار با الیسیتورهای مذکور نتیجه افزایش بیان ژن‌های *TYDC* و *COR* بود. نمونه‌هایی که دارای کم‌ترین میزان مورفین بودند، برای ژن *TYDC* کاهش و برای ژن *COR* افزایش بیان بیش‌تری را نشان دادند. احتمالا دلیل وجود کدئین و مورفین در کشت سلولی این گیاه را می‌توان به بیان اختصاصی ژن *TYDC1* در ریشه نسبت داد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که با استفاده از الیسیتورهای غیر زیستی می‌توان چرخه بیوسنتزی تولید و تجمع متابولیت ثانویه مورفین را در این گیاه تحریک کرد و میزان زیادی از این آلکالوئید را در مقایسه با شاهد به دست آورد.**

واژه‌های کلیدی

الیسیتور
سالسیلیک اسید
متابولیت ثانویه
متیل جاسمونات

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

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.1.0 ]

## مقدمه

خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*) گونه‌ای خشخاش تنومند چندساله با گل‌های سرخ پررنگ بزرگ و پهن می‌باشد که تا ارتفاع ۱/۲۲ متر رشد می‌کند و لکه سیاه‌رنگ برجسته‌ای در مرکز گلبرگ‌های آن دیده می‌شود. از این گیاه برای تولید تجاری کدئین و تبائین استفاده می‌شود. عدد کروموزومی گزارش شده در این گونه 2n=2x=14 بوده است (El Ahmadi et al. 2001). آلکالوئیدها خانواده بسیار بزرگی از متابولیت‌های ثانویه‌اند که به دلیل خواص دارویی و کاربردهای پزشکی مورد توجه قرار می‌گیرند. آلکالوئیدها همانند سایر ترکیبات ثانویه در گیاهان نقش دفاعی داشته و به‌عنوان دفع کننده حشرات عمل می‌کنند (Julsing et al. 2006). بنزیل ایزوکوئینولین‌ها[1]، گروه بزرگی از آلکالوئیدها هستند که بیش از دو هزار ساختار از آن‌ها شناسایی شده است (Hartmann 2007). تیروزین نقطه آغازین چرخه بیوسنتزی این متابولیت‌هاست (Fachini et al. 1995).

مورفین[2] و کدئین[3] را می‌توان در گونه‌های مختلفی از خشخاش یافت اما تبائین[4] به‌عنوان پیش ماده سنتز این مواد، به‌طور عمده در یکی از گونه‌های خشخاش بنام *P. bracteatum* یافت می‌شود (Bohm 1981). تبائین در صنایع داروسازی به آسانی قابلیت تبدیل به کدئین را دارد؛ همچنین ماده اولیه تولید بسیاری از داروهای مسکن مانند نالوکسون[5] و نالتروکسون[6] است (McNicholas and Martin 1984). به‌منظور افزایش تولید انواع آلکالوئیدهای ارزشمند بنزوفنانتریدین[7] در این گیاه مهندسی متابولیت فراوانی انجام شده که یکی از این روش‌ها استفاده از الیسیتورها است (Archambault et al. 1996; Holkova 2010). واژه الیسیتور به مولکول‌هایی با منشا زیستی و یا غیر زیستی گفته می‌شود (Radman et al. 2006) که با تحریک سیگنال‌های سلولی، بیان ژن‌های مرتبط در مسیر بیوسنتزی را تحریک کرده و موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و یا کشت سلولی آن‌ها می‌شود (Zhao et al. 2003). مسیر بیوسنتزی تولید تبائین در این گیاه مانند مسیر بیوسنتزی آن در *P. somniferom* می‌باشد که در آن، تبائین با دمتیله شدن به کدئین و مورفین تبدیل می‌شود. تیروزین دکربوکسیلاز یک ال-آمینواسید دکربوکسیلاز حلقوی رایج و عمومی در گیاهان می‌باشد که در گونه‌های مختلف گیاهی بیوسنتز تعداد زیادی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه به آن وابسته است (Fachini et al. 1995). در بین گونه‌های مختلف گیاهی، خشخاش دارای خانواده ژنی بزرگی از *TYDC*[8] می‌باشد. تاکنون هشت ژن جداسازی شده و بر اساس شباهت به دو زیرخانواده *TYDC2* و *TYDC1* تقسیم شده‌اند. اعضای *TYDC1* به مقدار زیاد در ریشه و *TYDC2* هم در ساقه و هم در ریشه بیان می‌شوند. مسیر مورفین در محل تبائین دو شاخه شده که اولین مرحله در مسیر اصلی صورت می‌گیرد به‌وسیله *T6ODM* کاتالیز شده و نئوپینون[9] را تولید می‌کند که به‌صورت خود به خودی به کدئینون تبدیل می‌شود و سپس به کدئین تبدیل شده که توسط یک آلدو-کتوریداکتاز[10] به‌نام کدئینون ریداکتاز به کدئین و کدئین به‌وسیله *CODM*[11] به مورفین تبدیل می‌شود. به‌طور جایگزین *CODM* اولین مرحله در مسیر فرعی که شامل ۳-ا-دمتیلاسیون تبائین به اوریپاوین[12] است را کاتالیز می‌کند. سپس *T6ODM*[13] اوریپاوین را به مورفینون تبدیل کرده که توسط *COR*[14] به مورفین احیا می‌شود (Hagel and Facchini 2010).

از آنجا که سیستم خودناسازگاری در این گیاه اجازه تولید رقم خالص از طریق خودگشنی را نمی‌دهد، استفاده از روش‌های کشت بافت در تولید انبوه *P. bracteatum* کاربرد دارد (Day et al. 1986). تحقیقاتی به‌منظور تولید تبائین در محیط کشت نیز انجام شده‌است و متاسفانه موفقیت‌های کمی در شرایط درون شیشه‌ای بدست آمده به‌طوری‌که گزارش‌ها حاکی از وجود تبائین بسیار اندک (Kamimura et al. 1976) و یا فقدان آن (Lockwood 1981; Kutchan et al. 1983; Hook et al. 1988;

[1] Benzylisoquinolines
[2] Morphine
[3] Codeine
[4] Thebaine
[5] Naloxone
[6] Naltrexone
[7] Benzophenanthridine
[8] Tyrosine/dopa decarboxylase
[9] Neopinon
[10] Aldo-keto reductase
[11] Codeine-O-demethylation
[12] Oripavine
[13] Thebaine 6-O-demethylase
[14] Codeine reductase



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.1.0 ]

Alkhimova et al. 1993) در این کشت‌ها بوده است. در مطالعه‌ای دیگر ارتباط میان بوجود آمدن سلول‌های شیرابه و حضور تبائین در جوانه‌ها مورد بررسی قرار گرفت که به‌نظر می‌رسد برای تولید تبائین در کشت سلولی، تمایز بافت‌ها ضروری می‌باشد (Rush et al. 1985). اثر الیسیتورها و پیش ماده الیسیتورها با تحریک سیگنال‌های سلولی، بیان ژن‌های مرتبط در مسیر را تحریک کرده و موجب ساخت متابولیت‌های ثانویه در این گیاهان و یا کشت‌های سلولی می‌شوند. هم‌چنین از الیسیتورها برای شناسایی مسیرهای سیگنال‌دهی در تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده‌است (Zhao et al. 2003). الیسیتورها به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم با فعال کردن ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ترکیبات ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌شوند (Neumann et al. 2009).

تنش‌های القا شده توسط اسید جاسمونیک و استرهای آن به ویژه متیل جاسمونات در تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات داروئی مانند آلکالوئیدها و آلفا توکوفرول و رسوراتول[1] به‌طور گسترده به‌کار گرفته شده‌اند. علاوه بر متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک نیز یکی از مولکول‌های محرک مهم است. سالیسیک اسید سیستم دفاعی گیاه را از طریق فعال‌سازی گروه مشخصی از ژن‌های مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک[2] تحریک می‌کند (Matkowski 2008). در بررسی اثر الیسیتورها در میزان تجمع آلکالوئیدها، پس از گذشت پنج الی ده ساعت از اضافه شدن پاتوژن .Botrytis sp به کشت سوسپانسیون خشخاش، میزان سانگوئینارین (ترکیب ضد میکروبی) آن، به‌طور چشمگیری افزایش یافته‌است (Fachini et al. 1996). در بررسی اثر الیسیتورها بر میزان تجمع آلکالوئیدها، مشخص شده که اضافه کردن پیش ماده‌های L-ornithine، L-phenylalanine، DL-tropic acid، L-dopamine و L-tyrosine به محیط کشت *P. bracteatum*، تاثیری بر تولید تبائین ندارد (Kamimura and Nishikawa 1976). هم‌چنین استفاده از نانو ذرات مس، آهن و سیلسیوم به‌منظور افزایش متابولیت‌های پاپاورین و تبائین و کدئین در سوسپانسیون سلولی خشخاش گزارش شده‌است (Bondarian 2013). با استفاده از دو الیسیتور متیل جاسمونات و اولتراسونیک همراه با فیدینگ، میزان تولید تبائین در کشت سلولی گیاه خشخاش ایرانی افزایش یافت (Zareh 2014). تاثیر الیسیتورهای زیستی و نانو الیسیتورها بر افزایش تولید آلکالوئیدهای گیاه *P. somnifrum* در کشت سلولی این گیاه بررسی شد. نتایج حاصله افزایش میزان تبائین و سنگوئینارین[3] را نسبت به شاهد نشان داد (Khodayari 2014). از الیسیتورهای عصاره مخمر، کیتوزان و ال تیروزین در کشت سلولی گیاه خشخاش ایرانی استفاده و افزایش میزان مورفین نسبت به شاهد گزارش شد (Jahangiri 2014). تاثیر نانو الیستورهای اکسید روی، اکسید سیلسیوم و نقره بر روی سوسپانسیون سلولی گیاه *P. bracteatum* مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج میزان کدئین و مورفین بیش‌تری را نسبت به شاهد نشان دادند (Asadollahi 2014).

در مطالعات گذشته تفاوت‌های زیادی در بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها و نهایتاً تولید و تجمع آن‌ها در کشت سلولی قابل مشاهده است که می‌توان آن را با نوع الیسیتور، زمان استفاده از آن و مدت زمانی که سلول‌ها در معرض الیسیتورها قرار دارند، نوع محیط کشت و غلظت مواد تشکیل دهنده آن و نهایتاً سن کشت کالوس مرتبط دانست (Namdeo 2007).

به‌منظور انتخاب الیسیتور مناسب برای افزایش تولید ترکیبات دارویی ارزشمند تبائین، در این تحقیق اثر دو الیسیتور غیر زیستی سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات، بر کشت سلولی ریزنمونه ریشه گیاه *P. bracteatum* در شرایط *in vitro* در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

بذرهای مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق از موسسه جنگل‌ها و مراتع کشور متعلق به منطقه پلور تهیه شد. بذور با الکل ۷۵ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی سطحی شده و پس از ۵-۳ بار شستشو با آب‌مقطر استریل به محیط کشت MS فاقد هورمون با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز و ۷/۵ گرم در لیتر آگار منتقل شدند.

[1] Resveratrol
[2] Systemic Resistance
[3] Sanguinarine



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.1.0 ]

برای جوانه‌زنی بهتر، بذور کشت شده به مدت دو هفته در یخچال نگهداری و سپس به اتاق رشد با دمای ۲۵°C و تناوب نوری شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل شدند (Park and Facchini 2000). جوانه‌زنی بعد از گذشت چهار هفته آغاز شد. پس از دستیابی به گیاهچه‌های مناسب با ارتفاع حدوداً ۱۰–۸ سانتی‌متر، ریزنمونه‌های مناسب از ناحیه ریشه برای مرحله کالزایی انتخاب و به محیط کالزایی (Karimaneh et al. 2009)، یعنی محیط MS تغییر یافته با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز و ۷/۵ گرم در لیتر آگار به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های BAP و 2,4-D منتقل شدند. کالوس‌های مورد نظر پس از دو بار واکشت سه هفته‌ای، از نظر درصد کال‌زایی، حجم و وزن کالوس مورد ارزیابی قرار گرفتند (دادها نشان داده نشده‌اند) و کالوس‌های مطلوب به محیط سوسپانسیون MS ½ (محیط فاقد آگار) با همان ترکیب هورمونی منتقل شده و در شیکر انکوباتور یخچال‌دار در محیط تاریکی با دمای ۲۵°C و ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از تکثیر کالوس‌ها و رسیدن به رشد مطلوب در فاز نمایی (۲۳ روز)، تمام سوسپانسیون‌ها با محلول متیل جاسمونات در سه غلظت متفاوت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار و سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تیمار شدند. هر سوسپانسیون به‌عنوان یک نمونه و برای هر بازه زمانی نیز یک شاهد در نظر گرفته شد و به سوسپانسیون‌های شاهد یک میلی‌لیتر آب مقطر در هر زمان اضافه شد. کالوس‌های رشد یافته در سوسپانسیون‌های سلولی در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار برای اندازه‌گیری آلکالوئیدهای مورفین، کدئین، تبائین، پاپاورین، و نوسکاپین با استفاده از کاغذ صافی جمع‌آوری و برای بررسی‌های بعدی در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری آلکالوئیدهای این گیاه، کالوس-های فریز شده به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریزدرایر جهت خشک کردن نمونه‌ها قرار داده شدند و سپس به میزان ۰/۰۱ گرم از آن‌ها با یک میلی‌لیتر متانول حاوی ۰/۵ درصد HCl (V/V) مخلوط و پس از ۶۰ دقیقه تیمار در حمام اولتراسونیک، به مدت ۲۰ دقیقه در $g$ ×۱۲۰۰۰ (Young Choa et al. 2008) مایع رویی جمع‌آوری و از فیلتر عبور داده شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن‌های COR و TYDC

| کد ژنتیکی | توالی (۳'→۵') | آغازگر |
|---|---|---|
| FJ596163.1 | CCACCATTTGACCAGCATTTAG | *COR* (F) |
| FJ596163.1 | GGGCTCATCTCCACCTTAATC | *COR* (R) |
| EU882987.1 | AACCCACTAGACCCTGATGA | *TYDC*(F) |
| EU882987.1 | GACCTGGCTTCTAACTGGATAAC | *TYDC*(R) |
| AK252297.1 | AGATGATTCCAACCAAGCCCA | *Elf1a*(F) |
| AK248954.1 | CCTTGATGACACCAACAGCAACT | *Elf1a*(R) |

برای اندازه‌گیری کمی آلکالوئیدها، غلظت‌های متفاوت از استاندارد هر یک از آلکالوئیدها استفاده و هر یک با تکرار به دستگاه HPLC تزریق شد.

برای بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای گیاه خشخاش ایرانی در پاسخ به الیسیتورهای استفاده شده، آغازگرهایی برای ژن‌های *TYDC* و *COR* طراحی و استفاده شد. جهت استخراج RNA از روش تغییر یافته ترایزول استفاده شد (Qin 2008). به‌منظور اطمینان از کمیت و کیفیت RNA استخراج شده و تعیین غلظت آن از دستگاه نانودراپ و ژل آگارز یک درصد استفاده شد. مرحله بعدی سنتز cDNA با استفاده از کیت فرمنتاز بود. نهایتاً تکثیر ژن‌های *TYDC* و *COR* برای اندازه‌گیری بیان ژن توسط Real Time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت. کمیت نسبی به‌وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ Eva Green با استفاده از دستگاه Bio Rad انجام گرفت. پس از روش Real Time PCR، با استفاده از ژن رفرنس Elfla[1] و با شرایط واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای چرخه اول و در چرخه‌های بعدی به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد.

داده‌های خام به‌صورت چرخه آستانه[2] از دستگاه استخراج شد. با در نظر گرفتن سه تکرار برای هر نمونه، جهت بررسی میزان بیان ژن‌های مذکور در مقایسه با شاهد از نرم‌افزار Rest (Pfaffl et al. 2002) استفاده شد.

[1] Elongation factor
[2] Threshold cycle (Ct)

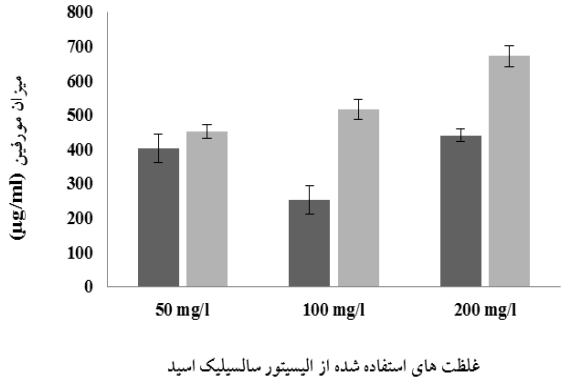


[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.1.0 ]

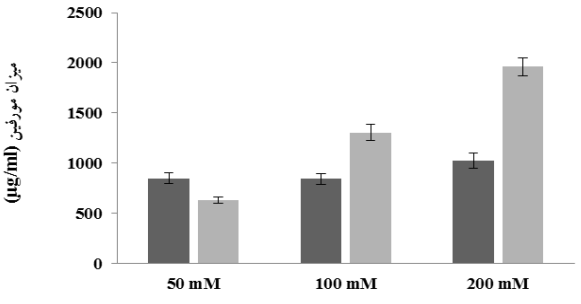
## نتایج و بحث

پس از قرار دادن ریزنمونه‌ها در محیط کشت مورد نظر و بعد از حدود هفتاد روز از زمان کالوس‌دهی تغییر رنگ کالوس‌ها به رنگ قهوه‌ای مشاهده شد که این تغییر رنگ احتمالا ناشی از آلکالوئیدهای بسیار زیاد این گیاه می‌باشد. تلاش‌های زیادی برای افزایش تولید متابولیت‌های گیاه خشخاش (*P. bracteatum*) انجام و از الیسیتورهای مختلف در زمان‌های متفاوتی برای مشاهده تاثیر آن‌ها بر افزایش آلکالوئیدهای این گیاه استفاده شده‌است. نتایج تحقیقات این‌طور نشان می‌دهد که در طی فرآیند القا، سلول‌های گیاهی در ابتدا با برهم کنش مولکولی میان گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلولی و یا سیتوپلاسمی و الیسیتور موجب شناسایی آن‌ها می‌شوند؛ در نتیجه سیگنال دریافتی توسط سلول‌های گیاهی موجب انتقال سیگنال‌های الیسیتوری شده و نهایتاً پاسخ‌های دفاعی نظیر قلیایی شدن محیط، فعال شدن ژن‌های دفاعی و سوخت‌های اکسیداتیو و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Ouwerkerk et al. 1999; Menke et al. 1999; Zhao et al. 2003).

نتایج حاصل پس از اندازه‌گیری آلکالوئید با دستگاه HPLC نشان داد که ماده مؤثر غالب در تمامی تیمارهای مورد بررسی از جمله تیمار شاهد مورفین می‌باشد. در شاهد و نمونه‌هایی که با الیسیتور متیل جاسمونات تیمار شده بودند، مورفین و کمی کدئین مشاهده شد در صورتی‌که در تیمارهای سالیسیک اسید تنها مورفین بدست آمد. مطالعات نشان داد که اثر عامل زمان برای هر دو الیسیتور مورد نظر معنی‌دار است. زمان ٤٨ ساعت اثر قابل توجهی بر روی میزان آلکالوئیدها نشان داد. در مقایسه دو الیسیتور، متیل جاسمونات سبب افزایش میزان مورفین نسبت به سالسیلیک اسید شد. از بین غلظت‌های مورد استفاده متیل جاسمونات در تیمارها، غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار در ٤٨ ساعت سبب تولید میزان بیش‌تری مورفین نسبت به دیگر تیمارها شد. در بین غلظت‌های مختلف سالسیلیک اسید نیز بیش‌ترین میزان مورفین در استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ٤٨ ساعت مشاهده شد. نظر به گزارشات قبلی راجع به *P. bracteatum* این گیاه دارای آلکالوئید تبائین به میزان فراوان و مقدار کمی کدئین می‌باشد (Kamimura et al. 1976; Milo et al. 2006). پس از بدست آمدن نتایج حاصل از HPLC و بررسی میزان آلکالوئیدها نمونه‌های تیمار شده با الیسیتورها که دارای بیش‌ترین میزان مورفین و کم‌ترین میزان این نوع آلکالوئید بودند، انتخاب شده و جهت بررسی میزان بیان ژن‌های *TYDC* و *COR* مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در نمونه تیمار شده با الیسیتور متیل جاسمونات با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار در زمان ٤٨ ساعت که دارای بیش‌ترین میزان مورفین بود، ژن *TYDC* و *COR* افزایش بیان معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند.




شکل ۱- تجمع آلکالوئید مورفین پس از اعمال الیسیتور سالسیلیک اسید در دو بازه زمانی ٢٤ (مشکی) و ٤٨ (طوسی) ساعت در گیاه *P. bracteatum*



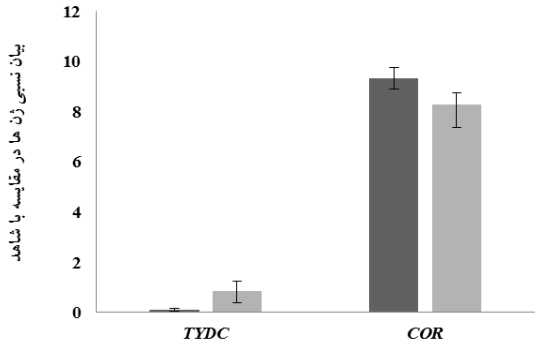

شکل ۲- تجمع آلکالوئید مورفین پس از اعمال الیسیتور متیل جاسمونات در دو بازه زمانی ٢٤ (مشکی) و ٤٨ (طوسی) در گیاه *P. bracteatum*

در نمونه‌ای که دارای کم‌ترین میزان مورفین در اثر استفاده از الیسیتور مذکور بود، کاهش بیان ژن *TYDC* و افزایش بیان ژن *COR* در مقایسه با شاهد مشاهده شد. نمونه‌ی تیمار شده با الیسیتور سالسیلیک اسید که دارای بیش‌ترین میزان مورفین بود

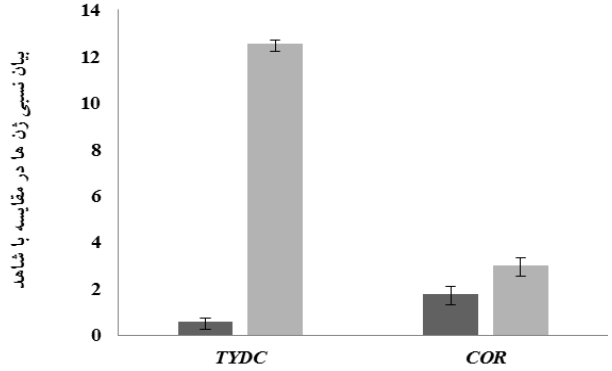


[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.1.0 ]

افزایش معنی‌داری در بیان ژن *TYDC* و *COR* نشان داد. هم چنین نمونه‌ای تیمار شده با الیسیتور ذکر شده که کم‌ترین میزان مورفین را داشت برای ژن *TYDC* کاهش و برای ژن *COR* افزایش بیان بیش‌تری را نشان داد.




شکل ۳- تغییرات ژن‌های *TYDC* و *COR* در کالوس *P. bracteatum* تیمار شده با الیسیتور سالسیلیک اسید در بالاترین (طوسی) و پایین ترین (مشکی) سطح آلکالوئید مورفین.




شکل ٤- تغییرات ژن‌های *TYDC* و *COR* در کالوس *P. bracteatum* تیمار شده با الیسیتور متیل جاسمونات در بالاترین (طوسی) و پایین‌ترین (مشکی) سطح آلکالوئید مورفین.

استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی، سبب افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از گیاهان دارویی شده‌است (Bota and Deliu 2012; Hao et al. 2012; Yamaner et al. 2013). متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید در مطالعات زیادی به‌عنوان الیسیتور بر روی گیاهان متفاوت اعمال شده‌اند (Mehrabani et al. 2011; Zare et al. 2012; Samadi et al. 2014). با وجودی‌که در اکثر مطالعات، تبائین به‌عنوان آلکالوئید اصلی در *P.bracteatum* گزارش شده‌است (Rostampour et al. 2009; Farjaminezhad et al. 2013; Zare et al. 2013) هم‌چنان تحقیقاتی هست که نشان می‌دهد آلکالوئیدهای دیگری در کشت سلولی این گیاه می‌تواند به‌عنوان آلکالوئید غالب نمایان شود. تجمع سنگوئینارین در کشت سوسپانسیونی *P. bracteatum* پس از استفاده از الیسیتورهای قارچی و هورمون‌ها به‌عنوان آلکالوئید اصلی گزارش شده‌است (Steven et al. 1988)، در صورتی‌که در همین تحقیق در محیط فاقد هورمون تجمع تبائین مشاهده شد. هم چنین در مطالعه‌ای دیگر، تجمع دوپامین به مقدار بسیار زیاد و مقدار کمی تبائین و سنگوئینارین در کشت سلولی *P.bracteatum* دیده شد (Larkin et al. 2007). از طرفی دیگر، مطالعات گذشته نشان می‌دهد که ارقام مختلف این گیاه حاوی آلکالوئیدهای گوناگون به‌عنوان آلکالوئید اصلی هستند. بطوری‌که ارقامی که از غرب آلمان جمع‌آوری شده بودند تبائین را به‌عنوان آلکالوئید غالب نشان دادند و در ارقام دیگر مورد استفاده‌ی این تحقیق ایزوتبائین به‌عنوان آلکالوئید اصلی گزارش شد (Kamimura et al. 1967).

در مطالعه حاضر تجمع مورفین دیده شد که ممکن است با نوع محیط کشت تغییر یافته مرتبط باشد. نتایج کلی نشان می‌دهد که الیسیتورهای استفاده شده بر روی چرخه‌ی بیوسنتزی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه خشخاش ایرانی موثر می‌باشند. که احتمالاً استفاده از محیط کشت تغییریافته MS جهت تولید کالوس این گیاه، سبب تحریک ژن‌های مسیر بیوسنتزی مورفین که در شرایط عادی فعال نیستند، شده‌است. دلیلی دیگر بر تجمع این نوع آلکالوئید می‌تواند فعال شدن عوامل رونویسی خاص باشد. مطالعات بر روی رونوشت‌های بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها در خشخاش افیونی نشان داد که یک عامل رونویسی *WRKY* که با W-box که یک عامل سیس حفاظت شده در پروموتر ژن‌های *TYDC* است برهمکنش کرده و رونویسی آن‌ها را فعال می‌کند (Mishra et al. 2013). هم‌چنین مطالعات بیان ژن مشخص می کند که ژن *COR* در تمامی نمونه‌های تیمار شده با الیسیتور، افزایش بیان را نسبت به شاهد نشان دادند. با توجه به تحقیقات گذشته، افزایش بیان *COR* منجر به افزایش میزان تجمع آلکالوئیدهای مورفینان می‌شود. ژن *COR* در مودولاسیون بیوسنتز



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.1.0 ]

مورفین نقش دارد زیرا افزایش بیان ژن *COR* منجر به افزایش سطوح آلکالوئیدهای مورفینان می‌شود (Larkin et al. 2007). نتایج حاصل از این تحقیق نیز نقش ژن *COR* را در تولید مورفین نشان می‌دهد. تیروزین، 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 (Facchini et al. 1999). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش بیان این ژن تاثیر به سزایی در افزایش میزان مورفین نشان داده است. به‌طوری که بیش‌ترین مقدار این آلکالوئید در اثر استفاده از الیسیتورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید زمانی حاصل شد که این ژن افزایش بیان داشته است و احتمالا این ژن نقش مهمی در تولید بالای مورفین دارا می‌باشد. همچنین افزایش و کاهش ژن *TYDC* در این تحقیق را می‌توان با مطالعه‌ای که بر روی *P. somniferum* صورت گرفت مورد مقایسه قرار داد. بیان ژن‌های *TYDC* پس از تیمار با الیسیتورها در کشت سوسپانسیونی گیاه خشخاش افیونی متفاوت بود (Facchini et al. 1996). به عبارتی دلیل وجود کدئین و مورفین در کشت سلولی این گیاه را می‌توان به بیان اختصاصی ژن *TYDC1* در ریشه نسبت داد که این نتیجه گواه بر وجود مقدار نسبتاً زیادی تبائین تولید شده در سلول‌های تمایز نیافته می‌باشد که توانسته‌اند وارد مسیر ژنتیکی بیوسنتز کدئین و مورفین شوند.

## منابع

Alkhimova EG, Adonin VI, Kunakh VA (1993) Production of medicinal alkaloids by *Papaver bracteatum* cultured cells. Acta Horticalturae 330:287-289.

Archambault J, Williams RD, Chavarie C (1996) Production of sanguinarine by elicited plant cell culture I. Shake flask suspension cultures. Journal of Biotechnology 46: 95-105.

Asadolahi E (2014) The effect of some Nano Elicitors on secondary Metabolite production of *papaver* bracteatum. University of Tehran Iran. (In Farsi).

Bohm H (1967) On the *Papaver bracteatum* Lindl. Characteristic changes of alkaloid spectrum during plant development. Planta Meica 15: 215-220.

Bondarian F (2014) Effect of Biotic and abiotic Elicitors on Papaveracea Family. Islamic Azad University. (In Farsi).

Day KB, Draper J, Srnit H (1986) Plant regeneration and thebaine content of plants derived from callus culture of *Papaver bracteatum*. Plant Cell Reports 5: 471-474.

El-Ahmady S, Nessler C (2001) Cellular localization of tyrosine decarboxylase expression in transgenic Opium Poppy and tobacco. Plant Cell Reports 4: 313-317.

Facchini P, Penzes C, Johnson A, Bull D (1996) Molecular Characterization of Berberine Bridge Enzyme Genes from Opium Poppy. Plant physioogy 112: 1669-1 677.

Facchini PJ and 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.

Hagel JM, Facchini PJ (2010) Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. Nature Chemical Biology 6: 273-275.

Holková I, Bezáková L, 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.

Hook I, Sheridan H, wilson G (1988) Alkaloid of cell culture derived from strains of *Papaver bracteatum*. Phytochemistry 27:2137-2141.

Jahangiri B (2014) Effect of some biotic elicitors on secondary metabolite production of *papaver bracteatum*. University of Tehran. Iran. (In Farsi).

Julsing KM, Kayser O (2006) Combinatorial biosynthesis of medicinal plants secondary metabolites. Biomolecular Engineering 23: 265-279

Kamimura S, Nishikawa M (1976) Tissue culture of Papaver bracteatum Part II. Growth and alkaloid production of Papaver bracteatum. Agricultural and Biological Chemistry 40:904-911.

Karimaneh Z, Omidi M, Khialparast F, Sabokdast M (2009) 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. University of Tehran. (In Farsi).

Khodayari M (2014) Effect of Elicitors on some Alkaloids Gene Expression in *papaver somniferum*. University of Tehran Iran. (In Farsi).

Lockwood GB (1981) Orientalidine and isothebaine from cell cultures of *Papaver bracteatum*. Phytochemistry 20:1463-1464.

McNicholas LF, Martin R (1984) New and experimental therapeutic role for aloxone and related opiate antagonists. Drugs 27: 81-93.

Mehrabani B, Nazeri S, Piri K (2011) Evaluation of total produced phenol in Chaei Koohi (*Stachys lavandulifolia Vahi*) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. Journal of Agricultural Biotechnology 4: 77-88. (In Farsi).

Namdeo AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites review, Pharmacognosy reviews 1: 69-79.

Pfaffl MW, Horgan GW, Demple L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.1.0 ]

comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR Nuleic acids res. 1:30:e36.
Radman RT, Saez C, Bucke T (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnol. Applied Biochemistry and Biotechnology 37: 91-102.
Rush MD, Kutchan TM, Coscia CJ (1985) Correlation of the appearance of morphinan alkaloids and latificer cells in germinating *Papaver bracteatum* seedlings. Plant Cell Report 4: 237-240.
Samadi S, Ghasemnezhad A, Alizadeh M (2014) Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. Plant Production.4:135-148. (In Farsi).
Young Choa H, Young Sona S, Soon Rheea H, Sung-Yong H, Carolyn WT, Lee-Parsonsc (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.
Zare Mehrjerdi M , Bihamta MR, Omidi M, Naghavi MR, Soltanloo H (2012) Study on *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana* trichome genes in response to methyl jasmonate and salicylic acid elicitors. Modern Genetics Journal 8:329-332. (In Farsi).
Zare N, Farjaminezhad R, Asghari-Zakaria R, Farjaminezhad M (2014) Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding. Natural Product Research 28:711-717.
Zdařilová A, Malíková J, Dvořák Z, Ulrichová J, Šimánek (2006) Quarternaryioquino line alkaloids sanguinarine and chelerythrine. Invitro and invivo effects. Chemicke Listy.100. 30641.
Zhao J, Sakai K (2003) Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor-induced-thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. Journal of Experimental Botany 54: 647-656.

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

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.1.0 ]