

جداسازی ملکولی cDNA کدکننده N-methylstylophine hydroxylase از مامیران کبیر (*Chelidonium majus* L.) و افزایش بیان آن در پاسخ به محرک غیرزیستی شوری

زهره سلیمانی^۱، صدیقه فابریکی اورنگ^{۲*}، سودابه مفاخری^۳

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ع)، قزوین، ایران.

^۲ استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ع)، قزوین، ایران.

^۳ استادیار، گروه باغبانی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ع)، قزوین، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۳۰

چکیده

مامیران کبیر (*Chelidonium majus* L.) حاوی ترکیبات آکالوئیدی مهم از جمله سنگوئینارین است. سنگوئینارین یک آکالوئید فعال دارای خواص دارویی بالقوه ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد توموری می‌باشد که به‌طور گسترده در گیاهان خانواده خشخاش وجود دارد. در این تحقیق جداسازی و تعیین توالی cDNA کدکننده آنزیم (s)-cis-N-methylstylophine 14-hydroxylase (MSH) در مامیران کبیر به‌عنوان یکی از آنزیم‌های کلیدی مسیر تولید سنگوئینارین انجام شد. سپس تغییرات بیان ژن *cmMSH* در سه اندام ریشه، برگ و ساقه در چهار سطح شوری (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی بررسی شد. در پژوهش حاضر cDNA کدکننده آنزیم *cmMSH* از بافت ریشه جداسازی، با موفقیت در ناقل پلاسمیدی PTG19-T درج و سپس در باکتری *E. coli* همسانه‌سازی شد. پس از تأیید همسانه‌های نوترکیب با روش PCR، پلاسمید باکتری‌های نوترکیب استخراج و قطعه ژنی توالی‌یابی شد. قطعه توالی‌یابی شده دارای ۷۸۴ نوکلئوتید با یک چارچوب قرائت باز ۲۶۱ اسید آمینه‌ای بود و مشخص گردید پروتئین حاصل با داشتن دامین‌های کارکردی *heme-binding region*، *helix K region* و *aromatic region* متعلق به خانواده پروتئینی Cytochrome-P450 می‌باشد. در درخت فیلوژنی، توالی پروتئینی ژن *cmMSH* جداسازی شده بیشترین شباهت را با آنزیم *methylstylophine 14-hydroxylase* گیاه خشخاش داشته است. مقایسه میانگین بیان نسبی ژن نشان داد که شوری ۵۰ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را بر افزایش بیان ژن *cmMSH* در بافت ریشه دارد. همچنین بررسی الگوی تغییرات بیان ژن نشان داد که با افزایش سطح شوری تا ۵۰ میلی‌مولار، بیان ژن *cmMSH* در دو اندام برگ و ریشه زیاد شده و با افزایش شدت شوری به ۱۰۰ میلی‌مولار میزان بیان ژن به‌مقدار ۳۵ درصد در هر دو اندام کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: آنزیم *cmMSH*، بنزیل‌ایزوکوئینولین‌ها، سنگوئینارین، شوری، مامیران.

میکروب) و پاپاورین (گشادکننده‌ی عروق) می‌باشند (Farrow *et al.*, 2012). بیوستنز آلکالوئیدهای BIA با tyrosine آغاز می‌شود و با انجام چند واکنش آنزیمی به (S)-reticuline تبدیل می‌شود. این ترکیب توسط آنزیم^۵ BBE به (S)-scoulerine تبدیل می‌شود که این ماده به نوبه خود در یک مسیر متشکل از چند واکنش آنزیمی به سنگوئینارین تبدیل می‌شود (شکل ۱). یکی از آنزیم‌های کلیدی این مسیر (S)-cis-N-methyl stylophine 14-hydroxylase (MSH) می‌باشد که (S)-cis-N-methylstylophine را به Protopine تبدیل می‌کند (Beaudoin & Facchini, 2013). متابولیت‌های ثانویه، مواد آلی با ساختار شیمیایی پیچیده‌ای هستند که گیاهان در طول حیات خود تولید می‌نمایند؛ ولی در رشد و نمو و فعالیت‌های حیاتی گیاهان نقش ندارند و عمدتاً به منظور دفع آفات، جذب حشرات گرده افشان و مبارزه با بیماری‌های میکروبی تولید می‌شوند (Kumar & Gupta, 2008). برخی از این ترکیبات مانند ترکیبات با اثرات ضد سرطانی از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند و قیمت آن‌ها از چند دلار تا چند هزار دلار به ازای هر کیلو تغییر می‌کند. تولید انبوه و سریع این مواد پیچیده در مقیاس زیاد از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً مشکل و یا غیر ممکن می‌باشد و از سویی محدودیت‌های مختلف مانع تأمین این مواد از طبیعت است (Bourgau *et al.*, 2001;)

متابولیت‌های ثانویه گیاهی منابع بی‌نظیری برای داروها، افزودنی‌های غذایی و ترکیبات مهم صنعتی هستند که در مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی سنتز می‌شوند. افزایش کاربرد گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها و نیز مقادیر پایین متابولیت‌های ثانویه (کمتر از یک درصد وزن خشک) در این گیاهان، اهمیت توجه به افزایش کمیت و کیفیت این ترکیبات را موجب می‌گردد (Alamgir, 2017; Singh & Dwivedi, 2018). مامیران یا "مامیران کبیر" گیاهی دارویی با نام علمی *Chelidonium majus* L. از خانواده خشخاش (Papaveraceae) است که گاه گیاه پرستو نیز نامیده می‌شود. تمامی قسمت‌های این گیاه و نیز شیرابه آن مصرف دارویی دارند و حاوی آلکالوئیدهای مختلفی مانند سنگوئینارین^۱، کلیدونین^۲ و کلریتین^۳ می‌باشد (Meng *et al.*, 2009). مامیران در استان‌های شمالی ایران یعنی گیلان، گرگان و مازندران رشد می‌کند (Ghanavi *et al.*, 2015). آلکالوئیدهای گروه بنزیل ایزوکوئینولین^۴ (BIAs) متشکل از ۲۵۰۰ ترکیب نیتروژن‌دار هستند که در گیاهانی از قبیل خانواده خشخاش یافت می‌شوند. بسیاری از این آلکالوئیدها دارای خاصیت دارویی مانند مرفین و کدئین (مسکن و ضد درد)، نوسکاپین (ضد سرفه و ضدسرطان)، سنگوئینارین و بربرین (ضد

1-Sanguinarine

۲-Chelidone

۳-Chelerythrine

4- Benzyloquinoline alkaloids; BIAs

۵-Berberine Bridge Enzyme; BBE

مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی و جداسازی cDNA کدکننده آنزیم MSH نیاز به طراحی آغازگر بود که برای این منظور از کتابخانه‌های EST گیاه مامیران استفاده شد. اطلاعات این کتابخانه‌ها و توالی‌های EST آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI^۱ به دست آمد. به منظور پیدا کردن توالی‌های EST که با ژن *cmMSH* مرتبط بودند از Blastn استفاده شد. از این رو با استفاده از توالی ژن‌های *CYP82Y1*، *CYP82X2*، *CYP82X1*، *P6H*، *MSH* گیاه خشخاش (*Papave somniferum*) EST هایی که با توالی مورد نظر ما شباهت بالایی داشتند را انتخاب و با نرم‌افزار EGAssembler^۲ هم‌گذاری انجام شد. چارچوب قرائت باز توالی توافقی به دست آمده با برنامه ORF finder^۳ به دست آمد. به منظور جداسازی cDNA کدکننده آنزیم MSH از گیاه مامیران، برای توالی توافقی به دست آمده آغازگرهای اختصاصی طراحی و پس از بررسی خصوصیات آغازگرها با استفاده از برنامه Oligo analyzer^۴ سنتز آن‌ها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شد (جدول ۱). برای تهیه نمونه گیاهی به منظور جداسازی ژن مورد نظر و نیز بررسی بیان آن در اندام‌های مختلف؛ بذر گیاه مامیران کبیر تهیه شده از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در

Kheradmand *et al.*, 2017; Rao & Ravishankar, 2002; Mulabagal & Tsay, 2004). هر چند امروزه نقش دفاعی متابولیت‌های ثانویه برای همه تقریباً پذیرفته شده است اما هنوز بررسی سازوکار تاثیر تنش‌های محیطی بر تولید این مواد تصویر پیچیده و پر ابهامی پیش روی ما می‌گذارد، شواهد زیادی نشان می‌دهند که در شرایط تنش، تولید برخی از این ترکیب‌ها تا چندین برابر افزایش می‌یابد، اما دلایل زیادی نیز وجود دارد که این تاثیر همیشگی نیست (Tripathi & Tripathi, 2003). مطالعات در زمینه گیاهان دارویی بیشتر بر شناسایی مسیر بیوسنتزی و ژن‌های داخلی، به منظور یافتن راه-کارهای مناسب برای تولید بیشتر با هزینه کمتر متمرکز می‌باشد (Mehrabani *et al.*, 2013). از یک سو، روشن‌سازی مسیرهای بیوسنتزی و تعیین توالی ژن‌ها و مشخص کردن نقش متابولیت‌های ثانویه در یک اکوسیستم می‌تواند افق جدیدی را در زمینه توسعه کشاورزی پایدار ایجاد کند و از سویی دیگر، با توجه به اهمیت اقتصادی ترکیبات آلکالوئیدی، دست‌ورزی متابولیسم آلکالوئیدهای گیاهی توجه زیادی را در بیوتکنولوژی گیاهی به خود معطوف داشته است. بنابراین، با توجه به اهمیت آلکالوئیدها، در این تحقیق اقدام به شناسایی و جداسازی ژن کدکننده آنزیم (s)-cis-N-methyl stylopine 14-hydroxylas (MSH) از گیاه مامیران کبیر شد و در قدم بعدی میزان بیان ژن مذکور در اندام‌های مختلف این گیاه تحت تاثیر محرک غیرزیستی تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت.

۱- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

۲- <http://www.genome.jp/tools/egassembler>

۳- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>

۴- <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

گردید. پس از چهار هفته از رشد گیاهان، تنش‌ها در سه زمان متوالی به مدت ۱۴ روز اعمال شد و پس از اعمال آخرین تنش نمونه برداری از اندام‌های ریشه، ساقه و برگ انجام گرفت.

گلخانه کاشته شدند. برای بررسی اثرات تنش شوری بر میزان بیان ژن *cmMSH* در گیاه مامیران، آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار سطح شوری (غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌مولار) در سه تکرار اجرا

جدول ۱- توالی جفت آغازگرهای مورد استفاده به منظور جداسازی و بررسی بیان ژن *cmMSH* در گیاه مامیران کبیر.

Table 1- The sequences of primers used for Isolation and *cmMSH* gene expression in *Chelidonium majus* L.

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (5'→3')	دمای اتصال (°C) Annealing temperature	طول قطعه تکثیری (bp) Product size	ژن هدف Target gene
MSH-F	TGTACCCAGCAGGACCATTG	57	784	<i>cmMSH</i>
MSH-R	TACACGCTCCCATCTCGTTG			
qMSH-F	TTGAGAGGTTTGGTTGGAGG	58	128	<i>cmMSH</i>
qMSH-R	GGCTAATTAGTCCTGCACTTTC			
Elf-F	AGATGATTCCAACCAAGCCCA	58	111	<i>ef-alpha</i>
Elf-R	CCTTGATGACACCAACAGCAACT			

در ادامه پس از خالص‌سازی، قطعات DNA از ژل آگارز با استفاده از کیت خالص‌سازی Expin™ Combo GP (GeneAll) انجام گرفت و قطعه تخلیص شده در پلاسمید pTG19 (Vivantis) درج و با روش شوک حرارتی در سلول‌های مستعد شده *E. coli* سویه DH5α (با روش کلرید کلسیم) (Sambrook & Russel, 2001) همسانه‌سازی گردید. به منظور غربال اولیه باکتری‌های نوترکیب از محیط انتخابگر حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین استفاده شد و برای اطمینان از حضور قطعه مورد نظر در

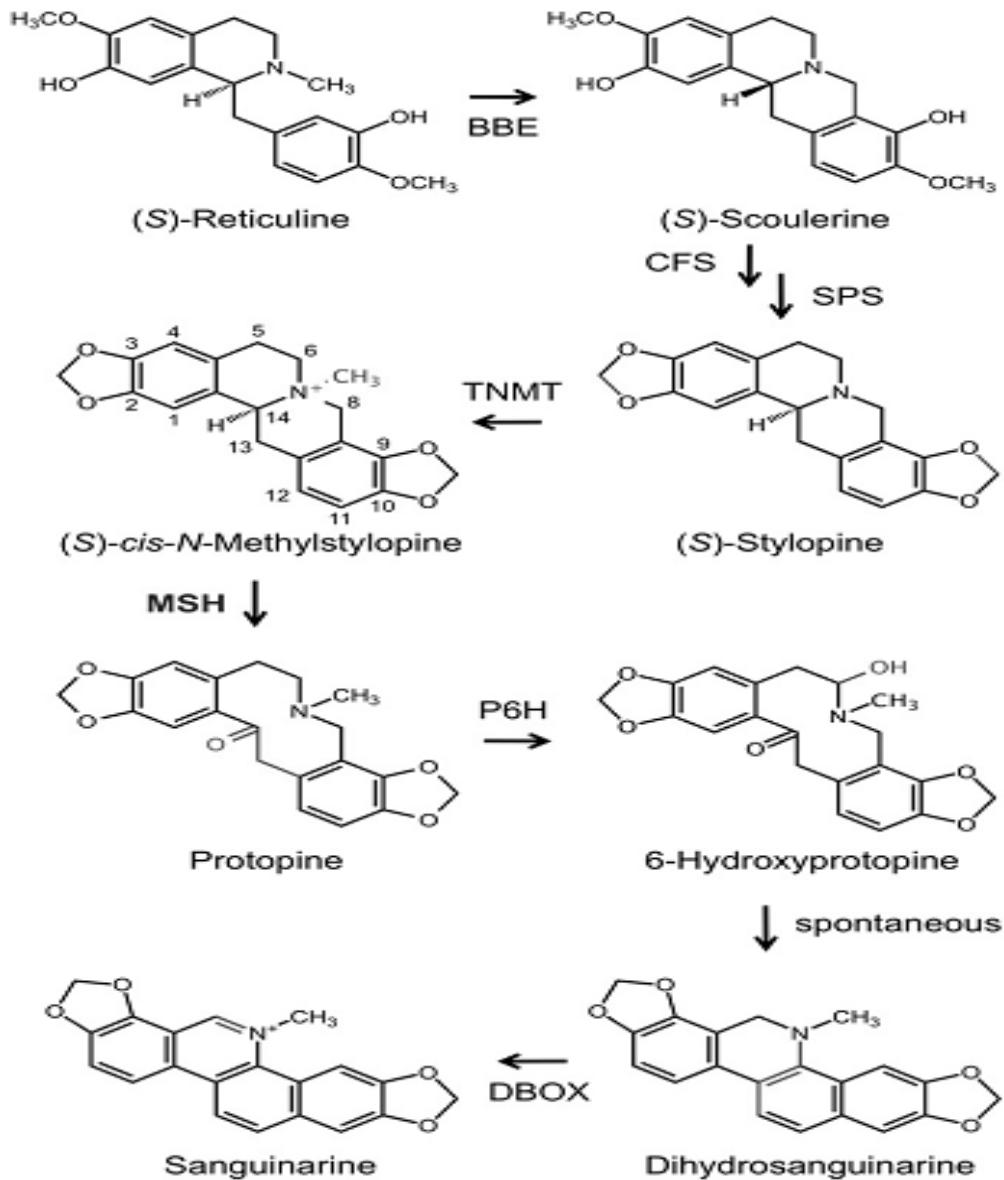
استخراج RNA از بافت‌های ریشه، ساقه و برگ با استفاده از بافر استخراج RNA (RNX- Plus Solution, Sinaclon, طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ساخت cDNA با استفاده از آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (Thermofisher scientific, EPO441) و آغازگر الیگو T_{۱۸}(dT) (Vivantis) انجام شد. پس از یافتن بهترین دمای اتصال جفت آغازگرها، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای جداسازی cDNA آنزیم *cmMSH* از گیاه مامیران با استفاده از مخلوط واکنش PCR (Amplicon) انجام شد.

این ژن در ریشه بیش از سایر اندام‌هاست (Facchini *et al.*, 2013)؛ بنابراین در پژوهش حاضر جداسازی cDNA کد کننده cmMSH از بافت ریشه انجام شد (شکل ۲-الف). پس از تأیید همسانه‌های نو ترکیب با روش PCR (شکل ۲-ب)، نتایج توالی‌یابی نشان داد که قطعه مورد نظر دارای ۷۸۴ نوکلئوتید با یک چارچوب قرائت باز ۲۶۱ اسید آمینه‌ای می‌باشد که با شماره دسترسی KX646397 در پایگاه داده NCBI ثبت گردید. توالی پروتئینی حاصل دارای دامین اصلی p450 بود که نشان می‌دهد پروتئین مورد مطالعه به خانواده پروتئینی Cytochrome-P450 تعلق دارد. لازم به ذکر است که از ویژگی‌های خانواده پروتئینی P450 دامین‌های *helix K region*، *aromatic region* و *heme-binding region* می‌باشد که در یوکاریوت‌ها حفاظت شده می‌باشد (Takemura *et al.*, 2013). دامین‌های ذکر شده در توالی اسید آمینه‌ای جداسازی شده در این مطالعه نیز در انتهای کربوکسیل یافت شد. توالی MSH جداسازی شده از مامیران کبیر (cmMSH) با پروتئین‌های P450 دیگر؛ به‌ویژه آن دسته از پروتئین‌ها که در بیوسنتز آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین نقش دارند (EcCYP82N2V2, PsCYP719B1, PsCYP82N4, EcCYP80B1V2, PsCYP719A25, EcCYP719A5) مقایسه شدند (شکل ۳) (Gesell *et al.*, 2009; Ikezawa *et al.*, 2007; Takemura *et al.*, 2013; Beaudoin and Facchini, 2013).

پلاسمید، PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام شد و توالی‌یابی با آغازگرهای عمومی M13 و T7 توسط شرکت Bioneer انجام گرفت. بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی قطعه مورد نظر، توسط نرم‌افزار CLC main workbench (V5.5) انجام گرفت. با استفاده از این نرم‌افزار، توالی‌های اضافی که شامل توالی ناقل بودند از توالی حذف گردید و توالی نوکلئوتیدی بدست آمده برای بررسی‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفت و در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید. مطالعه و مقایسه میزان بیان ژن *cmMSH* در اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه و برگ) و تیمارهای مختلف شوری (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول بر لیتر) با Real Time-PCR و آغازگرهای اختصاصی و نیز با استفاده از ژن Elongation factor به‌عنوان ژن مرجع انجام گرفت.

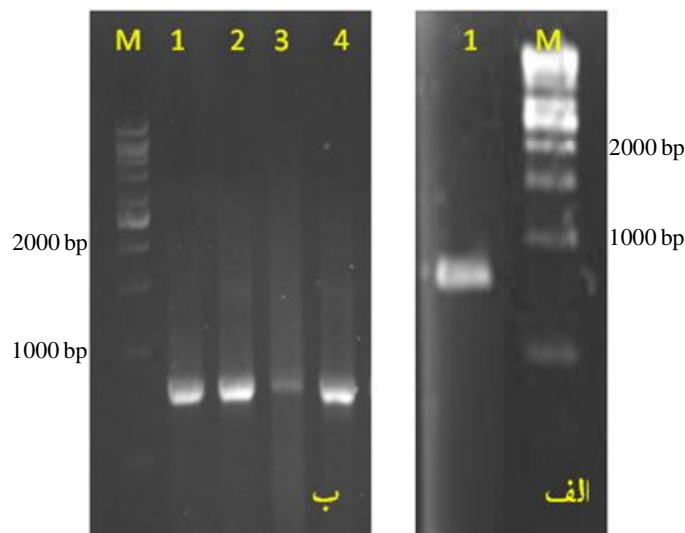
نتایج و بحث

بیوسنتز متابولیت مهمی نظیر سنگوئینارین در مامیران کبیر در مسیری متشکل از هفت مرحله آنزیمی از (S)-reticulic acid انجام می‌گیرد (شکل ۱). آنزیم N-methylstylopine hydroxylase (MSH) در این مسیر تبدیل (S)-stylopine به پروتوپین را انجام می‌دهد. با توجه به اینکه اطلاعاتی از cDNA کدکننده این آنزیم در مامیران کبیر وجود نداشت؛ در این راستا اقدام به جداسازی آن گردید. لازم به ذکر است که نتایج مطالعات مختلف در گیاهان هم‌خانواده حاکی از این مطلب بود که تجمع رونوشت‌های



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین که در این مسیر S-رتیکولین طی هفت مرحله آنزیمی به ماده نهایی سنگوئینارین تبدیل می‌شود (برگرفته از Beaudoin & Facchini, 2013).

Figure 1- Sanguinarine biosynthesis pathway which in this pathway S-reticuline is converted to the sanguinarine in seven enzyme phases (derived from Beaudoin & Facchini, 2013).



شکل ۲- الف) قطعه تکثیر شده *cmMSH* (چاهک ۱) از روی *cDNA* ریشه مامیران کبیر و ب) نتیجه روش PCR با همسانه‌های رشد کرده روی محیط گزینشگر (Clony PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (M- نشانگر اندازه ملکولی (Vivantis, 1kb)، چاهک ۱ الی ۳- همسانه‌های دارای ناقل نوترکیب، ۴- کنترل مثبت (*cDNA* ریشه به عنوان الگو).

Figure 2- (a) the amplified segment of *cmMSH* (well 1) from the root *cDNA* of greater celandine; b) the result of PCR test with selection cultures grown colons using specific primers (M: ladder, wells 1- 3: clones with recombinant vector, well 4: positive control (root *cDNA* as template).

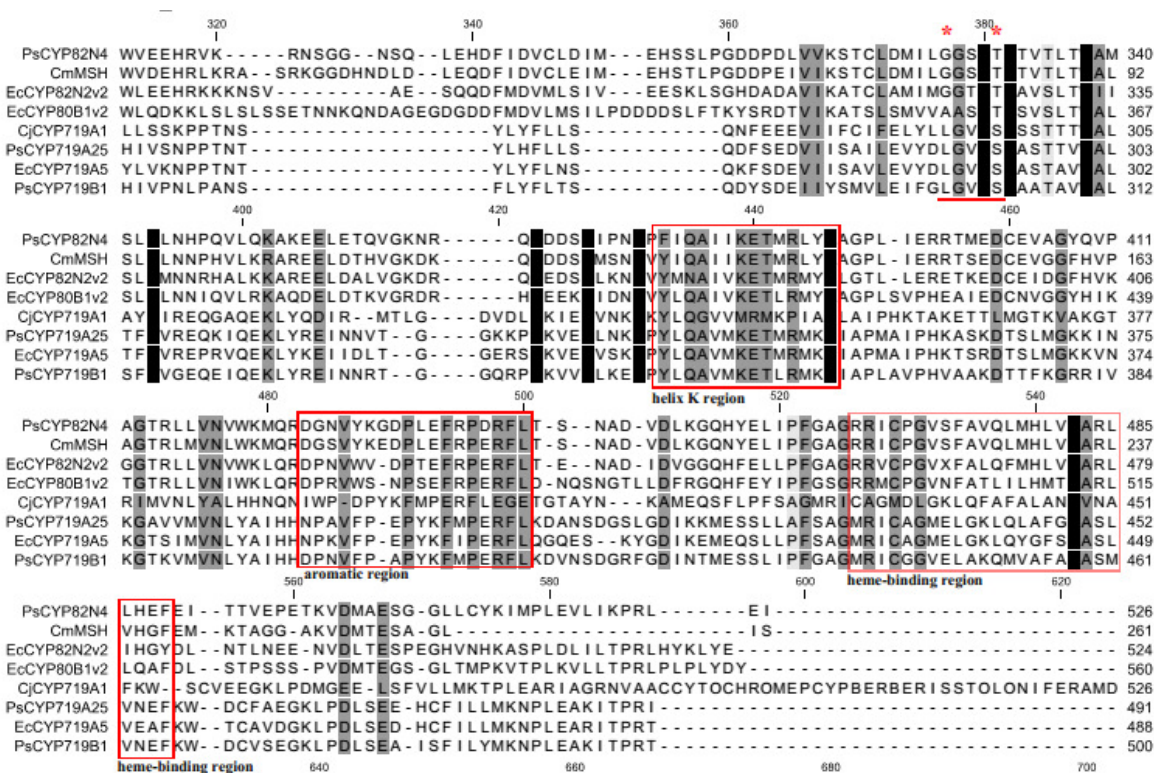
سپس با PsCYP82Y1 (۵۹ درصد یکسانی) و PsCYP82X2 (۵۷ درصد یکسانی) داشت. در بین پروتئین‌هایی که در بیوستنز آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین نقش دارند، *cmMSH* بیشترین شباهت را با آنزیم 14-methylstylopine hydroxylase گیاه خشخاش داشت (شکل ۴).

نتایج حاصل از داده‌های qRT-PCR به-منظور بررسی تأثیر تنش شوری بر بیان ژن *cmMSH* در اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گیاه مامیران، بیانگر تنوع بیان ژن مذکور در سطوح مختلف تنش و نیز در اندام‌های مختلف بود. براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، میزان تغییرات بیان ژن *cmMSH* در سطوح

از ویژگی‌های خانواده پروتئینی CYP82 دنباله آمینواسیدی Gly/Ala در ناحیه I helix می‌باشد. از سوی دیگر دنباله Thr در این ناحیه در پروتئین‌های منواکسیژناز P450 حفاظت شده است (شکل ۳)؛ بنابراین وجود این دنباله‌های آمینواسیدی حفاظت شده در I helix بیانگر این است که پروتئین موردنظر به‌عنوان یک آنزیم از نوع منواکسیژناز فعالیت دارد (Takemura *et al.*, 2013). در درخت فیلوژنی ترسیم شده (شکل ۴)، *cmMSH* از خانواده‌های پروتئینی CYP80 و CYP719 تفکیک شد. به‌طوری‌که در بین پروتئین‌های P450، پروتئین *cmMSH* بیشترین شباهت را با PsCYP82N4 (۷۷ درصد یکسانی)

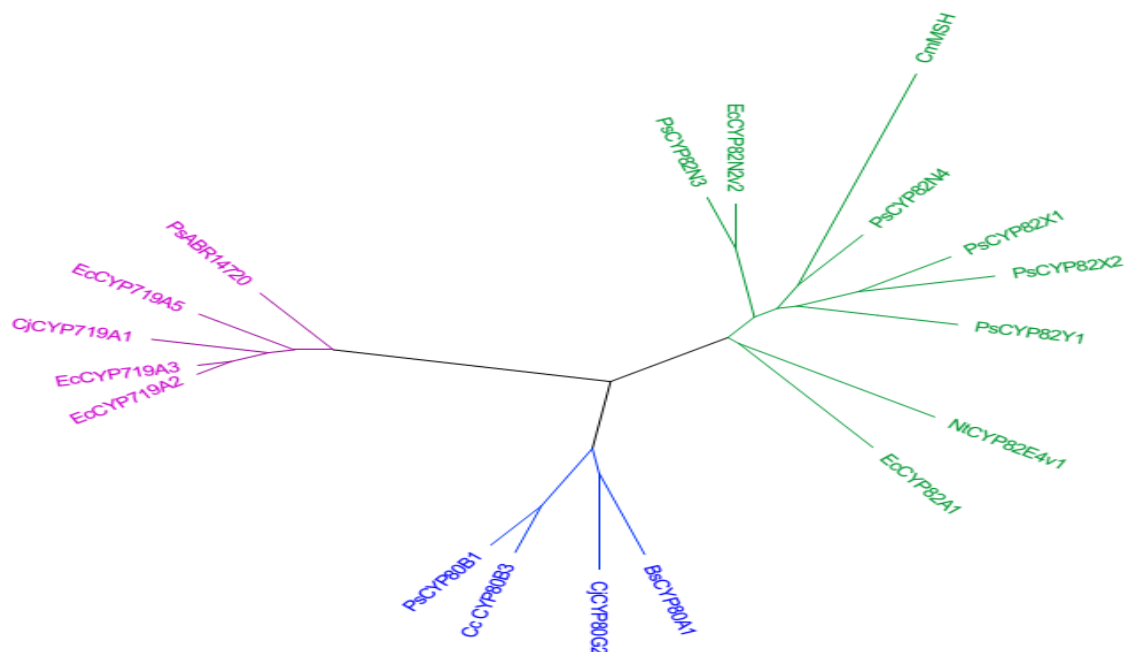
و کمترین میزان بیان ژن مربوط به شرایط بدون تنش (شاهد) بود. با بررسی روند تغییرات بیان مشخص گردید که با افزایش میزان شوری تا ۵۰ میلی مولار (شوری ملایم) بیان ژن *cmMSH* افزایش یافته و پس از آن با افزایش شدت شوری از میزان بیان ژن کاسته شده است.

مختلف شوری صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار اختلاف معنی داری را در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) نشان داد که این امر نشان از تأیید تأثیرگذاری تنش شوری بر بیان ژن مذکور بود. مقایسه میانگین بیان ژن در غلظت-های مختلف شوری نشان داد که شوری ۵۰ میلی-مولار بیشترین تاثیر را بر بیان ژن *cmMSH* دارد



شکل ۳- همردیفی توالی آمینواسیدی *cmMSH* جداسازی شده و تعدادی از پروتئین‌های خانواده P450. (نواحی مشخص شده با کادر قرمز نشان دهنده دامین‌های حفاظت شده پروتئین‌های P450 یوکاریوتی است. ناحیه زیرخط‌دار مربوط به توالی توافقی *helix I* است و علامت * مربوط به دنباله *Thr* و *Gly/Ala* حفاظت شده است).

Figure 3- Alignments for amino acid sequence of *cmMSH* and related P450 proteins family. (Red boxes indicate the conserved domains of eukaryotic P450 proteins, Underlined indicates Helix I consensus sequence and * sign indicates conserved Gly/Ala and Thr residue).

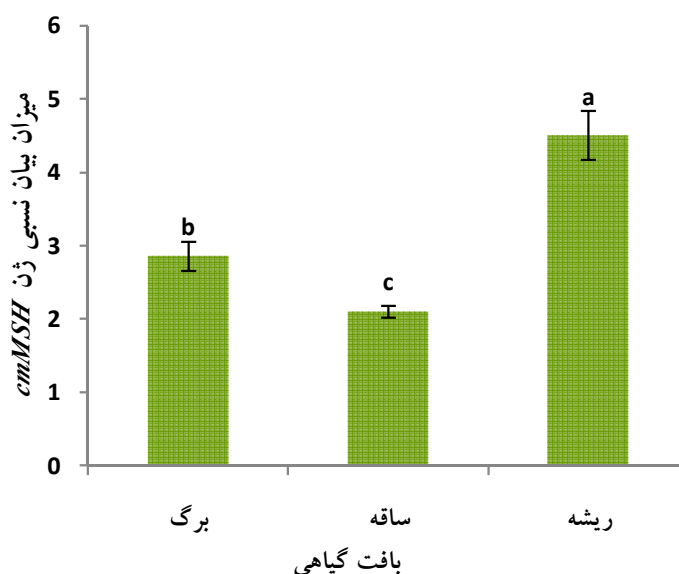


شکل ۴- روابط فیلوژنتیک براساس توالی‌های پروتئینی اعضای خانواده سیتوکروم P450 با الگوریتم Neighbor Joining (NJ).

Figure 4- Phylogenetic relationships based on protein sequences of the cytochrome P450 family with Neighbor Joining (NJ) algorithm.

بیشتری داشته است (Beaudoin & Facchini, 2013) که با نتایج این تحقیق هم‌راستا می‌باشد. بر اساس نتایج مشاهده شده فراوانی رونوشت‌های *cmMSH* در تمام اندام‌ها در تنش شوری ضعیف افزایش یافت تا این‌که به بالاترین میزان خود در تنش ملایم (۵۰ میلی‌مولار) در بافت ریشه رسید و سپس با افزایش شدت تنش کاهش یافت که این نتایج با افزایش فراوانی رونوشت‌های ژن *MSH* در اندام‌های مختلف گیاه خشخاش تحت تأثیر محرک قارچی *Botrytis cinerea* مطابقت دارد (Beaudoin & Facchini, 2013).

بررسی میزان بیان ژن *cmMSH* در اندام‌های مختلف گیاه مامیران (ریشه، ساقه و برگ)، بیانگر تفاوت اثر اندام در میزان بیان بود (جدول ۲). به‌طوری‌که بیشترین میزان بیان ژن مذکور در ریشه (۱/۶ برابر برگ و ۲/۵ برابر ساقه) و کمترین میزان بیان ژن در ساقه مشاهده گردید (شکل ۵). در توافق با نتایج حاصل از این تحقیق، در گیاه خشخاش نیز بالا بودن فراوانی نسبی رونوشت‌های ژن *cmMSH* در ریشه و به‌دنبال آن تجمع سنگوئینارین در ریشه‌های این گیاه گزارش شده است به‌طوری‌که رونوشت‌های این ژن در تمام اندام‌ها وجود دارد ولی در ریشه تجمع



شکل ۵- مقایسه بیان نسبی ژن *cmMSH* در اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گیاه مامیران.

Figure 5- Comparison of the mean relative expression of *cmMSH* gene in various organs (root, stem and leaf) of greater celandine.

دارد به‌طور گسترده در ریشه و ساقه حتی فعال‌تر از کپسول وجود دارد و نشان‌دهنده این موضوع است که مرفین در ریشه و ساقه سنتز شده و توسط شیره گیاهی به درون کپسول منتقل می‌شود (Gerardy & Zenk, 1993b). در واقع می‌توان بیان داشت که بیان یک ژن در یک اندام الزاما به معنای تجمع مواد تولیدی آن در همان اندام نیست. در این راستا، انتقال نیکوتین و هیوسیامین از ریشه توسط آوند چوبی به برگ‌ها یک مثال مشهود از آکالوئیدهایی است که در ریشه سنتز می‌شوند و در اندام‌های هوایی ذخیره می‌شوند (Hashimoto & Yamada, 1992). با توجه به اطلاعات فوق می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است چنین مکانیسمی برای سنگوئینارین نیز در مامیران وجود داشته باشد، به‌این‌صورت که

با توجه به گزارش‌های تجمع حداکثری سنگوئینارین در ریشه مامیران کبیر (Holkova *et al.*, 2010; Samanani *et al.*, 2004)، بالای رونوشت ژن‌های کنترل‌کننده این مسیر از جمله *cmMSH* در ریشه آن قابل انتظار بود. البته رونوشت‌های این ژن در اندام ساقه که سنگوئینارین قابل تشخیصی در آن تجمع نمی‌یابد نیز وجود دارد. در واقع به‌نظر می‌رسد محل سنتز سنگوئینارین منحصر به ریشه که در آن تجمع می‌یابد نباشد و ممکن است در ساقه نیز سنتز شود. در تأیید این موضوع می‌توان به سنتز مرفین در ساقه اشاره کرد، که با وجود این‌که مرفین فقط در اندام هوایی در درون کپسول تجمع می‌یابد (Facchini & De Luka, 1995)، اما آنزیم سالوتاردینول سینتتاز که در بیوسنتز مرفین نقش

سنگوئینارین سنتز شده در ساقه به سمت ریشه انتقال بیابد. نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی-داری را در اثر متقابل تنش شوری و اندام‌های مختلف گیاه مامیران بر میزان بیان ژن *cmMSH* نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن *cmMSH* تحت تأثیر تنش شوری در اندام‌های مختلف مامیران کبیر.

Table 2- Analysis of variance for *cmMSH* gene relative expression under salinity stress in greater celandine organs.

F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (S.O.V)
150.36**	21.05	63.15	3	شوری Salinity
129.5**	18.13	36.27	2	اندام Organ
60.85**	8.52	51.13	6	شوری×اندام Salinity×Organ
	0.140	3.35	24	خطای آزمایش Error
	11.85			CV%

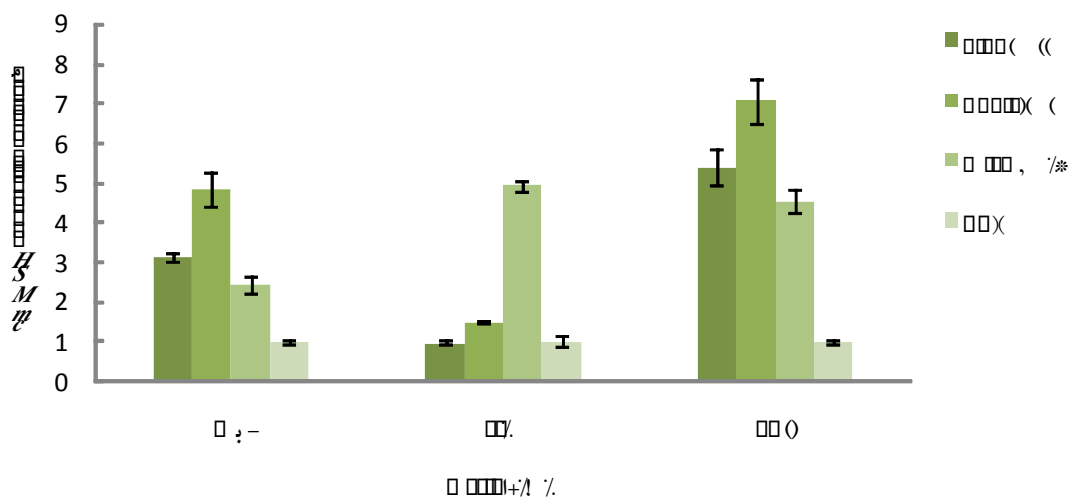
** : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

داشت، در حالی که در شوری ۵۰ میلی‌مولار نسبت به شوری ۲۵ میلی‌مولار کاهش قابل ملاحظه‌ای در بیان این ژن در اندام ساقه مشاهده شد. البته بیشترین میزان بیان ژن در این سطح از تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار)، مربوط به ریشه و کمترین میزان بیان مربوط به ساقه بود. در جمع-بندی اثر متقابل شوری و اندام همانطور که مشاهده می‌شود (شکل ۶) با شوری اولیه، میزان بیان ژن *cmMSH* در تمام اندام‌ها به‌خصوص در ساقه و با اختلاف معنی‌داری از شاهد افزایش یافت. اما با افزایش سطح شوری از ۵۰ میلی‌مولار به ۱۰۰ میلی‌مولار میزان بیان این ژن در تمام

با توجه به الگوی تغییرات بیان ژن در اندام‌های مختلف تحت شوری‌های متفاوت (شکل ۶)، تنش شوری ۲۵ میلی‌مولار، بیشترین تأثیر و درصد افزایش را بر بیان ژن *cmMSH* در اندام ساقه و کمترین تأثیر را بر بیان ژن مذکور در اندام برگ نشان داد؛ به طوری که در این سطح از تنش، بیان ژن *cmMSH* در تمام اندام‌های مامیران نسبت به تیمار شاهد (بدون شوری) افزایش چشم‌گیر و معنی‌داری داشت (شکل ۶). از سوی دیگر در شوری ۵۰ میلی‌مولار بیان ژن *cmMSH* نسبت به تیمار شاهد و شوری ۲۵ میلی‌مولار در هر دو اندام ریشه و برگ افزایش قابل ملاحظه‌ای

محرك زیستی بر بیان ژن *DIOX2* (از ژنهای موثر در سنتز سنگوئینارین) حاکی از روند کاهش بیان ژن فوق‌الذکر در ساعات پایانی القاء به دلیل مواجهه طولانی با محرک‌ها در سوسپانسیون سلولی می‌باشد (Hagel & Facchini, 2010).

اندام‌ها سیر نزولی نشان داد؛ که علت آن می‌تواند افزایش شدت تنش و مدت زمان طولانی مواجه شدن گیاه با شرایط تنش باشد. البته باید توجه داشت که در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار همچنان بیان ژن *cmMSH* در برگ و ریشه نسبت به عدم شوری (تیمار شاهد) افزایش یافته است (شکل ۵). در همین راستا نیز نتایج حاصل از تاثیر



شکل ۶- مقایسه اثر متقابل شوری و اندام‌های گیاه مامیران بر بیان ژن *cmMSH* (شاهد: بدون تنش؛ تنش ضعیف: شوری ۲۵ میلی‌مولار؛ تنش متوسط: شوری ۵۰ میلی‌مولار؛ تنش شدید: شوری ۱۰۰ میلی‌مولار).

Figure 6- Mean comparison of salinity × greater celandine organs interaction on *cmMSH* gene expression (control: non stress; weak stress: 25 mM salinity; mild stress: 50 mM salinity; severe stress: 100 mM salinity).

Cytochrome-P450 را در ژن جدا شده نشان داد. از نظر بیانی نتایج حاصل از ریل تایم پی-سی آر نشان داد که تنش شوری ملایم ۵۰ میلی-مولاری می‌تواند در گیاه دارویی مامیران کبیر باعث افزایش بیان ژن *cmMSH* با حداکثر میزان در ریشه و سپس برگ گردد.

نتیجه‌گیری

برای اولین بار در این مطالعه cDNA کد کننده *cmMSH* از گیاه مامیران کبیر جداسازی و توالی‌یابی شد. نتایج حاصل از بررسی بیوانفورماتیکی قطعه توالی‌یابی شده، دامین‌های کارکردی و اصلی خانواده پروتئینی

- Alamgir ANM (2017). Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1: Pharmacognosy. Springer.
- Beaudoin GA, Facchini PJ (2013). Isolation and characterization of a cDNA encoding (s)-cis-N-methylstylopine 14-hydroxylase from opium poppy, a key enzyme in sanguinarine biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431: 597-603.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
- Facchini PJ, De Luca V (1995). Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry* 269: 26684-26690.
- Farrow SC, Hagel JM, Facchini PJ (2012). Transcript and metabolite profiling in cell cultures of 18 plant species that produce benzyloquinoline alkaloids. *Histochemistry* 77: 79-88.
- Gerardy R, Zank MH (1993b). Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450, enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 32: 79-86.
- Gesell A, Rolf M, Ziegler J, Vez ML, Huang FC, Kutchan TM (2009). CYP719B1 salutaridine synthase, the C-C phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in opium poppy. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 24432-24442.
- Ghanavi Z, Molaei S, Babaei AR, Gasempour AR (2015). Quantitative measurements of alkaloids in *Chelidonium majus* at different altitudes of north Iran. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 31: 307-314.
- Hagel JM, Facchini PJ (2010). Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology* 6: 273-275.
- Hashimoto T, Yamada Y (1992). Tropane alkaloid biosynthesis: regulation and application. In proceedings of the 7th Annual Pennsylvania State symposium on plant physiology. *American Society of Plant Physiologists* 122-134.
- Holkova I, Bezakova L, Bilka FS, Bala_zova A, Vanko M, Blanarikova V (2010). Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 887-892.
- Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2007). Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylopine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 274: 1019-1035.
- Kheradmand Prouch M, Shahriari Ahmadi F, Moshtaghi N (2017). The effect of methyljasmonate elicitor on tropane alkaloid production in hairy roots of *Atropa belladonna*. *Journal of Agricultural Biotechnology* 9: 61-74.
- Kumar J, Gupta PK (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports* 2: 93-112.
- Mehrabani B, Nazeri S, Piri Kh (2013). Evaluation of total produced phenol in Chaei Koohi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2: 77-88.
- Meng F, Zuo G, Hao X, Wang G, Xiao H, Zhang J (2009). Antifungal activity of the benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates. *Journal of Ethnopharmacology* 125: 494-496.

- Mulabagal V, Tsay HS (2004). Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2: 29-48.
- Rao SR, Ravishankar GA (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- Samanani N, Liscombe DK, Facchini PJ (2004). Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal* 40: 302-313.
- Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Singh A, Dwivedi P (2018). Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7: 750-757.
- Takemura T, Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2013). Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells. *Phytochemistry* 91: 100-8.
- Tripathi L, Tripathi JN (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *International Institute of Tropical Agriculture* 2: 243-253.

Molecular isolation of cDNA encoding N-methylstylopine hydroxylase from greater celandine (*Chelidonium majus* L.) and its expression enhancement in response to salinity abiotic elicitor

Soleimani Z.¹, Fabriki-Ourang S.^{2*}, Mafakheri S.³

¹ M.Sc. of Genetics & Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

² Assistant professor, Department of Genetics & Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

³ Assistant professor, Department of Horticulture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

Abstract

The greater celandine (*Chelidonium majus* L.) contains important alkaloids such as Sanguinarine. Sanguinarine is an active alkaloid with potentially antimicrobial, anti-inflammatory and anti-tumor properties that is widely found in plants of Papaveraceae family. In this research, the isolation and sequencing of (s)-cis-N-methyl stylopine 14-hydroxylase (MSH) coding gene was performed as one of the key enzymes in Sanguinarine pathway from celandine. Then, the changes in *cmMSH* gene expression were investigated in roots, leaf and stems at four salinity levels (0, 25, 50, and 100 mM) in a factorial experiment based on completely randomized design. In the present study, the cDNA encoding MSH enzyme was isolated from root and successfully integrated into PTG19-T plasmid and cloned at *E. coli*. After confirmation of recombinant clones by PCR, plasmids of recombinant bacteria were extracted and the gene segment sequenced. The sequenced segment had 784 nucleotides with an open reading frame of 261 amino acids which the derived protein with functional domains including helix K region, heme-binding region and aromatic region belonged to the Cytochrome-P450 protein family. In the phylogeny tree, the protein sequence of isolated *cmMSH* gene had the most similarity with methylstylopine 14-hydroxylase enzyme of poppy species. Mean comparison of gene relative expression showed that 50 mM salinity had maximal effect on increasing of *cmMSH* gene expression in root tissue. Also, the expression pattern showed that with increment the salinity up to 50 mM, the expression of *cmMSH* gene increased in leaves and roots, but with increment the salinity to 100 mM the gene expression decreased 35% in both tissues.

Key words: *Benzylisoquinoline, Celandine, cmMSH, Salinity, Sanguinarine.*

* Corresponding Author: Fabriki S.

Tel:09195382099

Email: s.ourang910@gmail.com

