

## تأثیر الیستورهای غیر زیستی بر بیان ژن آلکالوئیدهای گیاه شقایق ایرانی (*Papaver bracteatum*)

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

مرجان بهزادی‌راد<sup>۱</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۱</sup>، علی‌اکبر شاه نجات بوشهری<sup>۱\*</sup>

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

Behzadirad M<sup>1</sup>, Naghavi MR<sup>1</sup>, Shahnejat Bushehri AA<sup>\*1</sup>

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: ۹۴/۳/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۹)

#### چکیده

خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*)، گونه‌ای مهم از خانواده پاپاوراسه است که دارای ترکیبات آلکالوئیدی با ارزش دارویی می‌باشد. الیستورها 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 الیستور سالیسیک 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 الیستور داشت. به‌طور کلی تیمار با الیستور متیل جاسمونات سبب افزایش بیش‌تر میزان مورفین نسبت به الیستور سالیسیک اسید در کشت سلولی ریشه شد. هم‌چنین بیش‌ترین میزان تجمع مورفین تحت تأثیر تیمار با الیستورهای مذکور نتیجه افزایش بیان ژن‌های *COR* و *TYDC* بود. نمونه‌هایی که دارای کم‌ترین میزان مورفین بودند، برای ژن *TYDC* کاهش و برای ژن *COR* افزایش بیان بیش‌تری را نشان دادند. احتمالاً 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 الیستورهای 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

الیستور

سالیسیک اسید

متابولیت ثانویه

متیل جاسمونات

## مقدمه

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 *TYDC1* و *TYDC2* 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 به وسیله *T6ODM* کاتالیز شده و نئوپینون<sup>9</sup> را تولید می‌کند که به صورت خود به خودی به کدئینون تبدیل می‌شود و سپس به کدئین تبدیل شده که توسط یک آلدو-کتوریداکتاز<sup>10</sup> به نام کدئینون ریداکتاز به کدئین و کدئین به وسیله *CODM*<sup>11</sup> به مورفین تبدیل می‌شود. به طور جایگزین *CODM* اولین مرحله در مسیر فرعی که شامل 3-دمتیلآسیون تبائین به اورپیاوین<sup>12</sup> است را کاتالیز می‌کند. سپس *T6ODM*<sup>13</sup> اورپیاوین را به مورفینون تبدیل کرده که توسط *COR*<sup>14</sup> به مورفین احیا می‌شود (Hagel and Fachini 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 به منظور تولید تبائین در محیط کشت نیز انجام شده‌است و متأسفانه موفقیت‌های کمی در شرایط درون شیشه‌ای بدست آمده به طوری که 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; )

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 به عنوان دفع کننده حشرات عمل می‌کنند (Julsing et al. 2006). بنزیل ایزوکوئینولین‌ها<sup>1</sup>، 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<sup>2</sup> و کدئین<sup>3</sup> را می‌توان در گونه‌های مختلفی از خشخاش یافت اما تبائین<sup>4</sup> به عنوان پیش ماده سنتز این مواد، به طور 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<sup>5</sup> و نالتروکسون<sup>6</sup> است (McNicholas and Martin 1984). به منظور افزایش تولید انواع آلکالوئیدهای ارزشمند بنزوفنانتريدین<sup>7</sup> در این گیاه مهندسی متابولیت فراوانی انجام شده که یکی از این روش‌ها استفاده از الیستورها است (Archambault et al. 1996; Holkova 2010). واژه الیستور 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

<sup>8</sup> Tyrosine/dopa decarboxylase

<sup>9</sup> Neopinon

<sup>10</sup> Aldo-keto reductase

<sup>11</sup> Codeine-O-demethylation

<sup>12</sup> Oripavine

<sup>13</sup> Thebaine 6-O-demethylase

<sup>14</sup> Codeine reductase

<sup>1</sup> Benzyloquinolines

<sup>2</sup> Morphine

<sup>3</sup> Codeine

<sup>4</sup> Thebaine

<sup>5</sup> Naloxone

<sup>6</sup> Naltrexone

<sup>7</sup> Benzophenanthridine

(2013). با استفاده از دو ایستور متیل جاسمونات و اولتراسونیک همراه با فیدینگ، میزان تولید تبائین در کشت سلولی گیاه خشخاش ایرانی افزایش یافت (Zareh 2014). تأثیر ایستوره‌های زیستی و نانو ایستورها بر افزایش تولید آلکالوئیدهای گیاه *P. somniferum* در کشت سلولی این گیاه بررسی شد. نتایج حاصله افزایش میزان تبائین و سنگوئینارین<sup>۳</sup> را نسبت به شاهد نشان داد (Khodayari 2014). از ایستوره‌های عصاره مخمر، کیتوزان و ال تیروزین در کشت سلولی گیاه خشخاش ایرانی استفاده و افزایش میزان مورفین نسبت به شاهد گزارش شد (Jahangiri 2014). تأثیر نانو ایستوره‌های اکسید روی، اکسید سیلیسیم 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 ایستور، زمان استفاده از آن و مدت زمانی که سلول‌ها در معرض ایستورها قرار دارند، نوع محیط کشت و غلظت مواد تشکیل دهنده آن و نهایتاً سن کشت کالوس مرتبط دانست (Namdeo 2007). به‌منظور انتخاب ایستور مناسب برای افزایش تولید ترکیبات دارویی ارزشمند تبائین، در این تحقیق اثر دو ایستور غیر زیستی سالیسیلیک 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 ۳-۵ بار شستشو با آب مقطر استریل به محیط کشت MS فاقد هورمون با

(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 ایستورها و پیش ماده ایستورها 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 ایستورها برای شناسایی مسیرهای سیگنال‌دهی در تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده‌است (Zhao et al. 2003). ایستورها به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم با فعال کردن ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ترکیبات ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌شوند (Neumann et al. 2009).

تنش‌های القاء شده توسط اسید جاسمونیک و استرهای آن به ویژه متیل جاسمونات در تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات دارویی مانند آلکالوئیدها و آلفا توکوفرول و رسوراتول<sup>۱</sup> 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<sup>۲</sup> تحریک می‌کند (Matkowski 2008). در بررسی اثر ایستورها 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 ایستورها بر میزان تجمع آلکالوئیدها، مشخص شده که اضافه کردن پیش ماده‌های DL-tropic L-phenylalanine, L-ornithine و L-dopamine acid و L-tyrosine به محیط کشت *P. bracteatum*، تأثیری بر تولید تبائین ندارد (Kamimura and Nishikawa 1976). هم‌چنین استفاده از نانو ذرات مس، آهن و سیلیسیم به‌منظور افزایش متابولیت‌های پاپاورین و تبائین و کدئین در سوسپانسیون سلولی خشخاش گزارش شده‌است (Bondarian

<sup>1</sup> Resveratrol

<sup>2</sup> Systemic Resistance

<sup>3</sup> Sanguinarine

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن های *COR* و *TYDC*

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

برای اندازه گیری کمی آلکالوئیدها، غلظت های متفاوت از استاندارد هر یک از آلکالوئیدها استفاده و هر یک با تکرار به دستگاه HPLC تزریق شد.

برای بررسی بیان ژن های مسیر بیوستزی آلکالوئیدهای گیاه خشخاش ایرانی در پاسخ به الیستورهای استفاده شده، آغازگرهایی برای ژن های *TYDC* و *COR* طراحی و استفاده شد. جهت استخراج RNA از روش تغییر یافته ترایزول استفاده شد (Qin 2008). به منظور 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 فرمتاز بود. نهایتاً تکثیر ژن های *TYDC* و *COR* برای اندازه گیری بیان ژن توسط Real Time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت. کمیت نسبی به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ Eva Green استفاده از دستگاه Bio Rad انجام گرفت. پس از روش Real Time PCR، با استفاده از ژن رفرنس *Elf1a* و با شرایط واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای چرخه اول و در چرخه های بعدی به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد.

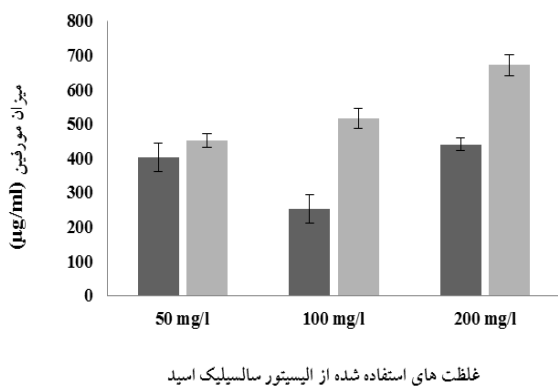
داده های خام به صورت چرخه آستانه<sup>۲</sup> از دستگاه استخراج شد. با در نظر گرفتن سه تکرار برای هر نمونه، جهت بررسی میزان ژن های مذکور در مقایسه با شاهد از نرم افزار (Pfaffl et al. 2002) Rest استفاده شد.

۳۰ mg/L<sup>-1</sup> ساکارز و ۷/۵ گرم در لیتر آگار منتقل شدند. برای جوانه زنی 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). جوانه زنی بعد از گذشت چهار هفته آغاز شد. پس از دستیابی به گیاهچه های مناسب با ارتفاع حدوداً ۱۰-۸ سانتی متر، ریزنمونه های مناسب از ناحیه ریشه برای مرحله کالزایی انتخاب و به محیط کالزایی (Karimaneh et al. 2009)، یعنی محیط MS تغییر یافته با ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارز و ۷/۵ گرم در لیتر آگار به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون های BAP و 2,4-D منتقل شدند. کالوس های مورد نظر پس از دو بار واکشت سه هفته ای، از نظر درصد کالزایی، حجم و وزن کالوس مورد ارزیابی قرار گرفتند (دادها نشان داده نشده اند) و کالوس های مطلوب به محیط سوسپانسیون 1/2 MS (محیط فاقد آگار) با همان ترکیب هورمونی منتقل شده و در شیکر انکوباتور یخچال دار در محیط تاریکی با دمای ۲۵°C و ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از تکثیر کالوس ها و رسیدن به رشد مطلوب در فاز نمایی (۲۳ روز)، تمام سوسپانسیون ها با محلول متیل جاسمونات در سه غلظت متفاوت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار و سالیسیلیک اسید در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر تیمار شدند. هر سوسپانسیون به عنوان یک نمونه و برای هر بازه زمانی نیز یک شاهد در نظر گرفته شد و به سوسپانسیون های شاهد یک میلی لیتر آب مقطر در هر زمان اضافه شد. کالوس های رشد یافته در سوسپانسیون های سلولی در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار برای اندازه گیری آلکالوئیدهای مورفین، کدئین، تبائین، پاپاورین، و نوسکاپین با استفاده از کاغذ صافی جمع آوری و برای بررسی های بعدی در دمای ۸۰- سانتی گراد نگهداری شدند. برای اندازه گیری آلکالوئیدهای این گیاه، کالوس های فریز شده به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریزدراپر جهت خشک کردن نمونه ها قرار داده شدند و سپس به میزان ۰/۰۱ گرم از آن ها با یک میلی لیتر متانول حاوی ۰/۵ درصد HCl (V/V) مخلوط و پس از ۶۰ دقیقه تیمار در حمام اولتراسونیک، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰×g (Young Choa et al. 2008) مایع رویی جمع آوری و از فیلتر عبور داده شد.

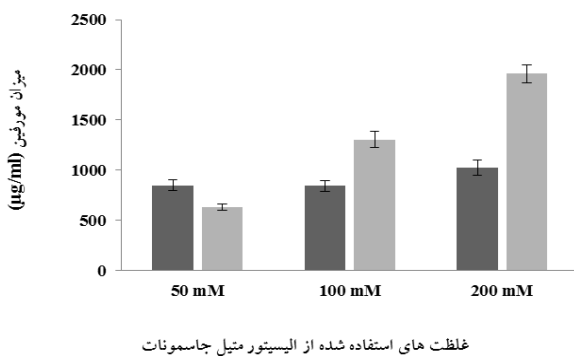
<sup>1</sup> Elongation factor<sup>2</sup> Threshold cycle (Ct)

## نتایج و بحث

HPLC و بررسی میزان آلکالوئیدها نمونه‌های تیمار شده با الیستورها که دارای بیش‌ترین میزان مورفین و کم‌ترین میزان این نوع آلکالوئید بودند، انتخاب شده و جهت بررسی میزان بیان ژن -های *TYDC* و *COR* مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در نمونه تیمار شده با الیستور متیل جاسمونات با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار در زمان ۴۸ 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 الیستور سالیسیلیک اسید در دو بازه زمانی ۲۴ (مشکی) و ۴۸ (طوسی) ساعت در گیاه *P. bracteatum*



شکل ۲- تجمع آلکالوئید مورفین پس از اعمال الیستور متیل جاسمونات در دو بازه زمانی ۲۴ (مشکی) و ۴۸ (طوسی) ساعت در گیاه *P. bracteatum*

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

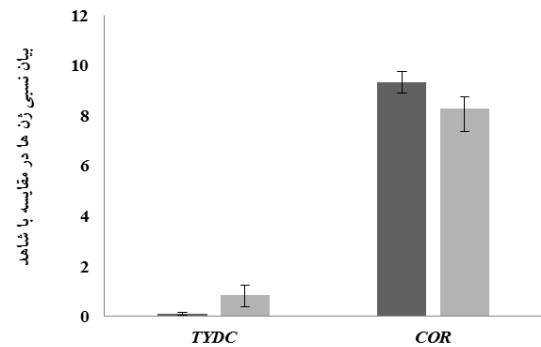
پس از قرار دادن ریزنمونه‌ها در محیط کشت مورد نظر و بعد از حدود هفتاد روز از زمان کالوس‌دهی تغییر رنگ کالوس‌ها به رنگ قهوه‌ای مشاهده شد که این تغییر رنگ احتمالاً ناشی از آلکالوئیدهای بسیار زیاد این گیاه می‌باشد. تلاش‌های زیادی برای افزایش تولید متابولیت‌های گیاه خشخاش (*P. bracteatum*) انجام و از الیستورهای مختلف در زمان‌های متفاوتی برای مشاهده تأثیر آن‌ها بر افزایش آلکالوئیدهای این گیاه استفاده شده است. 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 الیستور موجب شناسایی آن‌ها می‌شوند؛ در نتیجه سیگنال دریافتی توسط سلول‌های گیاهی موجب انتقال سیگنال‌های الیستوری شده و نهایتاً پاسخ‌های دفاعی نظیر قلیایی شدن محیط، فعال شدن ژن-های دفاعی و سوخت‌های اکسیداتیو و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Ouwkerk 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 الیستور متیل جاسمونات تیمار شده بودند، مورفین و کمی کدئین مشاهده شد در صورتی‌که در تیمارهای سالیسیلیک اسید تنها مورفین بدست آمد. مطالعات نشان داد که اثر عامل زمان برای هر دو الیستور مورد نظر معنی‌دار است. زمان ۴۸ ساعت اثر قابل توجهی بر روی میزان آلکالوئیدها نشان داد. در مقایسه دو الیستور، متیل جاسمونات سبب افزایش میزان مورفین نسبت به سالیسیلیک اسید شد. از بین غلظت‌های مورد استفاده متیل جاسمونات در تیمارها، غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار در ۴۸ ساعت سبب تولید میزان بیش‌تری مورفین نسبت به دیگر تیمارها شد. در بین غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید نیز بیش‌ترین میزان مورفین در استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۴۸ 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

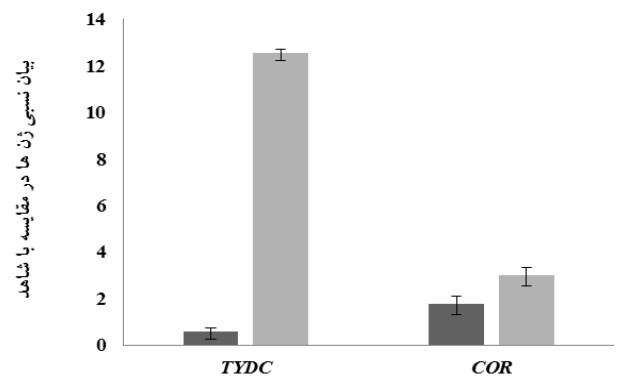
Rostampour et al. 2009; ) گزارش شده است *P.bracteatum* هم چنان (Farjaminezhad et al. 2013; Zare et al. 2013 تحقیقاتی هست که نشان می دهد آلكالوئیدهای دیگری در کشت سلولی این گیاه می تواند به عنوان آلكالوئید غالب نمایان شود. تجمع سنگوئینارین در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* پس از استفاده از الیستورهای قارچی و هورمون ها به عنوان آلكالوئید اصلی گزارش شده است (Steven et al. 1988)، در صورتی که در همین تحقیق در محیط فاقد هورمون تجمع تبائین مشاهده شد. هم چنین در مطالعه ای 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 می دهد که ارقام مختلف این گیاه حاوی آلكالوئیدهای گوناگون به عنوان آلكالوئید اصلی هستند. بطوری که ارقامی که از غرب آلمان جمع آوری شده بودند تبائین را به عنوان آلكالوئید غالب نشان دادند و در ارقام دیگر مورد استفاده ای این تحقیق ایزوتبائین به عنوان آلكالوئید 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 می دهد که الیستورهای استفاده شده بر روی چرخه بیوسنتزی تولید متابولیت های ثانویه گیاه خشخاش ایرانی موثر می باشند. که احتمالاً استفاده از محیط کشت تغییر یافته MS جهت تولید کالوس این گیاه، سبب تحریک ژن های مسیر بیوسنتزی مورفین که در شرایط عادی فعال نیستند، شده است. دلیلی دیگر بر تجمع این نوع آلكالوئید می تواند فعال شدن عوامل رونویسی خاص باشد. مطالعات بر روی رونوشت های بنزیل ایزوکوئینولین آلكالوئیدها در خشخاش افیونی نشان داد که یک عامل رونویسی *WRKY* که با W-box که یک عامل سیس حفاظت شده در پروموتور ژن های *TYDC* است برهمکنش کرده و رونویسی آن ها را فعال می کند (Mishra et al. 2013). هم چنین مطالعات بیان ژن مشخص می کند که ژن *COR* در تمامی نمونه های تیمار شده با الیستور، افزایش بیان را نسبت به شاهد نشان دادند. با توجه به تحقیقات گذشته، افزایش بیان *COR* منجر به افزایش میزان تجمع آلكالوئیدهای مورفینان می شود. ژن *COR* در مودولاسیون بیوسنتز

بود افزایش معنی داری در بیان ژن *TYDC* و *COR* نشان داد. هم چنین نمونه ای تیمار شده با الیستور ذکر شده که کمترین میزان مورفین را داشت برای ژن *TYDC* کاهش و برای ژن *COR* افزایش بیان بیش تری را نشان داد.



شکل ۳- تغییرات ژن های *TYDC* و *COR* در کالوس *P. bracteatum* تیمار شده با الیستور سالیسیلیک اسید در بالاترین (طوسی) و پایین ترین (مشکی) سطح آلكالوئید مورفین.



شکل ۴- تغییرات ژن های *TYDC* و *COR* در کالوس *P. bracteatum* تیمار شده با الیستور متیل جاسمونات در بالاترین (طوسی) و پایین ترین (مشکی) سطح آلكالوئید مورفین.

استفاده از الیستورهای زیستی و غیرزیستی، سبب افزایش تجمع متابولیت های ثانویه در بسیاری از گیاهان دارویی شده است (Bota and Deliu, 2012; Hao et al. 2012; Yamaner et al. 2013). متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در مطالعات زیادی به عنوان الیستور بر روی گیاهان متفاوت اعمال شده اند ( Mehrabani et al. 2014; Samadi et al. 2014; Zare et al. 2012; al. 2011). با وجودی که در اکثر مطالعات، تبائین به عنوان آلكالوئید اصلی در

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 الیستورها در کشت سوسپانسیون 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.

مورفین نقش دارند 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 تأثیر به‌سزایی در افزایش میزان مورفین نشان داده است. به طوری که بیشترین مقدار این آلکالوئید در اثر استفاده از الیستورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید زمانی حاصل شد که این ژن افزایش بیان داشته است و احتمالاً این ژن

#### منابع

Alkhimova EG, Adonin VI, Kunakh VA (1993) Production of medicinal alkaloids by *Papaver bracteatum* cultured cells. *Acta Horticulturae* 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, Srmit 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 physiology* 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 lipoxigenase 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 G.B (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 Koochi (*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

comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR Nucleic 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 latexifer 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 Rhee 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, Bihanta 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.