Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

# Evaluation of salicylic acid treatment on expression of some genes involving in morphine synthesis pathway in Opium Poppy (*Papaver Somniferum* L)

**Shokooh Hemati**

MSc. Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: shokooh.hemati@yahoo.com

**Ali Asghar Nasrollahnezhad Ghomi**

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: nasrollahnejad@gau.ac.ir.

**Ahad Yamchi**

Associate Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: yamchi@gau.ir.ac

**Seyedeh Sanaz Ramezanpour**

Associate Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: ramezanpours@gau.ac.ir

## *Abstract*

**Objective**

The present study was performed to investigate the effect of salicylic acid at different times on the expression of three genes involved in the morphine production end pathway (T6ODM, COR and CODM) in Opium Poppy capsules. It should be noted that these genes play an important role in the production of morphine as a medicinal alkaloid.

**Materials and methods**

Seeds of *Papaver Somniferum* were grown in pots under greenhouse conditions. When the plants reached the flowering stage, two to three days after the petals fell; a superficial scratch was created in the plant capsule and then treated with salicylic acid at a concentration of 50 µM. Capsule sampling was performed at three times zero (a few minutes after spraying salicylic acid solution on the capsule), three and 12 hours after salicylic acid treatment, compared to the control plant.

RNA was extracted from the capsule samples, followed by cDNA, and finally the results obtained by qRT-PCR were analyzed using GenEX software.

**Results**

The results of this study showed that with increasing the time after treatment of the capsules with salicylic acid, the expression level of all three genes decreased compared to the control plant. The expression of T6ODM gene at zero time increased about 1.84 times the expression of gene compared to the control plant, but the expression of this gene at 3 and 12 hours decreased by 46% and 21%, respectively, compared to the gene expression in the control plant. The results also showed that the expression of COR gene increased by about 1.26 times in zero hours compared to the control plant and decreased by 15% in three hours and by almost 30% in 12 hours compared to the control plant. . The expression level of CODM gene at zero hours was almost equal to that of the control plant and at three and 12 hours their expression level was almost zero. Also, the graphs related to T6ODM, CODM and COR genes showed that there is a significant difference in terms of gene expression between different times in each gene.

**Conclusions**

It is generally inferred that salicylic acid treatment reduces the expression of the three end genes involved in the morphine production pathway by increasing the time from zero hours to 12 hours.

**Keywords:** Salicylic acid, Morphine, T6ODM gene, COR gene, CODM gene.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation** Hemati SH, Nasrollahnezhad Ghomi AA, Yamchi A, Ramezanpour SS (2021) Evaluation of salicylic acid treatment on expression of some genes involving in morphine synthesis pathway in Opium Poppy (*Papaver Somniferum* L). *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (2), 45-60.

*Agricultural Biotechnology Journal* 13 (2), 45-60. DOI: 10.22103/jab.2021.15464.1204

Received: April 17, 2021. Accepted: May 31, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

# بررسی تاثیر اسید سالیسیلیک بر بیان برخی ژن‌های مسیر سنتز مورفین در خشخاش (*Papaver somniferum* L)

**شکوه همتی**

دانش آموخته بیوتکنولوژی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: shokooh.hemati@yahoo.com

**علی اصغر نصراله نژاد قمی**

*نویسنده مسئول : استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولیدگیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. تلفن: ۰۹۱۸۸۴۱۲۸۹۶، گرگان، ایران، رایانامه: nasrollahnejad@gau.ac.ir

**احد یامچی**

داد شیار گروه ا صلاح نباتات و بیوتکنولوژی، داد شکده تولیدگیاهی، داد شگاه علوم ک شاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: yamchi@gau.ir.ac

**سیده ساناز رمضانپور**

دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولیدگیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: ramezanpours@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۰

## چکیده

**هدف:** پژوهش حا ضر به منظور برر سی تاثیر ا سید سالیسیلیک در زمان‌های مختلف بر بیان سه ژن درگیر در مسیر انتهایی تولید مورفین (T6ODM، COR و CODM) در کپسول انجام گرفت. لازم به ذکر است که این ژن‌ها در تولید مورفین به عنوان یک آلکالوئید دارویی نقش بسزایی دارند.

**مواد و روش‌ها:** بذرهای گونه‌ی *Papaver Somniferum* در شرایط گلخانه در گلدان‌ها ک شت شدند. زمانی که گیاهان به مرحله گلدهی رسیدند، دو تا سه روز پس از ریزش گلبرگ‌ها، خراشیدگی سطحی درکپسول گیاه ایجادگردید و سپس با اسید سالیسیلیک در غلظت ۵۰ میکرو مولار تیمار شدند. نمونه گیری از کپسول ها در سه زمان صفر (چند دقیقه پس از پاشیدن محلول

اسید سالیسیلیک بر روی کپسول)، سه و ۱۲ ساعت بعد از تیمار کردن با اسید سالیسیلیک ، نسبت به گیاه شاهد انجام شد. از نمونه های کپسول RNA استخراج گردید و به دنبال آن cDNA ساخته شد و در نهایت نتایج به دست آمده از qRT-PCR با استفاده از نرم افزار GenEX مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش مدت زمان بعد از تیمارکردن کپسول ها با اسید سالیسیلیک، سطح بیان هر سه ژن نسبت به گیاه شاهد کاهش یافت. میزان بیان ژن T6ODM در زمان صفر ساعت حدود ۱/۸۴ برابر نسبت به میزان بیان آن در گیاه شاهد افزایش پیدا کرد. اما میزان بیان این ژن در زمان سه و ۱۲ساعت به ترتیب ۴۶درصد و ۲۱درصد نسبت به میزان بیان آن در گیاه شاهد کاهش نشان داد. همچنین نتایج نشان داد میزان بیان ژن COR در زمان صفر ساعت نسبت به گیاه شاهد حدود ۱/۲۶ برابر افزایش یافت و در زمان سه ساعت به میزان ۱۵درصد و در زمان ۱۲ ساعت تقریبا به میزان ۳۰ درصد نسبت مقدار بیان آن در گیاه شاهد کاهش یافت. میزان بیان ژن CODM در زمان صفر ساعت تقریبا معادل با گیاه شاهد بود و در زمان‌های سه و ۱۲ ساعت میزان بیان آن تقریبا نزدیک به صفر بود. همچنین نمودارهای مربوط به ژن‌های T6ODM، CODM و COR نشان دادند که از نظر بیان ژن بین زمان‌های مختلف در هر ژن اختلاف معنی داری وجود دارد.

**نتیجه‌گیری:** به طور کلی چنین استنباط می‌شود که تیمار اسید سالیسیلیک بیان سه ژن انتهایی درگیر در مسیر تولید مورفین را با افزایش زمان از صفر به ۱۲ ساعت کاهش می‌دهد.

**کلیدواژه‌ها: :** اسید سالیسیلیک ، مورفین، ژن T6ODM، ژن COR، ژن CODM.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** همتی شکوه، نصراله نژاد قمی علی اصغر، یامچی احد، رمضانپور سیده ساناز (۱۴۰۰) بررسی تاثیر اسید سالیسیلیک بر بیان برخی ژن‌های مسیر سنتز مورفین در خشخاش (*Papaver somniferum* L). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۲)، ۴۵-۶۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

## مقدمه

آلکالوئیدها گروه متنوعی از ترکیبات ازت‌دار با وزن مولکولی پایین هستند که در ۲۰ درصد از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند. فعالیت بیولوژیکی قوی برخی از آلکالوئیدها منجر به بهره برداری از آن‌ها به عنوان دارو، محرک، مواد مخدر و سموم شده است

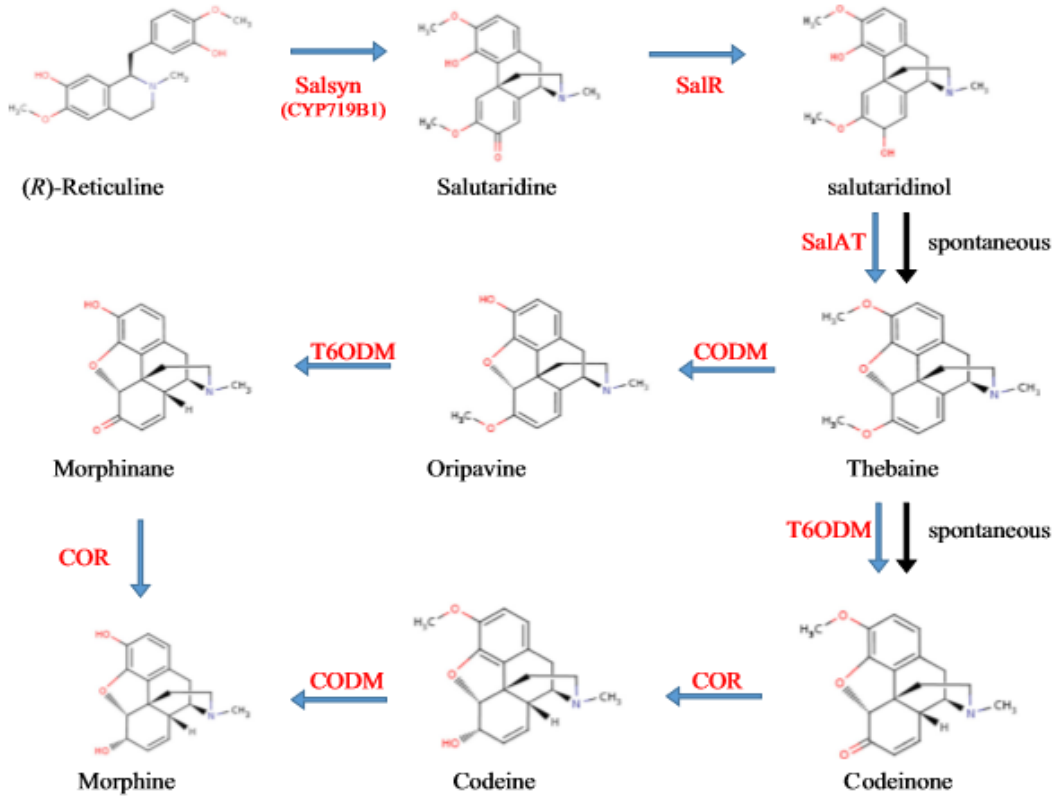
(Facchini 2001).آلکالوئیدهای بنزیل ایزووکوئینولین یکی دیگر از گروه‌های بزرگ محصولات طبیعی هستند که تقریبا ۲۵۰۰ ترکیب را شامل می‌شوند که عمدتا در خانواده Papaveraceae، Ranunculaceae، Berberiaceae و Menispermaceae یافت می‌شوند (van der Heijden 2004). تریاک، به عنوان لاتکس خشک شده کپسول نارس خشخاش، شامل بیش از ۸۰ آلکالوئید ایزوکوئینولین است. آلکالوئیدهای اصلی به دست آمده از تریاک مورفین (۴-۲۱ درصد) و به دنبال آن کدئین، تبائین، پاپاورین، نوسکاپین و نارسئین می‌باشند (Dewick 2002). کشت و کار خشخاش جهت تولید تجاری مورفین و کدئین بخش مهمی از چشم‌انداز کشاورزی در بسیاری از نقاط دنیا می‌باشد . اگرچه نزدیک به ۹۰ درصد از تولید جهانی خشخاش صرف تولید غیر قانونی مورفین جهت سنتز هروئین از طریق یک واکنش ساده اُ-اُ دی استیلاسیون می‌شود (Facchini and Park 2003). ساخت و تجمع آلکالوئیدها در اندام و سلول‌های خاصی در گیاه اتفاق می‌افتد. به طور کلی مورفین، نوسکاپین و پاپاورین آلکالوئیدهای فراوان در اندام‌های هوایی هستند، در حالی که سانگئونارین به طور معمول در ریشه تجمع می‌یابد (Facchini and DeLuca 1995). آلکالوئیدها در ریشه و سپس در مرحله گیاهچه و بعد از این مرحله در همه اندام‌های هوایی افزایش می‌یابند. اندازه گیری آلکالوئیدهای موجود در کپسول‌های جمع آوری شده از گیاه خشخاش نشان دهنده این است که آلکالوئیدهای مورفینان پس از ریزش گلبرگ‌ها در کپسول حضور پیدا می‌کنند (Shukla and Singh 2000). در خشخاش مورفین و کدئین بیشتر در اندام‌های هوایی به ویژه کپسول تجمع پیدا می‌کنند (Facchini et al. 2007).

مسیر مورفین (شکل ۱) در محل تبائین دو شاخه شده و اولین مرحله که در مسیر اصلی صورت می‌گیرد به وسیله‌ی تبائین ۶-اُ- دمتیلا[1] (T6ODM) کاتالیز شده و نئوپینون را تولید می‌کند. نئوپینون به صورت خود به خودی دچار بازآرایی شده و به کدئینون تبدیل می‌شود (Hagel and Facchini 2010). سپس کدئینون به وسیله‌ی یک آلدوکتوردوکتاز به نام کدئینون ردوکتاز[2] (COR) Unterlinner Kutchan (1999) به کدئین تبدیل شده و کدئین سپس توسط کدئین-اُ-دمتیلاز[3] (CODM) به مورفین تبدیل می‌شود. به‌طور جایگزین کدئین-اُ-دمتیلاز اولین مرحله در مسیر فرعی که شامل ۳-اُ- دمتیلاسیون تبائین به اوریپاوین است را کاتالیز می‌کند. سپس T6ODM اوریپاوین را به مورفینون تبدیل کرده که توسط COR به مورفین احیا می‌شود. خشخاش که در معرض آسیب‌های مکانیکی قرار گرفته، مورفین سریعا به بیس مورفین متابولیزه می‌شود. این ماده به دیواره سلولی الحاق می‌شود و نشان داده شده است که این امر می‌تواند باعث افزایش مقاومت به هیدرولیز به وسیله‌ی پکتیناز شود. بر اساس این نتایج یک نقش دفاعی را برای مورفین می‌توان پیشنهاد داد (Morimoto et al 2001). در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017).

[1]. Thebaine -6-O- demethylase
[2]. Codeinone reductase
[3]. Codeine -O- demethylase



Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500




**شکل ۱. مسیر متابولیکی آلکالوئیدهای مورفینان که مکان فعالیت آنزیم‌های Salsyn (CYP719B1)، SaLR، SaLAT، CODM، T6ODM و COR را نشان می‌دهد (adapted from Beaudoin and Facchini 2014; Hagel and Facchini 2010).**

**Figure 1. The metabolic pathway of morphinan alkaloids that illustrates the action sites of Salsyn (CYP719B1), SalR, SalAT, CODM, T6ODM and COR enzymes (adapted from Beaudoin and Facchini 2014; Hagel and Facchini 2010).**

ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه به طور هم زمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد ( Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چند بعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان

بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016).

اسید سالیسیلیک[۱] که یک ترکیب فنولی است، در واقع بنزوییک اسید تولید شده توسط گیاهان با نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده می‌باشد (Hayat and Ahmad 2007).اخیرا مطالعات بسیاری انجام شده که از این هورمون برای بررسی مسیرهای سیگنالیک سلولی و بیان ژن و بیوسنتز متابولیت ثانویه در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است (Chandra and Chandra 2011). در این مطالعه میزان بیان سه ژن کلیدی (T6ODM، CODM و COR) مسیر تولید مورفین در کپسول به عنوان اندامی که بیش‌ترین تجمع مورفین در آن وجود دارد تحت تاثیر اسید سالیسیلیک به عنوان تنش غیر زیستی با استفاده از تکنیک qRT- PCR[۲] گزارش می‌شود.

## مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق بذر گیاه خشخاش، گونه *Papaver. Somniferum* با شماره شناسایی P1006760 (رقم موجود) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. به منظور شکستن خواب بذر، بذرهای مورد نظر قبل از کشت به مدت ۲۴ ساعت در داخل پارچه‌ی مرطوب در یخچال نگهداری شد. کشت بذرها در گلدان‌ها با حجم‌های مساوی از خاک برگ، خاک باغچه و ماسه بادی در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در شرایط نور طبیعی و دمای ۲۰–۲۵ درجه سانتیگراد، انجام شد.

دو تا سه روز پس از ریزش گلبرگ‌ها، بر روی کپسول با پین استریل در هر میلی متر مربع از سطح جهت جلوگیری از ایجاد زخم عمیق در سطح کپسول خراشیدگی ایجاد شد. سپس کپسول گیاه با ۵۰ میکرو مولار اسید سالیسیلیک اسپری شد. برای تهیه محلول اسید سالیسیلیک، هفت میلی گرم پودر اسید سالیسیلیک (Sigma-Aldrich, s7401) در ۱۰۰ میکرو مولار اتانول ۹۵ درصد حل و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. برای نفوذ بیشتر محلول به گیاه، یک میلی مولار توین ۲۰ درصد به محلول مورد نظر اضافه شد. نمونه گیری از کپسول در سه زمان صفر ساعت، سه ساعت و دوازده ساعت انجام گرفت و همچنین نمونه گیری در هر زمان با شاهد مربوط به خود در همان زمان مقایسه گردید.

به منظور استخراج RNA از بافر p-BIOZOL شرکت BioFlux (توکیو، ژاپن) استفاده شد. برای تعیین کیفیت RNA از دستگاه اسپکتوفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید (شکل ۲). با توجه به کیفیت باند RNA از هر نمونه پنج میکرولیتر با DNAse تیمار و سنتز اولین رشته‌ی cDNA با آغازگر Oligo-dT بر اساس دستورالعمل شرکت فرمنتاز انجام شد

۱. Salicylic Acid

۲. Quantitative real-time polymerase chain reaction



Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

(شکل ۳). طراحی آغازگرها با نرم افزارهای Primer Quest و Prime 3 انجام شد. بررسی کیفیت آغازگرهای طراحی شده از طریق نرم افزارهای بر خط Oligo Analyze و Oligo Calculator انجام شد و اختصاصی بودن آعازگرها با نرم افزار بر خط Primer Blast مورد ارزیابی قرار گرفت(Hashemi and Naghavi 2015). نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در qRT-PCR به شرح زیر است (جدول ۱).

ریل تایم PCR در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر حاوی یک میکرولیتر cDNA رقیق شده، ۰/۲ میکرولیتر از هر آغازگر با استفاده از تکنولوژی رنگ سایبرگرین I و کیت سایبر بایو پارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران) در دستگاه iQ5 (شرکت بیورد، آمریکا) انجام شد. دمای مورد نیاز هر مرحله و تعداد چرخه‌ها به شرح زیر است (جدول ۲). نتایج حاصل از این مرحله به صورت نسبی ارزیابی شد. در این آزمایش ژن خانه دار بتا- اکتین[۱] به عنوان ژن کنترل داخلی جهت نرمال سازی نتایج استفاده شد. ارزش نرمال شده این نسبت با استفاده از روش ΔΔCT (دلتا دلتا CT) برای هر نمونه محاسبه شد. باتوجه به اینکه دستگاه عدد ΔΔCT را در اختیار قرار می‌دهد، با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta CT}$ اعداد به مقادیر مطلق بااستفاده از نرم افزار GenEX تبدیل شد و نمودار مربوط به بیان هر ژن در بافت کپسول توسط نرم افزار Excel رسم شد.

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از مطالعه بیان نسبی ژن T6ODM (شکل ۴) نسبت به شاهد نشان داد که این ژن در زمان صفر ساعت دارای بیشترین میزان بیان بوده و به میزان تقریبا ۱/۸۴ برابر نسبت به میزان بیان آن در گیاه شاهد افزایش پیدا کرد. میزان بیان این ژن تحت تیمار اسید سالیسیلیک با افزایش زمان تیمار به سه ساعت و ۱۲ ساعت، کاهش یافت. بیان این ژن در زمان سه ساعت به میزان ۴۶ درصد نسبت به میزان بیان آن در گیاه شاهد کاهش نشان داد. و کمترین میزان بیان آن در زمان ۱۲ ساعت بود که به میزان ۲۱ درصد نسبت به میزان بیان آن درگیاه شاهد کاهش نشان داد. همچنین نمودار نشان داد که از نظر بیان ژن T6ODM بین تمام زمان‌های مختلف، اختلاف معنی داری وجود دارد.

در مورد ژن COR (شکل ۵) بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به زمان صفر ساعت بود که به میزان ۱/۲۶ برابر نسبت به میزان بیان آن در گیاه شاهد افزایش نشان داد. ژن COR نیز تحت تیمار اسید سالیسیلیک با افزایش زمان تیمار از صفر ساعت به سه و ۱۲ ساعت در بافت کپسول کاهش بیان نشان داد. کمترین میزان بیان این ژن در زمان سه ساعت بود که به میزان ۱۵ درصد نسبت به میزان بیان آن در گیاه شاهد کاهش پیدا کرد.

[۱]. Beta Actin

**جدول ۱. اطلاعات و توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های تبائین ٦-آ- دمتیلاز (T6ODM)، کدئین آ- دمتیلاز (CODM)، کدئینون ردوکتاز (COR)** (Hashemi and Naghavi 2015)

**Table 1. Information and sequencing of primers regarding genes thebaine 6-*O*-demthylase (T6DM), codeine *O*-demthylase (CODM), codeinone reductase (COR)**

| نام آغازگر<br>Primer name | توالی آغازگر<br>Primer sequence | دمای ذوب °C<br>Melting point °C | طول محصول واکنش<br>Amplicone size (bp) |
|---|---|---|---|
| آغازگر رفت<br>T6ODM For | 5′ AAAACTCCCAGTGCCTCTCA 3′ | 58.4 | bp 124 |
| آغازگر برگشت<br>T6ODM Rev | 5′ ACCCTTAATCTCGGCTGCTT 3′ | 58.4 | |
| آغازگر رفت<br>CODM For | 5′ TTGTGCTTAAATTTCGTGGATGAC 3´ | 60.1 | bp 115 |
| آغازگر برگشت<br>CODM Rev | 5′ TGATTACATCACTTGACCCAAACAG 3′ | 62.5 | |
| آغازگر رفت<br>COR For | 5′ TTGATTGGGAACTAACGGCAGAAG 3′ | 63.5 | bp 102 |
| آغازگر برگشت<br>COR Rev | 5′TGAAAGGTCCAGTCGGTGATAACA 3′ | 63.5 | |
| آغازگر رفت<br>β-ACTIN For | 5′ TCTCAACCCAAAGGCTAATCG 3′ | 59.4 | 143bp |
| آغازگر برگشت<br>β-ACTIN Rev | ′5′ CCCCAGAATCCAAGACAATAC 3 | 59.4 | |

میزان بیان این ژن در زمان ۱۲ ساعت ۳۰ درصد نسبت به میزان بیان آن درگیاه شاهد کاهش یافت. همچنین نمودار نشان داد از نظر بیان ژن COR بین زمان‌های مختلف، اختلاف معنی داری وجود دارد. در بررسی میزان بیان ژن CODM (شکل ۶) در زمان صفر ساعت تحت تیمار اسید سالیسیلیک اختلاف معنی داری با شاهد مشاهده نشد و میزان آن تقریبا برابر ۱ بود که معادل با گیاه شاهد بود و بیان این ژن در زمان‌های سه ساعت و ۱۲ ساعت نزدیک به صفر بود . در مورد ژن CODM نیز میان تمامی زمان‌های مختلف، اختلاف معنی داری وجود دارد.

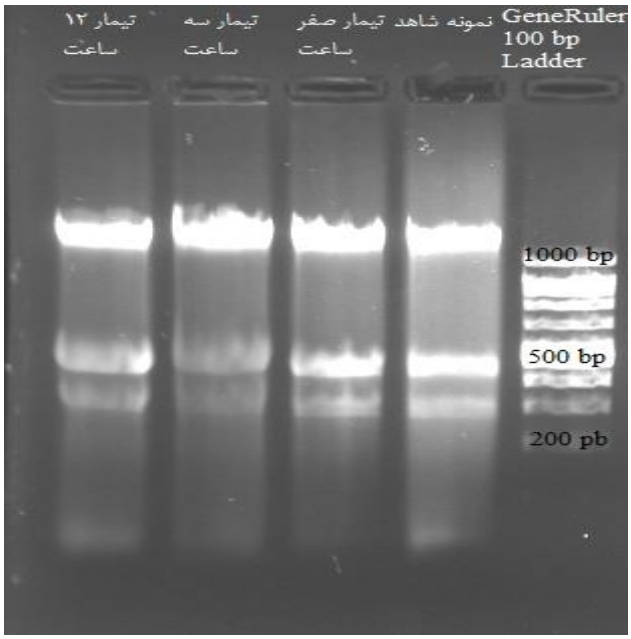


Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

**جدول ۲. چرخه حرارتی واکنش کمی زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی**

**Table 2. Thermal cycle Quantitative real-time polymerase chain reaction**

| مرحله Step | زمان (ثانیه) Time (s) | دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (℃) | تعداد چرخه Number of cycles |
|---|---|---|---|
| واسرشت Denaturation | 180 | 94 | 1 |
| واسرشت Denaturation | 10 | 94 | 40 |
| اتصال Annealing | 30 | 62 | 40 |
| تکثیر Extension | 30 | 72 | 40 |
| خوانش Read | 20 | 78 | 40 |

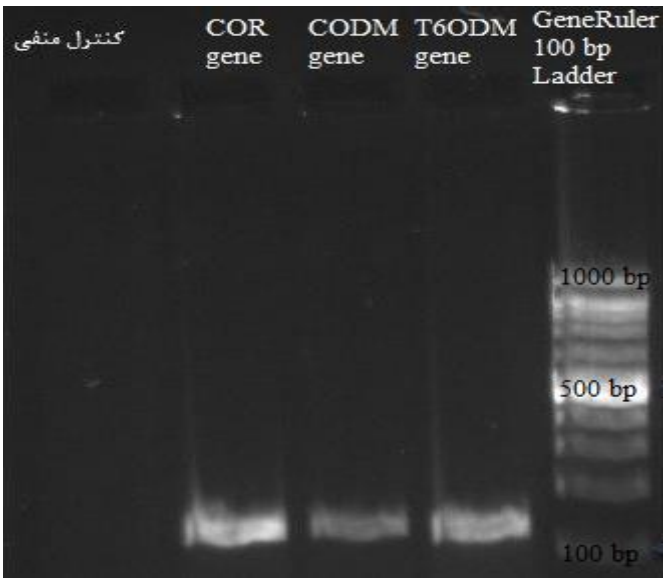



**شکل ۲. تصویر الکتروفورز RNA نمونه‌های کپسول گیاه خشخاش**

**Figure 2. RNA electrophoretic image of poppy capsule samples**

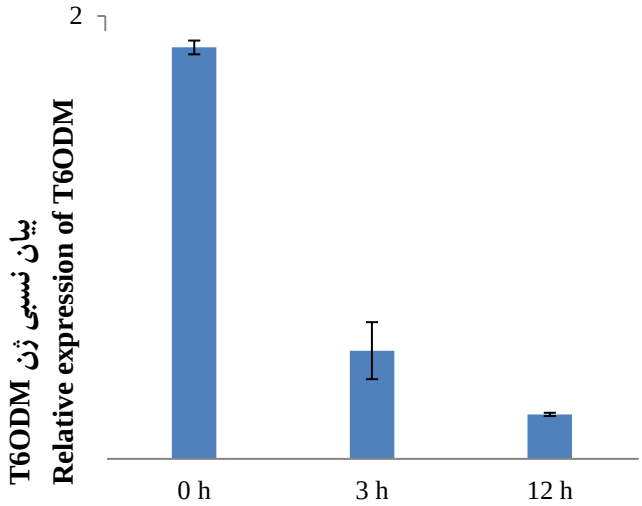
در این مطالعه بحث در مورد سه ژن انتهایی مهم مسیر تولید مورفین می‌باشد. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی به منظور شناخت و افزایش متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی انجام گرفته است (Sharma et al. 2013; Mora-Pale et al. 2014). آلکالوئیدهای مورفینان به دلیل فعالیت دارویی مورد توجه هستند. علاوه بر این به دلیل سمیت آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین تجمع این آلکالوئیدها محدود به سلول‌های خاصی به نام لاتیسیفر می‌باشد که در مجاورت عناصر غربالی وجود دارند (Le Flem-Bonhomme et al. 2004; Liscombe and Facchini 2008). از آنجا که تولید این آلکالوئیدها در سلول‌های خاصی اتفاق می‌افتد (Chandra and Chandra 2011)، بنابراین اعمال تنش‌های غیر زیستی می‌تواند به عنوان یک

روش کاربردی برای افزایش بیان ژن‌های تولید کننده آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین به منظور افزایش این آلکالوئیدها مورد استفاده قرار گیرد.




**شکل ۳. الگوی باندی حاصل از تکثیر cDNA با استفاده از جفت آغازگر *ACTIN***

**Figure 3. The banding pattern generated by cDNA replication using the *ACTIN* primer pairs**

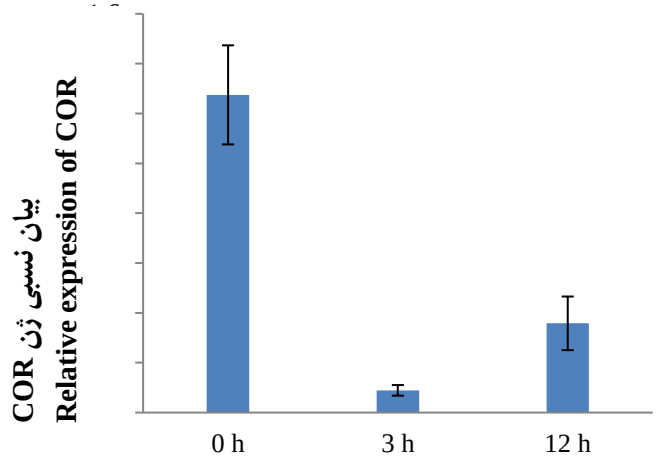



**شکل ٤. روند تغییرات بیان نسبی ژن T6ODM در نمونه کپسول خشخاش تیمار شده با اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد در زمان‌های مختلف**

**Figure 4. Trends in the expression of T6ODM in opium poppy capsule under salicylic acid treatment**

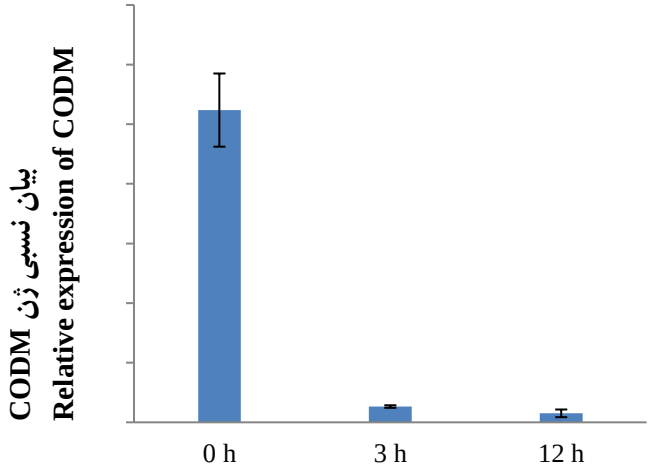


Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500




**شکل ۵. روند تغییرات نسبی بیان ژن COR در نمونه کپسول خشخاش تیمار شده با اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد در زمان‌های مختلف**

**Figure 5. Trends in the expression of COR in opium poppy capsule under salicylic acid treatment**




**شکل ٦. روند تغییرات نسبی بیان ژن CODM در نمونه کپسول خشخاش تیمار شده با اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد در زمان‌های مختلف**

**Figure 6. Trends in the expression of CODM in opium poppy capsule under salicylic acid treatment**

در مطالعه‌ای که توسط Hashemi and Naghavi (2015) انجام گرفت نشان داده شد که اسید سالیسیلیک در تجمع آلکالوئیدهای مورفینان در کشت ریشه مویین *Papaver orientale* در دوره‌های زمانی مختلف موثر است. به علاوه آن‌ها نشان دادند که میزان بیان ژن‌های تولید کننده این آلکالوئیدها در دوره‌های زمانی کوتاه تر پایین است. همچنین Sharifzadeh Naeini

.et al (2020) نشان دادند که تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین با استفاده از اسید سالیسیلیک در کشت ریشه مویین *Papaver armeniacum* افزایش پیدا کرد.

ژن‌های T6ODM، COR و CODM در گیاه خشخاش شناسایی شده‌اند که در بیوسنتز مورفین نقش اساسی دارند (Beaudoin and Facchini 2014). علاوه بر این در فرآیند اعمال تنش‌های غیر زیستی زمان تیمار و همچنین نوع بافت بر بیان بر بیان ژن تاثیر گذار است (Chong et al. 2005). بنابراین در پژوهش حاضر اثر اسید سالیسیک به عنوان تنش غیر زستی بر بیان ژن‌های T6ODM، COR و CODM در کپسول خشخاش و در دورهای زمانی مختلف (صفر، سه و ۱۲ ساعت) در غلظت یکسان از این هورمون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پژوهش حاضر نشان دادکه اسید سالیسیلیک بیان ژن T6ODM را با افزایش زمان از صفر به ۱۲ ساعت کاهش داد. نتایج آزمایش انجام شده توسط Hashemi and Naghavi (2015) نشان داد که بیان ژن T6ODM در زمان شش و ۱۲ ساعت تحت تیمار اسید سالیسیلیک افزایش بیان چشمگیری نداشته است. که با نتایج ما مطابقت داشت. همچنین .Sharifzadeh Naeini et al (2020) نشان دادند که اسید سالیسیلیک اثر مثبتی بر بیان ژن T6ODM در زمان‌های بیشتر از ۱۲ ساعت پس از تیمار داشت. در پژوهش حاضر نیز میزان بیان ژن CODM با فزایش زمان تیمار از صفر به ۱۲ ساعت کاهش نشان داد. همچنین Hashemi and Naghavi (2015) نشان دادند که میزان بیان این ژن در زمان‌های کمتر از ۲۴ ساعت یعنی شش و ۱۲ ساعت در کشت ریشه مویین P. orientale افزایش چشمگیری نداشت و تجمع کدئین نیز با افزایش دوره زمانی تیمار در این گیاه کاهش یافت. که این ممکن است به دلیل فعالیت کم آنزیم CODM یا میزان بیان کم ژن CODM در زمان بالاتر باشد. بیان بالای ژن CODM می‌تواند تبدیل تبائین و کدئین (به عنوان پیش ماده) به مورفین را افزایش دهد. علاوه بر این بیان بالای ژن COR می‌تواند تجمع کدئین و مورفین را افزایش دهد ( ;Allen et al. 2007 Larkin et al. 2007). نتیجه پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن COR نیز با افزایش زمان از صفر به ۱۲ ساعت کاهش پیدا کرد. به علاوه Hashemi and Naghavi (2015) نشان دادند که میزان بیان این ژن در زمان‌های کمتر از ۲۴ ساعت یعنی شش و ۱۲ ساعت در *P. orientale* پایین است. که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت.

طبق نتایج گزارش شده در پژوهش حاضر اسید سالیسیلیک تاثیر بسیار کمی بر بیان ژن‌های مورد مطالعه در زمان‌های انتخاب شده داشت. بسیاری از ژن‌ها در دوره طولانی‌تر (۲۴ و ۴۸ ساعت) پس از تیمار با اسید سالیسیلیک افزایش بیان پیدا می‌کنند (Hashemi and Naghavi 2015). به طور کلی توانایی سنتز یک متابولیت خاص مانند مورفین به تکامل چندین آنزیم بیوسنتزی از طریق افزایش رونویسی ژن‌های تکثیر شده توسط این آنزیم‌ها در ژنوم بستگی دارد (Pichersky and Lewinsohn 2011).

**نتیجه‌گیری:** در پژوهش حاضر اثر اسید سالیسیلیک بر بیان سه ژن انتهایی مسیر تولید مورفین مورد بررسی قرار گرفت. اهمیت این ژن‌ها در خشخاش بیشتر به لحاظ تولید ترکیبات آلکالوئیدی که به عنوان ترکیبات دارویی در این گیاهان شناخته شده‌اند، می‌باشد. نتایج تحقیق حاضرنشان داد که میزان بیان این سه ژن کاهش پیدا کرد. بنابراین مطالعات دیگر با در نظر گرفتن زمان‌های بیشتر جهت شناخت بهتر اسید سالیسیلیک بر روی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز مورفین می‌تواند صورت گیرد. در

زمان‌های طولانی‌تر یعنی ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز بیان این ژن‌ها را مورد بررسی قرار داد. این نتایج برای مهندسی مولکولی مسیر تولید مورفین و تولید آلکالوئیدهای مورفینان با استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژی برای گیاه خشخاش مفید خواهد بود.

**سپا سگزاری:** از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی کشور در تهران بخاطر همکاری در ارسال بذر خشخاش تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

احسنی محمدرضا ، محمدآبادی محمدرضا ، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۱-۱۶۷.

## References

Allen RS, Miller JAC, Chitty JA, et al. (2007) Metabolic engineering of morphinan alkaloids by overexpression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in opium poppy. Plant Biotechnol J 6, 22–30.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M, et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. Iran J Appl Anim Sci 9, 635-642.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

Beaudoin GAW, Facchini PJ (2014) Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. Planta 240, 19–32.

Chandra S, Chandra R (2011) Engineering secondary metabolite production in hairy roots. Phytochem Rev 10, 371–395.

Chong TM, Abdullah MA, Lai OM et al. (2005) Effective elicitation factors in Morinda elliptica cell suspension culture. Process Biochem 40, 3397–3405.

Facchini PJ, Hagel JM, Liscombe DK, et al. (2007) Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory. Phytochem Rev 6, 97–124.

Dewick PM (2002) Medicinal natural products: a biosynthetic approach, 2nd. Wiley, Chichester.

Facchini PJ, Park SU (2003) Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. Phytochem 64, 177-186

Facchini PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. Annu Rev Plant Physiol 52, 29-66.

Facchini PJ, DeLuca V (1995) Phloemspecific expression of tyrosine/dopa decarboxylase and isoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. Plant Cell 7, 1811 - 21.

Hagel JM, Facchini PJ (2010) Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. Nat Chem Biol 6, 273–275.

Hashemi SM, Naghavi MR (2015) Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. Plant Cell, Tiss Org Culture 125(1), 31-41.

Hayat S, Ahmad A (2007) Salicylic asid: A Plant Hormone. Department of Botany Aligarh Muslim University Aligarh 202002, India Pp, 4-11.

Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4, 119-132 (In Persian).

Larkin PJ, Miller JAC, Allen RS et al (2007) Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic Papaver somniferum. Plant Biotechnol J 5, 26–37.

Le Flem-Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Fliniaux MA (2004) Hairy root induction of Papaver somniferum var. album, a difficult-totransform plant, by A. rhizogenes LBA 9402. Planta 218, 890–893.

Liscombe DK, Facchini PJ (2008) Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. Curr Opin Biotechnol 19, 173–180.

Mora-Pale M, Sanchez-Rodriguez SP, Linhardt RJ et al (2014) Biochemical strategies for enhancing the in vivo production of natural products with pharmaceutical potential. Curr Opin Biotechnol 25, 86–94.

Mohammadabadi MR (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 12 (4), 167-181 (In Persian).

Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 12 (1), 177-192 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (in Persian).

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Morimoto S, Suemori k, Moriwaki j et al. (2001) Morphine Metabolism in the Opium Poppy and Its Possible Physiological Function. The J Biol Chem 276, 38179–38184.

Pichersky E, Lewinsohn E (2011) Convergent evolution in plant specialized metabolism. Annu Rev Plant Biol 62, 549–566.

Sharma P, Padh H, Shrivastava N (2013) Hairy root cultures: a suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. Eng Life Sci 13, 62–75.

Sharifzadeh Naeini M, Naghavi MR, Bihamta MR et al. (2020) Production of some benzylisoquinoline alkaloids in *Papaver armeniacum* L. hairy root cultures elicited with salicylic acid and methyl jasmonate. Plant Tissue Cult.

Shukla S, Singh SP ( 2000) Alkaloid profile in relation to different developmental stages of *Papaver somniferum* L. Phyton (Horn, Austria) 41(1), 87-96.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, et al. (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50.

Unterlinner B, Lenz R, Kutchan TM (1999) Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. Plant J, 18, 465–745.

Van der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijer W et al. (2004) The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. Curr Med Chem 11, 607–628.