

## بررسی ارتباط بین بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آلکالوئیدهای مورفینان با متابولیت‌های متناظر در *Papaver somniferum*

### Study the expression of genes involved in morphinan alkaloids biosynthesis and corresponding metabolites in *Papaver somniferum*

مهدی رضایی<sup>۱</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۱\*</sup>، عبدالهادی حسین‌زاده<sup>۱</sup>، علیرضا عباسی<sup>۱</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیاران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

Rezaei M<sup>1</sup>, Naghavi MR<sup>\*1</sup>, Hosseinzade AH<sup>1</sup>, Abbasi AR<sup>1</sup>

1- PhD Student, Professor, Associate Professors, University College of Agriculture and  
Natural Resources, University of Tehran

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

#### چکیده

تجزیه ترکیبی پروفیل رونوشت‌ها و متابولیت‌ها می‌تواند ابزاری ارزشمند برای شناسایی ژن‌های کاندیدای دخیل در تغییر ترکیب متابولیتی در یک سیستم بیولوژیکی باشد. درک و فهم کلی درباره رفتار یک سیستم پیچیده امکان ردیابی و پیگیری دقیق پاسخ یک موجود به شرایط محیطی و درونی را در سطوح مختلف مولکولی و ژنتیکی فراهم می‌آورد. در این تحقیق جهت بررسی ارتباط میان میزان بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های *T6ODM*، *CODM* و *COR* و میزان متابولیت‌های کدئین و مورفین به-عنوان محصولات متناظر با آن‌ها و تبیین به‌عنوان پیش‌ساز مسیر در قسمت‌های مختلف گیاه بالغ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه‌ی بیان نسبی ژن *T6ODM* با استفاده از qRT-PCR نشان داد این ژن در ریشه دارای کم‌ترین میزان بیان و در قسمت بالای ساقه دارای بیش‌ترین میزان بیان بوده است. در مورد ژن *CODM* بیش‌ترین میزان بیان مربوط به برگ و همانند ژن *T6ODM* کم‌ترین میزان بیان مربوط به ریشه بود. ژن *COR* بیش‌ترین بیان را در بالای ساقه و کم‌ترین میزان بیان را در برگ نشان داد. در مورد تبیین بیش‌ترین مقدار در ریشه و کم‌ترین مقدار در برگ مشاهده شد. به‌طور جالب توجهی کدئین و مورفین در ریشه‌ی گیاه شناسایی نشدند. بیش‌ترین میزان کدئین و مورفین در کپسول گیاه مشاهده شد. علی‌رغم وجود هماهنگی در میزان آلکالوئیدهای اندازه‌گیری شده در قسمت‌های مختلف گیاه، میان میزان رونوشت‌ها و میزان آلکالوئیدها در قسمت‌های مختلف گیاه تنظیم هماهنگی دیده نمی‌شود. به طوری که اگرچه میزان آلکالوئیدهای کدئین و مورفین در کپسول گیاه نسبت به بقیه بخش‌ها زیادتر بود ولی میزان رونوشت‌های ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بیوسنتزی تبدیل‌کننده تبیین به کدئین و مورفین در کپسول بیش‌ترین مقدار را نداشت. بنابراین می‌توان گفت که احتمالاً عوامل مولکولی، بیوشیمیایی و سلولی دیگری به غیر از سطح رونوشت بر تجمع تولیدات متابولیتی در بافت‌های خاص تأثیر گذار می‌باشند.

#### واژه‌های کلیدی

آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین

بیان ژن

تبیین

کدئین

مورفین

## مقدمه

آلکالوئیدها، گروه بسیار متنوعی از ترکیبات دارای وزن مولکولی پایین هستند که دارای یک نیتروژن بر روی حلقه‌ی هتروسیکلیک خود می‌باشند. تخمین زده می‌شود که گیاهان حدود ۱۲۰۰۰ نوع مختلف آلکالوئید تولید می‌کنند و این آلکالوئیدها طبق ساختارهای اسکلت کربنی‌شان به گروه‌هایی تقسیم‌بندی می‌شوند. آلکالوئیدها تقریباً در ۲۰ درصد گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند (Ziegler and Facchini 2008).

یکی از مهم‌ترین گروه‌های آلکالوئیدی، آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین بوده که گروه بزرگ و بسیار متنوعی از ترکیبات طبیعی شامل بیش از ۲۵۰۰ ساختار مشخص و تعریف شده می‌باشند. این آلکالوئیدها در خانواده‌های Papaveraceae, Ranunculaceae, Berberiaceae, Menispermaceae و Fumariaceae تولید می‌شوند (Facchini 2001). خشخاش افیونی (*P. somniferum*) بیش از ۱۰۰ نوع مختلف از آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین را تولید می‌نماید که بسیاری از آنها مانند مورفین و کدئین (فروشاننده‌های درد)، پاپاورین و (+) توبوکورارین (آرامبخش ماهیچه‌ای)، نوسکاپین (داروی ضد سرفه و تومور) و سنگوئینارین (عامل ضد میکروبی) از لحاظ دارویی دارای اهمیت می‌باشند (Hagel and Facchini 2013). کشت و کار خشخاش افیونی 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 افیونی صرف تولید غیر قانونی مورفین جهت سنتز هروئین از طریق یک واکنش ساده ی ا-دی استیلاسیون می‌شود (Facchini and Park 2003).

بسته به کموتایپ مورد مطالعه فراوانترین آلکالوئیدها در شیرابه خشخاش افیونی، مورفین، کدئین و تبائین (مورفینان)، نوسکاپین (فتالید ایزوکوئینولین) و پاپاورین (بنزیل ایزوکوئینولین) هستند. در مقابل فراوانترین آلکالوئیدها در ریشه، سنگوئینارین و دی هیدروسنگوئینارین (بنزو فنانتیریدین) می‌باشند (Frick et al. 2005).

بیوستز بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها با تبدیل تیروزین به دوپامین و ۴- هیدروکسی فنیل استالدئید (با شبکه‌ای از

دکربوکسیلاسیون، اورتو هیدروکسیلاسیون و دامیناسیون) آغاز می‌شود. تیروزین دکربوکسیلاز، تیروزین و دهیدروکسی فنیل آلانین را به آمین‌های مشابه خود تبدیل می‌کند. دوپامین و ۴- هیدروکسی فنیل استالدئید توسط نورکوکالارین سینتاز (NCS) با هم ترکیب شده تا اس- نورکوکالارین (پیش ماده مرکزی برای همه بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها در گیاهان) را تولید کند. تمام ۲۵۰۰ آلکالوئید بنزیل ایزوکوئینولین، از حد واسط مرکزی اس- نورکوکالارین عبور می‌کنند. اس- نورکوکالارین با همکاری ۶-ا- متیل ترانسفراز (6OMT)، ان- متیل ترانسفراز (CNMT)، یک P450 هیدروکسیلاز (CYP80B1) و ۴-ا- متیل ترانسفراز (4OMT) به اس-رتیکولین تبدیل می‌شود. هیدروکسیلاسیون حلقه آروماتیک شرکت کننده در تبدیل اس نورکوکالارین به اس رتیکولین توسط مونواکسیژناز وابسته به P450 (CYP80B1) کاتالیز شده و در آن اس-ان- متیل کوکالارین به اس-هیدروکسی-ان-متیل کوکالارین تبدیل می‌شود (Facchini et al. 1996a).

رتیکولین یک نقطه انشعابی بین مسیرهای مورفین و سنگوئینارین می‌باشد (Allen et al. 2004). واسطه‌های اس رتیکولین نیز به عنوان پیش ماده‌هایی برای بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدهای دایمر انجام وظیفه می‌کنند. بیشتر تحقیقات بر مسیرهای انشعابی منتهی-شونده به آلکالوئیدهای بنزوفنانتیریدین (مانند سنگوئینارین)، پروتوبربرین (مانند بربرین) و مورفینان (مانند تبائین مورفین و کدئین) متمرکز شده است. اولین مرحله برای بیوستز آلکالوئید های بنزوفنانتیریدین و پروتوبربرین شامل تبدیل اس رتیکولین به اس اسکولرین می‌باشد که توسط آنزیم Berberine (BBE) Bridge Enzyme صورت می‌گیرد (Facchini et al. 1996a). بیوستز آلکالوئید بنزوفنانتیریدینی سنگوئینارین، نیازمند تبدیل اس اسکولرین به اس استیلوپین است. در انتهای این شاخه، اکسیداسیون دی هیدروسنگوئینارین به سنگوئینارین توسط Dihydro Benzophenanthridine Oxidase (DBOX) که یک آنزیم سیتوزولی می‌باشد صورت می‌گیرد (Facchini et al. 1996a).

در مسیر انشعابی آلکالوئیدهای مورفینان، آنزیم سیتوزولی salutaridine: NADPH 7-oxidoreductase (SOR) موجود در خشخاش افیونی و *P. bracteatum*، سالوتاریدین را به ۷-اس-

## مواد و روش‌ها

## مواد گیاهی

بذرهای *P. somniferum* از یک کموتایپ محلی در استان فارس تهیه شد. بستر مورد استفاده برای کشت بذرها شامل ۴۰ درصد پرلیت، ۴۰ درصد کوکوپیت و ۲۰ درصد خاک رس بود. بذرها بر روی بستر اشباع از آب کشت و آبیاری آن‌ها هر هفته یک بار انجام شد.

## نمونه برداری

نمونه برداری از گیاهان بالغ در تاریخ دهم فروردین ماه سال ۱۳۹۲ انجام شد. نمونه‌های گیاهی بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

## استخراج RNA و ساخت رشته اول cDNA

برای استخراج RNA از شیوه‌ی ادغام کردن استفاده شد به طوری که مقدار تقریباً یکسان از هر کدام از قسمت‌های مورد مطالعه‌ی پنج گیاه بالغ توزین و در ازت مایع کوبیده شدند. مقداری از پودر همگن شده برای استخراج RNA و مابقی جهت استخراج آلکالوئید مورد استفاده قرار گرفت. قسمت‌های مورد مطالعه شامل ریشه (سه سانتی‌متر انتهایی)، قسمت پایین ساقه (دو سانتی‌متر بالاتر از طوقه)، برگ (دو برگ انتهایی)، بالای ساقه (دو سانتی‌متر زیر کپسول)، کپسول و محتویات درون کپسول بودند. استخراج با استفاده از محلول استخراج P-BIOZOL و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (BIO FLUX) انجام شد. سپس تیمار با آنزیم DNase طبق دستورالعمل شرکت Fermentas برای حذف آلودگی احتمالی به DNA ژنومی صورت گرفت. ساخت رشته اول cDNA با استفاده از آغازگرهای الیگو dT و آنزیم رونوشت بردار معکوس ساخت شرکت Fermentas انجام شد.

## طراحی آغازگرها

ابتدا توالی‌های کدکننده‌ی ژن‌های *T6ODM*، *CODM* و *COR* از پایگاه اطلاعاتی NCBI کسب و طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای برخط Primer Quest و Primer 3 انجام شد. در مورد هر کدام از ژن‌ها، آغازگرهای پیشنهادی با استفاده از نرم‌افزارهای برخط Oligo Analyzer و Oligo Calculator از نظر دارا بودن ویژگی‌های مهم (Dimer-Self, Hairpin و Hetero-Dimer) آزمون شدند و بهترین جفت آغازگر جهت اطمینان از

سالوتاریدینول احیا می‌کند. تبدیل ۷ اس سالوتاریدینول به تبائین با آنزیم acetyl coenzyme A:salutaridinol-7-O- (SAT) acetyltransferase کاتالیز می‌شود. تبائین در صنایع داروسازی به آسانی قابلیت تبدیل به کدئین را دارد. کدئینون از تبائین تولید شده و پس از احیا به کدئین، برای تولید مورفین متیل‌زدایی می‌شود (Facchini et al. 1996a). تبدیل تبائین به مورفین از دو مسیر مجزا صورت می‌گیرد. در مسیر اول تبائین توسط آنزیم thebaine-6-O-demethylase (T6ODM) به نئوپینون تبدیل شده و سپس نئوپینون به طور خودبخودی به کدئینون تبدیل می‌شود. آنزیم codeinone reductase (COR) کدئینون را به کدئین تبدیل کرده و متعاقباً کدئین توسط آنزیم codeine-O-demethylase (CODM) به مورفین تبدیل می‌شود. در مسیر دوم، تبائین توسط آنزیم codeine-O-demethylase (CODM) به اورپیاوین تبدیل شده و این ماده توسط thebaine-6-O-demethylase (T6ODM) به مورفینون تبدیل می‌شود. سپس در مرحله‌ی آخر مورفینون توسط codeinone reductase (COR) به مورفین تبدیل می‌شود (Hagel and Fucchini 2010).

تجزیه ترکیبی پروفیل رونوشت‌ها و متابولیت‌ها می‌تواند ابزاری ارزشمند برای شناسایی ژن‌های کاندیدای دخیل در تغییر ترکیب متابولیتی در یک سیستم بیولوژیکی باشد. درک و فهم کلی درباره‌ی رفتار یک سیستم پیچیده امکان ردیابی و پیگیری دقیق پاسخ یک موجود به شرایط محیطی و درونی را در سطوح مختلف مولکولی و ژنتیکی فراهم می‌آورد (Urbanczyk et al. 2003). در دسترس بودن منابع متابولومیکسی و ژنومیکسی مختص به گونه‌ها فرصت جدیدی را برای پژوهش بر روی بیوسنتز و تنظیم متابولیسم آلکالوئید در خشخاش افیونی به وجود آورده است (Zulak et al. 2007).

در مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی ارتباط میان میزان بیان ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های *T6ODM*، *CODM* و *COR* و میزان متابولیت‌های کدئین و مورفین به عنوان محصولات متناظر با آن‌ها و تبائین به عنوان پیش‌ساز مسیر در قسمت‌های مختلف گیاه بالغ مورد بررسی قرار گرفت.

رائش (دریفت) تشکیل شده که توسط یک شبکه به نام شاتر گرید از هم جدا شده‌اند. نمونه مورد تجزیه پس از تبخیر به همراه گاز حامل وارد ناحیه یونش شده و در آنجا با استفاده از ولتاژ بالا باردار می‌شود. یون‌ها به دلیل وجود میدان الکتریکی به سمت کلکتور حرکت می‌کنند اما شاتر گرید مانع نفوذ آن‌ها به ناحیه رائش می‌شود. شاتر گرید از دو سری نوار فلزی موازی با هم تشکیل شده‌است که با اعمال یک پالس الکتریکی به آنها در یک لحظه کوتاه باز شده و دسته‌ای از یون‌ها به ناحیه رائش وارد می‌شوند. یون‌ها در ناحیه رائش تحت میدان الکتریکی به سمت کلکتور حرکت می‌کنند. یون‌های سبک و کوچک سریع‌تر حرکت کرده و زودتر به کلکتور می‌رسند اما یون‌های سنگین و حجیم دیرتر به کلکتور می‌رسند. بدین ترتیب یون‌های مختلف در طی حرکت از هم جدا می‌شوند. برخورد هر دسته از یون‌ها به کلکتور یک سیگنال الکتریکی ایجاد می‌کند که تقویت شده و بر حسب زمان رسم می‌شود. بدین ترتیب یک طیف تحرک یونی حاصل می‌شود که مشابه کروماتوگرام، محل هر قله نشان‌دهنده نوع ماده و شدت آن، متناسب با غلظت گونه است. اساس شناسایی مولکول‌ها در این تکنیک بر اندازه‌گیری سرعت حرکت یون‌ها در میدان الکتریکی استوار است. سرعت یون‌ها در میدان به خاصیت تحرک یونی بستگی دارد که خود تابع جرم، اندازه و شکل یون است.

استانداردهای مورفین، کدئین و تبائین از شرکت تولید مواد اولیه دارو پخش (تماد) تهیه شدند. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلف از استانداردها تهیه و یک میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌ها با سه تکرار به دستگاه تزریق شد. برای اندازه‌گیری آلکالوئیدها نیز یک میکرولیتر از مایع رویی با سه تکرار به دستگاه تزریق شد.

تجزیه‌ی داده‌ها

تجزیه‌ی داده‌های حاصل از بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 و بیان هر کدام از ژن‌ها نسبت به اندام برگ سنجیده شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری آلکالوئیدها با نرم‌افزار SAS 9.1.3 Portable مورد تجزیه قرار گرفتند. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد.

اختصاصی بودن برای ژن مورد نظر در نرم‌افزار بر خط Primer Blast مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده‌است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای انجام qRT-PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر (۵'-۳')
T6ODM-F	AAAACCTCCCAGTGCCTCTCA
T6ODM-R	ACCCTTAATCTCGGCTGCTT
CODM-F	TTGTGCTTAAATTTCTGGATGAC
CODM-R	TGATTACATCACTTGACCCAAACAG
COR-F	TTGATTGGGAACTAACGGCAGAAG
COR-R	TGAAAGGTCCAGTCGGTGATAACA

PCR زمان واقعی کمی

جهت انجام qRT-PCR از کیت شرکت Solis BioDyne که دارای رنگ فلئورسنت Eva Green است استفاده شد. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌ها و غلظت واکنشگرها طبق دستورالعمل شرکت سازنده تنظیم شد. واکنش‌ها در دستگاه Rotor-Gene 6000 ساخت شرکت Qiagen با سه تکرار تکنیکی انجام شد.

استخراج آلکالوئید

مابقی پودر گیاهی حاصل از پنج گیاه در شرایط خلا و سرما، خشک شد. سپس به ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر خشک شده گیاهی یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و تیوب‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به وسیله‌ی دستگاه سونیکاتور همگن شدند. نمونه‌های همگن شده برای مدت یک دقیقه با حداکثر سرعت ورتکس و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از مایع رویی برای اندازه‌گیری میزان آلکالوئیدها استفاده شد.

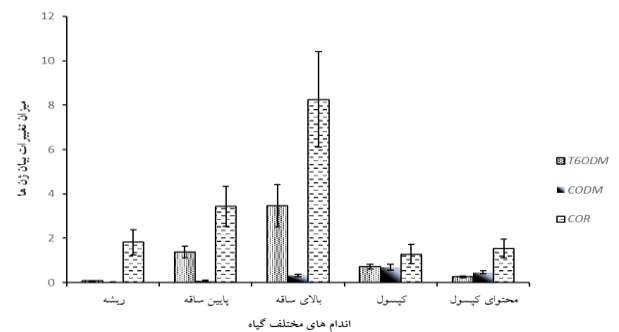
اندازه‌گیری آلکالوئیدها

به منظور اندازه‌گیری میزان آلکالوئیدها از دستگاه Ion Mobility Spectrometer-200 ساخت شرکت TOF Tech Pars استفاده شد.

اساس کار این دستگاه مشابه کروماتوگرافی گازی (GC) است با این تفاوت که نمونه تزریق شده به دستگاه پس از تبخیر یونیزه شده و سپس یون‌ها در یک ستون لوله‌ای حاوی گاز حرکت داده می‌شوند. یون‌ها با سرعت‌های متفاوت حرکت کرده و در راه از هم جدا می‌شوند. ستون از دو قسمت اصلی ناحیه یونش و ناحیه

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از مطالعه‌ی بیان نسبی ژن *T6ODM* (شکل ۱) نسبت به برگ نشان می‌دهد که این ژن در ریشه دارای کم‌ترین میزان بیان و در قسمت بالای ساقه دارای بیش‌ترین میزان بیان بوده‌است. همچنین نمودار نشان می‌دهد که از نظر بیان ژن *T6ODM* میان تمامی اندام‌ها اختلافات معنی‌داری وجود دارد. ترتیب میزان بیان نسبی ژن *T6ODM* از بیش‌ترین به کم‌ترین به صورت: بالای ساقه، پایین ساقه، برگ، کپسول، بذر و ریشه بود.



شکل ۱- میزان تغییرات بیان ژن‌های *T6ODM*، *CODM* و *COR* در اندام‌های ریشه، پایین ساقه، بالای ساقه، کپسول و محتوای کپسول در گیاه بالغ *P. somniferum* اندازه‌گیری شده به وسیله‌ی qRT-PCR. اندازه‌گیری‌ها نسبت به اندام برگ انجام شده‌اند. از ژن *ELF1a* به عنوان کنترل داخلی استفاده شده‌است.

در مورد ژن *CODM* (شکل ۱) بیش‌ترین میزان بیان مربوط به برگ و همانند ژن *T6ODM* کم‌ترین میزان بیان مربوط به ریشه بود. در مورد ژن *CODM* نیز میان تمامی بخش‌های گیاهی مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود داشت. ترتیب میزان بیان نسبی ژن *CODM* از بیش‌ترین به کم‌ترین به صورت برگ، کپسول، بذر، بالای ساقه، پایین ساقه و ریشه بود.

ژن *COR* (شکل ۱) بیش‌ترین بیان را در بالای ساقه و کم‌ترین میزان بیان را در برگ نشان داد. میان ریشه و پایین ساقه، ریشه و کپسول، ریشه و بذر و همچنین کپسول و بذر اختلاف معنی‌داری از نظر بیان ژن *COR* مشاهده نشد. ترتیب میزان بیان این ژن از بیش‌ترین به کم‌ترین به صورت بالای ساقه، پایین ساقه، ریشه، بذر، کپسول و برگ بود.

در مورد تبائین بیش‌ترین مقدار در ریشه (۸۴ میکروگرم در گرم وزن خشک) و کم‌ترین مقدار در برگ (۸/۱۵ میکروگرم در گرم وزن خشک) مشاهده شد (جدول ۲). از نظر میزان تبائین، تنها بین

قسمت بالای ساقه و کپسول اختلاف معنی‌داری دیده نشد. ترتیب میزان تبائین در قسمت‌های مختلف گیاه از بیش‌ترین به کم‌ترین مربوط به ریشه، کپسول، بالای ساقه، پایین ساقه، بذر و برگ بود.

جدول ۲- میزان آلکالوئیدهای اندازه‌گیری شده بر حسب میکروگرم در گرم وزن خشک

بخش گیاهی	تبائین	کدئین	مورفین
ریشه	۸۴/۰۳	۰	۰
پایین ساقه	۳۸/۸۴	۹۴/۰۸	۲۵۸/۲۰
برگ	۸/۱۴	۱۲۹/۱۹	۲۸۲/۶۴
بالای ساقه	۵۹/۱۷	۱۵۰/۰۶	۴۰۱/۶۰
کپسول	۶۷/۲۶	۱۸۷/۷۴	۴۳۰/۴۴
بذر	۲۶/۴۷	۶۷/۳۵	۳۰۱/۴۸

به طور جالب توجهی کدئین در ریشه‌ی گیاه شناسایی نشد (شکل ۲). برگ و پایین ساقه از نظر میزان کدئین دارای اختلاف معنی‌دار نبودند (شکل ۲). بیش‌ترین میزان کدئین در کپسول گیاه و معادل ۱۸۷/۷ میکروگرم در گرم وزن خشک بود (جدول ۲). ترتیب میزان کدئین از بیش‌ترین به کم‌ترین در قسمت‌های مختلف گیاه به صورت کپسول، بالای ساقه، برگ، پایین ساقه، بذر و ریشه بود (شکل ۲).

همانند کدئین، مورفین نیز در ریشه‌ی گیاه شناسایی نشد و همچنین بیش‌ترین میزان مورفین در کپسول گیاه (۴۳۰/۴۴ میکروگرم در گرم وزن خشک) مشاهده شد (جدول ۲). ترتیب میزان مورفین از بیش‌ترین به کم‌ترین در قسمت‌های مختلف گیاه تقریباً شبیه به کدئین و به صورت کپسول، بالای ساقه، بذر، برگ، پایین ساقه و ریشه بود (شکل ۲). از نظر میزان مورفین میان تمامی قسمت‌های گیاه اختلافات معنی‌داری وجود داشت (شکل ۲).

همان طور که در شکل ۲ دیده می‌شود درجه‌ی بالایی از هماهنگی میان میزان تبائین به عنوان پیش‌ساز کدئین و مورفین و میزان کدئین و مورفین در قسمت‌های مختلف گیاه وجود دارد. با توجه به نمودارهای بیان ژن‌های *T6ODM* و *CODM* به نظر می‌رسد که میزان بالای تبائین در ریشه و در عوض عدم شناسایی کدئین و مورفین در این اندام گیاهی می‌تواند به دلیل پایین بودن

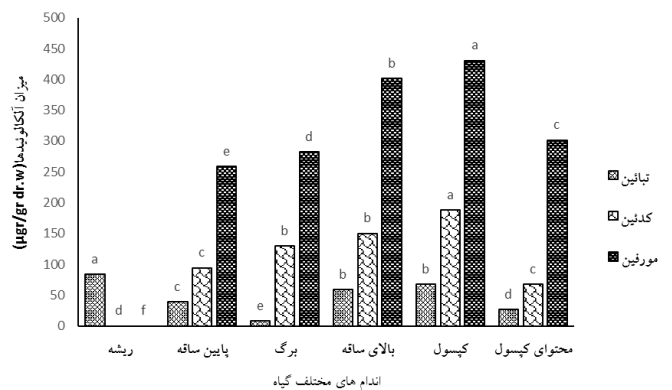
کننده‌ی تبائین به کدئین و مورفین در کپسول بیشترین مقدار را نداشت. در مورد دو ژن *T6ODM* و *COR* بالاترین میزان رونوشت در قسمت بالای ساقه و در مورد ژن *CODM* بالاترین میزان رونوشت در برگ گیاه وجود داشت. در کل مشاهده می‌شود که میزان رونوشت‌های ژنی در ساقه گیاه (مجموع قسمت بالا و پایین) نسبت به بقیه قسمت‌ها فراوان‌تر می‌باشند. بنابراین احتمال می‌رود که آلکالوئیدهای مورد نظر در قسمت‌های دیگر گیاه تولید شده و سپس به کپسول منتقل شوند. بیوستنز آلکالوئیدها در ساقه و ریشه خشخاش افیونی بسیار بالاتر بوده و آلکالوئیدهای آن‌ها به همراه لاتکس به کپسول منتقل می‌شوند که نشان می‌دهد فعالیت آنزیم‌های اختصاصی بیوستنز آلکالوئیدهای مورفینان در ساقه و ریشه بیشتر از کپسول می‌باشد (Gerardy and Zenk 1993a,b).

میزان آلکالوئیدهای گروه مورفین طی سه مرحله بذر، رویشی و بعد از گلدهی در گیاه خشخاش مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که میزان هر سه آلکالوئید مورفین، کدئین و تبائین در مرحله بعد از گلدهی هم در ریشه‌ها و هم در اندام‌های هوایی به مراتب بیشتر از مقدار آن در مراحل اولیه رشد و بذرها بود ولی در مجموع میزان هر سه آلکالوئید مورد بررسی در اندام‌های هوایی بالاتر از میزان آنها در ریشه گزارش شد (Omidi et al. 2012).

در چندین تحقیق ذکر شده است که تجمع رونوشت‌های ژنی کدکننده‌ی برخی از آنزیم‌های بیوستنزی به تجمع مکانی آلکالوئیدهای خاص مرتبط می‌باشند که البته استثناهای قابل توجهی در این موارد وجود دارد (Fuchini and De Luca 1994,1995; Fuchini et al. 1996a; Huang and kutchan 2000). در تحقیقات دیگری نشان داده شد که رونوشت ژن‌های *CYP80B1* و *BBE*، *TYDC* در پاسخ به تیمار ایستوری یا ایجاد زخم به شیوه‌ای که از نظر زمانی سازگار با تجمع سنگوئینارین است القا می‌شوند (Fuchini et al. 1996a,b; Huang and kutchan 2000).

تجمع القایی و نموی رونوشت‌های مربوط به هشت ژن (*TYDC*، *MLP*، *COR*، *SAT*، *BBE*، *4OMT*، *CYP80B1*، *CNMT*، *6OMT*) مرتبط با بیوستنز آلکالوئیدها در خشخاش افیونی مورد مطالعه

بیان ژن‌های *T6ODM* و *CODM* در ریشه بوده که باعث تجمع تبائین در ریشه می‌شود. در عوض در قسمت‌های دیگر گیاه احتمالاً به دلیل بیان ژن‌های *T6ODM*، *CODM* و *COR* و تولید آنزیم‌های بیوستنزی متناظر با آن‌ها برای کاتالیز کردن واکنش‌ها همواره میزان مورفین بیش از کدئین و میزان کدئین بیش‌تر از تبائین بود. در مطالعه Larkin et al. (2007) و Allen et al (2008) نیز که میزان آلکالوئیدهای مورفینان را در قسمت‌های مختلف گیاه اندازه‌گیری کرده بود مشاهده شد که همواره میزان کدئین بیش از تبائین و میزان مورفین بیش از کدئین بود. همچنین در مطالعه‌ی Hagel and Facchini (2010) در گیاه شاهد تیمار نشده با سازه‌های خاموش‌کننده‌ی ژن‌های *T6ODM*، *CODM* و *DIOX2* نیز میزان مورفین بیش‌تر از کدئین و میزان کدئین بیش‌تر از تبائین بود. همچنین به جز در مورد بذر، هماهنگی زیادی میان میزان کدئین به عنوان یکی از پیش‌سازهای مورفین و میزان مورفین در قسمت‌های مختلف گیاه وجود دارد به طوری که میزان مورفین تولیدی در هر بخش گیاه با میزان کدئین در آن متناسب بود.



شکل ۲- میزان تغییرات آلکالوئیدهای تبائین، کدئین و مورفین در اندام‌های ریشه، پایین ساقه، برگ، بالای ساقه، کپسول و محتوای کپسول در گیاه بالغ *P. somniferum* اندازه‌گیری شده به وسیله‌ی Ion Mobility Spectrometry

علی‌رغم وجود هماهنگی در میزان آلکالوئیدهای اندازه‌گیری شده در قسمت‌های مختلف گیاه، میان میزان رونوشت‌ها و میزان آلکالوئیدها در قسمت‌های مختلف گیاه تنظیم هماهنگی دیده نمی‌شود. به طوری که اگرچه میزان آلکالوئیدهای کدئین و مورفین در کپسول گیاه نسبت به بقیه بخش‌ها زیادتر بود ولی میزان رونوشت‌های ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بیوستنزی تبدیل

تولیدات متابولیتی در بافت‌های خاص تاثیرگذار می‌باشند. اگرچه برخی از جنبه‌های بیوسنتز آلکالوئیدها و تجمع آن‌ها در خشخاش افیونی کاملاً در سطح رونویسی کنترل می‌شود ولی نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تنظیم کل مسیر توسط مجموعه‌ای از عوامل پیچیده مولکولی، بیوشیمیایی و سلولی کنترل می‌شود (Facchini and Park 2003).

توزیع بافتی و زمانی آلکالوئیدها در خشخاش افیونی مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که میزان مورفین در اندام‌های هوایی بین روزهای ۵۰ تا ۸۰ پس از کشت افزایش قابل توجهی نشان می‌دهد. این افزایش در طول دوره ساقه‌دهی شروع شده و با نمو ساقه و پس از آن تشکیل کپسول مرتبط می‌باشد. هر دوی این بافت‌ها دارای شبکه‌ی گسترده‌ای از لاتیسیفر هستند که حضور آن‌ها با تشکیل آلکالوئیدهای مورفینان مرتبط می‌باشد. بین روزهای ۳۰ تا ۳۵ پس از کشت میزان بالای از مورفین و به میزان کمتری کدئین در ریشه وجود دارد و پس از این زمان میزان آن‌ها به شدت کاهش می‌یابد. احتمالاً این افزایش و کاهش با تغییرات نمودی در ریشه مرتبط باشد چون منشعب شدن ریشه در همین زمان مشاهده شده‌است. ممکن است کاهش مورفین و کدئین بین روزهای ۴۰ تا ۵۰ با افزایش در محتوای آلکالوئیدی بافت‌های هوایی مرتبط باشد. همچنین ممکن است افزایش در محتوای آلکالوئیدی اندام هوایی با انتقال از ریشه به اندام یا اضمحلال در محل ریشه و بیوسنتز مورفین و کدئین در اندام هوایی مرتبط باشد. بیش‌ترین میزان مورفین در ریشه گیاه در روز سی‌ام و به میزان ۳۱۳ میکروگرم در گرم بافت تر گیاه گزارش شد (Williams and Ellis 1989).

قرار گرفت و مشاهده شد که رونوشت ژن‌های هر هشت آنزیم بیوسنتزی در تمامی اندام‌های گیاهی یافت می‌شوند ولی به طور کلی سطح رونوشت‌ها در ساقه و جوانه‌های گل بیشترین و در برگ کمترین مقدار را داشت (Facchini and Park 2003). در ریشه رونوشت‌های *6OMT* و *CNMT* در سطوح متوسط تا زیاد وجود دارد در حالی که سطح *4OMT* در ریشه پایین است (Facchini and Park 2003). تجمع مکانی رونوشت‌های *CYP80B1*، *BBE*، *SAT* و *COR* مشابه و بیشترین سطح آنها به ترتیب در ساقه، جوانه‌ی گل و ریشه بود. در مطالعه‌ی آنها سطح نهایی رونوشت *TYDC* در ریشه بیش‌ترین مقدار را داشت ولی نتایج آن‌ها در مورد *COR* با نتایج (Unterlinner et al. 1999) که سطح پایین رونوشت *COR* را در ریشه، ساقه و برگ نشان دادند متفاوت بود (Facchini and Park 2003) این تفاوت‌ها نشان می‌دهد که سطح برخی از رونوشت‌ها می‌تواند در وارته‌های مختلف خشخاش افیونی متفاوت بوده یا اینکه بیان ژن‌های خاص می‌تواند به وسیله‌ی عوامل محیطی و شرایط رشد تحت‌تاثیر قرار گیرند. (Facchini et al. 1996a). ذکر کردند که قادر به ردیابی رونوشت *BBE* در برگ‌های خشخاش افیونی رقم *Marianne* نبودند ولی در مطالعه‌ی (Facchini and Park 2003) رونوشت *BBE* به فراوانی در برگ یافت شد که این نتیجه با نتایج (Huang and kutchan 2000) که از یک رقم متفاوت خشخاش افیونی استفاده کرده بودند همخوانی داشت. ردیابی رونوشت‌های ژنی *BBE* در اندام‌های هوایی به دور از انتظار است به دلیل اینکه سنگوئینارین غالباً در ریشه تجمع می‌یابد (Facchini and De Luca 1995). بنابراین می‌توان گفت که احتمالاً عوامل مولکولی، بیوشیمیایی و سلولی دیگری به غیر از سطح رونوشت بر تجمع

### منابع

Allen RS, Millgate AG, Chitty JA, Thistleton J, Miller JAC, Fist AJ (2004) RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nature Biotechnology* 22: 1559-1566.  
Allen RS, Miller JA, Chitty JA, Fist AJ, Gerlach WL, Larkin PJ (2008) Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in opium poppy. *Plant Biotechnology Journal* 6: 22-30.

Facchini PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology* 52: 29-66.  
Facchini PJ, De Luca V (1994) Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry* 269: 26684-26690.

- Facchini PJ, De Luca V (1995) Phloem-specific expression of tyrosine/ dopa decarboxylase and isoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *The Plant Cell* 7: 1811-1821.
- Facchini PJ, Johnson AG, Poupart J, De Luca V (1996b) Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiology* 111: 687-697.
- Facchini PJ, Park SU (2003) Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* 64: 177-186.
- Facchini PJ, Penzes C, Johnson AG, Bull D (1996a) Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiology* 112:1669-1677.
- Frick S, Kramell R, Schmidt J, Fist AJ, Kutchan TM (2005) Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment *Papaver somniferum* cultivars. *Journal of Natural Products* 68: 666-673.
- Gerardy R, Zenk MH (1993a) Formation of salutaridine from (R)- reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 3: 79-86.
- Gerardy R, Zenk MH (1993b) Purification and characterization of salutaridine: NADPH 7-oxidoreductase from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 34: 125-132.
- Hagel JM, Facchini PJ (2010) Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology* 6: 273-275.
- Hagel JM, Facchini PJ (2013) Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology* 54: 647-672.
- Larkin P, Miller J, Allen R, Chitty J, Gerlach W, Frick S, Kutchan T, Fist A (2007). Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotechnology Journal* 5: 26-37.
- Omidi M, Koozhadi F, Solouki M, Taghizad Farid R, Alizadeh H (2012) Comparison of morphinan alkaloids during different stage of growth in the medicinal plant opium poppy (*Papaver somniferum*). *Medicinal Plant* 11:140-149.
- Urbanczyk-Wochniak E, Luedemann A, Kopka J, Selbig J, Roessner-Tunali U, Willmitzer L, Fernie AR (2003) Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. *European Molecular Biology Organization Reports* 4: 989-993.
- Williams RD, Ellis BE (1989) Age and tissue distribution of alkaloids in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 28: 2085-2088.
- Ziegler J, Facchini PJ (2008) Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59: 735-769.
- Zulak KG, CORnish A, Daskalchuk TE, Deyholos MK, Goodenowe DB, Gordon PMK, Klassen D, Pelcher LE, Sensen CW, Facchini PJ (2007) Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta* 225: 1085-1106.



## Study the expression of genes involved in morphinan alkaloids biosynthesis and corresponding metabolites in *Papaver somniferum*

Rezaei M<sup>1</sup>, Naghavi MR<sup>\*1</sup>, Hosseinzade AH<sup>1</sup>, Abbasi AR<sup>1</sup>

1. Phd Student, Professor, Associate Professors, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

\* Corresponding Author, Email: mnaghavi@ut.ac.ir

### ABSTRACT

Combined analysis of transcript and metabolite profiling data presents a new and meaningful approach in the identification of candidate genes for changing the metabolic composition of a biological system. Holistic understanding of the biological behavior of a complex system enables the careful tracking of the response of an organism to conditional perturbations at different molecular and genetic levels. The availability of species with specific genomic and metabolomics resources creates new opportunities to investigate the biosynthesis and regulation of alkaloid metabolism in opium poppy. The relationship between expression of genes which encode Thebaine-6-O-demethylase, Codeine-O-demethylase and Codeine Reductase enzymes and the amount of codeine and morphine as corresponding products, and thebaine as precursor of the pathway in different parts of adult plants were studied. The results for T6ODM showed the lowest expression in roots and the highest in the upper part of the stems. The lowest and highest levels of transcripts for CODM were observed in roots and leaves, respectively. Leaves and upper part of stem had the lowest and highest level of COR transcripts. The predominant alkaloid of roots was thebaine and leaves had the lowest amount of thebaine. Surprisingly, although morphine and codeine were not detected in the roots, while, capsules had the highest amount of the metabolites. Despite of coordination between alkaloids rates in different parts of plants, coordinate regulation among transcript levels and morphinan alkaloids rates were not observed. Although, capsules had the maximum levels of codeine and morphine, the levels of transcripts encoded biosynthetic enzymes which convert thebaine into codeine and morphine were not at maximum levels. Therefore presumably molecular, biochemical and cellular factors other than the transcript level affect the accumulation of metabolites in specific tissues.

### Key Words

Benzylisoquinoline Alkaloids, Codeine, Gene Expression, Morphine, Thebaine