ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷
صفحه ۳۵۲ - ۳۴۳

# جداسازی و بررسی بیان ژن کدکننده BBE دخیل در مسیر بیوسنتز سنگوئینارین تحت تنش خشکی در مامیران کبیر

# Isolation and expression study of BBE encoding gene involved in sanguinarin biosynthesis pathway in greater celandine under drought stress

طیبه شمسینی غیاثوند[۱]، صدیقه فابریکی اورنگ*[۲]، سودابه مفاخری[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

**Shamsini Ghiasvand T[1], Fabriki-Ourang S[*2], Mafakheri S[3]**

1- PhD Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
3- Assistant Professor, Department of Horticulture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.ourang910@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

## چکیده

**بخش‌های مختلف گیاه دارویی مامیران کبیر (*Chelidonium majus* L.) حاوی ترکیبات متعدد آلکالوئیدی مهم مانند چلیدونین، کلریترین، سنگوئینارین- بربرین است. سنگوئینارین یک بنزوفنانتریدین چهار عضوی می‌باشد که به‌طور گسترده در گیاهان خانواده خشخاش، فوماریاسه و سدابیان وجود دارد. این آلکالوئید بیولوژیک فعال دارای طیف گسترده‌ای از خواص دارویی بالقوه مفید مانند ضد میکروبی، ضد التهابی و خاصیت ضدتوموری می‌باشد. اولین مرحله در مسیر بیوسنتز آلکالوئید سنگوئینارین مستلزم تبدیل اس- رتیکولین به اس- اسکولرین می‌باشد که این واکنش مهم به‌وسیله آنزیم کلیدی بربرین بریج که توسط ژن *BBE* کد می‌شود، صورت می‌گیرد. به‌منظور تهیه مواد گیاهی برای جداسازی ژن و نیز بررسی میزان بیان ژن *BBE* (Berberine Beridge Enzyme) در چهار سطح تنش خشکی شدید، متوسط، ضعیف و عدم تنش (به‌ترتیب با ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) در سه اندام ریشه، ساقه و برگ، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. جهت جداسازی cDNA کدکننده آنزیم BBE استخراج RNA از بافت ریشه و برای بررسی بیان ژن مذکور، استخراج RNA از ریشه، ساقه و برگ انجام شد. cDNA کدکننده آنزیم BBE از بافت ریشه با طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز جداسازی و با موفقیت در پلاسمید PTG19-T درج و در سلول‌های مستعد شده *E. Coli* همسانه‌سازی شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که ژن جداسازی شده با طول ۱۴۴۱ جفت‌باز، زنجیر پپتیدی به طول ۴۸۳ اسیدآمینه را کد می‌کند. زنجیر پپتیدی BBE حاصل، دارای موتیف NX(S/T) به‌عنوان جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون، flavin binding domain (برای اتصال هیستیدین فلاوینه شده)، موتیف اسیدآمینه‌ای SGGH و دنباله Glu که نقش کاتالیتیکی مهمی در تشکیل پل بربرین در آنزیم‌های فلاووپروتئینی دارد، بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین و کمترین میزان بیان این ژن به‌ترتیب در بافت ریشه تحت خشکی ضعیف (FC=70%) و در برگ و ساقه در شرایط عدم تنش (FC=100%) حاصل شد. در جمع‌بندی کلی می‌توان نتیجه گرفت که اعمال تنش خشکی ضعیف، سبب افزایش بیان ژن *BBE* می‌شود و شاید از این طریق بتوان به تولید سنگوئینارین بیشتری در این گیاه دست یافت.**

**واژه‌های کلیدی**

تنش خشکی
ژن *BBE*
سنگوئینارین
مامیران کبیر

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]

## مقدمه

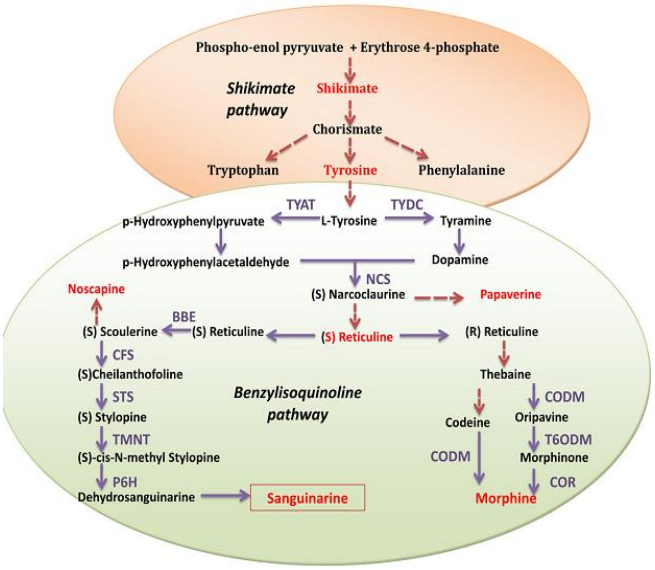
بنزیل‌ایزوکوینولین‌ها، گروه بزرگی از آلکالوئیدها هستند که به‌طور عمده در خانواده‌های گیاهی Papaveraceae، Fumariaceae، Berberidaceae و Ranunculaceae شناسایی شده‌اند. بسیاری از آلکالوییدهای این گروه دارای اثرات دارویی مهمی مانند مسکن (مورفین و کدئین)، ضد سرطان (سنگوئینارین)، ضد باکتری (بربرین) و شل کننده عضلات (پاپاورین) می‌باشند (Facchini et al. 2012).

بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل‌ایزوکوئینولین با تبدیل تیروزین به دوپامین و ٤-هیدروکسی فنیل استالدهید (با شبکه‌ای از دکربوکسیلاسیون، اورتوهیدروکسیلاسیون و دآمیناسیون) آغاز می‌شود. تیروزین دکربوکسیلاز، تیروزین و دهیدروکسی فنیل آلانین را به آمین‌های مشابه خود تبدیل می‌کند. دوپامین و ٤-هیدروکسی فنیل استالدهید توسط نورکوکلارین سینتاز (NCS) با هم ترکیب شده تا اس-نورکوکلارین (پیش‌ماده مرکزی برای همه آلکالوئیدهای بنزیل‌ایزوکوئینولین در گیاهان) را تولید کند. تمام ۲۵۰۰ آلکالوئید بنزیل‌ایزوکوئینولین، از ماده حد واسط مرکزی اس- نورکوکلارین سنتز می‌شوند. اس- نورکوکلارین با همکاری ٦-ا-متیل‌ترنسفراز (6OMT)، ان- متیل‌ترنسفراز (CNMT)، یک P450 هیدروکسیلاز (CYP80B1) و ٤-ا-متیل‌ترنسفراز (4OMT) به اس- رتیکولین تبدیل می‌شود. هیدروکسیلاسیون حلقه آروماتیک شرکت کننده در تبدیل اس-نورکوکلارین به اس- رتیکولین توسط مونواکسیژناز وابسته به P450 (CYP80B1) کاتالیز شده و در آن اس-ان-متیل‌کوکلارین به اس-هیدروکسی-ان-متیل‌کوکلارین تبدیل می‌شود (Facchini et al. 1996). رتیکولین یک نقطه انشعابی بین مسیرهای مورفین و سنگوئینارین می‌باشد (Allen et al. 2004).

اولین مرحله در بیوسنتز آلکالوئید سنگوئینارین مستلزم تبدیل اس-رتیکولین به اس-اسکولرین می‌باشد که این واکنش مهم توسط آنزیم کلیدی Berberine bridge enzyme (BBE) صورت می‌گیرد (Facchini et al. 1996). آنزیم BBE تبدیل ساختاری گروه N – متیل در S – رتیکولین را به کربن شماره ۸ در S- اسکولرین کاتالیز می‌کند (Frenzel et al. 1988). سپس S- اسکولرین توسط آنزیم شیلانتیفولین سنتتاز (DIOX) به S –

شیلانتیفولین پیش‌ماده سنگوئینارین تبدیل می‌شود (Hagel and Facchini 2010a) (شکل ۱). سنگوئینارین یک نمک آمونیومی و سمی می‌باشد که بیشتر در خانواده پاپاوراسه از جمله ریشه خشخاش یافت شده‌است (Beaudoin and Facchini 2013).

مامیران یا مامیران کبیر، گیاهی دارویی از خانواده خشخاش (Papaveraceae) با نام علمی *Chelidonium majus* L. می‌باشد که بخش‌های مختلف این گیاه در درمان بیماری‌هایی نظیر زخم معده، سرطان معده، زخم‌های دهان، بیماری‌های کبدی و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد. پتانسیل درمانی گیاه مامیران وابسته به شمار متعددی از ترکیبات فعال بیولوژیکی مانند کلیدونین، کلریترین، سنگوئینارین، بربرین، پروتوپین، آلوکریپتوپین و کوپتیسین می‌باشد. به‌طور کمی این گیاه حاوی مقادیر زیادی از آلکالوییدهای ایزوکوئینولینی است (۰/۲۷ تا ۲/۲۵ درصد در بخش‌های هوایی و سه تا چهار درصد در ریشه) (Lee and Facchini 2010; Amal et al. 2015).




شکل ۱- مسیر آلکالوییدی بنزیل ایزوکوئینولین (Verma et al. 2014). tyrosine aminotransferase ,dopa decarboxylase (TYDC)/Tyrosine) berberine bridge enzyme , norcoclaurine synthase (NCS),(TYAT) cheilanthifoline synthase (CFS), stylopine synthase(STS), , (BBE) methyltransferase (TNMT)-tetrahydroprotoberberine cis-N thebaine 6-O-demethylase, protopine 6-hydroxylase (P6H), (T6ODM), codeinone reductase (COR), codeine O-demethylase ((CODM)



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]

آزمایش‌های مختلفی در شرایط آزمایشگاهی و غیرآزمایشگاهی نشان داده‌اند که سنگوئینارین موجب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی انسان می‌شود و مطالعه روی سنگوئینارین به‌عنوان درمان بالقوه سرطان توصیه می‌شود.

علی‌رغم پیشرفت‌های به‌دست آمده در زمینه سنتز مصنوعی مواد موثره گیاهی، هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها راه دستیابی به بسیاری از مواد دارویی ارزشمند است؛ به‌طوری‌که بخش اعظم بازار گیاهان دارویی به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق شده از این گیاهان مربوط می‌شود. غلظت پایین این ترکیب‌ها در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، تخریب روزافزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، نابودی گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری و مشکلات مرتبط با اهلی نمودن و کشت این گیاهان، توجه محققین را به استفاده از راه‌کارهایی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده‌است (Mulabagal and Tsay 2004; Kumar and Gupta 2008).

اثربخشی الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی را به‌عنوان روشی کارآمد برای بهبود تولید ترکیبات با ارزشی مانند متابولیت‌های ثانویه تایید شده‌است (Verma et al. 2014). تغییر در عوامل محیطی مانند تنش‌های محیطی می‌توانند باعث تغییر در نحوه رشد و میزان مواد ثانویه در گیاهان دارویی شوند. بر پایه تحقیقات انجام گرفته، مشخص شده‌است که تنش‌ها به‌عنوان الیسیتورهای غیرزیستی بر مقدار ماده موثره گیاهان دارویی، عناصر تشکیل دهنده مواد موثره و میزان وزن خشک تولید شده تاثیر می‌گذارند و می‌توانند تولید برخی از این ترکیب‌ها را تا چندین برابر افزایش دهند، البته این تاثیر همیشگی نبوده و در مواردی نیز کاهش میزان متابولیت‌های ثانویه گزارش شده‌است. اگرچه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله ژن‌ها کنترل می‌شود؛ ولی تولید آن‌ها به میزان زیادی تحت تاثیر عوامل محیطی می‌باشد. اطلاعات موجود در رابطه با اثرات شرایط تنش در میزان تولید متابولیت‌های ثانویه، به‌طور عمده از تحقیقاتی به‌دست آمده است که سعی در افزایش این ترکیبات در گیاهان دارویی و معطر داشته‌اند (Timmermann et al. 1984). تنش خشکی، تاثیر گذارترین تنش غیرزنده محیطی است و میزان تاثیر آن بسته به ژنوتیپ‌ها، زمان وقوع تنش و شدت آن متفاوت است (Mousavi et al. 2012).

از آنجایی‌که یکی از دلایل اهمیت گیاه مامیران کبیر به‌وجود متابولیت سنگوییناریں با خاصیت ضد سرطانی قوی برمی‌گردد؛ و همان‌گونه که در بالا به آن اشاره رفت آنزیم BBE واکنش بسیار مهم تبدیل اس- رتیکولین به اس- اسکولرین را انجام می‌دهد؛ و سلسله واکنش‌های بعدی در این مسیر منجر به تولید سنگوییناریں می‌گردد. لذا در پژوهش حاضر در اولین گام، اقدام به جداسازی cDNA کد کننده آنزیم BBE از ریشه گیاه مامیران شد. هم‌چنین در ادامه پس از جداسازی و همسانه‌سازی cDNA مربوط به BBE؛ تغییرات بیانی این ژن در شرایط تنش خشکی در اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گیاه مامیران مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس اطلاعات موجود، این پژوهش اولین مطالعه در راستای بررسی مسیر بیوسنتزی سنگوییناریں در گیاه مامیران کبیر می‌باشد لذا نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در جهت افزایش فعالیت آنزیم BBE به‌عنوان آنزیم مهم و کلیدی در مسیر تولید سنگوییناریں و در نتیجه افزایش میزان این متابولیت به‌کار گرفته شود.

## مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه مامیران کبیر از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد و به‌منظور تهیه مواد گیاهی برای جداسازی ژن و نیز بررسی میزان بیان ژن *BBE* (Berberine Beridge Enzyme) در گیاه مامیران کبیر، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. دو فاکتور مورد مطالعه شامل تنش خشکی در سه سطح خشکی شدید، متوسط و ضعیف (به‌ترتیب۴۰، ۵۵ و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی) به همراه تیمار شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و سه اندام ریشه، ساقه و برگ بودند. تنش خشکی در مرحله چهار هفتگی گیاه و در سه زمان متوالی به مدت ۱۴ روز اعمال شد و پس از بروز تنش، نمونه‌گیری از اندام‌های ریشه، ساقه و برگ گیاه در سه تکرار زیستی انجام گرفت. به‌منظور جداسازی cDNA کدکننده آنزیم BBE استخراج RNA از بافت ریشه و نیز برای بررسی بیان ژن



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]

مذکور، استخراج RNA از بافت‌های ریشه، ساقه و برگ با استفاده از بافر استخراج RNA (RNX- Plus Solution) محصول شرکت سیناکلون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دو روش نانودراپ (Nanodrop 2000c، شرکت Thermo scientific) و الکتروفورز ژل آگارز؛ ساخت cDNA با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس (Thermofishen scientific, Ep0441) و آغازگر الیگوdT (Vivantis) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام پذیرفت.

برای طراحی آغازگرهای مورد نیاز جداسازی cDNA کدکننده آنزیم BBE؛ از کتابخانه‌های EST [1] گیاه مامیران کبیر استفاده شد. اطلاعات این کتابخانه‌ها و توالی‌های EST آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI [2] بدست آمد. برای پیدا کردن توالی‌های EST که با ژن BBE مرتبط بود از Blastn استفاده شد. بدین منظور از توالی‌های ژن BBE سایر گیاهان خانواده خشخاش به‌عنوان Query استفاده شد. در ادامه ESTهایی که با توالی مورد نظر ما شباهت بالای ۶۰ درصد داشتند را انتخاب کرده و توسط نرم‌افزار EGassembler [3] سرهم‌سازی شد. از میان کانتیگ‌های ساخته شده، بلندترین کانتیگ را انتخاب کرده و آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (جدول ۱) طراحی شد. بررسی خصوصیات آغازگرها با استفاده از برنامه آنلاین Oligo analyzer [4] انجام گرفت و سنتز آن‌ها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از مخلوط واکنش Ampliqon انجام شد. شرایط دمایی واکنش برای تکثیر، پنج دقیقه ذوب اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس بود که واکنش با ۴۰ چرخه شامل ۶۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷ درجه و ۸۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس ادامه یافت و در پایان یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. برای تایید تکثیر قطعه موردنظر، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

پس از خالص‌سازی قطعه تکثیر شده با استفاده از کیت Expin Combo (Geneall)، همسانه‌سازی محصول حاصل در ناقل پلاسمیدی PTG19-T (Vivantis) با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas) مطابق روش توصیه شده شرکت سازنده انجام پذیرفت. پس از آماده‌سازی سلول‌های مستعد باکتری *E.Coli* سویه *DH5α* به‌روش قلیایی کلریدکلسیم (Sambrook and Russel 2001)؛ معرفی ناقل نوترکیب به درون سلول‌های باکتری به‌روش شوک حرارتی (Sambrook and Russel 2001) انجام گرفت. سپس برای شناسایی باکتری‌های نوترکیب، از باکتری‌های رشد یافته در محیط گزینشگر حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، آزمون کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت.

1 Expression Sequence Tag; EST
2 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
3 http://www.genome.jp/tools/egassembler/
4 https://eu.idtdna.com/calc/analyzer

جدول ۱- توالی جفت آغازگرهای مورد استفاده به‌منظور جداسازی و بررسی بیان ژن *BBE* در گیاه مامیران کبیر

| نام آغازگر | توالی آغازگر (′۳→′۵) | دمای اتصال (°C) | طول قطعه تکثیری (bp) | ژن هدف |
|---|---|---|---|---|
| BBE1-F | TTGTCTAACTTCCCATGGCG | ۵۷ | ۱۵۰۰ | *BBE* |
| BBE1-R | GATGGTTAAACA CATTATTTGGA | | | |
| BBE2-F | ACGCCGTTTCCTCATCGTAA | ۵۸ | ۱۴۰ | *BBE* |
| BBE2-R | TTCGACACGAACGGTTCCAT | | | |
| Elf-F | AGATGATTCCAACCAAGCCCA | ۵۸ | ۱۱۱ | *ef-alpha* |
| Elf-R | CCTTGATGACACCAACAGCAACT | | | |



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]

پس از انجام PCR و انتخاب باکتری‌های نوترکیب حاوی ژن *BBE*، دو کلون انتخاب شد و استخراج پلاسمید با استفاده از کیت Exprop$^{TM}$ Plasmid SV (GeneAll) انجام گرفت. در ادامه، پس از بررسی کیفیت و کمیت پلاسمید استخراج شده (با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و نانودراپ)؛ توالی‌یابی قطعه مورد نظر با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 و T7 توسط شرکت Bioneer (کره) انجام پذیرفت.

بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی، توسط نرم‌افزار ClC main workbench (V5.5) انجام گرفت. با استفاده از این نرم‌افزار، توالی‌های اضافی که شامل توالی ناقل بودند از توالی حذف شد و توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده برای بررسی‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. هم‌ردیفی چندگانه پروتئین مورد نظر با توالی‌های پروتئینی مشابه که قبلا شناسایی شده‌اند، توسط برنامه ClustalW2 انجام شد. به‌منظور بررسی‌های بیش‌تر و تعیین زیرگروه ژن همسانه‌سازی شده، اقدام به بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار Clustalw2 شد. سپس دمین‌های قطعه ژن جداسازی شده با استفاده از پایگاه‌های NCBI، Interproscan و Motif scan بررسی شد.

میزان بیان ژن *BBE* در اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گیاه ماميران تحت تیمارهای مختلف خشکی (۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) به‌روش RT-PCR کمی با استفاده از آغازگرهای BBE2 بررسی شد. آغازگرهای BBE2 بر اساس اطلاعات حاصل از توالی‌یابی صورت گرفته طراحی شدند. از ژن *Elangation factor α* نیز به‌عنوان ژن مرجع در این آزمایش استفاده گردید. شرایط زمانی و دمایی واکنش RT-PCR کمی عبارت بود از چهار دقیقه دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت‌سازی اولیه که با ۴۰ چرخه شامل۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس (واسرشت‌سازی)، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس (اتصال)، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس (بسط) ادامه یافت و در نهایت رسم منحنی ذوب قطعه تکثیری از دمای ۶۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. واکنش RT-PCR کمی با استفاده از کیت Syber green (PremixEX Tag II, Fermentas) با دستگاه ریل‌تایم Biorad ساخت آمریکا صورت گرفت. برای تجزیه‌های آماری از نرم‌افزارهای MSTATC و SPSS استفاده شد.

## نتایج و بحث

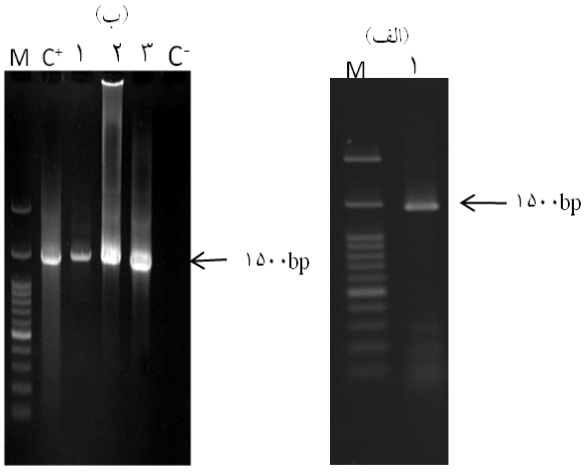
با عنایت به اهمیت دارویی سنگوئینارین به‌عنوان ماده‌ای با اثر ضد سرطانی قوی، داشتن اطلاعات کافی از مسیر بیوسنتزی آن و نیز ژن‌های کنترل کننده به‌منظور بهره‌مندی از این ماده دارویی با ارزش ضروری می‌باشد. گیاه ماميران کبیر از جمله گیاهان دارای این ماده می‌باشد؛ لذا به‌نظر می‌رسد افزایش اطلاعات مولکولی بتواند کمک شایانی برای اهدافی مانند افزایش میزان این ماده موثره نماید. (S)-Reticuline به‌عنوان یک نقطه انشعاب مرکزی در بیوسنتز بسیاری از آلکالوئیدهای ایزوکوئینولینی در گیاهان عمل می‌کند که هر کدام از آنزیم‌های موجود در نقطه انشعاب، آن را به یک مسیر خاص هدایت می‌کنند و در نهایت منجر به تولید یک محصول نهایی و خاص می‌شود (Facchini et al. 1996). آنزیم Berberine Beridge Enzyme (BBE) اولین مرحله از بیوسنتز سنگوئینارین را با تبدیل (S)-Reticuline به (S)-Scoulerine انجام می‌دهد؛ بنابراین با کسب اطلاعات مولکولی در این مسیر می‌توان تلاش‌هایی را در زمینه افزایش بیان ژن‌های مرتبط به‌منظور افزایش سنگوئینارین در ماميران نمود.

براساس نتایج ارائه شده در منابع مختلف، رونوشت‌های ژن *BBE* در ریشه گیاه خشخاش بیشتر از اندام هوایی مشاهده شده‌است (Facchini et al. 1996)؛ هم‌چنین مشخص شده است که در گیاه خشخاش، سنگوئینارین بیش‌تر در ریشه و گیاهچه تجمع می‌یابد (Facchini and Deluka 1995). بنابراین با توجه به این‌که گیاه ماميران نیز از خانواده خشخاش است، cDNA کد کننده آنزیم BBE؛ از بافت ریشه جداسازی شد. پس از استخراج RNA کل از ریشه و ساخت cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای BBE1 (جدول ۱) انجام گرفت و مطابق انتظار قطعه‌ای به‌طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز تکثیر شد (شکل ۲ الف). قطعه تکثیر شده به‌منظور همسانه‌سازی از روی ژل آگارز خالص‌سازی و در ناقل پلاسمیدی PTG19-T درج شد و سپس در سلول‌های مستعد شده *E. Coli* همسانه‌سازی شد. به‌منظور تایید تراریختی باکتری *E.*



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]

*Coli* حاوی ناقل با cDNA رمزکننده آنزیم BBE، ابتدا با سلول‌های باکتری رشد کرده روی محیط گزینشگر (حاوی آمپی‌سیلین) واکنش‌زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت (colony PCR) و پس از تایید اولیه درج قطعه مورد نظر در پلاسمید (شکل ۲ ب)؛ کشت باکتری‌های مورد نظر در محیط گزینشگر و استخراج پلاسمید انجام و در نهایت توالی‌یابی با آغازگرهای عمومی T7 و M13 در دو جهت انجام گرفت. پس از بررسی توالی به‌دست آمده و حذف توالی‌های اضافی مربوط به ناقل، توالی نهایی به طول ۱٤٤۱ جفت‌باز به‌دست آمد که در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی KY595435 ثبت شد.




شکل ۲– الف) نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل از تکثیر *BBE* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز یک درصد (M– نشانگر اندازه مولکولی (100bp, cinnaclon)، ۱– قطعه تکثیر شده از روی cDNA ریشه مامیران کبیر) ب) نتیجه آزمون PCR با همسانه‌های رشد کرده روی محیط گزینشگر (Colony PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز یک درصد (M– نشانگر اندازه مولکولی (100bp, cinnaclon)، $C^+$– کنترل مثبت ( cDNA ریشه به‌عنوان الگو)، ۱ الی ۳– همسانه‌های دارای ناقل نوترکیب، $C^-$– کنترل منفی).

با بررسی توالی نوکلئوتیدی cDNA آنزیم BBE این آزمایش با طول ۱٤٤۱ جفت‌باز، یک چارچوب قرائت آزاد با ٤۸۳ اسید آمینه شناسایی شد. همچنین مشخص شد که همانند BBE گیاه *Eschscholzia californica* (Dittrich and Kutchan,1991) و گیاه خشخاش (Facchini et al. 1996)، BBE گیاه مامیران نیز دارای توالی‌های توافقی با موتیف NX(S/T) به‌عنوان جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون می‌باشد (شکل ۳).

توالی‌های توافقی flavin binding domain (برای اتصال هیستیدین فلاوینه شده) شناسایی شده در توالی پروتئینی BBE مامیران در این آزمایش مشابه با توالی پروتئینی مربوط به *E. californica* (Dittrich and Kutchan,1991) و خشخاش (Facchini et al. 1996) در نزدیکی انتهای آمینی (N- terminal) بود. از ویژگی منحصر به‌فرد این دومین، موتیف اسیدآمینه‌ای SGGH به‌عنوان موتیف محافظت شده می‌باشد که همانند سایر گیاهان خانواده خشخاش، این جایگاه در توالی پروتئینی BBE گیاه مامیران نیز دیده شد (شکل ۳). همان‌گونه که از بررسی توالی اسیدآمینه‌ای BBE خانواده خشخاش به‌دست آمد، یک دنباله Glu که نقش کاتالیتیکی مهمی در تشکیل پل بربرین در آنزیم‌های فلاووپروتئینی دارد؛ در موقعیت ۳۳۸ توالی BBE مامیران دیده شد. دنباله مذکور در موقعیت ٤۱۷ گیاه *E. californica* (Winkler et al. 2008) و موقیت ٤۲۱ گیاه خشخاش ( Hagel et al. 2012) گزارش شده‌است.

در بررسی روابط فیلوژنتیکی فلاووپروتئین‌های مربوط به خانواده‌های گیاهی مختلف و فلاووپروتئین حاصل ار توالی جداسازی شده، بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی، پروتئین‌های BBE در دو دسته کلی قرار گرفتند. در یک گروه فلاووپروتئین‌های مربوط به گیاهان خانواده خشخاش قرار گرفت؛ در حالی‌که در گروه دیگر پروتئین‌های BBE خانواده‌های Runnunculaceae و Berberidaceae دسته‌بندی شد (شکل ٤). بیشترین درصد یکسانی توالی پروتئینی cDNA جداسازی شده از مامیران در این آزمایش با توالی‌های پروتئینی *Argemon Mexicana* و *E. californica* با درصد یکسانی به ترتیب ۷۰/۵۸ و ٦٦/۳٦ درصد بود.

مطالعه نحوه تنظیم مسیر بیوسنتز سنگوئینارین و شناسایی مراحل تأثیرگذار بر سرعت تولید این متابولیت ارزشمند جزء اولین و مهم‌ترین گام‌ها جهت مهندسی متابولیک به‌منظور افزایش تولید آن‌ها می‌باشد.

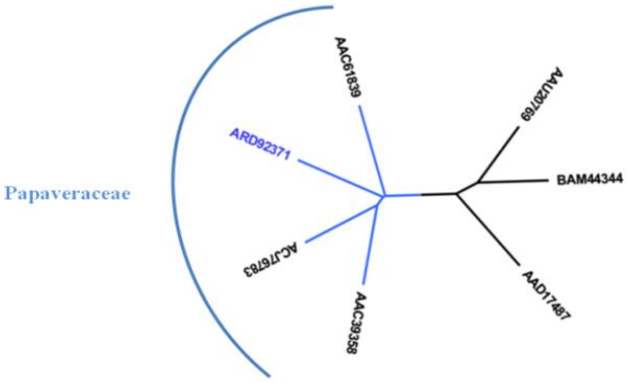


[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]




شکل ۳- هم‌ردیفی توالی‌های اسید آمینه BBE از *Argemone mexicana* (ACJ76784)، *E. califomica* (AAC39358)، *C. majus* (ARD92371) و *P. somniferum* (AAC61839). جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون (نواحی زرد)، توالی توافقی flavin binding domain (کادر قرمز)، دنباله گلوتامین (ناحیه سبز).




شکل ٤- درخت فیلوژنتیکی فلاووپروتئین‌های خانواده خشخاش و خانواده‌های مرتبط. نام گونه‌ها و شماره‌های دسترسی اعضاء درخت فیلوژنتیکی عبارتند از: (*Thalictrum flavum*) AAU20769، AAC39358 (*E. californica*)، BAM44344 (*Coptis*، AAC61839 (*P. somniferum*)، AAD17487 (*Berberis*، ARD92371 (*C. majus*)، *japonica*) ACJ76783 (*Argemon mexicana*) *stolonifera*),

تحریک آنزیمی به کمک الیسیتورها با منشاء زیستی و یا غیرزیستی از جمله روش‌های تحریک بیان ژن می‌باشد که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao et al. 2005).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) حاکی از تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان بیان ژن *BBE* در اندام‌های مختلف گیاه ماميران کبیر بود و هر سه منبع تنش خشکی، بافت و اثر متقابل بافت در تنش در سطح احتمال یک درصد ($P\leq0.01$) معنی‌دار شدند. نتایج مقایسه میانگین اثر اصلی بافت از نظر بیان ژن *BBE* نشان داد که میزان بیان این ژن در اندام‌های مختلف گیاه ماميران متفاوت بود (شکل ۵). به‌طوری‌که بیشترین میزان بیان ژن *BBE* با اختلاف معنی‌دار از سایر بافت‌ها در ریشه مشاهده شد؛ این نتایج تایید کننده این مطلب است که در این گیاه نیز همانند دیگر گیاهان خانواده خشخاش مانند *P. somniferum* (Facchini and De Luka 1995) و *P. bracteatum* (Rezaei et al. 2016) بیان ژن مزبور در ریشه بیش از ساقه و برگ است. این می‌تواند دلیلی بر تجمع بیشتر سنگوئینارین در ریشه گیاه ماميران، همان‌گونه که در سایر گیاهان هم‌خانواده ماميران نیز گزارش شده‌است (Facchini and De Luka 1995)، باشد. در ارتباط با دلیل حضور آنزیم BBE در ساقه و برگ علیرغم تجمع سنگوئینارین در بافت ریشه، می‌توان به‌طور مشابه به مسیر بیوسنتزی مورفین اشاره کرد. با وجود اینکه مورفین در اندام هوایی و درون کپسول تجمع می‌یابد، اما آنزیم سالوتاردینول سینتاز که در بیوسنتز مورفین نقش دارد به‌طور گسترده در ریشه و ساقه و حتی در کپسول وجود دارد که نشان‌دهنده این موضوع است که مورفین در ریشه و ساقه سنتز شده و توسط شیره گیاهی به اندام هوایی منتقل می‌شود (Gerardy and Zenk 1993b).



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]

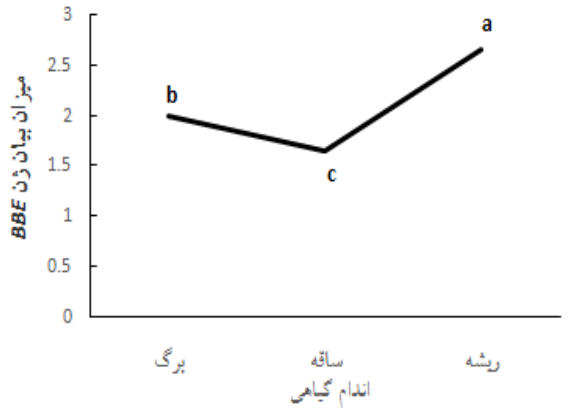
جدول ۲- تجزیه واریانس بیان ژن BBE در سطوح مختلف تنش خشکی و اندام‌های مختلف گیاه مامیران کبیر

| منابع تغییر (S.O.V) | درجه آزادی (df) | مجموع مربعات (SS) | میانگین مربعات (MS) | F |
|---|---|---|---|---|
| تنش خشکی | ۳ | ۲۳/۷۷ | ۷/۹ | ۶۱۹/۷** |
| بافت | ۲ | ۶/۴۱ | ۳/۲ | ۲۵۰/۵** |
| تنش خشکی× بافت | ۶ | ۵/۹۹ | ۰/۹۹ | ۷۸/۱** |
| خطای آزمایش | ۲۴ | ۰/۳۱ | ۰/۰۱۳ | |
| CV% | | ۵/۳۸ | | |

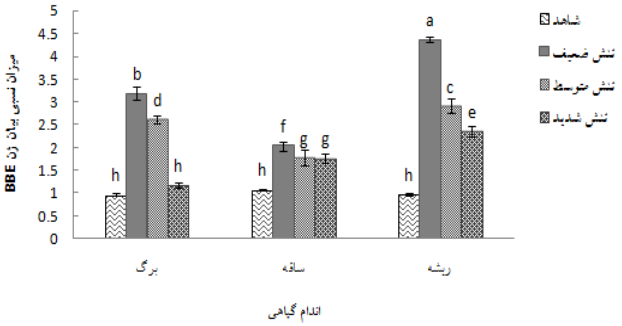
**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد ($P\leq0.01$).

در واقع می‌توان گفت که سنتز یک ژن در یک اندام به معنای تجمع محصول تولیدی آن در همان اندام نیست. انتقال نیکوتین و هیوسیامین از ریشه توسط آوند چوبی به برگ‌ها یک مثال مشهود از آلکالوئیدهایی است که در ریشه سنتز می‌شوند و در اندام هوایی ذخیره می‌شوند (Hashimoto and Yamada 1992)، که با توجه به اطلاعات فوق می‌توان گفت که ممکن است چنین مکانیسمی برای سنگوئینارین نیز در مامیران وجود داشته باشد. به این‌صورت که سنگوئینارین در ساقه و برگ سنتز شده و توسط انتقال دهنده خاص در خلاف جهت حرکت مورفین و نیکوتین به سمت ریشه انتقال بیابد.

بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل بافت در تنش، در تنش خشکی ضعیف (۷۰ درصد ظرفیت زراعی)، بیان ژن *BBE* در هر سه بافت مامیران نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری پیدا کرد و بیشترین میزان بیان ژن در بافت ریشه مشاهده شد (شکل ۶). از سوی دیگر با افزایش شدت تنش، میزان بیان ژن *BBE* در خشکی متوسط و شدید نسبت به تنش ضعیف روند کاهشی پیدا کرد ولیکن در تمام سطوح تنش بیشترین میزان بیان ژن *BBE* در بافت ریشه مشاهده شد. در مجموع هر سه بافت، تنش خشکی ضعیف و متوسط به‌ترتیب افزایش سه و دو برابری در بیان ژن *BBE* نسبت به شاهد نشان دادند. در کل با افزایش شدت تنش، کاهش در میزان بیان ژن *BBE* مشاهده شد و می‌توان این‌گونه استنباط نمود که تنش خشکی در سطوح ضعیف و متوسط به‌عنوان شوک ملایم می‌تواند موجب افزایش بیان ژن *BBE* و به تبع آن افزایش سنتز سنگوئینارین گردد و هرچه تنش خشکی شدت یابد منجر به کاهش بیان ژن *BBE* خواهد شد (شکل ۶).




شکل ۵- میزان بیان ژن *BBE* در بافت‌های مختلف گیاه مامیران کبیر




شکل ۶ - میزان بیان ژن *BBE* اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گیاه مامیران کبیر در سطوح مختلف تنش خشکی شدید، متوسط و کم (به‌ترتیب ۴۰، ۵۵ و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی) و شاهد.

در توافق با نتایج این آزمایش، Davoudnia et al. (2016) در مطالعه بیان ژن *BBE1* در چهار گونه مختلف خشخاش، بیان بالای این ژن را در اندام ریشه هر چهار گونه گزارش کردند ولیکن بیشترین میزان بیان ژن در ریشه گونه *P. bracteatum* به‌دست آمد. Rezaei et al. (2016) نیز بیشترین میزان بیان ژن *BBE1* را در ریشه گونه *P. bracteatum* و Facchini et al.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]

(1996) بیشترین میزان بیان ژن *BBE1* را در ریشه *P. somniferum* گزارش کرده‌اند. همچنین Facchini and Park (2003) و Huang and Kutchan (2000) بیان ژن *BBE1* در برگ *P. somniferum* را گزارش کردند.

در مقایسه با نتایج این تحقیق، نتایج پژوهش‌های مختلف نشان از کاهش بیان ژن‌های درگیر در سنتز سنگوئینارین مانند *tydc7*، *DBOX*، *DIOX2* و *BBE1* در اثر محرک‌های غیرزیستی مانند نانوذره‌ها می‌باشد، به‌طوری‌که با افزایش مدت زمان تیمار با الیسیتور کاهش معنی‌داری در بیان این ژن‌ها در خشخاش گزارش شده است (khodayari et al. 2015). چنین کاهش بیانی در ژن *DIOX2* در مواجهه طولانی مدت با الیسیتورها نیز گزارش شده‌است (Hagel and Facchini 2010). در جمع‌بندی کلی می‌توان نتیجه گرفت که که اعمال تنش خشکی در سطوح ضعیف، بیان ژن *BBE* را تحت تاثیر قرار داده و سبب افزایش آن می‌شود و احتمالا از این طریق بتوان به تولید سنگوئینارین بیشتری در این گیاه دست یافت.

## منابع

Allen RS, Millgate AG, Chitty JA, Thisleton J, Miller JAC, Fist AJ, Gerlach WL, Larkin PJ (2004) RNAi-mediated replacement of morphine with the non-narcotic alkaloid reticuline in Opium poppy. Natural Biotechnoogy 22:1559-1566.

Amal K, Maj I, Pratim B (2015) *Chelidonium majus* L. (Greater clandine) - A review on its phytochemical and therapeutic perspectives. International Journal Herbal Medicin 3:10-27.

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.

Davoudnia B, Ahmadi J, Fabriki-Ourang S (2016) Investigation in expression of key genes involved in sanguinarine biosynthetic pathway in Papaver genus under drought and salinity. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 5:48-57.

Dittrich H, Kutchan TM (1991) Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. Proceedings of Natlural Academyof Science USA 88:9969-9973.

Facchini PJ, Bohlmann J, Covello PS, De Luca V, Mahadevan R, Page JE, Ro DK, Sensen CW, Storms R, Martin VJJ (2012) Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites. Trends Biotechnology 30:127-131.

Facchini PJ, De Luca V (1995) Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase in Opium poppy. Journal of Biological Chemistry 269:26684-26690.

Facchini PJ, Penzes C, Johnson AG, Bull D (1996) Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from Opium poppy. Plant Physiology 112:1669 -77.

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

Frenzel T, Beale JM, Kobayashi M, Zenk MH, Flossm HG (1988) Stereochemistry of enzymic formation of the berberine bridge in protoverberine alkaloids. Journal of the American Chemical Society 110:7878-7880.

Gerardy R, Zank MH (1993b) Formation of salutaridine from (R)- reticuline by amembrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *papaver somniferum*. Phytochemistry 32:79-86.

Hagel JM, Beaudoni GA, Fossati E, Ekins A, Martin VJ, Facchini PJ (2012) Characterization of a flaboprotein oxidase from Opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. Journal of Biological Chemistry 287:42972- 42983.

Hagel JM, Facchini P (2010a) Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in Opium poppy. Nature Chemical Biology 4:273-375.

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.

Huang FC, Kutchan TM (2000) Distribution of morphinan and benzo [c] phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. Phytochemistry 53:555-564.

khodayari M, Omidi M, Shahnejat-booshehri A, Yazdani D, Naghavi M (2015) Gene expression involved in sanguinarine biosynthesis affected by nano elicitors in *papaver somniferum*. Journal of Medicinal Plants 2:41-54 (In Farsi).

Kumar J, Gupta PK (2008) Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports 2:93-112.

Lee EJ, Facchini PJ (2010) Norcoclaurine synthase is a member of the pathogenesis-related 10/Bet v1 protein family. Plant Cell 22:3489-3503.

Mousavi A, Alizadeh B, Khodarahmi M, Mostafavi KH (2012) Investigation of cold resistance in winter canola (*Brassica napus* L.) cultivars in field condition. Journal of Agronomy and Plant Breeding 8:29-37 (In Farsi).

Mulabagal V, Tsay HS (2004) Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]

biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering 2:29-48.
Rezaei M, Naghavi MR, Hosseinzadeh AH, Abbasi AR (2016a) Study the expression of genes involved in morphinan alkaloids biosynthesis and corresponding metabolites in *papaver somniferum*. Modern Genetics Journal 11:229-236 (In Farsi).
Rezaei M, Naghavi MR, Hosseinzadeh AH, Abbasi AR (2016b) Developmental accumulation of thebaine and some gene transcripts in different organs of *Papaver bracteatum*. Industrial Crops and Products 80:262-268.
Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NewYork, USA.
Timmermann BN, Steelink C, Loewus FA (1984) Recent advanced in phytochemistry, phytochemical adaptation to stress. Plenum press 18:333.
Verma P, Khan SA, Mathur AK, Ghosh S, Shanker K, Kalra A (2014) Improved sanguinarine production via biotic and abiotic elicitations and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum* with their gene expression studies and upscaling in bioreactor. Protoplasma 251:1359-1371.
Winkler A, Hartner F, Kutchan TM, Glieder A, Macheroux P (2006) Biochemical evidence that berberine bridge enzyme belongs to a novel family of flavoproteins containing a bi-covalently attached FAD cofactor. The Journal of Biololigal Chemistry 281:21276-21285.
Zhao J, Davis L,Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23:283-333.

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-05 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.2.3 ]