

## Cloning, identification and expression analysis of stylophine synthase (*STS*) gene in *Chelidonium majus* L.

H. Shahabzadeh <sup>1</sup> and S. Fabriki-Ourang <sup>2\*</sup>

1- M.Sc. Graduate. Dept. Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. Iran.

2\*- Corresponding author: Assoce. Prof., Dept. Genetic Engineering & Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. Iran. Email: [ourang@eng.ikiu.ac.ir](mailto:ourang@eng.ikiu.ac.ir)

### Abstract

#### Background and objectives

Sanguinarin is an important secondary metabolite of the benzyl isoquinoline alkaloids, which is widely found in Papaveraceae family plants such as *Chelidonium majus*. Sanguinarin has many properties such as antimicrobial, antifungal, and anti-inflammatory. The use of abiotic elicitors is one of the effective ways to induce and increase of secondary metabolites. The elicitors such as methyl-jasmonate induce the biosynthesis and accumulation of secondary metabolites by stimulating the plant's defense system. Since there is no report on the isolation of cDNA encoding the stylophine synthase in sanguinarine biosynthesis pathway in *Chelidonium majus*, the full length of this gene was isolated to provide an opportunity to identify and investigate the pathways of benzyloisoquinoline that have not been known so far. Also, the expression pattern of this gene was surveyed under the treatment of methyl-jasmonate to improve its production.

#### Methodology

In this research at the first stage, the cDNA encoding the stylophine synthase gene (*STS*) was identified and isolated from the root of *Chelidonium majus*. *STS* is one of the genes in sanguinarin biosynthesis pathway that converts (S)-Cheilanthifoline to (S)-Stylophine in the methoxy bridge, which belongs to CYP719 subfamily. In the next stage, the expression pattern of *STS* gene was examined in a completely randomized design with four replicates by applying methyl-jasmonate (concentration of 100  $\mu$ M) at four treatment levels (foliar, irrigation, foliar + irrigation and without methyl-jasmonate as control) in different organs (leaf, root and stem) and different sampling times (6, 24 and 48 hours after methyl-jasmonate treatment) In a pot experiment under greenhouse condition.

#### Results

Isolation of *STS* gene cDNA was done in two steps. At first, the incomplete sequence (1000 bp) was isolated, and then, by designing new primers based on the information from the primary sequence, the full length (1500 bp) of the coding region of gene was isolated and successfully cloned into pTG19-T plasmid. After sequencing and necessary modifications, the obtained gene sequence was registered in the NCBI database with the accession number KY550671.2. By evaluating the sequence characteristics and studying the phylogenetic relationships, it was determined that CYP719A3, the product of the *STS* gene, belongs to the P450 protein family. The results of variance analysis showed the methyl-jasmonate treatment affect significantly ( $P \leq 0.01$ ) *STS* gene expression at different times in different organs of *Chelidonium majus*. The highest level of gene expression was observed in methyl-jasmonate foliar spraying + irrigation 48 hours after treatment in the root. The mean comparison showed that the expression level of *STS* gene was different in the root, leaf and stem of *Chelidonium majus*, so it was 1.5 and 2.5 times higher in the root than leaf and stem, respectively. The high expression of the *STS* gene in the root of *Chelidonium majus* indicates the effectiveness of the plant organ in the level of gene activity, on the other hand, the use of methyl-jasmonate could play an effective role in increasing gene expression.



**Conclusion**

Methyl-jasmonate increased the expression of *STS* gene in the sanguinarine biosynthesis pathway so that the highest expression was observed in the root. Therefore, the sequence of the gene encoding stylophine synthase in the sanguinarine biosynthesis pathway and its expression pattern in *Chelidonium majus* can be used in the pathway engineering of this valuable metabolite.

**Keywords:** Cloning, Methyl-jasmonate, Sanguinarin, Stylophine synthetase.

## همسانه‌سازی، شناسایی و بررسی بیان ژن *(STS) stylophine synthase* در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*)

هانیه سادات شهاب‌زاده<sup>۱</sup> و صدیقه فابریکی اورنگ<sup>۲\*</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، رشته ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه مهندسی ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

پست الکترونیک: Email: [ourang@eng.ikiu.ac.ir](mailto:ourang@eng.ikiu.ac.ir)

### چکیده

سابقه و هدف:

سنگوئینارین (Sanguinarin) یکی از متابولیت‌های ثانویه مهم از خانواده آلکالوئیدهای گروه بنزیل ایزوکوئینولین می‌باشد که به‌طور گسترده در بیشتر گیاهان خانواده پاپاوراسه (Papaveraceae) از جمله مامیران کبیر (*Chelidonium majus*) وجود دارد. سنگوئینارین دارای خواص بسیاری مانند خاصیت ضد میکروبی قوی، ضدقارچی و ضدالتهاب است. کاربرد محرک‌های غیرزنده یکی از راهکارهای مؤثر القای تولید و افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. محرک‌هایی مانند متیل جاسمونات از طریق تحریک سیستم دفاعی گیاه موجب القاء بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. از آنجایی که گزارشی مبنی بر جداسازی cDNA کدکننده ژن *STS* در مسیر بیوسنتز آلکالوئید سنگوئینارین در گیاه مامیران وجود ندارد، در این تحقیق اقدام به جداسازی طول کامل این ژن گردید تا فرصتی برای شناسایی و بررسی مسیرهای بنزیل ایزوکوئینولین که تاکنون شناخته نشده‌اند فراهم گردد. همچنین، پس از جداسازی ژن مذکور، الگوی بیانی این ژن تحت تأثیر محرک غیرزنده متیل جاسمونات در جهت بهبود تولید آن بررسی شد.

مواد و روش‌ها:

در این تحقیق، در مرحله اول شناسایی و جداسازی cDNA کدکننده ژن *(STS) stylophine synthase* از اندام ریشه گیاه مامیران کبیر انجام شد. این ژن یکی از ژن‌های مسیر تولید سنگوئینارین می‌باشد و واکنش تبدیل (S)-Cheilanthifoline به (S)-Stylophine در پل متیلوکسی را سنتز می‌کند که متعلق به زیر خانواده CYP719 است. در مرحله بعدی میزان بیان ژن *STS* با اعمال تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در چهار سطح (محلول‌پاشی، آبیاری، ترکیب محلول‌پاشی + آبیاری و شاهد بدون متیل جاسمونات) در اندام‌های مختلف (برگ، ریشه و ساقه) این گیاه در زمان‌های مختلف پس از تیمار (۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در چهار تکرار در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد.

نتایج:

جداسازی cDNA ژن *STS* در دو مرحله انجام شد. ابتدا توالی ناقص (۱۰۰۰ جفت باز) جداسازی شد و بعد با طراحی آغازگرهای جدید بر اساس اطلاعات بدست آمده از توالی اولیه، طول کامل ناحیه کدکننده ژن استیلوپین سنتاز (۱۵۰۰ جفت باز) جداسازی و با موفقیت در پلاسمید pTG19-T همسانه‌سازی شد. پس از توالی‌یابی و انجام اصلاحات لازم، توالی ژنی به‌دست آمده با شماره دسترسی KY550671.2 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید. با بررسی خصوصیات توالی و مطالعه روابط فیلوژنتیکی، مشخص شد که CYP719A3 حاصل فعالیت ژن *STS* (ژن همسانه‌سازی و توالی‌یابی شده) متعلق به خانواده پروتئینی P450 است. نتایج تجزیه واریانس بیانگر اثر معنی‌دار تیمار متیل جاسمونات در زمان‌های مختلف در بافت‌های متفاوت بر بیان ژن *STS* گیاه مامیران (در سطح  $P \leq 0.01$ ) بود. بیشترین میزان بیان ژن *STS* در تیمار ترکیب محلول‌پاشی + آبیاری با متیل جاسمونات در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار در اندام ریشه بود. مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *STS* نشان داد که میزان بیان این ژن در ریشه، برگ و ساقه مامیران

کبیر متفاوت بود، به طوری که در ریشه ۱/۵ برابر برگ و ۲/۵ برابر ساقه بود. بیان بالای ژن STS در ریشه مامیران نشان‌دهنده مؤثر بودن اندام گیاهی در میزان فعالیت ژن می‌باشد و از سوی دیگر کاربرد محرک متیل جاسمونات می‌تواند نقش مؤثری در افزایش بیان آن داشته باشد. نتیجه‌گیری:

متیل جاسمونات سبب افزایش بیان ژن STS در مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین شد، به طوری که بیشترین افزایش بیان در ریشه گیاه مامیران مشاهده گردید. از این رو، توالی ژن کدکننده STS در مسیر بیوسنتز سنگوئینارین و الگوی بیانی آن در گیاه مامیران کبیر می‌تواند در زمینه مهندسی مسیر این متابولیت ارزشمند استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: استیلوپین سنتتاز، همسانه‌سازی، سنگوئینارین، متیل جاسمونات.

## مقدمه

و حتی برای پیشگیری و درمان تومورها و سرطان استفاده می‌شود (Venkatesh et al., 2011; Demelo et al., 2011). کلیه قسمت‌های گیاه و شیرابه آن مصارف درمانی دارند ولی ریشه آن مؤثرتر از سایر قسمت‌ها است. ترکیبات آلکالوئیدی این گیاه شامل آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین، چلیروتین، چلیدونین، ایزوچلیدونین سنگوئینارین، کاپتیسین، دی‌هیدرو کاپتیسین، استیلوپین پروتوپین، بربرین و پروتوبربرین می‌باشد (Moro et al., 2009).

با وجود تنوع ساختاری وسیع، بنزیل‌ایزوکوئینولین‌ها دارای منشأ مشترک بیوسنتزی هستند (Facchini et al., 1996). رتیکولین یک نقطه انشعابی بین مسیرهای تولید مورفین و سنگوئینارین می‌باشد (Allen et al., 2008). سنتز سنگوئینارین شامل هفت مرحله تبدیل آنزیمی (شکل ۱) با اکسیداسیون (اس) - رتیکولین به (اس) - اسکولرین با فعالیت آنزیم berberine bridge enzyme (BBE) آغاز می‌شود. اکسیداسیون (اس) - اسکولرین با آنزیم‌های cheilanthifoline synthase (CFS) و stylophine synthase (STS) انجام و پل‌های متیل‌دی‌اکسی به آن افزوده می‌شود و (اس) - استیلوپین حاصل می‌گردد. tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase (TNMT) سبب متیله شدن (اس) - استیلوپین شده و از اکسیداسیون این ترکیب با فعالیت (S)-cis-N-methyl-stylophine 14-hydroxylase (MSH) پروتوپین تولید می‌شود. هیدروکسیلاسیون پروتوپین با-6 protopine

گیاهان دارویی برای هزاران سال منبعی با ارزش برای پیشگیری و درمان بوده‌اند و امروزه نیز از منظر کشف دارو حائز اهمیت هستند. گیاهان دارویی با دارا بودن متابولیت‌های ثانویه به عنوان پیش‌ساز در سنتز داروهای جدید کاربرد دارند (Castillo-Perez et al., 2021). آلکالوئیدها به دلیل اهمیت زیاد دارویی و درمانی، از مهمترین متابولیت‌های ثانویه گیاهی محسوب می‌شوند. این دسته از متابولیت‌ها دارای خواص دارویی مهمی مانند فعالیت ضد میکروبی، ضد التهاب و ضد تومور هستند (Garcia et al., 2005). یکی از مهمترین گروه‌های آلکالوئیدی، بنزیل‌ایزوکوئینولین‌ها (Benzylisoquinoline alkaloids; BIAs) می‌باشند که در خانواده‌های Papaveraceae, Berberidaceae و Fumariaceae وجود دارند. از خواص دارویی این ترکیبات می‌توان به خاصیت تسکین درد مرفین، ضد میکروبی سنگوئینارین و بربرین، شل‌کننده عضلات در بابوکارین و پاپاورین و ضد سرطان در نوسکاپین اشاره کرد (Facchini, 2001; Facchini & Park, 2003).

گیاه دارویی مامیران با نام علمی *Chelidonium majus* L متعلق به خانواده پاپاوراسه (Papaveraceae) است که به دلیل داشتن آلکالوئیدهایی با خواص فارماکولوژیکی مهم، جایگاه ویژه‌ای را در میان گیاهان دارویی دارد (Tome & Colom, 1995). مامیران کبیر به صورت گسترده در درمان سنتی و مدرن برای درمان بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد

شده است که شیالنتیفولین سنتاز و استیلوپن سنتاز مستقل از هم عمل می‌کنند و ژن کدکننده آنزیم‌های شیالنتیفولین سنتاز و استیلوپن سنتاز به ترتیب از گیاهان خشخاش کالیفرنیا (Ikezawa *et al.*, 2007 and 2009) و خشخاش خاردار مکزیک جلداسازی و شناسایی شده‌اند (Díaz Chavez *et al.*, 2011).

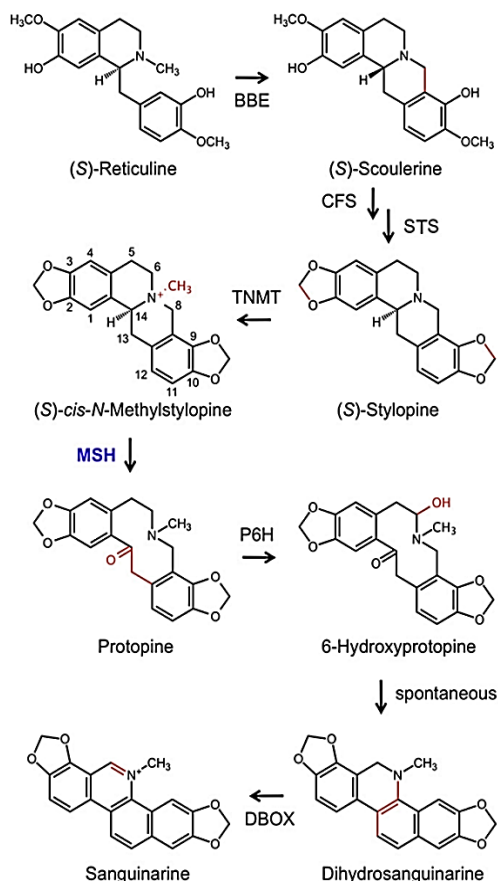
تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان به دلیل پاسخ دفاعی گیاه است. محرک‌های زیستی یکی از راهکارهای مهم برای القاء و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه هستند که از طریق فعال کردن سازوکارهای دفاعی باعث القای تشکیل متابولیت‌های ثانوی و پاسخ‌های فوق-حساسیتی می‌شوند. به دنبال درک محرک پاسخ‌های دفاعی سریع در سلول گیاهی مانند افزایش جریان‌ات یونی از عرض غشای پلاسمایی، تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر (ROS)، فعال‌سازی ژن‌های مربوط به دفاع، تغییرات ساختاری در دیواره سلولی و سنتز فیتوآلکسین‌ها اتفاق می‌افتد. متیل جاسمونات یکی از محرک‌هایی است که باعث این عمل می‌شود (Zhang & Guo, 2006). جاسمونات‌ها (جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات) گروهی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی محسوب می‌شوند که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک شرکت و نقش تدافعی در گیاه ایفا می‌کنند (Bari & Jones, 2009). شواهدی وجود دارد که جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات به‌عنوان مولکول‌های سیگنال فعالیت می‌کنند (Memelink, 2009). با فعالیت سیگنال‌های سلولی، بیان ژن‌های مرتبط در مسیر بیوسنتزی تحریک و موجب سنتز یا افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و یا در کشت سلولی آنها می‌شوند (Zhao & Sakai, 2003). در تحقیقی از متیل جاسمونات به‌عنوان یک محرک غیرزنده برای افزایش بیان برخی ژن‌های مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین در گیاه شقایق از خانواده پاپاوراسه استفاده شد (Ikezawa *et al.*, 2009). در آزمایشی استفاده از متیل جاسمونات باعث افزایش ۴۶ درصدی غلظت آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینولین در گیاه مامیران شد، همچنین مشاهده شد که با گذشت زمان میزان

hydroxylase (P6H) انجام می‌شود، در ادامه دی-هیدروسنگوئینارین به صورت خودبه‌خودی از هیدروکسی پروتوئین به دست می‌آید که این ترکیب نیز تحت تأثیر آنزیم dihydrobenzophenanthridine oxidase (DBOX) سنگوئینارین تبدیل می‌شود (Beudoin & Facchini, 2013).

سنگوئینارین (Sanguinarin) یک آلکالوئید بنزوفنانتریدين است (Facchini, 2001). این آلکالوئید یکی از ترکیبات میانی در مسیر سنتز آلکالوئیدهای گروه مرفین می‌باشد که در ریشه تولید و در همین اندام تجمع می‌یابد (Weid *et al.*, 2004). این ترکیب یک مهارکننده قوی است که از فعال‌سازی فاکتور رونویسی هسته‌ای NF-KB3 ممانعت می‌کند و نقش مهمی در تنظیم رشد سلول، تنظیم چرخه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها ایفا می‌کند (Ahmad *et al.*, 2000). شناسایی مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین و ژن‌های دخیل در این مسیر در مامیران کبیر تا حدودی انجام شده است. سنگوئینارین همانند آلکالوئیدهای دیگر گروه بنزوفنانتریدين دارای عمل کاملاً واضح در سطح آنزیمی می‌باشد. آلکالوئیدهایی مانند پروتوبربرین، بنزوفنانتریدين، پروتوئین و فتالیدی ایزوکوئینولین پس از تبدیل (اس) - رتیکولین به آلکالوئید پروتوبربرین (اس) - اسکولرین، سنتز می‌شوند، در نتیجه اولین قدم برای بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدين تبدیل (اس) - رتیکولین به (اس) - اسکولرین است. این واکنش اکسیداتیو از (اس) - رتیکولین شامل تشکیل پیوند میان C-C و گروهان - متیل در حلقه فنولیک می‌باشد که این واکنش توسط آنزیم بربرین بریدج (BBE) انجام می‌شود (Winkler *et al.*, 2008). تبدیل (اس) - اسکولرین به سنگوئینارین با تشکیل پل متیلوکسی به وسیله دو سیتوکروم P450، شیالنتیفولین سنتاز و استیلوپن سنتاز که هر دو اعضای خانواده CYP719A هستند، انجام می‌شود که نتیجه آن سنتز (اس) - استیلوپین است. (اس) - استیلوپین دارای دو گروه متیلوکسی در حلقه‌های A و D از اسکلت پروتوبربرین می‌باشد (Kutchan & Dittich, 1995). این دو آنزیم در کشت سلولی شقایق بررسی شده‌اند. در این گزارش مشخص

شبه‌سازی مولکولی و خصوصیات آنزیم methylenedioxy در گیاه *Eschscholzia californica* استفاده از محرک متیل جاسمونات بیان ژن CYP719A3 در ریشه این گیاه افزایش یافت (Ikezawa *et al.*, 2007).

این آلکالوئید تحت تیمار متیل جاسمونات رو به افزایش است (Kleinwachter *et al.*, 2015). در بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی ترین‌ها نتایج نشان داد که تمام ژن‌های مورد مطالعه در اثر متیل جاسمونات القاء می‌شوند که می‌تواند به دلیل نقش ترین‌ها در مسیرهای دفاعی و انتقال پیام باشد (Elyasi *et al.*, 2016). در پژوهشی دیگر،



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین با هفت مرحله تبدیل آنزیمی از اکسیداسیون (اس)-رتیکولین به (اس)-اسکولرین تا تبدیل به

سنگوئینارین (Beaudoin & Facchini, 2013).

**Figure 1. Sanguinarin biosynthetic pathway with seven enzymatic conversion steps from the oxidation of (s)-reticuline to (s)-sculerine until a change to sanguinarin (Beaudoin & Facchini, 2013).**

گردید تا فرصتی برای شناسایی و بررسی مسیرهای بنزیل‌ایزوکوئینولین که تا کنون شناخته نشده‌اند فراهم گردد. همچنین پس از جداسازی ژن مذکور، الگوی بیانی این ژن تحت تأثیر محرک غیرزنده متیل جاسمونات برای

از آنجایی که گزارشی مبنی بر جداسازی cDNA دکننده ژن STS در مسیر بیوسنتزی آلکالوئید سنگوئینارین در گیاه مامیران وجود ندارد، در این تحقیق اقدام به جداسازی طول کامل این ژن در دو مرحله مجزا

بهبود تولید آن بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

کشت مواد گیاهی و طرح آزمایش

بذرهای گیاه دارویی مامیران کبیر (*Chelidonium majus*) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با کد دسترسی IBRC P1006625 (منشاء استان گلستان) تهیه گردید و در گلدان‌های حاوی خاک، ماسه شسته و کود دامی پوسیده با نسبت ۱۰ : ۵ : ۲ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) کاشته شد.

به منظور بررسی اثرهای محرک غیرزنده متیل-جاسمونات بر میزان بیان ژن *STS* در مامیران، آزمایشی به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. تیمار متیل جاسمونات (MeJA) در مرحله سه تا چهار برگی گیاه با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به صورت‌های محلول‌پاشی، آبیاری و ترکیب محلول‌پاشی + آبیاری اعمال شد. یادآوری می‌شود که برای گیاهان شاهد از محلول‌پاشی و آبیاری با آب مقطر استفاده شد. برداشت نمونه‌های گیاهی از اندام‌های ریشه، ساقه و برگ در سه بازه زمانی مختلف (۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار) انجام شد. نمونه‌های گیاهی تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

## استخراج RNA و ساخت cDNA

به منظور جداسازی ژن کدکننده آنزیم *STS*، استخراج RNA از بافت ریشه و برای بررسی بیان این ژن، استخراج RNA از ریشه، ساقه و برگ با استفاده از محلول استخراج RNA (RNX- Plus Solution, RNA Sinaclon) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و برای تشخیص خلوص RNA، نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ (Thermo scientific, Nanodrop 2000c) بررسی گردید. برای

بررسی سلامت RNA و اطمینان از عدم حضور هر گونه آلودگی به DNA، قبل از سنتز cDNA، به ترتیب از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و نانودراپ، پس از تیمار نمونه‌های RNA با آنزیم DNaseI (Fermentase) به منظور حذف آلودگی‌های DNA استفاده شد. ساخت cDNA با کیت (GeneAII، کره‌جنوبی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

هم‌گذاری کتابخانه‌های EST، شناسایی و همسانه‌سازی cDNA کدکننده آنزیم استیلوپین سنتتاز

به منظور طراحی آغازگرها برای جداسازی cDNA کدکننده آنزیم *STS* از کتابخانه‌های Expression Sequence Tag (EST) گیاه مامیران استفاده شد. اطلاعات این کتابخانه‌ها و توالی‌های EST آنها از پایگاه اطلاعاتی NCBI بدست آمد. برای پیدا کردن توالی‌های EST مرتبط با ژن *STS* از BLASTn استفاده شد. در این مرحله، توالی‌های ژن *STS* در سایر گیاهان خانواده خشخاش، ثبت شده در NCBI، به‌عنوان Query استفاده گردید. در مرحله بعد، توالی‌های EST حاصل از هم‌ردیفی با شباهت بیش از ۶۰ درصد که احتمال همولوژی بالایی با ژن‌های *STS* در سایر گیاهان داشتند انتخاب شده و با نرم‌افزار Egassembler سرهم‌بندی انجام شد. از میان کانتیگ‌های ساخته شده، بلندترین کانتیگ با طول ۱۶۰۰ جفت باز انتخاب و برای وجود چارچوب قرائت باز کامل با استفاده از برنامه آنالین ORF finder بررسی شد. برای اطمینان از کانتیگ بدست‌آمده و چارچوب قرائت باز، از BLASTp استفاده شد.

آغازگرها برای تکثیر ژن مورد نظر با نرم‌افزار Primer3 طراحی گردید و صحت آنها با Oligo analyzer v3.1 بررسی شد. ویژگی‌های بررسی شده در این برنامه شامل ساختارهای ثانویه، هم‌وایدیم و هترووایدیم، دمای ذوب و درصد GC آغازگرها بود. جفت آغازگر STSF و STSR به گونه‌ای طراحی شد که ORF شناسایی شده با طول تقریبی ۱۶۰۰ جفت‌باز تکثیر شود. همچنین آغازگر STS C1 بر

تکثیر قطعه مورد نظر، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از طریق الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد بررسی گردید. قطعات تکثیری با استفاده از کیت Expin™ Combo GP (GeneAll) جداسازی و خالص‌سازی و بعد در ناقل پلاسمیدی pTG19-T (Vivantis, TA010) با آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas) درج شدند. پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با روش شوک حرارتی (Sambrook & Russel, 2001) به باکتری مستعد *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  منتقل شدند. برای تأیید حضور پلاسمیدهای نوترکیب در سلول‌های باکتری *E. coli* آزمون کلنی PCR با کلنی‌های رشد کرده در محیط گزینش‌گر حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با آغازگرهای اختصاصی ژن *STS* انجام شد.

اساس توالی شناسایی شده مرحله قبل به منظور شناسایی طول کامل ژن *STS* طراحی گردید (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از مخلوط واکنش Ampliqon برای جداسازی ژن *STS* انجام شد. شرایط دمایی واکنش برای تکثیر شامل یک چرخه واسرشته‌سازی پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه شامل ۶۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷/۵ درجه سلسیوس و ۸۰ و ۱۲۰ ثانیه (به ترتیب برای جداسازی ژن با طول ناقص با ترکیب آغازگری *STSF* و *STSR* و طول کامل با ترکیب آغازگری *STSF* و *STSC1*) در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود و در پایان یک چرخه بسط نهایی ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. برای تأیید

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به منظور جداسازی cDNA کدکننده آنزیم استیلوپین سنتتاز و مطالعه بیان آن در مامیران کبیر

**Table 1. Characteristics of the primers used to isolate the cDNA encoding the stylopine synthase enzyme and study its expression in *Chelidonium majus*.**

	Primer name	Primer sequence (5→3')	Anneal temperature (C°)	Amplified segment length (bp)
Gene isolation	STS F	CTA TTA AAG AGG AAG CGG CG	53.7	1557
	STS R	AAGAA CAC CAA CAT CAA CTA CA	52.2	
	STS C1	GATCATTACTGCTACCACATTAG	51	1960
Gene expression	qSTS F	CTTCTTCAACTACGGCATGGG	60	
	qSTS R	TGCTAATGGTGCAATGGGTT	60	197
	Actin F	GCCCCTAGCAGCATGAAGAT	60	150
	Actin R	GCACTTCCTGTGGACAATGG	60	

همچنین به منظور شناسایی نوع و تعداد دومین *STS* از پایگاه‌های NCBI، Interproscan و Motif scan استفاده شد. همدردی چندگانه پروتئین مورد نظر با توالی‌های پروتئینی مشابه که قبلاً شناسایی شده‌اند، توسط برنامه ClustalW2 انجام شد. برای شناسایی پروتئین‌های مشابه با پروتئین مورد بررسی از برنامه BLASTp استفاده شد و پروتئین‌هایی که میزان شباهت بالاتری داشتند، انتخاب شدند.

#### مطالعه بیان نسبی ژن *STS* با qRT-PCR

برای بررسی میزان بیان ژن کدکننده آنزیم *STS* و میزان تغییرات بیان آن در تیمارهای متیل جاسمونات با غلظت

پس از تأیید باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب ژن *STS*، کلون‌های منتخب گزینش شدند و استخراج پلاسمید با کیت Expin™ Plasmid SV (GeneAll) انجام شد. همچنین کیفیت و کمیت پلاسمید استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و نانودراپ بررسی شد. توالی‌یابی قطعه مورد نظر با آغازگرهای عمومی M<sub>13</sub> و T<sub>7</sub> توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شد.

ارزیابی نتایج توالی‌یابی با نرم‌افزار CLC Genomics workbench (Ver. 5/5) انجام گردید. توالی‌های اضافی که شامل توالی ناقل بودند از توالی حذف گردید و توالی نوکلئوتیدی بدست آمده برای بررسی‌های بیشتر استفاده شد.



شده در سایر گیاهان خانواده پاپاوراسه حاوی این ماده مانند گیاه خشخاش نیز نشان داده که تجمع سنگوئینارین در ریشه بیش از سایر اندامهاست (Facchini & De Luca, 1995). همچنین میزان بیان ژن *STS* در ریشه گیاه شقایق به طور معنی داری بیشتر از ساقه و برگ آن گزارش شده است (Ikezawa *et al.*, 2007)؛ از این رو، در این پژوهش جداسازی ژن کدکننده آنزیم *STS* از ریشه مامیران کبیر انجام گردید. جداسازی cDNA ژن *STS* در دو مرحله انجام شد. در ابتدا توالی ناقص (۱۰۰۰ جفت باز) جداسازی شد و بعد با طراحی آغازگرهای جدید بر اساس اطلاعات بدست آمده از توالی اولیه، طول کامل ناحیه کدکننده ژن *STS* (۱۵۰۰ جفت باز) جداسازی و پس از انجام اصلاحات لازم، توالی به دست آمده با شماره دسترسی KY550671.2 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید.

به منظور بررسی بیشتر توالی و روابط فیلوژنتیکی، توالی‌هایی که بیشترین شباهت را با ژن *STS* نشان دادند (شش توالی از گیاهان مختلف) با نرم‌افزارهای BLASTp و ClustalW انتخاب شدند. نتایج نشان داد که پروتئین ژن همسانه‌سازی شده *STS* با پروتئین‌های Methylenedioxy (*C. japonica*)، (S)-canadine synthase و Cheilanthifoline synthase (*E. californica*) بیشترین شباهت و با پروتئین Cytochrom P450 (*E. californica*) کمترین شباهت را دارد (شکل ۲). مطابق نتایج مطالعات Ikezawa و همکاران (2007)، پروتئین CYP719A3 که به *STS* نسبت داده شده است، مشابهت زیادی با پروتئین‌های (R,S)-cheilanthifoline، (S)-scoulerine و (S)-tetrahydrocolumbamine در گیاه *E. californica* دارد. پس از بررسی استیلوپین سنتاز از مامیران و methylenedioxy از (*C. japonica*)، (S)-canadine synthase از (*C. japonica*) و Cheilanthifoline synthase از (*E. californica*) مشخص گردید که این پروتئین‌ها به خانواده پروتئینی P450 تعلق دارند. از خصوصیات مشترک این خانواده پروتئینی، یک ناحیه ماریج

۱۰۰ میکرومولار (محلول‌پاشی، آبیاری، ترکیب محلول‌پاشی + آبیاری) در مقایسه با یکدیگر و نسبت به تیمار شاهد (عدم متیل جاسمونات) در بازه‌های زمانی مختلف (۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) پس از اعمال تیمار در اندام‌های ریشه، ساقه و برگ از روش qRT-PCR استفاده شد. واکنش qRT-PCR با برنامه دمایی واسرشتگی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۴۵ چرخه شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس (واسرشتگی)، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس (اتصال)، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس (گسترش) و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در نهایت رسم منحنی ذوب برای اطمینان از تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر در دمای ۹۵ تا ۶۵ درجه سلسیوس انجام شد. واکنش qRT-PCR با SYBR-Green PCR Master Mix (Ampliqon) 2X و دستگاه Real-time PCR (Bio-Rad) انجام شد. تجزیه واریانس براساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح پایه کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن انجام شد. از نرم‌افزارهای SPSS و MSTATC برای تجزیه‌های آماری استفاده گردید.

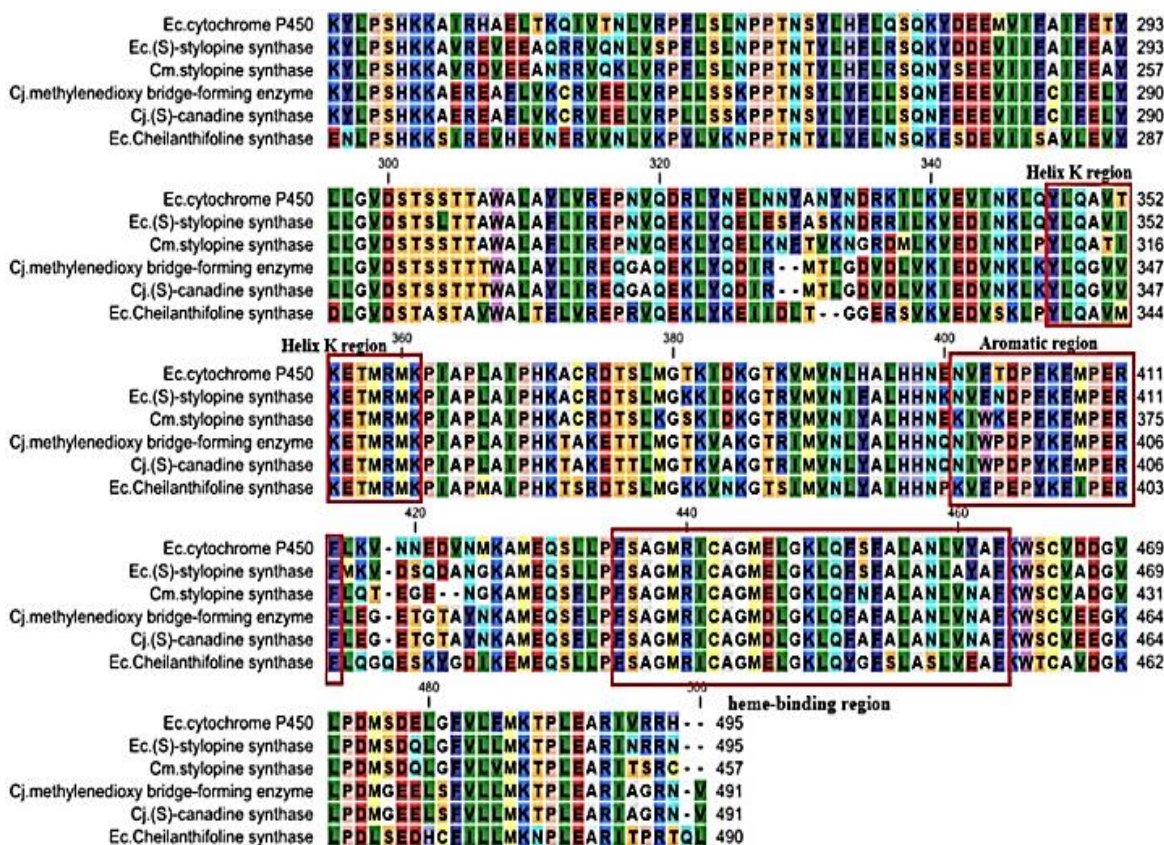
## نتایج و بحث

نظر به اهمیت دارویی آکالوئیدی مانند سنگوئینارین، دستیابی به اطلاعات مولکولی ژن‌های دخیل در بیوسنتز این متابولیت ثانویه با ارزش، ضروریست. با توجه به اینکه مامیران کبیر یکی از گیاهان حاوی سنگوئینارین می‌باشد اطلاعات مولکولی مرتبط با بیوسنتز آن می‌تواند در راستای افزایش این ماده مفید باشد. در راستای این هدف، جداسازی و مطالعه الگوی بیانی ژن کدکننده آنزیم *STS*، یکی از آنزیم‌های مسیر بیوسنتز سنگوئینارین انجام شد.

اندازه‌گیری میزان سنگوئینارین در عصاره کشت سلولی بافت مریستم و ریشه مامیران کبیر نشان داده است که مقدار سنگوئینارین در بافت ریشه بیشتر از مریستم بوده است (Garcia *et al.*, 2005). نتایج پژوهش‌های انجام

*californica* و در CYP719A1 از *C. japonica* نیز گزارش شده است (Ikezawa *et al.*, 2007). از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که CYP719A3 حاصل فعالیت ژن *STS* (ژن همسانه‌سازی شده) در مامیران نیز متعلق به خانواده پروتئینی P450 می‌باشد (قسمت مشخص شده با ستاره در شکل ۲). بر اساس داده‌های حاصل از درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده و با استفاده از تحقیقات انجام شده روی ژن *STS* در گیاه *E. californica* مشخص شد که یکی از پروتئین‌هایی که بیشترین شباهت را با استیلوپین سنتاز مامیران دارد، Cheilanthifoline synthase در گیاه *E. californica* است.

K ناحیه آروماتیک و یک ناحیه متصل شونده به گروه هم (heme) در انتهای کربوکسیل و دامنه‌های هیدروفوبیک در انتهای آمینی می‌باشد که با توالی غشایی گونه‌های میکروسومال P450 مطابقت دارد (شکل ۲). این مناطق حفاظت‌شده در پروتئین‌های CYP719A2 و CYP719A3 از خانواده پروتئینی P450 در گیاه *E. californica* نیز گزارش شده است (Ikezawa *et al.*, 2007). ناحیه ماریج K مشخص شده در شکل ۲ دارای موتیف حفاظت‌شده EXXR می‌باشد که مشخصه اعضای خانواده پروتئینی P450 است. این موتیف در CYP719A2 و CYP719A3 از *E.*



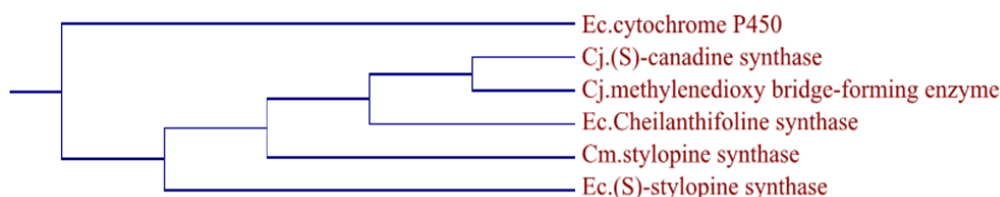
شکل ۲- هم‌ردیفی چندگانه ژن *STS* در مامیران کبیر و پروتئین‌های مشابه با روش Clustalw

کادراهی مشخص شده در شکل مناطق حفاظت‌شده یوکاریوتی P450 هستند که شامل ناحیه ماریج K، ناحیه آروماتیک و ناحیه متصل به آهن هم (heme) می‌باشند. قسمت مشخص شده در ناحیه ماریج K نشان‌دهنده موتیف حفاظت‌شده EXXR است که مشخصه همه اعضای خانواده پروتئینی P450 می‌باشد.

**Figure 2. Multiple alignment of *STS* gene in *Cheilidonium majus* and similar proteins using Clustalw method.** The marked boxes in the figure are the conserved regions of eukaryotic P450, which include the helix K region, the aromatic region, and the heme-binding region. The marked section in the K-helix region represents the conserved EXXR motif, which is characteristic of all P450s.

می‌باشد، بنابراین بیان ژن *STS* در مامیران نه تنها تحت تأثیر متیل‌جاسمونات قرار می‌گیرد بلکه زمان اثر این محرک در بافت‌های مختلف گیاه یکسان نیست. بیشترین میزان بیان ژن *STS* در تیمار ترکیبی محلول‌پاشی + آبیاری متیل‌جاسمونات در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار در ریشه و کمترین میزان بیان ژن مربوط به آبیاری با متیل‌جاسمونات در شش ساعت پس از اعمال تیمار در ساقه مشاهده شد (شکل ۴).

در این تحقیق میزان بیان ژن *STS* در تیمارهای محلول‌پاشی، آبیاری و ترکیب محلول‌پاشی + آبیاری با متیل‌جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) در بازه‌های زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار در اندام‌های ریشه، برگ و ساقه با استفاده از PCR کمی بررسی شد تا درک مناسبی از روند بیان این ژن در بیوسنتز سنگوئینارین حاصل شود. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) بیانگر اثر معنی‌دار تیمار متیل‌جاسمونات در زمان‌های مختلف در بافت‌های متفاوت بر بیان ژن *STS* گیاه مامیران ( $P \leq 0.01$  در سطح)



شکل ۳- درخت فیلوژنی *STS* مامیران کبیر و سایر توالی‌های پروتئینی استیلوپین سنتتاز از گونه‌های مختلف شماره دسترسی پروتئین‌ها در درخت فیلوژنی رسم شده عبارت است از:

**Figure 3. Phylogeny tree of *Chelidonium majus* stylopine synthase and other STS protein sequences from different species.**

Accession numbers of proteins in the drawn phylogeny tree are Cj. methylenedioxy (BAB68769), Cm. Stylopine synthase (KY550671.2), Ec. Cytochorom P450 (BAG75116), Ec. (S)-stylopine (Q50LH3), Cj. (S)-canadine synthase (Q94817), Ec. Cheilanthifoline synthase (B5UAQ8).

بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین میزان بیان ژن *STS* در تیمار محلول‌پاشی متیل‌جاسمونات در ۴۸ و ۶ ساعت پس از تیمار در برگ مشاهده شد که مقدار آنها با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند و کمترین میزان بیان ژن در ۶ ساعت پس از اعمال تیمار در ساقه مشاهده شد. در تیمار آبیاری و ترکیب محلول‌پاشی + آبیاری با متیل‌جاسمونات بیشترین و کمترین میزان بیان ژن به ترتیب در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار در ریشه و ۶ ساعت پس از اعمال تیمار در ساقه مشاهده گردید. در تأیید این یافته، نتایج ژولیده و همکاران در گیاه سرخدار نشان داد که بیان ژن باکاتین فنیل پروپانویل ترانسفراز در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل-جاسمونات در ۴۸ ساعت، ۱۳/۵ برابر گیاه شاهد بود

در مطالعه‌ای تأثیر (Zhoulideh *et al.*, 2022) در مطالعه‌ای تأثیر متیل‌جاسمونات روی مقدار آلکالوئیدهای گیاه مامیران بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از متیل‌جاسمونات باعث افزایش ۴۶ درصدی غلظت آلکالوئیدهای بنزوفناتریدین در این گیاه شد و با گذشت زمان اعمال تیمار متیل‌جاسمونات میزان این آلکالوئید تحت تیمار افزایش یافت (Kleinwachter *et al.*, 2015). در این پژوهش نیز میزان بیان ژن *STS*، یکی از ژن‌های مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزوفناتریدین به نام سنگوئینارین در مامیران، در تیمار با متیل‌جاسمونات افزایش یافت و این روند افزایشی با گذشت زمان بیشتر شد.

جدول ۲- تجزیه واریانس بیان ژن *STS* تحت تیمار با متیل‌جاسمونات در زمان‌های مختلف در اندام‌های مامیران کبیر  
**Table 2. Variance analysis of *STS* gene expression under methyl jasmonate treatment at different times in the organs of *Chelidonium majus*.**

Source of Variation	DF	SS	MS	F test
Methyl jasmonate	3	26.33	8.77	1379.12**
Time	2	11.72	5.86	920.82**
Organ	2	37.43	18.71	2904.54**
Methyl-jasmonate×time	6	10.36	1.72	271.32**
Methyl jasmonate× organ	6	20.09	3.34	526.16**
Organ ×time	4	13.30	3.32	522.91**
Methyl-jasmonate×time× organ	12	14.40	1.2	188.84**
Experimental error	108	0.678	0.006	
Total	143	134.35		

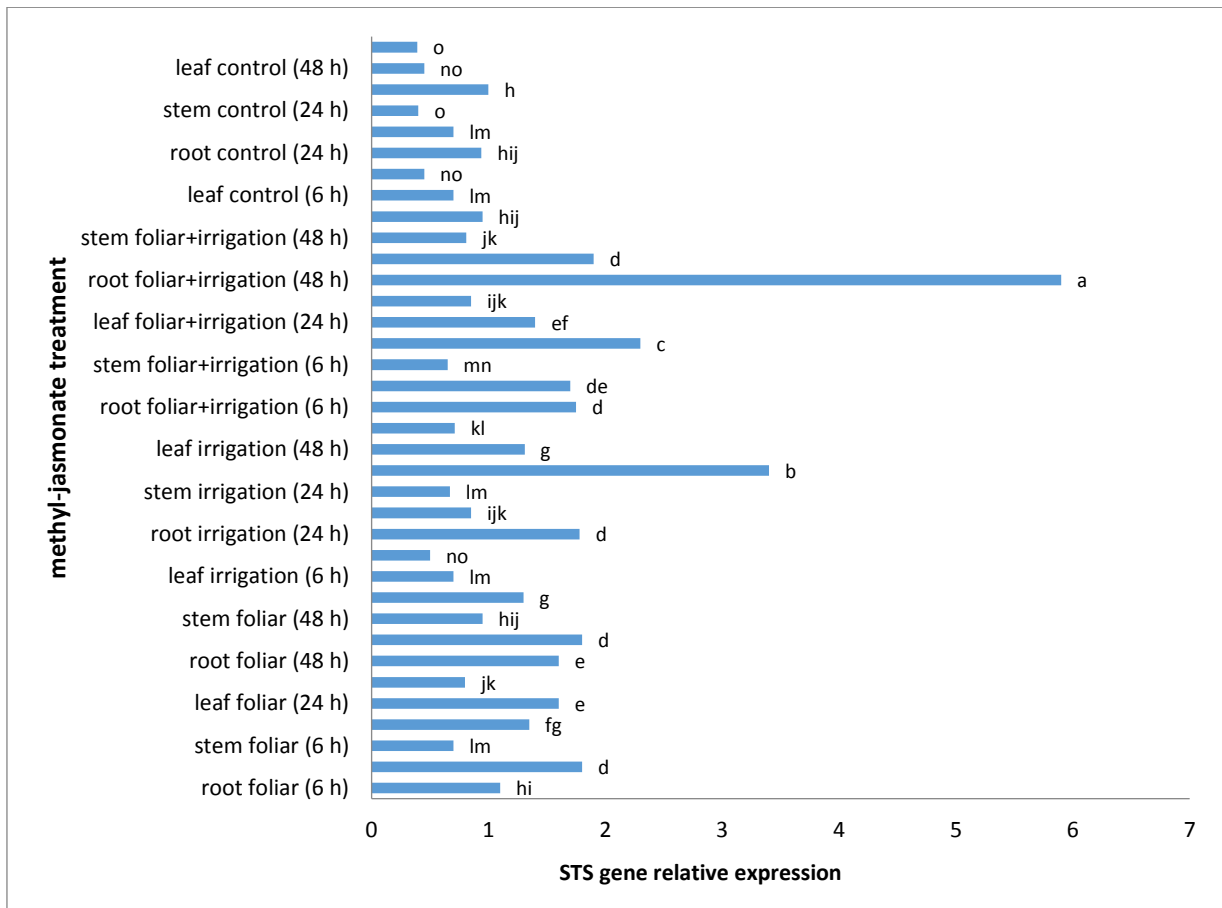
\*\* : significantly difference at 1% probability level

\*\*\* : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

و هیوسیامین در ریشه سنتز می‌شوند و توسط آوندهای چوبی به برگ‌ها منتقل و در همان جا ذخیره می‌گردند (Hashimoto & Yamada, 1992). از این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که سنتز یک ژن در یک اندام به معنای تجمع آن در همان اندام نمی‌باشد.

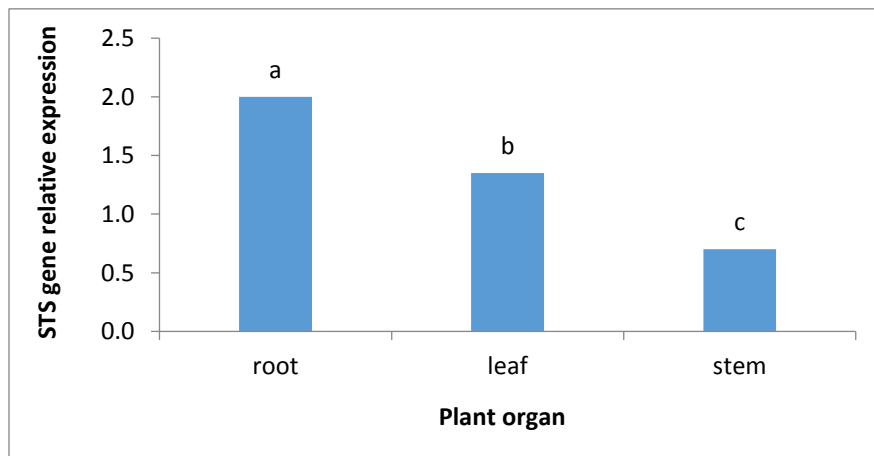
در آزمایشی در کشت بافت خشخاش که هم‌خانواده مامیران است، چهار ژن *STP*, *CFS*, *STP*, *TNMT* و *P6H* مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین تحت تیمار محرک غیرزنده سالیسیلیک‌اسید افزایش بیان هشت تا نه برابری را نشان داد (Hagel *et al.*, 2012). این نتیجه می‌تواند هم‌راستا با نتایج این پژوهش در مورد افزایش بیان ژن *STS* در حضور محرک غیرزنده متیل‌جاسمونات باشد. در مطالعه‌ای دیگر، متیل‌جاسمونات باعث افزایش ۴۶ درصدی غلظت آلکالوئیدهای بنزوفناتریدین در گیاه مامیران شد و با گذشت زمان میزان این آلکالوئید تحت تیمار متیل-جاسمونات افزایش یافت (Kleinwachter *et al.*, 2015). در این پژوهش نیز میزان بیان ژن *STS* در تیمار با متیل-جاسمونات افزایش یافت و میزان این اثر افزایشی با گذشت زمان بیشتر شد.

در این تحقیق مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *STS* نشان داد که میزان بیان این ژن در ریشه، برگ و ساقه مامیران کبیر متفاوت بود، به طوری که در ریشه ۱/۵ برابر برگ و ۲/۵ برابر ساقه بود (شکل ۵) که بیانگر فعالیت بیشتر آنزیم تولید شده از ژن *STS* در ریشه است. هم‌راستا با نتایج این تحقیق، متیل‌جاسمونات باعث افزایش بیان ژنهای درگیر در مسیر تولید سنگوئینارین (*STP*, *CFS*, *BBE*, *CYP80B1*, *4-OMT*) گیاه شقایق در ریشه، برگ و ساقه گزارش شده و میزان بیان در ریشه بسیار بیشتر از ساقه و برگ بود (Ikezawa *et al.*, 2007). با نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان بیان کرد که سنتز سنگوئینارین علاوه بر ریشه که مکان اصلی تجمع آن می‌باشد، در اندام ساقه و برگ نیز سنتز می‌شود. به طور مشابه می‌توان به سنتز مورفین در خشخاش اشاره کرد؛ با وجود اینکه مورفین در اندام هوایی درون کپسول تجمع می‌یابد (Facchini & De Luca, 1995) ولی آنزیم کلیدی سنتز مورفین به طور معنی‌داری در ساقه و ریشه فعال‌تر از کپسول مشاهده شده که می‌توان نتیجه گرفت مورفین در ریشه و ساقه سنتز شده و توسط لاتکس به اندام هوایی منتقل می‌گردد (Gerardy & zenk, 1993 a,b). همچنین مشخص شده که آلکالوئیدهای نیکوتین



شکل ۴- مقایسه میانگین بیان نسبی ژن STS در گیاه مامیران کبیر برای اثر متقابل سه جانبه متیل جاسمونات در اندام و زمان با آزمون دانکن

Figure 4. Mean comparison of STS gene relative expression for methyl-jasmonate × time × organ three-way interaction effect in *Chelidonium majus* using Duncan's test.



شکل ۵- مقایسه میانگین بیان نسبی ژن STS در ریشه، برگ و ساقه مامیران کبیر با آزمون دانکن

Figure 5. Mean comparison of STS gene relative expression in root, leaf, and stem of *Chelidonium majus* using Duncan's test.

- Facchini, P. J. and De Luca, V. 1995. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *Journal of Biological chemistry*, 269(43): 26684-26690.
- Facchini, P.J., Penzes, C., Johnson, A.G. and Bull, D. 1996. Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiology*, 112:1669-1677.
- Facchini, P. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 29-66.
- Facchini, P.J. and Park, S.U. 2003. Development and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 64: 177-86.
- Garcia, V.P., Valdes, F., Martin, R., Luis, G.C., Afonso, A.M. and Ayala, J.H. 2005. Biosynthesis of antitumoral and bactericidal sanguinarine. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 63518: 1-6.
- Gerardy, R. and Zek, M. H. 1993a. Purification and characterization of salutaridine: NADPH 7-oxidoreductase from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 34(1): 125-132.
- Gerardy, R. and Zank, M.H. 1993b. Formation of salutaridine from (R)- reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 32: 79-86.
- Hagel, J.M., Beaudoin, G.A.W., Fossati, E., Ekins, A., Martin, V.J.J. and Facchini, P.J. 2012. Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *Biological Chemistry*, 287: 42972-42983.
- Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1992. Tropane alkaloid biosynthesis: regulation and application. In proceedings of the 7<sup>th</sup> Annual Pennsylvania State Symposium on plant physiology. *American Society of plant physiologists*, 122-134.
- Ikezawa, N., Iwasa, K. and Sato, F. 2007. Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylopine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *FEBS Journal*, 274: 1019-1035.
- Ikezawa, N., Iwasa, K. and Sato, F. 2009. CYP719A subfamily of cytochrome P450 oxygenases and isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Reports*, 28: 123-133.
- Kleinwachter, M., Paules, J., Bloem, E., Schnug, E. and Selmar, D. 2015. Moderate drought and signal-transducer induced biosynthesis of relevant secondary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*), greater celandine (*Chelidonium majus*) and parsley (*Petroselinum crispum*). *Industrial Crops and Products*, 6: 158-168.
- Kutchan, T.M. and Dittrich, H. 1995. Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in plants. *Biological chemistry*, 270: 24475-24481.

در جمع‌بندی نهایی این تحقیق، متیل‌جاسمونات سبب افزایش بیان ژن *STS* در مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین شد، به طوری که بیشترین افزایش بیان در ریشه گیاه مامیران مشاهده گردید. بنابراین توالی ژن کدکننده آنزیم استیلوین سنتتاز در مسیر بیوسنتز سنگوئینارین و الگوی بیانی آن در گیاه مامیران کبیر می‌تواند در زمینه مهندسی مسیر این متابولیت ارزشمند استفاده شود.

## سیاسگزاری

بدین وسیله از مسئولان محترم دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) برای تأمین هزینه‌های مالی این تحقیق تشکر می‌گردد.

## References

- Ahmad, N., Gupta, S., Husain, M.M. and Mukhtar, H. 2000. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clin Cancer Research*, 6: 1524-1528.
- Allen, R.S., Miller, J.A.C., Chitty, J.A., Fist, A.J., Gerlach, W. L. and Larkin, P. J. 2008. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over expression and RNAi suppression of salutarinol 7- O-acetyltransferase opium poppy. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 22-30.
- Bari, R. and Jones, J.D.G. 2009. Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Molecular Biology*, 69: 473-488.
- Beaudoin, G.A. and Facchini, P.J. 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(3): 597-603.
- Castillo-Perez, L.J., Alonso-Castro, A.J., Fortanelli-Martínez, J. and Carranza-Alvarez, C. 2021. Biotechnological approaches for conservation of medicinal plants. In *Phytomedicine* (pp. 35-58). Academic Press.
- DeMelo, J.G., Santos, A.G., De Amorim, E.L.C., Do Nascimento, S.C. and De Albuquerque, U.P. 2011. Medicinal plant used as antitumor agents in Brasil: an ethnobotanical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 365:359.
- Elyasi, R., majdi, M., bahram nezhad, B. and mirzaghaderi, G. 2016. Expression analysis of genes involved in terpenes biosynthesis in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with methyl jasmonate. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 24(1): 54-65. doi: 10.22092/ijrfpbgr.2016.106167 (In Persian)

- the opium poppy. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101: 57-62.
- Winkler, A., Lyskowski, A., Riedl, S., Puhl, M., Kutchan, T. M. and Macheroux, P. 2008. A concerted mechanism for berberine bridge enzyme. *Chemical Biology*, 4: 739-741.
  - Yamada, Y., Yoshimoto, T., Yoshida, S. T. and Sato, F. 1992. Characterization of the promoter region of biosynthetic enzyme genes involved in berberine biosynthesis in *Coptis japonica*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-10.
  - Zhang, J. and Guo, Z. 2006. Effect of methyl jasmonic acid on bacatin III biosynthesis. *Tsinghua Science and Technology*, 11: 363-367.
  - Zhao, J. and Sakai, K. 2003. Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor-induced  $\beta$ -thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, 54: 647-656.
  - Zhourideh, Y., Mohammadi, Y. and Mashayekhi, M. 2022. Effect of methyl jasmonate on Taxol production and bap gene expression of *Taxus baccata*. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 30(1): 86-96. doi: 10.22092/ijrfpbgr.2022.357774.1411 (In Persian)
  - Li, J., Lee, E.J., Chang, L. and Facchini, P. J. 2016. Genes encoding norcoclaurine synthase occur as tandem fusions in the Papaveraceae. *Scientific Reports*, 6: 1-12.
  - Memelink, J. 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry*, 70(13-14): 1560-1570.
  - Moro, P. A., Cassetti, F., Giugliano, G., Falce, M. T., Mazzanti, G. and Menniti-IPolito, F. 2009. Hepatitis from greater celandine (*Chelidonium majus* L.): review of literature and report of a new case. *Ethnopharmacology*, 124: 328-332.
  - Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Springer Harbor Laboratory Press, New York.
  - Tome, F. and Colombo, M. L. 1995. Distribution of alkaloids in *chelidonium majus* and factors affecting their accumulation. *Phytochemistry*, 40: 37-39.
  - Venkatesh, K., Govindaraj, S., Ramachandran, A., Kalimuthu, S. and Perumal, E. V. 2011. Effect of ukrain on cell survival and apoptosis in the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. *Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology*, 30: 11-9.
  - Weid, M., Ziegler, J. and Kutchan, T. M. 2004. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in