Eco–phytochemical
Journal of Medicinal Plants
Print ISSN: 2322-3235
Online ISSN: 2783-4697
Islamic Azad University
Gorgan Branch
Iranian Society
of Medical Plants

Analysis of TYDC2 gene expression in the root, leaf, and stem tissues and its correlation with the rate of callus formation in the medicinal plant poppy (*Papaver somniferum* L.)

Nazila Bagheri[1*], Alireza Tarinejad[1], Mohammad Majidi[1], Karim Hasanpour[2]
[1] Department of Biotechnology, Shahid Madani University of Azerbaijan, Tabriz, Iran,
Email: bagheri12255@gmail.com
[2]Assistant Professor, Tabriz University, Tabriz, Iran.

Article type:
Research article

Article history
Received: 04-09-2024
Revised: 22-102024
Accepted: 29-10-2024

Keywords
Auxin Hormone
Callus Formation
Gene Expression
Sequencing

Abstract

Poppy, scientifically known as **Papaver somniferum** L., is a member of the Papaveraceae family. This plant contains over 40 different alkaloids, with the most significant being morphine, codeine, thebaine, noscapine, and papaverine. The purpose of this research is to identify the expression level of the TYDC2 gene in the stem, root, and leaf tissues of the poppy medicinal plant using Next Generation Sequencing (NGS) and to evaluate its relationship with the rate of callus formation in these tissues. Investigating the expression of the TYDC2 gene can provide insights into the biological mechanisms involved in callus formation and the development of various plant tissues. Additionally, it may help improve techniques for tissue culture and the production of medicinal plants. In this study, the sequence of the TYDC2 gene in the three tissues (stem, root, and leaf) was selected from the Gene section of the NCBI website and downloaded using the SRA Toolkit. The quality of the data was assessed with FastQC, and a heatmap diagram was created using RStudio software, along with other gene expression comparison charts. Next, Murashige and Skoog culture medium was prepared with 2,4-D hormone at a concentration of 2 mg/liter. The mentioned tissues were placed in this medium, and the percentage of callus formation, along with the diameter and weight of the callus, was measured and compared with the level of gene expression. Finally, the gene was analyzed using gene ontology via g: profiler. The results indicated that the expression levels of the TYDC2 gene varied across the stem, root, and leaf tissues of the poppy. The highest expression level was found in the leaf tissue, while the lowest was observed in the root tissue. Additionally, the results of the callus formation with the 2,4-D hormone (2 mg/liter) in vitro showed that callus formation was highest in the leaf tissue and lowest in the root tissue, indicating a direct relationship between gene expression and the amount of callus formed in these tissues. This research contributes to the advancement of scientific knowledge in plant genetics and biotechnology and serves as a reference for future studies in this field.

Cite this article as: Bagheri, N., Tarinejad, A.R., Majidi, M., Hasanpour, K. (2024). Analysis of TYDC2 gene expression in the root, leaf, and stem tissues and its correlation with the rate of callus formation in the medicinal plant poppy (*Papaver somniferum* L.). *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants.*, 12(3): 129-142

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی
شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۳۲۳۵
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۹۷
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
انجمن گیاهان دارویی ایران ثبت ۱۸۹۶۳

بررسی بیان ژن TYDC2 در بافت‌های ریشه، برگ، ساقه و ارتباط آن با میزان کالوس‌زایی این بافت‌ها در گیاه دارویی خشخاش (*Papaver somniferum* L.)

نازیلا باقری[1*]، علیرضا تاری نژاد[1]، محمدمجیدی[1]، کریم حسن‌پور[2]

[1] گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، رایانامه: bagheri12255@gmail.com

[2] استادیار دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۰۶/۱۴
تاریخ بازنگری:۱۴۰۳/۰۸/۰۱
تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۰۸/۰۸

واژه‌های کلیدی:
بیان ژن
توالی‌یابی
کالوسزایی
هورمون اکسین

چکیده

خشخاش با نام علمی *Papaver somniferum* L. متعلق به خانواده Papaveraceae است. بیش از ۴۰ نوع آلکالوئید، در خشخاش شناخته شده است که مهمترین آنها مورفین، کدئین، تبائین، نوسکاپین و پاپاورین می‌باشد. هدف از این پژوهش؛ شناسایی میزان بیان ژن TYDC2 در سه بافت ساقه، ریشه و برگ گیاه دارویی خشخاش از طریق NGS بوده و ارتباط آن را با میزان کالوس‌زایی این بافت‌ها ارزیابی می‌کند. بررسی بیان ژن TYDC2 می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های بیولوژیکی که در فرآیند کالوس‌زایی و توسعه بافت‌های مختلف گیاه دخیل هستند و همینطور به بهبود روش‌های کشت بافت و تولید گیاهان دارویی کمک کند. در این تحقیق، توالی این ژن در سه بافت ساقه، ریشه و برگ گیاه خشخاش، از بخش Gene سایت NCBI انتخاب شد و توسط ابزار SRAtoolkit دانلود گردید و کیفیت آن‌ها توسط ابزار fastqc مورد ارزیابی قرار گرفت و نمودار heatmap با نرم افزار Rstudio و سایر نمودارهای مقایسه بیان ژن، ترسیم گردید. در ادامه، محیط کشت موراشیک-اسکوگ با هورمون 2,4-D با غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر تهیه شد و بافت‌های ذکر شده در این محیط قرار گرفت و درصد کالوسزایی، قطر و وزن کالوس بررسی شد و با میزان بیان ژن مقایسه گردید. در انتها، این ژن با ژن آنتولوژی توسط gprofiler مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد؛ میزان بیان ژن تولیدی در بافت‌های ساقه، ریشه و برگ گیاه دارویی خشخاش، متفاوت بوده و میزان بیان در بافت برگ بیشتر از سایر بافت‌های مورد آزمایش می‌باشد. کمترین میزان بیان نیز در بافت ریشه مشاهده گردید و همینطورنتایج کالوسزایی این سه بافت گیاهی با هورمون 2,4-D (۲ میلی‌گرم بر لیتر) در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد، که میزان کالوسزایی در بافت برگ بیشتر از سایر بافت‌ها بوده و کمترین میزان کالوسزایی نیز در بافت ریشه مشخص گردید، که نشان دهنده‌ی ارتباط مستقیم بین بیان ژن و میزان کالوسزایی در بافت‌ها است. این تحقیق می‌تواند به گسترش دانش علمی در زمینه ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهی کمک کرده و به عنوان مرجع برای تحقیقات آینده در این حوزه عمل نماید.

استناد: باقری، نازیلا؛ تاری‌نژاد، علیرضا؛ مجیدی، محمد؛ حسن‌پور، کریم. (۱۴۰۳). بررسی بیان ژن TYDC2 در بافت‌های ریشه، برگ، ساقه و ارتباط آن با میزان کالوس‌زایی این بافت‌ها در گیاه دارویی خشخاش (*Papaver somniferum* L.). *فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی*، ۱۲ (۳)، ۱۴۲-۱۲۹.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

گیاهان دارویی، دسته‌ای از گیاهان هستند که به علت داشتن خواص دارویی از زمان‌های قدیم مورد استفاده انسان بوده است. این خواص دارویی به دلیل وجود ترکیبات مختلفی است که در طول واکنش‌های متابولیکی، در آن‌ها انباشته می‌شود (Ghasemi, Kumleh, & Kordrostami, 2019). متابولیت‌های ثانویه ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که از متابولیت‌های اولیه مشتق می‌شوند و نقشی در متابولیسم‌های اولیه ندارند، این ترکیبات بیشتر خاصیت دارویی دارند (Alqethami & Aldhebiani, 2021). یکی از مهمترین گروه متابولیت‌های ثانویه، آلکالوئیدها می‌باشند. آلکالوئیدهای گیاهی یکی از بزرگترین گروه ترکیبات طبیعی هستند که فراورده‌های دارویی متنوعی از آن‌ها تولید می‌شود (Leite Dias & D'Auria, 2024). آلکالوئیدهای گروه مورفین در خشخاش از دو مولکول اسید آمینه ال-تیروزین به واسطه‌ی ۱۷ مرحله‌ی آنزیمی طی چندین واکنش اکسیداتیو پیوسته، سنتز می‌گردند. اولین آنزیم کلیدی در این مسیر، ال-تیروزین دکربوکسیلاز (TYDC2) می‌باشد (شکل ۱). پتانسیل تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی در شرایط طبیعی بسیار محدود بوده و عوامل مختلفی نظیر شرایط اقلیمی و محیطی تولید آن‌ها را با محدودیت مواجه می‌نماید. محققین برای رفع این تنگنا، از تکنیک‌های جدید نظیر کشت سلول و بافت گیاهی، هیبریداسیون سوماتیکی و مهندسی متابولیک استفاده می‌کنند. با روش توالی‌یابی می‌توان تولید برخی از آلکالوئیدها را دربافت‌های مختلف شناسایی کرد و به چرخه‌ی تولید این آلکالوئیدها در گیاهان دست یافت. بنابراین هرگونه تحقیقات و مطالعات در زمینه‌ی شناخت مکانیسم بیوسنتز آن‌ها و شناسایی گونه‌های گیاهی تولیدکننده‌ی این مواد بسیار ارزشمند و ضروری است(Hori et al., 2018). به طورکلی، آلکالوئیدهای خشخاش به‌دلیل خواص دارویی و اقتصادی خود، نقش مهمی در پزشکی و صنعت دارند و تحقیقات در این زمینه می‌تواند به بهبود درمان‌ها و تولید داروهای جدید منجر شود، آلکالوئیدهای موجود در خشخاش، به ویژه مورفین و کدئین، به عنوان مسکن‌های قوی در پزشکی مطرح هستند که این ترکیبات در درمان دردهای شدید و مدیریت درد پس از جراحی می‌توانند تاثیرگذار باشند (Aghaali & Naghavi, 2024). آلکالوئیدهای خشخاش به عنوان مدل‌های تحقیقاتی در مطالعات دارویی و فارماکولوژی مورد استفاده قرار گرفته و می‌توانند به درک بهتر از مکانیسم‌های عمل داروها و تأثیرات آن‌ها بر روی سیستم عصبی کمک قابل توجهی داشته باشند. علاوه بر آن: با توجه به خواص دارویی آلکالوئیدهای خشخاش، از آن می‌توان به عنوان پیش‌سازهایی برای تولید داروهای جدید و مؤثر در درمان بیماری‌ها استفاده کرد (Májer & Németh, 2024). و در نهایت، مطالعه بر روی ژن‌ها و مسیرهای بیوشیمیایی تولید آلکالوئیدها می‌توانند به توسعه روش‌های بیوتکنولوژیکی برای افزایش تولید این ترکیبات در گیاهان و همچنین در سیستم‌های کشت بافت کمک کند(Vadhel et al., 2023). نگاهی به تقاضای قانونی سالیانه ۷۰۰ تن مورفین در جهان و توجه به این نکته که هیچکدام از آلکالوئیدهای خشخاش (به غیر از Protopine، Crptopine، Thebaine) در هیچ جنس گیاهی به غیر از Papaver وجود ندارد. اهمیت گیاه خشخاش را به عنوان تنها منبع تامین کننده آلکالوئیدهای تامین کننده گروه مورفین (مورفین، تبائین، کدئین، نارکوتین و غیره) روشن می‌کند. بررسی ژن‌های مهم وکلیدی در سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاه خشخاش از اهمیت بسیاری برخوردار است. برای این منظور از فناوری نوظهور توالی‌یابی

نسل بعد، برای تجزیه و تحلیل کمی و کیفی پروفایل بیان ژن استفاده می‌شود. بنابراین شناسایی ژن‌های موثر در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه خشخاش که کاندیدهای مناسبی برای دست‌ورزی‌های بعدی به منظورافزایش تولید ترکیبات دارویی این گیاه می‌باشند، یکی از موضوعات اصلی محققین می‌باشد. تکنولوژی توالی یابی با توان بالا بیان هزاران ژن را به صورت همزمان انجام می‌دهد(Arumuganathan & Earle, 1991). شناخت نحوه پاسخ و عمل ژن‌ها می‌تواند اطلاعات بسیار مفیدی در رابطه با نحوه‌ی اصلاح گیاهان در جهت افزایش عملکرد فراهم کند. اهمیت شناخت تنظیم بیان ژن‌ها در بیوسنتز آلکالوئیدها توسط محققین گزارش شده است و مطالعه‌ی ترانسکریپتوم برای درک و تفسیر عملکردی ژنوم یک موجود زنده از ضروریات به شمار می‌رود (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, & Seki, 2003). در سال‌های اخیر روش‌های توالی‌یابی با توان بالا که توالی یابی نسل دوم نیز نامیده می‌شود. حجم بالایی از اطلاعات بیولوژیکی را با هزینه و زمان کم در مقایسه با روش‌های قدیمی ایجاد کرده است. ماریونی و همکاران(Marioni, Mason, Mane, Stephens, & Gilad, 2008). پروفایل بیان ژن را با استفاده از RNA-seq و با پلتفرم Illumina و با آرایه‌های Affymetrix ارزیابی نموده و به این نتیجه رسیدند که RNA-seq نه تنها ژن‌هایی با بیان متمایز را توضیح می‌دهد بلکه همچنین توانایی تشخیص رونوشت‌هایی با سطح بیان پایین، شناسایی انواع توالی‌ها و رونوشت های جدید را نیز دارد. کشت بافت یکی از تکنیک‌های مهم وضروری در بیوتکنولوژی گیاهی است که موجب تولید و تکثیر گیاهان از ریزنمونه‌ها در شرایط کنترل‌شده می‌شود. اهمیت کشت بافت در گیاه دارویی خشخاش **(**Papaver**)** در چندین جنبه از جمله: تولید انبوه گیاهان، محافظت و نگهداری ذخایر ژنتیکی، تولید گیاهان عاری از ویروس و بیماری و همینطور، به عنوان ابزاری برای تحقیق و توسعه در زمینه‌ی ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهی مطرح است(Ngernsaengsaruay et al., 2023). کشت بافت گیاهی یکی از مهمترین تکنیک‌های تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه است، زیرا پتانسیل تولید این مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد. کشت بافت یکی از فرایندهای مهم کشاورزی مولکولی می باشد. یوشیکاوا و فورویا گزارشی از تولید کدئین در کالوس با سطوح نسبتا بالایی از کینتین گزارش کردند. ویلمن نیز جنین زایی با عملکرد بالا توسط کشت بافت با هورمون 2,4-D را گزارش داد (Yoshikawa & Furuya, 1983). در حالی که موفقیت بزرگی در کشت سلول گیاهی از نظر سلول‌هایی با بازده بالای بنزیل ایزوکوئینولین‌ها وجود داشته است، از دیدگاه تجاری و دارویی، تولید مورفین در کشت‌های سلولی گیاهی دشوار است. اکثر بافت‌های خشخاش کشت شده، به شکل کالوس یا سوسپانسیون سلولی، به راحتی سنگوئینارین، دی هیدروسنگوئینارین و اکسی سنگوئینارین تولید می‌کنند. محققان پیشنهاد می‌کنند که شرایط کشت را می‌توان برای ارتقاء تولید آلکالوئید مورفین دستکاری کرد (Aghaali, Naghavi, & Zargar, 2024). هدف از این تحقیق مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی تحلیل و بررسی میزان بیان ژن در بافت‌های ریشه، برگ و ساقه‌ی گیاه دارویی خشخاش و همینطور کالوسزایی از بافت‌های ذکر شده با هورمون 2,4-D (۲ میلی‌گرم بر لیتر) می‌باشد که می‌تواند کمک شایانی در جهت تولید این بافت گیاهی نسبت به سایر بافت‌ها در جهت تولید آلکالوئیدهای خشخاش شود، چرا که شناسایی میزان بیان ژن در بافت‌های مختلف می‌تواند باعث افزایش سطح تولید و کاهش هدر رفت زمان، امکانات و

تجهیزات شود. نظر به اینکه بررسی بیان ژن TYDC2 و ارتباط آن با کالوسزایی در گیاه دارویی خشخاش تاکنون مطرح نشده است، این مطالعه برای تولید آلکالوئید این گیاه می‌تواند مفید باشد.

شکل ۱: ترسیم شکل سه بعدی پروتئین tyrosine/DOPA decarboxylase 2 توسط swiss-model (توالی FASTA این پروتئین توسط NCBI گرفته شد و در ابزار ذکر شده قرار گرفت)

مواد و روش‌ها

مکان و زمان انجام آزمایش: قسمت اول این تحقیق که مربوط به تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی بود، به کمک نرم افزارهای تحت وب و تحت لینوکس صورت گرفته است. قسمت دوم که مربوط به کالوسزایی می‌باشد در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان در سال ۱۴۰۲-۱۴۰۳ صورت گرفت.

بررسی آلکالوئیدها در گیاه دارویی خشخاش از طریق رهیافت بیوانفورماتیک: استخراج داده: برای این کار، توالی سه بافت مختلف (ریشه، ساقه و برگ) مربوط به خشخاش (*P. somniferum* L.) از بخش Gene، سایت NCBI انتخاب گردید (جدول ۱). پس از انتخاب این بافت‌ها از قسمت SRA، از طریق ابزار SRAtoolkit دانلود این داده‌ها صورت گرفت.

جدول ۱: داده‌های مربوط به بافت‌های مختلف برگرفته از سایت NCBI

نوع بافت	دیتا
ریشه	SRR15146363
برگ	SRR6378472
ساقه	SRR6782291

کنترل کیفی داده‌ها: در مرحله‌ی بعدی، با ابزار fastqc به کنترل کیفی پرداخته شد، که پس از اتمام دو فایل html ایجاد گردید که کیفیت داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. اکثر داده‌ها دارای کیفیت خوانش بالایی بودند و آن‌هایی که کیفیت خوانش پایین داشتند با ابزار Trimmomatic، برش خورده، اصلاح گردید. در این مرحله از نرم افزار Trimmomatic، کیفیت هر نوکلئوتید به صورت جداگانه و همین‌طور کیفیت کلی خوانش فیلتر می‌شوند. حذف نوکلئوتیدها با کیفیت پایین از سمت ′۵ با انتخاب گزینه‌ی LEADING و حذف نوکلئوتیدها با کیفیت پایین از سمت ′۳ با انتخاب گزینه‌ی TRAILING صورت می‌گیرد. در

صورتی که بخواهیم تعدادی از نوکلئوتیدها را به صورت همزمان بررسی کرده و نوکلئوتیدهایی با کیفیت پایین‌تر از عدد مدنظر فیلتر گردد، از گزینه‌ی SLIDINGWINDOW استفاده گردید و دوباره با ابزار fastqc کنترل کیفی صورت گرفت.

هم ردیفی با ژنوم مرجع: خوانش‌ها با ژنوم مرجع هم ردیف شده تا مشخص شود که هر خوانش به کدام قسمت از ژنوم مرجع متصل می‌شود، برای این کار در ابتدا ژنوم مرجع با فرمت fasta دانلود شده و با ابزار hisat2-build به index گیاه خشخاش تبدیل شد. داده‌های فیلتر شده با نام fastq توسط ابزار hisat2 به داده‌ی SAM تبدیل شد. داده‌های SAM توالی‌های موجود در فایل fastq با ژنوم مرجع Align شده و اولین فایل خروجی به نام SAM را ایجاد می-کند که مشخص می‌کند هر کدام از خوانش‌ها مربوط به کدام بخش از ژنوم می‌باشند. در قسمت بعد داده‌های SAM تولید شده با ابزار samtools به فایل BAM تبدیل شد. فایل BAM فرمت باینری فشرده از فایل SAM می‌باشد. BAM به‌طور فزاینده‌ای به عنوان یک جایگزین برای صرفه‌جویی در فضا به جای فایل‌های FASTQ خام استفاده می‌شود و همه نرم‌افزارهای Alignment فعلی می‌توانند SAM/BAM را به عنوان فرمت خروجی تولید کنند. پس از ایجاد فرمت BAM، فایل را می‌توان ایندکس کرده و دسترسی سریعی به هر منطقه از ژنوم مرجع را فراهم نمود(Cánovas, Moffat, & Turpin, 2016). سپس فایل BAM توسط HTseq-count به فایل count تبدیل گردید(جدول۲) و در نهایت نمودارهای بیان ژن در بافت‌های ذکر شده توسط نرم افزار Rstudio ترسیم شد و مورد بحث و بررسی قرار گرفت.

جدول ۲: خلاصه‌ای از geneid در سه بافت ساقه، ریشه و برگ گیا دارویی خشخاش ومیزان بیان ژن در هرکدام از بافت‌ها

شناسه ژن	برگ	ریشه	ساقه
LOC113324569	۰	۰	۰
LOC113276494	۰	۹۳	۰
LOC113324709	٦٢	۰	۳۸
LOC113324717	۰	۰	۰
LOC113276501	٦	۱۸	۲۱
LOC113324596	۰	۰	۰
LOC113276507	۱۰	۵	۲۱
LOC113276513	۱۵	۱۳	۳۳۸
LOC113324603	۰	۰	۰
LOC113324612	٥٤	۰	۱
LOC113324620	۰	۰	۰
LOC113276520	٤٠٨	۳۵۸	۱٦٤
LOC113324726	۱	۵	۵
LOC113276546	۱۵٤	۱٦۸	۱۸٤
LOC113324738	۳۹	۹۷	۲۳
LOC113276554	۳۸	۵۳	۲٦
LOC113276571	۲٤٦	۱۲۵	۸۹
LOC113324749	۰	۱	۰
LOC113276583	۳٤۷	٤۲۸	۱۳٤
LOC113324632	۰	۰	۰
LOC113324642	۳	۰	۰
LOC113324651			
TRNAL-AAG			
LOC113324655			
TRNAP-AGG			
LOC113276601			
TRNAP-AGG_1			
LOC113276609			
LOC113276618			
LOC113276629			

LOC113324664	۷	٤	۲
LOC113341692	۰	۰	۰
LOC113324755	۱۱	۲٦	۱۱
LOC113324761	۰	۰	۰
	٤٤	۳۸	۱٦۱
	۰	۰	۰
	۹۰	۳۱۲	۲۲۹
	۵۸	۷٤	۱۱٤
	۱۹۵	۲۵۷	۳۰۹
	۰	۰	۰
	۰	۰	۰
	۲۲	۱۸	٤
	۰	۰	۰

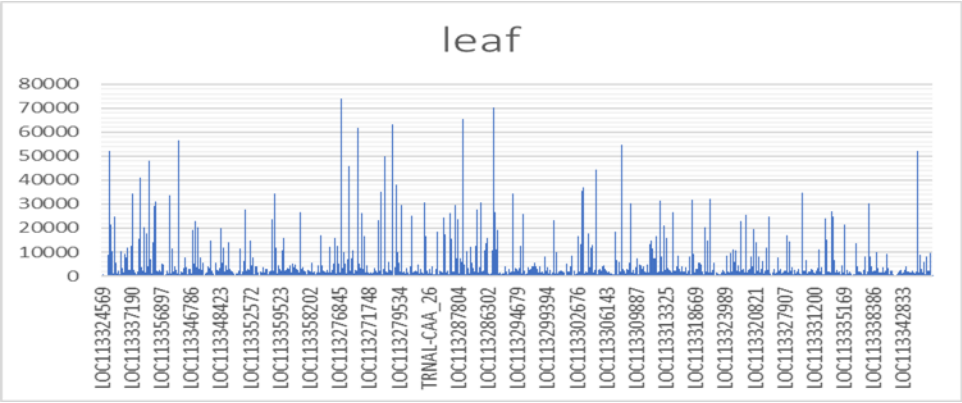
بررسی کالوسزایی بافت‌های مختلف گیاه دارویی خشخاش در شرایط درون شیشه‌ای: ضدعفونی و کشت بذر: بذر گیاه دارویی خشخاش ابتدا با آب مقطر (v/v) به مدت ۵ دقیقه مورد شستشو قرار گرفت، سپس با الکل ۷۰ درصد (v/v) به مدت یک دقیقه، شستشو با آب مقطر برای بار دوم به مدت ۳ دقیقه و استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (w/v) به مدت ده دقیقه و شستشو سه مرتبه ای با آب مقطر برای بار سوم به مدت دو دقیقه، ضدعفونی شدند. سپس بذور استریل شده در محیط MS ۱/۲ درون شیشه مربا کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در زیر نور فلورسنت سفید ملایم بر روی قفسه‌ها نگهداری گردید. بعد از گذشت ۱۲ روز بذور شروع به جوانه زنی کردند.

تهیه‌ی ریزنمونه و تیمار با هورمون: از بذور جوانه زده تحت شرایط استریل ریزنمونه‌های برگچه، ریشه چه وساقه چه و به محیط کشت MS حاوی هورمون کالوسزایی منتقل شدند. جهت کالوسزایی ریزنمونه‌ها از محیط MS استفاده شد. بعد از تهیه‌ی محیط موراشیک- اسکوگ، pH آن را در حدود ۵/۷ تنظیم شد و آگار به میزان ٦ گرم جهت بستن محیط اضافه گردید. استریل تمامی ترکیبات داخل محیط کشت، در دستگاه اتوکلاو تحت دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. بعد از قرار گرفتن اکسپلنت‌ها در محیط موراشیک- اسکوگ، تحت تیمار هورمونی، پتری‌دیش‌ها، تحت شرایط کنترل شده‌ی نوری و دمایی (متوسط دما ۲۵ درجه و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس) در اتاقک رشد قرار گرفت که بعد از گذشت ۲۰ روز تعدادی از ریزنمونه‌ها به کالوس رفتند که از لحاظ قطر و وزن کالوس و درصد کالوسزایی مورد بررسی قرار گرفتند و نمودار آن ترسیم شد.

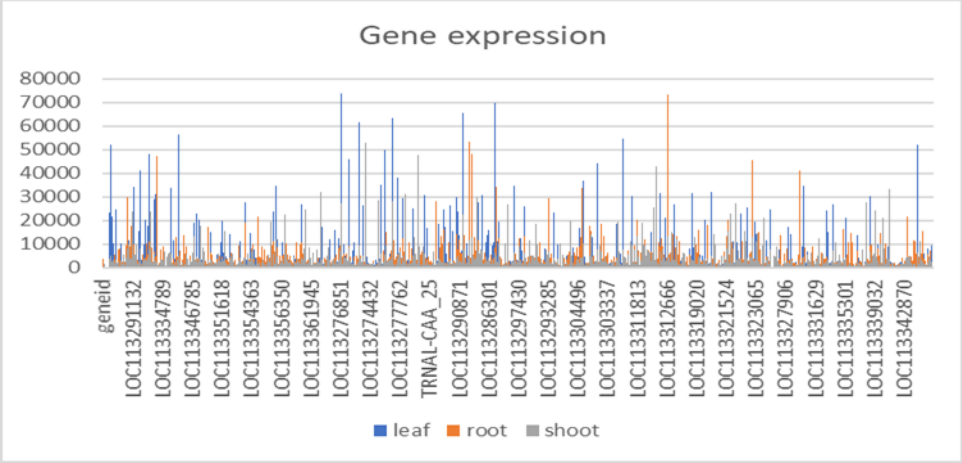
نتایج

بررسی بیان ژن در بافت‌های مختلف گیاه دارویی خشخاش: برخی از مولکول‌ها، نقش‌های کلیدی را در طول و رشد کالوس ایفا می‌کنند. به عنوان مثال، خانواده فاکتورهای رونویسی (LBD) مانند، LBD16، LBD17، LBD18 می‌توانند بیان فاکتورهای پاسخ اکسین، ARF7 و ARF19 را تقویت کنند(D.-K. Lee, Geisler, & Springer, 2009). در پژوهشی، ژن‌های ARR1 و ARR21 برای ایجاد کالوس در آرابیدوپسیس شناسایی شده‌اند(Sakai et al., 2001). ۱۵ ژن مانند(Eucgr.D00640، Eucgr.B00171،

(Eucgr.C00948، Eucgr.K01667، Eucgr.C00663) در اکالیپتوس شناسایی شده است که نقش مهمی در طول توسعه کالوس ایفا می‌کنند(Kanei, Horiguchi, & Tsukaya, 2012). در گزارشی عنوان شده است که؛ Eucgr.E01615 که پروتئین EXPB2 را کد می‌کند، در طول فرآیند بلوغ کالوس در گیاه اکالیپتوس، نقش مثبتی دارد(Santelia et al., 2005). در مطالعه‌ای، مشخص شد که افزایش بیان ژن BBE منجر به افزایش فنانترن‌ها می‌شود(Tilkat, Ayaz Tilkat, Akkaya, & Özden Çiftçi, 2024). در پژوهشی دیگری بیان شد که میزان افزایش بیان ژن CYP80B3 منجر به افزایش آلکالوئیدهای موجود در لاتکس می‌شود(Tilkat et al., 2024). میزان بیان ژن با میزان کالوسزایی می‌تواند رابطه‌ی مستقیم داشته باشد. در این مطالعه نیز، داده‌های مختلف از بافت‌های متفاوت بدست آمده نشان دهنده‌ی تفاوت در میزان بیان ژن است. تغییرات بیان نسبی ژن TYDC2 در هر سه بافت ذکر شده به صورت تنظیم مثبت بوده است و در بافت برگ در مقایسه با دو بافت دیگر بیان بیشتری برای ژن دیده شد(شکل۲)، که این را می‌توان به محل تولید و تجمع ماده‌ی موثره این ژن مرتبط دانست. تولید مواد موثره در گیاهان دارویی معمولا تحت تاثیر ژنوتیپ و عوامل محیطی قرار دارد(D'Antuono, Moretti, & Lovato, 2002). تغییرات اقلیمی و فصول مختلف سال می‌تواند بر روی میزان و ترکیبات عصاره گیاهان دارویی تاثیرگذار باشد. تحقیقات نشان داده است که میزان ماده‌ی موثره و بیان ژن‌های تولیدکننده آن‌ها در اندام‌ها و گیاهان هیچگاه ثابت نیست و متناسب با مراحل رشدی گیاه، شرایط محیطی و فصل‌های مختلف قابل تغییر است(Miranda et al., 2012). بعد از بافت برگ، بیشترین میزان بیان در بافت ساقه مشاهده شد. کمترین میزان بیان نیز در بافت ریشه عنوان شد. میزان بیان در این سه بافت به طور همزمان نیز مورد بررسی قرار گرفت که نمودار آن در شکل ۳ نشان داده شده است. نمودار heatmap که میزان بیان را نشان می‌دهند در شکل ٤ آورده شده است. نقاط قرمز در نمودار heatmap که نشان دهنده‌ی بیشترین درگیری است، متعلق به بیان ژن در بافت برگ می‌باشد.

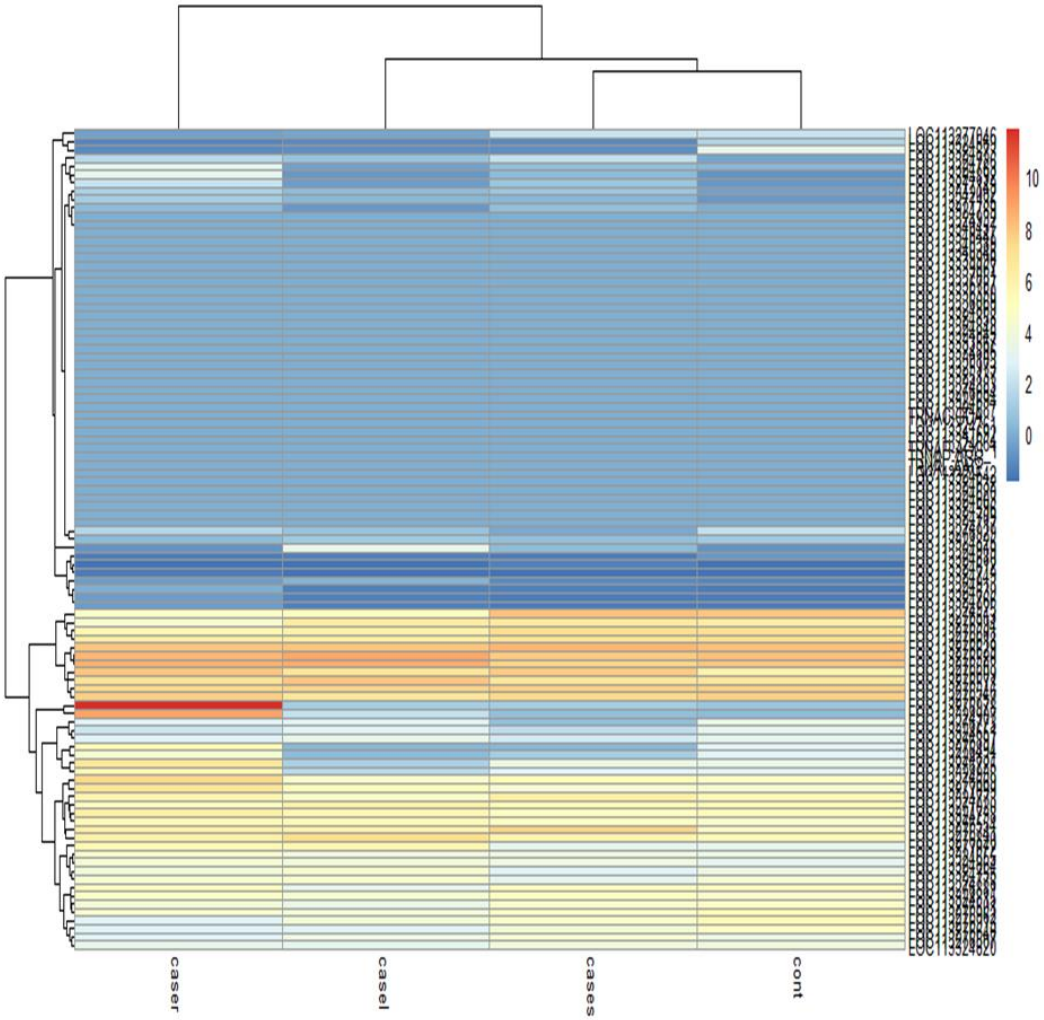


شکل۲: بیان ژن TYDC2 در بافت برگ



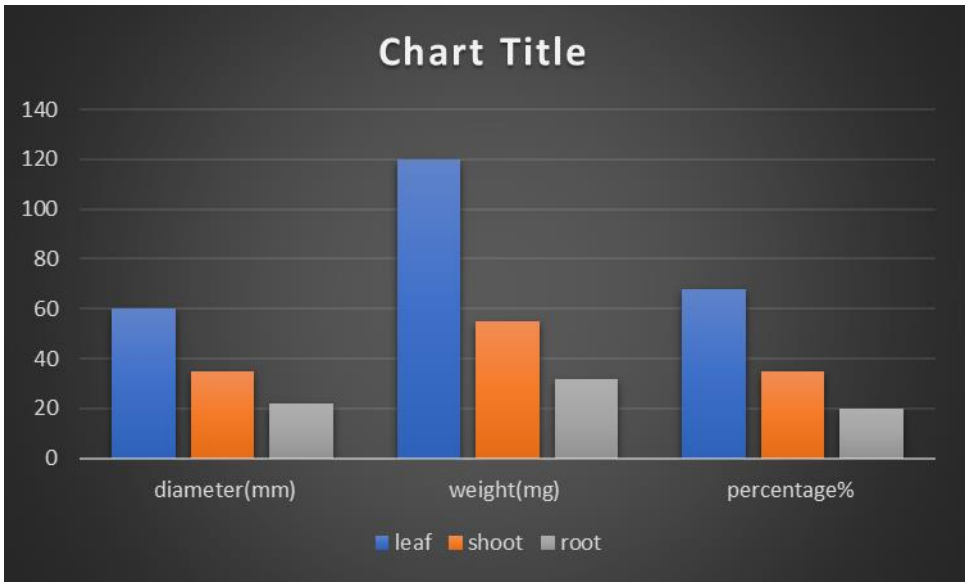
شکل۳: مقایسه بیان ژن TYDC2 در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه

(همانطور که مشخص است میزان بیان ژن در بافت برگ بیشتر از سایر ریزنمونه‌ای ساقه و ریشه می‌باشد)

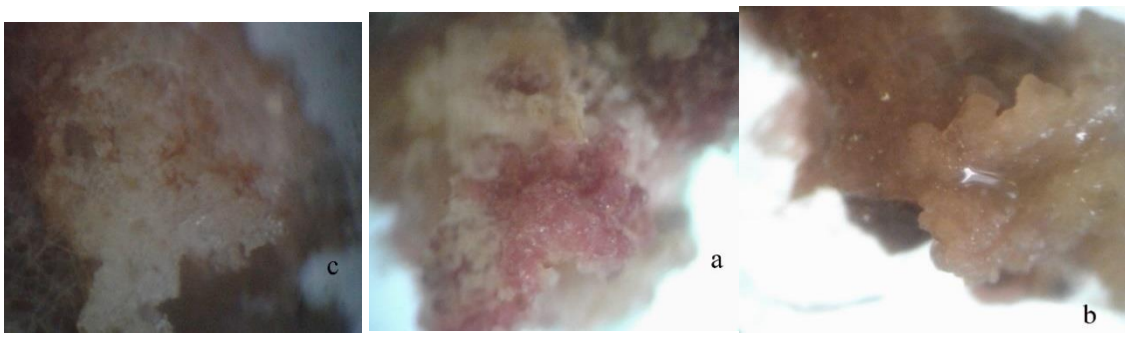


شکل ٤: نمودار heatmap مربوط به سه بافت ذکر شده(نقاط آبی، شدت بیان کمتر و نقاط قرمز، شدت بیان بیشتر را نشان می‌دهد. ستون اول از سمت چپ، بیشترین بیان اتفاق افتاده است که مربوط به بافت برگ می‌باشد)

بررسی کالوسزایی بافت‌های ساقه، ریشه و برگ تحت تیمار هورمون 2,4-D : کالوس‌زایی یکی از فرایندهای مهم کشاورزی مولکولی است. یکی از مهمترین کاربردهای کشت بافت، ریزازدیادی و تکثیر سریع است که در مقایسه با تکثیر به روش سنتی؛ ریزازدیادی از طریق کشت بافت با مزیت تکثیر سریع و یکنواخت از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. بنابراین تکنیک درون شیشه‌ای مطلوب‌ترین روش برای جمع‌آوری، تکثیر و ذخیره‌ی ژرم پلاسم است. در تحقیقات مختلف کالوسزایی گیاهان بیشترین نوع کالوس‌زایی متعلق به بافت برگ در گیاهان می‌باشد. در مطالعه‌ای، کالوسزایی برگ گیاه دارویی مورد با هورمون 2,4-D (۳میلی گرم بر لیتر) نسبت به سایر بافت‌ها مثل ساقه و ریشه، درصد بیشتری، گزارش شده است(Bagheri, Maleki Zanjani, & Ammarlou, 2020). در این بررسی نیز مشاهده شد؛ که بیشترین میزان کالوسزایی متعلق به بافت برگ و کمترین کالوسزایی متعلق به بافت ریشه می‌باشد، در این بررسی قطر و وزن کالوس نیز ارزیابی شد(شکل۵). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بیشتر بودن بیان ژن در یک بافت که نتیجه‌ی تجمع مواد موثره‌ی بیشتر است می‌تواند دلیلی برای کالوسزایی بیشتر نیز باشد، چرا که هزاران ژن بیان‌شده در یک سلول خاص، تعیین می‌کنند که آن سلول چه عملکردی داشته باشد. علاوه‌بر این، هر مرحله در جریان اطلاعات از DNA به RNA و به پروتئین، یک نقطه کنترلی جهت خودتنظیمی عملکرد سلول وجود دارد که مقدار و نوع پروتئین‌هایی که در سلول تولید می‌شوند را تنظیم می‌کند(Romero, Ruvinsky, & Gilad, 2012). در هر زمان، مقدار یک پروتئین خاص در یک سلول، حاصل تعادل بین مسیرهای سنتز و تخریب آن پروتئین در سلول است(Eckert et al., 2004). در سمت سنتز این تعادل، تولید پروتئین از رونویسی (DNA به RNA) شروع می‌شود و با ترجمه (RNA به پروتئین) ادامه می‌یابد(Diaz-Bárcena & Giraldo, 2023; M.-L. T. Lee, Kuo, Whitmore, & Sklar, 2000). بنابراین، کنترل این فرآیندها نقش مهمی در تعیین اینکه چه پروتئینی و با چه مقداری در یک سلول وجود داشته باشد، ایفا می‌کند. علاوه بر این، روشی که در طی آن سلول رونوشت‌های RNA و پروتئین‌های تازه ساخته‌شده خود را پردازش می‌کند نیز، بر سطح پروتئین تأثیر زیادی دارد(Birnie et al., 2008). بدست آوردن بیان ژن در بافت‌های مختلف موجب پیشرفت در تولید و کاهش زمان و تجهیزات خواهد شد. میزان بیان ژن در بافت‌های مختلف یک گیاه در تولید آن گیاه و نیل به اهداف، می‌تواند کمک قابل توجهی داشته باشد. در این آزمایش، رابطه‌ی مستقیمی بین بیان ژن و کالوسزایی برقرار بود به طوری که هرچه میزان بیان ژن در یک بافت بیشتر بود، میزان کالوسزایی آن بافت نیز نسبت به سایر بافت‌ها روند افزایشی را نشان داد. نتایج کالوسزایی در سه بافت مورد مطالعه در شکل ٦ گزارش شده است.



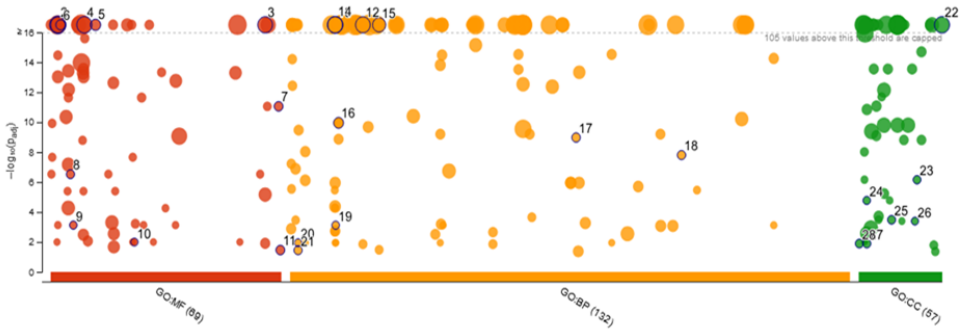
شکل۵: نمودار مربوط به تغییرات کالوسزایی در ریزنمونه‌ها به ازای غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر از هورمون2,4-D، که برحسب درصد کالوسزایی(بیشترین درصد مربوط به برگ و کمترین درصد کالوسزایی مربوط به ریشه می‌باشد)، وزن کالوسزایی(بیشترین وزن کالوس مربوط به ریزنمونه‌ی برگ و کمترین وزن مربوط به ریزنمونه‌ی ریشه می‌باشد) و قطر کالوس(که بیشترین و کمترین قطر کالوس به ترتیب مربوط به برگ و ریشه است)بیان شده است.



شکل٦: کالوسزایی سه ریزنمونه‌ی a)برگچه، b)ساقه چه و c)ریشه چه در محیط MS حاوی غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر از هورمون 2,4-D

بررسی ژن آنتولوژی: هستی شناسی ژن (Cánovas et al.)یک ابتکار بیوانفورماتیک بزرگ برای یکسان سازی نمایش ژن و ویژگی‌های محصول ژن در همه گونه‌ها است (Consortium, 2008). در واقع، برای استفاده از یک نمایش و هستی‌شناسی واحد برای بیان ویژگی‌های ژن‌ها و محصولات ژنتیکی است. در این تحقیق نیز برای بدست آوردن فرایند بیولوژیکی(BP)، عملکرد مولکولی(MF) و اجزای سلولی(cc) از سایت gprofiler استفاده گردید. بررسی GO مربوط به ژن TYDC2 در بافت برگ، نشان داد که ژن‌های با افزایش بیان مربوط به گروه فرایندهای بیولوژیکی(BP) شامل فرایندهای متابولیکی از قبیل فعالیت بیوسنتز سلولاز، بیوسنتز ترهالوز، فرایند متابولیک ٦ فسفات می‌باشد. در گروه(MF) نیز فرایندهایی مثل؛ اکسیداسیون-احیا و فتوسنتز مطرح می‌باشد. در گروه ترکیبات سلولی(cc) نیز می‌توان به سازماندهی دیواره‌ی سلولی اشاره کرد(شکل۷). بیشترین نقش را در این فرایند مربوط به فرایندهای

بیولوژیکی می‌باشد. همانطور که مشخص است، محور yها، -log10(padj) را نشان می‌دهد که لگاریتم مقدار احتمال اصلاح شده برای هر داده را بیان می‌کند. در محور xها نیز گروه فرایندهای بیولوژیکی(نقاط نارنجی رنگ)، عملکرد مولکولی(نقاط قرمز رنگ) و قسمت سبز رنگ نیز اجزای سلولی را نمایش می‌دهد. در این پژوهش، میزان فرایندهای بیولوژیکی بیشترین نقش را داشته است.



شکل۷: ژن آنتولوژی برای ژن TDYC2

بحث

گیاه دارویی خشخاش یکی از مهمترین و استراتژیک‌ترین محصولات در جهت تولید دارو می‌باشد. بنابراین ایجاد الگوی مناسب تولید در این گیاه دارویی، امری ضروری و مهم است. ژن TYDC2 نیز از مهمترین ژن‌های سنتز آلکالوئید به خصوص آلکالوئید مورفین است. بنابراین شناسایی نوع و میزان بیان این ژن در بافت‌های مختلف گیاه خشخاش می‌تواند در تولید دارو مفید باشد. بدست آوردن بیان ژن در بافت‌های مختلف موجب پیشرفت در تولید و کاهش زمان و تجهیزات خواهد شد. میزان بیان ژن در بافت‌های مختلف یک گیاه در تولید آن گیاه و نیل به اهداف، می‌تواند کمک قابل توجهی داشته باشد. با مشخص شدن میزان بیان در بافت برگ می‌توان این بافت را در محیط کشت مورد ارزیابی قرار داد و با ریزازدیادی میزان آن را در واحد سطح گسترش داد.

نتیجه‌گیری نهایی

با شناسایی بافت‌هایی که بیان بالاتری از ژن TYDC2 دارند و در نتیجه کالوس‌زایی بهتری را ایجاد می‌کنند، می‌توان روش‌های کشت بافت را بهینه‌سازی و توسعه داد. این اطلاعات می‌تواند به تولید کالوس‌های با کیفیت کمک کند. با توجه به نقش ژن‌ها در تولید آلکالوئیدها، شناسایی بافت‌های مناسب برای کالوس‌زایی می‌تواند به افزایش تولید این ترکیبات دارویی ارزشمند در گیاه خشخاش کمک کند. این امر می‌تواند به توسعه روش‌های جدید برای استخراج و تولید داروهای گیاهی منجر شود. نتایج این پژوهش می‌تواند به شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های گیاه خشخاش با بیان بالاتر ژن TYDC2 کمک کند. این ژنوتیپ‌ها می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی و تولید تجاری گیاهان دارویی از طریق کشت بافت استفاده شوند. نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات بیشتر در زمینه ژن‌های مرتبط با متابولیسم ثانویه و تأثیر آن‌ها بر روی کالوس‌زایی و تولید ترکیبات دارویی در سایر گیاهان دارویی را موجب شود.

References

Aghaali, Z., & Naghavi, M. R. (2024). Developing benzylisoquinoline alkaloid-enriched opium poppy via CRISPR-directed genome editing: A review. *BMC Plant Biology, 24*(1), 700 .

Aghaali, Z., Naghavi, M. R., & Zargar, M. (2024). Collaboration of hairy root culture and scale-up strategies for enhancing the biosynthesis of medicinal and defensive alkaloids in Papaver sp. *Current Plant Biology*, 100381 .

Alqethami, A., & Aldhebiani, A. Y. (2021). Medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia: phytochemical screening. *Saudi Journal of Biological Sciences, 28*(1), 805-812 .

Arumuganathan, K., & Earle, E. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant molecular biology reporter, 9*, 208-218 .

Bagheri, N., Maleki Zanjani, B., & Ammarlou, A .(۲۰۲۰) .A callus study of different explants of the medicinal Myrtle plant (Myrtus communis). *Journal of Medicinal Plants Biotechnology, 6*(1), 93-101 .

Birnie, R., Bryce, S. D., Roome, C., Dussupt, V., Droop, A., Lang, S. H., . . . Stower, M. J. (2008). Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome biology, 9*, 1-13 .

Cánovas, R., Moffat, A., & Turpin, A. (2016). CSAM: compressed SAM format. *Bioinformatics, 32*(24), 3709-3716 .

Consortium, G. O. (2008). The gene ontology project in 2008. *Nucleic acids research, 36*(suppl_1), D440-D444 .

D'Antuono, L. F., Moretti, A., & Lovato, A. F. (2002). Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of Nigella sativa L. and Nigella damascena L. *Industrial crops and products, 15*(1), 59-69 .

Diaz-Bárcena, A., & Giraldo, P. (2023). Exploring the research evolution of Papaver somniferum and Cannabis sativa: A bibliometric comparative analysis. *Industrial Crops and Products, 203*, 117143 .

Eckert, R. L., Crish, J. F., Efimova, T., Dashti, S. R., Deucher, A., Bone, F., . . . Balasubramanian, S. (2004). Regulation of involucrin gene expression. *Journal of Investigative Dermatology, 12* .۲۲-۱۳ ,(۱)۳

Ghasemi, S., Kumleh, H. H., & Kordrostami, M. (2019). Changes in the expression of some genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites in Cuminum cyminum L. under UV stress. *Protoplasma, 256*, 279-290 .

Hori, K., Yamada, Y., Purwanto, R., Minakuchi, Y., Toyoda, A., Hirakawa, H., & Sato, F. (2018). Mining of the uncharacterized cytochrome P450 genes involved in alkaloid biosynthesis in California poppy using a draft genome sequence. *Plant and Cell Physiology, 59*(2), 222-233 .

Kanei, M., Horiguchi, G., & Tsukaya, H. (2012). Stable establishment of cotyledon identity during embryogenesis in Arabidopsis by ANGUSTIFOLIA3 and HANABA TARANU. *Development, 139*(13), 2436-2446 .

Lee, D.-K., Geisler, M., & Springer, P. S. (2009). LATERAL ORGAN FUSION1 and LATERAL ORGAN FUSION2 function in lateral organ separation and axillary meristem formation in Arabidopsis .

Lee, M.-L. T., Kuo, F. C., Whitmore, G., & Sklar, J. (2000). Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 97*(18), 9834-9839 .

Leite Dias, S., & D'Auria, J. C. (2024). The bitter truth: how insects cope with toxic plant alkaloids. *Journal of Experimental Botany*, erae312 .

Májer, P., & Németh, É. Z. (2024). Alkaloid Accumulation and Distribution within the Capsules of Two Opium Poppy (Papaver somniferum L.) Varieties. *Plants, 13*(12), 1640 .

Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M., & Gilad, Y. (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome research, 18*(9), 1509-1517 .

Miranda, M., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Rodríguez, M. J., Maureira, H., & Martínez, E. A .(۲۰۱۲) .Nutritional aspects of six quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) ecotypes from three geographical areas of Chile. *Chilean journal of agricultural research, 72*(2), 175 .

Ngernsaengsaruay, C., Leksungnoen, N., Chanton, P., Andriyas, T., Thaweekun, P., Rueansri, S., . . . Hauyluek, W. (2023). Morphology, taxonomy, anatomy, and palynology of the opium poppy (Papaver somniferum L.) cultivation in Northern Thailand. *Plants, 12*(11), 2105 .

Romero, I. G., Ruvinsky, I., & Gilad, Y. (2012). Comparative studies of gene expression and the evolution of gene regulation. *Nature Reviews Genetics, 13*(7), 505-516 .

Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Oka, A. (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins .*Science, 294*(5546), 1519-1521 .

Santelia, D., Vincenzetti, V., Azzarello, E., Bovet, L., Fukao, Y., Düchtig, P., . . . Geisler, M. (2005). MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS letters* .۵۴۰۶-۵۳۹۹ ,(۲۴)۵۷۹ ,

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current opinion in plant biology, 6*(5), 410-417 .

Tilkat, E., Ayaz Tilkat, E., Akkaya, Ö., & Özden Çiftçi, Y. (2024). Metabolic Engineering for Overproduction of Plant Secondary Metabolites: Alkaloids. *Innovative Methods in Horticultural Crop Improvement: Molecular Tools, Nanotechnology and Artificial Intelligence*, 297-328 .

Vadhel, A., Bashir, S ,.Mir, A. H., Girdhar, M., Kumar, D., Kumar, A., . . . Mohan, A. (2023). Opium alkaloids, biosynthesis, pharmacology and association with cancer occurrence. *Open Biology, 13*(5), 220355 .

Yoshikawa, T., & Furuya, T. (1983). Regeneration and in vitro flowering of plants derived from callus cultures of opium poppy (Papaver somniferum). *Experientia, 39*, 1031-1033 .