

خاموشی سیستمیک ژن کدکننده آنزیم تبائین -۶- ا- دمیتلاز در گیاه دارویی خشخاش (*Papaver somniferum* L.) با استفاده از فن خاموشی ژن با القا ویروس

شوکت عالی پور امرایی^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۳ و علی محمد لطیفی^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

پست الکترونیک: ismaili.a@lu.ac.ir

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۲۰

چکیده

گیاه دارویی خشخاش (*Papaver somniferum* L.) به عنوان یکی از مهمترین منابع تجاری برای برخی از آلکالوئیدهای دارویی مانند ضد درد کدئین و مورفین و داروهای نیمه مصنوعی مانند اکسی کدون، بوپرونورفین و نالتروکسن می باشد. از ژن های پائین دست مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها در این گیاه، ژن تبائین -۶- ا- دمیتلاز (*T6ODM*) است که بر تولید موادی مانند تبائین و اوریپاوین تأثیرگذار است. در این پژوهش، اثر سازه خاموشی متکی بر فن VIGS، بر کاهش سطح بیان این ژن در گیاه خشخاش مطالعه شد. برای این منظور، ابتدا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، cDNA ژن *T6ODM* تکثیر شد و برای تأیید مورد توالی یابی قرار گرفت. سپس بخشی از ژن به عنوان قطعه هدف خاموشی در ناقل ویروسی *pTRV* همسانه سازی شد و به روش آگروباکتري، برگ های گیاه تراریخت شد. حضور ژن کدکننده پروتئین پوششی موجود در ناقل ویروسی در گیاهان با استفاده از PCR بررسی و سطح بیان ژن در گیاهان تراریخت توسط تجزیه و تحلیل نیمه کمی و PCR در زمان واقعی بررسی شد. نتایج نشان داد که میانگین بیان ژن *T6ODM* در گیاه حاوی سازه مورد نظر نسبت به گیاهان شاهد ۸۳/۷۱ درصد کاهش داشت.

واژه های کلیدی: خشخاش، آگروباکتري، PCR در زمان واقعی

مقدمه

مصنوعی مانند اکسی کدون است (Facchini and De Luca, 2008). داروهای مسکن خانواده مورفین به صورت طبیعی متعلق به گروه بزرگ و متنوع آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئیلین (BIAs)^۱ می باشند. بیوسنتز BIAs در

خاصیت دارویی گیاه خشخاش (*Papaver somniferum* L.) بعد از شکل گیری تمدن بشر مهم واقع شد (Facchini & De Luca, 2008). این گیاه یکی از مهمترین منابع تجاری چندین دارو که به طور گسترده استفاده می شوند از جمله مورفین، کدئین و مشتقات نیمه

1 - Benzylisoquinoline alkaloids

گیاهان خانواده شقایق شامل یک مسیر پیچیده بیوشیمیایی است که از یک ترکیب مشتق شده از تیروزین شروع شده و بعد از انجام چندین واکنش مختلف، ماده حد واسط s- رتیکولین تولید می‌شود (Hagel & Facchini, 2010). سپس چندین مسیر از این ماده منشعب می‌شود که در یکی از این مسیرها مورفینانها (از جمله تبائین و کدئین) تولید می‌شوند. یکی از ژن‌های مهم پائین دست مسیر بیوسنتزی مورفینانها ژن کدکننده آنزیم تبائین ۶-۸-دمتیلاز ($T6ODM$) می‌باشد (Hagel & Facchini, 2010). این آنزیم که متعلق به خانواده دمتیلازها است، cDNA متناظر با آن جداسازی و همسانه‌سازی شده است (Hagel & Facchini, 2010). این آنزیم، تبائین را در موقعیت ۶ دمتیله کرده و به نتوپینون تبدیل می‌کند. سپس این ماده طی یک واکنش خودبخودی به کدئینون تبدیل می‌شود. در مسیر دیگری آنزیم $T6ODM$ اورپیاوین را دمتیله کرده و به مورفینون تبدیل می‌کند (Hagel & Facchini, 2010). دست‌ورزی ژنتیکی فرصت مناسبی برای بهبود محتوای آلكالوئیدهای خانواده شقایق است که می‌تواند به چند روش رخ دهد:

۱- افزایش فعالیت آنزیمها در گلوگاه مسیرهای بیوسنتز آلكالوئیدها، ۲- بلوکه کردن واکنش‌های نامطلوب، ۳- بلوکه کردن مسیرهای سنتزی در مراحل خاصی تا آلكالوئیدهای مطلوب تجمع یابند (Chitty et al., 2003). خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری یا PTGS^۲ یک سازوکار دفاعی مختص به توالی‌های نوکلئوتیدی است که در mRNAهای سلولی و ویروسی رخ می‌دهد (Wesley et al., 2003). فن خاموشی ژن با القا ویروس ($VIGS$)^۳ به‌عنوان یک فن سریع برای تجزیه و تحلیل عمل خاموشی ژن مبتنی بر خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری است که در طیف گوناگونی از گونه‌های گیاهی به‌کار برده می‌شود (Baulcombe., 1999; Benedito et al., 2004).

با توجه به اهمیت ویژه گیاه دارویی شقایق در تولید

4- RNA Dependent RNA Polymerase

5- Agroinfiltration

6- Micro-bombardment

7- Tobacco Rattle Virus

1- $T6ODM$

2- Post transcription gene silencing

3- Virus induced gene silencing

آغازگرها، مطابق دستورالعمل کیت Revert Aid first strand synthesis kit، cDNA تک رشته‌ای ژن *T6ODM* تهیه شد.

در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دمای واسرشت‌سازی اولیه 94°C به مدت ۳ دقیقه، واسرشت‌سازی ثانویه 94°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها 58°C به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر الگو 72°C به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی 72°C به مدت ۵ دقیقه برای تکثیر cDNA در نظر گرفته شد (Hagel & Facchini, 2010). این واکنش در ۳۵ چرخه تکرار شد. محصول PCR بر روی آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. پس از مشاهده باند مورد نظر، cDNA از روی ژل، مطابق دستورالعمل موجود در کیت Silica Bead DNA Gel Extraction محصول شرکت فرمتناز خالص‌سازی شد و بعد برای همسانه‌سازی، واکنش اتصال بین cDNA و ناقل pTZ57R/T با استفاده از آنزیم لیگاز T4 انجام گردید (Glick *et al.*, 2010). ناقل pTZ57R/T به روش شوک کلسیمی به باکتری *E. coli* سویه *DH5 α* انتقال یافت تا هم این کلنی‌ها را برای مدت طولانی‌تری نگهداری کرد و هم اینکه قطعه مورد نظر را راحت‌توالی‌یابی کرد (Glick *et al.*, 2010). شناسایی کلنی‌های ترانسفورم از غیر ترانسفورم بر اساس رنگ آنها انجام شد. به این صورت که کلنی‌های رنگ آبی غیر ترانسفورم و کلنی‌های سفید ترانسفورم می‌باشند. پس از تأیید همسانه‌سازی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و هضم آنزیمی، cDNA همسانه‌سازی شده تعیین توالی شد.

همسانه‌سازی قطعه هدف خاموشی درون ناقل TRV برای تکثیر قطعه خاموشی هدف یک جفت آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی شد. این آغازگرها قطعه‌ای به طول ۲۱۷ جفت باز را در ناحیه انتهایی ژن تکثیر می‌کنند. توالی آغازگرهای رو به جلو و برگشتی به ترتیب '5' GACGTGATTGCATGTCA3' و '5' CACAACGCACTTTCGAGA3' می‌باشد. قطعه

تعداد زیادی از آلکالوئیدهای مهم، بررسی تأثیر ژن‌های مختلف مسیر بیوشیمیایی این آلکالوئیدها نقش مهمی در مهندسی متابولیت این گیاه دارد. از این رو در این پژوهش، به منظور بررسی جایگاه ژن T-6ODM، از روش خاموشی ژن (فن VIGS) استفاده شد.

مواد و روش‌ها

ساخت cDNA ژن *T6ODM*

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. ابتدا بذر گیاه دارویی خشخاش (*Papaver somniferum* L.) در گلدانهای محتوای ۲۰ درصد خاک نرم، ۴۰ درصد ماسه نرم همراه با ۴۰ درصد کود آلی کشت داده شدند. در نهایت در هر گلدان یک گیاه نگهداری شد و برای تیمارهای آزمایش (گیاهان تراریخت و شاهد) حداقل تعداد ۱۰ گیاه برای هر تیمار در ابتدای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. چند روز قبل از رسیدن گیاهان به مرحله گلدهی (حدود اواخر اردیبهشت‌ماه)، سه سانتی‌متر انتهایی ساقه گیاهان با تیغه اسکالپل برش داده شد و بعد توسط نیتروژن مایع پودر شد (Hagel & Facchini, 2010). مطابق دستورالعمل کیت RNeasy Plant Mini-Kit محصول شرکت سیناژن RNA کل استخراج شد و مطابق دستورالعمل کیت revert Aid first strand cDNA تک رشته‌ای ژن *T6ODM* تهیه شد.

توالی mRNA ژن T-6ODM با شماره دسترسی GQ500139 و طول ۱۳۸۶ جفت باز در پایگاه اطلاعاتی NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) موجود است که از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر cDNA توالی بین بازهای شماره ۱۳۶۹-۳۳ استفاده شد. توالی آغازگرهای رو به جلو و برگشتی به ترتیب 5'-CATGGAGAAAGCAAACTTATGAAGCTA G-3' و 5'-TCAAACACAACGCACTTTCG-3' با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی شد. پس از طراحی

تزریق اگروباکتري به برگ‌های گیاه

مايه تلقیح توسط سرنگ تزریق معمولی (با سوزن نازک) به لایه زیرین برگ‌های فوقانی گیاهان چهار هفته‌ای تزریق شد. پس از سپری شدن دو هفته از زمان تزریق و ظهور برگ‌های جدید، سه سانتی‌متر انتهایی ساقه گیاهان در مراحل اولیه فاز زایشی توسط تیغه اسکالپل جدا شد و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند. ساقه گیاهان توسط هاون در ازت مایع پودر شدند و مانند قبل RNA کل استخراج و بعد cDNA ساخته شد.

انتخاب گیاهان تراریخت موقت

در ابتدا برای بررسی ورود ناقل TRV به گیاهان مورد آزمایش، حضور ژن کدکننده پروتئین پوششی ناقل (cp¹) در گیاه توسط PCR بررسی شد و بعد گیاهانی که حاوی ژن مورد نظر بودند، برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی انتخاب شدند.

آزمایش نیمه کمی^۲

از مجموع ۱۴ گیاه مورد بررسی، ۹ گیاه نسبت به حضور ژن پروتئین پوششی ویروس TRV پاسخ مثبت دادند. از آنجایی که سطح خاموشی ژن هدف در گیاهان تراریخت به دلایل مختلفی از جمله درج تصادفی، ناحیه ورود ژن قطعه خاموشی در نواحی ژنومی گیاهان تراریخت یکسان نمی‌باشد، بنابراین انتظار نمی‌رود که میزان بیان ژن سازه خاموشی ژن *T6ODM* در گیاهان تراریخت موقت حاصل یکسان باشد. از این رو گیاهان تراریخت حاصل، برای مقایسه و غربالگری اولیه برای بررسی میزان بیان ژن *T6ODM* مورد آزمایش نیمه کمی PCR قرار گرفتند. به این منظور cDNA نمونه‌های گیاهی مختلف توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل نانودراپ

خاموشی هدف ابتدا در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی و بعد در باکتري *E. coli* تکثیر و در مرحله بعد تعیین توالی شد. برای همسانه‌سازی قطعه خاموشی در ناقل ویروسی pTRV، ابتدا باکتري‌های دارای ناقل T/A همراه با قطعه خاموشی و همچنین باکتري‌های حاوی ناقل TRV کشت شدند و بعد استخراج پلاسمید انجام شد. پلاسمیدها توسط دو آنزیم *SmaI* و *EcoRI* برش داده شدند و پس از خالص‌سازی قطعه هدف خاموشی و ناقل TRV، واکنش اتصال بین آنها انجام گردید. ناقل نو ترکیب مانند روش قبل در باکتري *E. coli* سویه DH5α همسانه‌سازی شد. پس از همسانه‌سازی قطعه خاموشی در ناقل TRV2 به میزبانی *E. coli*، این ناقل در مرحله بعد به اگروباکتري سویه GV3101 طبق همان روش برای تراریختی موقت گیاه منتقل شد (Hileman et al., 2005).

آماده‌سازی مایه تلقیح

اگروباکتري سویه GV3101 ترانسفورم شده با ناقل‌های TRV1 و TRV2 خالی و اگروباکتري ترانسفورم شده با ناقل‌های TRV1 و TRV2 حاوی قطعه هدف خاموشی، در محیط LB مایع حاوی ۱۰ میلی‌مولار MES (2-Nmorpholino ethanesulfonic acid) و ۲۰ میکرومولار استوسرینگون کشت شبانه داده شد. اگروباکتري پس از کشت شبانه در دور 3000g سانتی‌فیوژ شد و رسوب به دست آمده در محیط کشت مایع تلقیح (حاوی ۱۰ میلی‌مولار MES و ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون و ۱۰ میلی‌مولار MgCl₂) حل شد. پس از رسیدن سطح جذب محلول مذکور در 260nm به ۱/۵ (با استفاده از دستگاه بیوفتومتر)، نسبت ۱:۱ از باکتري حاوی TRV1 و TRV2 حاوی سازه و همچنین TRV2 خالی با هم مخلوط شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد برای تزریق به گیاه استفاده شد (Hileman et al., 2005).

1 - Coat protein

2- Semi quantitative PCR

بازدهی تکثیر محاسبه شد. با داشتن بازدهی تکثیر، میزان بیان ژن با استفاده از روش Schmittgen و Livak (۱۹۹۸) برآورد شد. برای گیاهان تیمار شده و شاهد آزمایش با سه تکرار بیولوژیکی (سه گیاه) و دو نوع تکرار تکنیکی اجرا گردید. تکرارهای تکنیکی شامل دو بار ساخت cDNA (برای RNA هر نمونه گیاهی) و دوبار انجام واکنش PCR زمان واقعی برای هر نمونه cDNA بود.

نتایج

بعد از تهیه cDNA از گیاهان کشت شده در گلخانه و تکثیر ژن T6ODM با آغازگرهای اختصاصی، در نهایت نتایج تکثیر این ژن مورد توالی‌یابی قرار گرفت. نتایج توالی‌یابی این ژن با توالی موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI توسط نرم‌افزار Blast^۲ تطابق داده شد و مشاهده شد که شباهت بسیار بالایی (بیش از ۹۹ درصد) با توالی ژن موجود در بانک اطلاعاتی دارد.

به منظور تأیید همسانه‌سازی قطعه هدف خاموشی موجود در ناقل pTZ57R/T در باکتری *E. coli*، ابتدا از تک کلنی‌های سفید استخراج پلاسمید انجام شد و بعد مورد آزمایش PCR قرار گرفتند (شکل ۱).

برای تأیید همسانه‌سازی قطعه هدف خاموشی در ناقل TRV از دو روش کلنی-PCR (شکل ۲) و هضم آنزیمی (شکل ۳) استفاده شد. در هضم آنزیمی ابتدا از دو کلنی تأیید شده توسط PCR، پلاسمید استخراج و بعد واکنش هضم آنزیمی توسط دو آنزیم *EcoRI* و *SmaI* انجام شد. نتیجه واکنش هضم منجر به تولید باندهای ۲۱۷ جفت باز در روی ژل بود که نشان‌دهنده وجود قطعه خاموشی ژن هدف در جایگاه مربوطه در پلاسمید بود (شکل ۳).

(Ependorf, Germany) با استفاده از آب مقطر هم‌غلظت شدند. سپس از جفت آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه‌ای از ژن T6ODM و ژن کنترل داخلی دائم‌البیان *ELF1a*^۱ استفاده شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد و بعد سطح بیان ژن دائم‌البیان *ELF1a* با سطح بیان ژن T6ODM در گیاهان هدف و شاهد مقایسه شد. به این صورت که در مقایسه با گیاهان شاهد چنانچه باند ظاهر شده برای ژن T6ODM در یک گیاه تراریخت ضعیف و در عوض برای ژن *ELF1a* همان گیاه باند قوی و مشابه گیاه شاهد ظاهر شد، آن گیاه به عنوان گیاه تراریخت مناسب (که خاموشی ژن هدف نسبتاً مناسب بوده است) برای تجزیه و تحلیل PCR زمان واقعی انتخاب شد.

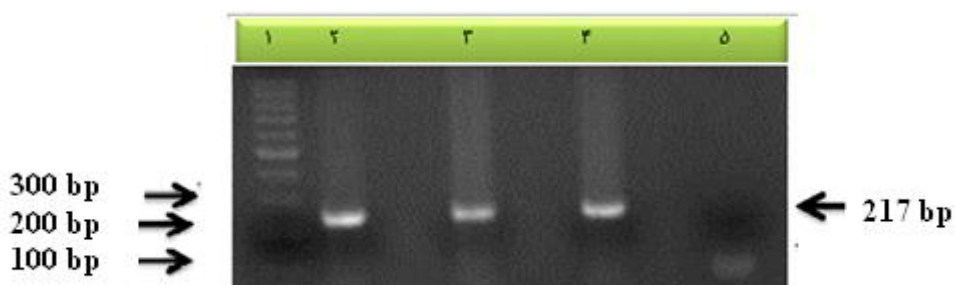
آزمایش PCR زمان واقعی

از کیت سایبرگرین برای واکنش Real time PCR استفاده شد. هر ۲۰ میکرولیتر از مخلوط اصلی^۱ واکنش شامل ۲ میکرولیتر از cDNA و دو میکرولیتر از آغازگرهای رو به جلو و برگشتی با غلظت 300nM و سایبرگرین 1X بود. در ابتدای واکنش دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه اعمال شد و بعد طی ۴۰ دوره متوالی دماهای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه برای تک‌رشته‌ای کردن، ۶۰ درجه به مدت ۲۵ ثانیه برای اتصال و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه برای گسترش تعیین شد. همچنین در انتهای هر واکنش، برای رسم منحنی ذوب، افزایش دما از ۶۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به صورت یک درجه به ازای گذشت هر ۵ ثانیه، اعمال شد. همچنین برای پی‌بردن به بهینه بودن qPCR از یک سری رقیق شده DNA الگو استفاده شد و از نتایج آن برای ایجاد یک منحنی استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد با ترسیم لگاریتم مقدار اولیه DNA الگو در برابر مقدار چرخه آستانه‌ای (CT) به دست آمد و بعد

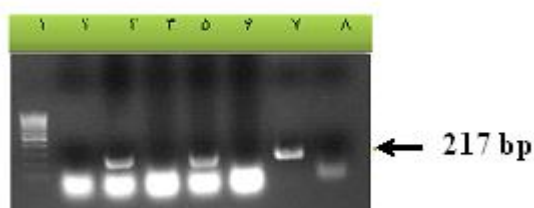
1 - Elongation factor

2 - Master mix

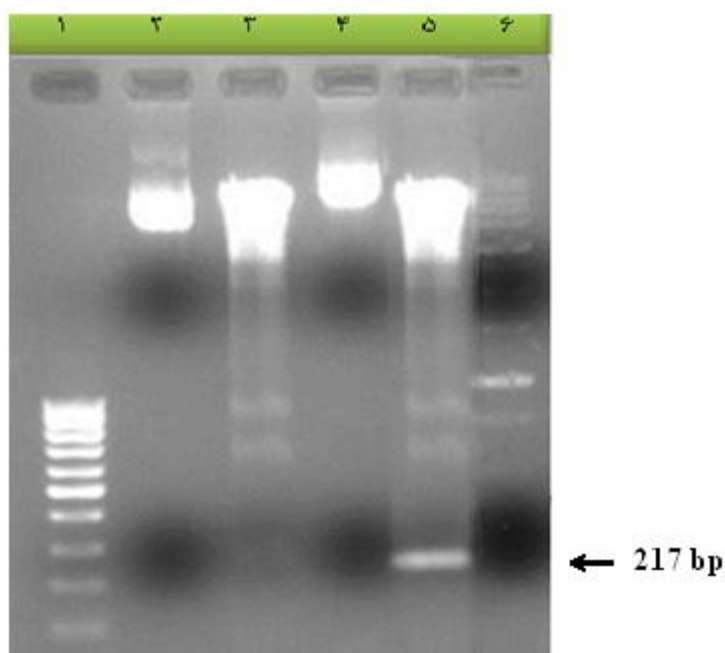
3- Basic Local Alignment Search Tools



شکل ۱- نتیجه تأیید همسانه‌سازی قطعه خاموشی ژن *T6ODM* در پلاسمید باکتری *E. coli*. چاهک شماره ۱: نشانگر اندازه ۱۰۰ bp؛ چاهک شماره ۲-۴: نمونه‌های تکثیری؛ ۵: کنترل منفی.



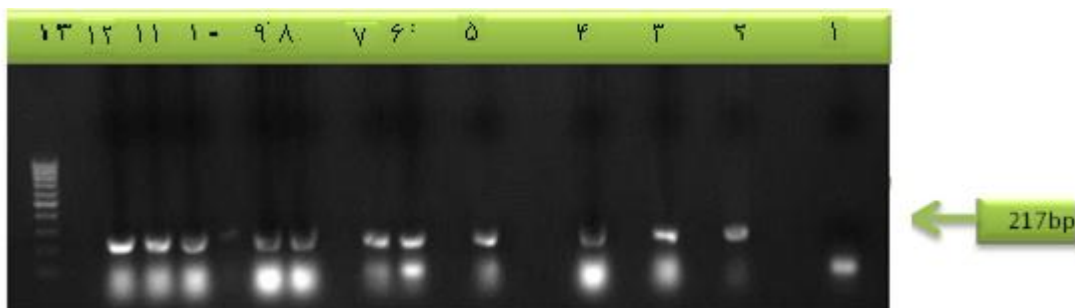
شکل ۲- کلنی PCR برای تأیید همسانه‌سازی قطعه هدف خاموشی در ناقل *TRV*. چاهک ۱: نشانگر اندازه ۱۰۰ bp؛ چاهک ۲-۶: کلنی‌های آزمون شده؛ چاهک ۷: کنترل مثبت (حاوی *cDNA* الگو زن مورد نظر)؛ ۸ چاهک: کنترل منفی (بدون الگو).



شکل ۳- تأیید همسانه‌سازی قطعه هدف خاموشی در ناقل *TRV* توسط هضم آنزیمی. چاهک ۱: نشانگر اندازه ۱۰۰ bp؛ چاهک ۲: ناقل *TRV* برش نخورده (از کلنی شماره a تأیید شده)؛ چاهک ۳: ناقل *TRV* (از کلنی شماره a تأیید شده) برش خورده با دو آنزیم *EcoRI* و *SmaI*؛ چاهک ۴: ناقل *TRV* برش نخورده (از کلنی شماره b تأیید شده)؛ چاهک ۵: ناقل *TRV* برش خورده با دو آنزیم *EcoRI* و *SmaI* (از کلنی شماره b تأیید شده)؛ چاهک ۶: نشانگر اندازه ۱ kb.

پس از انتقال سازه خاموشی VIGS به آگروباکتری، کلنی‌های متعددی با استفاده از واکنش کلنی-PCR مورد

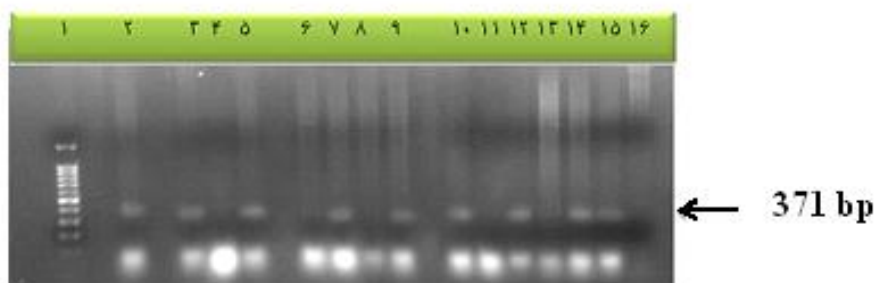
آزمون قرار گرفتند که نتایج حکایت از تأیید ورود ناقل مذکور در برخی کلنی‌ها داشت (شکل ۴).



شکل ۴- واکنش کلنی-PCR روی برخی از کلنی‌های آگروباکتری ترانسفورم شده با TRV. چاهک ۱: کنترل منفی؛ چاهک ۲: کنترل مثبت؛ چاهک‌های ۳-۱۲: کلنی‌های مختلف؛ چاهک ۱۳: نشانگر اندازه ۱۰۰ bp.

گیاهان تلقیح یافته باند مربوط به ژن مذکور را نشان دادند. بنابراین گیاهان مربوط به نمونه‌های مثبت برای مراحل بعدی آزمایش انتخاب شدند (شکل ۵).

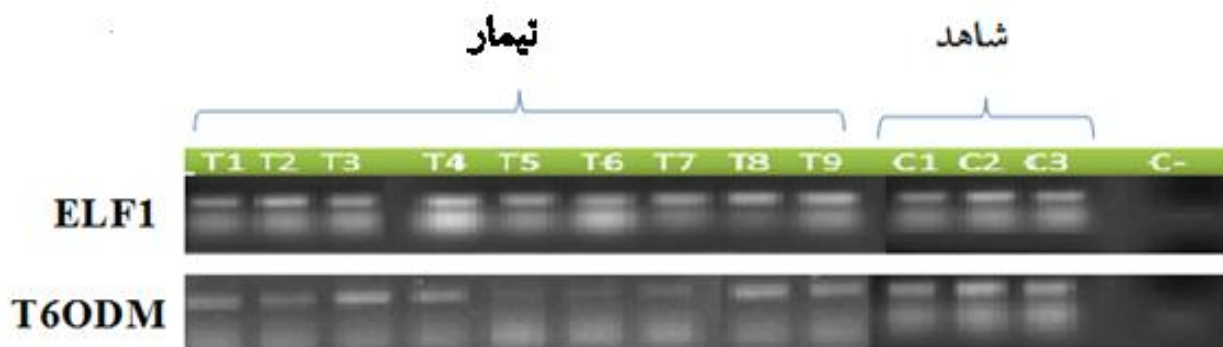
نتایج تجزیه و تحلیل PCR در زمان واقعی ابتدا گزینش اولیه گیاهان تراریخت با استفاده از PCR و بر اساس حضور ژن کدکننده پروتئین پوششی ناقل TRV انجام شد. پس از الکتروفورز محصولات PCR، تعدادی از



شکل ۵- نتیجه تکثیر ژن کدکننده پروتئین پوششی (CP) ناقل TRV برای گزینش گیاهان تراریخت. چاهک شماره ۱: نشانگر اندازه ۱۰۰ bp. چاهک شماره ۲-۱۵: نمونه‌های گیاهی مورد بررسی؛ چاهک شماره ۱۶: کنترل منفی.

نتایج PCR زمان واقعی نشان داد که بیان ژن *T6ODM* در گیاهان تراریخت ۱۶/۲۹ درصد بود (بر مبنای مقایسه با میزان بیان ژن هدف در گیاه شاهد). از این رو از مقایسه میزان بیان ژن در گیاه تراریخت با گیاه شاهد (غیر تراریخت) دیده شد که بیان ژن در گیاه تراریخت به طور میانگین ۸۳/۷۱ درصد کاهش داشت (جدول ۱).

در آزمایش PCR نیمه کمی، با مقایسه شدت باندهای حاصل از ژل الکتروفورز ژن هدف و ژن دائم‌البیان *ELF1* در گیاهان تراریخت و شاهد (شکل ۶)، مشاهده شد که سه گیاه تراریخت (نمونه‌های T2, T5, T6) نسبت به سایر گیاهان تراریخت سطح بیان ژن *T6ODM* پایین‌تری دارند. بنابراین این گیاهان به‌عنوان سه تکرار بیولوژیکی برای سنجش بیان ژن توسط PCR زمان واقعی انتخاب شدند.



شکل ۶- آزمایش نیمه کمی برای انتخاب گیاهان با کمترین بیان ژن با استفاده از دو ژن هدف (*T6ODM*) و کنترل داخلی (*ELF1a*) (حرف T مبین گیاه تراریخت و حرف C مبین گیاه شاهد یا غیرتراریخت است).

جدول ۱- نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن *T6ODM* با روش PCR در زمان واقعی

نوع گیاه	درصد بیان	خطای استاندارد
تراریخت	۱۶/۲۹	۲/۵
غیر تراریخت (شاهد)	۱۰۰	۰/۴

بحث

سالیسیلیک اسید (Elyasi et al., 2015) می‌باشد. با وجود این برای بررسی دقیق تر نقش ژن هدف در شبکه متابولیت ثانویه گیاهی، روشهای مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخت بسیار مهمتر است. ژن ¹PDS یکی از آنزیم‌های مهم دخیل در مسیر ساخت کارتنوئیدها را کد می‌کند. چنانچه این ژن خاموش شود یا بیان آن کم شود، به طور محسوس فنوتیپ رنگ پریدگی در گیاه آشکار می‌شود (Hileman et al., 2005). در ضمن Hileman و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که سیستم خاموشی موقت با استفاده از ناقل ویروسی TRV، قادر است که خاموشی موقت این ژن را در گیاه شقایق القا کند. در بررسی خاموشی برخی ژن‌های پایین دست شبکه مورفینان در گیاه شقایق با استفاده از روش تداخل RNAi، نتایج PCR زمان واقعی نشان داد که درصد بیان ژن *T6ODM* در گیاه تراریخت نسبت به گیاه شاهد نزدیک به ۷۰ تا ۸۰ درصد کاهش یافته است (Hagel

یکی از کاربردهای بیان موقت این است که آزمون سریع سازه بیان ژن در بافت یا اندام اختصاصی در گیاه غیر تراریخت می‌تواند در طول چندین روز بدون نیاز به صرف زمان زیاد و باززایی گیاه تراریخت انجام شود (Gleba et al., 2007). کاربرد دیگر آن تجزیه و تحلیل سریع عمل ژن و تعیین جایگاه فراورده ژنی است. همچنین با این روش می‌توان با سرعت بالایی گیاه را دست‌کاری کرد. این روش تحت تأثیر جایگاه کروموزومی نیست (Gleba et al., 2007). در این تحقیق راهبرد خاموشی موقت ژن *T6ODM* در گیاه دارویی خشخاش بررسی شد تا تأثیر سازه ساخته شده بر میزان بیان این ژن در سطح نسخه برداری آن در گیاه مشخص شود.

البته بیان ژنهای دخیل در مسیرهای بیوشیمیایی مربوط به ترکیبات دارویی در گیاهان در بافتهای مختلف گیاه متفاوت بوده (Shamsi-Fard et al., 2015)، همچنین تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی یا عوامل تیماری مثل

1 - Phytoene desaturase

منابع مورد استفاده

- Baulcombe, D.C., 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(2): 109-113.
- Benedito, V.A., Peter, B., Visser, G., Angenent, C. and Krens, A. F., 2004. The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genetics and Molecular Research*, 3(3): 323-341.
- Chitty, J.A., Allen, R.S., Fist, A.J. and Larkin, P.J., 2003. Genetic transformation in commercial Tasmanian cultivars of opium poppy, *Papaver somniferum*, and movement of transgenic pollen in the field. *Functional Plant Biology*, 30(10): 1045-1058.
- Dange, T.T. and Facchini, P.J., 2013. Characterization of three O-methyltransferases involved in noscapine biosynthesis in opium poppy. *Plant Physiology*, 159(2): 618-631.
- Di Stilio, V.S., Kumar, R.A., Oddone, A.M., Tolkin, T.R., Salles, P. and McCarty, K., 2010. Virus-induced gene silencing as a tool for comparative functional studies in *Thalictrum*. *Public Library of Science*, 5(8): e12064.
- Elyasi, R., Majidi M., Bahramnejad, B. and Mirzaghaderi, Gh., 2015. Expression pattern analysis of genes involved in the biosynthetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with salicylic acid. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 23 (2): 164-174 (In persian).
- Facchini, P.J., and De Luca, V., 2008. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal*, 54, 763-784.
- Gleba, Y., Klimyuk, V. and Marillonnet, S., 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2): 134-141.
- Glick, B.R., Jack, J.P. and Patten, C.L., 2010. *Molecular Biotechnology, principles and applications of recombinant DNA* (4th Eds). ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, USA.
- Hagel, J.M. and Facchini, P.J., 2010. Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology*, 6(4): 273-275.
- Hileman, L., Drea, C.S., Martino, G.D., Litt, A. and Irish, V.F., 2005. Virus induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *The Plant Journal*, 44(2): 334-341.
- (Wijekoon & Facchini, 2010 ; & Facchini, 2010). مقایسه میزان کاهش بیان مربوط به خاموشی ژنهای شبکه مورفینان گیاه شقایق در پژوهش‌های قبلی (Hagel & Wijekoon & Facchini, 2012) با میزان کاهش بیان ژن در این تحقیق نشان می‌دهد که میزان کاهش بیان ژن در این تحقیق‌ها مشابه است. در بررسی خاموشی موقت ژن *CYP82Y1* در گیاه شقایق که توالی کوتاهی از ناحیه انتهایی این ژن در ناقل ویروسی TRV همسازسازی شد و توسط آگروباکتری به جوانه گیاهان منتقل شد، کاهش حدود ۲۵ درصدی سطح نسخه‌های این ژن در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده شد (Dang & Facchini, 2012). در همین رابطه Hosseini و همکاران (2011) توالی کدکننده ژن *COR* به طول 960bp از گیاه شقایق را در ناقل دوتایی *pBII21* قرار دادند و به بررسی فوق بیان موقت آن پرداختند. نتایج ارزیابی نشان داد که مورفین و کدئین در برگ‌های گیاهان تراریزش شده با سازه فوق وجود دارد و اختلاف معنی‌داری در تولید نهایی مشاهده شد ولی در برگ‌های گیاهان شاهد (غیر تراریزش و تراریزش شده با آگروباکتری خالی) در مورفین و کدئین تفاوتی مشاهده نشد (Hosseini et al., 2011).
- با توجه به کاهش قابل توجه سطح بیان ژن هدف در این مطالعه، به نظر می‌رسد صرف نظر از نوع ژنوتیپ گیاه و شرایط حاکم، ناقل TRV می‌تواند به عنوان یک ناقل ویروسی کارآمد در کاهش بیان ژن بسیار مؤثر باشد. با توجه به جایگاه و نقش ژن *T6ODM* در گیاه خشخاش، بلوکه کردن این ژن می‌تواند منجر به افزایش قابل توجه سطح آکالوئیدهای بالادست از جمله تیائین و اریپاوین شود، بنابراین در صورت نیاز به این دو ماده با ارزش می‌توان با این روش به مقدار قابل توجهی از آنها دست یافت. از این رو پیش‌بینی می‌شود با این روش بتوان با متوقف کردن فعالیت یک آنزیم، میزان آکالوئید تولید شده بالادست را افزایش داد و به این ترتیب راه را برای تولید مواد با ارزش دارویی هموارتر نمود و یا از تولید آکالوئیدهای پایین دست کم اهمیت‌تر جلوگیری کرد.

- carries intron containing GUS and analysis using micro-bombardment and agroinjection. Iranian Journal of Plant Biology, 6(19): 97-110 (In persian).
- Wege, S., Scholz, A., Gleissberg, S. and Becker, A., 2007. Highly efficient virus-induced gene silencing (VIGS) in California poppy (*Eschscholzia californica*): an evaluation of VIGS as a strategy to obtain functional data from non-model plants. Annals of Botany, 100(3): 641-649.
 - Wesley, S.V., Liu, Q., Wielopolska, A., Ellacott, G., Smith, N., Singh, S. and Helliwell, C., 2003. Custom knock-outs with hairpin RNA-mediated gene silencing. Plant Functional Genomics, 236: 273-286.
 - Wijekoon, C.P. and Facchini, P.J., 2012. Systematic knockdown of morphine pathway enzymes in opium poppy using virus induced gene silencing. The Plant Journal, 69(6): 1052-1063.
 - Hosseini, B., Shahriari-Ahmadi, F., Hashemi, H., Marashi, M.H., Mohseniazar, M., Farokhzad, A. and Sabokbari, M., 2011. Transient expression of cor gene in *Papaver somniferum*. BioImpact, 1(4): 229-235.
 - Robertson, D., 2004. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. Annual Reviews Plant Biology, 55: 495-519.
 - Schmittgen, T.D. and Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, 3(6): 1101-1108.
 - Shamsi-Fard, M.H., Mirzaghaderi, Gh. and Majdi M., 2015. Transcript expression analysis of geranyl diphosphate synthase gene in different tissues of black cumin (*Nigella sativa* L.) Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23 (2): 143-155 (In persian).
 - Shokouhifar, F., Motallebi, M. and Zamani, M.R., 2013. Construction of pGCGi, an expression vector

Systematic knockdown of *thebaine 6-O-demethylase* gene in *Papaver somniferum* L., using virus-induced gene silencing technique

S. Alipour Amraei¹, A. Ismaili^{2*}, F. Nazarian FirouzAbadi³, A.M. Latifi⁴

1- M.Sc., Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R.Iran

2- *Corresponding author, Assoc. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R.Iran. E-mail: ismaili.a@lu.ac.ir

3- Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R.Iran

4- Assoc. Prof., Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

Received: 26.07.2016 Accepted: 10.05.2017

Abstract

Papaver somniferum is one of the important commercial sources for several pharmaceutical alkaloids including the narcotic analgesics codeine and morphine and the semi-synthetic drugs oxycodone, buprenorphine and naltrexone. One of the downstream genes in alkaloid biosynthesis pathway in the species is thebaine-6-O demethylase (*T6ODM*) that inverts thebaine and oripavine to codeinone and morphinone, respectively. In this study, a transient silencing construct based on virus-induced gene silencing (VIGS) technique was used to knockdown the *T6ODM* expression. In this regard, cDNA of *T6ODM* was prepared using specific primers and the results of reaction were sequenced for confirmation. Then, a part of resulted cDNA (silencing fragment) was selected for cloning in pTRV vector. The silencing construct was infiltrated to plant leaves via *Agrobacterium tumefaciens*. The presence of cp (coat protein) gene of TRV vector was assayed by PCR and the positive TRV plants were screened for analysis of gene expression by semi quantitative and real-time PCR. Results of gene expression analysis showed that transgenic plants had a significant decrease in expression (with average amount of 83.71%), comparing to control plants.

Keywords: *Agrobacterium*, *Papaver*, Real time-PCR, VIGS