

خاموش‌سازی سیستماتیک ژن کدئین ا-دمتیلاز (CODM) با استفاده از فن القای خاموشی از طریق ویروس (VIGS) در گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum* L.)

حسین شاهی وند^۱، احمد اسماعیلی^{۱*}، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۱ و علیرضا زبرجدی^۲

^۱ لرستان، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

^۲ کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۹

چکیده

گیاه شقایق (*Papaver somniferum* L.) به عنوان مهم‌ترین منبع اقتصادی تولید ترکیبات آلکالوئیدی نارکوتیک مانند کدئین، تبائین، نارکوتین و پاپاورین شناخته شده است و از ترکیبات آن در صنعت داروسازی به عنوان بی‌حس‌کننده، ضد سرفه و ضد اسپاسم استفاده می‌شود. امروزه از فن مهندسی متابولیک، برای دستوری ژنهای بیوستز آلکالوئیدها و فرآورده‌های متابولیکی این گیاه از طریق مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود. کدئین ا-دمتیلاز (CODM)، آنزیم انتهایی در مسیر بیوستزی مورفینان در گیاه شقایق می‌باشد که باعث دمتیلاسیون تبائین در موقعیت ۳ و تبدیل آن به اورپاوین و همچنین دمتیلاسیون کدئین می‌شود. این پژوهش با هدف خاموشی احتمالی ژن CODM از طریق مکانیسم خاموشی ژن به واسطه ویروس (VIGS) به اجرا در آمد. ابتدا ژن CODM با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از روی cDNA تکثیر شد. بخشی از انتهای cDNA سنتز شده در ناحیه 3' UTR، به عنوان قطعه هدف خاموشی در ناقل ویروسی TRV2 همسانه‌سازی شد و سازه ژنی با استفاده از آگروباکتریوم به نمونه‌های برگ گیاه شقایق انتقال داده شد. به وسیله PCR ژن پروتئین پوششی ویروس TRV، گیاهان تراریخت غربال اولیه شدند و سپس آنالیز نیمه کمی بیان ژن CODM روی تعدادی از آنها انجام شد. آنالیز نهایی خاموشی ژن ناشی از مکانیسم VIGS با استفاده از PCR زمان واقعی در بهترین گیاهان تراریخت انتخاب شده، کاهش ۹۵ درصدی بیان ژن CODM در مقایسه با نمونه‌های شاهد را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: مهندسی متابولیت، شقایق، آلکالوئید، کاهش بیان ژن، CODM.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۶۶۳۳۴۳۰۰۱۲، پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

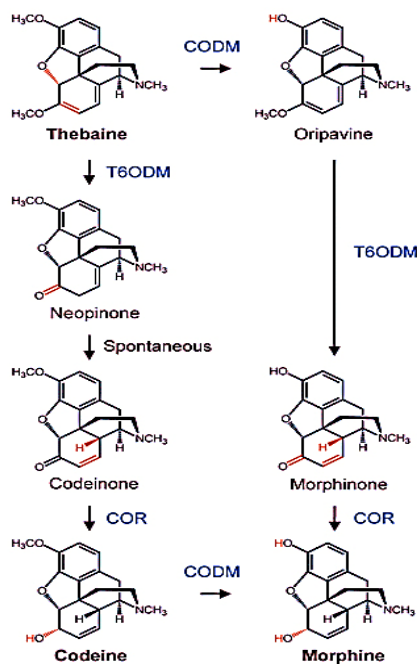
مقدمه

عنوان گونه‌ای مجزا (۱۶)، همچنان *Papaver somniferum* تنها گیاه شناخته شده‌ای است که مشتقاتی از تبائین را از طریق ا-دمتیلایون تولید می‌کند (شکل ۱).

بنابراین شناسایی روشی جایگزین برای تولید این ترکیبات ارزشمند به عنوان یک ضرورت مطرح است تا از این طریق، از هدررفت هزینه‌های هنگفت و زمان‌بر بودن فرآیند تولید، به نوعی جلوگیری به عمل آید (۲۳).

گیاه شقایق (*Papaver somniferum* L.) تنها منبع تجاری تولید مسکنهای کدئین و تعدادی از ترکیبات نیمه‌سنتزی مشتق شده از تبائین و اورپاوین شامل اکسی‌کدون، بوپرنورفین، نالترکسون و نالوکسون می‌باشد. امکان سنتز مصنوعی و تبدیل شیمیایی این ترکیبات وجود دارد اما با توجه به پیچیدگی نسبی فرآیند تولید، این گونه روشها اغلب مستلزم صرف هزینه‌های قابل توجهی است. به علاوه با وجود عدم اطمینان از *Papaver setigerum* به

قطعات کوتاه به طول ۲۳ تا ۶۰ نوکلئوتید نیز می‌تواند مؤثر باشد (۱۸).



شکل ۱- آلکالوئیدهای انتهایی مسیر سنتز مورفینان در گیاه شقایق (۱۲)

ناقلهای استفاده شده در VIGS برای تراریزش از طریق آگروباکتریوم شامل قطعه‌ای از ژن میزبان در کلونهای ویروسی می‌باشند. آگروباکتریوم بر اساس عمل تلقیح، ناحیه T-DNA ناقل ویروسی را برش می‌دهد که این ناحیه توسط RNA پلیمراز میزبان نسخه‌برداری می‌شود و ssRNA تولید می‌شود. در ادامه فعالیت آنزیم RDRP (RNA-dependent RNA polymerase) باعث تولید RNA دو رشته‌ای (dsRNA) از روی ssRNA می‌شود. در نهایت این siRNA های دو رشته‌ای تولید شده، بیشتر تکثیر شده و از روش سیستماتیک (مثلاً با کمک آوندهای گیاهی) به سایر قسمت‌های گیاه گسترش می‌یابند و از بیان ژن در آن قسمت‌ها جلوگیری به عمل می‌آید (۱۵). یکی از ناقلهایی که فراوان مورد استفاده قرار می‌گیرد، بر پایه ویروس تیغه‌ای تنباکو (Tobacco Rattle Virus; TRV) طراحی شده است، زیرا توانایی ایجاد آلودگی در

درک مبتنی بر توسعه سلولی، محیطی و مکانیسمهای کنترل بیولوژیکی، روشهای مهندسی متابولیک را برای تولید ارقام تجاری در گیاه شقایق توسعه داده است که این امر در واقع دست‌آورد افزایش تقاضای جهانی برای داروهای مسکن مشتق شده از این گیاه بوده است. دستورزی مسیرهای بیوسنتزی این گیاه از طریق ایجاد جهشهای تصادفی و روشهای اصلاح کلاسیک گزینشی به دفعات صورت گرفته است که مهم ترین آن منجر به تولید موتانت top1 با میزان بالای تبائین و اورپاوین و کاهش مورفین و کدئین گردید (۱۹). همچنین در ادامه، موتانت‌هایی با میزان بالای تبائین و کدئین از موتانت top1 ایجاد شده است (۷ و ۱۰). بررسی لاینهای جهش یافته بیانگر غیرفعال شدن ژنهای تبائین ۶-اُدمتیلاز T6ODM (مسئول میزان بالای تبائین و اورپاوین) و کدئین اُدمتیلاز CODM (مسئول میزان کدئین بالا) بوده است (۱۲). CODM، آنزیم انتهایی در مسیر بیوسنتزی مورفینان در گیاه شقایق می‌باشد که باعث دمتیلاسیون تبائین در موقعیت ۳ و تبدیل آن به اورپاوین و همچنین دمتیلاسیون کدئین و تبدیل آن به مورفین می‌شود. مهندسی ژن آنزیم کاتالیز کننده محصولات نهایی تولید شده در شبکه آلکالوئیدی مورفینان، فرصت تازه‌ای را برای تخمین و برآورد کنترل متابولیسم داروهای نارکوتیک در گیاه شقایق فراهم خواهد کرد.

تکنیک خاموش‌سازی هترولوگ ژن از طریق ساز و کار ویروسی VIGS (Virus induced gene silencing) به عنوان یکی از ابزارهای قوی در ژنومیکس کاربردی با هدف مطالعه عملکرد ژنهای گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. خاموشی ژن از طریق ویروسها در واقع تابع یک مکانیسم طبیعی ضد ویروس در گیاهان است که به منظور خاموش کردن هدفمند RNA های طبیعی درون گیاه که با توالیهای مهندسی شده در داخل ویروسها همولوگ هستند استفاده می‌شود. معمولاً قطعاتی به طول ۸۰۰-۳۰۰ نوکلئوتید که با ژنهای هدف در گیاهان همولوگ هستند در داخل ناقلهای ویروسی قرار داده می‌شوند، در حالی که

نمونه‌ها، RNA کل استخراج شده و در ادامه بر اساس دستورالعمل کیت شرکت فرمتاز اولین رشته cDNA ساخته شد. برای این منظور ابتدا مقدار ۷ میکرولیتر از RNA استخراجی با ۱ میلی‌لیتر از آغازگر (oligo(dt) و ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز ترکیب شد و پس از اضافه کردن سایر ترکیبات مورد نیاز موجود در کیت، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه ترمومیکسر قرار داده شد. در ادامه با استفاده از آغازگرهای DIOX-DF (oxoglutarate-dioxygenase) و DIOX-DR2، قطعه‌ای به طول ۲۵۹ bp در ناحیه 3' UTR منطبق بر آگزون انتهایی ژن *CODM* به عنوان قطعه القاگر خاموشی این ژن، از طریق واکنش PCR تکثیر شد (واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، واسرشت‌سازی ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر الگو ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه).

همسانه‌سازی توالی القاگر خاموشی ژن *CODM*: پس از تکثیر قطعه القاگر خاموشی ژن *CODM*، مطابق دستورالعمل کیت خالص‌سازی محصول PCR شرکت فرمتاز تخلیص گردید. سپس واکنش اتصال بین قطعه ژنی و ناقل pTZ57R/T با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase انجام گرفت. در مرحله بعد انتقال پلاسمید نو ترکیب ساخته شده به روش شوک کلسیمی در باکتری *E. coli* سویه *DH5α* صورت گرفت. سلولهای ترانسفورم شده در محیط کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و X-gal/IPTG کشت داده و سلولهای تراریخت جداسازی گردیدند. برای تأیید ورود ژن به داخل پلاسمید، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و هضم آنزیمی استفاده شد. همچنین سازه ژنی تعیین توالی شد و میزان تشابه رمز ژنتیکی توالی مورد تراریزش، با توالیهای موجود در بانک ژن مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه به منظور همسانه‌سازی توالی القاگر خاموشی ژن *CODM* در ناقل TRV، استخراج

مریستمهای گیاه میزبان را دارد (۱۷). ویروس تیغه‌ای تنباکو، دامنه میزبانی وسیعی دارد به طوری که حدود ۴۰۰ گونه گیاهی از انواع خانواده‌های گیاهان دولپه‌ای و تک لپه‌ای را آلوده می‌سازد (۲۱).

بر اساس گزارش هیلمن و همکاران (۲۰۰۵) به کارگیری ناقل ویروسی TRV حاوی ژن PapsPDS در گیاه شقایق نشان داد که این ناقل تأثیر نامطلوبی بر رشد و تولید مثل گیاه نداشته و علائم بیماری ویروسی مشاهده نگردید (۱۳). همچنین استفاده از فن VIGS در گیاه *Eschscholzia californica*، کارآمد بودن این روش را در تعیین عملکرد ژن، ۲ تا ۳ هفته پس از انتقال سازه ژنی به گیاه نشان داد (۲۲).

از آنجایی که فرآورده‌های استحصال‌ی این گیاه، نقش عمده و غیر قابل انکاری در تأمین برخی مواد دارویی برعهده دارند، در این پژوهش خاموشی ژن کد کننده آنزیم *CODM* (به عنوان یکی از مهم ترین ژنهای دخیل در انتهای شبکه آکالوئیدی مورفینان) با استفاده از فن VIGS مورد بررسی قرار گرفت تا تأثیر خاموشی این ژن بر تغییرات متابولیت‌های دارویی این شبکه مشخص گردد.

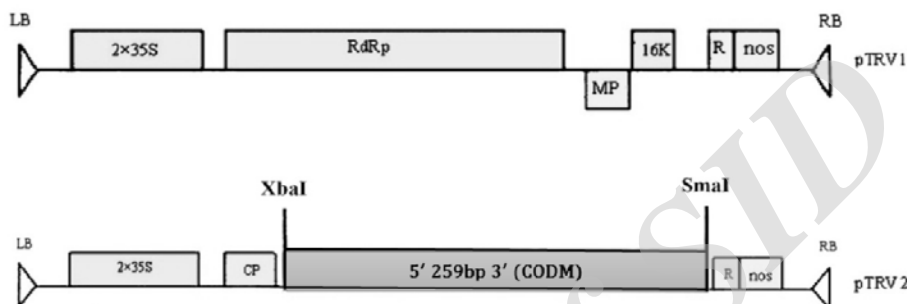
مواد و روشها

توالی کد کننده mRNA ژن *CODM* با طول ۱۴۵۲ bp در پایگاه اطلاعاتی NCBI با کد دسترسی GQ500141 ثبت شده است. برای خاموش‌سازی ژن *CODM*، باید ابتدا سازه خاموشی این ژن ساخته شود. پس از بررسیهای بیوانفورماتیکی، مشخص گردید که توالی DNA ژنومی کد کننده آنزیم *CODM*، دارای سه ناحیه اینترونی می‌باشد. بنابراین جهت جداسازی توالی القا کننده خاموشی، در ابتدا cDNA این ژن ساخته شد.

ساخت cDNA ژن *CODM*: ابتدا بخش انتهایی ساقه گیاه شقایق، چند روز قبل از گلدهی توسط ازت مایع پودر گردید و سپس مطابق دستورالعمل کیت شرکت سیناژن از

از آگروباکتریوم سویه *GV3101* برای انتقال سازه خاموشی به گیاه و ایجاد تراریختی استفاده شد. به این منظور پس از کشت آگروباکتریوم در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین، ناقل خاموشی TRV2 حاوی ژن *CODM* و نیز ناقل TRV1 حاوی ژن *RDRP*، به روش شوک کلسیمی (روش یخ و ذوب) به آگروباکتریوم منتقل شد.

پلاسمید از باکتریهای *E. coli* حاوی ناقل pTZ57R/T و ناقل ویروسی TRV2 با استفاده از کیت شرکت فرمتاز صورت گرفت. این دو ناقل توسط دو آنزیم *XbaI* و *SmaI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند و واکنش اتصال قطعه خاموشی در ناقل TRV2 انجام گرفت. به دنبال مستعد کردن باکتری *E. coli* به روش شوک کلسیمی، تراریزش سازه TRV2-*CODM* در این باکتری انجام شد (شکل ۲).



شکل ۲- دیاگرام مربوط به سازه‌های TRV1 و TRV2-*CODM*. در این شکل 2X35S، نشان دهنده دو نسخه از راه‌انداز *cauliflower mosaic virus*؛ پروتئین حرکتی؛ 16K، پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی؛ RZ، ریپوزایم؛ NOS، خاتمه دهنده نوپالین سنتتاز؛ RDRP، آنزیم RNA پلی‌مراز وابسته به RNA می‌باشد (۱۳).

آماده‌سازی مایع تلقیح، از مجموع ۲۸ گیاه انتخابی، تعداد ۲۰ گیاه برای تراریختی با TRV1 و TRV2-*CODM* و ۸ گیاه برای تراریختی توسط TRV1-TRV2 خالی به عنوان گیاهان شاهد انتخاب شدند. از آنجایی که اختلاف بیان ژن مشاهده شده بین گیاهان مایه کوبی شده با سازه TRV2-*CODM* و TRV2 خالی می‌تواند تنها ناشی از تأثیر حضور قطعه القاگر خاموشی ژن *CODM* در سازه TRV2-*CODM* باشد، از ناقل TRV2 خالی در نمونه‌های شاهد استفاده گردید. به هر گیاه ۳۰۰ میکرولیتر از مایع تلقیح توسط سرنگ بدون سوزن به لایه زیرین برگهای گیاهان شقایق تزریق شد. پس از گذشت ۸ هفته از زمان تزریق، سه سانتیمتر انتهایی ساقه گیاهان در مراحل اولیه فاز زایشی توسط تیغه اسکالپل جدا شد و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز گردید.

آنالیز بیان موقت سازه خاموشی TRV2-*CODM*: جهت بررسی میزان بیان ژن *CODM* به وسیله واکنش PCR در

تراریزش سازه خاموشی TRV2-*CODM* به گیاه شقایق: پس از تأیید سازه القاگر خاموشی موقت ژن *CODM* و انتقال آن به آگروباکتریوم، این سازه به گیاهان در مرحله ۳-۵ برگی، با یک سرنگ بدون سوزن تزریق گردید. بدین صورت که ابتدا آگروباکتریوم‌های سویه *GV3101* ترانسفورم شده با TRV1، TRV2 خالی و TRV2-*CODM* در محیط LB مایع (حاوی ۱۰ میلی‌مولار MES (N-)) ethanesulfonic acid (morpholino) و ۲۰ میکرومولار استوسرینگون) کشت شبانه داده شد. آگروباکتریوم پس از کشت شبانه در دور ۳۰۰۰ جمع‌آوری شد و در مایع تلقیح (حاوی ۱۰ میلی‌مولار MES و ۲۰ میکرومولار استوسرینگون و ۱۰ میلی‌مولار MgCl₂) مایع کوبی شد. پس از رسیدن سطح جذب باکتری در ۲۶۰ نانومتر به میزان ۱/۵، نسبت ۱:۱ از باکتری حاوی TRV1 و TRV2-*CODM* و همچنین TRV1 و TRV2 خالی با هم مخلوط شدند و سپس برای تزریق به گیاه استفاده گردید. پس از

۶۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به صورت یک درجه سانتی‌گراد به ازای گذشت هر ۵ ثانیه، اعمال گردید. همچنین با استناد بر آخرین پژوهش‌های صورت گرفته روی مهندسی متابولیک گیاه شقایق، از ژن *Elongation factor 1a* (*ELF1a*) به عنوان کنترل داخلی جهت نرمال‌سازی داده‌های مربوط به بیان ژن *CODM* در نمونه‌های تراریخت و شاهد استفاده شد. همزمان با انجام واکنش‌های PCR در زمان واقعی، استانداردسازی جهت تعیین کارایی تکثیر و ضریب تبیین شیب خط رگرسیون، با هدف تعیین فرمول مناسب برآورد نسبت واقعی بیان ژن *CODM* و *ELF1a* انجام شد که میزان کارایی تکثیر هر دو ژن در حدود ۹۰ درصد محاسبه گردید. براین اساس از روش لیواک برای محاسبه میزان بیان ژن استفاده گردید.

نتایج و بحث

پس از اتمام فرآیند تراریزش قطعه خاموشی ژن *CODM* در ناقل pTZ57R/T، جهت اطمینان از صحت همسانه‌سازی قطعه خاموشی در باکتری *E. coli*، برای تعدادی از کلنی‌های سفید به همراه نمونه‌های کنترل مثبت و منفی، PCR انجام شد و صحت این فرآیند تأیید گردید (شکل ۳). تعیین توالی ناقل pTZ57R/T حاوی قطعه خاموشی ژن *CODM* نیز انجام شد.

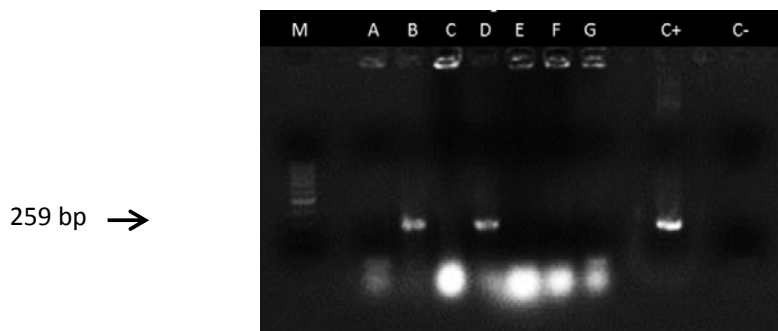
در ادامه، قطعه خاموشی ژن *CODM*، از ناقل pTZ57R/T توسط آنزیم‌های برشی *SmaI* و *XbaI* جداسازی و در ناقل TRV2 همسانه‌سازی گردید. تأیید این همسانه‌سازی، به وسیله واکنش PCR انجام گرفت (شکل ۴).

کلنی‌های شماره ۸ و ۱۱ جهت اطمینان بخشی به صحت فرآیند همسانه‌سازی، توسط آنزیم‌های برشی *SmaI* و *XbaI* مورد هضم قرار گرفت (شکل ۵). همچنین پس از انتقال سازه TRV2-*CODM* به آگروباکتریوم به روش شوک کلسیمی (یا روش یخ و ذوب)، این پلاسمید مجدداً استخراج گردید و از طریق تعیین توالی صحت آن تأیید

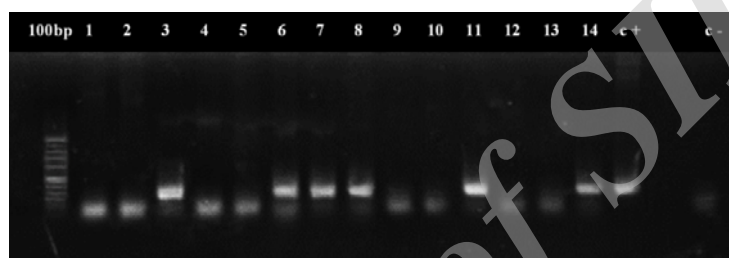
زمان واقعی (Real time PCR)، ابتدا یک غربالگری اولیه از طریق PCR با آغازگرهای اختصاصی بخشی از ژن کدکننده پروتئین پوششی (CP; Coat protein) ویروس TRV، بر روی cDNA کلیه نمونه‌های موجود، طراحی گردید. سپس نمونه‌های با PCR مثبت جهت مرحله بعدی آزمایش انتخاب شدند.

در مرحله غربالگری اولیه هدف آن بود که تراریخت بودن گیاهان تراریخت شده بررسی شود؛ در حالی که در مرحله دوم به بررسی تغییرات بیان ژن در گیاهان تراریخت شده با دو روش نیمه کمی و کمی پرداخته شد. برای این منظور ابتدا RNAهای استخراج شده بر اساس دستورالعمل گفته شده از نمونه‌های CP مثبت، به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین غلظت و خلوص گردید و پس از یکسان کردن غلظت کلیه نمونه‌ها (به منظور بررسی تغییرات بیان نسبی ژنهای هدف)، از روی آنها cDNA ساخته شد. برای انجام واکنش PCR در زمان واقعی، تعدادی از گیاهان که بیشترین خاموشی ژن *CODM* را در روی ژل از خود نشان دادند، انتخاب شد. پس از استخراج RNA از دو نمونه گیاهی (به عنوان تکرار بیولوژیک)، از روی RNA مربوط به هر نمونه دو بار cDNA (به عنوان تکرار تکنیکی) ساخته شد. آزمایشات PCR در زمان واقعی نیز سه مرتبه تکرار گردید. پس از انجام هر آزمایش جهت تأیید نتایج حاصله، نمونه‌های به دست آمده بر روی ژل تفکیک شدند. برای انجام PCR در زمان واقعی، حجم هر واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل ترکیب حاوی سایبرگرین، cDNA، آغازگر پیشرو و برگشتی و آب عاری از نوکلئاز بود. برنامه زمان‌بندی PCR در زمان واقعی بدین صورت تعیین گردید که ابتدا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه اعمال شده و سپس طی ۴۰ سیکل متوالی دماهای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه برای واسرشته‌سازی، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه برای اتصال و گسترش تعیین گردید. همچنین در انتهای هر واکنش، جهت رسم منحنی ذوب، افزایش دما از

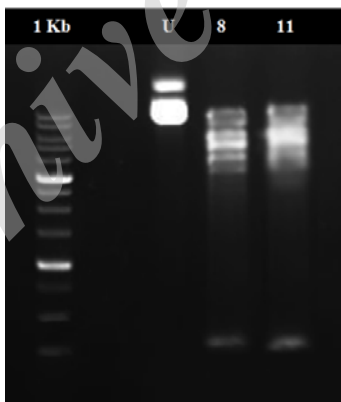
گردید.



شکل ۳- الکتروفورز محصول colony PCR همسانه‌سازی قطعه خاموشی ژن *CODM* در ناقل pTZ57R/T. در کلنیهای B و D باندهای مورد نظر با طول ۲۵۹ bp مشاهده گردید.



شکل ۴- تأیید حضور توالی القاگر خاموشی ژن *CODM* در ناقل TRV2 از طریق انجام واکنش PCR و با استفاده از آغازگرهای DIOX-DF و DIOX-DR2. در کلنیهای شماره ۳، ۶، ۷، ۸، ۱۱ و ۱۴ حضور این قطعه به طول ۲۵۹ bp نشان داده شده است.



شکل ۵- تأیید حضور سازه خاموشی ژن *CODM* در ناقل TRV2 توسط واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیمهای *SmaI* و *XbaI*. U: پلاسمید هضم نشده. ۸ و ۱۱ شماره کلنیهای مورد هضم می‌باشد.

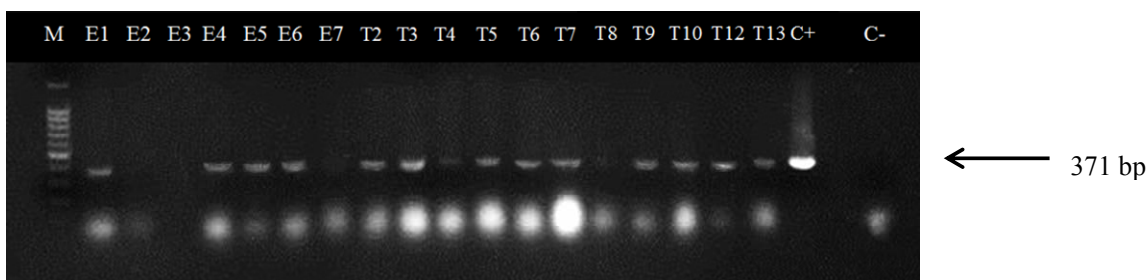
نتیجه آن تکثیر قطعه‌ای به طول ۳۷۱ bp در نمونه‌های تراریخت موقت بود (شکل ۶).

پس از انجام PCR با آغازگرهای ژن CP، به وسیله فن RT PCR نیمه کمی، غربالگری دوم با هدف تعیین گیاهان منتخب برای آزمایشات PCR در زمان واقعی، انجام شد و

قبل از انجام آزمایشات PCR در زمان واقعی، جهت کوتاه شدن فرآیند آنالیز بیان ژن، یک غربالگری اولیه روی گیاهان تلقیح یافته با آگروباکتریوم حاوی سازه خاموشی صورت گرفت. این غربالگری اولیه از طریق انجام PCR با آغازگرهای ژن CP مربوط به ناقل TRV به اجرا درآمد که

ماده غیرسمی ریما) با استفاده از نرم افزار ImageJ این مقایسه صورت پذیرفت (شکل ۷).

از طریق مقایسه شدت باندهای تشکیل شده متناظر دو ژن *ELF1* و *CODM* روی ژل آگارز (با رنگ آمیزی به کمک



شکل ۶- تأیید تراریختی موقت تعدادی از گیاهان آلوده شده توسط ناقل TRV2 خالی (نمونه‌های شاهد) و TRV2 حاوی قطعه خاموشی ژن *CODM* از طریق PCR با آغازگرهای ژن CP. E1-E7: نمونه‌های تیمار شده با ناقل TRV2 خالی به عنوان شاهد، T2-T13: نمونه‌های تیمار شده با TRV2 حاوی قطعه خاموشی.



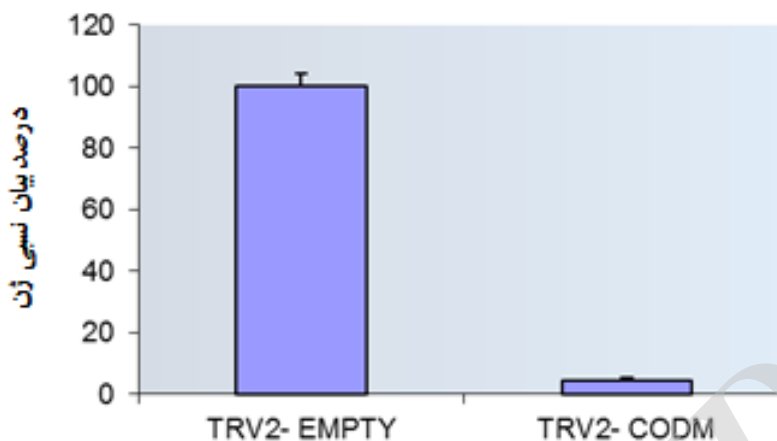
شکل ۷- بررسی نیمه کمی بیان ژن *CODM* در مقایسه با ژن کنترل داخلی *ELF1*.

در این میان تنها گیاه شقایق توانایی بیوسنتز آلکالوئیدهای نارکوتیک مانند کدئین را داراست. بدیهی است تحقیقات برای بررسی دقیق‌تر تأثیر آنزیمهای *CODM* و *T6ODM* دخیل در انتهای مسیر بیوسنتز مورفینان، پیش از هر عاملی، پاسخی به نیاز صنعت بزرگ داروسازی و مسائل اجتماعی-اقتصادی مرتبط با تولید این مواد بوده است. تعیین عملکرد ژنهای گیاهی امروزه به طور متداول از طریق الحاق قطعاتی از ژنهای مورد نظر انجام می‌شود. افزایش بیان موقت ژن *COR* در برگهای گیاهان تراریخت شقایق موجب تجمع آلکالوئیدهای مورفین و کدئین گردید (۱۴). تکنیکهای خاموش‌سازی ژن مبتنی بر همولوژی بازها، اثبات کرده‌اند که می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب برای سایر روشها، بر محدودیتهای خاموش‌سازی ژن غلبه کنند. مولکولهای dsRNA می‌توانند به روش RNA سنساق سری پایدار و یا آلودگی توسط ویروسهای

بعد از انجام واکنش RT PCR نیمه کمی، تعدادی از گیاهانی که بیشترین کاهش بیان ژن *CODM* را در روی ژل از خود نشان داده، انتخاب شده و سپس از روی مربوط به هر نمونه، دو بار cDNA (به عنوان تکرار تکنیکی) ساخته شد و همچنین آزمایشات PCR در زمان واقعی نیز سه مرتبه تکرار گردید. شکل ۸ میزان خاموش‌سازی ژن *CODM* در نمونه‌های گیاهی تراریخت حاوی سازه خاموشی *TRV2-CODM* در مقایسه با نمونه‌های شاهد را نشان می‌دهد. در این تحقیق دیده شد که به طور میانگین میزان خاموشی ژن هدف در بهترین گیاهان تراریخت انتخاب شده نهایی نسبت به گیاهان شاهد ۹۵ درصد است.

تاکنون ساختار حدود ۲۵۰۰ آلکالوئید از خانواده بنزیلایزوکوئینولین (BIA) که به صورت طبیعی در تعدادی از خانواده‌های گیاهی ساخته می‌شوند، شناسایی شده‌اند که

نو ترکیب که قسمتی از ژنهای گیاهی را حمل می‌کنند، به گیاهان معرفی شوند (۳ و ۲۳).



شکل ۸- مقایسه میزان بیان ژن *CODM* در بهترین نمونه‌های تراریخت برای سازه خاموشی *TRV2-CODM* در مقایسه با نمونه‌های شاهد غیر تراریخت (*TRV2-EMPTY*). محور عمودی بیان درصد بیان نسبی ژن هدف می‌باشد.

پتانسیل اقتصادی فراوان در تولید وارته‌هایی با پروفایل آلکالوئیدی مرفینان مهندسی شده دارد (۱۲).

کاهش ۹۵ درصدی بیان ژن *CODM* با استفاده از تکنیک *VIGS* در این تحقیق، به عنوان روشی مبتنی بر خاموشی پس از ترجمه نسخه‌برداری (*PTGS*)، نشان می‌دهد که همانند آنچه که در منابع پیشین ذکر شده است، *VIGS* باعث جلوگیری کامل از نسخه‌برداری ژن هدف نمی‌شود و هنوز درصدی از مولکولهای *RNA* این ژن به پروتئین ترجمه می‌شوند. همچنین مشاهده تفاوت درصد خاموش‌سازی ژنها در *VIGS* می‌تواند ناشی از ماهیت تکنیکی این آزمایش، مانند ناحیه انتخاب شده از ژن هدف جهت همسانه‌سازی در ناقل، وجود ژنهای کد کننده آنزیمهایی با فعالیت مشابه، میزان بیان ژن طبیعی گیاه و تصادفی بودن جایگاه ورود قطعه *DNA* در ژنوم میزبان باشد. این در حالی است که در پژوهشهای پیشین، مشخص شده است که نسلهای مختلف گیاهی از لحاظ عمل ساختار خاموش کننده و میزان خاموشی متفاوت می‌باشند (۱).

امروزه شاهد افزایش رویکرد جامعه به استفاده از داروهای گیاهی در درمان بیماریهای مختلف انسان در کشور ایران

مزیت عمده استفاده از *VIGS*، ممانعت از انجام کارهای پر زحمت و وقت‌گیر طی فرآیند تراریخت در گیاه است که موفقیت در این روش در گرو انجام مطالعات دقیق و تعیین سیستم میزبانی مناسب است (۴، ۶، ۸، ۹ و ۱۱). ناقل *TRV* به علت داشتن دامنه میزبانی وسیع، توانایی نفوذ در بافتهای مریستمی، ایجاد علائم بیماری‌زایی ملایم و توان خاموش‌سازی گسترده، به عنوان یک ناقل *VIGS* کامل شناخته شده است (۵ و ۲۰). استفاده از آگروباکتریوم برای معرفی ناقل *TRV* به یک میزبان، می‌تواند راهکاری مناسب جهت غلبه بر مشکلات نسخه‌برداری از *RNA* ویروسی در شرایط درون شیشه‌ای و محدودیتهای به کارگیری روشهایی مانند تفنگ ژنی باشد.

تلاش برای تولید وارته‌هایی از گیاه شقایق که در آن مسیر ساخت آنزیم *CODM* مسدود شده است، می‌تواند به راهبردی برای تولید مستقیم کدئین تبدیل شود که سبب حذف تعدادی از مراحل صنعتی خالص‌سازی کدئین در صنعت داروسازی می‌گردد. کشت گسترده وارته *Top1* در کشور استرالیا تحت تأثیر افزایش تقاضا برای داروهای آپوئیدی نیمه صنعتی مانند اُکسی‌کدون، نشان از وجود

روش‌های خاموشی دائم ژن مبتنی بر همولوژی بازها (مانند RNAi) می‌تواند به عنوان روشی کارآمد در تولید گیاهان تراریخت دائم با تغییرات بیانی ژنهای مربوط به آلکالوئیدهای مطلوب در گیاه شقایق مورد استفاده قرار گیرد.

بوده و برخی از آنها نیز به صورت تجاری وارد عرصه دارویی کشور شده است (۲). در پژوهش حاضر، مؤثر بودن فن بکاتر رفته به عنوان یک استراتژی در ارزیابی بیان ژنهای مؤثر در تولید ترکیبات آلکالوئیدی و تطبیق‌پذیری شقایق به عنوان گیاه دارویی مدل در مطالعات ژنومیک کاربردی اثبات گردید. از این رو به نظر می‌رسد کاربرد

منابع

۱. رخشنده‌رو، ف.، پالوکایتیس، پ. و شمس بخش، م. ۱۳۹۲. ناپایداری ساختارهای ساقه - حلقه در جلوگیری از بیان ژنهای مسئول مقاومت در برابر آلودگیهای ویروسی در توتونهای تراریخت. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. جلد ۲۶، شماره ۳، ص ۴۱۵-۴۰۱.
۲. امیر اصلانی، ب.، صابونی، ف.، عباسی، ش.ص.، میررضوی، م.، ناظم، ح.ا.، خرم‌خورشید، ح.ر. و ثابت، م.ص. ۱۳۹۲. اثر داروی گیاهی آیمود بر تولید نیتریک اکساید در سلولهای میکروگلیای ملتعب. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. جلد ۲۶، شماره ۳، ص ۲۴۲-۲۵۰.
3. Baulcombe DC (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current opinion in plant biology* 2:109-113
4. Burch-Smith TM, Miller JL, Dinesh-Kumar SP (2006) Delivery of dsRNA into Plants by VIGS Methodology. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006:pdb. prot4327
5. Burch-Smith TM, Schiff M, Liu Y, Dinesh-Kumar SP (2006) Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiology* 142:21-27
6. Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP (2004) Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal* 39:734-746
7. Byrne CJ, Fist AJ, Gerlach WL (2000) Papaver somniferum strain with high concentration of thebaine and oripavine. *Google Patents US6067749*.
8. Constantin GD, Krath BN, MacFarlane SA, Nicolaisen M, Elisabeth Johansen I, Lund OS (2004) Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *The Plant Journal* 40:622-631
9. Ding XS, Schneider WL, Chaluvadi SR, Mian MR, Nelson RS (2006) Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1229-1239
10. Fist AJ, Miller JA, Gregory D (2013) Papaver somniferum with high concentration of codeine. *Google Patents US20100234600*.
11. Fofana IB, Sangare A, Collier R, Taylor C, Fauquet CM (2004) A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant molecular biology* 56:613-624
12. Hagel JM, Facchini PJ (2010) Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature chemical biology* 6:273-275
13. Hileman LC, Drea S, Martino G, Litt A, Irish VF (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* 44:334-341
14. Hosseini B, Shahriari-Ahmadi F, Hashemi H, Marashi M-H, Mohseniazar M, Farokhzad A, Sabokbari M (2011) Transient Expression of *COR* Gene in *Papaver somniferum*. *BioImpacts: BI* 1:229
15. Jaberolansar N, Hayati J, Rajabi-Memari H (2011) Tomato and Tobacco Phytoene Desaturase Gene Silencing by Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) Technique. *Iranian Journal of virology* 4:7-11
16. La Valva V, Sabato S, Gigliano GS (1985) Morphology and alkaloid chemistry of *Papaver setigerum* DC. (*Papaveraceae*). *Taxon* 34(2):191-196. 8.
17. Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar S (2002) Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance

- to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 30:415-429
18. Liu Z (2009) New viral vectors for the expression of antigens and antibodies in plants. ISBN 978-1109142648.
 19. Millgate AG, Pogson BJ, Wilson IW, Kutchan TM, Zenk MH, Gerlach WL, Fist AJ, Larkin PJ (2004) Analgesia: morphine-pathway block in top1 poppies. *Nature* 431:413-414
 20. Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC (2001) Technical advance: tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* 25:237-245
 21. Robinson D, Harrison B (1989) Tobacco rattle virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses. no. 12, 4 PP.
 22. Tekleyohans DG, Lange S, Becker A (2013) Virus-Induced Gene Silencing of the Alkaloid-Producing Basal Eudicot Model Plant *Eschscholzia californica* (California Poppy). Virus-Induced Gene Silencing. Springer, pp 83-98
 23. Wijekoon CP, Facchini PJ (2012) Systematic knockdown of morphine pathway enzymes in opium poppy using virus-induced gene silencing. *The Plant Journal* 69:1052-1063

Systematic silencing of codeine O-demethylase (*CODM*) gene, using virus-induced gene silencing (VIGS) technique in *Papaver somniferum* L.

Shahivand H.¹, Ismaili A.¹, Nazarian Firouz-Abadi F.¹ and Zebarjadi A.R.²

¹ Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, I.R. of Iran

² Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

Papaver somniferum L. is the most important commercial source of production of morphinan alkaloid component, such as codeine, thebaine, narcotine and papaverine that are exploited by the pharmaceutical industry as analgesics, antitussives and anti-spasmodics. Recently, metabolic engineering technology for genetic manipulation of alkaloid biosynthesis and metabolic products has been used via production of transgenic plants. Codeine O-demethylase (*CODM*) catalyzes the late step of morphine biosynthesis in opium poppy for conversion of thebaine to oripavine and codeinone and codeine to morphine via demethylation mechanism. This study was conducted in silencing of *CODM* gene using VIGS technique. cDNA was amplified using specific primers, and then a part of this cDNA at the 3' UTR terminal was subcloned in TRV2 vector in *Agrobacterium* as silencing fragment. Plant leaves was inoculated via *Agrobacterium* containing silencing fragment. Initial screening of transformed plants was conducted via PCR on tobacco rattle viral coat protein gene (TRV-CP) and then, some positive TRV plants were analyzed using semi-quantitative RT PCR. The final analysis of VIGS was performed using real-time PCR. Based on the results 95 percent reduction in gene expression of *CODM* in transgenic plants compared to the control plants was achieved.

Key words: *Papaver somniferum*, Metabolic Engineering, alkaloid, Reduction in gene expression, *CODM*.