مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی ـ پژوهشی)
جلد ۷، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۵

خاموش کردن بیان ژن کدئین رداکتاز به‌روش خاموش‌سازی القایی با ویروس در گیاه دارویی شقایق (Papaver somniferum L.)

راضیه خواجوند M.Sc.[1]، احمد اسماعیلی Ph.D.[1*]، فرهاد نظریان فیروزآبادی Ph.D[1]، علی‌محمد لطیفی Ph.D[2]

۱- دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، خرم آباد، ایران
۲- دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... ، مرکز تحقیقات کاربردی، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ismaili.a@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۰

چکیده

هدف: گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum* L.) تنها منبع تجاری از آلکالوئیدهای دارویی بنزوفنانترین از زیر گروه آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین است که شامل مسکن‌های ضد درد مانند کدئین و داروهای نیمه مصنوعی اکسی کدون، باپرنورفین و نالتروکسون می‌باشد. اگرچه بیشتر ژن‌های مسیر این آلکالوئیدها شناسایی شده‌اند، ولی تنظیم پس از نسخه‌برداری ژن‌های مسیر آلکالوئیدهای آن‌ها به‌خوبی شناسایی نشده است. خاموش سازی القایی با ویروس (virus induced gene slencing) یکی از روش‌های سریع برای خاموشی ژن است که در این تحقیق از این روش برای بررسی خاموشی یکی از ژن‌های مهم مسیر آلکالوئیدهای این گیاه استفاده شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق به‌منظور کاهش سیستماتیک در سطوح بیان ژن آنزیم‌های مسیر تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین از VIGS استفاده شد. جهت خاموشی ژن کدئین رداکتاز (Codeinone Reductase) از ناقل pTRV جهت همسانه‌سازی استفاده شد. انتقال آگروباکتری حاوی سازه مورد نظر به برگ‌های ۲ تا ۳ هفته‌ای با استفاده از روش اگروواینفیلتراسیون انجام شد.

نتایج: نتایج همسانه‌سازی این ژن با استفاده از روش‌های مختلف مولکولی همانند PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت. ترا ریختگی گیاهان تلقیح شده با سازه ژنتیکی مورد نظر با استفاده از PCR اثبات شد. تعیین سطوح نسخه‌برداری ژن هدف با استفاده از فن PCR نیمه کمی و PCR در زمان واقعی نشان داد که بیان ژن COR حدود ۸۹ درصد کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از روش تداخل RNA، بیان ژن کدئین رداکتاز به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش بیان داشت.

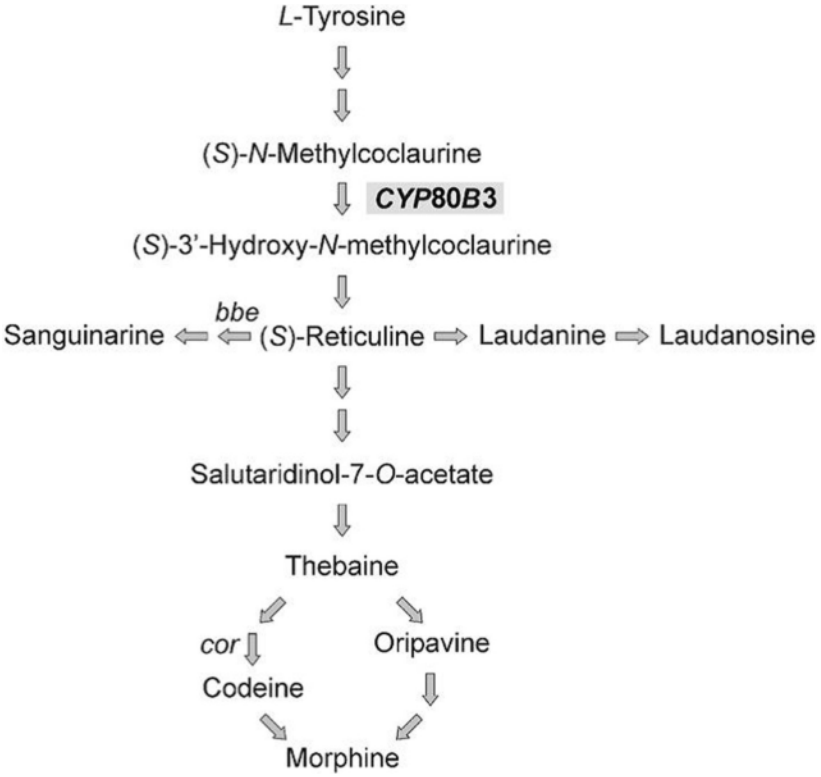
واژگان کلیدی: بنزیل ایزوکوئینولین، آگروباکتری، مهندسی متابولیک، pTRV، PCR زمان واقعی

مقدمه

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تأمین بهداشت و سلامت جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماری‌ها برخوردار می‌باشند. گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به‌طور کلی فرآورده‌های طبیعی به‌ویژه در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و مهم‌ترین علل آن، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی تهدید کننده کره زمین از سوی دیگر بوده است (۱).

گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد. خصوصیات دارویی شقایق از زمان‌های بسیار دور شناخته شده و ترکیبات گیاهی آن در ارتباط با زمینه‌های اقتصادی، اجتماعی و سیاسی موجب شده تا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی دنیا مطرح شود. اهمیت دارویی این گونه مربوط به قابلیت تولید گروهی از آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین از زیر گروه آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینولی می‌باشد. برخی از این مسکن‌ها به‌عنوان آلکالوئیدهای ۵حلقه‌ای بنزیل ایزوکوئینولین شامل تبائین، کدئین، مورفین و مشتقات آن‌ها می‌باشند. مورفین به‌همراه مواد شیمی درمانی دیگر نظیر وین کریستین و وین‌بلاستین و کامپوتسین ازآلکالوئیدهای مهم تجاری شده هستند که از این گیاه دارویی استخراج می‌شوند. همچنین می‌توان به آنتی-بیوتیک‌هایی نظیر سانگونارین دارای خاصیت ضد میکروبی و ضد التهابی، نوسکاپین دارای خاصیت ضد سرفه و ضد توموری، پاپاورین به‌عنوان گشاد کننده رگ‌ها و توبوکورارین شل‌کننده عضلات اشاره نمود (۲).

در طول مسیر ساخت داروهای نارکوتیک انتهایی، آنزیم مرحله نهایی در دو واکنش متناوب کدئینون رداکتاز می-باشد. اولین بار کدئینون رداکتاز (COR) توسط لنز و زنک (۳) از کشت سلولی گونه*P. somniferum* استخراج شد. در سال ۱۹۹۹ نیز برای اولین بار جداسازی و شناسایی چهار cDNA مشابه کد کننده کدئینون رداکتاز انجام گرفت و در اشرشیاکلایی بیان شد (۴). مسیر تولید آلکالوئیدهای مورفینان در شکل ۱ آمده است (۵).



شکل ۱: مسیر تولید آلکالوئیدهای مورفینان (۵).

مهندسی متابولیک گیاهی رشته نسبتا جدیدی از تحقیقات است که فرصت‌های تازه‌ای را برای پیشرفت متابولیک‌های گیاهی، سلولی و فرآیندهای فیزیولوژیکی ایجاد می‌کند. امروزه مهندسی متابولیک به‌عنوان روشی خاص برای تنظیم ساخت آلکالوییدها و دست‌کاری فرآورده‌های متابولیکی است که می‌تواند سطح مسیرهای با ارزش میانه یا فرآورده‌های انتهایی را به‌وسیله فوق بیان از یک آنزیم با سرعت محدود افزایش دهد و یا اینکه متابولیت‌های نامطلوب را از طریق خاموشی ژن از بین برده و کاهش دهد (۶). تاکنون آزمایش‌های زیادی جهت بررسی اثرات مهندسی متابولیکی مسیر آنزیمی ساخت مورفینان چه از طریق روش-های افزایش بیان ژن و چه از طریق روش‌های خاموشی ژن انجام گرفته است. در گیاه شقایق آزمایش‌هایی جهت افزایش بیان موقت ژن COR انجام گرفت که۱۱ گیاه از ۱۵ گیاه افزایش بیان را نشان دادند (۷).

یکی از راه‌های کاهش و متوقف سازی یک محصول در گیاه، خاموشی ژن می باشد که انواع مختلفی دارد (۸). خاموشی پس از رونویسی (Post-transcriptional gene silencing) شامل آلودگی توالی نوکلئوتیدی خاصی است که با ویروس و mRNA سلول انجام می‌گیرد (۹). VIGSروشی است که در آن از دفاع ذاتی گیاه بر علیه آلودگی ویروسی استفاده شده و براساس پدیده RNA-interference (RNAi) می‌باشد که به تداخل بیان ژن به واسطه RNA های کوچک در توالی خاصی اشاره دارد. در گیاهانی که با ویروس آلوده می‌شوند، چرخه‌هایی ایجاد می‌شود که RNA ویروسی، خاموشی ژن را در میزبان در برابر ویروس، تحریک می‌کند (۱۰). فن VIGS فنی قوی برای خاموشی ژن‌های خاص و مطالعه سریع کاهش عملکرد و آنالیز بیان ژن است که نیازمند تراریزش در گیاه می‌باشد و روشی ساده است که عملکرد را به‌سرعت نشان می‌دهد (۱۱). هدف از انجام این تحقیق ساخت سازه خاموشی موقت ژن کدئینون رداکتاز (COR) و تاثیر آن روی بیان ژن هدف آن در گیاه دارویی شقایق بود.

مواد و روش‌ها

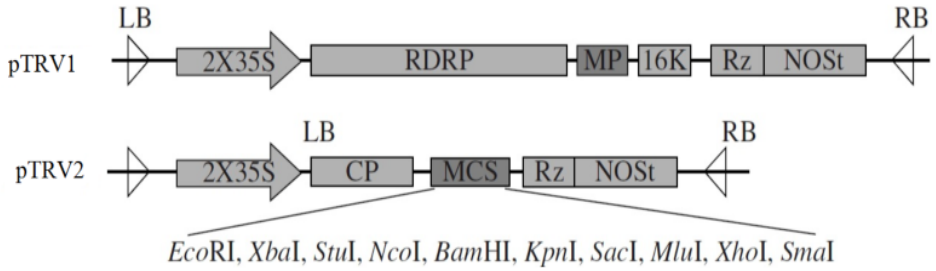
این آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به اجرا در آمد. بذور گیاه شقایق (*P. somniferum*) از موسسه جنگل‌ها و مراتع تهیه شدند. پس از ضدعفونی بذور با الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و پس از چند بار شستشو با آب مقطر استریل، در نهایت بذور استریل در محیط B5 (۱۲) بدون هورمون حاوی ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر ساکارز کشت شدند. بذرهای کشت شده در شرایط مناسب جهت جوانه‌زنی در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. سپس برگ‌های جوان گیاه‌چه‌های یک و نیم ماهه برداشت شد و با نیتروژن مایع پودر شد و بلافاصله در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. به‌منظور ساخت سازه خاموشی موقت ژن COR، ابتدا از گیاه با استفاده از کیت RNA XPLUS (شرکت سیناژن) استخراج RNA انجام گرفت. سپس با آنزیم رونوشت بردار معکوس، cDNA ساخته شد. از cDNA تکثیر شده به‌عنوان الگو جهت ساخت DNA دو رشته‌ای و تکثیر ژن توسط PCR با استفاده از آغاز گرهای اختصاصی ژن طبق برنامه استفاده شد. طراحی آغاز گر با استفاده از نرم افزار Vector NTI (version 9.0) روی توالی گرفته شده از پایگاه اطلاع داده‌ها NCBI (شماره دسترسی AF108435)طراحی شد. برنامه زمانی PCR به‌صورت دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه طراحی شد. ۳۵ چرخه برای واکنش PCR در نظر گرفته شد. الکتروفورز ژل آگارز برای محصول PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد انجام گرفت. به‌منظور تکثیر و نگه‌داری ژن موردنظر و همسانه‌سازی آن در ناقل pTRV ابتدا محصول PCR در ناقل T/A کلون شد. سپس قطعه تکثیر شده و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد و پس از مشاهده باند مورد نظر و تطبیق اندازه باند با اندازه

باند نشانگر، باند توسط دستورالعمل شرکت فرمنتاز از روی ژل استخراج شد و بعد الحاق محصول PCR در ناقل Ptz57R/T (Vectorشرکت فرمنتاز) به‌کمک آنزیم لیگاز T4 طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. تراریزش و عمل انتقال ناقل به باکتری *E.coli* سوش DH5α به روش ذوب و یخ با استفاده از شوک کلسیمی انجام گرفت. برای غربال باکتری‌هایی که پلاسمید به آن‌ها منتقل نشده است از آنتی بیوتیک آمپی سیلین و برای جداسازی باکتری‌هایی با پلاسمید ترا ریخت از روش رنگ کلونی استفاده شد. تعدادی از کلونی‌های سفید به‌دست آمده (تراریزش شده) واکشت شد و کلونی PCR با آغاز گرهای ژن انجام گرفت. بعد از تایید کلونی PCR بر روی کلونی‌ها، از کلونی‌ها استخراج پلاسمید با روش Miniperpration انجام شد و سپس مورد توالی یابی قرار گرفتند. نتیجه حاصل از توالی یابی با بانک‌های اطلاعاتی تطابق داده شد و آغاز گرهایی برای تکثیر این قطعه توسط نرم افزار (Vector NTI version 9.0)) طراحی شد. بعد از طراحی آغاز گرها و بازیابی قطعه نهایی، قطعه موردنظر به‌منظور مشابه نبودن توالی‌های برشی بر روی قطعه، با نرم افزار NEBCutter مورد بررسی قرار گرفت. برنامه زمانی PCR برای آغاز گرهای طراحی شده به این صورت بود که دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه طراحی شد. ۳۵ چرخه برای واکنش PCR در نظر گرفته شد. الکتروفورز ژل آگارز برای محصول PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد انجام گرفت.

به‌علت اینکه در فن خاموشی به‌روش VIGS اساس کار بر پایه همولوژی است، قطعه مورد نظر با استفاده از سایت RNASCAN مورد بررسی قرار گرفت. بعد از تایید توالی یابی، کشت مایع از یکی از کلونی‌های سفید تایید شده انجام شد و به‌مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور انکوبه شد. روز بعد استخراج پلاسمید انجام گرفت.

همسانه سازی ژن COR در ناقل خاموشی pTRV2

یکی از ناقل‌های مورد استفاده در VIGS ناقل pTRV یا ویروس جغجغه ای توتون می‌باشد که متعلق به جنس *Tobravirus* بوده و ژنوم آن از نوع مولکول RNA تک رشته ای می‌باشد. ناقل pTRV در دو ناقلpTRV1 و pTRV2 توزیع شده است. ناقلpTRV1 حاوی ژن‌های کد کننده برای حرکت پروتئین و تکثیر پروتئین می‌باشد. ناقلpTRV2 شامل ژن‌های کد کننده پروتئین پوششی (coat protein) و دو پروتئین غیرساختاری است. هر دو بخش ژنوم ویروسی به‌وسیله آغاز گر CaMV 35S آغاز و با ساخت نوپالین به اتمام می‌رسند. هر دو ناقل مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین را دارند. در شکل ۲ ساختارهای ناقل pTRV1 و pTRV2 آمده است (۱۳).



شکل ۲: ساختار ناقل‌های pTRV1 وpTRV2 (۱۳).

برروی پلاسمید استخراج شده از ناقل T/A به‌منظور ساخت سازه خاموشی، هضم آنزیمی با آنزیم‌های XbaI و*Sma*1 گذاشته شد. هم‌زمان با آن هضم آنزیمی بر روی ناقل pTRV2 با همان آنزیم‌های برشی انجام گرفت. در روی ژل محصول حاصل از هضم آنزیمی در ناقل T/A دو باند به‌دست آمد، یک باند ۲۱۴ جفت نوکلئوتیدی و یک باندی در حدود سه کیلو بازی، که باند ۲۱۴ جفت نوکلئوتیدی از ژل آگارز جدا شد. هم‌زمان با آن محصول

هضم ناقل خاموشی pTRV2 نیز بر روی ژل آگارز برده شد و باند بریده شده آن از روی ژل با استفاده از کیت استخراج ژن از ژل انجام شد. سپس الحاق باند بریده شده از روی ژل در ناقل pTRV2 توسط آنزیم لیگاز T4 طبق دستورالعمل شرکت انجام شد.

انتقال سازه خاموشی موقت ژن COR به آگروباکتری: پس از ساخت سازه خاموشی موقت ژن COR، از آگروباکتری تومیفشنس (*A. tumefaciens*) سویه GV3101 برای انتقال ژن به گیاه استفاده شد. پلاسمید از باکتری E.coli استخراج شده و به باکتری آگروباکتری تومیفشینس سویه GV3101 به‌روش ذوب انجماد شوک کلسیمی انتقال داده شد.

انتقال سازه خاموشی موقت به گیاه: برای انتقال سازه به گیاه، بذور گیاه شقایق در گل‌خانه در گلدان‌های حاوی خاک سیلتی لومی کشت شدند و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. به‌منظور انتقال سازه خاموشی به گیاه ابتدا یک تک کلونی از آگروباکتری حاوی سازه خاموشی در LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و ریفامپسین (۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و ۲۰ میکرولیتر استوسرینگون و ۱۰ میلی‌مولار بافر MES اضافه شد و کشت شبانه داده شد. باکتری رشد یافته در سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. به رسوب باکتری، محیط القایی رشد که شامل ۱۰ میلی مولار $Mgcl_2$ و ۲۰ میکرولیتر استوسرینگون و ۱۰ میلی مولار بافر MES است اضافه شد، به‌طوری‌که به OD600=0.25 رسید. اگروباکتری دارای COR-pTRV2 با pTRV1 خالی با نسبت ۱:۱ ترکیب و برای شاهد نیزpTRV2 خالی با pTRV1 خالی با نسبت ۱:۱ ترکیب شدند. بعد از دو ساعت که باکتری در دمای اتاق قرار گرفت و رشد کرد، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محیط را با سرنگ کشیده و به سطح پشتی برگ تزریق شد.

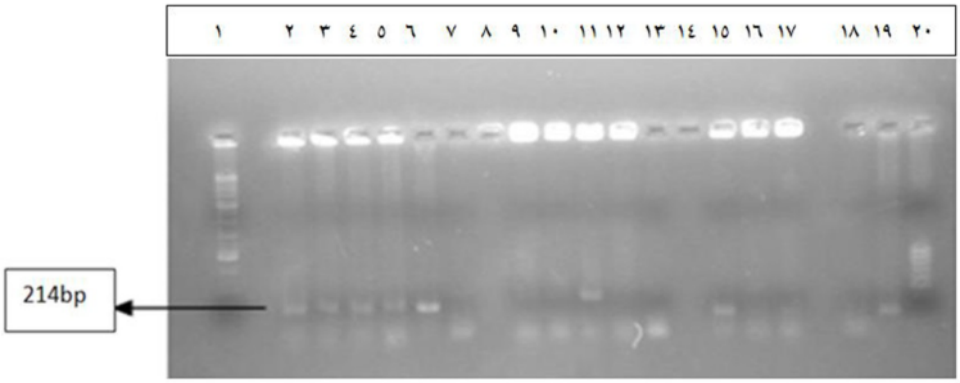
به‌منظور بررسی گیاهان ترا ریخت، حدود ۸ تا ۱۰ هفته پس از اگروایفیلتراسیون گیاه، هم‌زمان با ظهور جوانه‌های گل، سه قطعه یک سانتیمتری از بافت ساقه در زیر جوانه گل برش خورده و به‌صورت تازه در نیتروژن مایع پودر شد، سپس از آن‌ها استخراج RNA و ساخت cDNA انجام گرفت. از ساخت پروتئین پوششی ویروس برای جداسازی اولیه ترا ریخت‌ها از غیر ترا ریخت‌ها استفاده شد که به‌کمک PCR غربال شدند. سپس گیاهانی که وجود پروتئین پوششی در آن‌ها تایید شد PCR نیمه کمی با آغاز گرهای کدئینون رداکتاز (COR) و فاکتورهای طویل شدن نسخه برداری (Elongation factor) انجام گرفت. آغاز گرهای طراحی شده برای پروتئین پوششی و ژن کدئینون رداکتاز در جدول ۱ آمده است. پس از انتخاب گیاهان بر اساس PCR نیمه‌کمی، واکنش PCR در زمان واقعی انجام گرفت. این واکنش براساس نورسنجی رنگ فلورسنس سایبرگرین انجام گرفت و از ژن دائم‌البیان فاکتور طویل شدن نسخه برداری (EF) به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. جهت آنالیز نتایج PCR در زمان واقعی، از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد (۱۴). مواد واکنش PCR در زمان واقعی شامل ۱۰ میکرولیتر محلول حاوی سایبرگرین، ۱ میکرولیترآغاز گر رفت (باغلظت pmol/µL ۱۰)، ۱ میکرولیترآغاز گر برگشت (باغلظت pmol/µL ۱۰)، ۲ میکرولیتر از نمونه موردنظر و ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل بود که حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسید. واکنش PCR در زمان واقعی به این صورت انجام شد که واسرشتگی مقدماتی به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشتگی به‌مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و برای اتصال آغازگرها به‌مدت ۲۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تعداد چرخه‌ها ۳۵ سیکل بود.

جدول ۱ : لیست آغاز گرهای به‌کاربرده شده در واکنش PCR در زمان واقعی.

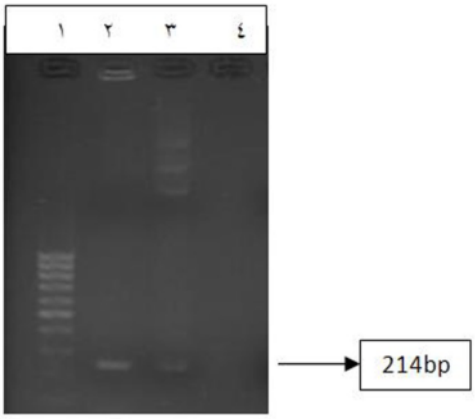
ژن	توالی آغازگر برگشت ۵′→۳′	توالی آغازگررفت ۵′ ⟶ ۳′
Elongation factor	GTCTCAACCACCATTGGCTTG	TGCTCCTGTTCTGGATTGTC
Coat Protein	TAGGAAGTGGCTTGACGACA	TGCCTCTACAGCTTTCCACA
COR	CTCTTCATCACTTCCAAGCTC	AGCTTACCGGATGGTGTATC

نتایج

به‌منظور تایید ساخت سازه خاموشی ژن کدئینون رداکتاز در ناقل pTRV2، از روش کلونی PCR روی کلونی‌های E.coli استفاده شد. نتایج این واکنش نشان داد که تعداد قابل توجهی از کلونی‌ها باند مورد نظر (قطعه ۲۲۴ جفت باز) را تولید کردند (شکل ۳). در مرحله بعد، از کلونی‌هایی که وجود سازه مورد نظر در آن‌ها تایید شد، استخراج ناقل صورت گرفت و ناقل مربوطه به آگروباکتری ترانسفورم شد. سپس وجود ناقل حاوی سازه خاموشی ژن کدئینون رداکتاز در آگروباکتری با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از آگروباکتری استخراج پلاسمید صورت گرفت و با استفاده از واکنش PCR قطعه مورد نظر (قطعه ۲۲۴ جفت باز) تکثیر شد (شکل ۴) که تایید کافی بر وجود ناقل حاوی قطعه خاموشی ژن هدف در آگروباکتری بود.



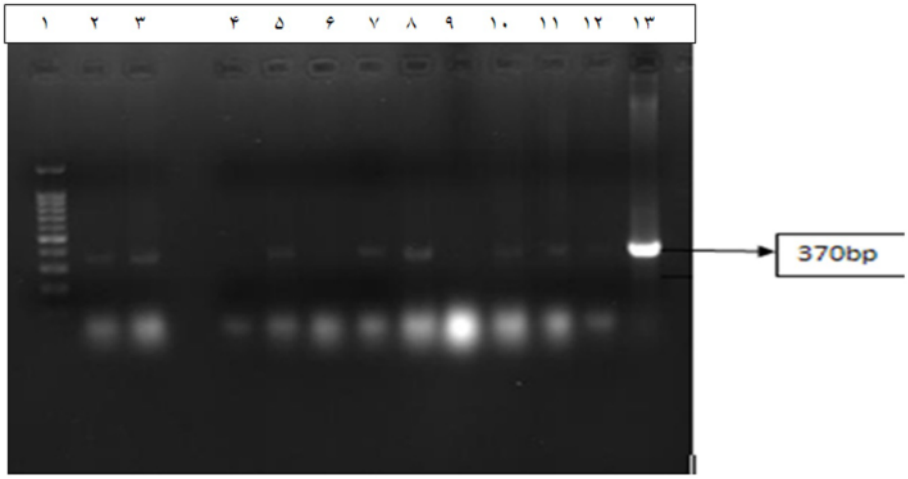
شکل ۳: نتیجه کلونی PCR روی کلونی‌های E.coli حاوی خاموشی COR در ناقل خاموشی موقت pTRV2. چاهک شماره ۱و۲۰ نشانگر ۱۰۰bp، چاهک شماره ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۱، ۱۵و ۱۹ کلونی‌هایی که قطعه خاموشی در آن‌ها تراریزش شده است.



شکل ۴: نتیجه استخراج پلاسمید از آگروباکتری و PCR خاموشی COR، چاهک ۱ مارکرbp ۱۰۰، چاهک ۲ و۳ محصول PCR قطعه خاموشی COR ، چاهک ۴ کنترل منفی.

با توجه به اینکه از روش تلقیح با آگروباکتری حاوی ناقل ویروسی در بردارنده قطعه خاموشی جهت ترا ریخت نمودن موقت گیاهان استفاده شد؛ از این‌رو جهت غربال و تفکیک گیاهان ترا ریخت از غیرترا ریخت از روش PCR استفاده شد. برای این منظور، پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، از آغاز گرهای ژن پروتئین پوششی ویروس (CP)

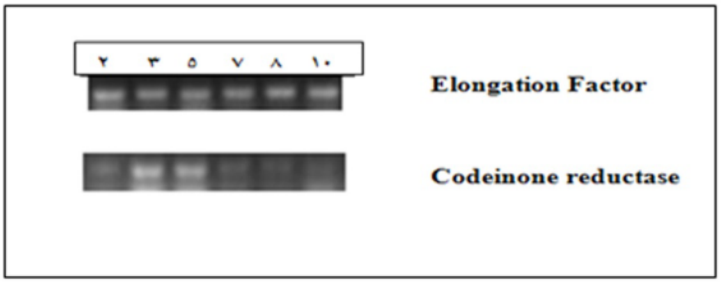
جهت واکنش استفاده شد. نتایج نشان داد که تعداد قابل توجهی از گیاهان ترانسفورم شده، حاوی سازه ژنتیکی مورد نظر بودند و باندی با اندازه ۳۷۰ جفت باز در این گیاهان مشاهده شد (شکل ۵).



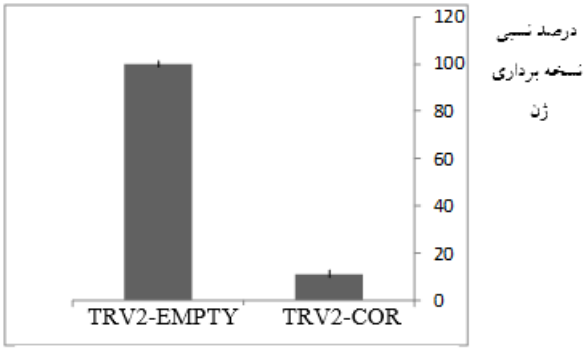
شکل ۵: تعیین نمونه‌های دارای پروتئین پوششی، چاهک ۱ نشانگر۱۰۰bp، چاهک ۲، ۳، ۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱ نمونه‌های دارای پروتئین پوششی.

جهت بررسی میزان خاموشی ژن مورد نظر در گیاهان ترا ریخت تایید شده از این آزمایش، ابتدا از واکنش PCR نیمه کمی استفاده شد. نتایج نشان داد که در تعدادی از نمونه‌ها بر اساس مقایسه شدت باندهای تولید شده (شکل ۶)، گیاهان یا نمونه‌های شماره نمونه‌های شماره ۲، ۷، ۸ و ۱۰ دارای کاهش بیان بیشتری نسبت به گیاه شاهد (غیرترا ریخت) بودند. بنابراین این گیاهان جهت آنالیز بیان ژن با روش PCR در زمان واقعی انتخاب شدند.

نتایج آنالیز بیان ژن در گیاهان ترا ریخت حاوی قطعه خاموشی ژن کدئینون رداکتاز با روش PCR در زمان واقعی در حداقل سه تکرار فنی و زیست شناختی روی سه قسمت ساقه انجام شد. نتایج نشان داد که سطح نسخه‌برداری ژن CORدر گیاهان ترا ریخت انتخاب شده نهایی به‌طور میانگین حدود ۸۹ درصد نسبت به گیاهان غیر ترا ریخت (شاهد) کاهش بین نشان داد (شکل۷).



شکل ۶: مقایسه نمونه‌های خاموشی ژن COR با فاکتورهای طویل شدن نسخه برداری.



شکل ۷: مقایسه سطح نسبی نسخه‌برداری ژن COR درگیاهان ترا ریخت (TRV2-COR) با گیاهان غیر ترا ریخت (TRV2-EMPTY).

بحث

گیاه شقایق (*Papaver somniferum*) منبع تجاری مهمی از داروهای مسکن مورفینانی و کدئین می‌باشد. سایر ترکیبات با خاصیت دارویی مثل وین‌کریستین، وین-بلاستین و کامپوتسین از مهم‌ترین آلکالوئیدهای تجاری هستند که از گیاه داروئی شقایق استخراج می‌شوند. ساخت از ابتدا و تبدیل شیمیایی این ترکیبات عملی است ولی در درجه اول مقرون به صرفه نیست (۱۵). از این‌رو دانشمندان به‌دنبال اصلاح و دست‌ورزی مسیر ژن‌های ساخت این آلکالوئیدها با استفاده از روش‌های مرسوم اصلاح گیاهان (مثل روش‌های جهش‌زایی) و یا روش‌های مبتنی بر مهندسی ژنتیک (مثل روش‌های انتقال ژن‌های مربوط به فوق بیان ژن یا روش‌های خاموش‌سازی ژن‌ها) با تکیه بر فن تراریزش پایدار یا تراریزش موقت به‌واسطه آگروباکتری بوده‌اند (۱۶).

نتایج این تحقیق نشان داد که VIGS روشی سریع و موثر برای بررسی عملکرد ژن در *P. somniferum* است که می‌تواند در سطح بالایی خاموشی را در گیاه ایجاد کند. خاموش سازی القایی با ویروس یا همان VIGS یک روش منتخب برای خاموشی سریع ژن‌های گیاهی به‌منظور شناخت عملکرد ژن است. با استفاده از این فن قابلیت تجزیه و تحلیل ژن‌های گیاهانی که دستورالعمل‌های انتقال برای آن‌ها هنوز در دسترس نیست امکان‌پذیر است و به‌علاوه نکته قابل توجه اینکه خاموشی ژن‌ها در این روش در نواحی مریستمی موثر می‌باشد (۱۷). بر این اساس این امکان فراهم می‌شود که عملکرد ژن را بتوان در همان مراحل اولیه بررسی نمود. از بین روش‌های به‌کار رفته در خاموشی موقت، روش آگروایینفیلتراسیون گیاه موثرترین روش بوده است. همچنین از بین سویه‌های مختلف آگروباکتری سویهGV3101 بیشترین خاموشی و از بین تلقیح در مراحل مختلف رشد گیاه، تلقیح در مرحله ۳ تا ۵ برگی بیشترین خاموشی را در گیاه موجب شده است (۱۸).

سطوح خاموشی نیز بسته به شرایط محیطی میزبان، دما، شرایط رشد و مرحله تلقیح متفاوت است (۹). در تحقیقاتی که به‌منظور بررسی نقش ژن Norcoclaurine Synthase (NCS) در Opium poppy انجام شد، خاموشی سیستمیک با استفاده از ناقل ویروسی pTRV درگیاه شقایق القا شد که نتایج آن کاهش ۸۰ درصدی در بیان ژن NCS را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد (۱۹). در مطالعات دیگری که در خاموشی ژن‌های Salsyn، SalR، SalAT، T6ODM، CODM وCOR در گیاه شقایق صورت گرفت، خاموشی هر کدام از ژن‌ها در سطح نسخه برداری با PCR در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پژوهش مذکور نشان داد که سرکوب سطوح نسخه برداری (خاموشی) در محدوده‌ای از ۷۰ تا ۹۰ درصد (که برای ژن CODM کمترین و برای ژن COR بیشترین بود) متغیر بود (۹). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که خاموشی بیان ژن در یرای ژن COR حدود ۸۹ درصد بود. با توجه با این نتایج دیده می‌شود که این نتایج با نتایج به‌دست آمده در پژوهش‌های مذکور مطابقت دارد. به‌طور کلی از نظر کاربردی، نتایج حاضر ثابت کرد که بیان ژن‌های مربوط به ساخت آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینولین گیاه مورد مطالعه می‌تواند با به‌طور موثری با فن خاموشی سیستمیک با استفاده از ناقل ویروسی (VIGS) تغییر یابد.

نتیجه‌گیری

در مجموع اگر چه روش‌های مختلفی از قبیل الیسیتورهای زیستی (۲۰)، روش‌های به‌زراعی و غیره جهت تغییر مقدار آلکالوئیدهای گیاهی وجود دارد، ولی نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از فن VIGS به‌طور قابل ملاحظه ای جهت دستورزی بیان ژن‌های مسیرهای متابولیکی دارویی بنزوایزوکوئنولینی در گیاه دارویی شقایق بهره برد.

منابع

1. Aryapor, A, Mirzaeimolla Mohammad, R. Medicinal, aromatic and industrial plants of forest and rangeland.1th Ed. High education of Elmikarbordi Press; 2010; 232 (in Persian)

2. Fiore SD, Hoppmann V, Fischer R, Schillberg S. Transient gene expression of recombinant terpenoid indole alkaloid enzymes in Catharanthus roseus leaves. Plant Mol Biol Rep. 2004; 22: 15-22.

3. Lenz R, Zenk MH. Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from Papaver somniferum cell cultures and differentiated plants. Eur J Biochem. 1995; 233: 132-139.

4. Unterlinner B, Lenz R, Kutchan TM. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. Plant J. 1999; 18(5): 465-475.

5. Frick S, Kramell R, Kutchan, TM. Metabolic engineering with a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding. Metabolic Eng. 2007; 9(2): 169-176.

6. Larkin PJ, Miller JA, Allen RS, Chitty JA, et al. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. Plant Biotech J. 2007; 5(1): 26-37.

7. Hosseini B, Shahriari-Ahmadi F, Hashemi H, Marashi MH, et al. Transient Expression of cor Gene in Papaver somniferum. BioImpacts. 2011; 1(4): 229.

8. Kahrizi, D. Reduction of EPSP synthase in transgenic wild turnip (*Brassica rapa*) weed via suppression of aroA. Mol. Biol. Rep. 2014; 41: 8177-8184.

9. Wijekoon CP, Facchini PJ. Systematic knockdown of morphine pathway enzymes in opium poppy using virus-induced gene silencing. Plant J. 2012; 69(6): 1052-1063.

10. Purkayastha A, Dasgupta I. Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. Plant Physiol. Biochem.2009; 47: 967-976.

11. Dang TTT, Facchini PJ. Characterization of three O-methyltransferases involved in noscapine biosynthesis in opium poppy. Plant Physiol. 2012; 159(2): 618-631.

12. Gamborg O, Miller R, Ojima K. Nutrient requirements of suspensioncultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 1968; 50(1): 151–158.

13. Tekleyohans DG, Lange S, Becker A. Virus-Induced Gene Silencing of the Alkaloid-Producing Basal Eudicot Model Plant *Eschscholzia californica* (*California Poppy*) in Virus-Induced Gene Silencing pp. Springer. 2013; 975: 83-98.

14. Livak K. Comparative CT method. ABI Prism. 1997; 7700(2): 11-15.

15. La Valva V, Sabato S, Siniscalco Gigliano G. Morphology and alkaloid chemistry of *Papaver setigerum* DC. (*Papaveraceae*). Taxon. 1985; 34(2): 191–196.

16. Facchini PJ, Loukanina N, Blanche V. Genetic transformation via somatic embryogenesis to establish herbicide-resistant opium poppy. Plant Cell Rep. 2008; 27: 719–727.

17. Liu Y, Nakayama N, Schiff M, Litt A, et al. Virus induced gene silencing of a deficiens ortholog in *Nicotiana benthamiana*. Plant Mol. Biol. 2004a; 54: 701-711.

18. Hileman LC, Drea S, Martino G, Litt A, Irish VF. Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (*opium poppy*). The Plant Journal. 2005; 44(2): 334-341.

19. Lee EJ, Facchini PJ. Norcoclaurine synthase is a member of the pathogenesis-related 10/Bet v1 protein family. Plant Cell. 2010; 22(10): 3489-350.

20. Esmaeilzadeh Bahabadi S, Sharifi M. Increasing the Production of Plant Secondary Metabolites Using Biotic Elicitors. J Cell Tissue. 2013; 4(2): 119-128.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2017; 7(4)

Original Article

Gene silencing of Codeinone Reductase in Papaver somniferum L., using virus-induced gene silencing technique

Khajvand R. M.Sc.[1], Ismaili A. Ph.D.[1,*], Nazarian Firouz-Abadi F. Ph.D.[1], Latifi A.M.. Ph.D. [2]

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical sciences, Tehran, Iran

* Email corresponding author: ismaili.a@lu.ac.ir

Received: 1 Sep. 2015 Accepted: 28 Feb. 2017

Abstract

Aim: Papaver somniferum remains the sole commercial source for several pharmaceutical benzophenanthridine alkaloids from benzylisoquinoline branch alkaloids, which includes the narcotic analgesics codeine and the semi-synthetic drugs such as; oxycodone, buprenorphine and naltrexone. Although, most of the biosynthetic pathways genes of this alkaloid have been identified, the post-transcriptional regulation of these alkaloids pathway has not been completely determined. Virus induced gene silencing (VIGS) is a method for fast functional genomics, and in this study, this technique was used to investigate the silencing one of the most important genes in this alkaloid pathway.

Materials and Methods: In the current research VIGS technique was used for systematic reduction in the level of genes expression involves in benzylisoquinoline alkaloids pathway. For silencing of codeinone reductase gene, pTRV vector was used for cloning. The specific silencing of COR gene was evaluated in 2-3 weeks old leaves of Papaver somniferum using agro-infiltration method.

Results: Result of cloning was confirmed by using of different molecular methods such as enzyme digestion and also PCR. PCR technique was used for confirmation of transgenic plants in some transformed plants. Using of semi-quantitative PCR and real-time PCR showed that the level of reduction in transcription of COR gene was about 89 percent.

Conclusion: The obtained results confirmed that by application of RNA interference method, the level of COR gene expression was significantly reduced compared with control.

Keywords: Banzylisoquinoline, Agrobacterium, Metabolic Engineering, pTRV, Real time PCR