

## خاموشی ژن انتهایی بیوسنتز آلکالوئیدهای پاپاورین و سنگوینارین (DBOX) در گیاه دارویی شقایق با استفاده از فن VIGS

کامران سمیعی، Ph.D. Student، احمد اسماعیلی، \*Ph.D.، فرهاد نظریان فیروز آبادی، Ph.D.

سید محسن سهرابی، Ph.D. Student

– دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، خرم آباد، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ismaili.a@lu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۴

### چکیده

**هدف:** در این پژوهش، به منظور بررسی تاثیر خاموشی بر بیان ژن کلیدی DBOX (که آنزیم نهایی بیوسنتز دو آلکالوئید سنگوینارین و پاپاورین را کد می‌کند)، از فن VIGS در گونه ای از خشخاش (*Papaver somniferum* L.) استفاده شد.

**مواد و روش‌ها:** قطعه ۳۵۰ جفت بازی از توالی ژن DBOX (در محدوده ۱۴۶۲-۱۱۱۲ bp) براساس تولید بیشترین تعداد siRNA با طول ۲۱ نوکلئوتید انتخاب شد. پس از همسانه‌سازی این قطعه در ناقل واسط pTZ57R/T و انتقال به ناقل ویروسی pTRV2، مایع تلقیح آگروباکتریوم حاوی سازه خاموشی به برگ‌های بوته‌های گیاه تزریق شد. گیاهان تراریخت اولیه توسط واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ژن کد کننده پوشش پروتئینی ویروس (CP) انتخاب و غربالگری ثانویه توسط تکنیک PCR نیمه کمی صورت گرفت. در مرحله بعد نمونه‌هایی با بیشترین خاموشی (کمترین بیان) ژن مورد نظر توسط تکنیک real-time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** صحت همسانه‌سازی در پلاسمیدهای pTZ57R/T و pTRV2 با استفاده از واکنش‌های PCR و هضم آنزیمی تأیید شد. براساس نتایج PCR نیمه کمی، تعداد ۵ بوته تراریخت با کمترین بیان برای ژن DBOX انتخاب شدند. نتایج نهایی real-time RT-PCR به‌طور متوسط بیانگر کاهش نسبی ۸۱ درصدی در بیان رونوشت‌های ژن DBOX در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان کنترل (تلقیح شده با پلاسمید خالی pTRV2) بود.

**نتیجه‌گیری:** به‌طور کلی نتایج نشان داد که فن VIGS به‌طور موفقیت آمیزی می‌تواند میزان بیان ژن DBOX را در گیاه خشخاش کاهش دهد. به‌علاوه از نتایج به‌دست آمده در خصوص این ژن، می‌توان در درک بیشتر مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای گیاه خشخاش و تولید گیاهان تراریخت با اهداف مهندسی متابولیت بهره برد.

**واژگان کلیدی:** DBOX، خشخاش، PCR در زمان واقعی، خاموشی

## مقدمه

گیاهان عالی علاوه بر متابولیت‌های اولیه، حاوی تعداد زیادی از ترکیبات شیمیایی با ساختاری پیچیده و وزن مولکولی پایین به نام متابولیت‌های ثانویه هستند. آلکالوئیدها با بیش از ۱۲۰۰۰ ساختار شیمیایی مختلف، از جمله متنوع‌ترین و مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند (۱). آلکالوئیدهای گروه بنزیل‌ایزوکوینولینی (Benzylisoquinolin) alkaloids (BIAs) گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند که تاکنون بیش از ۲۵۰۰ ساختار مختلف از آن‌ها شناسایی شده است. اهمیت شیمیایی بیشتر BIAs به دلیل وجود یک یا چند مرکز کایرال در ساختار شیمیایی این گروه از آلکالوئیدها می‌باشد. وجود مرکز کایرال یکی از دلایل اصلی عدم سنتز و تولید صنعتی تعدادی از این آلکالوئیدها بوده و به همین دلیل برای سالیان متوالی تنها منبع تولید آن‌ها، به صورت طبیعی می‌باشد (۲). در بین گیاهان دارویی که حاوی آلکالوئیدهای گروه بنزیل‌ایزوکوینولینی هستند، گیاه شقایق (*Papaver somniferum L.*) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و سالیان طولانی است که به دلیل دارا بودن آلکالوئیدهای مهمی (از جمله پاپاورین، سنگونارین، بربرین و گروه مورفینان)، مورد توجه فراوان بوده است (۳ و ۴).

در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای بنزیل‌ایزوکوینولینی (BIAs) گیاه شقایق، آنزیم‌های متعددی متعلق به تعداد نسبتاً محدودی از خانواده‌های پروتئینی (از جمله سیتوکروم‌های P450، O و N متیل ترانسفرازهای دهیدروژناز-ردوکتازهای وابسته به NADPH، اکسید ردوکتازهای مرتبط با FAD) حضور دارند (۲ و ۵). بیوسنتز آلکالوئیدهای ایزوکوینولینی (BIAs) در گیاه شقایق با تراکم شدن دوپامین و ترکیب شیمیایی دیگری به نام ۴-هیدروکسی‌فیل‌استالدهید (4-HPAA) آغاز می‌شود که هر دو از مشتقات اسید آمینه تیروزین هستند. این دو ترکیب طی مراحل بعدی به دو ماده میانی به نام اس - کولاورین و اس - رتیکولین تبدیل می‌شوند که

تقریباً تمام آلکالوئیدهای مهم و با ارزش گیاه شقایق از جمله پاپاورین، سنگونارین، نوسکاپین و مورفینان از این دو ترکیب میانی تولید خواهند شد. آلکالوئیدهای سنگونارین، پاپاورین و نوسکاپین به ترتیب با دارا بودن خاصیت آنتی‌باکتریال، شل‌کننده عضلات و ضد سرطانی، از مهم‌ترین آلکالوئیدهای تولید شده توسط گیاه شقایق محسوب می‌شوند. سنگونارین و پاپاورین هر دو دارای چرخه بیوسنتزی مختص به خود بوده و در مسیر تولید آن‌ها آنزیم‌های متعددی حضور دارند با این حال آنزیم نهایی سنتز هر دو یکسان است. ژن کد کننده این آنزیم، هیدرو بنزوفنانتریدین اکسیداز (DBOX) نام دارد که علاوه بر نقش کلیدی در سنتز آلکالوئیدهای سنگونارین و پاپاورین، بر روی میزان تولید نوسکاپین نیز موثر است (۲ و ۶).

در حال حاضر استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک، از جمله پرکاربردترین فنونی به‌شمار می‌روند که در دستورزی مسیر تولید ترکیبات آلی موجود در گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این بین استراتژی مهندسی متابولیت، تغییر در تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از دو سیستم کلی افزایش و کاهش بیان ژن‌های بیوسنتز کننده می‌باشد. مهندسی متابولیت را می‌توان راه‌کار نهایی برای افزایش تولید ترکیبات زیستی با استفاده از دانش زیست‌شناسی و مهندسی ژنتیک برای تغییر عملکرد در سطح سلولی دانست (۷). به‌طور کلی می‌توان گفت که تغییر بیان ژن‌های کلیدی درگیر در تولید یک یا دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، از مهم‌ترین استراتژی‌های مورد استفاده در بالا بردن تولید متابولیت‌ها در گیاهان دارویی محسوب می‌شود (۸).

محققین با استفاده از تکنیک‌های خاموشی ژن مختلفی که تاکنون ابداع و گزارش شده است، توانسته‌اند نتایج قابل توجهی در دستورزی مسیرهای ژنتیکی به دست آورند (۹). در فرآیند مهندسی ژنتیک، خاموشی ژن در سطوح مختلفی القاء می‌شود که از مهم‌ترین آن‌ها

### مواد و روش‌ها

**استخراج RNA و ساخت cDNA** بذور ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق (*P. somniferum* L.) در گلدان‌هایی با قطر ۳۰ سانتیمتر در گلخانه گیاهان تراریخت دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند و دمای رشد شبانه و روزانه در کل دوره رشد به ترتیب ۱۸ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. RNA کل با استفاده از کیت جداسازی RNA (Thermo Fisher scientific, Germany) استخراج و به‌منظور حذف DNA ژنومی احتمالی، نمونه‌های RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI (Fermentase, Germany) تیمار شدند و برای تأیید نهایی عدم حضور DNA ژنومی، از PCR با استفاده از آغازگرهای ژن کنترل داخلی بتا-اکتین (*beta-Actin*) بر روی RNA مورد نظر به‌عنوان الگو استفاده گردید. ژن کنترل داخلی بتا-اکتین از بیان بالا و پایداری بیان در بیشتر بافت‌ها و شرایط محیطی برخوردار است و آغازگرهای این ژن از بخشی طراحی شدند که به ناحیه هدف اگزونی ژن متصل می‌شوند و قابلیت تکثیر بخش ژنومی و cDNA را دارند.

جهت تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، از ژل الکتروفورز و دستگاه اسپکتوفتومتری استفاده شد. پس از تایید کمیت و کیفیت RNA، رشته‌های اولیه cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo Fisher scientific, Germany) براساس دستورالعمل شرکت ساخته شد. برای این منظور هر تیوب حاوی ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش بود که اجزای آن شامل نیم میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای تصادفی ۶ نوکلئوتیدی (هگزامر) و آغازگر عمومی  $18(dT)(Oligo)$  (با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در هر میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر dNTPs (با غلظت ۱۰ میکرومولار در هر میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر بافر واکنش (5X)، ۵ میکرولیتر RNA (با غلظت ۱۰۰ نانو گرم در هر میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم ترانسکریپتاز

می‌توان به خاموشی در دو سطح رونویسی و ترجمه اشاره کرد. خاموشی ژن به واسطه ویروس (virus induced gene silencing) (VIGS) یکی از تکنیک‌های خاموشی ژن پس از رونویسی (post transcriptional gene silencing) (PTGS) محسوب می‌شود. در این روش ژنوم تغییر شکل یافته ویروس به‌همراه بخشی از توالی ژن گیاهی مورد نظر توسط آگروباکتریوم به‌درون گیاه فرستاده می‌شود. در سلول‌های گیاهی ابتدا RNA تراریخت رونویسی شده و سپس توسط آنزیم RNA پلیمرز وابسته به RNA (RDRP) به RNA دو رشته‌ای تبدیل شده و این RNAهای دو رشته‌ای توسط آنزیم‌های برشی خاصی به‌نام DICER شناسایی و به قطعات RNA دو رشته‌ای کوتاه‌تری به‌نام siRNA تبدیل و وارد کمپلکس خاموشی (RNA-induced silencing complex) (RISC) شده و به RNAهای کوتاه تک رشته‌ای تبدیل می‌شوند. این قطعات تک رشته‌ای براساس شباهت با توالی ژن هدف به آن‌ها متصل شده و در فرایند PTGS سبب خاموشی ژن هدف خواهند شد (۱۰ و ۱۱). تاکنون بسیاری از آنزیم‌های کلیدی که در بیوسنتز آلکالوئیدهای گیاه شقایق نقش دارند، شناسایی و جداسازی شده‌اند و با توجه به اهمیت مسیر بیوسنتز این دسته از آلکالوئیدها، مطالعات متعددی در راستای مهندسی آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی این گیاه دارویی صورت گرفته و نقش فیزیولوژیکی و میزان تغییر بیان آن‌ها با استفاده از انواعی از روش‌های سرکوب و خاموشی ژن بررسی شده است (۱۲-۱۶). با توجه به اهمیت گیاه دارویی شقایق و تولید آلکالوئیدهای پر کاربرد در این گیاه، از جمله دو آلکالوئید مهم پاپاورین و سنگوبنارین و نقش فعال آنزیم DBOX در تولید نهایی این دو آلکالوئید (۱۷)، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی تاثیر خاموشی ژن DBOX با استفاده از تکنیک VIGS در ژنوتیپ ایرانی این گیاه دارویی اجرا شد.

مناسب بود و احتمال تولید بیشترین siRNA با طول ۲۱ نوکلئوتید را داشت انتخاب شد. پس از انتخاب قطعه مورد نظر با بیشترین میزان تولید siRNA، با استفاده از نرم افزارهای Vector NTI 10.3 و Allele ID 7.0 یک جفت آغازگر اختصاصی (جدول ۱) برای تکثیر این ناحیه طراحی شد. با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، قطعه مورد نظر توسط آنزیم *Pfu* از روی cDNA تکثیر و پس از الکتروفورز بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز، تخلیص گردید. پس از خالص سازی محصول PCR، قطعه مورد نظر با استفاده از کیت همسانه سازی (Thermo Fisher scientific, Germany) به درون ناقل واسط pTZ57R/T وارد شد و نهایتاً پلاسمید نوترکیب (pTZ-DBOX)، جهت تکثیر به درون سلول های مستعد *DH5α* باکتری *E.coli* به روش شوک کلسیمی منتقل شد. جهت تأیید همسانه سازی، از PCR با آغازگرهای اختصاصی و واکنش هضم با استفاده از آنزیم های برشی *BamHI* و *EcoRI* استفاده شد و نهایتاً توالی یابی قطعه همسانه سازی شده با استفاده از آغازگرهای M13 صورت گرفت.

معکوس (با غلظت ۲۰۰ واحد در هر میکرولیتر) و مابقی آب بود. برنامه تکثیر نیز براساس چرخه دمایی ۴۲ درجه سانتی گراد برای ۹۰ دقیقه با استفاده از پس از واسرشت سازی مخلوط واکنش در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. پس از سنتز cDNA، کارایی و سلامت cDNA ساخته شده با استفاده از PCR و آغازگرهای ژن کنترل داخلی بتا-اکتین تأیید شد (جدول ۱).

**همسانه سازی سازه خاموشی ژن DBOX به منظور** ساخت سازه خاموشی، ابتدا بخشی از ژن هدف به طول ۳۵۵ جفت باز از روی توالی ژن DBOX (با شماره دسترسی JX390714 موجود در بانک اطلاعاتی NCBI) انتخاب شد. روش انتخاب قطعه مورد نظر جهت ساخت سازه خاموشی به این صورت بود که ابتدا توالی نوکلئوتیدی ORF ژن هدف به قطعات ۳۰۰ نوکلئوتیدی تقسیم بندی و با استفاده از ابزار RNAi Scan مورد بررسی قرار گرفت. سپس قطعه ای از نظر پارامترهای مربوطه (میزان GC بین ۳۰ تا ۶۰ درصد، وجود نوکلئوتیدهای AU در ۵' و نوکلئوتیدهای GC در ۳'، عدم وجود تکرارهای ۳ یا بیشتر از نوکلئوتیدهای GC و عدم وجود تکرارهای ۴ یا بیشتر از نوکلئوتیدهای AT)

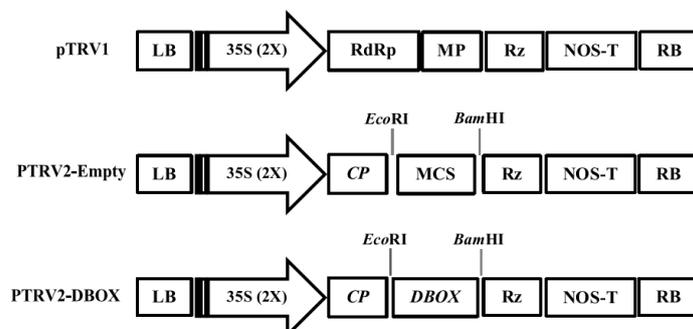
جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده جهت جداسازی، تکثیر، ساخت و تأیید سازه خاموشی

نام آغازگر	توالی آغازگر		اندازه محصول bp
	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	
pTRV2-DBOX	CATTAGAACAAGGTGCCACG	GGTTCCTCACGTAATCAGC	۳۵۰
CP-TRV	CGGGCTAACAGTGCTCTTG	CTCCCTTGGTTCGTCGTAAC	۱۳۴
<i>Elf1</i>	CGATAGGCGATCTGGAAAGG	AGGTGGATACTGAGCGAAGG	۱۲۴
<i>Beta-Actin</i>	TCTCAACCCAAAGGCTAATTCG	CCCCAGAATCCAAGACAATAC	۳۱۳
DBOX-RT	AACCTTCTCATCCAATCAATCTGC	TTCGGAATTTGAAACTCCTTACCC	۱۱۷

نیز در این مرحله با استفاده از واکنش PCR و هضم آنزیمی تأیید شد و سازه نهایی pTRV2-DBOX نامیده شد (شکل ۱). در این تحقیق از پلاسمید pTRV2 خالی (pTRV<sub>2</sub>-Empty) که بدون قطعه خاموشی است جهت تلقیح نمونه های گیاهان شاهد (کنترل) تراریخت استفاده

جهت ساخت سازه نهایی، ابتدا قطعه همسانه سازی شده در ناقل pTZ57R/T (pTZ-DBOX)، با استفاده از آنزیم های برشی *BamHI* و *ECORI* جدا شد و سپس با استفاده از واکنش الحاق در ناقل pTRV2 و در محل جایگاه این دو آنزیم قرار داده شد. صحت همسانه سازی

کشت جامد LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین به عنوان گزینش گر کشت داده شدند. پس از کشت باکتری ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت، تک کلونی های مثبت اولیه براساس واکنش PCR انتخاب شدند.



شکل ۱: شماتیک پلاسمیدهای مختلف جهت تراریزش بوته های شقایق. 35S: پروموتور ویروس موزایک کلم (CaMV)، *EcoRI* و *BamHI*: سایت های برشی مورد استفاده جهت هضم و لیگاسیون، *CP*: ژن کد کننده پوشش پروتئینی ویروس، *Rz*: ریبوزیم خود برشی، *NOS-T*: خاتمه دهنده ژن نوپالین سینتاز، *MCS*: جایگاه همسان سازی چندگانه، *RdRp*: آنزیم RNA پلی مرز وابسته به RNA، *MP*: پروتئین حرکتی ویروس، 16K: پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی، *RB* و *LB*: به ترتیب مرز راست و چپ T-DNA هستند.

بعد از سرنگ های یک میلی لیتری بدون سوزن برای تزریق مایع تلقیح به زیر قسمت پشتی ۳ تا ۴ برگ هر بوته شقایق استفاده شد و از مجموع ۳۰ بوته انتخابی، ۲۰ بوته با سازه pTRV2-DBOX و ۱۰ بوته با پلاسمید pTRV2 خالی به عنوان شاهد تلقیح شدند. بوته های تلقیح شده تا زمان گلدهی در گلخانه نگهداری شدند. نمونه های برگ بوته های تیمار شده چند روز قبل از باز شدن گل (مرحله آنتریز) جمع آوری و در ازت مایع قرار داده و پس از انتقال به آزمایشگاه برای مطالعات بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

#### انتخاب گیاهان تراریخت و اجرای PCR نیمه کمی:

پلاسمید pTRV2 قطعه ای از پوشش پروتئینی ویروس را به نام *CP* (coat protein) را کد می کند (۱۰). به منظور تأیید حضور پلاسمید و سازه خاموشی نهایی در بوته های تلقیح شده و انتخاب گیاهان تراریخت اولیه، از آغازگرهای اختصاصی ژن کد کننده قطعه پروتئینی *CP* استفاده شد. از مجموع بوته های تراریخت که *CP*-PCR آن ها مثبت بود، تعداد ۱۰ نمونه انتخاب و میزان نسبی تغییر بیان ژن هدف (*DBOX*) در آن ها با استفاده تکنیک PCR نیمه

شد. پلاسمید pTRV2 خالی (*pTRV2-Empty*)، پلاسمید pTRV1 و سازه pTRV2-DBOX به طور جداگانه با استفاده از تکنیک الکتروپوراسیون به درون سلول های مستعد شده سویه *GV3101* باکتری *Agrobacterium tumefaciens* منتقل و بر روی محیط

#### آگرو-فیلتراسیون و اجرای فرایند VIGS از تک

کلونی های مثبت انتخاب شده از هر کدام از پلاسمیدهای pTRV2 خالی و pTRV1 و سازه نهایی pTRV2-DBOX برای کشت شبانه در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) استفاده شد. باکتری های رشد یافته توسط سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه) در دمای محیط جداسازی و در مایع تلقیح (حاوی ۱۰ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۱۰ میلی مولار MES و ۲۰ میکرومولار استوسیرینگون) مجدداً حل شد به طوری که جذب نهایی تمام نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تقریباً برابر با ۲ بود ( $OD_{600}=2$ ) (۱۸).

جهت اجرای آگرو-فیلتراسیون و تلقیح بوته های شقایق (بوته هایی با عمر ۴ تا ۵ هفته) از روش پیشنهادی هیلمن و همکاران (۱۹) و پنیکس و فاچینی (۱۸) استفاده شد، بدین منظور مایع تلقیح حاوی پلاسمید pTRV2 خالی (به عنوان شاهد تراریخت) و سازه pTRV2-DBOX بطور جداگانه به نسبت ۱:۱ با پلاسمید pTRV1 ترکیب و به مدت ۳ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. در مرحله

برای مقایسه تغییر سطوح بیان در تمامی واکنش‌ها استفاده شد. شرایط دمایی واکنش نیز به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای ۵۱ و ۵۳ درجه سانتی‌گراد نیز به‌عنوان دمای اتصال به مدت ۱ دقیقه به ترتیب برای ژن هدف و ژن کنترل داخلی در نظر گرفته شد. جفت آغازگرهای مورد استفاده (DBOX-RT) براساس اتصال در خارج از قطعه هدف خاموشی طراحی و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). از ۵ تکرار بیولوژیک و ۲ تکرار تکنیکی در اجرای واکنش‌های *real-time RT-PCR* استفاده شد و نهایتاً نتایج با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (۲۰) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

### نتایج

براساس نتایج به‌دست آمده از ژل الکتروفورز و اسپکتوفتومتری مشخص شد که RNA استخراج شده از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار بوده و نسبت جذب  $A_{260}/A_{280}$  و  $A_{260}/A_{230}$  آن به ترتیب برابر با ۱/۹ و ۲/۱ بود. هیچ قطعه‌ای توسط واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای کنترل داخلی بتا-کتین تکثیر نشد که بیانگر عدم وجود DNA ژنومی در RNA کل بود. نتایج RNAi Scan نشان داد که قطعه ۳۵۰ جفت بازی حد فاصل بین نوکلوتیدهای ۱۱۱۲ تا ۱۴۶۲ از بیشترین تعداد siRNA برخوردار است. پس از اجرای PCR بر روی cDNA ساخته شده از روی RNA اولیه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، قطعه ۳۵۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۲).

پس از اتمام تراریزش قطعه تکثیر شده در ناقل اختصاصی بر روی کلونی‌های سفید نشان داد که تمامی کلونی‌ها باند ۳۵۰ جفت بازی را تکثیر نمودند که بیانگر حضور قطعه مورد نظر در این کلونی‌ها بود. از مجموع کلونی‌های مثبت، ۲ کلونی انتخاب گردید. نتایج هضم با استفاده از دو آنزیم برشی *BamHI* و *EcoRI* نیز حضور قطعه ۳۵۰ جفت بازی را تأیید نمود (شکل ۲). نتایج توالی‌یابی ۲ کلونی تأیید شده اولیه نشان داد که قطعه همسانه‌سازی شده با ۱۰۰ درصد همسانی با بخش انتخاب

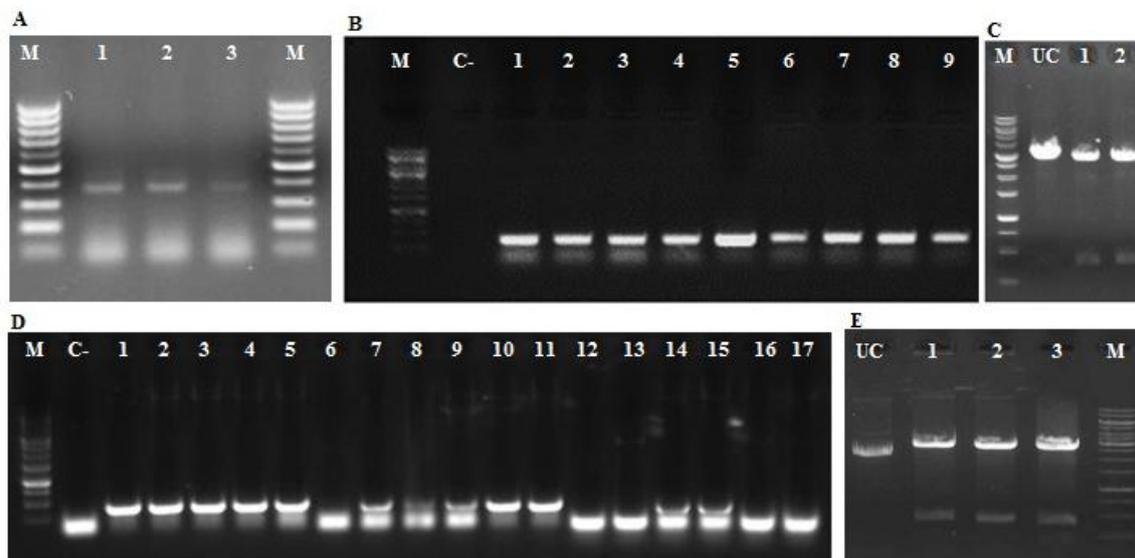
کمی و آغازگرهای اختصاصی خارج از توالی قطعه خاموشی انتخاب شده از ژن DBOX، مورد بررسی قرار گرفتند. از آغازگرهای ژن بتا-کتین گیاه شقایق نیز به‌عنوان ژن کنترل داخلی جهت مقایسه میزان بیان ژن در نمونه‌های تراریخت استفاده شد.

ابتدا cDNA تمامی نمونه‌هایی با *CP-PCR* مثبت از روی RNA کل آن‌ها ساخته شد و با استفاده از غلظت‌های مشخص و یکسان از cDNA هر نمونه به‌عنوان الگو، PCR نیمه کمی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن DBOX و ژن بتا-کتین به‌طور همزمان در واکنش‌های مجزا اجرا شد. حجم معین و یکسانی از محصول نهایی PCR تمام نمونه‌ها برای ژن هدف و ژن کنترل داخلی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری و اجرا شد. قطعات تکثیر شده بررسی و تغییر بیان ژنی هر نمونه برای ژن هدف با استفاده از قطعه تکثیر شده ژن کنترل داخلی همان نمونه مقایسه شد و نهایتاً نمونه‌هایی که از بیان کمتری برخوردار بودند، برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

**واکنش‌های PCR در زمان واقعی:** قبل از اجرای این مرحله از مطالعه، به‌منظور بررسی کارایی تکثیر با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، از واکنش PCR با استفاده از cDNA گیاه غیر تراریخت و برداشت محصول واکنش در ۴ چرخه دمایی مختلف (چرخه‌های ۲۲، ۲۵، ۲۸ و ۳۱) استفاده و راندمان تکثیر با کمی‌سازی میزان شدت نور قطعات تکثیر شده، محاسبه شد. واکنش‌های *real-time RT-PCR* با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) و کیت SYBR Green شرکت فرمنتاز اجرا شد. جهت انجام این واکنش‌ها از cDNA مربوط به بافت‌های برگ گیاهان تراریخت (سازه pTRV2-DBOX) و شاهد تراریخت (تلقیح با سازه pTRV2 خالی) استفاده شد. هر واکنش شامل ۷/۵ میکرولیتر از محلول پایه SYBR Green، ۳۰۰ نانومولار از آغازگرهای اختصاصی و ۱۰ نانوگرم از cDNA به‌عنوان الگو بود. از ژن کنترل داخلی *Elfl* نیز به‌عنوان استاندارد

توسط واکنش PCR و هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم برشی *EcoRI* و *BamHI* تأیید گردید (شکل ۲).

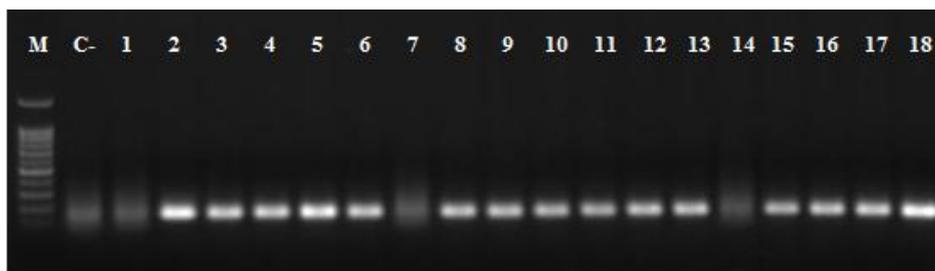
شده ژن DBOX شباهت داشت. در مرحله بعد، پس از انتقال قطعه هدف به درون پلاسمید pTRV2 با استفاده از واکنش هضم و لیگاسیون مجدد، حضور قطعه مورد نظر



شکل ۲: مراحل جداسازی، ساخت و تأیید سازه نهایی خاموشی. (A) تکثیر قطعه هدف ژن DBOX با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از روی cDNA، نشانگر با وزن مولکولی مشخص 100bp، اعداد بیانگر شماره واکنش است. (B) کلونی PCR قطعه هدف در پلاسمید pTZ57R/T، نشانگر با وزن مولکولی مشخص 1Kb، C- کنترل منفی و اعداد بیانگر شماره کلونی انتخاب شده می‌باشند. (C) هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T حاوی قطعه خاموشی، M: مارکر مولکولی 1Kb، UC: پلاسمید pTZ57R/T برش نخورده، ۱ و ۲ شماره کلونی حاوی پلاسمید pTZ57R/T برش خورده توسط آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *BamHI* و با قطعه خاموشی خارج شده به طول ۳۵۰ جفت باز. (D) کلونی PCR قطعه هدف در پلاسمید pTRV2، نشانگر با وزن مولکولی مشخص 1Kb، C- کنترل منفی و اعداد بیانگر شماره کلونی انتخاب شده می‌باشند. (E) هضم آنزیمی پلاسمید pTRV2 حاوی قطعه خاموشی، M: مارکر مولکولی 1Kb، UC: پلاسمید pTRV2 برش نخورده، ۱، ۲ و ۳ شماره کلونی حاوی پلاسمید pTRV2-DBOX برش خورده با قطعه خاموشی خارج شده به طول ۳۵۰ جفت باز.

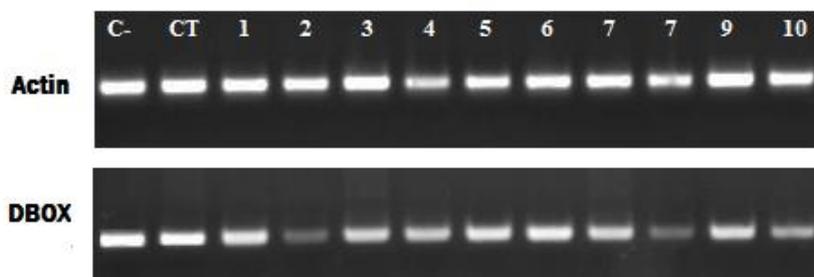
بودند و قطعه ۱۳۴ جفت بازی را تکثیر نمودند که این مقدار برای نمونه‌های کنترل تلقیح شده با پلاسمید pTRV2 خالی، ۷ عدد از مجموع ۱۰ بوته بود. در مجموع میزان تراریختی در بوته‌های شقایق تلقیح شده با سازه خاموشی و پلاسمید pTRV2 خالی به ترتیب ۸۰ و ۷۰ درصد بود (شکل ۳).

حدود ۳ ماه پس از زمان تلقیح بوته‌های شقایق (۴ ماه پس از کاشت) توسط مایع تلقیح حاوی سازه خاموشی و پلاسمید pTRV2 خالی، استخراج RNA و ساخت cDNA از تمامی بوته‌های تلقیح شده صورت گرفت و نتایج PCR با استفاده از آغازگرهای ژن کد کننده پروتئین CP نشان داد که از مجموع ۲۰ بوته تلقیح شده با سازه خاموشی (pTRV2-DBOX) تعداد ۱۶ نمونه مثبت



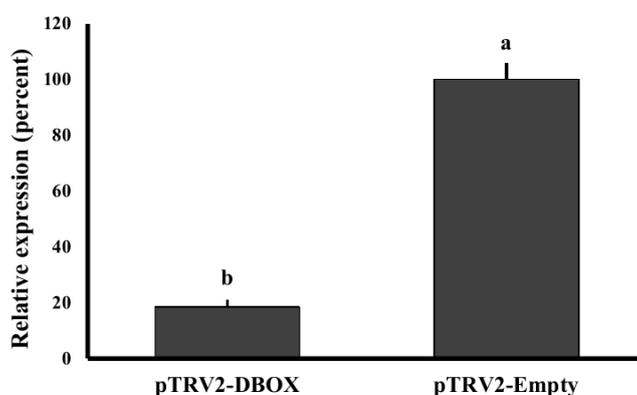
شکل ۳: نتایج PCR بوته‌های تلقیح شده با سازه خاموشی توسط آغازگرهای ژن کد کننده پوشش پروتئینی ویروسی (CP). M: نشانگر با وزن مولکولی مشخص 100bp، C-: کنترل منفی و اعداد بیانگر شماره بوته‌های تراریخت اولیه می‌باشند.

نتایج به دست آمده نشان داد که راندمان واکنش PCR کمی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده حدود ۱۰۰ درصد بود. قبل از اجرای واکنش‌های real-time RT-PCR، تعداد ۱۰ نمونه از بوته‌های تراریخت اولیه که CP-PCR آن‌ها مثبت بود انتخاب و با استفاده از تکنیک PCR نیمه کمی مورد غربالگری قرار گرفتند. با توجه به نتایج به دست آمده و مقایسه بین شدت باندهای تولید شده توسط آغازگرهای ژن DBOX و ژن کنترل داخلی بتا-اکتین، تعداد ۵ نمونه ترا ریخت براساس کمترین بیان ژن DBOX انتخاب شد (شکل ۴).



شکل ۴: نتایج PCR کمی بر روی ۱۰ نمونه انتخاب شده با استفاده از آغازگرهای ژن کنترل داخلی بتا-اکتین و آغازگرهای اختصاصی ژن هدف DBOX: C- گیاه شاهد، CT: گیاه تلقیح شده با pTRV2 خالی و اعداد ۱ تا ۱۰ بیانگر شماره بوته‌های تلقیح شده با سازه خاموشی (pTRV2-DBOX) می‌باشند.

پس از انتخاب اولیه نمونه‌های تراز یخت با دارا بودن بالاترین خاموشی (کمترین بیان) نسبت به سایر نمونه‌ها، واکنش‌های real-time RT-PCR با استفاده از ۲ تکرار تکنیکی و ۵ تکرار بیولوژیکی (روی نمونه‌های انتخاب شده براساس PCR نیمه کمی) اجرا شد. کاهش بیان ژن DBOX در نمونه‌های تراریخت انتخاب شده آن نسبت به نمونه‌های شاهد غیر ترا ریخت انتخاب شده به‌طور متوسط حدود ۸۱ درصد بود (شکل ۵).



شکل ۵: مقایسه میزان کاهش نسبی بیان ژن DBOX در گیاه تراریخت (pTRV2-DBOX) نسبت به گیاه کنترل (pTRV2 خالی). خطوط روی ستون هیستوگرام‌ها نشان دهنده خطای معیار میانگین می‌باشد و ستون‌ها با حروف غیر مشترک، بیانگر معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها در سطح ۱ درصد با استفاده از آزمون t-student می‌باشد.

## بحث

هر یک از آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی گیاه شقایق، در مسیر بیوسنتزی مختص به خود تولید می‌شوند. در ابتدای چرخه، پاپاورین توسط دو مسیر وابسته به هم از ماده میانی اس-کوکلاورین سنتز شده که در انتهای هر دو مسیر، آنزیم DBOX سبب تبدیل ترا هیدرو پاپاورین به پاپاورین خواهد شد (۲ و ۱۸). در مراحل پائین‌تر چرخه، تولید ترکیب میانی (S)-scoulerine اولین قدم در سنتز آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدين نظیر سنگونارین محسوب می‌شود. تبدیل (S)-scoulerine به سنگونارین شامل بسته شدن مسیرهای متیلاسیون توسط تعدادی سیتوکروم P450 می‌باشد که در مرحله نهایی اکسیداسیون دو الکترون سبب تبدیل دی‌هیدروسنگونارین به سنگونارین می‌شود که این

تولید ترکیب میانی (S)-scoulerine اولین قدم در سنتز آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدين نظیر سنگونارین محسوب می‌شود. تبدیل (S)-scoulerine به سنگونارین شامل بسته شدن مسیرهای متیلاسیون توسط تعدادی سیتوکروم P450 می‌باشد که در مرحله نهایی اکسیداسیون دو الکترون سبب تبدیل دی‌هیدروسنگونارین به سنگونارین می‌شود که این

درصد بود. در مطالعه دیگری که توسط گورکوک و همکاران (۲۲) بر روی خاموشی دو ژن *4'OMT* و *7OMT* صورت گرفت، توانستند میزان رونوشت‌های این ژن‌ها را به ترتیب ۷۱ و ۴۶ درصد در بافت برگ گیاه شقایق کاهش دهند.

در مطالعات متعددی که بر روی خاموشی ژن‌های کد کننده چرخه بیوسنتزی آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی گیاه شقایق با استفاده از تکنیک *VIGS* صورت گرفته، کارایی بالای این تکنیک در کاهش رونوشت‌های ژن‌های مورد مطالعه اثبات شده است (۱۶، ۱۸، ۲۱ و ۲۲). نتایج مطالعه حاضر ضمن مشابهت با نتایج مطالعات قبلی، در بیشتر موارد از کارایی بیشتری برخوردار بود به طوری که سطوح رونوشت‌های ژن مورد مطالعه (*DBOX*) به مقدار قابل توجهی (۸۱ درصد) کاهش یافته بود که این مقدار در مقایسه با گیاه شاهد بسیار معنی‌دار بود (شکل ۵). در رابطه با میزان موفقیت تلقیح با سازه خاموشی و تولید گیاهان تراریخت، تراریختگی بیش از ۷۰ درصد بود که در مطالعات قبلی این میزان کمتر از ۵۰ درصد (۱۶) گزارش شده است.

تاکنون بیشتر ژن‌های کد کننده آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی پاپاورین و سنگونارین از جمله ژن *DBOX* و عملکرد هر یک از آن‌ها شناسایی شده است. با توجه به عملکرد کلیدی ژن *DBOX* و موفقیت تکنیک *VIGS* در کاهش بیان آن، خاموشی این ژن سبب تغییرات قابل توجهی در سطوح دو آلکالوئید سنگونارین و پاپاورین خواهد شد. علاوه بر کاهش این دو آلکالوئید، نوسکاپین نیز که از آلکالوئیدهای پرکاربرد موجود در شقایق محسوب می‌گردد تحت تاثیر تغییر بیان ژن *DBOX* قرار گرفته و با کاهش میزان بیان نسخه‌های این ژن، سطوح نوسکاپین نیز کاهش خواهد یافت (۱۷).

#### نتیجه‌گیری

گیاهان منبع اصلی متابولیت‌های ثانویه با اهداف پزشکی و درمانی محسوب می‌شوند و امروزه تمایل به مصرف گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی موجود در آن‌ها رو به

واکنش توسط آنزیم *DBOX* صورت می‌گیرد. علاوه بر این چرخه نهایی تبدیل دی‌هیدروپاپاورین و پاپاورین نیز توسط این آنزیم کاتالیز می‌شود. آنزیم *DBOX* یک فلاوپروتئین از خانواده اکسید-دوکنازهای وابسته به *FAD* (*FADOX*) می‌باشد که ژن‌های کد کننده این گروه از آنزیم‌ها، از جمله ژن‌های مهم و پایه‌ای حیات محسوب می‌شوند که در واکنش‌های متعدد شیمیایی، کاتابولیسم و تولید انرژی سلولی نقش فعالی دارند (۱۷) و به نظر می‌رسد که مطالعه این دسته از ژن‌ها با استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک نظیر خاموشی و فوق بیان، به شناخت و درک بهتر آن‌ها کمک بسیار زیادی خواهد کرد.

نتایج پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد که از تکنیک *VIGS* می‌توان جهت خاموشی ژن‌های مسیره‌های متابولیک در بافت‌های مختلف گیاهی استفاده نمود. در همین راستا به منظور بررسی ۶ آنزیم درگیر در بیوستز پاپاورین مطالعه‌ای با استفاده از تکنیک *VIGS* و خاموشی ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها اجرا شد (۱۸). تفاوت معنی‌داری در سطوح رونوشت‌های تمام ژن‌های مورد مطالعه مشاهده شد به طوری که مقدار کاهش بین ۳۰ درصد برای ژن *N7OMT* و ۷۵ درصد برای ژن *7OMT* بود. در مطالعه دیگری که به مطالعه آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای مورفینان پرداخته است (۱۶)، ژن‌های مورد نظر با استفاده از تکنیک *VIGS* خاموش شد. نتایج نشان داد که خاموشی دو ژن *CODM* و *T6ODM* در مراحل پایانی سنتز این گروه از آلکالوئیدها، سبب کاهش معنی‌دار سطوح رونوشت‌های هر دو ژن گردید و این مقدار کاهش به طور متوسط ۶۰ درصد بود. دنگ و فاجینی (۲۱) نشان دادند که خاموشی القا شده توسط *VIGS* بر روی ژن *CYP82V1* سطوح متفاوتی از رونوشت‌های این ژن را در بافت‌های مختلف گیاه شقایق ایجاد می‌کند که به طور کلی متوسط این کاهش در کل بافت‌های مورد مورد مطالعه حدود ۷۵

5. Liscombe DK, MacLeod BP, Loukanina N, Nandi OI, et al. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry*. 2005; 66(20): 1374-93.
6. Hagel JM, Facchini PJ. Benzyloisoquinoline alkaloid metabolism—a century of discovery and a brave new world. *Plant Cell Physiol*. 2013; 54(5): 647-672.
7. Wu S, Chappell J. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Curr Opin Biotechnol*. 2008; 19(2): 145-152.
8. Alvarez MA, Marconi PL. 2011. Genetic transformation for metabolic engineering of tropane alkaloids. In Alvarez MA, (ed). *Genetic transformation*. Vol 15. Croatia: Intech Publisher; 2011; 291-304.
9. Senthil-Kumar M, Mysore KS. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sci*. 2011; 16(12): 656-665.
10. Lange M, Yellina A, Orashakova S, Becker A. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the Virus-derived vector systems. In Becker A, (ed). *Virus-Induced Gene Silencing, Methods and Protocols*. New York: NY Humana Press, Springer; 2013; 1–14.
11. Kalantidis K, Schumacher HT, Alexiadis T, Helm JM. RNA silencing movement in plants. *Biol Cell*. 2008; 100(1): 13-26.
12. Kempe K, Higashi Y, Frick S, Sabarna K, et al. RNAi suppression of the morphine biosynthetic gene salAT and evidence of association of pathway enzymes. *Phytochemistry*. 2009; 70(5): 579-589.
13. Allen RS, Miller JA, Chitty JA, Fist AJ, et al. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in opium poppy. *Plant Biotechnol J*. 2008; 6(1): 22-30.
14. Allen RS, Millgate AG, Chitty JA, Thisleton J, et al. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid

افزایش است (۲۳). گیاه دارویی شقایق به دلیل دارا بودن طیف وسیعی از آلکالوئیدهای مهم و پر کاربرد بنزیدیل ایزو کوئینولینی (BIAS)، از اهمیت قابل توجهی برخوردار بوده و به عنوان تنها منبع تجاری و طبیعی این دسته از آلکالوئیدها محسوب می‌شود. استفاده از روش‌های نوین مهندسی متابولیت و دست‌کاری مسیرهای بیوسنتزی گیاهان دارویی نقش ارزنده‌ای در بهبود مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بر عهده داشته است (۲). استفاده از تکنیک‌های موفق خاموشی ژن، نظیر VIGS، به عنوان ابزاری کارآمد و مناسب برای مطالعات عملکرد ژن‌های مهم و تغییر محتوای ژنتیکی و شیمیایی در گیاهان به حساب می‌آید (۹). نتایج مطالعه حاضر بطور کلی نشان داد که استفاده از تکنیک VIGS می‌تواند جهت خاموش نمودن یک ژن و نهایتاً کاهش بیان محصول نهایی آن، موثر و موفق باشد. مزیت‌های تکنیک VIGS از جمله دامنه وسیع میزبانی، عدم ایجاد علائم بیماری‌زایی در گیاهان تیمار شده و کم هزینه بودن آن، سبب شده است که از این تکنیک در مطالعات گوناگون و سطوح مختلف از جمله بررسی عملکردهای ژنی و تغییر مسیرهای ژنتیکی در گیاهان مختلف استفاده شود (۹).

#### منابع

1. Khan F, Qidwai T, Shukla RK, Gupta V. Alkaloids Derived from Tyrosine: Modified Benzyltetrahydroisoquinoline Alkaloids. In *Natural Products*. Springer. 2013; 405-460.
2. Beaudoin GA, Facchini PJ. Benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*. 2014; 240(1): 19-32.
3. Hagel JM, Facchini PJ. Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nat Chem Biol*. 2010; 6: 273-275.
4. Wink M. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Ann Plant Rev*. 2010; 40: 1-19.

15. reticuline in opium poppy. *Nat Biotechnol.* 2004; 22(12): 1559-1566.
16. Larkin PJ, Miller JA, Allen RS, Chitty JA, et al. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotechnol J.* 2007; 5(1): 26-37.
17. 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.
18. Hagel JM, Beaudoin GA, Fossati E, Ekins A, et al. Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *J Biol Chem.* 2012; 287(51): 42972-42983.
19. Desagné-Penix I, Facchini PJ. Systematic silencing of benzyloquinoline alkaloid biosynthetic genes reveals the major route to papaverine in opium poppy. *Plant J.* 2012; 72(2): 331-344.
20. 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). *Plant J.* 2005; 44(2): 334-341.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-408.
22. Dang T-TT, Facchini PJ. Cloning and characterization of canadine synthase involved in noscapine biosynthesis in opium poppy. *FEBS Lett.* 2014; 588(1): 198-204.
23. Gurkok T, Ozhuner E, Parmaksiz I, Özcan S, et al. Functional Characterization of 4' OMT and 7OMT Genes in BIA Biosynthesis. *Front Plant Sci.* 2016; 7: 98-109.
24. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 2006; 27(1): 1-93.

## Silencing of final gene involved in biosynthesis of papaverin and sanguinarin alkaloids (*DBOX*) using VIGS technique in *Papaver somniferum* L.

Samiei K. Ph.D. Student., Ismaili A. Ph.D.\*, Nazarian Firouz-Abadi F. Ph.D.,

Sohrabi S.M. Ph.D. Student.

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

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

Received: 14 Mar. 2017

Accepted: 11 Jul. 2017

---

### Abstract

**Aim:** In this study, the effect of silence on the expression of the key gene expression of *DBOX* (which encodes the final enzyme for the synthesis of two alkaloids, Sanguinarin and papaverin) was used by VIGS technique in a species of poppy (*Papaver somniferum* L.).

**Material and methods:** A fragment of 350 pairs of alkali from the *DBOX* gene sequence (within the range of 1112-1462bp) was selected based on the highest number of siRNA production with 21 nucleotides length. After cloning this segment into the pTZ57R/T vector and transferring the vector to pTRV2 viral vector, *Agrobacterium* inoculation liquid containing silencer was injected into the poppy plants leaves. Primary transgenic plants were selected by PCR reaction using a protein-binding protein coding gene primer (CP) and secondary screening was performed by semi-quantitative PCR technique. In the next step, the samples with the maximum silence (lowest expression) of the gene were examined by real-time RT-PCR technique.

**Results:** Cloning accuracy in pTZ57R/T and pTRV2 plasmids were confirmed using PCR and enzymatic digestion. Based on the results of semi-quantitative PCR, 5 transgenic plants were selected with the lowest expression for *DBOX* gene. Based on semi-quantitative PCR results, 5 transgenic plants with the lowest expression were selected for *DBOX* gene. The results of real-time RT-PCR showed averagely decrease of 81% in the expression of *DBOX* gene transcriptions in transgenic plants compared to control plants (inoculated with the pTRV2 empty plasmid).

**Conclusion:** The results generally showed that the VIGS technique could successfully reduce the *DBOX* gene expression in poppy plants. In addition, the results obtained for this gene can be used to understand the biosynthetic pathway of poppy alkaloids and transgenic plants for metabolic engineering purposes.

**Key words:** *DBOX*, *Papaver somniferum*, Real-time PCR, Silencing