

خاموشی همزمان ژن‌های تبائین ۶-O-دمتیلاز و کدئین O-دمتیلاز در گیاه دارویی شقایق با روش القاء ویروسی

Co-silencing of Thebaine 6-O-demethylase and Codeine O-demethylase in *Papaver somniferum* L., Using Virus-Induced Gene Silencing

پروین نوروزی مقدم^۱، احمد اسماعیلی^{۲*} و فرهاد نظریان فیروزآبادی^۳

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۹/۰۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۳/۲۸

چکیده

گیاه شقایق تنها منبع تجاری برخی آکالوئیدهای مهم دارویی است. دو آنزیم مهم به نام تبائین ۶-O-دمتیلاز (Thebaine 6-O-demethylase; *T6ODM*) و کدئین O-دمتیلاز (Codeine O-demethylase; *CODM*) در انتهای مسیر بیوشیمیایی آکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی این گیاه وجود دارند. در این مطالعه فعالیت بیانی ژن‌های دو آنزیم مذکور با روش VIGS (Virus-Induced Gene Silencing) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، سازه‌ای براساس ناقل TRV2 که دارای توالی حفاظت شده ژن *DIOX* (که مشترک با بخش انتهایی ژن‌های *T6ODM* و *CODM*) می‌باشد، طراحی شد. برگ‌های اولیه گیاه دو تا سه هفته‌ای کشت شده در گلدان با آگروباکتریوم دارای سازه خاموشی و برای گیاهان کنترل با آگروباکتریوم حاوی ناقل TRV2 خالی مایه‌زنی شدند. بررسی بیان ژن در سطح نسخه‌برداری با فن Real Time PCR به ترتیب نشان‌دهنده کاهش ۸۶ و ۸۷ درصدی بیان ژن‌های *CODM* و *T6ODM* بود. این مطالعه اثبات کرد که VIGS ابزار موثری برای کاهش سطوح نسخه‌های ژن‌های بیوسنتزی بنزیل ایزوکوینولین‌هاست.

واژه‌های کلیدی: بنزوایزوکوینولین، شقایق، خاموشی ژن، VIGS

۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

Email: ismaili.a@lu.ac.ir

* نویسنده مسوول

تکنیک‌های از کار انداختن کامل ژن (Knock out) مانند (Millgate *et al.*, 2004)، روش‌های کاهش بیان ژن مانند RNA آنتی‌سنس پارک و همکاران (Park *et al.*, 2002, 2003)؛ فریک و همکاران (2004) و روش‌های RNAi/نیو و همکاران (2007)؛ آلن و همکاران (2008)؛ کیمپ و همکاران (Kempe *et al.*, 2009) مورد بررسی قرار گرفته است. روش‌هایی مانند فوق بیان و RNAi نیازمند گیاهان تراریزش شده دائم یا کشت‌های سلولی است.

به‌تازگی خاموشی ژن تحت القاء ویروسی (VIGS) به‌عنوان یک ابزار ژنومیک کاربردی برای مطالعه متابولیسم بنزیل ایزوکوینولین‌ها ظهور یافته است. فناوری VIGS روشی سریع و مستقیم است که نیازمند تراریزش دائم نیست (هاگل و فاجینی، 2013) و از این واقعیت استفاده می‌کند که گیاهان در پاسخ به حمله ویروس‌ها، مکانیسم دفاعی وابسته به همولوژی را القا می‌کنند. بنابراین ویروس‌ها می‌توانند برای خاموشی ژن‌های هدف در گیاه میزبان مهندسی شوند روبرتسون و همکاران؛ بورچ-اسمیت و همکاران (Burch-Smith *et al.*, 2004; Robertson, 2004). در واقع VIGS روشی است که در آن از مکانیسم دفاعی ضدویروسی برای خاموشی ژن در سطح RNA استفاده می‌کند. این فناوری بر پایه خاموشی ژن پس از رونویسی (Post-transcriptional gene silencing; PTGS) استوار است. بعد از توصیف پدیده VIGS در گیاه شقایق هیلمن و همکاران (Hileman *et al.*, 2005) این تکنیک برای خاموشی شش ژن انتهایی مسیر مورفین به‌کار گرفته شد (ویجیکون و فاجینی، 2012). هم‌چنین عملکرد ۳ آنزیم O-متیل ترانسفراز بر بیوسنتز نوسکاپین با روش VIGS انجام گرفت (دنگ و فاجینی (Dang and Facchini, 2012).

با توجه به نقش ژن‌های *T6ODM* و *CODM* در انتهای مسیر بیوسنتز مورفینان‌ها و اهمیت گیاه شقایق به‌عنوان تنها منبع تولیدکننده داروهای ناركوتیک و اهمیت آن در صنعت داروسازی، در این تحقیق اثر خاموشی همزمان ژن‌های *CODM* و *T6ODM* به روش VIGS بر میزان بیان این ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق بذور گیاه شقایق (*Papaver somniferum* L.) در گلدان‌هایی با قطر ۳۰ سانتی‌متر حاوی ۵۰ درصد ماسه،

آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی (BIA) گروه متنوعی از ترکیبات ازت‌دار هستند که پراکنش تاکسونومی محدودی در بین گیاهان دارند. اگرچه برخی از فعالیت‌های بنزیل ایزوکوینولین‌ها شناخته نشده است، اما خصوصیات دارویی بسیاری از این ترکیبات شناسایی شده است. این ترکیبات شامل مسکن‌های دارویی کدئین و مورفین، عوامل ضد میکروبی مانند سنگویی‌نارین و بربرین و داروهای ضدتومور مانند نوسکاپین هستند (هاگل و فاجینی (Hagel and Facchini, 2013). گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum*) از لحاظ اقتصادی، اجتماعی و سیاسی در جهان اهمیت دارد. خصوصیات دارویی این گیاه از آغاز تمدن شناخته شده است. شقایق به‌عنوان تنها منبع تجاری برای تولید مسکن‌های مورفین، کدئین و ترکیبات نیمه‌مصنوعی مانند اکسی‌کدون، بیوپرینورفین و نالتروکسن است (ویجیکون و فاجینی (Wijekoon and Facchini, 2012).

بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولین با ترکیب دوپامین و ۴-هیدروکسی‌فنیل‌استالدئید آغاز می‌شود، این دو ماده طی چندین واکنش آنزیمی به اس-نارکوکلازین تبدیل می‌شوند، این ماده پیش‌ساز عمومی BIA در گیاهان است (Samanani *et al.*, 2004). اس-نارکوکلازین با چندین واکنش آنزیمی پی در پی به اس-رتیکولین تبدیل می‌شود (فاجینی و پارک؛ زیگلر و همکاران؛ فاجینی و همکاران (Facchini and Park, 2003; Ziegler *et al.*, 2005; Ounaroon *et al.*, 2003). بیشتر محصولات بنزیل ایزوکوینولین‌ها از اس-رتیکولین به‌وجود می‌آیند. تغییرات اس-رتیکولین منجر به تشکیل آلکالوئیدهای مورفینانی می‌شود. تبدیل اس-رتیکولین به مورفین در گیاه شقایق شامل ۸ مرحله آنزیمی است که آنزیم‌های تبائین ۶-۰-دمتیلاز و کدئین O-دمتیلاز از آنزیم‌های مراحل انتهایی بیوسنتز مورفینان‌ها هستند. *T6ODM* به‌ترتیب ۶-۰-O-دمتیلازیون تبائین و اوری‌پاوین را به کدئینون و مورفینون کاتالیز می‌کند. آنزیم *CODM* باعث دمتیله شدن تبائین در موقعیت ۳ و تبدیل آن به اوری‌پاوین و همچنین دمتیله شدن کدئین و تبدیل آن به مورفین می‌شود (هاگل و فاجینی، 2010).

نقش ژن‌های بیان‌کننده آنزیم‌های شرکت‌کننده در متابولیسم بنزیل ایزوکوینولین‌ها با استفاده از فناوری‌های مختلف مانند فوق بیان/نیو و همکاران؛ لارکین و همکاران؛ فریک و همکاران؛ آلن و همکاران (Inui *et al.*, 2007; Larkin

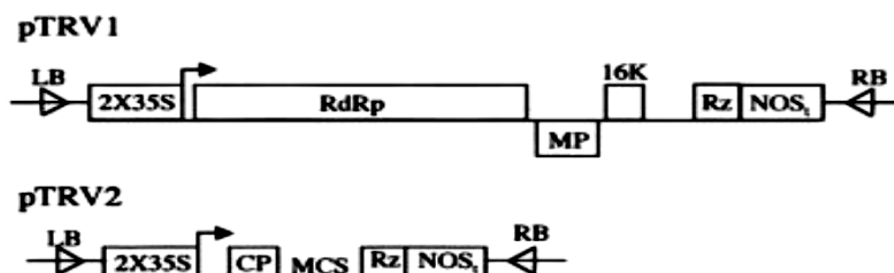
سویه GV3101 به منظور تراریزش گیاه شقایق مورد استفاده قرار گرفت.

در این پژوهش از ناقل ویروسی PTRV2 به عنوان واسطه انتقال قطعه خاموشی به گیاه شقایق و از ناقل PTRV1 برای همانندسازی ویروس استفاده شد.

ساختار PTRV1 و PTRV2 در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

۲۵ درصد کود دامی پوسیده و ۲۵ درصد خاک لومی کشت شدند. گیاهان در سن دو تا سه هفته‌ای با ناقل ویروسی دارای قطعه خاموشی مایه‌زنی شدند. بعد از مایه‌زنی، گیاهان تا زمان گل‌دهی در گلخانه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در روز، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در شب، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α برای تراریختی‌های باکتریایی و نگهداری آن‌ها و *Agrobacterium tumefaciens*



شکل ۱: ناقل‌های VIGS براساس TRV. TRV cDNA clones were placed between 2X CaMV 35S promoter (2X35S) and NOS terminator (NOST) in T-DNA vector. *RdRp*, RNA-dependent RNA polymerase; 16K, 16-kDa cysteine rich protein; *MP*, movement protein; *CP*, coat protein; LB and RB, left and right borders of T-DNA, respectively; *Rz*, self-cleaving ribozyme; MCS, multiple cloning sites (Dinesh-Kumar *et al.*, 2002)

بازدهی بالا همان ژن را تکثیر کند. فاکتور طول‌سازی با نام *Elongation factor 1a* (*ELA1*) به‌عنوان ژن کنترل درونی مورد استفاده گرفت. ناقل ویروسی TRV2 کدکننده پروتئین پوششی ویروس (*Coated protein*) است، حضور این ژن در RNA استخراج شده از ساقه گیاه اثبات‌کننده حضور و تکثیر ویروس در گیاه است. برای این ژن آغازگرهای TRV *CPF2* و TRV *CPR2* طراحی شد که قطعه‌ای به طول ۳۷۱ نوکلئوتید را تکثیر می‌کردند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

برای ساخت سازه خاموش‌کننده دو ژن *CODM* و *T6ODM* از ناحیه مشترک آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار primer3 آغازگرهای Dioxia-F و Dioxia-R طراحی شد. قطعه خاموشی با نام Dioxia به طول ۳۴۲ جفت باز از توالی ژن *T6ODM* انتخاب شد. این قطعه در دو ژن *CODM* حدود ۸۷ درصد مشابهت دارد.

با توجه به مشابهت بالای ژن‌های منتخب خاموشی طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی هر ژن برای Real Time PCR به گونه‌ای صورت گرفت که این آغازگرها به‌طور اختصاصی و با

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه خاموشی، اثبات حضور ویروس و آزمایش‌های Real Time PCR

Table 1: Primers sequences used for amplification of silencing fragment, Evaluation the presence of virus, and real time-PCR experiments

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (5'-3') Primer sequence (5'-3')	هدف طراحی آغازگر Primer application
RTT6ODMFN	GATTACTCCAGAGACACCTGC	Real Time PCR
RTT6ODMRN	TCTGACATGCAATCACGTC	Real Time PCR
RTCODMFN	CTTTCAAGGAAGCTTGATGG	Real Time PCR
RTCODMRN	CATCCACGAAATTTAAGCAC	Real Time PCR
EL1AF	TGCTCCTGTTCTGGATTGTC	Real Time PCR
EL1AR	GTCTCAACCACCATTGGCTTG	Real Time PCR
DIOXa-F	ACTAGTGGCGCGCCCCTTGTCCTCAACCAAAT	ساخت سازه خاموشی Silencing construct
DIOXa-R	GGATCCATTTAAATTCCACTTTTAAACAAAGC	ساخت سازه خاموشی Silencing construct
TRV CPF2	TGCCTCTACAGCTTTCCAC	تایید نفوذ ویروس به گیاه Confirmation of virus penentrance to plant
TRV CPR2	TGTCGTCGAAGCCACTTCCTA	تایید نفوذ ویروس به گیاه Confirmation of virus penentrance to plant

قطعه خاموشی از pTZ57R/T خارج و ناقل PTRV2 به فرم خطی درآمد. محصولات برش آنزیمی از ژل خالص‌سازی شده و مخلوط الحاق ساخته و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مخلوط الحاق به باکتری مستعد *E. coli* سویه DH5 α تراریزش و باکتری‌ها روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین رشد داده شدند. از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط گزینشگر استخراج پلاسمید صورت گرفته و حضور سازه ژنی در *E. coli* با استفاده از کلنی PCR مورد تأیید قرار گرفت. برای تأیید نهایی واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Sma*I و *Eco*RI انجام شد که موجب خارج شدن سازه خاموشی از ناقل TRV2 و تأیید آن شد. کلنی تأیید شده استخراج پلاسمید شد و پلاسمید حاصل با روش انجماد و ذوب به *آگروباکتریوم تومی‌فشنیس* سویه GV3101 انتقال داده شد. با کلنی‌های تشکیل شده روی محیط انتخابی ریفامپسین و کانامایسین واکنش کلنی PCR انجام شد.

تزریق *آگروباکتریوم دارای ناقلین ویروسی به گیاه*

از *آگروباکتریوم تومی‌فشنیس* حاوی TRV2-dioxa کشت مایع شبانه تهیه شد. یک کلنی تک از *آگروباکتریوم* برای تلقیح سه میلی‌لیتر محیط LB برای تهیه کشت شبانه مورد استفاده قرار گرفت. سپس این کشت شبانه برای تلقیح ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط LB حاوی MES ۱۰ میلی‌مولار، استوسرینگون ۲۰

از cDNA ژن *T6ODM* به‌عنوان الگو برای تکثیر قطعه خاموشی استفاده شد. با استفاده از آغازگرهای Dioxa-F و Dioxa-R واکنش PCR انجام و قطعه خاموشی تکثیر شده با کیت استخراج DNA از ژل (ساخت شرکت Fermentas کشور آلمان) خالص‌سازی شد.

برای همسانه‌سازی مستقیم قطعه خاموشی با استفاده از کیت TA cloning (محصول شرکت Fermentas کشور آلمان) مخلوط اتصال ساخته و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مخلوط واکنش اتصال به سلول‌های باکتری *E. coli* سویه DH5 α مستعد شده با روش شوک کلسیمی تراریزش شد. با توجه به حضور ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و *LacZ* در ساختار ناقل برای گزینش باکتری‌های تراریخت دریافت‌کننده ناقل از محیط حاوی آمپی‌سیلین و X-Gal و IPTG استفاده شد. بعد از تراریزش، چندین کلنی سفید انتخاب و با واکنش کلنی PCR با آغازگرهای قطعه خاموشی حضور قطعه خاموشی در آن‌ها تأیید و از کلنی‌های تأیید شده کشت مایع تهیه و استخراج پلاسمید انجام شد سپس پلاسمیدها تعیین توالی شدند.

از قطعه خاموشی همسانه‌سازی شده در ناقل TA که همسانه‌سازی آن با PCR و توالی‌یابی تأیید شده بود برای ساخت سازه خاموشی ویروسی به روش VIGS استفاده شد. ناقل ویروسی TRV2 و pTZ57R/T (حاوی قطعه خاموشی مشترک) با آنزیم‌های *Sma*I و *Eco*RI برش داده شدند، تا

کمی گیاهان با تغییر بیان قابل محسوس برای آزمایش Real Time PCR انتخاب شدند.

واکنش Real Time PCR

بعد از تأیید حضور نسخه‌های ژن *CP* و انجام PCR نیمه کمی برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های *CODM* و *T6ODM* از آغازگرهای طراحی شده واکنش Real Time PCR در جدول ۱ استفاده شد. برای انجام Real Time PCR از کیت SYBR-green و دستگاه Real Time RT-PCR (ساخت شرکت Qiagen کشور آمریکا) استفاده شد. براساس دستورالعمل کیت، هر واکنش تکثیر در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر از Master Mix، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲ میکرولیتر از cDNA گیاه انتخاب شده با غلظت ۵۰ نانوگرم در آزمایش PCR نیمه کمی و ۶ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر انجام شد. پس از تهیه حجم مورد نظر، واکنش PCR در ۳۵ چرخه، شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه و ۲۵ ثانیه در ۶۰ درجه انجام شد. پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی ۱ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه و بین دمای ۹۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد به منظور بررسی اختصاصی بودن واکنش PCR رسم شد. واکنش Real Time PCR برای گیاهانی که در PCR نیمه کمی کاهش بیان نشان داده بودند و همچنین دو گیاه شاهد که با توجه به PCR نیمه کمی بیان بالایی داشتند، انجام شد. از هر نمونه دو cDNA ساخته و با هر cDNA واکنش Real Time PCR با سه تکرار انجام شد. سطح نسبی نسخه‌های بیان شده توسط هر ژن در گیاهان تیمار شده با سازه خاموشی مشترک و گیاهان شاهد تیمار شده با ناقل خالی TRV2 با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ مقایسه شدند لیواک و شمیثن (Livak and Schmittgen, 2001).

نتایج و بحث

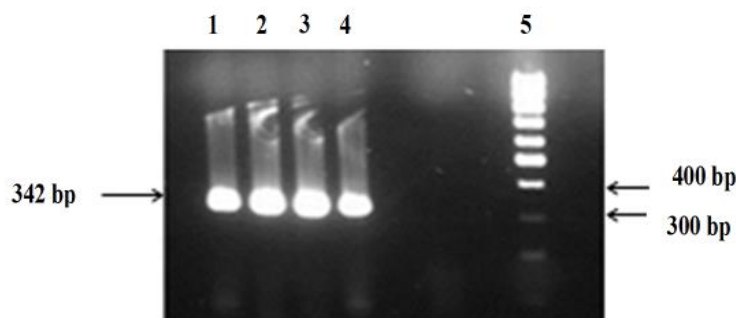
بعد از همسانه‌سازی قطعه خاموشی در ناقل T/A، برای تأیید حضور قطعه خاموشی در این ناقل، با کلنی‌های سفید حاصل از تراریزش به *E. coli* واکنش کلنی PCR انجام شد که باند مورد انتظار ۳۴۲ جفت بازی تکثیر شد و نتیجه آن در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

میکرومولار و کاناماسین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. کشت‌ها در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس در دور ۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب تشکیل شده در محلول مایه‌زنی شامل MES ۱۰ میلی‌مولار، استوسرینگون ۲۰ میکرومولار و $MgCl_2$ ۱۰ میلی‌مولار حل شد تا OD600 به ۲/۵ رسید. آگروباکتریوم حاوی TRV2-dioxa برای گیاهان تیمار خاموشی و ناقل TRV2 خالی برای گیاهان شاهد هر یک به صورت مستقل با نسبت ۱:۱ با آگروباکتریوم حاوی TRV1 مخلوط شده، به مدت دو ساعت قبل از مایه‌زنی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. گیاهان شقایق استفاده شده برای VIGS گیاهان ۲ تا ۳ هفته‌ای بودند که برگ‌های اولیه آن‌ها ظاهر شده بود. مایه‌زنی آگروباکتریوم به برگ‌ها با سرنگ ۱ میلی‌لیتری انجام شد.

حدود ۶ تا ۸ هفته بعد از مایه‌زنی گیاهان، سه سانتی‌متر اولیه ساقه بلافاصله در زیر غنچه گل از گیاه بالغ در مرحله گل‌دهی و قبل از باز شدن غنچه گل برای آنالیزهای Real Time PCR جمع‌آوری شد. برای اثبات حضور و تکثیر ویروس در گیاه حضور نسخه‌های ژن *CP* در RNA استخراج شده از ساقه گیاه مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۴۸ گیاه مایه‌زنی شده ۹ گیاه، انتخاب و برای تأیید حضور *CP* بررسی شدند. با کیت استخراج RNA (ساخت شرکت سیناژن) از بافت ساقه RNA استخراج و با استفاده از کیت ساخت cDNA (محصول شرکت Fermentase کشور آلمان) ساخته و با آغازگرهای ژن *CP* واکنش PCR انجام شد. گیاهانی که حضور نسخه‌های ژن *CP* در آنها تأیید شده بود برای آزمایش PCR نیمه کمی و Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

PCR نیمه کمی

آزمایش PCR نیمه کمی برای نمونه‌هایی که حضور ژن *CP* در آن‌ها تأیید شده بود انجام شد. در این آزمایش از ELISA به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. با نمونه‌های تیمار شده با سازه خاموشی و نمونه‌های شاهد تیمار شده با ناقل خالی TRV2 که حضور ژن *CP* در آن‌ها تأیید شده، با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *CODM*، *T6ODM* و آغازگرهای مربوط به *ELISA* واکنش PCR انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. با توجه به نتایج PCR نیمه

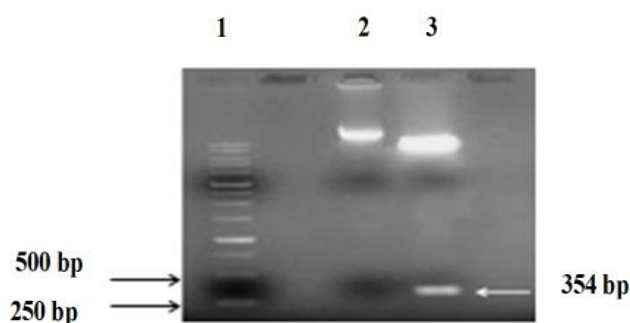


شکل ۲: کلنی PCR برای تأیید حضور قطعه خاموشی در ناقل pTZ57R/T. ۱، ۲، ۳ و ۴: تکثیر قطعه خاموشی. ۵: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp

Fig. 2: Evaluation the presence of the silencing fragment in pTZ57R/T using colony PCR. 1, 2, 3 and 4: amplification silencing fragment; 5: molecular marker 100 bp

انجام و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *SmaI* و *EcoRI* انجام شد. خروج قطعه‌ای به طول ۳۵۴ جفت باز صحیح بودن همسانه‌سازی قطعه خاموشی در ناقل pTRV2 را تأیید کرد. نتیجه هضم آنزیمی در شکل ۳ مشاهده می‌شود.

بعد از برش قطعه خاموشی از ناقل pTZ57R/T و همسانه‌سازی آن در ناقل pTRV2، باکتری‌های تراریخت بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین رشد داده شدند. سپس برای دو کلنی تأیید شده استخراج پلاسمید

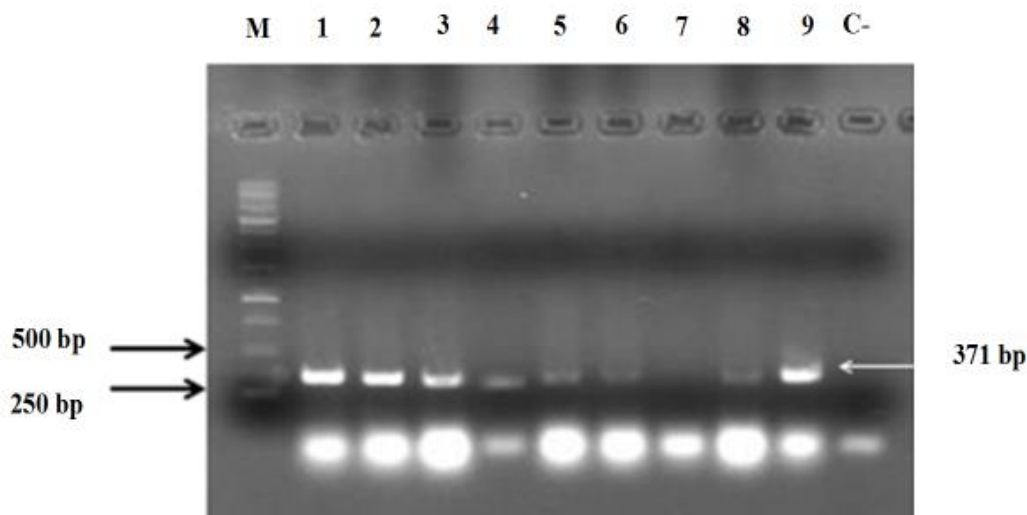


شکل ۳: هضم آنزیمی پلاسمید حاوی قطعه خاموشی با آنزیم‌های *SmaI* و *EcoRI*. ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp. ۲: پلاسمید هضم نشده. ۳: پلاسمید هضم شده با آنزیم‌های *SmaI* و *EcoRI*

Fig. 3: Digestion of plasmid containing silencing fragment with *SmaI* and *EcoRI*. 1: molecular marker 100 bp; 2: undigested plasmid; 3: plasmid were digested with *SmaI* and *EcoRI*

تأیید حضور نسخه‌های ژن CP در گیاهان تیمار شده از بین ۹ نمونه تیمار شده با ناقل ویروسی TRV2 حاوی سازه خاموشی حضور نسخه‌های ژن CP در هشت نمونه تأیید شد (شکل ۴).

بعد از تأیید همسانه‌سازی قطعه خاموشی در ناقل pTRV2 از باکتری‌های دارای سازه خاموشی استخراج پلاسمید انجام و پلاسمید حاصل به آگروباکتریوم تومی فشنیس سویه GV3101 تراریخت شد. برای تأیید نهایی حضور سازه ویروسی در آگروباکتریوم واکنش کلنی PCR انجام شد که باند مورد انتظار ۳۴۲ جفت بازی تکثیر شد.

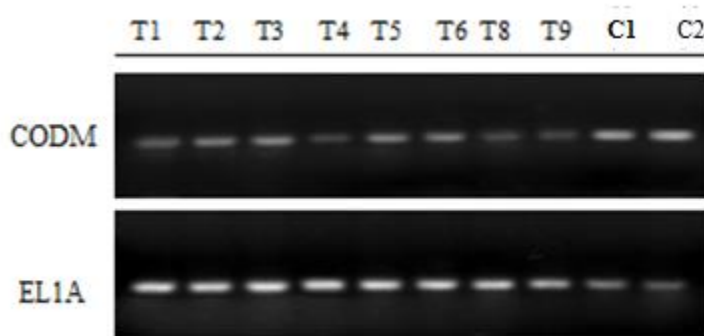


شکل ۴: تأیید حضور نسخه‌های ژن CP در گیاهان تیمار شده با ناقل pTRV2 حاوی سازه خاموشی. M: نشانگر وزن مولکولی 1kb. ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸ و ۹: گیاهانی که حضور ژن ویروس برای تکثیر قطعه ۳۷۱ جفت باز در آنها تأیید شد. ۷: گیاهی که حضور ویروس در آن تأیید نشد

Fig. 4: Evaluation the presence of CP virus gene in treated plants by gene-silencing pTRV2 construct. M: molecular marker 1Kb; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9: plants that confirmed for the presence of the 371 bp band of virus gene; 7: the plant that not confirmed for the presence of virus gene

شکل گیاهان T1، T2، T4، T8 و T9 در مقایسه با گیاهان شاهد بیان کمتری داشتند و بنابراین این گیاهان برای واکنش Real Time PCR انتخاب شدند.

نتایج مربوط به RT-PCR نیمه کمی ژن CODM و آغازگرهای اختصاصی ژن CODM و آغازگرهای ژن ELIA در شکل‌های ۵ و ۶ مشاهده می‌شود. با توجه به

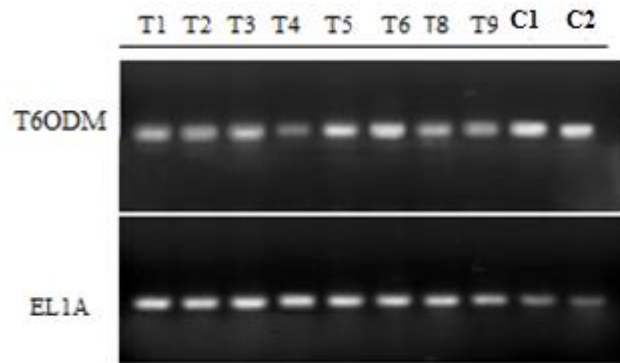


شکل ۵: نتایج PCR نیمه کمی ژن CODM نرمال شده با ELIA گیاهان T1، T2، T3، T4، T8 و T9: تیمار شده با TRV2 دارای Dioxin. گیاهان C1 و C2: تیمار شده با TRV2 خالی

Fig. 5: Results of semi-quantitative RT-PCR for CODM which normalized by ELIA. T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9: TRV2-dioxa-treated plants. C1, C2: TRV2-empty-treated plants

T4، T8 و T9 در مقایسه با گیاهان شاهد بیان کمتری داشتند و بنابراین این گیاهان برای واکنش Real Time PCR انتخاب شدند.

نتایج مربوط به RT-PCR نیمه کمی ژن T6ODM و آغازگرهای اختصاصی ژن T6ODM و آغازگرهای ژن ELIA در شکل ۶ مشاهده می‌شود. با توجه به شکل گیاهان T1، T2،

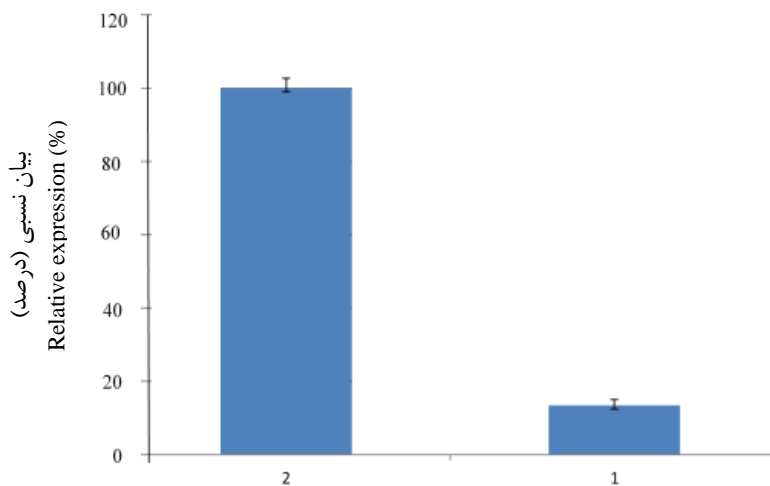


شکل ۶: نتایج PCR نیمه کمی ژن *T6ODM* نرمال شده با *EL1A*. گیاهان T1، T2، T3، T4، T5، T6، T8، T9 و T9: تیمار شده با TRV2 دارای *dioxa*. گیاهان C1 و C2: تیمار شده با TRV2 خالی

Fig. 6: Results of semi-quantitative RT-PCR for *T6ODM* which normalized by *EL1A*. T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9: TRV2-*dioxa*-treated plants. C1, C2: TRV2-empty-treated plants

میزان خاموش سازی ژن *CODM* در نمونه های گیاهی مختلف تیمار شده با سازه خاموشی TRV2-*dioxa* در مقایسه با نمونه های شاهد نشان داد که به طور میانگین خاموشی به میزان ۸۶ درصد یا به عبارتی دیگر بیان ژن *CODM* در نمونه های تیمار شده حدود ۱۴ درصد بیان این ژن، در نمونه های شاهد می باشد (شکل ۷).

پنج گیاهی که در PCR نیمه کمی بیشترین کاهش بیان را داشتند برای واکنش Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. با استانداردسازی مشخص شد میزان کارایی هر سه ژن *CODM*، *T6ODM* و *EL1A* حدود ۹۰ درصد است. بنابراین با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (لیواک و اشمیتزن، ۲۰۰۱) بیان ژن های *CODM* و *T6ODM* در نمونه های تیمار شده نسبت به بیان این ژن ها در نمونه های شاهد محاسبه شد.

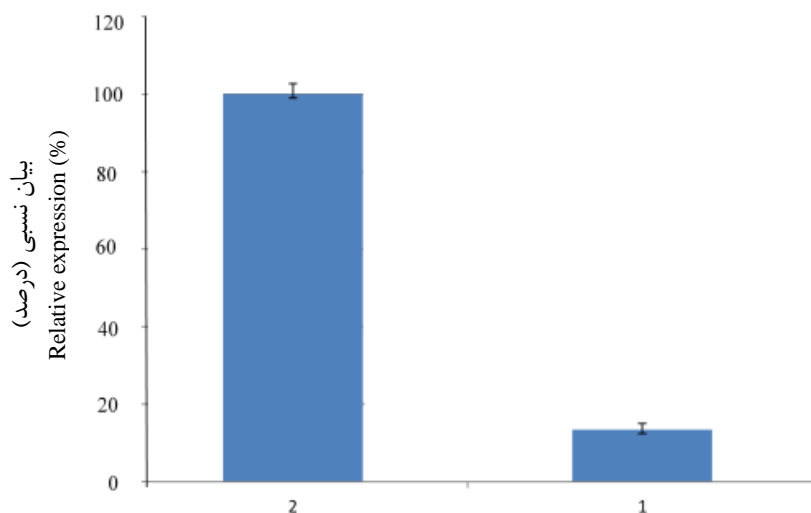


شکل ۷: مقایسه بیان ژن *CODM* در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد. ۱: میزان بیان ژن *CODM* در گیاهان تیمار شده با TRV2 خالی. ۲: میزان بیان ژن *CODM* در گیاهان تیمار شده TRV2-*dioxa*

Fig. 7: Comparison between *CODM* gene expression in transgenic and control plants. 1: Expression level of *CODM* gene expression in TRV2-empty- treated plants; 2: level of *CODM* gene expression in TRV2-*dioxa*- treated plants

میزان ۸۷ درصد یا به عبارتی دیگر بیان ژن *T6ODM* در نمونه های تیمار شده حدود ۱۳ درصد بیان این ژن، در نمونه های شاهد می باشد (شکل ۸).

میزان خاموش سازی ژن *T6ODM* در نمونه های گیاهی مختلف تیمار شده با سازه خاموشی TRV2-*dioxa* در مقایسه با نمونه های شاهد نشان داد که به طور میانگین خاموشی به



شکل ۸: مقایسه بیان ژن *T6ODM* در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد. ۱: میزان بیان ژن *CODM* در گیاهان تیمار شده با TRV2 خالی. ۲: میزان بیان ژن *CODM* در گیاهان تیمار شده TRV2-dioxa

Fig. 8: Comparison of *T6ODM* gene expression in transgenic and control plants. 1: level of *CODM* gene expression in TRV2-empty- treated plants; 2: level of *T6ODM* gene expression in TRV2-dioxa- treated plants

در پژوهش حاضر نیز نتایج به دست آمده بسیار نزدیک به پژوهش‌های پیشین (هاگل و فاجینی، ۲۰۱۰) بود. به طوری که بیان ژن *T6ODM* نسبت به نمونه‌های شاهد ۸۷ درصد و بیان ژن *CODM* نسبت به نمونه‌های شاهد ۸۶ درصد کاهش یافته بود. این بررسی نشان‌دهنده کارایی بالای VIGS برای خاموشی موقت ژن در گیاه شقایق می‌باشد. همچنین نتایج به دست آمده نشان‌دهنده کارایی قطعه خاموشی انتخاب شده برای خاموشی هم‌زمان دو ژن و اطمینان از عملکرد آن برای خاموشی دائم است.

یکی از دلایل بازده بالای خاموشی در پژوهش انجام شده استفاده از ناقل ویروسی مناسب و روش ارائه این ناقل به گیاه بود. ناقل ویروسی به کار رفته در این پژوهش ناقل TRV2 بود. این ناقل مزیت‌هایی دارد از جمله اینکه خود علائم ویروسی را که فنوتیپ VIGS را پیچیده می‌کند، القاء نمی‌کند. علائم آلودگی ایجاد شده توسط این ناقل در مقایسه با سایر ناقل‌ها خفیف‌تر است. سطح وسیعی از سلول‌های مجاور را آلوده می‌کند و بیان ژن را در نقاط رشدی خاموش می‌کند. اثرات خاموشی آن قسمت وسیع‌تری از بافت گیاهی را در بر می‌گیرد و موجب کاهش بیشتر تجمع mRNA می‌شود. راتکلیف و همکاران (Ratcliff et al., 2001). بنابراین با توجه به بازده بالای خاموشی دو ژن *CODM* و *T6ODM* در پژوهش اخیر چنین استنباط می‌شود که ناقل TRV2 توانسته است اثرات خاموشی را به صورت سیستمیک و گسترده در گیاه انتشار دهد، که نتیجه آن خاموشی بالای هر دو ژن هدف بود. استفاده از این ناقل برای خاموشی ژن PDS و همچنین خاموشی ژن‌های مسیر بیوسنتزی مورفین در گیاه شقایق

فن VIGS به عنوان ابزاری کاربردی برای مطالعه متابولیسم بنزیل ایزوکوینولین‌ها در گیاه شقایق است. این فناوری سریع با اطلاع در مورد بخشی از ژن می‌تواند سطح نسخه‌های ژن هدف را کاهش دهد. همچنین با این روش می‌توان یک خانواده ژنی را سرکوب کرد (هاگل و فاجینی، ۲۰۱۳). روش VIGS به عنوان یک روش خاموشی پس از نسخه‌برداری است و نسخه‌های ژن را کاهش می‌دهد اما نمی‌تواند تمام نسخه‌های ژن هدف را از بین ببرد. اینکه VIGS چه اثراتی روی میزان نسخه‌ها داشته باشد به عوامل متعددی بستگی دارد. بعضی از فاکتورهای خود تکنیک VIGS مانند ناحیه انتخاب شده از ژن هدف برای ساخت ناقل ویروسی، وجود ژن‌هایی با فعالیت مشابه و سطح نسخه‌های ژن درونی از عواملی هستند که می‌تواند بر میزان خاموشی تأثیرگذار باشد (ویجیکون و فاجینی، ۲۰۱۲).

در این پژوهش با استفاده از فن VIGS، تنظیم بیوسنتز مورفین از طریق کاهش سیستمیک در سطح بیان ژن‌های *CODM* و *T6ODM* بررسی شد. خاموشی ژن در سطح نسخه‌برداری با استفاده از Real Time PCR مورد تأیید قرار گرفت. در مجموع مشخص شد خاموشی هم‌زمان دو ژن *CODM* و *T6ODM* با روش VIGS توسط سازه خاموشی مشترک دو ژن موجب کاهش بیان هر دو ژن در گیاهان تیمار شده با ناقل حاوی قطعه خاموشی نسبت به گیاهان شاهد می‌شود. با توجه به قطعه خاموشی هدف که خاموشی هر دو ژن را پوشش می‌داد و با توجه به مشابهت بالای دو ژن (۸۴ درصد) انتظار می‌رفت که میزان نسخه‌های هر دو ژن کاهش یابد زیرا این ناحیه از منطقه مشترک دو ژن انتخاب شده بود.

خاموشی همزمان ژن‌های تباین ۶-۰-۰-دمتیلاز و...

می‌رسد در افزایش بازدهی خاموشی تأثیرگذار بوده است. این پژوهش نشان‌دهنده موثر بودن VIGS به‌عنوان استراتژی برای معتبر ساختن نقش فیزیولوژیکی ژن‌های مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهاست.

به‌کار رفته و کارآمدی آن برای خاموشی این ژن‌ها در گیاه شقایق به اثبات رسیده بود. همچنین با توجه به موثر بودن پروتکل تراریزش ناقل ویروسی به گیاه شقایق در پژوهش‌های قبلی، از این پروتکل در تحقیق اخیر استفاده شد، که به نظر

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.