بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه لرستان

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

عنوان پایان نامه

همسانه سازی سازه خاموشی ژن T6ODM (Thebain 6-0 - demethylase) و معرفی دائم و موقت آن در گیاه دارویی شقایق

نگارش

شوکت عالی پور امرایی

استاد راهنما

دکتر احمد اسماعیلی

اساتید مشاور

دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی

دکتر علیرضا زبرجدی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی کشاورزی رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

همه ی امتیازات این پایان نامه به دانشگاه لرستان تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب در مجلات، کنفرانس ها یا سخنرانی ها، باید نام دانشگاه لرستان (یا استاد یا اساتید راهنمای پایان نامه) و نام دانشجو با ذکر ماخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

بهمن ۱۳۹۲

چکیده:

شقایق مهمترین منبع چندین آلکالوئید دارویی مانند ضد درد، سرفه، تومور و باکتری است. با آنکه اصلاح سنتی به خوبی دیگر روش‌های مولکولی تعداد زیادی ژرم پلاسم با میزان آلکالوئیدهای تغییر یافته تولید کرده است، ولی هنوز نیاز به دستورزی مسیرهای بیوسنتزی این آلکالوئیدها به روش‌های مهندسی ژنتیک می‌باشد. ژن T6ODM (Thebaine – 6 - O Demetylase) یکی از ژن‌های پایین دست مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها می‌باشد که تبائین را در موقعیت ٦ دمتیله کرده و به نئوپینون تبدیل می‌کند که نئوپینون خود طی یک واکنش دیگری به کدوئینون تبدیل می‌شود. همچنین این ژن در مسیر دیگری اوریپاوین را دمتیله کرده و به مورفینون تبدیل می-کند. در این پژوهش به منظور بررسی تأثیر خاموشی ژن یاد شده بر میزان بیان آن، دو سازه خاموشی موقت و دائم متکی بر فن RNAi طراحی و ساخته شد و سپس توسط اگروباکتری به گیاه شقایق وارد شدند. جهت خاموشی پایدار از سازه سنجاق‌سری ژن هدف و از ناقل pGSA1285 استفاده گردید و سازه یاد شده توسط اگروباکتریی به ریزنمونه‌های محور زیرلپه منتقل شد. برای همسانه‌سازی سازه خاموشی موقت (VIGS; Virus Induced Gene Silencing) ژن هدف از ناقل ویروسی pTRV استفاده شد و توسط اگروباکتری به برگ‌های گیاهچه‌های ۳ تا ٤ هفته‌ای تراریزش شد. در بررسی خاموشی موقت ژن T6ODM ابتدا گیاهان تیمار (تلقیح یافته با TRV+T6ODM) و گیاهان شاهد (تلقیح یافته با TRV خالی)، جهت اثبات تراریزش، مورد ارزیابی حضور ژن پروتئین پوششی (CP) ناقل TRV قرار گرفتند. در مرحله بعد از میان گیاهانی که TRV مثبت بودند تعدادی گیاه جهت آنالیز نیمه کمی انتخاب شدند. سپس نمونه‌هایی که کمترین سطح بیان را نشان دادند، جهت آنالیز دقیق‌تر بیان ژن با استفاده از فن بیان ژن در زمان واقعی مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میانگین درصد خاموشی در گیاهان تراریخت انتخابی نسبت به گیاهان شاهد حدود ۷۳ درصد می‌باشد. از این رو کارایی سازه مورد نظر جهت کاهش قابل توجه بیان ژن مورد تأیید قرار گرفت.

در این پژوهش به منظور بهینه سازی شرایط کشت بافت و باززایی ریزنمونه‌های تلقیح یافته، آزمایش دیگری به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با هشت تکرار (هر پتری‌دیش به طور متوسط شامل ۱۰ ریزنمونه به عنوان یک تکرار) انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل نوع محیط کشت پایه (B5 و MS) و سطوح آنتی بیوتیک پاراومومایسین (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم بر لیتر) بودند. نتایج نشان داد در مرحله تولید کالوس از ریزنمونه های تلقیح‌یافته، محیط MS محیط مناسب تری است. همچنین در غلظتهای پاراومومایسین سطوح ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم بر لیتر باززایی گیاهچه مشاهده شد ولیکن به تناسب افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک درصد باززایی سیر کاهشی داشت.

کلمات کلیدی: آلکالوئید، پاراموماییسین، خاموشی، محور زیرلپه، PCR در زمان واقعی، VIGS.

ای کامکاری که دل دوستان در کنف توحید توست و ای که جان بندگان در صدف تقدیر توست، ای قهاری که کس را به تو حیلت نیست، ای جباری که گردنکشان را با تو روی مقاومت نیست، ای حکیمی که روندگان ترا از بلای تو گریز نیست، ای کریمی که بندگان را غیر از تو دست آویز نیست، نگاه دار تا پریشان نشویم و در راه آر تا سرگردان نشویم.

الهی ای کریمی که بخشنده عطایی و ای حکیمی که پوشنده خطایی و ای احدی که در ذات و صفات بی همتایی و ای خالقی که راهنمایی و ای قادری که خدایی را سزایی، بذات لایزال خود و بصفات باکمال خود و بعزت جلال خود و بعظمت جمال خود که جان ما را صفای خود ده، دل ما را هوای خود ده، چشم ما را ضیا خود ده و ما را آن ده که آن به.

تقدیم به مهربانترین آفریده های پروردگار:

پدرم، او که همه رنج ها را با جان خرید تا حلاوت زندگی را به من ببخشد

مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق

و

همسر مهربانم، پناه خستگیم و امید بودنم

تشکر و قدردانی

شکر و سپاس خدای را که با الطاف ربانی اش توفیق داد تا این مجموعه را به پایان رسانده و از خداوند منان توفیق و سعادت همه پویندگان و رهروان علم و دانش را خواهانیم. پس از حمد و ثنای الهی و شکر گزاری به درگاه خداوند متعال به مصداق حدیث شریف:

"من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق"

اینک که حاصل همه تلاشها و تلذ مثمر ثمر واقع شد بر خود فرض می دانم که بابضاعت اندکم در کمال ادب و احترام مراتب سپاس و قدردانی خالصانه وصمیمانه را از همه کسانیکه مرا را در این وادی یاری نموده اند ابراز داشته به ویژه از: استاد فرهیخته و ارجمند جناب آقای دکتر اسماعیلی استاد محترم راهنما که در این مدت با صبر و متانت مشوق و راهنمای شایسته ای برای اینجانب بوده اند و با پیگیری مداوم و دلسوزی همیشگی شان راه را بر من هموار ساختند، جناب آقای دکتر نظریان و جناب آقای دکتر زبرجدی اساتید محترم مشاور که از راهنمایی های ارزشمندشان بهره برده ام، سرکار خانم نوروزی مقدم کارشناس محترم آزمایشگاه که در این مدت از هیچ کمکی دریغ نکردند و از همه دوستان خوب و ارزشمندم در آزمایشگاه بیوتکنولوژی که در طی این دوره از لطف و یاریشان برخوردار بودم و از همه عزیزانی که در تنظیم و گردآوری این مجموعه نقش داشته اند تشکر و قدرشناسی می نمایم.

. امید است این مجموعه بتواند برای جویندگان علم و دانشجویان عزیز مثمر ثمر واقع شود.

عنوان صفحه

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-مقدمه ۲

فصل دوم:کلیات و بررسی منابع

۲- کلیات و بررسی منابع ۶

۲-۱ گیاه‌شناسی ۶

۲-۲ متابولیت‌های ثانویه ۶

۲-۲-۱ آلکالوئیدها ۷

۲-۲-۲ چرخه بیوسنتزی مورفینان‌ها ۸

۲-۲-۳ نقش ژن T6ODM در چرخه سنتز مورفینان ۱۱

۲-۳ مهندسی متابولیت در شقایق با RNAi ۱۲

۲-۳-۱ خاموشی ژن با فن RNAi در گیاه شقایق ۱۶

۲-۳-۲ خاموشی ژن با روش VIGS در شقایق ۱۶

۲-٤ کشت بافت و تراریزش گیاه شقایق ۲۰

۲-٤-۱ تراریزش گیاه شقایق ۲۱

۲-۵ بررسی سطح بیان ژن توسط واکنش Real time ۲۴

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳ مواد و روش‌ها ۲۸
۳-۱ همسانه‌سازی cDNA ژن T6ODM درون ناقل pTZ57R/T ۲۸
۳-۱-۱ ترانسفورم کردن باکتری E.coli سویه DH5α ۳۱
۳-۱-۲ انتخاب کلونی‌های ترانسفورم ۳۲
۳-۲ همسانه‌سازی قطعه خاموشی درون ناقل pTZ57R/T ۳۴
۳-۳ ساخت سازه خاموشی T6ODM ۳۶
۳-۳-۱ ویژگی‌های ناقل خاموشی pGSA1285 ..... ۳۶
۳-۳-۲ همسانه‌سازی قطعه خاموشی در جهت سنس به pGSA1285 ..... ۳۸
۳-۳-۲-۱ تایید همسانه‌سازی قطعه سنس در pGSA1285 ..... ۴۰
۳-۳-۳ همسانه‌سازی قطعه آنتی سنس در pGSA1285 سنس ۴۲
۳-۳-۳-۱ واکنش هضم آنزیمی برای تایید همسانه‌سازی سازه خاموشی به pGSA1285 ..... ۴۳
۳-۳-٤ انتقال سازه خاموشی به اگروباکتری ۴۵
۳-٤ تراریزش موقت گیاه شقایق ۴۶
۳-٤-۱ ناقل ویروسی TRV ۴۶
۳-٤-۲ همسانه‌سازی قطعه خاموشی T6ODM در ناقل TRV ۴۸
۳-٤-۳- انتقال سازه خاموشی موقت به گیاه شقایق ۵۰
۳-٤-۳-۱ کشت بذر ۵۰
۳-٤-۳-۲ آماده‌سازی مایع تلقیح ۵۰
۳-٤-۳-۳ تزریق اگروباکتری به برگ‌های گیاه شقایق ۵۰
۳-۵ آنالیز Real time برای گیاهان تراریخت موقت ۵۱
۳-۵-۱ استخراج RNA و ساخت cDNA ۵۱
۳-۵-۲ طراحی آغازگر ۵۱
طراحی آغازگر ژن T6ODM ۵۲

طراحی آغاز گر جهت تکثیر ژن ELF1 ..... ۵۲
طراحی آغازگرتکثیر قطعه‌ای از ژن پروتئین پوششی در ناقل TRV ۵۳
۳-۵-۳ انتخاب گیاهان تراریخت موقت ۵۳
۳-۵-٤ آزمایش نیمه کمی(Semi quantitative) ۵۴
۳-۵-۵ آزمایش Real time ۵۴
۳-۵-۵-۱ طراحی آزمایش ۵۴
۳-۵-۵-۲ واکنش Real time PCR ۵۵
۳-۵-٦ محاسبه سطح بیان نمونه‌ها ۵۵
۳-۵-٦-۱ روش لایوک ۵۶
۳-٦ بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه شقایق ۵۶
۳-٦-۱ کشت بذرها ۵۸
۳-٦-۲ تراریزش گیاه شقایق ۵۹

فصل چهارم: نتایج و بحث

عنوان صفحه

٤-۱ تایید همسانه‌سازی cDNA ژن T6ODM در ناقل pTZ57R/T ۶۱
٤-۱-۱ تعیین توالی cDNA ژن T6ODM ۶۳
٤-۲ همسانه‌سازی قطعه خاموشی ژن T6ODM در ناقل pTZ57R/T ۶۸
٤-۳ ساخت سازه RNA سنجاق سری ۷۲
٤-۳-۱ تایید همسانه‌سازی قطعه خاموشی در جهت سنس در ناقل خاموشی pGSA1285 ..... ۷۲
٤-۳-۲ تایید همسانه‌سازی قطعه خاموشی در جهت آنتی سنس به ناقل pGSA1285 سنس ۷۴
٤-۳-۳ تایید همسانه‌سازی سازه خاموشی در اگروباکتریوم ۷۶
٤-۳-٤ توالی‌یابی سازه خاموشی T6ODMRNAi ۷۶

٤-٤ تایید همسانه‌سازی سازه VIGS در ناقل ویروسی TRV2 ..... ۷۷
٤-٤-١ تایید همسانه‌سازی سازه خاموشی موقت در اگروباکتری ۷۹
٤-٥ نتایج آنالیز Real time PCR ۸۰
٤-٥-١ تکثیر قطعه‌ای از ژن CP ۸۰
٤-٥-٢ بررسی میزان بیان ژن در نمونه‌های مختلف گیاهی به روش نیمه کمی ۸۱
٤-٥-٣ آنالیز Real time PCR ۸۱
۴-۶ بهینه سازی انتقال ژن ۸۴
منابع و ماخذ ۱۰٦

فهرست تصاویر

عنوان صفحه

شکل۲-۱ بیوسنتز مورفین، بربرین و سنگوینارین ۱۱
شکل ۲-۲. بیوسنتز آلکالوئیدهای مورفینان شقایق ۱۲
شکل ۲-۳.مکانیسم RNAi در مسیر هضم siRNA ۱۵
شکل ۲-٤ مکانیسم عمل VIGS ۱۸
شکل ۳-۱ شمای کلی از ناقل همسانه‌سازی pTZ57R/T ۳۳
شکل۳-۲ توالی ناحیه تکثیرشونده قطعه خاموشی توسط جفت آغازگرهای طراحی شده ۳۵
شکل- ۳- ۳ شکل شماتیکی از ساختار کلی مربوط به ناقل‌های pCAMBIA ۳۷
شکل ۳-٤ شمای کلی از ناقل pGSA1285 مولد dsRNA ۳۸
شکل ۳-۵ شکل شماتیک سازه طراحی شده RNA سنجاق‌سری ژن T6ODM ۴۴
شکل ۳-٦ ساختار ناقل دو گانه pTRV2 ..... ۴۷
شکل ٤-۱ تکثیر cDNA ژن T6ODM توسط آغازگرهای اختصاصی ۶۱
شکل ٤-۲ نتیجه برش cDNA ژن T6ODM (تکثیری توسط PCR) از روی ژل ٦۲

شکل ٤-٣ نتیجه کلونی- PCR. برای تایید همسانه‌سازی cDNA ژن T6ODM به باکتری E.coli. ۶۲
شکل ٤-٤ تایید همسانه‌سازی cDNA با الگوی تکثیری پلاسمید ی. ۶۳
شکل ٤-٥ نتیجه هم ردیف‌سازی توالی همسانه‌سازی شده cDNA ژن T6ODM با تواالی موجود.... ۶۶
شکل ٤-٦ نتیجه هم ردیف‌سازی توالی اسید آمینه‌ای مربوط به توالی ژن T6ODM و تواالی موجود . ۶۸
شکل ٤-٧ تعیین دمای بهینه اتصال بین آغازگرها و رشته الگو. ۶۹
شکل ٤-٨ نتیجه برش قطعه خاموشی ژن T6ODM از روی ژل ۷۰
شکل ٤-٩ نتیجه کلونی- PCR برای تایید همسانه‌سازی قطعه خاموشی ژن در باکتری E.coli ۷۰
شکل ٤-١٠ نتیجه تایید همسانه‌سازی قطعه خاموشی ژن در باکتری E.coli. ۷۱
شکل ٤-١١ هم **ردیف‌سازی** قطعه خاموشی همسانه‌سازی شده با قطعه متناظرش از ژن T6ODM.. ۷۲
شکل ٤-١٢ برش ناقل کلون pTZ57R/T و ناقل خاموشی pGSA1285 باAscI..... ۷۳
شکل ٤-١٣کلونی PCR برای تایید همسانه‌سازی قطعه سنس در ناقل PGSA1285..... ۷۳
شکل ٤-١٤ تایید همسانه‌سازی قطعه سنس در ناقل pGSA1285. ..... ۷۴
شکل ٤-١٥- برش ناقل TA حامل قطعه خاموشی و همچنین ناقل pGSA1285 حامل قطعه سنس .. ۷۵
شکل ٤-١٦ تایید همسانه‌سازی سازه خاموشی. ۷۵
شکل ٤-١٧ تایید انتقال سازه خاموشی به اگروباکتری توسط هضم آنزیمی ۷۶
شکل ٤-١٨ توالی سازه خاموشی همسانه‌سازی شده. ۷۷
شکل ٤-١٩ برش ناقل TA حامل قطعه خاموشی و همچنین ناقل TRV توسط آنزیمهای Sma1 ..... ۷۸
شکل ٤-٢٠ کلونی PCR برای تایید همسانه‌سازی قطعه سنس در ناقل TRV. ۷۸
شکل ٤-٢١ تایید همسانه‌سازی قطعه سنس در ناقل TRV. ۷۹
شکل ٤-٢٢ واکنش کلونی- PCR. ۸۰
شکل ٤-٢٣ نتیجه تکثیر ژن CP ناقل TRV جهت گزینش گیاهان تراریخت. ۸۱
شکل-٤-٢٤ آزمایش نیمه کمی برای انتخاب گیاهان با کمترین بیان ژن ۸۱
شکل ٤-٢٥ نتیجه آنالیز Real time توسط تابش فلورسنت به نمونه‌های مورد بررسی..... ۸۲

شکل٤-٢٦ نتیجه تکثیر محصولات Real time PCR برای ژن هدف ۸۲
شکل ٤-٢٧ نتیجه تکثیر محصولات Real time PCR برای ژن ELF1..... ۸۳

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول۳-۱ آغازگرهای تکثیر cDNA ژن T6ODM ۲۸
جدول ۳-۲ مواد مورد نیاز جهت ساخت cDNA..... ۲۹
جدول ۳ -۳ اجزای واکنش PCR برای تکثیر cDNA ۳۰
جدول۳-٤ چرخه دمایی واکنش PCR برای تکثیر cDNA ژن T6ODM ۳۰
جدول ۳-۵ مواد مورد نیاز جهت الحاق cDNA ژن T6ODM در ناقل TA ۳۱
جدول ۳-٦ غلظت‌های مورد استفاده از آنتی بیوتیک‌ها وسوبسترا و القاگر مورد استفاده ۳۴
جدول ۳-۷ توالی آغازگرهای تکثیر قطعه خاموشی ژن T6ODM..... ۳۵
جدول ۳-۸ مخلوط واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم AscI و SwaI..... ۳۹
جدول ۳-۹ مخلوط اتصال قطعه خاموشی و pGSA1285..... ۴۰
جدول ۳-۱۰ واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم SacI و BamHI..... ۴۱
جدول ۳-۱۱ واکنش کلونی PCR برای تایید الحاق قطعه سنس در E.coli ۴۲
جدول ۳-۱۲ واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم SpeI و BamHI ۴۳
جدول ۳-۱۳ واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم BamHI و HindIII..... ۴۴
جدول ۳-۱٤ واکنش هضم آنزیمی با آنزیم AscI ۴۵
جدول ۳-۱۵ مخلوط واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم SmaI وEcoRI..... ۴۸
جدول ۳-۱٦ مخلوط اتصال ناقل‌های TRV2 و pTZ57R/T..... ۴۹
جدول ۳- ۱۷ آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه‌ای از ژن T6ODM در آنالیز Real time ۵۲
جدول ۳- ۱۸ توالی آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه‌ای از ژن ELF1..... ۵۳

جدول ۳-۱۹ توالی آغازگر برای تکثیر قطعه‌ای از ژن CP جهت واکنش RT-PCR ۵۳
جدول ۳-۲۰ لیست تیمارهای انجام شده در بهینه‌سازی انتقال ژن ۵۷
جدول٤-۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه ۸۴
جدول ٤-۲- نتایج مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه به روش دانکن ۸۶

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار٤-۱- مقایسه میانگین در صد بیان گیاهان انتخابی با میانگین در صد بیان گیاهان شاهد.....۸۳

فصل اول

مقدمه

۱-مقدمه

شاید مصرف گیاهان دارویی به قدمت حضور انسان بر روی کره‌ی خاک باشد. تقریبا در تمام اقوام و قبایل، انسان‌ها از گیاهانی که در طبیعت اطراف آن‌ها می روئیده بهره می‌گرفته‌اند. تخمین زده شده است که ۷۰ تا ۸۰ درصد مردم جهان عمدتاً داروهای گیاهی جهت حفظ سلامتی‌شان استفاده می کنند. تقاضای جهانی برای گیاهان دارویی دائما در حال افزایش است (افکار و کریم زاده، ۱۳۸۸).

خشخاش، شقایق یا کوکنار متعلق به خانواده کوکناریان می باشد. این گیاه به واسطه مواد موثره مورفین استفاده‌های داروئی ارزشمندی پیدا کرده است (کیانمهر، ۱۳۸۷). این گیاه با نام علمی *papaver somniferum* یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است و امروزه به عنوان منبع تجاری مسکنهای مورفین و کودئین است. همراه با این دو مسکن، شقایق تقریبا هشتاد آلکالوئید متعلق به خانواده تتراهیدروبنزوایزوکوئینولین را تولید می کند (Weid *et al*., 2004).

آلکالوئیدها یکی از بزرگترین گروه‌های فراورده‌های طبیعی هستند و به طور کلی از طریق مجموعه ای از مسیرها تولید می شوند. در واقع آلکالوئیدها گروه متنوعی از ترکیبات نیتروژن دار با وزن کم هستند که اکثرا از آمینو اسیدها مشتق شده اند و تقریبا در ۲۰ درصد از گونه‌های گیاهی یافت می شوند. آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینلین برای رشد و توسعه طبیعی گیاه ضروری نیستند اما به نظر می رسد که یک نقش دفاعی در حفاظت گیاهان در مقابل گیاه خواران و عوامل بیماری‌زا بازی می کنند (Facchini and Benoit, 2005).

خاصیت دارویی کودئین و مورفین به عنوان مسکن و ضد سرفه، سانگوایناربن و بربرین به عنوان آنتی‌بیوتیک با خاصیت ضد میکروبی و ضد التهابی، نوسکاپین‌ها با خاصیت ضدسرفه و ضد توموری، پاپاورین به عنوان گشاد کننده رگ‌ها به اثبات رسیده است (Lee and Facchini, 2010).

به غیر از پروتوپین، کریپتوپین وتبائین، هیچ یک از آلکالوییدهای شقایق در هیچ جنس گیاهی به جز Papaver وجود ندارد (یزدانی، ۱۳۸۱). کشت قانونی این گیاه به عنوان تنها منبع تجاری برای چندین ترکیب دارویی، شامل مورفین، کودئین و مشتقات نیمه مصنوعی مانند اکسی کدون می باشد. اما در

مقابل، کشت وسیع غیرقانونی این گیاه برای تولید هروئین (O,O-diacetylmorphine) باعث ایجاد اثرات عمیق و منفی جهانی شده است (Hagel and Facchini, 2010). سنتز شیمیایی اکثر این آلکالوئیدها امکانپذیر است، اما از نظر تجاری باصرفه نیست و راه حل تولید کشت سلولی در همه موارد نشدنی است. از آنجایی‌که تجمع آلکالوئیدها مخصوص بافت است، فقط آلکالوئیدهای انتخاب شده‌ای می توانند در کشت‌های سلولی تولید و انباشته شوند. کالوس‌های متمایز نشده گیاه شقایق بنزوفنانتریدین‌هایی مانند سنگوینارین را تولید می کنند، اما مسکن‌های مهم دارویی را نمی‌توانند تولید کنند (Kempe *et al*., 2009).

در روش مهندسی متابولیت می‌توان با وارد نمودن ژن مربوط به آنزیم‌های کلیدی و قرار دادن آن‌ها در کنار پیش برنده‌های قوی، بیان ژن را افزایش داد. از طرف دیگر با استفاده از روش‌های خاموشی ژن از طریق بکارگیری توالی‌های آنتی سنس با تداخل RNA، این امکان وجود دارد تا از طریق مهار تولید این آنزیم‌ها، راه متابولیکی را به سمت محصول مورد نظر نشانه گیری کرد (حسینی وهمکاران، ۱۳۸۷).

تغییرات تراریختی یک فرصت جدیدی برای تغییر محتوای متابولیت‌های ثانویه شامل ترکیبات دارویی، عناصر غذایی و مواد شیمیایی محافظ گیاه می‌باشد. مهندسی متابولیک در صدد تغییر در مقدار یا ساختار شیمیایی متابولیت‌های خاصی می‌باشد، برای مثال از طریق تغییرات در فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی یا پروتئین‌های تنظیم کننده مسئول بیان ژن‌های مسیر، یا معرفی فعالیت آنزیم‌های جدید می‌تواند عمل کند (Chitty *et al*., 2003).

فن تداخل RNA (RNAi)[1]یک فرایند خاموشی ژن است که در هضم نسخه‌ها یا جلوگیری از سنتز پروتئین برای تنظیم بیان ژن، کنترل توسعه و دفاع در مقابل هجوم اسید نوکلئیک‌هایی مانند ویروس‌ها ،ترانسپوزون‌ها یا ترانسژن‌ها درگیر است.

RNAi می‌تواند به عنوان یک وسیله قوی در مهندسی ژنتیک در محصولات گیاهی بدون الحاق پروتئین جدید بیان ژن را تغییر دهد و محصولاتی با ویژگی‌ها وکیفیت بهتر مانند کاهش توکسین، حذف ترکیبات آلرژی زا، افزایش ارزش غذایی، تحمل نسبت به تنش های زنده و غیر زنده را تولید کند که ممکن است با این روش فنوتیپ‌های قابل توارث و پایداری ایجاد شود (Baykal and Zhang, 2010).

ژن T6ODM (Thebaine-6-O Demetylase) در انتهای مسیر بیوسنتزی آلکالوییدها واقع شده است که تبائین را در موقعیت ٦ دمتیله کرده و به نئوپینون تبدیل می کند، سپس این ماده طی یک واکنش خودبخودی به کدوئینون تبدیل می‌شود، در مسیر دیگری T6ODM اوریپاوین را دمتیله کرده و به مورفینون تبدیل می‌کند، این دو ترکیب در محلول‌های آبی ناپایدارند و طی واکنش‌های آنزیمی به ترتیب به کدوئین و مورفین تبدیل می‌شوند (Facchini and Hagel, 2010).

در کار حاضر ابتدا سازه‌های خاموشی ژن با روش RNAi طراحی و ساخته شد و سپس به دو روش ترانسفورماسیون دائم و موقت به ریز نمونه‌ها و برگ گیاه هدف منتقل گردید. جهت بررسی میزان بیان ژن مربوطه از واکنش سنجش کمی Real time quantitative PCR استفاده گردید.

[1]- RNA interference

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۲- کلیات و بررسی منابع

۲-۱ گیاه شناسی

خانواده papaveraceae دارای شش جنس می‌باشد که عبارتند از: Meconopsis, papaver chelidonium, Glaucium, Roemeria و Hypecoum می باشد. جنس پاپاور در ایران حداقل ۲۸ گونه گیاهی یک ساله تا چند ساله دارد (مظفریان، ۱۳۷۵). شقایق گیاهی است یک ساله، به ارتفاع ۵/. تا ۲ متر، با ریشه‌های سطحی، ساقه سبز، قائم و بی کرک که از ماده مومی پوشیده شده است. برگ‌ها منفرد، متناوب با رنگ سبز غبار آلود و دارای تقسیمات عمیق دندانه دار که در برگ‌های فوقانی این بریدگی عمیق‌تر و نا منظم‌تر است (علوی، ۱۳۵۳). گل‌ها درشت و بسته به واریته آن به رنگ‌های سفید یا قرمز مایل به بنفش دیده می‌شوند. میوه کپسول کم و بیش کروی یا گویچه‌ای که در قاعده مدور دارای پایک کوتاه به ابعاد ۵-٤ × ۷-۵ سانتی متر می‌باشد (Cullen, 1966). این جنس شامل ۹۹ و یا تعداد بیشتری گونه است که همگی دارای سلول‌ها یا مجراهایی هستند که حاوی شیره شیری رنگی می باشند(Bernat and Tetenyi, 1981). شیرابه مذکور حاوی ۱۰ تا ۱۵ درصد آب، ۲۰ درصد مواد قندی و همچنین مقداری اسیدهای آلی نظیر اسید لاکتیک، اسید فوماریک و اسید اگزالواستیک می‌باشد. شیرابه مذکور همچنین حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد آلکالوئید است (امیدبیگی، ۱۳۷٦). این گیاه بومی اروپای جنوب شرقی و غرب آسیا می‌باشد (Thetnyi, 1997).

۲-۲ متابولیت های ثانویه

گیاهان بخش مهمی از وعده غذایی هر روز ما را تشکیل می‌دهند و اجزا سازنده گیاه و ارزش تغذیه-ای آن‌ها برای چندین دهه به شدت مطالعه شده است. گیاهان علاوه بر تولید متابولیت‌های اولیه ضروری (کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و آمینو اسیدها) قادرند که طیف وسیعی از ترکیبات با وزن مولکولی پائین به نام متابولیت‌های ثانویه را تولید کنند. متابولیت‌های ثانویه گیاهان یک اصطلاح کلی است که