تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل
دانشکده کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد
در رشته بیوتکنولوژی

تاثیر تشدید بیان ژن TYDC جهت افزایش تولید آلکالوئیدهای دارویی خشخاش

اساتید راهنما:
دکتر محمود سلوکی
دکتر منصور امیدی

اساتید مشاور:
مهندس نفیسه مهدی‌نژاد
دکتر هوشنگ علیزاده

تهیه و تدوین:
فرزانه کوهزادی

پاییز ۸۸

بسم الله الرحمن الرحیم

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

همسر فداکارم محمد

دختر صبورم مارال

سپاسگزاری

لازم می‌دانم از عزیزانی که در انجام این پایان نامه مرا یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

از جناب آقایان دکتر محمود سلوکی و دکتر منصور امیدی، استادان راهنمای این پایان نامه که در عرصه علم و نیز راهنمایی برای انجام این تحقیق از هیچ گلی مضایقه ننمودند کمال قدردانی دارم هرچند تشکر از زحمات این بزرگواران در قالب سخن نمی گنجد. از جناب آقای دکتر هوشنگ علیزاده و خانم مهندس مهدی نژاد که مشاور بنده در این پژوهش بودند کمال تشکر را دارم. از کمک-های ارزشمند، آقایان مهندس مصطفی پیرسیدی، مهندس روح الله براهیمی، مهندس مهدی شریفی، دکتر مسعود توحیدفر، مهندس علیرضا اطمینان، مهندس مهدی شفیعی، مهندس امیرزارع و خانم مهندس اولادزادگه در طول سالهای تحصیل و نیز انجام این پژوهش راه گشای من بوده اند سپاسگزاری می نمایم. همچنین از مسئولین پژوهشکده گیاهان دارویی به خصوص جناب دکتر شمعلی رضازاده، که مواد و امکانات این پایان نامه را در اختیارم قرار دادند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

همراهی و همکاری تمام این عزیزان را همواره به خاطر خواهم داشت و ضمن قدردانی از آنها، موفقیت و سلامتی را برایشان آرزومندم.

چکیده

گیاهان خانواده *Papaveraceae* به واسطه تولید آلکالوئیدهای با ارزش و پرمصرف از جمله مورفین، کدئین، تبائین، نوسکاپین، پاپاورین و سنگوئینارین دارای اهمیت تجاری خاصی در صنایع دارویی می-باشند. ژن L–تیروزین دکربوکسیلاز (TYDC)، نقطه شروع مسیر سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین در خشخاش می باشد و واکنشی را کاتالیز می‌کند که منجر به تولید تیرامین از تیروزین می‌شود و بعد از حداقل ۱۷ مرحله آنزیمی دیگر، حلقه بنزنی با تغییرات بعدی به کدئین و مورفین تبدیل می‌شود. هدف از این تحقیق، بررسی اثر تشدید بیان ژن TYDC در تجمع آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین و در پی آن، افزایش سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین می‌باشد. برای رسیدن به این هدف سازه نوترکیبpBI121-TK با کلون سازی ژن تیروزین دکربوکسیلاز حاوی توالی کوزاک در محل ژنGus در پلاسمید pBI121 تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر Nos ساخته‌شد و نتایج کلونینگ این ژن با استفاده از روشهای مختلف مولکولی، هضم آنزیمی، PCR و آزمون هیستوشیمیایی Gus تایید گردید. نتایج HPLC گیاهان ترنسژنیک به روش اگروباکتریوم نشان داد که مقدار آلکالوئیدهای موجود در این گیاهان به مراتب بیشتر از گیاهان غیر ترنسژنیک بود.

کلمات کلیدی: آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین، تیروزین دکربوکسیلاز (TYDC)، اگروباکتریوم، **تشدید بیان ژن، خشخاش.**

فهرست مطالب

عنوان .....صفحه

فصل اول: مقدمه ۲
فصل دوم: مرور منابع ۵
۱-۲- کلیات ٦
۲-۲- خواص دارویی خشخاش ٦
۳-۲- متابولیت‌های ثانویه ۷
٤-۲- آلکالوئیدها ۸
۵-۲- نقش TYDC در چرخه سنتز مورفین ۱۱
٦-۲- استراتژی‌های بیان در گیاه ۱٦
۷-۲- مزیت بیان گذرای ژن در گیاه ۱۷
۸-۲- اگروباکتریوم ۱۸
۹-۲- ژن گزارشگر ۱۹
۱۰-۲- ژن گزارشگر Gus ۲۰
فصل سوم : مواد و روش‌ها ۲۱
۱-۳- کلیات ۲۲
۲-۳- کلون کردن ژن TYDC درون ناقل pGEM T-Easy Vector ۲۲
۱-۲-۳- استخراج DNA ژنومی از گیاه خشخاش ۲۲
۱-۱-۲-۳- ضد عفونی بذرخشخاش ۲۲
۲-۱-۲-۳- کشت بذر خشخاش ۲۳
۳-۱-۲-۳- استخراج DNA ژنومی به روش CTAB ۲۳
٤-۱-۲-۳- بررسی کیفی DNA استخراج شده ۲٤
۵-۱-۲-۳- محلول اتیدیوم بروماید ۲۵
۲-۲-۳- طراحی پرایمر ۲۵
۳-۲-۳- تکثیر ژن TYDC به وسیله واکنش PCR ۲۷
۱-۳-۲-۳- بهینه کردن شرایط واکنش PCR ۲۷

۲-۳-۲-۳- جداسازی قطعه تکثیر شده با pfu از روی ژل آگارز ۲۷
۳-۳-۲-۳- اتصال نوکلئوتید A به دو انتهای '۳ ..... ۲۸
٤-۲-۳- کلون کردن ژن TYDC درون ناقل ۲۹
٤-۲-۳- ترانسفورم کردن باکتری Escherichia coli سویه DH5α ۳۰
۱-٤-۲-۳- تهیه سلول های مستعد (Competent cell) ۳۱
۱-۱-٤-۲-۳- آنتی بیوتیک ها ۳۲
۲-۱-٤-۲-۳- ذخیره سازی و نگهداری باکتری ها ۳٤
۲-٤-۲-۳- استخراج پلاسمید از کلونی های نوترکیب ۳٤
۳-٤-۲-۳- تایید وجود ژن در پلاسمید ۳۵
۳-۳- ساخت ناقل کلونینگPTZ57R/T-TK ۳٦
۱-۳-۳- طراحی جفت پرایمر دوم ۳٦
۲-۳-۳- تکثیر ژن TYDC به همراه جفت پرایمر دوم ۳۷
۳-۳-۳- تایید وجود ژن در پلاسمید ۳۷
٤-۳- ساخت سازه ژنی pBI121-TK ۳۸
۱-٤-۳- آماده سازی ناقل گیاهی pBI121 ..... ۳۸
۲-٤-۳- آماده سازی ژن TYDC ۳۹
۳-٤-۳- اتصال ژن TKو ناقل گیاهی pBI121 ..... ۳۹
٤-٤-۳- وارد کردن سازه ساخته شده به باکتری E.coli ٤۰
۵-٤-۳- آزمون صحت سازه ساخته شده ٤۰
٦-٤-۳- وارد کردن سازه ساخته شده به باکتری جهت انتقال به گیاه ٤۱
۵-۳- آزمون هیستوشیمیایی Gus ٤۲
۱-۵-۳- اگروباکتریوم سازهpBI121-Gus به خشخاش ٤۲
۲-۵-۳- رنگ آمیزی ژن Gus ٤۳
۱-۲-۵-۳- طرز تهیه بافر فسفات ٤٤
۲-۲-۵-۳- روش تهیه محیط کشت گیاهی پایه MS ٤۵
٦-۳- اگروباکتریوم سازه pBI121-TK به خشخاش ٤۷
۷-۳- آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت ٤۸
۱-۷-۳- آزمون طیف سنجی HPLC ٤۸

۲-۷-۳- استخراج DNA ژنومی از گیاه خشخاش تراریخت ٤٩
فصل چهارم: نتایج و بحث ٥٠
٤-١- استخراج DNA ژنومی از گیاه ٥١
٤-٢- بهینه کردن شرایط واکنشPCR ٥٢
٤-٣- نتایج تکثیر ژن TYDCبه وسیله واکنش PCR ٥٣
٤-٤- نتایج تایید وجود ژن در پلاسمید pGEM T-Easy Vector ٥٤
٤-٥- نتایج ساخت ناقل کلونینگ PTZ57R/T-TK ٥٥
٤-٥-١- طراحی جفت پرایمر دوم ٥٥
٤-٥-٢- لحاق توالی KOZAK به ژن TYDC ٥٦
٤-٦- ساخت سازه pBI121-TK ٥٧
٤-٦-١- جداسازی ژن Gus از پلاسمید pBI121 ..... ٥٧
٤-٦-٢- خارج کردن ژن TK از پلاسمید PTZ57R/T ٥٨
٤-٦-٣- آزمون صحت سازه ساخته شدهpBI121-TK ٥٨
٤-٧- بیان موقت ژن Gus در خشخاش ٦٠
٤-٧-١- بتاگلوکورونیداز(Gus) ٦٠
٤-٧-٢- بررسی مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی ٦٢
٤-٧-٣- نتایج حاصل از GC-Mas و HPLC در نمونه ها ٦٣
٤-٨- بحث ٦٥
٤-٩- پیشنهادات ٧١
فهرست منابع ٧٢

فهرست شکل ها

شکل۱-۲- طبقه بندی آلکالوئیدها ٩
شکل۲-۲- مسیر اسید شیکیمیک در سنتز اسیدهای آمینه آروماتیک ١٢
شکل۳-۲- مسیر سنتز مورفین در گیاه خشخاش ١٦
شکل ۱-۳- توالی ژن TYDC ٢٦
شکل۲-۳- pGEM T-Easy Vector، شرکتpromega ٢٩
شکل۳-۳- pTZ57R/T Easy Vector، شرکتFermentas ٣٧

شکل٤-٣- ناقل گیاهی pBI121 ..... ٣٩
شکل١-٤- DNA استخراج شده روی ژل آگارز ٥١
شکل٢-٤- تکثیر ژن TYDC در واکنش PCR ٥٣
شکل٣-٤- اندازه باندها برای جلوگیری از تکرار آن در تمام شکل‌ها ٥٣
شکل٤-٤- برش پلاسمید pGEM T-Easy Vector با استفاده از آنزیم EcoRI ٥٤
شکل ٥-٤- توالی توافقی کوزاک ٥٥
شکل٦-٤- واکنش PCR از پلاسمید pTZ57R/T-TK با استفاده از جفت پرایمرهای دوم R2,F2 ..... ٥٦
شکل ٧-٤- برش pBII21 با آنزیم‌های SacI و XbaI.می باشد ٥٧
شکل٨-٤- برش pBI121 و pTZ57R/T به طور جداگانه با آنزیم‌های XbaI و SacI ٥٨
شکل٩-٤- تایید از طریق PCR با آغازگرهای F2 و R2 ..... ٥٩
شکل١٠-٤- تایید با واکنش برش توسط آنزیم‌های XbaI و SacI ٥٩
شکل١١-٤- نتایج حاصل از رنگ آمیزی Gus ٦١
شکل١٢-٤-ترایخت سازی نمونه ها توسط پمپ خلا ٦١
شکل ١٣-٤- نگهداری گیاهان اینفیلتره شده در اتاق رشد ٦٢
شکل١٤-٤- PCR توسط پرایمرهای R2 F2 با DNA استخراج شده ازگیاه شاهد و گیاه.....٦٣
شکل١٥-٤- نتایج HPLC مربوط به اگرواینفیلتریزاسیون سازه pBI-TK خشخاش ٦٤
شکل ١٦-٤- مسیر سنتز مورفین از L –تیروزین ٦٦
شکل ١٧-٤- نقش TYDC در سنتز هیدروکسی سینامیک آمیدهای دیواره سلولی. ٦٦
شکل ١٨-٤- خاموش سازی ژن cor مانع تبدیل کدئینون به کدئین ٧٠

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

خشخاش با نام علمی *Papaver somniferum L.* متعلق به خانواده *Papaveraceae* گیاهی است دیپلوئید (۲n=۲۲) علفی و یک ساله که بومی غرب آسیا و جنوب شرقی اروپا می‌باشد تتنی(۱۹۹۷). تاریخچه استفاده از گیاه خشخاش به عنوان گیاه دارویی به بیش از ۳۵۰۰ سال قبل برمی‌گردد. لغت opium اولین بار برای توصیف شیرابه خشخاش در قرن اول قبل از میلاد بکار گرفته شد، لفظ افیون دارای ریشه‌ای یونانی و از کلمه opos به معنی شیرابه گرفته شده است الاحمدی و نسلر(۲۰۰۱). از اواسط قرن شانزدهم خشخاش دارای مصارف پزشکی بی‌شماری گردید خصوصیات داروئی این گیاه مربوط به قابلیت این گیاه در بیوسنتز گروهی از آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین از زیرگروه آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین می‌باشد. بیش از ٤٠ نوع آلکالوئید دارویی مهم در خشخاش شناخته شده است که مهمترین آنها مورفین، کدئین، تبائین، نوسکاپین، پاپاورین و سنگوئینارین می‌باشد دکر و همکاران(۲۰۰۰). به غیر از پروتوپین، کریپتوپین و تبائین، هیچ یک از آلکالوئیدهای خشخاش در هیچ جنس گیاهی به غیر از *Papaver* وجود ندارد. و به غیر از *P. somniferum* تنها در گونهٔ *P. setigerum* مورفین دیده شده است یزدانی و همکاران (۱۳۸۱). در اوائل قرن نوزدهم میلادی (۱۸۰۳) بود که سر تورنر Serturner داروساز آلمانی برای اولین بار آلکالوئید مورفین را از تریاک جدا کرد. قبل از این کشف تنها شیرابه خام آن، که همان تریاک می‌باشد در مصارف پزشکی به کار می‌رفت، در تجسسات بعدی سایر مشتقات آن مانند کدئین (۱۸۳۲) ، نارکوتین، تبائین، پاپاورین (۱۸٤۸) وغیره به دست آمد. گیاهان خانواده *Papaveraceae* به واسطه تولید آلکالوئیدهای با ارزش و پرمصرف در صنایع دارویی، دارای اهمیت

تجاری خاصی هستند بطوریکه سطح زیرکشت آن در دنیا طی سالهای ۲۰۰۰ – ۱۹۹۰ میلادی بالغ بر ۲۸۰/۰۰۰ هکتار بوده است وضعیت سطح زیر کشت و فرآوری این محصول تحت نظارت دفتر کنترل مواد مخدر و پیشگیری از جرایم سازمان ملل متحد (ODCCP)[1] می‌باشد. در دهه اخیر کشورهای مختلف و بخصوص اروپایی، سرمایه‌گذاری بزرگی بر روی جنبه‌های مختلف زراعت، فرآوری و کنترل قاچاق مشتقات خشخاش انجام دادند به طوریکه در برخی کشورها تولید تریاک غدغن شد و به جای آن عصاره تغلیظ شده پوسته خشک کپسول خشخاش که اصطلاحا CPS[2] نامیده می‌شود، به منظور تهیه آلکالوئیدهای مورد نیاز صنایع دارویی مورد استفاده قرار گرفت (فیست، ۲۰۰۱). سو استفاده غیرقانونی و قاچاق مواد مخدر در این روش بسیار مشکل تر از تریاک است. بیش از ۹۰ درصد خشخاش تولید شده در جهان به تولید غیرقانونی هروئین اختصاص می‌یابد، هروئین طی واکنش داستیلاسیون از مورفین سنتز می‌شود (کوتکان،۱۹۹۳) .

با توجه به تقاضای قانونی مورفین در صنعت داروسازی جهان و جایگاه با ارزش این گیاه در صنایع دارویی و همچنین توجه به این نکته که اغلب الکالوئیدهای خشخاش در هیچ جنس گیاهی به غیر از *Papaver* وجود ندارد وهمچنین از آنجایی که سنتز شیمیایی این ترکیبات ارزشمند به دلیل ساختار پیچیده شیمیایی شان بسیار سخت است و گیاهان وحشی یا اهلی تنها منبع تأمین کننده این ترکیبات هستند، اهمیت این گیاه را به عنوان تنها منبع تجاری تأمین کننده آلکالوئیدهای گروه مورفین (مورفین، تبایین، کدیین، نارکوتین وغیره) روشن می‌کند. طبق آمارهای موجود سطح زیر کشت خشخاش از سال۱۹۹۱ در دنیا در حال افزایش است در نتیجه افزایش ارزش انرژی و نیروی کار از یک سو و لزوم کنترل دقیق مزارع کشت این گیاه به جهت جلوگیری از سوء استفاده و قاچاق آن از سوی دیگر محققین

[1] . Office for Drug control and crime prevention
[2] . concentrate of popy straw

کشورهای مختلف دنیا را به این فکر واداشت تا ضمن استحصال مستقیم آلکالوئیدها از کپسول خشک به صورت CPS با تکنیک‌های اصلاح گیاه و مهندسی ژنتیک درصدد یافتن ارقامی با راندمان بالای تولید آلکالوییید در واحد سطح باشند. به همین دلیل کشت خشخاش به منظور تولید تجاری مورفین و کدئین و دیگر آلکالوئیدهای دارویی آن از چشم اندازهای مهم محققان در نقاط مختلف دنیا می‌باشد تا ضمن کاهش سطح زیر کشت و کاهش هزینه و نیروی انسانی کمتر، محصول بیشتری تولید کنند. امروزه با بکارگیری انتقال ژن و متدهای مشابه آن ، تولید گیاهان تراریخت با برتری‌های متعدد از جمله در خصوصیات مربوط به رشد، عملکرد، کیفیت غذایی بالاتر، مقاومت به بیماری‌ها وآفات و علف کش‌ها امکان پذیر شده است دویس و شویین(۲۰۰۳). در این میان یکی از کاربردهای مهم انتقال ژن بالا بردن قابلیت تولید یک فرآورده مفید و با ارزش شیمیایی یا دارویی در صنایع داروسازی می‌باشد (دلوکا و اس تی پییر، ۲۰۰۰). محققین امیدوارند با استفاده از این فن آوری و دست کاری مسیرهایی که منجر به سنتز مورفین می شود میزان تولید آلکالوئید های گروه مورفین را افزایش دهند. در این تحقیق ما قصد داریم نقش افزایش بیان ژن TYDC که اسید آمینه آروماتیک تیروزین را دکربوکسیله و به سمت سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین در خشخاش هدایت می‌کند، در میزان افزایش آلکالوئیدهای خشخاش بررسی کنیم.

فصل دوم

مرور منابع

۱-۲- کلیات

تا کنون مطالعات زیادی بر روی گیاه خشخاش در زمینه‌های مختلف انجام شده‌است، بررسی خواص داروئی خشخاش، متابولیت‌های ثانویه موجود در آن، آلکالوئیدها و مسیر سنتز آنها، اصلاح کلاسیک و مهندسی ژنتیک به منظور افزایش راندمان تولید آلکالوئیدهای گروه مورفین، نقشElicitor ها درافزایش آلکالوئیدهای خشخاش از جمله مطالعاتی است که بر روی این گیاه انجام شده‌است.

۲-۲ خواص داروئی خشخاش

به طور کلی از خشخاش و مشتقات بدست آمده از آن در صنعت داروسازی در ساخت داروهای شل کننده ماهیچه، آرام‌بخش‌ها، تسکین‌دهده‌های درد و روان‌گردان‌ها و بعضی از آنتی بیوتیک ها استفاده می‌شود (سیمون و همکاران،۲۰۰۷).

مورفین و کدئین تسکین دهنده درد هستند و باعث کاهش احساس درد، اثر خواب آلودگی، انقباض عدسی چشم و رفلکس سرفه می‌گردند و به صورت گسترده‌ای در کلینیک‌ها برای کاهش دردهای مزمن به صورت وریدی و یا عضلانی استفاده می‌شوند (جف و مارتین، ۱۹۹۰)، سنگوئینارین نوعی آنتی بیوتیک است که دارای خاصیت ضدمیکروبی و ضدالتهابی می‌باشد. نوسکاپین‌ها خاصیت ضدسرفه و ضد توموری دارند، پاپاورین به عنوان گشاد کننده رگها و توبوکورارین به عنوان شل کننده عضلات کاربرد دارند. اس- رتیکولین سوبسترای بالقوه در تولید ترکیبات متفاوت با خواص ضد مالاریایی و ضدسرطانی و همچنین محرک رشد مو می‌باشد. اتورفین یک مسکن خیلی قوی است که در دامپزشکی استفاده می-شود (استفانو و همکاران، ۲۰۰٤). علاوه بر موارد ذکر شده گروهی از داروهای نیمه سنتتیک از

آلکالوئیدهای خشخاش ساخته شده است، داروهای نیمه سنتتیک کـه در صـنعت داروسـازی از مـورفین مشتق شده‌اند هیدرومورفین، دیامورفین (هوبین) و اکسی مورفین مـی‌باشـند. کـدئین، دی‌هیدروکـدیین و نالورفین به دلیل داشتن اثرات تسکینی ملایم، در تسکین دردهای با شدت متوسط کاربرد دارند و بیشتر به عنوان یک ضد سرفه در بسیاری از فرآورده‌های ضدسرفه به کار می‌روند، البته ترکیبـات دیگـر مثـل فـل کدیین، اتیل مورفین و هیدروکدون و اکسی‌کدون نیز خواص ضد سرفه دارند. آنتاگونیست‌های نارکوتیک مثل نالوکسون در درمان نارسایی تنفسی ناشی از مسمومیت کاربرد دارند. مورفین تعدادی از عملکردهای عصبی را متوقف، اما تعدادی دیگر را تحریک می‌کند. به طور کلی نحوه اثر ایـن مـسکن‌هـای نارکوتیـک اینست که به صورت مستقیم روی گیرنده‌های مغزی اثر می‌کنند (جف و مارتین، ۱۹۹۰).

۳-۲- متابولیت‌های ثانویه

مجموعه تمام فرآیندهای شیمیایی که در یک موجود زنده به وقوع می‌پیوندد متابولیسم یا سوخت و ساز نامیده می‌شود. متابولیسم اصطلاحی یونانی به مفهوم تغییر است که فرآیندی بسیار پویا می‌باشد به طوریکه ترکیب یک سلول در هر زمانی توازن بین سنتز و تجزیه را نشان می‌دهد. قسمت عمده کربن و انرژی که در گیاه جذب و تحلیل می‌شود طی فرآیندهای شیمیایی به متابولیت‌های اولیه یعنی قندها، چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک تبدیل می‌شود. مهمترین خصوصیات این گروه اینست که این ترکیبات در تمام سلول-ها وجود دارند. اما در این میان در بسیاری از گیاهان قسمت قابل توجهی از کربن و انرژی که اسمیلت (جذب و تحلیل) می‌شود به سنتز موادی اختصاص می‌یابد که ممکن است نقش آشکاری در رشد و نمو نداشته باشند، این مولکولها به متابولیت‌های ثانویه معروف‌اند. به عبارتی دقیق‌تر، متابولیت‌های ثانویه بخشی از ساختمان مولکولی پایه سلول نیستند یعنی این ترکیبات در صورت وجود، معمولاً در بافت‌ها یا اندام‌های خاص، یا در مراحل بخصوص از نمو یافت می‌شوند و همچنین

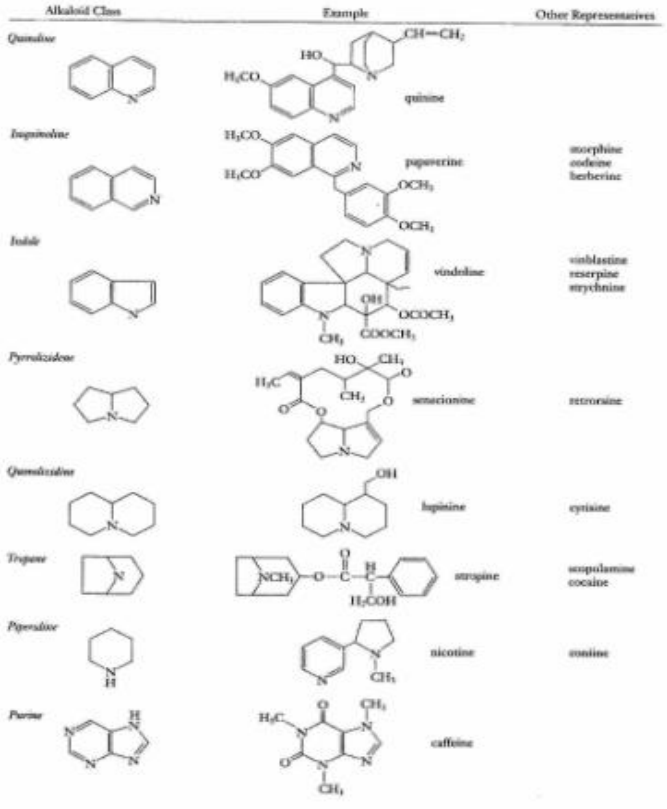
تولید آنها ممکن است فقط به جنس یا حتی گونهٔ خاصی از گیاهان محدود باشد. متابولیت‌های ثانویه به چهار گروه عمده تقسیم می‌شود که عبارتند از: ۱- ترپن‌ها ۲- ترکیبات فنولی ۳- ساپونین‌ها و گلی‌کوزیدها و گلوکوزینولات‌ها ٤- آلکالوئیدها.

متابولیت‌های ثانویه در فرآورده‌های صنعتی کاربرد فراوانی دارند و در ساخت دارو، صابون، اسانس، رنگ‌ها، صمغ‌ها، رزین، کائوچو، چاشنی غذا ونوشیدنی و غیره بکار می‌روند و در خود گیاه نیز دارای وظایف مهمی مانند هورمون‌ها وتنظیم کننده‌های رشد، رفع آلودگی میکروبی، دور کردن علف‌خواران و حشرات (به این واسطه موجب کاهش خسارت حیوانات و حشرات می‌شوند)و همچنین جذب عوامل گرده‌افشان از دیگر خصوصیات متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. گیاه خشخاش از جمله گیاهانی است که حاوی متابولیت‌های ثانویه بسیاری می‌باشد، اکثر آنها از گروه آلکالوئیدهااند و خواص داروئی و درمانی چشمگیری دارند و بیش از ٤٠ آلکالوئید مهم در آن شناسایی شده‌است.

۴-۲- آلکالوئیدها

محققین برای سهولت مطالعه، متابولیت‌های ثانویه را غالبا به چهار گروه عمده تقسیم می‌کنند که یکی از این گروهها، آلکالوئیدها می‌باشند. یکی از خواص عمومی آلکالوئیدها اینست که حداقل یک اتم نیتروژن در ساختمان شیمیایی آنها وجود دارد و عمدتاً هتروسیکلیک‌اند. آلکالوئیدها در دزهای پائین ارزش درمانی دارند و از دوران قبل از تاریخ تا به امروز، برای اهداف مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند و در ۲۰ درصد گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند. برخلاف ترپنوئیدها و فنول‌ها، آلکالوئیدها دستهٔ وسیعی از مولکولها هستند که از لحاظ ساختمان شیمیایی نا متجانس و غیرمرتبط با هم می‌باشند به طوری که طبقه بندی آنها مشکل می‌باشد و عموماً براساس سیستم حلقوی غالب موجود در مولکول طبقه‌بندی می‌شوند شکل۱-۲ در این طبقه بندی آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین اهمیت دارویی چشمگیری دارند به

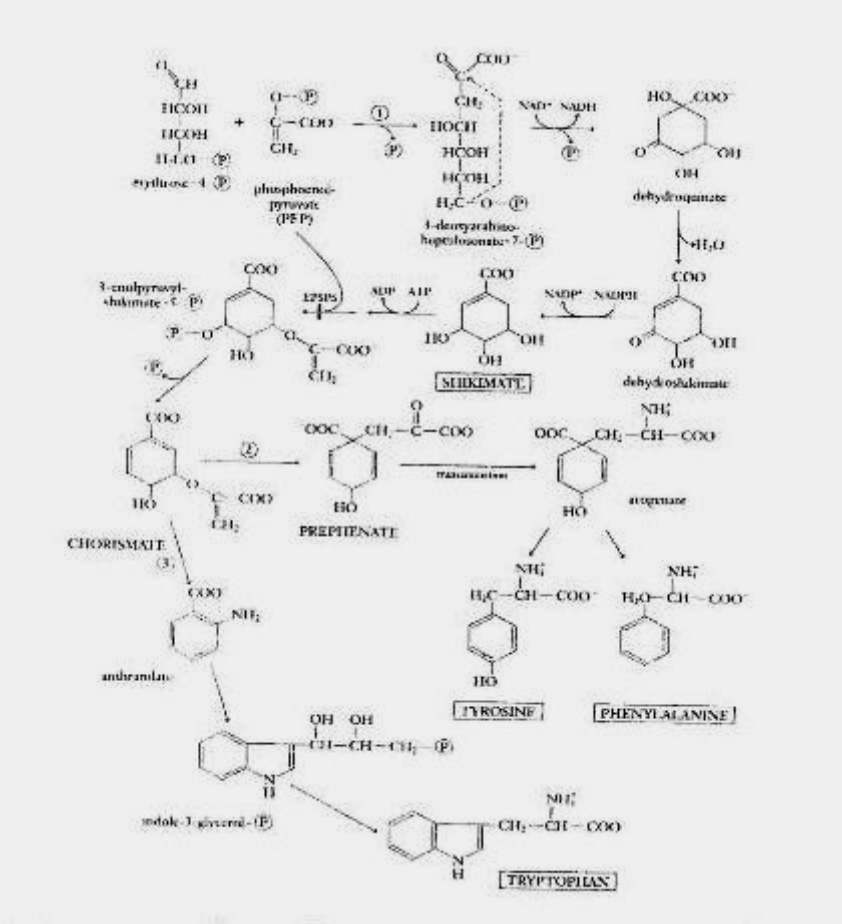
طوریکه از حدود ۲۹ آلکالوئیدی که بصورت خالص در صنعت داروسازی غرب استفاده می‌شود، ٦ تای آن از نوع آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین است که شامل مورفین، کدئین، تبائین، نوسکاپین، پاپاورین و سنگوئینارین می‌باشد (فاچینی و بیرد، ۱۹۹۸). بیش از ۱۰۰۰۰ آلکالوئید طبیعی شناخته شده‌است، آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین بزرگترین و متنوع‌ترین گروه‌اند که تنها در پنج خانواده گیاهی *Berberiaceae*، *Fumariaceae*، *Menispermaceae*، *Papaveraceae* و *Ranunculaceae* یافت شده‌است. اهمیت گیاهان خانواده خشخاش به واسطه تولید آلکالوئیدهای گروه مورفین می‌باشد. الکالوئیدهای گروه مورفین از گروه آلکالوئیدهای بنزوفنانترن است که زیر گروه آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین می‌باشد. بعد از کشف ساختار شیمیایی مورفین در سال ۱۸۰٦ تا به امروز بیش از ۲۵۰۰ عدد از مشتقات آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین در خشخاش شناسایی شده‌است (فاچینی و پارک، ۲۰۰۳)؛ (فاچینی و بیرد، ۱۹۹۸).



شکل۱-۲- طبقه بندی آلکالوئیدها

مطالعات انجام شده بر روی مسیر بیوسنتز آلکائیدها نشان داده است که بیوسنتز بسیاری از ترکیبات آلکالوئیدی و فنولی با اسید آمینه‌های آروماتیک فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان شروع می‌شود این اسید آمینه‌های آروماتیک نیز، در اثر یک رشته از واکنش‌های متوالی که به مسیر اسید شیکیمیک معروف است، از فسفو انول پیرووات و اریتروز-٤- فسفات سنتز می‌شوند شکل۲-۲ مسیر اسید شیکیمیک در باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان عمومیت دارد، اما در حیوانات دیده نمی‌شود. بنابراین فنیل آلانین و تریپتوفان در بین ۱۰ اسید آمینه ضروری در جانوران از جمله انسان دسته‌بندی می‌شوند و منبع اصلی تمام مولکولهای آروماتیک در حیوانات‌اند (گیلت و همکاران، ۲۰۰۰). البته با وجودی که تیروزین جزء اسیدهای آمینه غیرضروری دسته‌بندی می‌شود در واقع تیروزین در جانوران در اثر هیدروکسیداسیون اسید آمینه ضروری فنیل آلانین سنتز می‌شود بنابراین در صورت کمبود فنیل آلانین، سنتز تیروزین نیز دچار اختلال می‌شود. همانطور که ذکر شد اسید آمینه‌های آروماتیک پیش سازهای مولکولهای آروماتیک از جمله آلکالوئیدها و فنولها و غیره در موجودات‌اند. طی مطالعات انجام شده، اسید آمینه‌های آروماتیک تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین نه تنها در سنتز پروتئین‌ها شرکت دارند بلکه این اسید آمینه‌های آروماتیک نقش مهمی در سنتز متابولیت‌های مختلف از جمله کوئینون‌ها، ایندول‌ها، آلکالوئیدها، پروپانوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، آنتوسیانین‌ها، سوبرین، لیگنین وغیره شرکت دارند (فاچینی و همکاران، ۱۹۹۸). مطالعات انجام شده بر روی مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها نشان داده‌است که اغلب آلکالوئیدها از طریق دکربوکسیلاسیون پیش سازهای اسیدهای آمینه‌ای مثل تیروزین، تریپتوفان، فنیل‌آلانین و لیزین و ایجاد آمین‌های مربوطه سنتز می‌شوند (فابری و همکاران، ۲۰۰۰; گونال و همکاران، ۱۹۹۹). با توجه به نوع پیش‌ساز، مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها متفاوت می‌باشد از جمله مسیر آلکالوئیدهای ایندولی، آلکالوئیدهای ایزوکوئینولینی و غیره. استفاده از تیروزین به عنوان پیش ساز منجر به سنتز آلکالوئیدهای ایزوکوئینولینی

می‌شود که دارای حلقه بنزن‌اند و با تغییرات بعدی به کدئین و مورفین تبدیل می‌شوند (فاچینی و همکاران، ۲۰۰۰).



شکل۲-۲- مسیر اسید شیکیمیک در سنتز اسیدهای آمینه آروماتیک

۵-۲- نقش TYDC در چرخه سنتز مورفین

تیروزین دکربوکیسلاز (TYDC) یک ال–آمینو اسید دکربوکسیلاز حلقوی رایج و عمومی در گیاهان می‌باشد که در گونه‌های مختلف گیاهی بیوسنتز تعداد زیادی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه به آن وابسته می‌باشد (فاچینی و همکاران، ۱۹۹۹). تیروزین دکربوکیسلاز با حذف یک گروه کربوکسیل از تیروزین و دی هیدروکسی فنیل آلانین (دوپا) آنها را به ترتیب به تیرامین و