بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه لرستان

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

عنوان پایان‌نامه

همسانه‌سازی و معرفی سازه خاموشی ژن Codein-O-Demethylase با استفاده از فن RNAi در گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum* L)

نگارش:

حسین شاهی‌وند

استاد راهنما:

دکتر احمد اسماعیلی

اساتید مشاور:

دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی

دکتر علیرضا زبرجدی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

بهمن ۱۳۹۱

همه‌ی 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.

تقدیم به:

پدر و مادرم به پاس زحمات همیشگی شان

و برادرم که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بود و تکیه گاهم در مواجهه با مشکلات

تشکر و قدردانی:

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان گردید. به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت. حال که با یاری او موفق به اتمام تحصیلاتم در این مقطع شدم، بر خود لازم می دانم از تمامی عزیزانی که در طی انجام این پژوهش از راهنمایی و یاریشان بهره مند گشته ام تشکر و قدردانی نمایم. از استاد راهنمای فرهیخته و اندیشمندم جناب آقای دکتر احمد اسماعیلی به پاس حمایت بی دریغ و رهنمودهای ارزشمند علمی و عملی ایشان در پیشبرد مراحل پایان نامه از نخستین گام ها تا انتها، صمیمانه سپاسگزارم. از اساتید مشاورم جناب آقای دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی و آقای دکتر علیرضا زبرجدی که اینجانب را مورد راهنمایی و لطف قرار داده و با صبر و متانت طبع یاری نمودند، قدردانی و تشکر می نمایم. همچنین از اساتید فرزانه و دلسوز؛ جناب آقای دکتر هادی احمدی و سرکار خانم دکتر فرانک هادی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند کمال تشکر و قدردانی را دارم. در پایان سزاوار است مراتب تشکر و قدردانی بیکران خود را از کلیه اساتید محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات این دانشکده صمیمانه ابراز دارم و آنچه را که در مدت شش سال شاگردی از ایشان آموخته ام را ارج نهم و نیز از دوستان گرانقدری که از کمک و همراهی بی دریغ هریک به نحوی در دوران تحصیل و انجام پایان نامه بهره جسته ام سپاسگزارم.

ای علّم هستی ما از تو پست نیست به خود، هست به تو هرچه هست

پای طلب، راه گذار از تو یافت دست توان، قوت کار از تو یافت

ناآمده از تو رهنمایی دورست که ره برد به جایی

در کف ما مشعل توفیق نه ره به نهانخانه تحقیق ده

حسین شاهی وند - اردیبهشت ۹۲

Shahivand_h@yahoo.com

چکیده

شقایق(*Papaveer somniferum* L.) به عنوان مهمترین منبع اقتصادی تولید ترکیبات آلکالوئیدی مورفینان مانند مورفین، کدوئین، تبائین، نارکوتین و پاپاورین شناخته شده است و از ترکیبات آن در صنعت داروسازی به عنوان بی‌حس کننده، ضد سرفه و ضد اسپاسم استفاده می‌شود. امروزه از فن مهندسی متابولیک، برای دستورزی ژن‌های بیوسنتز آلکالوئیدها و فرآورده‌های متابولیکی این گیاه از طریق تراریخت‌سازی استفاده می‌شود. کدوئین اُ–دمتیلاز (CODM)، آنزیم انتهایی در مسیر بیوسنتزی مورفینان در گیاه شقایق می‌باشد که باعث دمتیلاسیون تبائین در موقعیت ۳ و تبدیل آن به اوریپاوین و همچنین دمتیلاسیون کدوئین و تبدیل آن به مورفین می‌شود. در این پژوهش با هدف بررسی تأثیر خاموش‌سازی ژن CODM بر پروفایل آلکالوئیدهای مهم انتهایی شبکه مورفینان، از تکنیک‌های RNAi و VIGS استفاده گردید. پس از شناسایی و جداسازی ژن CODM با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، بخش انتهایی cDNA سنتز شده این ژن واقع در ناحیه 3′ UTR، به عنوان قطعه هدف خاموشی جهت سنس و آنتی‌سنس به ترتیب و طی دو مرحله در ناقل خاموشی pGSA1285 همسانه‌سازی گردید. همچنین قطعه ژنی مذکور بار دیگر به منظور مطالعه خاموشی گذرای ژن CODM، در ناقل ویروسی TRV2 همسانه‌سازی شد و سپس با استفاده از آگروباکتری حاوی سازه، به برگهای نمونه‌های گیاهی مورد نظر تراریزش صورت گرفت. از طریق PCR ژن پروتئین پوششی ویروس TRV، گیاهان تراریخت شده انتخاب شدند و سپس آنالیز نیمه کمی بیان ژن انجام شد. آنالیز نهایی خاموشی ژن ناشی از مکانیسم VIGS نیز که با استفاده ازPCR در زمان واقعی انجام شد، کاهش ۸۸ درصدی بیان ژن CODM در مقایسه با نمونه‌های شاهد را نشان داد. جهت بهینه‌سازی و تعیین روش مناسب باززایی گیاهان تراریخت، آزمایش فاکتوریل با ۵ تکرار (هر پتری‌دیش حاوی ۱۰ ریز نمونه معادل با یک تکرار) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با فاکتورهای ریز نمونه (در دو سطح هیپوکوتیل و ریشه)، محیط کشت پایه (شامل دو سطح B5 و MS) و آنتی‌بیوتیک پارامومایسین (در سطوح غلظتی ۱۰، ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر)، طراحی و اجرا گردید. در مورد کالوس‌زایی نتایج نشان داد که میزان کالوس‌زایی در محیط MS به مراتب بهتر از محیط B5 بوده و بهترین نتیجه در ترکیب تیماری ریزنمونه هیپوکتیل در محیط MS با سطح آنتی‌بیوتیک ۱۰ mg/L مشاهده گردید. دیده شد که ریزنمونه هیپوکوتیل در هر سه سطح آنتی‌بیوتیک و در دو محیط MS و B5 درصد کالوس‌زایی بیشتری در مقایسه با ریزنمونه ریشه دارا بود. همچنین میزان جنین‌زایی ریزنمونه ریشه در هر سه سطح آنتی‌بیوتیک و در هر دو محیط در مقایسه با ریزنمونه هیپوکوتیل، بیشتر بود.

واژگان کلیدی: مهندسی متابولیت، شقایق الی‌فرا، آلکالوئید، VIGS و RNAi

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه ۱

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

۲- کلیات ۵

۲-۱-گیاه‌شناسی ۵

۲-۲- متابولیت‌های ثانویه ٦

۲-۳- آلکالوئیدها ۷

۲-٤- شبکه آلکالوئیدی مورفینان، جایگاه و نقش آنزیم کدوئین اُ- دمتیلاز (CODM) ۹

۲-۵- خواص دارویی آلکالوئیدهای گیاه شقایق ۱۲

۲-٦- خاموش‌سازی ژن ۱۳

۲-۷- خاموش‌سازی ژن از طریق RNA مداخله‌گر (RNAi) ۱٤

۲-۸- خاموش‌سازی ژن از طریق ویروس (VIGS) ۱۵

۲-۹- کشت بافت و جنین‌زایی سوماتیکی ۱۸

۲-۱۰- واکنش Real-Time PCR ۲۰

۲-۱۱- پیشینه مهندسی متابولیت و تراریزش شقایق ۲۰

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد ۲۵

۳-۱-۱- مواد گیاهی ۲۵

۳-۱-۲- سویه‌های باکتریایی ۲۵

۳-۱-۳- آغازگرها ۲۵

۳-۱-٤- میزبان‌های همسانه‌سازی ۲٦
۳-۱-٥- محیط کشت باکتری و آنتی‌بیوتیک‌ها ۳۰
۳-۱-٦- آنزیم‌های محدودگر ۳۱
۳-۲- روش‌ها ۳۲
۳-۲-۱- شناسایی، تکثیر و جداسازی ژن CODM ۳۲
۳-۲-۲- ساخت cDNA ژن CODM ۳٥
۳-۲-۳- همسانه‌سازی cDNA ژن CODM در ناقل pTZ57R/T ۳۷
۳-۲-٤- طراحی آغازگرهای همسانه‌سازی قطعه خاموشی ۳۸
۳-۲-٥- همسانه‌سازی قطعه خاموشی sense ژن CODM در ناقل pTZ57R/T ۳۹
۳-۲-٦- همسانه‌سازی قطعه خاموشی sense ژن CODM در ناقل pGSA1285 ..... ۳۹
۳-۲-۷- همسانه‌سازی قطعه خاموشی Antisense ژن CODM در ناقل pGSA1285 ..... ٤۱
۳-۲-۸- انتقال سازه خاموشی ژن CODM در آگروباکتری ٤۱
۳-۲-۹- همسانه‌سازی توالی القاگر خاموشی ژن CODM در ناقل ویروسی TRV ٤۲
۳-۲-۱۰- انتقال سازه خاموشی TRV2-CODM به آگروباکتری ٤۳
۳-۲-۱۱- انتقال سازه خاموشی TRV2-CODM به گیاه شقایق ٤٤
۳-۲-۱۲- آنالیز بیان موقت سازه خاموشی TRV2-CODM در گیاه شقایق ٤٤
۳-۲-۱۳- بهینه سازی انتقال دائم ژن به گیاه شقایق ٤۷
۳-۲-۱٤- تهیه محلول پایه تنظیم کننده‌های رشد ٤۸
۳-۲-۱٥- کشت بذر ٤۸
۳-۲-۱٦- محیط های القای کالوس، تلقیح و هم کشتی ٤۹
۳-۲-۱۷- انتقال ریزنمونه‌ها به محیط گزینشگر ٥۰
۳-۲-۱۸- آنالیز آماری نتایج بخش کشت بافت ٥۰

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤- نتایج بخش مولکولی و کشت بافت ٥۲
٤-۱- تایید همسانه سازی cDNA ژن CODM در ناقل pTZ57R/T ٥۲

٤-٢- کلونی PCR با گرادیان دمایی ٥٣
٤-٣- تایید وجود قطعه خاموشی ژن CODM در ناقل pTZ57R/T ٥٣
٤-٤- همسانه‌سازی قطعه سنس ژن CODM در ناقل pGSA1285 ..... ٥٦
٤-٥- همسانه‌سازی قطعه آنتی سنس ژن CODM در ناقل pGSA1285 ..... ٥٧
٤-٦- همسانه‌سازی سازه خاموشی ژن CODM در آگروباکتری ٥٨
٤-٧- همسانه‌سازی قطعه القای خاموشی ژن CODM در ناقل TRV..... ٦٢
٤-٨- نتایج آنالیز بیان موقت سازه خاموشی TRV2-CODM از طریق Real Time PCR..... ٦٤
٤-٩- نتایج بهینه سازی کشت بافت و انتقال ژن ٦٩
٤-١٠- پیشنهادات..... ٧٣

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

شکل ٢-١- گروه‌های آلکالوئیدی اساسی مشتق از خانواده بنزیل‌ایزوکوئینولین(BIAs) ٩
شکل ٢-٢- مسیر سنتز آلکالوئیدهای مورفینان در گیاه شقایق ١١
شکل ٢-٣- شمای کلی فرایند VIGS در گیاهان ١٧
شکل ٣-١- ساختار ناقل همسانه‌سازی pTZ57R/T ٢٧
شکل ٣-٢- ناقل اختصاصی pGSA1285..... ٢٩
شکل ٣-٣- دیاگرام ناقل های TRV1 و TRV2..... ٣٠
شکل٣- ٣- نتیجه هم ردیفی توالی DNA ژنومی و cDNA ژن CODM ٣٥
شکل ٣-٤- دیاگرام سازه خاموشی ژن CODM در ناقلpGSA128. ..... ٤١
شکل ٣-٥- دیاگرام مربوط به سازهای TRV1 و TRV2-CODM. ٤٣
شکل ٤-١- تکثیر cDNA ژن CODM توسط آغازگرهای اختصاصی ٥٢
شکل ٤-٢- گرادیانت PCR جهت تعیین دمای اتصال بهینه آغازگر ٥٣

شکل ٤-٣- الکتروفورز محصول Colony PCR همسانه سازی ژن CODM در ناقل pTZ57R/T..... ٥٤
شکل ٤-٤- نتیجه تعیین توالی همسانه سازی قطعه القای خاموشی ژن CODM در ناقل pTZ57R/T ٥٤
شکل ٤-٥- حضور pTZ57R/T حاوی قطعه خاموشی ژن CODM در باکتری های *E.coli*..... ٥٥
شکل ٤-٦- نتیجه PCR تایید حضور قطعه خاموشی ژن CODM در پلاسمید pTZ57R/T ٥٥
شکل ٤-٧- کلونی PCR جهت تائید حضور قطعه سنس در ناقل pGSA1285 و باکتری *Ecoli* ٥٦
شکل ٤-٨- نتیجه هضم آنزیمی جهت تائید حضور قطعه سنس در ناقل pGSA1285 و باکتری *Ecoli*..... ٥٧
شکل ٤-٩- هضم تائید حضور آنتی سنس با آنزیم های *Hind*III و *Sac*I در باکتری Ecoli ٥٨
شکل ٤-١٠- تائید حضور سازه خاموشی ژن CODM در آگروباکتری به وسیله PCR..... ٥٩
شکل ٤-١١- تعیین توالی قطعات سنس و آنتی سنس القاگر خاموشی ژن CODM در ناقل pGSA1285 .... ٦٠
شکل ٤-١٢- تائید حضور ژن CODM در آگروباکتری به وسیله هضم آنزیمی *Hind*III و *Sac*I ٦٠
شکل ٤-١٣- تائید حضور سازه خاموشی ژن CODM در آگروباکتری به وسیله هضم آنزیمی *Asc*I ٦١
شکل ٤-١٤- تائید حضور ژن CODM در آگروباکتری به وسیله هضم آنزیمی با *Hind*III و *Sac*I..... ٦١
شکل ٤-١٥- تائید حضور توالی القاگر خاموشی ژن CODM در ناقل TRV2 از طریق انجام PCR..... ٦٢
شکل ٤-١٦- تائید حضور ژن CODM در ناقل TRV2 توسط واکنش هضم آنزیمی *sma*1 و *Xba*1 ..... ٦٣
شکل ٤-١٧- نتیجه تعیین توالی همسانه سازی قطعه القای خاموشی ژن CODM در ناقل TRV2..... ٦٣
شکل ٤-١٨- مراحل مختلف باززایی گیاه تراریخت شقایق. ٦٩

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ٣-١- آغازگرهای پیشرو و برگشتی طراحی شده. ٢٦
جدول ٣-٢- عناصر ژنتیکی ناقل pTZ57R/T..... ٢٨
جدول ٣-٣- آنتی بیوتیک‌ها و غلظت‌های مورد استفاده. ٣١
جدول ٣-٤- آنزیم های برشی مورد استفاده (Fermentase)..... ٣٢

جدول ۳-۵- اجزای ترکیب ساخت cDNA. ۳۵
جدول ۳-٦- واکنش PCR برای تکثیر cDNA. ۳٦
جدول ۳-۷- سیکل دمایی و زمان واکنش PCR. ۳۷
جدول ۳-۸- اجزا مورد استفاده در واکنش الحاق cDNA ژن CODM به داخل ناقل pTZ57R/T ۳۸
جدول ۳-۹- واکنش های هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Asc*1 و *Swa*1. ..... ٤۰
جدول ۳-۱۰- مخلوط واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم *Sma*I و *Xba*I. ٤۲
جدول ۳-۱۱- اجزای واکنش اتصال TRV2 و توالی جدا شده از ناقل pTZ57R/T. ٤۳
جدول ۳-۱۲- اجزای واکنش Real-Time PCR. ٤٦
جدول ۳-۱۲- ترکیب تیمارهای اعمال شده در آزمایشات کشت بافت. ٤۸
جدول ٤-۱- تجزیه واریانس صفت های درصد کالوس و درصد جنین ۷۰
جدول ٤-۲- نتیجه مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه به روش دانکن. ۷۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

گرایش روزافزون جوامع بشری به استفاده از داروهای دارای منشاء گیاهی، موجب شده است تا شرکت‌های داروسازی نیز به طور گسترده به تولید داروها و فرآورده‌های آرایشی بهداشتی با منشاء گیاهی روی آورند که این امر سبب افزایش تقاضای مواد موثره گیاهان دارویی شده است. علی‌رغم پیشرفت‌های به دست آمده در زمینه سنتز مصنوعی مواد موثره گیاهی، هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها راه دستیابی به بسیاری از مواد دارویی ارزشمند است. سازمان بهداشت جهانی فهرستی بالغ بر ۲۰۰۰۰ گونه گیاه دارویی را گردآوری نموده است که در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. بر اساس اعلام این سازمان حدود ۵۰۰۰-٤۰۰۰ داروی گیاهی نیز توسط صنایع دارویی ساخته و به بازار عرضه می‌شود. کشور ایران با اقلیم‌های مختلف آب و هوایی، حدود ۸۰۰۰ گونه گیاهی و بیش از ۱۰۰۰ گونه گیاه دارویی بستر بسیار مناسبی برای فعالیت در زمینه‌های مختلف بهره‌برداری از گیاهان دارویی را داراست (زارع زاده، ۱۳۸٦). بخش‌اعظم بازار گیاهان دارویی به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود. متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیباتی آلی هستند که مستقیماً در رشد، نمو یا تولیدمثل گیاه دخیل نیستند. این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده‌تری نسبت به متابولیت‌های اولیه (مانند اسیدهای آمینه که برای بقاء زندگی سلول‌ها ضروری‌اند) می‌باشند. آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، رنگیزه‌ها و تانن‌ها از جمله مهم‌ترین این ترکیبات هستند. سلول‌های گیاهی مقادیر متنوعی از این فرآورده‌ها را تولید می‌کنند (Stamp, 2003).

آمین‌های طبیعی حاصل از منابع گیاهی را به دلیل خاصیت قلیایی محلول‌های آبی آنها، قلیاهای گیاهی[1] می‌نامند که امروزه به آلکالوئید مشهورند (Mcmurry, 1998). تا کنون بیش از ۱۲۰۰۰ آلکالوئید در گیاهان شناسایی شده است که بیشترین استفاده را در تولید دارو دارند و سهم آنها در بازار جهانی حدود ٤ میلیارد دلار می‌باشد. زمینه تحقیقاتی آلکالوئیدها هرچند سابقه کهنی دارد ولی ما هنوز در ابتدای راه شناخت کامل و بهره‌وری زیست فناورانه آن هستیم (Dehghan, 2010).

یکی از گیاهان دارویی مهم، شقایق با نام علمی *Papaver somniferum* L. متعلق به خانواده *Papaveraceae* می‌باشد. این گیاه دیپلوییید بوده (2n=22) (Tetenyi, 1997) و بومی جنوب شرق اروپا و غرب آسیا می‌باشد (Fleming, 1998). خصوصیت دارویی این گیاه مربوط به قابلیت آن در بیوسنتز

[1] Vegetable alkali

گروهی از آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین از زیر گروه آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین می‌باشد. این گیاه حاوی حدود ۸۰ نوع آلکالوئید است که از تتراهیدروکسی بنزوایزوکوییینولین مشتق می‌شوند (Frick *et al.*, 2004). این گیاه به عنوان مهمترین منبع اقتصادی تولید ترکیبات آلکالوئیدی مورفینان مانند مورفین، کدوئین، تبائین، نارکوتین و پاپاورین شناخته شده است و از ترکیبات آن در صنعت داروسازی به عنوان بی‌حس کننده، ضدسرفه و ضداسپاسم استفاده می‌شود (Dehghan, 2010).

بر اساس آمار منتشر شده از سوی سازمان FAO[1] سطح زیر کشت گیاه مذکور در طی چند سال اخیر روندی افزایشی را نشان می‌دهد به طوری که مقدار آن از ۸۹۳۲۵ هکتار در سال ۲۰۰٤ به ۱۳۲۵۸٤ هکتار در سال ۲۰۰۹ افزایش یافته است. این امر در واقع بیانگر افزایش تقاضای جهانی برای محصولات مذکور می‌باشد (FAO, 2011).

افزایش محتوای آلکالوئیدی و کیفیت آن باعث افزایش رقابت‌پذیری صنعت کشت شقایق شامل انتقال، ذخیره و عصاره‌گیری و حذف ضایعات خواهد شد. با استفاده از تکنیک‌های بهنژادی، میزان محتوای آلکالوئیدهای این گیاه در دو دهه اخیر به دو برابر افزایش یافته است (حسینی و همکاران، ۱۳۸۷). این در حالی است که تغییر ترکیب محتوای آلکالوئیدی در جهت افزایش یا کاهش یک یا چند آلکالوئید خاص در کنار افزایش کل محتوای آلکالوئیدی از اهمیت خاصی برخوردار است.

امروزه مهندسی متابولیک، روشی خاص برای تنظیم بیوسنتز آلکالوئیدها و دستکاری فراورده‌های متابولیکی است (Hughes and Shanks, 2002؛ Verpoorte *et al.*, 2000؛ Dixon and Steele, 1999) که می‌تواند سطح مسیرهای با ارزش میانه یا فرآورده‌های انتهایی را بوسیله فوق بیان از یک آنزیم با سرعت محدود افزایش دهد و یا اینکه متابولیت‌های نامطلوب را از طریق خاموشی ژن از بین برده یا کاهش دهد (Frick *et al.*, 2007). مهندسی متابولیک از طریق تغییر در فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی، یا پروتئین‌های تنظیمی مسئول در بیان ژن‌های مسیر، تغییرات در مقدار یا ساختار شیمیایی متابولیت‌های خاص را ایجاد می‌کند (Larkin *et al.*, 2007). در روش مهندسی متابولیت می‌توان با وارد نمودن ژن مربوط به آنزیم‌های کلیدی و قرار دادن آنها در کنار پیش‌برنده‌های قوی، بیان ژن را افزایش داد. از طرف دیگر با استفاده از روش‌های خاموشی ژن از طریق بکارگیری توالی‌های آنتی‌سنس، این امکان وجود دارد تا از طریق مهار تولید این آنزیم‌ها، راه متابولیکی را به سمت محصول مورد نظر نشانه‌گیری کرد (حسینی وهمکاران، ۱۳۸۷). آنتی‌سنس، RNA تک رشته‌ای است که مکمل رشته mRNA نسخه برداری شده

[1] Food and Agriculture Organization

درون سلول است. وقتی RNA آنتی‌سنس وارد سلول می‌شود، به mRNA مکمل جفت شده و مانع ترجمه آن می‌شود. این روش هنگامی مفید است که کپی‌های زیادی از ژن هدف در ژنوم وجود دارد (Bautista *et al*., 2000). با توجه به اهمیت گیاه شقایق الی‌فرا به دلیل ساخت متابولیت‌های ثانویه که در صنعت داروسازی بسیار حائز اهمیت هستند، در این تحقیق به بررسی تاثیر خاموشی ژن CODM با دو مکانیسم RNAi و VIGS بر روی میزان آلکالوئیدهای بالادست و پایین دست این ژن در این گیاه دارویی مهم پرداخته شد.

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۲- کلیات

در اوایل قرن حاضر، پیشرفت علم شیمی و کشف سیستم‌های پیچیده سنتز ارگانیک، منجر به توسعه صنعت داروسازی گیاهی و جایگزینی بسیاری از مواد دارویی صناعی به وسیله آن شده است. مواد اولیه موثری که در گیاهان به حالت ذخیره موجود است، پیوسته به عنوان موادی غیر قابل جایگزین مورد استفاده بوده و خواهد بود. از آنجایی که این مواد به دلیل همراه بودنشان با سایر ترکیبات، پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردار می‌باشد، در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند، از اینرو برتری قابل ملاحظه‌ای نسبت به داروهای سنتتیک دارند. شقایق نیز به عنوان یکی از مهمترین گیاهان دارویی همواره مورد توجه محققان بوده است. در این فصل تلاش شده است تا ضمن معرفی این گیاه، به بررسی مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای مهم و سوابق پژوهشی مرتبط با این تحقیق پرداخته شود.

۲-۱-گیاه‌شناسی

خشخاش یا کوکنار با نام علمی *Papaver somniferum* از خانواده *Papaveraceae* و نام لاتین Opium poppy، گیاهی است دیپلوییید (2n=2x=22)، علفی و یک ساله که ارتفاع آن از ۳۰ سانتی‌متر تا ۲ متر می‌رسد. ساقه راست دارد و برگ‌های آن نسبتاً بزرگ، نوک تیز و دارای بریدگی و دندانه می‌باشند که به صورت متناوب (یک در میان) می‌رویند. گل‌ها درشت و در انتهای ساقه واقع شده‌اند، شبیه گل شقایق (که البته شقایق هم متعلق به همین خانواده می‌باشد) و به رنگ‌های سفید، صورتی و قرمز مایل به بنفش دیده می‌شود (Fleming, 2000). میوه‌ی خشخاش به صورت یک کپسول تخم‌مرغی یا کروی شکل و ناشکوفا می‌باشد که وقتی نارس است به رنگ سبز و وقت رسیدن و خشک شدن به رنگ زرد تا قهوه‌ای در می‌آید و حاوی تعداد زیادی دانه ریز به رنگ کرم یا رنگ‌های دیگر در بین پره‌های داخل کپسول است. عمده روش تکثیر این گیاه از طریق بذر می‌باشد. گیاه خشخاش دارای ریشه‌ای مخروطی و کم و بیش چوبی است که به طور مستقیم در زمین فرو می‌رود و طول ریشه اصلی این گیاه متفاوت بوده و به گونه گیاه و شرایط اقلیمی محل رویش بستگی دارد. ریشه این گیاه به طور متوسط بین ۱۸ تا ۲۰ سانتی‌متر طول و قطر آن یک تا دو سانتی‌متر است. ریشه خشخاش دارای انشعاب‌های کمی است و ریشه‌های جانبی شبکه بسیار وسیعی از ریشه‌های ظریف را تا عمق ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متری خاک به وجود

می‌آورند و ساقه فوقانی ریشه قطورتر است که باعث استحکام ساقه می‌شود. خشخاش گیاهی است روزبلند که با افزایش طول روز، دوره رشدی آن کاهش می‌یابد (یزدانی، ۱۳۸۱).

۲-۲- متابولیت‌های ثانویه[1]

گیاهان که منبع غذاها، داروها و تعداد بیشماری از مواد آلی گوناگون هستند، در حقیقت گنجینه‌ای عظیم از ثروت پنهانی بشمار می‌روند که پیوسته تجدید می‌شوند. برخی از فرآیندها مانند فتوسنتز یا چرخه‌های تحولات نیتروژن و گوگرد، خصلتی عام دارند که به بیومولکول‌های ساده متابولیسم اولیه مانند قندها و آمینواسیدها و... که در همه گیاهان مشترک هستند منجر می‌شوند. در مقابل، فرایندهای دیگر اختصاصی‌تر هستند و به فرآورده‌های متابولیسم ثانویه حاصل از استفاده مواد متابولیسم اولیه، می‌انجامند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیباتی آلی هستند که مستقیما در رشد، نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نیستند. این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده‌تری نسبت به متابولیت‌های اولیه (مانند اسیدهای آمینه) که برای بقاء زندگی سلول‌ها ضروری‌اند می‌باشند. آلکالوئیدها (مورفین، کدئین، آتروپین و ...)، ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، رنگیزه‌ها و تانن‌ها از جمله مهم‌ترین این ترکیبات هستند. سلول‌های گیاهی مقادیر متنوعی از این فرآورده‌ها را تولید می‌کنند (Stamp, 2003).

این ترکیبات اغلب در وزیکول‌های خاص یا واکوئول‌ها ذخیره می‌شوند. این نوع ذخیره‌سازی از یک طرف نوعی سمیت‌زدایی برای گیاه است و از طرف دیگر نوعی مخزن ذخیره برای موادی نظیر مولکول‌های غنی از نیتروژن است. اگر چه متابولیت‌های ثانویه گیاهی بسیار رایج هستند، اما هر گیاهی قادر به تولید هر نوع ترکیب ثانویه‌ای نیست و برخی ترکیبات نیز تنها منحصر و محدود به گونه خاصی هستند. اهمیت متابولیت‌های ثانویه برای گیاهان از ماهیتی اکولوژیک برخوردار است و این ترکیبات نیز دارای کارکردهای متنوعی‌اند که از آن جمله می‌توان به عملکرد دفاعی در برابر صیادان، انگل‌ها و عوامل بیماریزا، فیتوالکسین‌ها (سموم گیاهی) در هنگام ابتلاء به قارچ جهت جلوگیری از گسترش میسلیوم در گیاه، رقابت‌های بین گونه‌ای، یا تسهیل فرآیندهای تولیدمثلی (مانند تولید بوهای جاذب و یا مواد رنگی) و یا ایجاد ارتباط با گرده افشان‌ها اشاره کرد.

[1] Secondry metabolites

۲-۳- آلکالوئیدها[1]

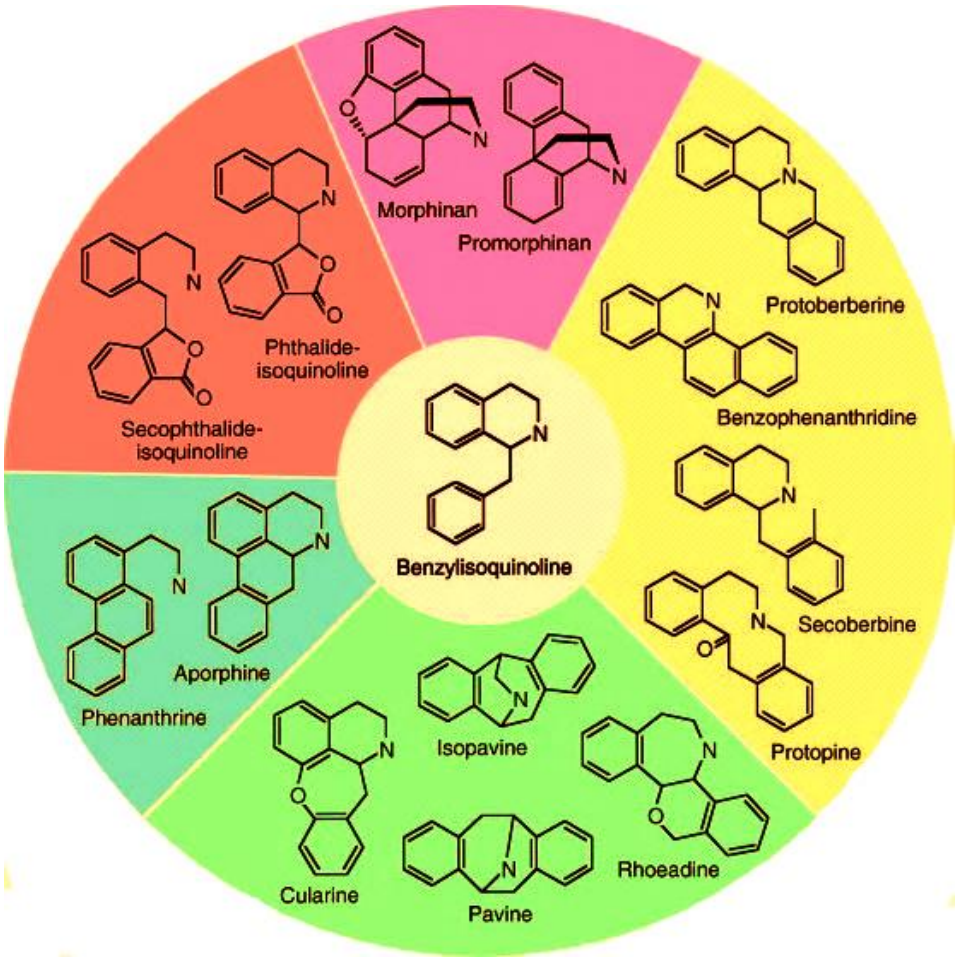
آلکالوئیدها از مواد بیولوژیکی موثری هستند که در حدود ۲۰ درصد از گیاهان و به ویژه گیاهان دارویی وجود دارند و اغلب به وسیله دکربوکسیلایون اسیدهای آمینه به وجود می‌آیند. این مواد در واقع دسته‌ای از ترکیبات آلی شیمیایی حاصل از متابولیسم ثانویه هستند که دست کم دارای یک اتم نیتروژن در حلقه هتروسیکلیک خود می‌باشند. تاکنون حدود ۱۲۰۰۰ آلکالوئید در طبیعت و یا در آزمایش‌های شیمیایی شناسایی شده است (Facchini, 2001). تعریف و تعیین محدوده آلکالوئیدها امری مشکل است، چرا که از نظر شیمیایی، بیوشیمیایی و فیزیولوژی، گروه متجانسی از ترکیبات نمی‌باشند، به غیر از این اصل که تمامی آلکالوئیدها حاوی ترکیبات نیتروژنی هستند، در مجموع تعریف عمومی مناسبی برای تمامی آلکالوئیدها وجود ندارد. آتروپین، مرفین، کینین، وین‌کریستین و... معرف تعدادی از آلکالوئیدهایی هستند که برای درمان بیماری‌های مختلف، از مالاریا تا سرطان استفاده می‌شوند. آلکالوئیدها درحیوانات، قارچ‌ها، باکتری‌ها و گیاهان وجود دارند، ولی غنی‌ترین منبع آنها، گیاهان می‌باشند (Shamsa, 2008). آلکالوئیدها بیشتر در بافت‌هایی ذخیره می‌شوند که از لحاظ بقا و تولید مثل اهمیت بیشتری دارند که این بافت‌ها نیز شامل بافت‌های جوان در حال رشد، ریشه، پوست ساقه، گل‌ها (بویژه دانه‌های آنها)، جوانه‌ها و بافت‌ها فعال در فتوسنتز می‌باشند. بطور کلی میزان آلکالوئیدها با پیر شدن بافت‌ها کاهش می‌یابد به صورتی که معمولا برگ‌های پائیزی که در حال ریختن هستند تقریبا فاقد آلکالوئید می‌باشند. میزان آلکالوئید در بافت‌های ذخیره‌ای بسیار زیاد است و گاهی اوقات تا ۱۰ درصد وزن خشک بافت‌ها را تشکیل می‌دهد. در بعضی گیاهان علفی، آلکالوئیدها در بافت اپیدرمی ذخیره می‌شوند (مانند کوکائین، کلشیسین، آکونیتین، آلکالوئیدهای استروئیدی، نیکوتین، وراترین، بوکسین، کونین و لوپانین)، چرا که این آلکالوئیدها نقش دفع دشمنان را داشته و اولین سد دفاعی گیاه محسوب می‌شود. تعدادی از گیاهان لاتکس تولید می‌نمایند که این ماده نیز حاوی آلکالوئیدهای دفاعی می‌باشد. از جمله این مواد می‌توان به مورفینان‌ها و سایر آلکالوئیدهای گروه بنزیل‌ایزوکوئینولین در خانواده *Papaveraceae*، پروتوبربرین و آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین در مامیران، لوبلین و دیگر آلکالوئیدهای پیپریدین در گیاه Lobelia و ترپنوئیدها مانند استرهای فوربول اشاره نمود. ساختار آلکالوئیدها معمولا با توجه به محل سنتز و تجمع آنها متفاوت است و علاوه بر این پروفیل آلکالوئیدها معمولا با توجه به نوع اندام‌های گیاه (مثلا دانه‌ها،

[1] Alkaloid

جوانه‌ها، و بخش‌های بالغ گیاه) تفاوت دارد. ساختار و غلظت آلکالوئیدها در طول مدت رشد گیاهان و نیز چرخه زندگی آنها نیز متفاوت است. تحقیقات در زمینه بیوشیمی آلکالوئید گیاهان، با جداسازی مورفین در سال ۱۸۰۶ آغاز گردید. ساختار مورفین تا زمان تعیین شکل فضایی مولکول ها در سال ۱۹۵۲ ناشناخته ماند (Facchini, 2001). بیشتر آلکالوئیدها از آمین‌های ایجاد شده در اثر دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه‌هایی مانند هیستیدین، لایزین، اورنیتین، تریپتوفان و تایروزین ایجاد می‌شوند. اتصال آمین‌ها به دیگر متابولیت‌های تولید شده به عنوان اولین مرحله در بیوسنتز آلکالوئید و اشتقاق سایر خانواده‌های آلکالوئیدی در گیاهان محسوب می‌شود (Ilari, 2009).

بنزیل‌ایزوکوئینولین[1] (BIAs) شاخه بزرگی از ترکیبات آلکالوئیدی می‌باشند که ساختار حدود ۲۵۰۰ نوع از انواع آن شناسایی شده است. این آلکالوئیدها که همگی از اسیدآمینه تایروزین مشتق می‌شوند، می‌توانند نقش‌های بیولوژیکی متفاوتی داشته باشند، به عنوان مثال آلکالوئید کولشیسین[2] به عنوان مختل کننده رشته‌های میکروتوبول در زمان تقسیم سلولی، مورفین به عنوان یک داروی مسکن قوی و توبوکورانین به عنوان مسدود کننده عصب عضلانی به کار گرفته می‌شوند (Facchini, 2001).

[1] Benzylizoquinoline
[2] Colchicine



شکل ۲-۱- گروه‌های آلکالوئیدی اساسی مشتق از خانواده بنزیل‌ایزوکوئینولین(BIAs) (Liscombe *et al*., 2005).

۲-٤- شبکه آلکالوئیدی مورفینان[1]، جایگاه و نقش آنزیم کدوئین اُ- دمتیلاز[2] (CODM)

عمدتاً مسیر بیوسنتز بسیاری از آلکالوئیدهای بنزیل‌ایزوکوئینولین در شقایق تا ماده حدواسط اس-رتیکولین[3] مشترک می‌باشد و این ترکیب، نقطه انشعاب مرکزی به چند شاخه مجزا از هم می‌باشد. متیلاسیون متابولیت اس- رتیکولین با توجه به نسبت و تعداد جایگاه‌های گروه متیل، موجب پیچیدگی بیشتر BIA های ساده می‌شود. به عبارت دیگر واکنش‌های متعدد به علت تشکیل اتصال‌های کربن- کربن

[1] Mophinan Alkaloid Pathway
[2] Codein -O-Demethylase
[3] S - Reticuline