DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2012.4015

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۰۲-۸۸ (۱۳۹۱)

افزایش بیان دائم ژن کدئینون ردوکتاز در گیاه تراریخت شقایق الی‌فرا (*Papaver somniferom* L.)

بهمن حسینی[1*]، هاله هاشمی‌سهی[2]، فرج‌الله شهریاری[3] و اسماعیل دهقان[4]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۲- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی

۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد

٤- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۰

چکیده

امروزه گیاه *Papaver somniferom* L. به‌عنوان منبع تجاری آلکالوئیدهای ارزشمند مورفین و کدئین محسوب می‌شود. آنزیم کدئینون ردوکتاز (Codeinone reductase) با قابلیت تبدیل کدئینون به کدئین و مورفینون به مورفین از آنزیم‌های کلیدی جهت مهندسی متابولیک مسیر بیوسنتز این ترکیب‌ها محسوب می‌شود. در این تحقیق ابتدا بهینه‌سازی انتقال ژن از طریق *Agrobacterium tumefaciens* دارای پلاسمید pBI121 (حاوی ژن گزارشگر *gus*) انجام گردید. جداسازی ژن مربوط به بیوسنتز کدئینون ردوکتاز براساس توالی موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI) انجام و در ناقل بیانی تحت کنترل پروموتر CaMV35S کلون گردید. پس از آماده‌شدن سازه، ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی شقایق توسط آگروباکتریوم حامل سازه نوترکیب، تلقیح شده و با استفاده از روش مولکولی PCR و آغازگرهای اختصاصی پیشرو ژن cor و برگشتی ژن nos الحاق ژن در ژنوم گیاهان تأیید گردید. آنالیز HPLC نشان‌دهنده تغییر میزان، نوع و درصد ترکیب‌های آلکالوئیدی در نمونه‌های تراریخته نسبت به گیاهان شاهد بود. نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده اهمیت دستورزی ژنتیکی آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی مورفین در تغییر الگوی تولید متابولیت‌های ارزشمند بنزیل‌ایزوکوئینولین می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کدئینون ردوکتاز، مهندسی متابولیک، HPLC، *Papaver somniferum* L.، *Agrobacterium tumefaciens*.

مقدمه

آلکالوئیدهای بنزیل‌ایزوکوئینولین گروه بزرگ و متنوعی از محصولات طبیعی با بیش از ۲۵۰۰ ساختار شیمیایی مشخص می‌باشند که اغلب در ۵ خانواده گیاهی یافت می‌شوند (Facchini, 2001). گیاه خشخاش (Opium poppy: *Papaver somniferum*) یکی از قدیمیترین گیاهان دارویی جهان بوده و در حال حاضر به‌عنوان سیستم مدل مهندسی متابولیت‌های ثانویه، تحقیقات مختلفی بر روی آن در حال انجام است (Zulak *et al*., 2008). این گیاه بیش از ۱۰۰ آلکالوئید بنزیل‌ایزوکوئینولین مختلف را تولید می‌کند که برخی از آنها نظیر مورفین ضددرد، کدئین و پاپاورین به‌عنوان

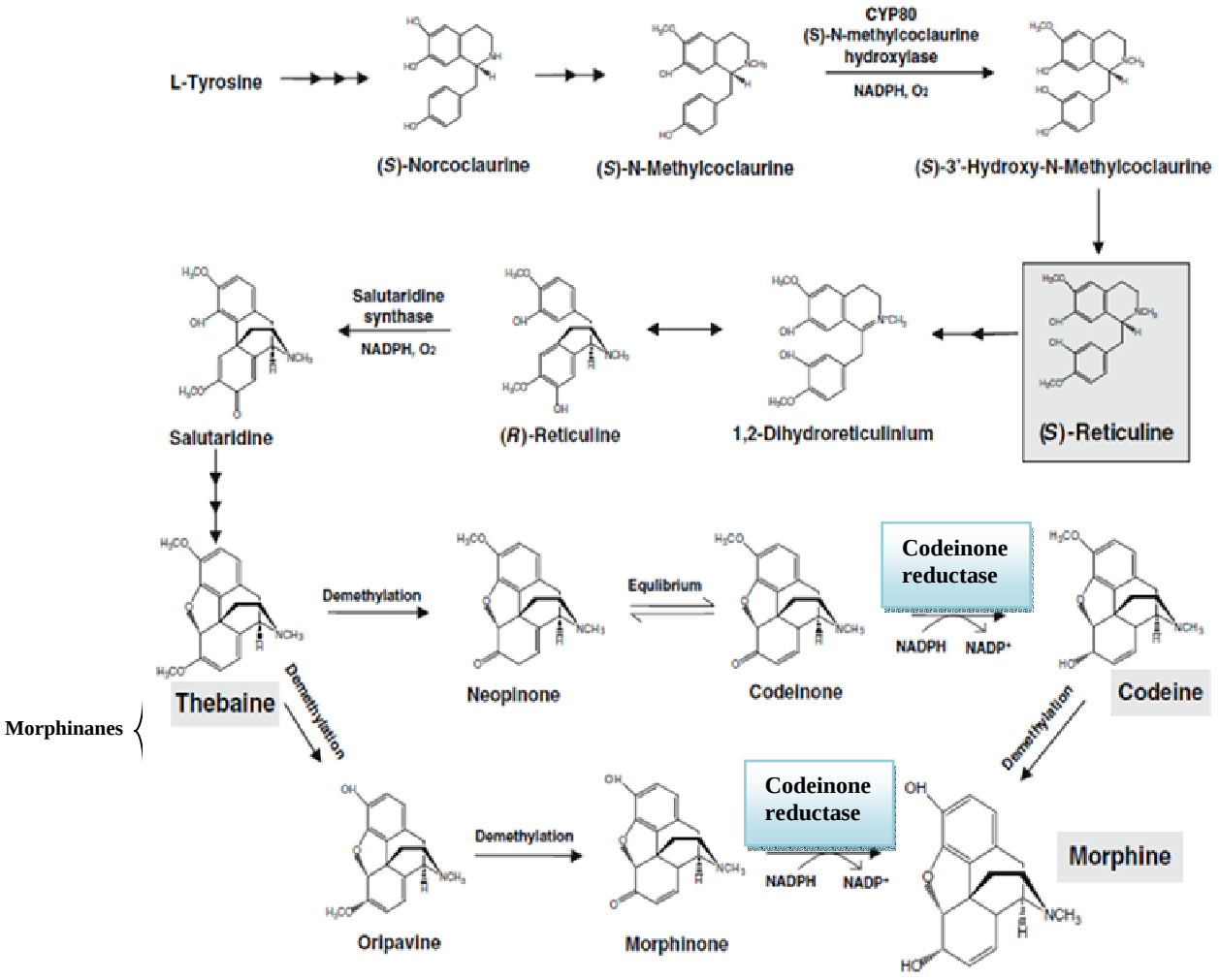
شل‌کننده عضلات، نوسکاپین به‌عنوان داروی ضدتومور و سانگواینارین به‌عنوان ترکیب ضدمیکروبی از نظر پزشکی دارای اهمیت می‌باشند (Di Fiore *et al.,* 2004). این ترکیب ها از پیش‌ماده اولیه ال-تیروزین (L-tyrosine) و ماده حدواسط مرکزی اس-رتیکولین (S-reticulin) ساخته می‌شوند. مورفین به همراه مواد شیمی درمانی دیگر نظیر وین‌کریستین (Vincristine)، وین‌بلاستین (Vinblastine) و کامپتوتسین (Camptothecine) از آلکالوئیدهای مهم تجاری بوده که از گیاهان دارویی استخراج می‌شوند. سنتز شیمیایی این ترکیب‌های ارزشمند به‌دلیل ساختار پیچیده‌شان بسیار سخت است. بنابراین گیاهان وحشی یا اهلی به‌عنوان تنها منبع تجاری تأمین‌کننده این ترکیب ها مورد توجه می‌باشند. در شکل ۱ چرخه بیوسنتز مورفین و آنزیم‌های درگیر در این مسیر نمایش داده شده‌است (Allen *et al*., 2004). مرفین طی نزدیک به ۱۷ مرحله آنزیمی از دو مولکول اسیدآمینه ال-تیروزین بدست می‌آید.

در طول مسیر بیوسنتزی مورفین در *P. somniferum*، آنزیم کدئینون ردوکتاز (Codeinone reductase) واکنش تبدیل کدئینون به کدئین را کاتالیز می‌کند که یک واکنش احیاء وابسته به NADP است. سرانجام مورفین در اثر دمتیلاسیون کدئین تولید می‌شود. به‌طور متناوب و در زنجیره دیگر، تبائین دمتیله شده و اریپاوین حاصل می‌گردد. در اثر اکسیداسیون اریپاوین، مورفینون تشکیل شده و در اثر احیاء آن توسط کدئینون ردوکتاز مورفین به‌عنوان محصول نهایی تولید می‌گردد (شکل ۱). نحوه‌ی بیان آنزیم COR نشان می‌دهد که آن یک آنزیم کلیدی و اساسی است که توسط تیمار با محرک‌ها (Elicitors) یا زخمی کردن، برخلاف سایر ژن‌های سنتزکننده مورفین نظیر (sat) (Facchini & Park, 2003) القاء نمی‌شود.

جداسازی ژن‌های مؤثر در بیوسنتز مورفین برای بهبود مهندسی متابولیک خشخاش و تولید آلکالوئیدهای ویژه اهمیت زیادی دارد. یکی از توانایی‌های ارزشمند استفاده از مهندسی ژنتیک، دستورزی مسیرهای بیوسنتتیک سلول گیاه و هر یک از متابولیت‌ها می‌باشد.

میزان تولید مواد آلکالوئیدی مختلف را می‌توان با استفاده از دستورزی ژنتیکی آنزیم‌های کلیدی شرکت‌کننده در مسیر متابولیکی تولید مورفین و کدئین تغییر داد. در این روشها می‌توان با وارد نمودن ژن مربوط به آنزیم‌های کلیدی و قراردادن آنها در کنار پیش‌برنده‌های قوی، بیان ژن را افزایش داد. Larkin و همکاران (۲۰۰۷) با افزایش بیان آنزیم COR تولید مورفین به‌ازای وزن خشک گیاه *P. Somniferum* را افزایش دادند. Allen و همکاران (۲۰۰٤) با استفاده از تکنولوژی RNAi موفق به خاموشی خانواده چند ژنی cor در *P. somniferum* گردیدند. به‌واسطه خاموشی ژن مذکور، پیش‌ساز آلکالوئیدی رتیکولین به جای مورفینان‌ها در گیاه تجمع یافت.

نظر به موارد مذکور، تحقیق حاضر با هدف جداسازی و کلون ژن کلیدی کدئینون ردوکتاز به منظور افزایش بیان آن در گیاه شقایق الی‌فرا و افزایش تولید مورفین انجام شده‌است.



شکل ۱- مسیر کامل بیوسنتز مورفین

مواد و روشها

مواد آزمایشی گیاهی و شرایط رشد

در این تحقیق از رقم فرانسوی Rence گیاه شقایق (*P. somniferum* L.) استفاده شد. در ابتدا بذرهای ریز شقایق با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت هفت دقیقه و چند بار شستشو با آب مقطر استریل ضدعفونی سطحی گردید. سپس بذرهای استریل شده در محیط کشت پایه B5 حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز کشت شدند، لیوان‌های حاوی بذر در فیتوترون با دمای ۲۳°C و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی به مدت شش هفته جهت استخراج RNA از گیاهچه‌های تولید شده و ۹ روز جهت تهیه ریزنمونه نگهداری شدند. کلیه آزمایشهای مربوط به کشت بافت و کارهای مولکولی در آزمایشگاه پژوهشکده بیوتکنولوژی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و

بیوتکنولوژی و آزمایشهای مربوط به سنجش بیوشیمیایی در آزمایشگاه کنترل کیفی شرکت تماد انجام گردید.

باکتری و پلاسمید مورد استفاده

باکتری اشریشیا کولی (*Escherichia coli*) سویه DH5α و باکتری آگروباکتریوم تومه فشنس (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه GV3850، برای تهیه سلول‌های مستعد (Competent cells)، نگهداری، دستکاری و تکثیر پلاسمیدهای اصلی و نوترکیب و همچنین جهت تراریخت نمودن ریزنمونه‌های گیاهی، مورد استفاده قرار گرفتند. از پلاسمیدهای pTZ57R/T به‌عنوان ناقل اولیه جهت نگهداری و تعیین توالی ژن و پلاسمید pBI121 جهت همسانه‌سازی و بیان ژن در گیاهان تراریخت استفاده شد. پلاسمید pTZ57R/T با داشتن طول ۲۸۸٦ جفت باز دارای ژن آنزیم بتالاکتاماز عامل مقاومت به آمپی‌سیلین، پیش‌برنده T7 در بالادست جایگاه کلونینگ، دارای خصوصیات متنوع دیگری به منظور کاربرد در کلونینگ می‌باشد. پلاسمید pBI121 دارای اندازه ۱۳kb حامل ژن نئوفسفوترانسفرازII (nptII) جهت ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌باشد که برای انتخاب سلول‌ها و گیاهان تراریخت حامل پلاسمید مورد نظر در شرایط محیط انتخابی استفاده می‌گردد.

استخراج mRNA و سنتز cDNA

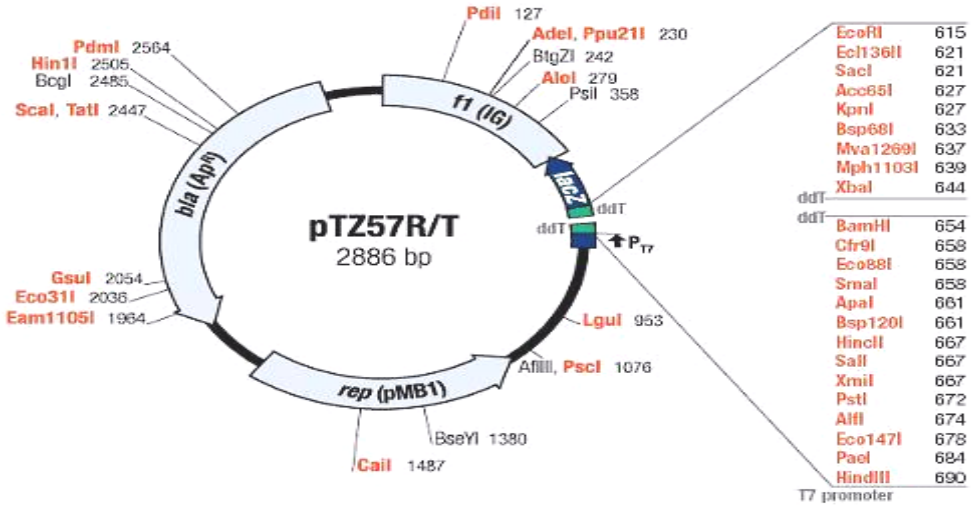
از کیت استخراج RNA XPLUS (شرکت سیناژن) جهت استخراج mRNA از برگ‌های گیاهان استفاده گردید. از گیاهان شش هفته‌ای *P. somniferum*، cDNA کدکننده ژن cor توسط واکنش رونویسی معکوس (Reverse Transcription) با استفاده از RNAی استخراج‌شده سنتز گردید. cDNA سنتزشده به‌عنوان الگو جهت سنتز DNAی دورشته‌ای و تکثیر توسط PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن cor طبق برنامه بهینه‌سازی شده مورد استفاده قرار گرفت. به منظور حذف ساختار دورشته‌ای DNA-RNA از دمای ۹٤ درجه سلسیوس برای واسرشت اولیه به مدت پنج دقیقه استفاده گردید. ۳۰ چرخه برای PCR بدین صورت در نظر گرفته شد: واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد؛ اتصال یک دقیقه در دمای ٦۲ درجه سانتی گراد و گسترش یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ ۱۰ دقیقه اضافه برای گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد. طراحی آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Oligo6 و با استفاده از توالی‌های موجود برای ژن مورد نظر در بانک اطلاعاتی NCBI (با شماره دسترسی AF108435 و طول ۹٦٦ جفت باز) انجام گردید. به منظور وارد کردن ژن در پلاسمید pBI121، جایگاه‌های برشی برای آنزیم‌های محدودکننده *BamHI* و *Sac*I در انتهای ´۵ آغازگرها وارد شد.

توالی آغازگرهای طراحی‌شده عبارتند از:

AF108435 F: 5'- TCG،GAT،CCG،CCA،CCA،TGG،AGA،GTA،ATG،GTG،TA - 3'
AF108435 R: 5'- GAG،AGC،TCT،CAA،TCC،TTC،TCA،TCC،CAG - 3'

همسانه‌سازی ژن cor و ساخت ناقل دوگانه (Binary vector)

به منظور تکثیر، نگهداری و کلونینگ ژن مورد نظر در ناقل T/A، ابتدا محصولات PCR مستقیماً در ناقل T/A کلون گردید. پس از تولید DNAی دورشته‌ای ژن مورد نظر، کلونینگ آنها در ناقل T/A (Cloning Kit # k1214) توسط اتصال محصولات PCR در پلاسمید pTZ57R/T (شکل ۲) به کمک آنزیم لیگاز T4 طبق دستورالعمل کیت (فرمنتاز) انجام گردید. در مرحله بعد، انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* که با استفاده از محلول $CaCl_2$ تهیه شده بود (Sambrook & Russelle, 2001) با استفاده از روش فیزیکی گرم شدن و یخ زدن سریع (Freez and Thaw) انجام گردید. سلول‌های تراریخت حامل پلاسمیدهای نوترکیب در محیط مک‌کانگی و محیط انتخابی LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) انتخاب و جهت استخراج پلاسمید نوترکیب در طول شب (در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و چرخش با دور ۱۸۰rpm) کشت شدند.



شکل ۲- پلاسمید pTZ57R/T

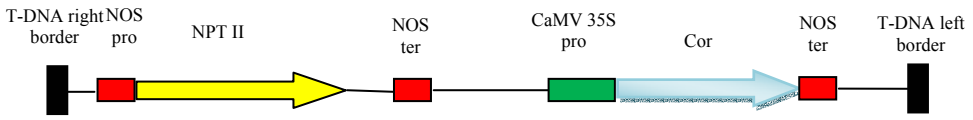
این پلاسمید در حالت خطی یک TA-vector است و برای کلون کردن محصولات PCR با انتهای ′۳ آدنین‌دار مناسب می‌باشد.

پس از استخراج پلاسمید به روش Miniprep و انجام هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I، الکتروفورز ژل آگارز (۱٪) به منظور خالص‌سازی ژن مورد نظر با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA (Roche) انجام گردید. به منظور کلون نمودن ژن مورد نظر در پلاسمید pBI121، ابتدا سلول‌های سویه $DH_{5\alpha}$ باکتریایی حامل پلاسمید pBI121 در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰mg/l) در طول مدت شب (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و چرخش با دور ۱۸۰rpm) کشت و استخراج پلاسمید به روش Miniprep از سلول‌های کشت شده انجام شد. با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I ژن *gus* از پلاسمید pBI121

حذف شده و پلاسمید خطی فاقد ژن *gus* با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA (Roche) جهت انجام واکنش اتصال (لیگاسیون) آماده گردید. در مرحله بعد، ژن *cor* در پلاسمید pBI121 خطی شده توسط آنزیم T4 DNA لیگاز اتصال یافت.

تراریختی باکتریهای مستعد *E. coli*

پس از پایان زمان آزمایش اتصال محصولات PCR در ناقل pBI121 (شکل۳)، ۲۰ µl از مخلوط واکنش را با ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد تهیه شده از *E. coli* مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مجدداً به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. سپس ۸۰۰ µl محیط LB مایع استریل به ویال اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر انکوباتور و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در پایان پلت باکتریایی بدست‌آمده از سانتریفوژ، در محیط LB جامد حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به صورت شبانه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و کلون‌های تراریخت باکتریایی انتخاب گردیدند. جهت تأیید الحاق ژن در پلاسمید pBI121، آزمون‌های Colony PCR و PCR با آغازگرهای اختصاصی *cor* در دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد و نیز آغازگر پیشرو *cor* به همراه آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد، همچنین هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. از ژل آگارز ۱٪ جهت مشاهده نتایج محصول PCR و محصول هضم آنزیمی استفاده گردید.



شکل ۳- سازه نهایی ایجاد شده جهت انتقال و بیان ژن *cor* در گیاه

تراریزش باکتریهای مستعد آگروباکتریوم

پس از تأیید نهایی ساخت سازه نوترکیب pBI121.*cor*، انتقال این پلاسمید به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* در دستور کار قرار گرفت. جهت انتقال ژن به گیاهان یکی از مفیدترین روشهای انتقال ژن، استفاده از باکتری خاکزی *A. tumefaciens* می‌باشد. به همین منظور لازم است که پلاسمید حامل ژن مورد نظر ابتدا به آگروباکتریوم منتقل گردد و در ادامه گیاهان تراریخت گردند. پس از تهیه سلول‌های مستعد آگروباکتریوم توسط محلول‌های شیمیایی کلرید کلسیم، سلول‌های مستعد سویه GV3850 باکتری *A. tumefaciens* به روش مشابه *E. coli* تراریخت گردیدند. جهت گزینش کلون‌های نوترکیب از محیط کشت حاوی ریفامپسین و کانامایسین در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت دو تا سه روز استفاده گردید.

تأیید تراریختی آگروباکتریوم

تأیید تراریختی آگروباکتریوم با استفاده از آزمون‌های Colony PCR، PCR با آغازگرهای اختصاصی *cor* و نیز

آغـازگر پیشـرو ژن *cor* همـراه بـا آغـازگر معکـوس خاتمه‌دهنده *nos* انجام گردید. جهت استخراج پلاسمید از آگروبـاکتریوم از کیـت اسـتخراج High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) استفاده گردیـد. در ایـن کیـت از محلول‌های آمـاده Binding Buffer، Washing Buffer و تیوب‌های Recovery جهت اسـتخراج خـالص پلاسـمید استفاده گردید. در پایان، محصول خالص‌سـازی شـده بـر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد.

تراریختی *P. somniferum* و باززایی گیاهان تراریخت

تراریختی ریزنمونـه‌هـای هیپوکـوتیلی شـقایق در سـه مرحله زیر انجام شد.

آمـاده‌سـازی سوسپانسـیون بـاکتری: بـرای انجـام تراریختی ابتدا تک‌کلونی آگروباکتریوم در محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بـر لیتـر کانامایسـین و همـین مقـدار ریفامپسـین در شـیکر بـا ۱٤۰ دور بـر دقیقـه و دمـای ۲۸ درجه سانتی گـراد در طـول مـدت شـب کشـت شـد. سوسپانسـیون بـاکتری بـا OD_{600} برابـر بـا ۰/۵ در دمـای ٤ درجـه سـانتی‌گـراد و ٤۰۰۰ دور بـه مـدت ۱۰ دقیقـه سانتریفیوژ و رسوب داده شد. سپس رسوب بدسـت آمـده با محـیط 1/2MS مـایع کـه دارای ۵۰ gr/l سـاکارز و pH برابـــر ۵/۵ بـــه همـــراه ۱۰۰µl استوســـرینگون (Acetosyringone) (200µM) بـود مجـدداً بـه حالـت سوسپانسیون درآمد، در ادامه باکتریها در شیکر ۲۸ درجـه سـانتی‌گـراد و ۱٤۰ دور بـر دقیقـه بـه مـدت ۳ سـاعت نگهداری شدند. این سوسپانسیون باکتریـایی بـرای تلقـیح ریزنمونه‌ها استفاده شد.

ترانسفورماسیون ریزنمونه‌های هیپوکـوتیلی شـقایق: ریزنمونه‌های هیپوکـوتیلی گیاهـان ۷ تـا ۹ روزه از ناحیـه نزدیک کوتیلدون و ناحیه نزدیک ریشه برش‌خـورده و در سوسپانسیون باکتری به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتـه و تکـان داده شد. سپس ریزنمونه‌ها از سوسپانسیون خـارج و روی کاغذ استریل جهت گرفتن باکتریهای اضافه مستقر شـدند. در ادامه ریزنمونه‌ها در محیط هم‌کشتی (Co-cultivation) B5 که حاوی ۲۰gr/l ساکارز بود به مـدت دو روز تحـت شرایط روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

حذف باکتری از ریزنمونه‌ها: بعد از هم‌کشتی، حذف باکتری از ریزنمونه‌ها با شستشو توسط محلول آبی حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسـیم (Ceffotaxime) انجـام گردید. پس از رفع آلودگی باکتریایی، ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی (Selective medium) تکمیل شده با ۲ میلی‌گـرم در لیتر هورمون توفوردی (2,4-D) و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۰۰ میلی‌گـرم در لیتـر سفوتاکسـیم جهـت القای کالوس منتقل و هر ۳ هفته یک بـار واکشـت انجـام گردید. پس از چند بار واکشت و تشکیل کالوس و القـای جنین‌هـای سـوماتیکی در محـیط فاقـد هورمـون، جهـت باززایی ساقه، جنین‌ها به محیط B5 بدون هورمون تکمیـل شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و ۱۰ میلی‌گـرم در لیتـر آنتـی‌بیوتیـک کانامایسـین و ۲۰۰ میلـی‌گـرم در لیتـر سفوتاکسیم منتقل گردید. سپس ساقه‌هـای القـاء شـده در محیط القای ریشه که همان محیط B5 تکمیل‌شـده بـا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA بود منتقـل شـدند. پـس از ۱۰-۸ هفته ریشه‌ها القاء شده و پس از دو بار واکشت بـه داخل گلدان منتقل گردیدند.

استخراج ترکیب‌های آلکالوئیدی از برگ‌های گیاهان شقایق

استخراج مواد آلکالوئیدی برگ‌ها با استفاده از محلـول متـانول و کمـی NaOH انجـام گردیـد. ابتـدا بـرگ‌هـای

نمونه‌های تراریخت و شاهد در آون با دمای ٦٠ درجه سانتی گراد به مدت ٤٨ ساعت خشک گردیدند. سپس با ۳۰ml متانول به مدت ١٤ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد ریفلاکس گردید. پس از سه مرحله استخراج، متانول تبخیر گردید. رسوب بدست آمده فیلتر شده و در نهایت در ۵ml متانول حل گردید. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های مختلف استخراجی به همراه نمونه استاندارد با استفاده از سرنگ ویژه بر روی صفحه آلومینیومی سیلیکاژل (۲۰ در ۲۰ سانتی‌متر با ضخامت ۰/۲ میلی‌متر و اندازه ذرات ٦-۵ میکرومتر، E-Merck، Germany) بارگیری شدند. در ادامه، این صفحه آلومینیومی در داخل تانک حاوی بافر ویژه تفکیک آلکالوئیدها شامل تولوئن-استون-اتانول-آمونیوم به نسبت (٤٠، ٤٠، ٦ و ۲) به مدت ٦٠ دقیقه قرار داده شد. در پایان و پس از خشک کردن صفحه آلومینیومی در معرض هوا، وجود باندهای موجود در برگ‌های تراریخت و شاهد در طول موج ۲۸۰ نانومتر با دستگاه Scanner 3، CAMAG و مجهز به نرم‌افزار win CATS تشخیص داده شد. محلول‌های استاندارد مورفین، کدئین، پاپاورین، نوسکاپین و تبائین نیز از محصولات شرکت تماد تهیه گردید.

در ادامه با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) میزان کمی تولید این ترکیب ها در نمونه‌های تراریخت و شاهد اندازه‌گیری شد. از دستگاه HPLC (مدل ٤١٠ Varian prostar) با ستون 3.9×30 mm C18 wat 011695 برای HPLC استفاده شد. فاز متحرک استفاده شده شامل ٦٠٪ Po4rNa2Po4H2Na و ٤٠٪ متانول با فشار ٠/٤٥ و مدت زمان ۲۰ دقیقه استفاده شد. طول موج ماوراءبنفش مورد استفاده برای شناسایی آلکالوئیدهای مرفین و کدئین ٢٥٤nm در نظر گرفته شد.

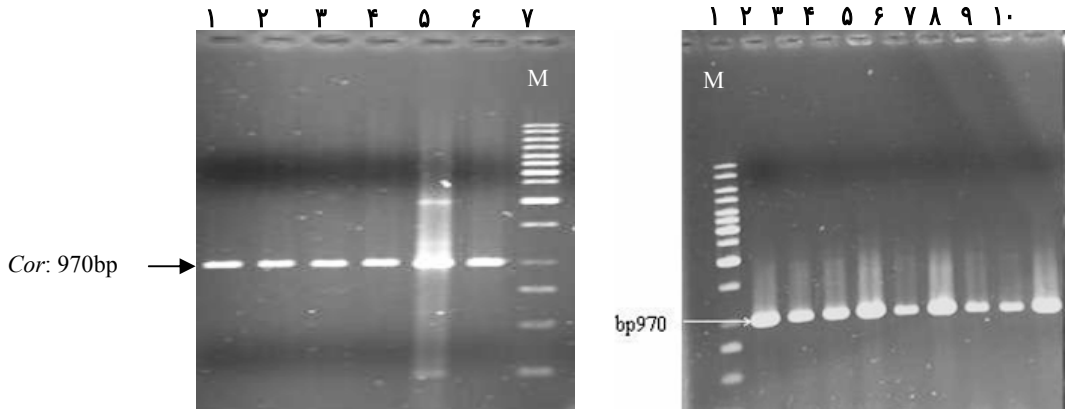
این آزمایش در آزمایشگاه کنترل کیفی شرکت تماد انجام گردید.

نتایج

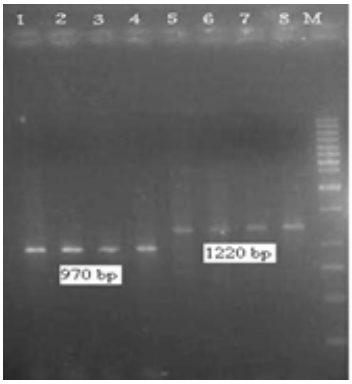
همسانه‌سازی ژن *cor*

پس از اتصال ژن مسئول بیوسنتز آنزیم COR به پلاسمید T/A، تراریختی باکتریهای مستعد *E. coli* انجام گردید. کلون های رشد یافته باکتری در دو محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و محیط مک‌کانگی به‌ترتیب انتخاب گردیدند. پس از استخراج پلاسمید، تأیید الحاق و تکثیر ژن مورد نظر در باکتری با استفاده از PCR و توالی آغازگرهای اختصاصی انجام گردید. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که پلاسمید pTZ57R/T نوترکیب بوده و حامل قطعه ۹۷۰ جفت بازی مربوط به ژن *cor* می‌باشد (شکل ٤- الف). یکی از روشهای تأیید سریعتر الحاق ژن، کاربرد آزمون Colony PCR و استفاده از کلونی‌های باکتری به‌عنوان الگو در واکنش PCR می‌باشد که در آن نیازی به استخراج پلاسمید نمی‌باشد. به همین منظور آزمون تأیید الحاق ژن از طریق Colony PCR نیز انجام گردید (شکل ٤- ب). نتایج این روش نیز الحاق ژن به داخل پلاسمید T/A را اثبات کرد.

نتایج تأیید الحاق ژن در باکتری آگروباکتریوم نشان داد که در واکنش‌هایی که از آغازگرهای اختصاصی *cor* در PCR استفاده شده بود قطعات با اندازه ۹۷۰bp تکثیر یافت، ولی در واکنش‌هایی که از آغازگر مستقیم ژن *cor* و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* (به منظور اطمینان از درج صحیح cDNA ژن*cor*) استفاده گردید اندازه قطعات تکثیری حدود ۲۵۰bp افزایش یافت (شکل ۵).



شکل ٤- تایید همسانه سازی ژن *cor* در ناقل pTZ57R/T الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *cor* (الف)، الکتروفورز الحاق ژن *cor* در یلاسمید با استفاده از Colony PCR (ب)، M مارکر ۱kb فرمنتاز

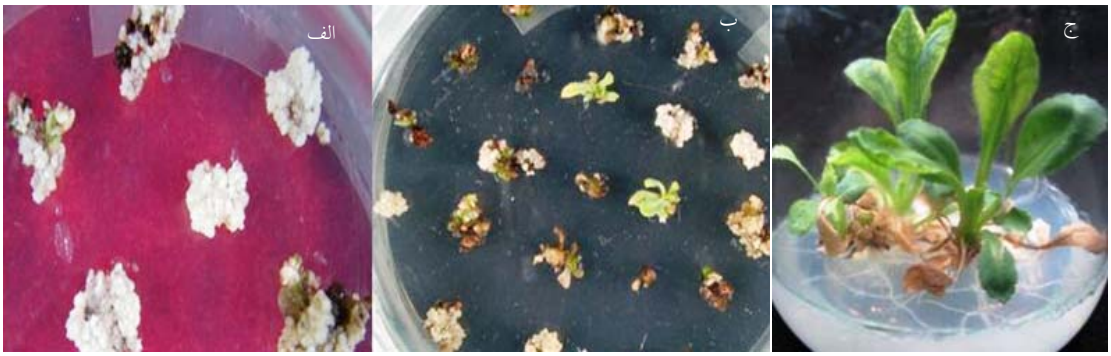


شکل ٥- تأیید تراریختی کلون‌های آگروباکتریوم از طریق الکتروفورز محصولات PCR

چاهک‌های ٤-۱ تأیید تراریختی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تکثیر حدود ۹۷۰bp ژن *cor*، ٤ چاهک بعدی تأیید تراریختی آگروباکتریوم با استفاده از آغازگر مستقیم ژن *cor* و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* و تکثیر حدوداً ۱۲۲۰bp. مارکر ۱kb فرمنتاز

باززایی گیاهان تراریخت

پس از تأیید صحت عملکرد سازه‌های ساخته شده توسط بیان موقت (Transient expression)، سلول‌های باکتری حامل پلاسمید pBI121.*cor* جهت تراریختی دائم ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی گیاهان *P. somniferum* استفاده گردید. پس از تراریختی ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی و القای کالوس در محیط انتخابی B5+2mg/l 2، 4-D + 200mg/l cefotaxime + 10mg/l kanamycin انجام شد. پس از گذشت ٤ ماه جنین‌زایی در محیط B5 فاقد هورمون حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین تکمیل شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. باززایی نیز در شرایط مشابه انجام گردید (متوسط نرخ باززایی گیاهان تراریخت ۸٪ بود). القای تشکیل ریشه در گیاهان شقایق بسیار مشکل می‌باشد و از همین طریق نرخ باززایی این گیاهان به‌دلیل مشکلات در عمل ریشه‌زایی بشدت کاهش می‌یابد (تنها ۵۰٪ گیاهان باززایی شده قادر به تولید ریشه کافی بودند). افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین باعث افزایش ۳۰-۲۰ درصدی ریشه‌زایی گردید. در نهایت٪ ۱۵ گیاه قادر به تولید میزان کافی ریشه شدند (شکل ٦).



شکل ٦- باززایی گیاهان تراریخت *P. somniferum*

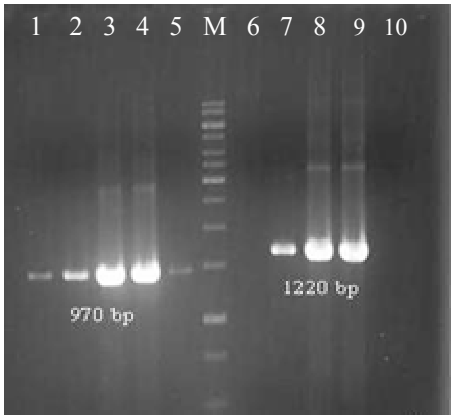
الف: تولید جنین‌های سوماتیکی در محیط انتخابی حاوی اسید آمینه گلوتامین

ب: باززایی گیاهچه‌های تراریخت احتمالی در محیط باززایی B5 فاقد هورمون به‌علاوه سفوتاکسیم

ج: ریشه‌زایی گیاهان تراریخت احتمالی در محیط B5 دارای پرولین و IBA

شناسایی ژن *cor* در گیاهان تراریخت

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR گیاهان تراریخته، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن *cor* و نیز با استفاده از آغازگرهای مستقیم و برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشها نشان داد که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ژن *cor* در گیاهان تراریخته و شاهد قابل شناسایی می‌باشد، ولی استفاده از آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* هیچ باندی را در گیاهان شاهد نشان نداد (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهد که ژن مورد نظر به درستی در ژنوم گیاهان تراریخته تلفیق یافته‌است. البته نتایج بررسی‌های مولکولی بر روی کلیه ۱۵ گیاه ریشه‌دار شده حضور ژن مورد نظر در آنها را تأیید نمود.



شکل ۷- تأیید تراریختی گیاهان شقایق الی‌فرا توسط ژن *cor* با استفاده از PCR

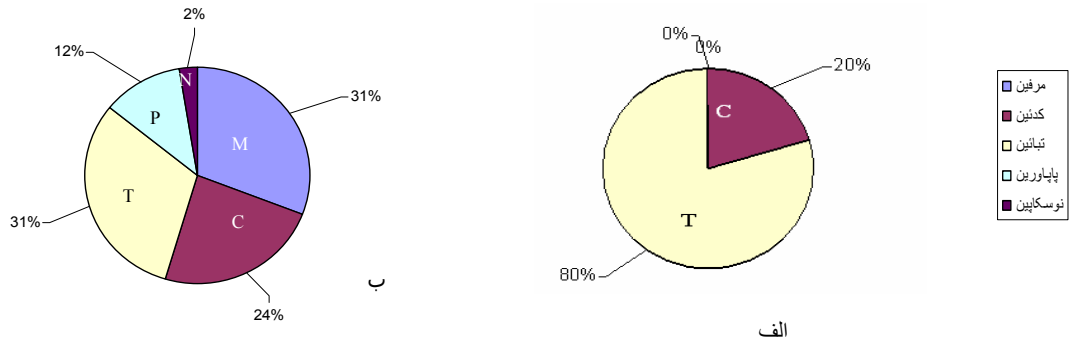
چاهک ۱، ۲ و ۵ تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *cor* و تکثیر قطعات به طول ۹۷۰bp، چاهک ۳، ٤، ۸ و ۹ کنترل مثبت (پلاسمید pBI121*cor*)، چاهک ۷ تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از آغازگر مستقیم ژن *cor* و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* و تکثیر قطعات به طول ۱۲۰۰bp و چاهک ۱۰ گیاه غیرتراریخته می‌باشد.

بررسی تغییر متابولیت‌ها در گیاهان تراریخت و شاهد

جهت سنجش درصد آلکالوئیدها در نمونه‌ها از روش HPLC و TLC استفاده شد. نتایج HPLC اولیه نمونه‌های برگی حکایت از افزایش تعداد و درصد آلکالوئیدها در نمونه‌های تراریخت در مقایسه با کنترل داشت.

جدول ۱- نتایج آنالیز HPLC در برگ‌های گیاهان تراریخته و شاهد

نوع آلکالوئید	درصد آلکالوئید برگ‌های گیاهان	
	شاهد	تراریخته
مورفین	۰	۰/۱۳
کدئین	۰/۰۹	۰/۱
تبائین	۰/۳۵	۰/۱۳
پاپاورین	۰	۰/۰۵
نوسکاپین	۰	۰/۰۱



شکل ۸- درصد ترکیب‌های مختلف آلکالوئیدی در نمونه‌های برگی گیاهان تراریخته و گیاهان شاهد

الف: گیاهان شاهد، ب: گیاهان تراریخته با ژن *cor*

C: کدئین، T: تبائین، M: مورفین، P: پاپاورین، N: نوسکاپین

نتایج آنالیز HPLC نشان داد که میزان، نوع و درصد ترکیب‌های آلکالوئیدی در نمونه‌های تراریخته و گیاهان شاهد متفاوت می‌باشد (جدول ۱). در حالی‌که در گیاهان شاهد تنها تبائین و مقدار کمی کدئین قابل تشخیص می‌باشد، اما در گیاهان تراریخته امکان شناسایی مورفین، پاپاورین و نوسکاپین وجود دارد. در گیاهان تراریخته با ژن *cor* بدلیل مصرف تبائین به‌عنوان پیش‌ماده بیوسنتز مورفین، کدئین و نوسکاپین، میزان تبائین کاهش یافته‌است. در حالی‌که در برگ گیاهان شاهد مورفین غیر قابل ردیابی می‌باشد، در گیاهان تراریخته امکان تولید مورفین در برگ فراهم گردیده‌است. همچنین در گیاهان تراریخته ترکیب‌های مؤثر دیگری نظیر پاپاورین و نوسکاپین تولید می‌گردد که در گیاهان شاهد امکان شناسایی و اندازه‌گیری آنها وجود ندارد. درصد

ترکیب‌های آلکالوئیدی به کل ترکیب‌ها نیز در بین نمونه‌های مختلف، متفاوت می‌باشد (شکل ۸). در حالی‌که درصد تبائین در گیاهان شاهد ۸۰٪ آلکالوئیدهای شناسایی شده را تشکیل می‌دهد. این نسبت پس از بیش‌بیان ژن *cor* برابر ۳۱٪ می‌باشد. درصد مورفین نیز در گیاهان تراریخته با ژن *cor* ۳۱٪ کل آلکالوئیدها را شامل می‌شود.

بحث

مورفین به همراه داروهای شیمی درمانی وینکریستین، وینبلاستین و کامپتوتسین یکی از مهمترین ترکیب‌های آلکالوئیدی است که به‌صورت تجاری از گیاهان دارویی استحصال می‌شود. افزایش میزان آلکالوئید باعث افزایش رقابت‌پذیری صنعت کشت شقایق می‌شود. با استفاده از روشهای اصلاح نباتات میزان آلکالوئید در دو دهه اخیر دو برابر شده‌است. با این حال، افزایش سریع در عملکرد مورفین از طریق اصلاح سنتی تقریباً محدود شده‌است. ترانسفورماسیون ژنتیکی گیاهان شقایق فرصت مناسبی را جهت افزایش و بهبود ترکیب‌های آلکالوئیدی در اندام‌های مختلف آن فراهم آورده‌است. در این راستا از راهبردهای مختلفی مانند افزایش فعالیت آنزیم‌ها در گلوگاه‌های مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها و مهار واکنش‌های جانبی نامطلوب که جریان مسیر را به سمت ترکیب‌های نامطلوب هدایت می‌نماید استفاده شده‌است (Kutchan, 1998؛ Facchini, 2001؛ Larkin *et al*., 2007).

تاکنون گزارش‌های مختلفی از باززایی گیاهان از بافت‌های مختلف *P. somniferum* گزارش شده‌است (Nessler & Mahlberg, 1979؛ Nessler, 1982؛ Yoshikawa & Furuya, 1985؛ Gerardy & Zenk, 1992؛ Schumacher *et al*., 1987؛ Ikuta *et al*., 1978؛ Dieu & Dunwell, 1988؛ Kapoor, 1995). همانند تحقیق حاضر، در بیشتر این مطالعات از ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی و کوتیلدونی به‌عنوان منبع اولیه در کشت بافت استفاده شده و باززایی ساقه از طریق جنین‌های سوماتیکی انجام شده‌است. با این حال قهوه‌ای شدن بافت‌ها و کشت‌ها مشکل همیشگی بوده‌است، به‌طوری که فراوانی باززایی معمولاً پایین بوده و انتقال موفق گیاهان ریشه‌دار به خاک به‌عنوان مشکل همیشگی باقی‌مانده است (Larkin *et al*., 2007). مطالعات اولیه کشت بافت شقایق نشان داد که میزان موفقیت در باززایی گیاهان در شرایط آزمایشگاهی رابطه مستقیمی با میزان آلکالوئید ارقام مورد مطالعه دارد. آزمایشها آشکار ساخت که کمترین میزان باززایی در ارقامی که دارای حداکثر میزان آلکالوئید بودند اتفاق می‌افتد. با این حال، با توجه به نیاز به انجام مطالعات افزایش بیان ژن در ارقام حاوی میزان بالای مورفین و کدئین، در این تحقیق از رقم Rence استفاده گردید. جهت بهینه‌سازی کشت بافت گیاهی نیز از ریزنمونه‌های کوتیلدونی، هیپوکوتیلی و برگی در آزمایشهای اولیه کشت بافت استفاده گردید که از بین آنها، ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی دارای بیشترین میزان القای کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی بودند. محیط کشت B5 تکمیل شده با دو میلی‌گرم در لیتر هورمون توفوردی در مقایسه با سایر ترکیب‌های هورمونی مورد استفاده بهترین نتایج را نشان داد (داده‌ها نشان داده نشده‌است).

جهت افزایش بیان ژن یکی از ضروری‌ترین مسائل استفاده از پیش‌برنده‌های قوی می‌باشد. تاکنون اغلب از پیش‌برنده CaMV35S و پیش‌برنده فاژ T7 استفاده شده‌است. در این تحقیق نیز پلاسمید pBI121 حامل ژن نشانگر *gus* و ژن *nptII* استفاده گردید. ژن *cor* تحت

کنترل پیش‌برنده CaMV35S در باکتریهای *E. coli* و *A. tumefaciens* وارد و با استفاده از روش هم‌کشتی باکتری-ریزنمونه گیاهی، در ژنوم گیاهان باززا شده الحاق گردید. بررسی مطالعات مولکولی گیاهان باززا شده در شرایط درون شیشه حضور ژن مورد نظر در گیاه را با رؤیت باندهای با اندازه تقریباً ۹۷۰bp که برابر با توالی کامل ژن *cor* می‌باشد، اثبات نمود. جهت آنالیز بیان ژن‌ها نیز از روش بیوشیمیایی HPLC استفاده گردید. ارزیابی‌ها نشان داد که در اثر افزایش بیان ژن *cor* میزان ترکیب‌های آلکالوئیدی شامل کدئین، مورفین، نوسکاپین و پاپاوریین در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش داشته‌است و در مقابل میزان تبائین کاهش یافت. حداکثر افزایش تولید نیز برای آلکالوئید مورفین در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده گردید. مورفین، نوسکاپین و پاپاورین در گیاهان شاهد قابل مشاهده نبود، در حالی‌که این ترکیب‌ها در گیاهان تراریخته به‌ترتیب در مقادیر ۰/۱۳، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد قابل شناسایی بودند. Larkin و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که افزایش بیان کدئینون ردوکتاز (*cor*) افزایش معنی‌دار مورفین در تمامی گیاهان تراریخته (در آزمایشهای مزرعه‌ای و گلخانه‌ای) را به همراه دارد. در این آزمایشها پس از چهار سال نشان داده شد که مجموع آلکالوئیدها بیش از ۲۸٪، مورفین ۲۲٪، کدئین ۵۸٪ و تبائین ۷۵٪ افزایش را نشان می‌دهد. این مطالعات آشکار ساخت که میزان تبائین در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان کنترل به میزان بالایی کاهش یافت. اگرچه میزان تبائین در گیاهان کنترل ۸۰٪ کل ترکیب‌های آلکالوئیدی برگ را شامل می‌شود، اما این میزان در گیاهان تراریخته به ۳۱٪ کل ترکیبهای آلکالوئیدی برگ تقلیل یافت. این موضوع نشان می‌دهد که آنزیم کدئینون ردوکتاز با مصرف پیش‌ماده‌های مراحل قبلی باعث افزایش تولید محصولات نهایی می‌گردد. آزمایشهای Allen و همکاران (۲۰۰٤) نشان داد که با مهار کامل تمام اعضای خانواده چند ژن *cor* با استفاده از RNAi، میزان ماده حد واسط اس-رتیکولین (۷ مرحله آنزیمی بالادست کدئین) در مقایسه با کدئین، مورفین، اریپاوین و تبائین افزایش می‌یابد. در این آزمایشها تجمع مشتقات متیله رتیکولین نیز مشاهده گردید. بنابراین با توجه به مواردی که ذکر گردید و نیز سایر تحقیقات، آزمایشهای افزایش بیان ژن نشان داده است که با دستورزی در بیان یک ژن سایر مسیرهای آنزیمی نیز دچار تغییر شده و در نتیجه میزان سایر آلکالوئیدها تغییر می‌یابد.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ژن‌های مورد نظر در بافت ژنوم گیاهی تلفیق شده‌اند و همراه با ژنوم گیاهان در تمامی سلول‌ها تقسیم شده و به سلول‌های دختری منتقل شده‌اند. نتایج PCR ژن‌ها با آغازگرهای پیشرو اختصاصی و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* نشان داد که ژن مورد نظر به‌صورت کاست بیانی در ژنوم میزبان تلفیق شده‌است. در حالی‌که در گیاهان شاهد باندی برای تکثیر با استفاده از آغازگرهای مستقیم ژن و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* تکثیر نگردید.

در مجموع، می‌توان گفت که با افزایش بیان *cor* پروفیل تولید متابولیت‌های مهم دارویی گیاه خشخاش تغییر یافته است. همان‌طور که انتظار می‌رفت تبدیل تبائین به ترکیب ارزشمند مورفین در برگ گیاه می‌تواند در برنامه‌های اقتصادی تولید ترکیب‌های دارویی این گیاه مؤثر باشد. از طرفی با توجه به تولید اختصاصی و ترشح این آلکالوئیدها در مجاری شیرابه‌ای، بررسی بیشتر و آنالیز

ترکیب‌های شیرابه‌ای کپسول گیاه نیز باید در برنامه‌های آینده مورد توجه قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- Allen, R.S., Millgate, A.G., Chitty, J.A. Thisleton, J., Miller, J.A.C., Fist, A.J., Gerlach, W.L. and Larkin, P.J., 2004. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in Opium poppy. Nature Biotechnology, 22: 1559-1566.
- Allen, R.S., Miller, J.A., Chitty, J.A., Fist, A.J., Gerlach, W.L. and Larkin, P.J., 2008. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in Opium poppy. Plant Biotechnology Journal, 6: 22-30.
- Di Fiore, S., Hoppmann, V., Fischer, R. and Schillberg, S., 2004. Transient Gene Expression of Recombinant Terpenoid Indole Alkaloid Enzymes in Catharanthus roseus Leaves. Plant Molecular Biology Reporter, 22: 15-22.
- Dieu, P. and Dunwell, J.M., 1988. Anther culture with different genotypes of Opium poppy (*Papaver somniferum* L.): effect of cold treatment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 12(3): 263-271.
- Facchini, P.J., 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 52(52): 29-66.
- Facchini, P.J. and Park, S.U., 2003. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in Opium poppy. Phytochemistry, 64: 177-186.
- Gerardy, R. and Zenk, M.H., 1992. Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. Phytochemistry, 32: 79-86.
- Ikuta, A., Syono, K. and Furuya, T., 1978. Alkaloids of callus tissues and dedifferentiated plantlets in the Papaveraceae. Phyochemistry, 13: 2175-2179.
- Kapoor, L.D., 1995. Opium poppy Botany, Chemistry and Pharmacology. Routledge, 326p.
- Kutchan, T. M. 1998. Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. 257-316, In: Cordell, G., (ed.), The Alkaloids. Academic Press, San Diego, *pp.* 257 316.
- Larkin, P.J., Miller, J.A.C., Allen, R.S., Chitty, J.A., Gerlach, W.L., Frick, S., Kutchan, T.M. and Fist, A.J., 2007. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. Plant Biotechnology Journal, 5**:** 26-37.
- Nessler, C.L. 1982. Somatic embryogenesis in the Opium Poppy, *Papaver Somniferum*. Physiolgia Plantarum, 55(4): 453-458.
- Nessler, C.L. and Mahlberg, P.G., 1979. Ultrastructure of laticifers in redifferentiated organs on callus from *papaver somniferum*. Canadian journal of botany, 57(6): 675-685.
- Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2344p.
- Schumacher, H.M., Gundlach, H., Fiedler, F. and Zenk, M.H., 1987. Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in Eschscholtzia cell cultures. Plant Cell Reports, 6(6): 410-413.
- Yoshikawa, T. and Furuya, T. 1985. Morphinan alkaloid production by tissues differentiated from cultured cells of *Papaver somniferum* (1). Planta Medica, 51(2): 110-113.
- Zulak, K.G., Weljie, A.M., Vogel, H.J. and Facchini, A.J., 2008. Quantitative HNMR metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming of primary and secondary metabolism in elicitor-treated opium poppy cell cultures. BMC Plant Biology, 8: 5.

Stable Over expression of codeinone reductase gene in transgenic *Papaver somniferum* L.

B. Hosseini[1*], H. Hashemi Sohi[2], F. Shahriari[3] and E. Dehghan[4]

1*- Corresponding author, Urmieh University, Urmieh, Iran, E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir
2- National Research Institute of Genetic Engineering and Biothechnology, Tehran, Iran
3- Faculty of Agriculture, Ferdowsi Univesity, Mashhad, Iran
4- PhD. student, Faculty of Agriculture, Ferdowsi Univesity, Mashhad, Iran

Received: February 2010 Revised: June 2011 Accepted: June 2011

Abstract

Papaver somniferum L. today is considered as the commercial source of the narcotic analgesics morphine and codeine. Codeinone reductase is a key gene in metabolic engineering of isoquinoline alkaloids pathway with the ability of conversion of codeinone to codein and morphine. In this project, at first optimization of the gene transfer of *P. somniferum* was performed via *A. tumefascience* containing pBI121 plasmid. This gene then was cloned in expression vectors under control of CaMV35 promoter and transferred to plants by agro transformation. After preparing the structure, hypocotyl explants of *P. somniferum* was inoculated by agrobacterium carrying recombinant structures. HPLC analysis indicated the variation of the amount, type and percentage of alkaloid compounds in transgenic samples compared to the control plants. The result of the evaluation showed qualitative and quantitative changes in metabolite production of transgenic and control plants.

Key words: Codeinone reductase, metabolic engineering, HPLC, *Papaver somniferum* L., *Agrobacterium tumefaciens.*