بسم الله الرحمن الرحيم

تایید اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیأت داوران نسخه ی نهائی پایان نامه خانم بهنوش سلطان محمدی تحت عنوان : انتقال ژن پروانسولین انسانی به روش اگروباکتریوم به گیاه گوجه فرنگی را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه ی علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر مختار جلالی جواران	دانشیار	
۲- استاد مشاور	دکتر حمید رجبی معماری	استادیار	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر قاسم کریم زاده	دانشیار	
۴- اساتید ناظر: ۱- داخلی	دکتر قاسم کریم زاده	دانشیار	
۲- خارجی	دکتر هوشنگ علیزاده	دانشیار	

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبیّنبخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

مادّه ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اطلاع دهد.

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامهٔ کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیوتکنولوژی است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران و مشاورهٔ جناب آقای دکتر حمید رجبی معماری از آن دفاع شده است"

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّه ۴ در صورت عدم رعایت مادّه ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ۶ اینجانب بهنوش سلطان محمدی دانشجوی رشته بیوتکنولوژی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:

تاریخ و امضاء:

۹۱/۵/۲۰

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب ، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه می باشد، باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی

انتقال ژن پروانسولین انسانی به گیاه گوجه فرنگی به روش آگروباکتریوم

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

استاد راهنما:

دکتر مختار جلالی جواران

استاد مشاور:

دکتر حمید رجبی معماری

تحقیق و تدوین از:

بهنوش سلطان محمدی

بهار ۱۳۹۰

تقدیم به:

پدر مهربان

مادر دلسوز

همسر عزیز

و

تنها خواهرم "بهاره"

چکیده :

گوجه فرنگی یکی از مهمترین سبزیجات و گیاهان مدل جهت انتقال ژن و تولید پروتئین نوترکیب است. روش تراریختی گوجه‌فرنگی یک روش با کارائی بالا و قابل تکرار برای همه ارقام نیست. بنابراین بهینه سازی و توسعه روش تراریختی در ارقام مختلف گوجه فرنگی ضروری است.

دیابت بیماری است که بدن نمی تواند هورمون انسولین تولید کند و یا به درستی از آن استفاده کند. بنابراین افراد مبتلا به این بیماری نیاز به مصرف روزانه انسولین دارند. درمان این بیماری با استفاده از تزریق روزانه انسولین تنها راه موثر برای درمان این بیماران بوده است. انتظار می رود که در آینده نزدیک افزایش میزان بیماری دیابت باعث افزایش میزان تقاضا برای هورمون انسولین گردد. گیاهان به عنوان بیوراکتور برای تولید پروتئین های نوترکیب در مقیاس وسیع وقیمت ارزان استفاده می شوند و پروتئین های مختلفی از جمله پروتئین های داروئی برای مصرف انسان در گیاهان تولید شده اند.

هدف اصلی از انجام این تحقیق، استفاده از گیاه به عنوان بیوراکتور جهت تولید پروانسولین به عنوان پروتئین نوترکیب و داروی دیابت می باشد. در این تحقیق بهینه سازی سیستم کشت بافت گوجه فرنگی در ۳ رقم اوربانا ، ریو گرند و کلجی به منظور انتقال ژن پروانسولین انسانی صورت گرفته است. ژن پرو انسولین انسانی که در ناقل *pCAMBIA1304* کلون گردیده، به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* منتقل شد و در نهایت به گیاه گوجه فرنگی منتقل گردید. گیاهچه های تلقیح شده بر روی محیط کشت حاوی ۵ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفاتوکسیم باززایی شده و پس از رشد کامل جوانه های باززایی شده، ریشه دار گردیدند و حضور ژن موردنظر پروانسولین از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تایید گردید.

واژه های کلیدی: ژن پروانسولین انسانی، انتقال ژن، اگروباکتریوم، باززایی، کشت بافت، گوجه فرنگی، زراعت مولکولی، دیابت

فهرست مطالب:

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- اهمیت مهندسی ژنتیک و لزوم استفاده از آن در اصلاح نباتات ۶

۲-۲- مزایای بهنژادی گیاهان از طریق مولکولی ۷

۲-۳- سیستم‌های مختلف بیان ژن هدف در گیاهان ۸

۲-۳-۱- انتقال ژن هدف به هسته سلول گیاهان ۸

۲-۳-۲- گیاهان تراریخت کلروپلاستی(ترانس پلاستومیکس) ۸

۲-۴- تهیه سازه برای انتقال ژن ۹

۲-۵- گوجه فرنگی ۱۰

۲-۵-۱- جایگاه رده بندی گوجه فرنگی ۱۰

۲-۵-۲- مشخصات گیاهشناسی ۱۱

۲-۵-۳- نیاز آب و هوایی ۱۲

۲-۶- کشت بافت گیاهی ۱۳

۲-۶-۱- کشت بافت گوجه فرنگی ۱۴

۲-۷- اصلاح گوجه فرنگی ۱۴

۲-۸- روش انتقال ژن به گوجه فرنگی با استفاده از آگروباکتریوم ۱۵

۲-۸-۱- باکتری آگروباکتریوم ۱۵

۲-۸-۱- مکانیسم بیماریزایی آگروباکتریوم ۱۶

۲-۸-۲- T-DNA ۱۶

۲-۸-۳- ژنهای القاء خاصیت بیماریزایی در باکتری (Vir genes) ۱۷

۲-۸- ۴- تکنیکهای تراریختی با استفاده از آگروباکتریوم ۱۹

۲-۸-۵- مزایا و معایب انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم ۲۱

الف : انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم از مزیتهای زیر برخوردار است ۲۱

۲-۸-۶- حاملهای انتقال ژن بر اساس پلاسمید Ti ۲۲

۲-۹- بیان موقت و پایدار ژن ۲۲
۲-۱۰- ژن پروانسولین انسانی ۲۳
۳-۱- تهیه مواد شیمیایی ۲۶
۳-۲-تهیه بذر گوجه فرنگی ۲۶
۳-۳- باکتری ۲۶
۳-۴- توالی ژن پروانسولین و پروتئین الحاقی ۲۸
۳-۵- آغازگرها ۲۸
۳-۶- تهیه ذخیره مادری (Stock) از باکتری ۲۸
۳-۷- تائید وجود ژن پرو انسولین در باکتری ۲۹
۳-۸- محیط کشت گیاهی MS ۲۹
۳-۸-۱-کلیات تهیه محیط کشت ۲۹
۳-۸-۲- آماده ساختن محیط کشت ۳۱
۳-۸-۳- محیط گزینشگر MS (Selection Media) ۳۲
۳-۹- کشت بذر ۳۳
استریل کردن بذور گوجه فرنگی ۳۳
۳-۱۰- کشت ریزنمونه ها ۳۴
۳-۱۰-۱- شرایط نگهداری کشتها ۳۵
۳-۱۱- تعیین سطح مؤثر هیگرومایسین ۳۵
۳-۱۲- تراریخت نمودن ریزنمونه های کوتیلدونی گوجه فرنگی ۳۶
۳-۱۲-۱- کشت مقدماتی ریز نمونه ها ۳۶
۳-۱۲-۲- کشت آگروباکتریوم ۳۶
۳-۱۲-۳- آماده سازی باکتری ۳۷
۳-۱۲-۴- تلقیح ریزنمونه ها ۳۷
۳-۱۲-۵- باززایی گیاهان تراریخت ۳۸

۳-۱۲-۶- محیط القاء ریشه ۳۸
۳-۱۳- استخراج DNAی ژنومی گیاه به روش CTAB ۳۹
۳-۱۳-۱- مواد موردنیاز استخراج DNA ۳۹
۳-۱۳-۲- روش کار ۴۰
۳-۱۳-۳- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA استخراجی ۴۱
۳-۱۳-۴- الکتروفورز ژل آگارز ۴۱
۳-۱۳-۴-۱- بافر TBE (۱۰ X) ۴۱
۳-۱۳-۴-۲- تهیه ژل آگارز ۴۲
۳-۱۳-۴-۳- تهیه بافر نمونه گذاری ۴۲
۳-۱۳-۴-۳-۱- مواد مورد نیاز در تهیه loading dye ۴۳
۳-۱۳-۴-۴- تهیه محلول اتیدیوم بروماید ۴۳
۳-۱۳-۴-۵- الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ۴۳
۳-۱۴- تکثیر قطعه DNA به روش PCR ۴۳
۴-۱- ظروف مورد استفاده ۴۶
۴-۱-۲- تیمار مورد استفاده برای ضدعفونی بذر ۴۷
۴-۲- بهینه سازی کشت بافت گوجه فرنگی ۴۷
۴-۲-۱- بهینه سازی کالوس زایی در ریز نمونه های گوجه فرنگی ۴۸
۴-۲-۲ – بهینه سازی سیستم باززایی از ریزنمونه های کوتیلدونی گوجه فرنگی ۵۰
۴-۲-۳- بهینه سازی سیستم ریشه زایی جوانه های باززایی شده از ارقام مورد بررسی گوجه فرنگی ۵۲
۴-۳- تعیین سطح موثر هیگرومایسین جهت انتخاب گیاهچه های تراریخت باززایی شده ۵۴
۴-۴- تایید حضور ژن پروانسولین انسانی در سازه و کلون های باکتری ۵۵
۴-۵- بهینه سازی فرایند تلقیح ریزنمونه ها گیاه گوجه فرنگی با آگروباکتریوم حاوی ژن هدف ۵۶
۴-۶- تائید گیاهان باززایی شده با استفاده از PCR آغازگرهای اختصاصی ۵۷
۴-۷- ریشه دار نمودن و سازگار کردن گیاهان تراریخت ۵۸

۴-۸- بحث ۵۹
۴-۹- پیشنهادات ۶۴
۵-۱- منابع ۶۶

فهرست اشکال :

شکل ۲-۱- تصویر کلی پلاسمید Ti ۱۶

شکل ۲-۲- مراحل انتقال ژن از پلاسمید Ti در آگروباکتریوم به سلول گیاهی ۱۷

شکل ۳-۱- نقشه ناقل بیانی *pCAMBIA1304* ۲۵

شکل ۳-۲- سازه حاصل از همسانه سازی ژن ۲۵

شکل ۴-۱- ظروف مورد استفاده جهت کشت بذر ۴۴

شکل ۴-۲- اثرات متقابل رقم × تیمارهای هورمونی بر روی میزان کالوس زایی ۴۷

شکل ۴-۳- اثرات متقابل رقم × تیمارهای هورمونی بر روی صفت باززایی گوجه فرنگی ۴۹

شکل ۴-۴- اثرات متقابل رقم × تیمارهای هورمونی بر روی صفت ریشه زایی ۵۱

شکل ۴-۵- بررسی و تعیین سطح مقاومت ریز نمونه های گوجه فرنگی ۵۲

شکل ۴-۶- نتایج حاصل از Colony PCR ۵۳

شکل ۴-۷- گیاه باززایی شده در محیط حاوی ۵ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین ۵۵

شکل ۴-۸- الکتروفورز DNA ژنومی ۵۵

شکل ۴-۹- نتایج PCR گیاهان ۵۶

شکل ۴-۱۰- گیاه تراریخت(حاوی ژن پروانسولین) در گلدان پرلیت ۵۷

فهرست جداول :

جدول ۳-۱- ترکیب محیط کشت MS ۲۸

جدول ۳-۲- غلظت آنتی بیوتیک های لازم برای محیط کشت ۳۱

جدول ۳-۳- تیمارهای هورمونی در کشت بافت گوجه فرنگی ۳۲

جدول ۳-۴- مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط LB ۳۴

جدول ۳-۵- مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر استخراج ۳۷

جدول ۳-۶- مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر TBE ۴۰

جدول ۳-۷- مواد موردنیاز جهت تهیه loading dye ۴۱

جدول ۴-۱- جدول تجزیه واریانس صفت کالوس زایی..... ۴۶
جدول ۴-۲- جدول تجزیه واریانس صفت باززایی..... ۴۸
جدول ۴-۳- جدول تجزیه واریانس صفت ریشه زایی..... ۵

۱-۱- مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در زیست شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی تصور عمومی را در مورد کاشت گیاهان به صورت سنتی و فقط به عنوان یک منبع غذایی به سمت اینکه گیاهان می‌توانند در نقش کارخانه‌های زیستی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و دارویی ایفای نقش نمایند، تغییر داده است. گیاهان به دلیل توانایی تولید نامحدود پروتئین‌های ایمن و ارزان نوترکیب دارای قابلیت کشاورزی زیستی هستند. تحقیقات گسترده در دو دهه اخیر نشان داده است که دامنه وسیعی از پروتئین‌های مهم و ضروری می‌توانند به طور مؤثری در گیاهان بیان شوند. نمونه‌هایی شامل پروتئین‌های سرم و فاکتورهای رشدی، آنتی بادی‌ها، واکسن‌ها، آنزیم‌های تجاری، پلیمرهای زیستی و معرف‌های مولکول‌های زیستی وجود دارند (Fischer and Emans ,2000).

سلول‌های گیاهی امکان تولید پروتئین‌های دارویی با هزینه کم و در حجم انبوه را فراهم نموده‌اند و همچنین توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه در آنها وجود دارد. اگر پروتئین‌های درمانی در گیاه تولید شوند و امکان مصرف آنها از طریق خوراکی فراهم گردد مرحله پرهزینه خالص‌سازی در فرایند تولید پروتئین‌های نوترکیب حذف می‌شود و همچنین امکان ذخیره راحت این پروتئین‌ها و عدم نیاز به افراد حرفه‌ای برای تزریق فراهم می‌شود. به دلیل مزایایی که تولید پروتئین‌های دارویی در گیاهان دارند پروتئین‌های دارویی مختلفی در گیاهان تولید شده‌اند و بیشترین میزان بیان و تولید پروتئینهای نوترکیب در گیاه توتون بوده است (Schillberg *et al*., 2002).

از مهمترین مزایای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهی می‌توان به اقتصادی‌تر بودن آن نسبت به سیستم‌های صنعتی، تولید فرآورده‌های بیولوژیکی فعال و مشابه شکل طبیعی، بیان بالای ژن و تولید بالای پروتئین نوترکیب، پایداری بیشتر و همچنین عدم وجود خطرات ناشی از آلودگی اشاره کرد (Daniell *et al*., 2001). در اواخر دهه ۸۰ میلادی تکنولوژی تولید پروتئین و DNA نوترکیب در گیاهان باعث کشف سیستم‌های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین‌های ارزشمند بودند. زراعت

مولکولی دارای پتانسیل بالایی در تولید نامحدود پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌ها می‌باشد (Schillberg *et al*., 2002).

مزیت عمده سیستم گیاهی در مقایسه با سایر سیستم‌ها این است که گیاهان می‌توانند جهت تولید هر نوع پروتئین در مقیاس زیاد با قیمتی حدود ۱۰٪ سیستم‌های دیگر مورد استفاده قرار بگیرند. این صرفه جویی به دلیل تمام نشدن سرمایه در مقایسه با سیستم‌های تخمیری و کاهش هزینه‌های پی در پی، توانایی نگهداری و برداشت گیاهان با استفاده از روش‌های سنتی و عدم نیاز فعالیت‌های کشاورزی به مهارت‌های خاص است. بر خلاف سیستم‌های تخمیری و حیوانات تراریخته میزان تولید در گیاهان زیاد و هزینه تولید ارزان است. برخلاف حیوانات تراریخته در سیستم گیاهی نیازی به نگهداری یک گله حیوان تراریخته نیست. همچنین مواد گیاهی می‌توانند به صورت بذر نگهداری و در موقع نیاز کشت و مورد بهره برداری قرار گیرند.

یک مزیت دیگر سیستم‌های گیاهی نسبت به سایر سیستم‌ها، سلامتی و ایمنی[1] آنهاست. زیرا معمولاً حاوی عوامل بیماری زای انسانی و حیوانی نیستند. اگر بتوان برخی پروتئین‌های نوترکیب خاص را در قسمت‌های خوراکی مثل دانه و میوه بیان کرد بسیاری از هزینه‌ها کاهش می‌یابد و یا به طور کلی حذف می‌شود. این عمل به ویژه در واکسن‌ها و آنتی‌بادی‌هایی برای ایمنی درمانی[2] کاربرد دارند(Daniell *et al*., 2001).

پروتئین‌های نوترکیب را می‌توان در بخش‌های مختلف گیاهی مانند میوه، ریشه، برگ، دانه و.. تولید نمود. تجمع پروتئین‌های نوترکیب در دانه فواید دیگری هم دارد. در غلات پروتئین‌های تجمع یافته در دانه می‌تواند در شرایط مختلف برای ماهها و یا سال‌ها بدون کاهش فعالیت بیولوژیکی پایدار باقی بماند. به علاوه جمع شدن اختصاصی پروتئین‌ها در دانه در مقایسه با تجمع در قسمت‌های رویشی بیشتر می‌تواند از افزایش پروتئین‌های مزاحم جلوگیری کند.

[1] -Safety

[2] -Immunotherapy

۱) سیستم‌های گیاهی نسبت به سیستم‌های تخمیری و بیورآکتورها اقتصادی‌تر هستند. به طورکلی، برآورد کرده‌اند که ارزش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان بسته به نوع گیاه می‌تواند یک دهم تا یک پنجاهم قیمت تولید همان پروتئین‌ها در فرمانتور و با استفاده از باکتری *E. coli* باشد (Ghislaine *et al*., 2008).

۲) امکان تولید انبوه پروتئین‌ها با منشأ خارجی در گیاهان وجود دارد. تخمین زده می‌شود که میزان تولید پروتئین‌ها در گیاهانی نظیر توتون، سویا و یونجه، بیش از ۱۰۰ کیلوگرم به ازای هر هکتار باشد (Maliga, 2002).

۳) امکان بیان پروتئین مورد نظر در قسمت خاصی از گیاه نظیر برگ، ریشه، دانه و یا در اندامک خاصی از سلول (نظیر کلروپلاست و میتوکندری) وجود دارد (Daniell *et al*., 2002).

۴) برخلاف باکتری‌ها، گیاهان (به دلیل یوکاریوت بودن) می‌توانند پروتئین‌های پیچیده یوکاریوتی را در شکل صحیح خود تولید کنند (Schillberg *et al*., 2002).

هم اکنون تقاضای روزافزون به داروهای بیولوژیکی، تشخیصی و در عین حال قیمت بالای آنها، دسترسی به آنها را محدود کرده است بنابراین به نظر می رسد که استفاده از بیوراکتورهای گیاهی جایگزین مناسبی برای سایر سیستمها باشد.

نزدیک به ۰/۷ ٪ جمعیت جهان به نوعی از دیابت مرتبط با انسولین رنج می‌برند (Winter *et al*., 2001). تخمین زده شده است که تعداد افراد مبتلا به دیابت دو برابر خواهد شد و تقریباً ۳۰۰ میلیون نفر در ۲۵ سال آینده به این بیماری مبتلا خواهند شد (Kjeldsen *et al*., 2001). بطور معمول در کشورهای صنعتی بیماری دیابت بعد از بیماریهای قلبی عروقی و سرطان سومین عامل مرگ و میر محسوب می‌شود (Barfoed, 1987). تا به حال درمان با استفاده از انسولین تنها روش موثر برای درمان دیابت نوع اول بوده است. درمان این بیماران نیازمند تنظیم دقیق میزان قند خون با تزریق متناوب انسولین می‌باشد. سخت بودن تزریق به بدن توسط خود شخص بیمار، منجر به عدم رضایت بیماران از روش تزریق شده است. برای فائق آمدن بر این مشکل، روشهای مختلفی برای راحتی مصرف انسولین ایجاد شده‌اند که شامل

مصرف ریوی انسولین و مصرف از طریق بینی می‌باشد (Goldberg and Gomez-Orellana, 2003; Cefalu, 2004). اگرچه ممکن است این روشها مقبول واقع شوند ولی برای جبران کاهش جذب از طریق این روشها میزان دز بیشتر (۵ الی ۲۰ برابر) مورد نیاز است. همراه با افزایش تعداد بیماران دیابتی در دنیا، معرفی روشهای مکمل جدید برای مصرف این هورمون و همچنین افزایش تقاضا برای هورمون انسولین (میزان رشد ۳ الی ۴ ٪ در سال) قابل پیش بینی است. این میزان تقاضا، لزوم توسعه روشهای ارزان، مقرون به صرفه و با ظرفیت تولید بالا را در آینده نشان می‌دهد (Nykiforuk *et al*., 2006).

انسولین یک پلی‌پپتید ۵۱ اسید آمینه‌ای است که دارای دو زنجیره مجزا می‌باشد. دو زنجیره A و B بوسیله دو باند دی‌سولفیدی که بین دو زنجیره تشکیل می‌شود به هم متصل می‌شوند. زنجیره A دارای یک باند دی‌سولفیدی درون مولکولی نیز می‌باشد. در سلول‌های بتای پانکراس انسان، انسولین به صورت یک زنجیره پلی‌پپتیدی منفرد ساخته می‌شود که به این زنجیره پلی‌پپتیدی پروانسولین گفته می‌شود. پیش‌ساز پروانسولین، پری پروانسولین می‌باشد که به عنوان ماده اولیه تولید پروانسولین در این سلول‌ها ساخته می‌شود. آنزیم‌های موجود در سلول‌های بتا، پری پروانسولین را شکسته و تبدیل به مولکول‌های کوچکتر پروانسولین می‌کنند. زنجیره A و B در مولکول پروانسولین بوسیله یک زنجیره پپتیدی متصل کننده (پپتید C) به هم متصل می‌شوند. پروانسولین بعد از تولید (بسته بندی و تشکیل باندهای دی‌سولفیدی) از طریق شکست آنزیمی که منجر به جدا شدن پپتید C می‌شود به انسولین تبدیل می‌شود (Farinas *et al*., 2007).

هدف از انجام این تحقیق، بهینه سازی کشت بافت گوجه فرنگی در ۳ رقم اوربانا، ریوگرند و کلجی به منظور انتقال ژن پروانسولین انسانی شد. ژن موردنظر در ناقل *pCAMBIA1304* کلون گردیده است و ناقل حاوی ژن پرو انسولین به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه *LBA4404* منتقل شده است تا انتقال ژن به روش اگروباکتریوم صورت گیرد.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- اهمیت مهندسی ژنتیک و لزوم استفاده از آن در اصلاح نباتات

کشاورزی دارای سابقه تاریخی بسیار عمیقی است که دست کم به هزاران سال قبل برمی‌گردد و طی این مدت انسانها برای اصلاح گیاهان زراعی با کیفیت غذایی بهتر، محصول بیشتر و خصوصیات مطلوب‌تر بطور مستمر و گسترده ای تلاش کرده اند.

مهندسی ژنتیک گیاهی به انتقال DNA خارجی که اطلاعات ژنتیکی ویژه‌ای را کد می‌نماید، از یک گونه بخشنده به داخل یک گونه گیرنده، توسط پلاسمید باکتریایی، ویروس یا سایر ناقلین اطلاق می‌گردد.

اصلاح واریته‌های جدید زراعی فرایندی طولانی و مشکل و همچنین تحقیقات جهت بهبود کیفیت محصولات کشاورزی، بسیار مهم می‌باشد. ژنهای جدید تغییر یافته، بوسیله ناقلین خاص به سلولهای منفرد گیاهی که در ظروف آزمایشگاهی رشد می یابند، تلقیح می‌شود. سپس گیاهان کامل را می‌توان از سلولهای منفرد جنسی یا غیر جنسی بوجود آورد. تکنیکهای مهندسی ژنتیک در سالهای اخیر دریچه جدیدی بر روی علم اصلاح نباتات گشوده، که عبارتند از:

۱) افزودن ژن یا ژنهای جدید بدون کاربرد دورگ‌گیری جنسی، که باعث ایجاد صفات مطلوب و مورد نظر در گیاهان تراریخت می‌گردد.

۲) افزایش میزان بیان ژن یا ژنهای مطلوب با وارد کردن تعداد کپی بیشتری از ژن یا ژنهای مورد نظر

۳) کاهش میزان بیان محصولات و یا خاموش نمودن ژن یا ژنهای مورد نظر

شایان ذکر است که اولین مهندس ژنتیک، خود طبیعت می‌باشد که باکتری آگروباکتریوم با انتقال ژن خود به گیاهان دولپه، آنها را به استخدام خود درآورده و ژن باکتری در گیاه بیان می‌شود. ما نیز با الهام از طبیعت است که به این مهم می‌پردازیم و تلاش می‌کنیم تا یک یا چند ژن مورد نظر را به گیاه منتقل نمائیم (ارزانی، ۱۳۸۳).

۲-۲- مزایای به‌نژادی گیاهان از طریق مولکولی

از جمله مزایای بهنژادی مولکولی نسبت به روش کلاسیک عبارتند از:

۱) می‌توان یک صفت خاص را تغییر داد بطوری که سایر صفات موجود زنده دست نخورده باقی بمانند و نیز در این روش صفات غیر دلخواه وارد گیاه تراریخت نمی‌شوند. در اصلاح نباتات سنتی به همراه انتقال صفت مطلوب و مورد نظر تعدادی از ژنهای ناخواسته هم به گیاه اصلاحی منتقل می‌شود(فارسی و ذوالعلی،۱۳۸۸).

۲) دوره اصلاحی و مدت زمان انتقال ژن با استفاده از این روش بسیار کوتاهتر از روش کلاسیک است زیرا نیازی به چندین نسل تلاقی برگشتی وجود ندارد. نظیر روش شجره‌ای یا بالک که جهت اصلاح یک رقم حداقل به ۱۲ سال نیاز دارند.

۳) امکان انتقال ژن یا ژنهای مطلوب از هر منبع ژنتیکی(مثلا" پروکاریوتی) به گیاه مورد نظر وجود دارد.

مراحل انتقال ژن به گیاهان زراعی بدین صورت است که در این روش باید یک ژن مطلوب را ابتدا شناسایی، بعدا" جداسازی و در نهایت پس از تهیه سازه ژن هدف آن را به گیاه مورد نظر منتقل نمود و سپس گیاهان واجد صفت مطلوب را انتخاب نمود و گیاهان را از لحاظ خصوصیات زراعی و کیفیت ارزیابی کرده و رقم مورد نظر را تولید نمود .

اصلاح گیاهان زراعی با استفاده از روش مهندسی ژنتیک طی این مراحل ضروری است:

۱) شناخت صفت یا صفات مطلوب مورد نظر

۲) استخراج ژنهای مطلوب از منبع ژنتیکی مورد نظر

۳) انتقال ژن یا ژنهای استخراج شده به سلولهای گیاهی مورد نظر.

۴) تولید گیاهان تراریخت از سلولهای دستورزی شده و تثبیت صفت یا صفات منتقل شده

۵) بررسی و مطالعه گیاهان تراریخت از نظر تعداد کپی های ژن منتقل شده و میزان بیان ژن