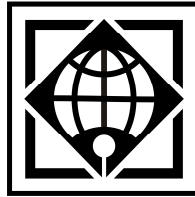


دانشگاه بین‌المللی امام خمینی



IMAM KHOMEINI
INTERNATIONAL UNIVERSITY

دانشکده فنی - مهندسی
گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

همسانه سازی cDNA ژن تیوردو کسین *h* (*VvTRXh*) از بافت حبه انگور رقم یاقوتی (*Vitis vinifera* L. cv. Yaquti)

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی گرایش

کشاورزی

نگارش:

سید شرف الدین موسوی

استاد راهنما:

دکتر رحیم حداد

استاد مشاور:

دکتر رامین حسینی

دکتر قاسمعلی گروسی

مرداد ۱۳۸۹

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تقدیم به:

پدر دلسوز

و

مادر مهربانم

که در راه پرورشم همچون شمع می سوزند

هرچه نیکیست نثارشان باد.

تقدیر و تشکر:

از پدر دلسوز و مادر مهربانم که راهنمایی‌ها، تشویق و دعای خیرشان پیوسته بدرقه کارم بود نهایت تشکر و سپاسگذاری را دارم و از خداوند قادر متعال هرچه خیر و نیکیست برایشان آرزومندم.

از راهنمایی‌ها و مساعدت‌های استاد راهنمای محترم، جناب آقای دکتر رحیم حداد که زحمت راهنمایی اینجانب را داشتند و بی‌تجربگی‌ها و اشتباهات اینجانب را بردبارانه تحمل نمودند، کمال تشکر و سپاس را دارم و از خداوند قادر متعال آرزوی بهترین‌ها را برای این استاد وارسته دارم.

از اساتید محترم مشاور جناب آقایان دکتر قاسم علی گروسی و دکتر رامین حسینی که حق استادی چه از لحاظ علمی و چه از لحاظ اخلاقی بر گردن اینجانب دارند و زحمت مشاوره بنده را نیز تقبل نمودند بی نهایت سپاسگذارم.

از داوران محترم داخلی و خارجی جناب آقایان دکتر امیر حسین بیگی مدیر گروه ژنتیک و اصلاح نباتات و دکتر شکیب عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج که زحمت داوری پایان نامه بر دوش این بزرگواران بود نیز کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم.

از اساتید گرامی جناب آقای دکتر جعفر احمدی عضو هیئت علمی گروه ژنتیک و اصلاح نباتات و دکتر علی احمدی عضو هیئت علمی دانشگاه الزهرا که زحمت استادی اینجانب را داشتند تشکر می‌کنم.

از مسئول محترم آزمایشگاه کشت بافت، سرکار خانم دکتر قنادنیا به خاطر مساعدت‌های بی دریغشان بی نهایت سپاسگذارم و از خداوند منان برای آقای سلیمانی مسئول آزمایشگاه بیولوژی مولکولی، توفیق خدمتگذاری هر چه بیشتر و بهتر را مسئلت دارم.

چکیده

تیوردوکسین‌ها پروتئین‌هایی فراگیر و از لحاظ وزن مولکولی کوچک (معمولاً شامل ۱۰۰ تا ۱۲۰ آمینو اسید) بوده و دارای پل دی‌سولفیدی انفعالی با توالی‌های کاملاً حفاظت شده -Cys- Gly (Ala/Pro)- Pro- Cys- می‌باشند. در این تحقیق، پس از استخراج RNA کل از بافت‌های برگ و حبه انگور (*Vitis vinifera* L.) رقم یاقوتی، سنتز cDNA از RNA استخراجی صورت پذیرفت. ژن تیوردوکسین h تحت عنوان *VvTrxh*، با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استاندارد از بافت حبه، جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pUC19 همسانه سازی گردید. ژن *VvTrxh* در روش مشابهی در ناقل دوگانه pBI121 متصل گردیده و سرانجام به آگروباکتریوم *Agrobacterium tumefaciens* (سویه pGV3101)، منتقل شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که ژن همسانه سازی شده، تیوردوکسیون h بوده و حاوی یک چارچوب باز خواندنی منفرد به طول ۳۴۵ bp می‌باشد که یک پروتئین با ۱۱۴ اسید آمینه را کد می‌کند. این ژن حاوی جایگاه فعال غیر معمول RCGLC، اسید آمینه تریپتوفان ویژه W و یک موتیف ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول در انتهای آمینوی (MAEE) خود می‌باشند. بررسی‌های ترتیب توالی با استفاده از نرم افزارهای Blastp و ClustalW، شباهت زیادی را بین توالی پروتئینی پیش بینی شده این ژن با ژن مورد نظر در بانک ژن NCBI و با تیوردوکسین h سایر گیاهان نشان داد. همچنین بررسی روابط فیلوژنتیکی به روش دندروگرام با استفاده از نرم افزار ClustalW نشان داد که این آیزوفرم متعلق به زیرگروه I تیوردوکسین‌های h می‌باشد.

کلمات کلیدی: انگور، همسانه سازی، تیوردوکسین، رقم یاقوتی، باند دی‌سولفیدی.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: مقدمه و کلیات

۲	۱-۱- تاریخچه انگور.....
۳	۲-۱- معرفی انگور.....
۳	۳-۱- گیاه شناسی انگور.....
۴	۱-۳-۱- زیرجنس یوویتیس.....
۴	۱-۳-۱-۱- گونه‌های آسیایی.....
۵	۱-۳-۱-۲- گونه‌های آمریکایی.....
۵	۱-۳-۱-۳- گونه‌های اروپایی.....
۵	۱-۳-۲- زیرجنس موسکادینه.....
۶	۴-۱- تقسیم بندی تجاری ارقام انگور.....
۶	۵-۱- توسعه و تولید.....
۶	۶-۱- انگورهای بی‌دانه.....
۷	۷-۱- ترکیبات شیمیایی موجود در انگور.....
۷	۱-۷-۱- پلی‌فنول‌ها.....
۷	۲-۷-۱- رسوراترول.....
۸	۳-۷-۱- آنتوسیانین.....
۸	۸-۱- ارزش غذایی انگور.....
۹	۱-۸-۱- روغن بذر انگور.....
۹	۲-۸-۱- عصاره انگور.....
۱۰	۹-۱- تیوردوکسین‌ها.....
۱۳	۱۰-۱- بیوتیول‌ها.....
۱۴	۱۱-۱- سیستم‌های تیوردوکسینی در موجودات زنده.....
۱۴	۱۲-۱- کشف تیوردوکسین در گیاهان.....

- ۱۳-۱- سیستم‌های تیوردوکسین‌های گیاهی..... ۱۶
- ۱۳-۱- سیستم فردوکسین- تیوردوکسین کلروپلاستی..... ۱۷
- ۱۳-۱-۲- سیستم سیتوسولی تیوردوکسین در گیاهان..... ۱۷
- ۱۳-۱-۳- سیستم تیوردوکسین- گلو تاردوکسین..... ۱۸
- ۱۳-۱-۴- سیستم تیوردوکسین- ریبونوکلئوتید ردوکتاز..... ۱۸
- ۱۳-۱-۵- سیستم NADH- تیوردوکسین و جوانه زنی بذر..... ۱۹
- ۱۴-۱- تیوردوکسین‌های سازواره‌های فتوستتزی..... ۲۰
- ۱۴-۱-۱- توالی‌ها و تکامل..... ۲۰
- ۱۴-۱-۲- ساختمان ثانویه..... ۲۰
- ۱۴-۱-۳- ساختار سه بعدی..... ۲۱
- ۱۴-۱-۴- جایگاه فعال تیوردوکسین..... ۲۱
- ۱۵-۱- ساختار درخت فیلوژنیک تیوردوکسین‌های گیاهی..... ۲۲
- ۱۶-۱- عملکردهای فیزیولوژیک تیوردوکسین‌ها در سازواره‌های مختلف..... ۲۳
- ۱۶-۱-۱- سازواره‌های غیر فتوستتزی..... ۲۳
- ۱۶-۱-۲- سازواره‌های فتوستتزی..... ۲۴
- ۱۶-۱-۲-۱- سیستم‌های کلروپلاستی..... ۲۴
- ۱۶-۱-۲-۲- سیستم‌های غیر کلروپلاستی..... ۲۵
- ۱۷-۱- سیستم‌های کاهشی تیوردوکسین..... ۲۶
- ۱۷-۱-۱- NADPH- تیوردوکسین ردوکتاز..... ۲۶
- ۱۷-۱-۲- فردوکسین- تیوردوکسین ردوکتاز (FTR)..... ۲۶
- ۱۸-۱- آنزیم‌های هدف مختلف مرتبط با سیستم کاهشی تیوردوکسین..... ۲۷
- ۱۹-۱- زیرگروه‌های مختلف ژن تیوردوکسین نوع *h*..... ۲۷

فصل دوم: بررسی منابع

- ۱-۲- پروتئین‌های تیوردوکسین..... ۲۹
- ۲-۲- تحقیقات ژنومیکس..... ۲۹
- ۳-۲- تحقیقات پروتئومیکس..... ۳۵

فصل سوم: مواد و روش ها

- ۱-۳- مواد گیاهی و نمونه برداری..... ۴۶
- ۲-۳- استخراج RNA کل..... ۴۶
- ۱-۲-۳- ضد عفونی وسائل و محلول‌های به‌کار گرفته شده در مراحل مختلف استخراج RNA کل..... ۴۶
- ۳-۳- تخمین کمیت و کیفیت RNA کل استخراج..... ۴۹
- ۱-۳-۳- اسپکتروفتومتری RNA کل استخراجی..... ۴۹
- ۲-۳-۳- الکتروفورز ژل آگارز- فرم آلدهید ۱/۲ درصد..... ۵۰
- ۴-۳- واکنش نسخه برداری معکوس و ساخت رشته اول cDNA..... ۵۲
- ۵-۳- الکتروفورز محصول واکنش نسخه برداری معکوس..... ۵۴
- ۶-۳- جداسازی ژن *VvTrxh* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نسخه برداری معکوس (PCR)..... ۵۶
- ۱-۶-۳- طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن..... ۵۶
- ۲-۶-۳- نحوه انجام PCR اختصاصی..... ۵۷
- ۳-۶-۳- PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمرز *pfu*..... ۵۸
- ۴-۶-۳- PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمرز *Taq*..... ۵۹
- ۷-۳- بررسی محصولات PCR..... ۶۰
- ۱-۷-۳- بررسی محصولات PCR بوسیله الکتروفورز ژل آگارز..... ۶۰
- ۲-۷-۳- بررسی محصولات PCR بوسیله هضم آنزیمی..... ۶۰
- ۸-۳- خالص‌سازی محصولات PCR از ژل آگارز..... ۶۲
- ۹-۳- هضم آنزیمی محصولات PCR خالص‌سازی شده از ژل..... ۶۳
- ۱۰-۳- هضم آنزیمی ناقل پلاسمیدی و حذف فسفر انتهای ۵'..... ۶۵
- ۱۱-۳- واکنش اتصال ژن *VvTrxh* به ناقل pUC19..... ۶۹
- ۱۲-۳- رشد و تکثیر باکتری *E. coli* و اگروباکتریوم..... ۷۰
- ۱۳-۳- محیط‌های کشت باکتریایی..... ۷۱
- ۱-۱۳-۳- محیط کشت LB..... ۷۱
- ۲-۱۳-۳- محیط کشت SOB حاوی آگار، آمپی‌سیلین، X-Gal و IPTG جهت انجام آزمون سفید-آبی..... ۷۲
- ۳-۱۳-۳- محیط کشت SOB حاوی آگار، کانامایسین و محیط کشت SOB حاوی آگار، کانامایسین و ریفامپیسین..... ۷۳
- ۴-۱۳-۳- محیط کشت SOC..... ۷۳

- ۷۴-۳-۱۴- ذخیره سازی باکتری های رشد یافته در محیط کشت مایع.....
- ۷۴-۳-۱۵- مستعد سازی سلول های *E. coli* با استفاده از کلرید کلسیم.....
- ۷۶-۳-۱۶- تهیه ذخیره سلول های مستعد.....
- ۷۷-۳-۱۷- انتقال پلاسمید حاوی ژن به سلول های مستعد *E. coli*.....
- ۷۸-۳-۱۷- تخمین بازده سلول های تراریخت با استفاده از کنترل مثبت.....
- ۷۸-۳-۱۸- آزمون سریع کلونی های نو ترکیب بوسیله PCR.....
- ۷۹-۳-۱۹- استخراج پلاسمید با استفاده از روش تحلیل قلیایی و SDS.....
- ۸۲-۳-۲۰- بررسی کلونی های نو ترکیب.....
- ۸۲-۳-۲۱- تعیین جهت ژن همسانه سازی شده در ناقل pUC19.....
- ۸۲-۳-۲۱-۱- هضم آنزیمی ناقل نو ترکیب.....
- ۸۴-۳-۲۱-۲- توالی یابی DNA.....
- ۲۲-۳- جداسازی ژن *VvTrxh* همسانه سازی شده از ناقل نو ترکیب pUC19 با استفاده از واکنش های زنجیره پلیمرز (PCR).....
- ۸۴-۳-۲۳- هضم آنزیمی ناقل دوگانه pBI121 و حذف فسفر انتهای 5'.....
- ۸۷-۳-۲۴- اتصال ژن *VvTrxh* به ناقل دوگانه pBI121.....
- ۸۷-۳-۲۵- انتقال ناقل نو ترکیب pBI121 به سلول های مستعد *E. coli*.....
- ۸۸-۳-۲۶- بررسی کلونی های نو ترکیب *E. coli*.....
- ۸۸-۳-۲۷- تعیین جهت ژن همسانه سازی شده در ناقل pBI121.....
- ۸۹-۳-۲۸- تهیه سلول های مستعد آگروباکتریوم با استفاده از کلرید کلسیم.....
- ۹۰-۳-۲۹- انتقال ناقل نو ترکیب pBI121 به سلول های مستعد آگروباکتریوم.....
- ۹۲-۳-۳۰- بررسی کلونی های نو ترکیب آگروباکتریوم.....
- ۹۲-۳-۳۰-۱- استخراج پلاسمید از آگروباکتریوم با استفاده از محلول قلیایی و SDS.....
- ۹۵-۳-۳۰-۲- تعیین جهت ژن همسانه سازی شده در ناقل pBI121 پس از استخراج از آگروباکتریوم.....

فصل چهارم: نتایج و بحث

- ۹۷-۴-۱- استخراج RNA کل.....
- ۱۰۲-۴-۲- واکنش نسخه برداری معکوس (RT) و سنتز DNA مکمل (cDNA).....
- ۱۰۴-۴-۳- واکنش زنجیره ای پلیمرز نسخه برداری معکوس (PCR) استاندارد.....
- ۱۰۶-۴-۴- خالص سازی محصول PCR از ژل آگارز.....

۱۰۸	۵-۴- نتایج هضم آنزیمی.....
۱۰۸	۵-۴-۱- تایید محصول PCR با استفاده از هضم آنزیمی.....
۱۰۸	۵-۴-۲- هضم آنزیمی ژن و ناقل پلاسمیدی pUC19 توسط آنزیم برشی <i>KpnI</i>
۱۱۰	۵-۴-۶- واکنش اتصال بین ژن <i>VvTrxh</i> و ناقل پلاسمیدی pUC19.....
۱۱۲	۵-۴-۷- انتقال مولکول DNA نوترکیب به درون سلول مستعد <i>E. coli</i>
۱۱۶	۵-۴-۸- تایید کلونی های نوترکیب.....
۱۱۶	۵-۴-۸-۱- شناسایی سریع کلونی های نوترکیب.....
۱۱۸	۵-۴-۸-۲- استخراج پلاسمیدهای نوترکیب از کلونی های تراریخته به روش تحلیل قلیایی با SDS.....
۱۱۹	۵-۴-۸-۳- تایید کلونی های نوترکیب بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR).....
۱۱۹	۵-۴-۸-۴- تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی.....
۱۲۰	۵-۴-۹- تعیین جهت ژن <i>VvTrxh</i> همسانه سازی شده با استفاده از هضم آنزیمی.....
۱۲۲	۵-۴-۱۰- توالی یابی DNA ژن های همسانه سازی شده.....
۱۲۲	۵-۴-۱۱- نتایج بررسی های ترتیب توالی و روابط فیلوژنتیکی.....
	۵-۴-۱۲- جداسازی ژن <i>VvTrxh</i> همسانه سازی شده از ناقل نوترکیب pUC19 با استفاده از واکنش های
۱۳۰	زنجیره ای پلیمرز (PCR).....
۱۳۱	۵-۴-۱۳- هضم آنزیمی ناقل دوگانه pBI121 و حذف فسفر انتهایی ۵'.....
۱۳۲	۵-۴-۱۴- واکنش اتصال بین ژن <i>VvTrxh</i> و ناقل دوگانه pBI121.....
۱۳۲	۵-۴-۱۵- انتقال ناقل نوترکیب pBI121 به سلول های مستعد <i>E. coli</i>
۱۳۳	۵-۴-۱۶- تایید کلونی های نوترکیب <i>E. coli</i>
۱۳۳	۵-۴-۱۶-۱- تایید کلونی نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی.....
۱۳۴	۵-۴-۱۶-۲- تایید کلونی نوترکیب بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR).....
۱۳۵	۵-۴-۱۷- تعیین جهت ژن همسانه سازی شده در ناقل pBI121.....
۱۳۷	۵-۴-۱۸- انتقال ناقل نوترکیب pBI121 به سلول های مستعد آگروباکتریوم.....
۱۳۸	۵-۴-۱۹- تایید کلونی های نوترکیب آگروباکتریوم.....
۱۳۹	۵-۴-۲۰- تعیین جهت ژن همسانه سازی شده پس از استخراج ناقل نوترکیب pBI121 از آگرو باکتریوم.....

فصل پنجم: جمع بندی و پیشنهادها

۱۴۲	۵-۱- جمع بندی.....
۱۴۴	۵-۲- پیشنهادها.....

منابع.....	۱۴۶
پیوست‌ها.....	۱۶۲
پیوست ۱- اطلاعات بدست آمده در رابطه با ژن <i>VvTrxh</i> موجود در بانک ژن NCBI با شماره دستیابی AM430243 جهت طراحی پرایمر و همچنین مقایسه ترتیب توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن <i>VvTrxh</i> همسانه سازی شده با آن.....	۱۶۲
پیوست ۲- محل قرارگیری آغازگرهای طراحی شده با مکان برشی آنزیم <i>KpnI</i> روی ژن <i>VvTrxh</i> موجود در بانک ژن NCBI با شماره دستیابی AM430243.....	۱۶۳
پیوست ۳- محل قرارگیری آغازگرهای طراحی شده با مکان برشی آنزیم <i>BamHI</i> روی ژن <i>VvTrxh</i> موجود در بانک ژن NCBI با شماره دستیابی AM430243.....	۱۶۳
پیوست ۴- تجزیه و تحلیل مکان‌های برشی ژن تیوردوکسین h موجود در بانک ژن NCBI با شماره دستیابی AM430243. با استفاده از نرم‌افزار آن لاین Restrictionmapper V.3 (www.Restrictionmapper.com).....	۱۶۴
پیوست ۵- نقشه ژنتیکی ناقل پلاسمیدی pUC19 به همراه توالی پلی لینکر آن (www.fermentase.com).....	۱۶۵
پیوست ۶- نقشه ژنتیکی ناقل دوگانه pBI121 (www.fermentase.com).....	۱۶۵
پیوست ۷- ترتیب توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن <i>VvTrxh</i> همسانه سازی شده با ژن موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم افزار ClustalW (http://clustalW.genome.ad.jp).....	۱۶۶
پیوست ۸- ژن ثبت شده <i>VvTrxh</i> در بانک ژن NCBI و با شماره دستیابی HM622264. این ژن توسط نگارنده و همکاران (۲۰۱۰) از بافت حبه گیاه انگور و رقم Yaquti استخراج، توالی یابی و به بانک ژن NCBI معرفی شده است.....	۱۶۷

فهرست جداول

صفحه

عنوان

۲۷	جدول (۱-۱) ویژگی‌ها و خصوصیات زیرگروه‌های I, II و III از تیوردوکسین‌های گروه h.....
۵۴	جدول (۱-۳) مقدار و غلظت ترکیبات واکنش سنتز cDNA.....
۵۷	جدول (۲-۳) مشخصات آغازگرهای استفاده شده جهت PCR اختصاصی ژن.....
۵۹	جدول (۳-۳) مقدار و غلظت ترکیبات PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمراز <i>pfu</i>
۵۹	جدول (۴-۳) چرخه حرارتی PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمراز <i>pfu</i>
۶۰	جدول (۵-۳) مقدار و غلظت ترکیبات PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمراز <i>Taq</i>
۶۲	جدول (۶-۳) مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی محصولات PCR.....
۶۴	جدول (۷-۳) مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی ژن <i>VvTrxh</i>
۷۰	جدول (۸-۳) مقدار و غلظت ترکیبات واکنش اتصال.....
۷۲	جدول (۹-۳) محیط کشت LB.....
۷۳	جدول (۱۰-۳) محیط کشت SOB.....
	جدول (۱۱-۳) مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی به منظور تعیین جهت ژن همسانه سازی شده بر روی ناقل پلاسمیدی pUC19.....
۸۳	جدول (۱۲-۳) مشخصات آغازگرهای استفاده شده جهت جداسازی ژن <i>VvTrxh</i> توسط PCR اختصاصی از ناقل نوترکیب pUC19.....
۸۵	جدول (۱۳-۳) مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی ناقل دوگانه pBI121.....
	جدول (۱-۴) نتایج اسپکتروفتومتری RNA کل استخراجی از بافت‌های مختلف گیاه انگور، رقم یاقوتی و مقایسه آن با روش یاندولینو و همکاران (۲۰۰۴).....
۱۰۲	جدول (۲-۴) نسبت‌ها و غلظت‌های مختلف ناقل و قطعه DNA در واکنش اتصال.....
۱۱۲	

فهرست شکل ها

صفحه

عنوان

- شکل (۱-۱) ساختار ثانویه و سه بعدی پروتئین تیوردوکسین به همراه جایگاه فعال آن..... ۱۲
- شکل (۱-۴) الکتروفورز RNA کل استخراجی از بافت های مختلف روی ژل آگارز- فرم آلدهید ۱/۲ درصد. ۱۰۱
- شکل (۲-۴) الکتروفورز cDNA سنتز شده در بافت های مختلف (حبه و برگ) روی ژل آگارز ۱/۲ درصد..... ۱۰۳
- شکل (۳-۴) الکتروفورز محصول PCR در بافت های مختلف روی ژل آگارز ۱/۲ درصد..... ۱۰۶
- شکل (۴-۴) الکتروفورز محصول PCR از بافت حبه، جهت خالص سازی ژن *VvTrxh* از ژل آگارز ۰/۸ درصد..... ۱۰۷
- شکل (۵-۴) الکتروفورز ژن *VvTrxh* از بافت حبه، پس از خالص سازی از ژل، روی ژل آگارز ۱/۲ درصد... ۱۰۷
- شکل (۶-۴) تایید محصول PCR از بافت حبه با استفاده از هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۷ درصد..... ۱۰۹
- شکل (۷-۴) ایجاد انتهای چسبان در ژن *VvTrxh* از بافت حبه با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده *KpnI* و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد..... ۱۱۰
- شکل (۸-۴) ایجاد انتهای چسبان در ناقل پلاسمیدی pUC19 با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده *KpnI* و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد..... ۱۱۰
- شکل (۹-۴) شناسایی کلونی های باکتریایی نوترکیب از بافت حبه با استفاده از آزمون سفید-آبی..... ۱۱۶
- شکل (۱۰-۴) آزمون سریع کلونی های نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد..... ۱۱۷
- شکل (۱۱-۴) الکتروفورز پلاسمیدهای نوترکیب استخراجی از کلون های تراریخته روی ژل آگارز ۰/۸ درصد..... ۱۱۸
- شکل (۱۲-۴) تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد..... ۱۱۹
- شکل (۱۳-۴) تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. ۱۲۰
- شکل (۱۴-۴) نتایج حاصل از تعیین جهت ژن همسانه سازی شده با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم های برشی *HindIII* و *Van91I* و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد..... ۱۲۱

شکل (۴-۱۵) توالی نوکلئوتیدی ژن *VvTrxh* همسانه سازی شده از بافت حبه انگور، رقم یاقوتی..... ۱۲۲

شکل (۴-۱۶) توالی پروتئینی ژن *VvTrxh* همسانه سازی شده از رقم یاقوتی به طول ۱۱۴ اسید آمینه. موتیف‌های ساختاری ویژه پروتئین بصورت ضخیم نشان داده شده‌اند..... ۱۲۲

شکل (۴-۱۷) هم‌ردیف سازی پروتئینی ژن *VvTrxh* همسانه سازی شده با ایزوفرم‌های دیگر انگور (زیرگروه I) و گیاهان دیگر با استفاده از نرم افزار ClustalW..... ۱۲۵

شکل (۴-۱۸) درخت فیلوژنتیکی رسم شده ژن همسانه سازی شده با سایر ایزوفرم‌های انگور و ایزوفرم‌های گیاهان ذرت، برنج، گندم، سویا، کلزا، توتون، سورگوم، نخود، یونجه، درخت صنوبر، صنوبر سیتکا، اوکالیپتوس، کرچک روغنی، آرابیدوپسیس، نیلوفر صحرائی، چچم، نوروک، فلفل زیتتی، سیب مانگرو، *Fagopyrum esculentum*، *Citrus sinensis*، *Capsicum annuum*، *Solanum berthaultii*، *Ipomoea batatas* و *Jatropha curcas*، به منظور تعیین زیرگروه ژن همسانه سازی شده با استفاده از نرم افزار ClustalW..... ۱۲۸

شکل (۴-۱۹) ایجاد انتهای چسبان در ژن *VvTrxh* با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده *BamHI* و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد..... ۱۳۱

شکل (۴-۲۰) هضم آنزیمی و حذف فسفر انتهای ۵' ناقل دوگانه pBI121 وحشی بترتیب با آنزیم های *BamHI* و آلکالین فسفاتاز روده گوساله (CIP) و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد..... ۱۳۲

شکل (۴-۲۱) تایید کلونی نو ترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد..... ۱۳۴

شکل (۴-۲۲) تایید کلونی‌های نو ترکیب با استفاده از تکنیک PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد..... ۱۳۵

شکل (۴-۲۳) تعیین جهت ژن همسانه‌سازی شده در ناقل pBI121 با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد..... ۱۳۶

شکل (۴-۲۴) کلونی‌های تراریخته باکتریایی حاوی pBI121 نو ترکیب..... ۱۳۷

شکل (۴-۲۵) تایید کلونی‌های نو ترکیب با استفاده از تکنیک PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد..... ۱۳۸

شکل (۴-۲۶) تعیین جهت ژن همسانه سازی شده در ناقل pBI121 با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد..... ۱۴۰

اختصارات

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Complementary deoxynucleic acid
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxynucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetra acetic acid
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FTR	Ferredoxin-thioredoxin reductase
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
Grx	Glutaredoxin
GS	Glutamine synthetase
GSH	Glutathione
GST	Glutathione S-transferase
gusA	β -glucuronidase
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactoside
Kan	Kanamycin
LB	Luria–Bertani medium
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NADPH	Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
NPTII	Neomycin phosphotransferase II
NTR	NADP-thioredoxin reductase
ORF	Open reading frame
PDI	Protein disulfide isomerases
Prx	Peroxiredoxin
PKR	Phosphoribulokinase
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RNA	Ribonucleic acid

PCR	polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
THL	Thioredoxin-like
TR	Thioredoxin reductase
Trp	Tryptophan
Trx	Thioredoxin
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- تاریخچه انگور

انگور بومی نواحی مدیترانه‌ای، اروپای مرکزی، آسیای جنوب غربی از مراکش تا اسپانیا و از شمال تا جنوب آلمان و از شرق تا شمال ایران می باشد (زوهاری و همکاران^۱، ۲۰۰۰).
پیدایش انگور روی کره زمین به ۱۳۰ تا ۲۰۰ میلیون سال پیش و ارتباط نوع بشر با این گیاه به دوره نئولیتیک^۲ (عصر حجر) باز می‌گردد. انگورهای وحشی توسط کشاورزان اولیه برداشت می‌شدند. هزاران سال است که میوه این گیاه استفاده‌های دارویی و خوراکی دارد. تاریخچه این گیاه با تاریخچه شراب گره خورده و همچنین تاریخچه اهلی شدن این گیاه به ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ سال پیش در جنوب غربی آسیا یا جنوب قفقاز (ارمنستان و گرجستان کنونی) باز می‌گردد (والکر و همکاران^۳، ۲۰۰۷).

اولین کتیبه‌های نوشته شده درباره انگور و شراب در شعرهای حماسی سومریان (۳۰۰۰ سال پیش) کشف شده است. همچنین سابقه این گیاه را می‌توان در خط هیروگلیف^۴ (خط تصویری مصری) در نزد مصریان باستان نیز مشاهده نمود و این نوشته‌ها نشان می‌دهد که شراب منحصرًا برای کشیش‌ها، ماموران محلی و فراعنه تهیه و آماده می‌شده است (پاری و همکاران^۵، ۲۰۰۶).

کشت و پرورش انگور و تولید شراب را یونان باستان، به اروپا معرفی نمود. در قرن سوم و چهارم با تضعیف رومیان، کشت و کار انگور محدود شد. تا قرن ۱۷ پرورش انگور به عنوان یک فعالیت اقتصادی حائز اهمیت بود، اما با گسترش اسلام این امر رو به زوال و انحطاط گذاشت. در دوره رنسانس^۶ انگورکاری مجدداً رونق گرفت. مقالات متعددی از این دوره در رابطه با انگورکاری و تولید شراب به جای مانده است (شی و همکاران^۷، ۲۰۰۳).

1- Zohary *et al.*
2- Neolithic period
3- Walker *et al.*
4- Hieroglyph
5- Parry *et al.*
6- Renaissance
7- Shi *et al.*

۱-۲- معرفی انگور

میوه انگور یک میوه نافرازگرا می‌باشد و از لحاظ گیاهشناسی یک میوه حقیقی به شمار رفته و در جنس ویتیس هم به صورت یک گیاه چوبی دائمی و هم به صورت خزان کننده یافت می‌شود. میوه انگور یکی از مهمترین محصولات باغی است که در بین میوه‌ها از نظر غذایی و خواص بهداشتی و دارویی در درجه اول اهمیت قرار دارد. همچنین از لحاظ اقتصادی نیز از درجه اهمیت بالایی برخوردار بوده و آن را می‌توان به صورت خام (تازه خوری) و یا در صنعت به اشکال مربا، آب‌میوه، ژله، سرکه، شراب، کشمش، روغن بذر انگور و همچنین در شیرینی پزی به کار برد (ساتو و همکاران^۱، ۲۰۰۲؛ امیر قاسمی، ۱۳۸۲). انگور در خوشه‌های ۶ تا ۳۰۰ تایی رشد کرده و به رنگ‌های قرمز، سیاه، آبی تیره، زرد و سبز دیده می‌شود. انگور سفید در اصل به این رنگ نبوده و طی فرآیند تکامل از انگورهای قرمز منشعب شده است؛ به این ترتیب که جهش در ۲ ژن تنظیمی انگورهای سفید، تولید آنتوسیانین^۲ که مسئول رنگ قرمز انگور است را متوقف می‌سازد (والکر و همکاران، ۲۰۰۷). آنتوسیانین و دیگر رنگرزه‌های شیمیایی، متعلق به خانواده پلی‌فنل‌ها^۳ بوده که در انگورهای قرمز مسئول تیرگی‌های گوناگون فرآورده‌های آن می‌باشد (برویلارد و همکاران^۴، ۲۰۰۳).

۱-۳- گیاه شناسی انگور

انگور گیاهی است از تیره‌ی آمپلی‌داسه^۵ که این تیره به نام‌های دیگری چون سارمانتاسه^۶ ویتاسه^۷ نیز خوانده می‌شود. گیاهان این تیره درختچه‌هایی هستند که دارای ساقه‌های گره‌دار بوده و به وسیله پیچک‌هایی که دارند، بالا رونده می‌باشند. این پیچک‌ها در مقابل برگ‌های پنجه‌ای

1- Sato *et al.*
2- Anthocyanins
3- Polyphenols
4- Brouillard *et al.*
5- Ampelidaceae
6- Sarmanthaceae
7- Vitaceae

شکل گیاه قرار گرفته و خود را به درخت یا دیوار چسبانده و موجب بالا رفتن گیاه می‌شوند (شی و همکاران، ۲۰۰۳). برگ‌های انگور به اشکال مختلف ساده یا مرکب بوده و از برگچه‌های منتهی به یک نقطه تشکیل شده است. گل‌هایی نر- ماده، پلی‌گام^۱، یک‌پایه یا دوپایه و مجتمع به صورت مختلف گرزنی یا خوشه دارند. کاسه گل آن ۵ دندانه‌ای، جام آن مرکب از ۵ گلبرگ آزاد و ۵ پرچم می‌باشد (پلوچر و همکاران^۲، ۲۰۰۳). عموماً پرچم‌هایی به تعداد گلبرگ‌ها و مادگی مرکب از ۲ برچه دارند که مجموعاً تخمدانی ۲ خانه و محتوی یک یا ۲ تخمک در هر خانه به وجود می‌آورند. میوه آن‌ها سته و محتوی ۲ تا ۴ دانه است. ساقه این گیاه گره‌دار و برگ‌هایش متناوب، دارای دم‌برگ دراز شامل ۵ لوب دندانه‌دار، به رنگ سبز تیره در سطح فوقانی پهنک است. این گیاه تقریباً دارای ۱۲ جنس و ۷۰۰ گونه می‌باشند که عموماً در مناطق معتدله و گرم کره زمین پراکندگی دارند (ریچ و همکاران^۳، ۲۰۰۸). این تیره دارای جنسی به نام ویتیس است که از لحاظ مرغوبیت میوه‌هایش، در موکاری مورد توجه می‌باشد (والکر و همکاران، ۲۰۰۷). این جنس دارای ۲ زیر جنس به شرح زیر می‌باشد:

۱-۳-۱- زیر جنس یوویتیس^۴

گونه‌های این زیر جنس از لحاظ ژنتیکی دارای عدد کروموزومی $2n=38$ می‌باشد. همچنین دارای صفات زراعی منحصر به فرد بوده و در موکاری از انواع مختلف آن‌ها استفاده می‌گردد. تا کنون ۳۵ گونه از این زیر جنس شناخته شده که بر حسب حوزه پراکندگی و منشأ اصلی آن‌ها به ۳ دسته زیر تقسیم می‌شوند (امیر قاسمی ۱۳۸۲):

۱-۳-۱-۱- گونه‌های آسیایی

۱۶ گونه از این دسته در مناطق شرق آسیا، چین، ژاپن، هندوستان و کره شناخته شده که از نظر پژوهشگران موکاری، بی اهمیت تلقی می‌شوند.

1- Polygamic
2- Plocher *et al.*
3- Reisch *et al.*
4- *Euvtis*