بسم الله الرحمن الرحیم

تقدیم به:

روح پاک پدرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه

زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم روحش شاد

و به مادرم دریای بی کران فداکاری و عشق

تقدیر و تشکر:

برای پدرم که تا آخرین لحظه عمرش پشتیبان و راهنمایم بود از خداوند طلب شادی روح و از مادر مهربانم که راهنمایی ها، تشویق و دعای خیرش پیوسته بدرقه کارم بود نهایت تشکر و سپاسگذاری را دارم و از خداوند قادر متعال هرچه خیر و نیکیست برایشان آرزومندم.

از راهنمایی ها و مساعدت های استاد راهنمای محترم، جناب آقای دکتر قاسمعلی گروسی که زحمت راهنمایی اینجانب را داشتند و بی تجربگی ها و اشتباهات اینجانب را بردبارانه تحمل نمودند، کمال تشکر و سپاس را دارم و از خداوند قادر متعال آرزوی بهترین ها را برای این استاد وارسته دارم.

از اساتید محترم مشاور جناب آقایان دکتر رحیم حداد 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 خانم دکتر دهقان نیری عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی قزوین و دکتر عباسی عضو هیئت علمی دانشگاه تهران که زحمت داوری پایان نامه بر دوش این بزرگواران بود نیز کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم.

از دکتر علی احمدی عضو هیئت علمی دانشگاه الزهرا که زحمت استادی اینجانب را داشتند تشکر می کنم.

از مسئول محترم آزمایشگاه کشت بافت، سرکار خانم دکتر قنادنیا و آقای سلیمانی مسئول سابق و آقای نظامی مسئول فعلی آزمایشگاه های کشت بافت و بیولوژی مولکولی به خاطر مساعدت های بی دریغشان بی نهایت سپاسگذارم.

و در پایان از همه کسانی که در این سه سال به اینجانب کمک کردند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

چکیده

اسکوپولامین و هیوسیامین از تروپان آلکالوئیدهای مهم دارویی هستند که بدلیل تاثیر آن‌ها بر سیستم عصبی در درمان تشنج، سیاه سرفه و برونشیت مزمن مورد استفاده قرار می‌گیرند. در فرایند تولید اسکوپولامین و هیوسیامین ماده پیش ساز، تروپینون در نتیجه اثر آنزیم TRI به دو متابولیت ثانویه یاد شده تبدیل می‌گردد، در حالی که در اثر آنزیم رقیب TRII به یک آلکالوئید غیرتروپانی بنام کالیستیژن تبدیل می‌شود. به منظور مطالعه میزان رقابت آنزیم های TRII و TRI با یکدیگر و میزان بیان دو متابولیت یاد شده، فاژمید pBluescript نوترکیب حاوی ژن *TR*II از *E.coli* تراریخت سوش DH5α استخراج و به همراه پلاسمید pBI۱۲۱ با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac* I برای همسانه سازی در جهت آنتی‌سنس و با استفاده از آنزیم برشی *Xba* I برای همسانه سازی در جهت سنس برش داده شدند.بعد از خالص سازی ژن هدف با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز در جهت آنتی سنس برای خاموشی و در جهت سنس برای افزایش بیان ژن *TR*II به داخل ناقل بیان pBI1121 معرفی گردید. ناقل نوترکیب pBI121 ابتدا برای تکثیر داخل *E.coli* سوش DH5α کلون شد و متعاقبا در آگروباکتریوم تومفاسینس سوش های LBA4404 و GV3101 و آگروباکتریوم رایزوژنز سوش MSV440 برای انتقال به گیاه کلون گردید. بعد از تایید پلاسمید نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و PCR، از آگروباکتریوم تومفاشینس سوش LBA4404 برای انتقال ژن *TR*II به گیاه تنباکو استفاده شد. موفق آمیز بودن انتقال ژن به تنباکو با استفاده از PCR با آغازگر های اختصاصی مقاومت به کانامایسین و ژن *TR*II تایید شد.

کلمات کلیدی: همسانه‌سازی، ناقل بیانی، تروپینون ردوکتازII، اسکوپولامین، pBI121

فصل اول: مقدمه و بررسی منابع

۱-۱ انتقال ژن..... ۲

۱-۱-۱ انتقال DNA از طریق آگروباکتریوم ۴

۱-۱-۲ مکانیزم انتقال DNA از طریق آگروباکتریوم..... ۵

۱-۲ فناوری RNA آنتی سنس..... ۶

۱-۲-۱ مکانیسم..... ۷

۱-۱-۲ مکانیسم تجزیه mRNA..... ۷

۱-۳ متابولیت های ثانویه گیاهی..... ۸

۱-۳-۱ آلکالوئید ها..... ۹

۱-۳-۲ مسیر های انتقال و محل ذخیره آلکالوئید ها در گیاهان..... ۱۰

۱-۳-۳ تروپان آلکالوئیدها..... ۱۳

۱-۳-۴ مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها..... ۱۵

۱-۳-۵ تروپان رداکتازها..... ۱۶

۱-۳-۵-۱ ساختار و وظیفه دو تروپینون رداکتاز (TRI و TRII)..... ۱۸

۱-۳-۶ افزایش میزان آلکالوئید های هیوسیامین و اسکوپولامین..... ۲۱

۱-۳-۷ الیسیتورها..... ۲۲

۱-۳-۸ تغییر سطح پلوئیدی برای افزایش تروپان آلکالوئیدها..... ۲۶

۱-۳-۹ مهندسی ژنتیک مسیر تولید متابولیت های ثانویه هیوسیامین و اسکوپولامین.....۲۷

۱-۴ هدف پژوهش.....۳۳

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ تجهیزات مورد نیاز.....۳۵

۲-۲ تهیه و خالص سازی ژن تروپینون رداکتاز **II** ۳۶

۲-۲-۱ استخراج فاژمید pBluescriptII SK/KS (-) **تراریخت از** *E.coli* **سوش** DH5α.....۳۶

۲-۲-۲ هضم آنزیمی فاژمید نوترکیب pBluscriptII SK/KS (-) ۳۸

۲-۲-۳ خالص سازی قطعه ژن TRII **ا**.....۳۹

۲-۲-۴ هضم آنزیمی و خالص سازی ناقل دو تایی pBI121 **و حدف فسفر پایانه ۵ (در حالت هضم آنزیمی با آنزیم** *Xba*I.....۳۹

۲-۳ اتصال ژن *TR*II به پلاسمید دوتایی pBI121 .....۴۱

۲-۴ مستعد سازی سلول های *E.coli*.....۴۳

۲-۵ تراریخت کردن سلول های *E.coli* با استفاده از شوک حرارتی.....۴۴

۲-۵-۱ تخمین بازده سلول های تراریخت با استفاده از کنترل مثبت.....۴۶

۲-۶ بررسی کلونی های تراریخت.....۴۶

۲-۶-۱ واکنش زنجیره ای پلی مراز.....۴۷

۲-۷ انتقال **pBI121** تراریخت با ژن ***TR*II** به آگروباکتریوم.....۴۸

۲-۷-۱ مستعد سازی آگروباکتریوم.....۴۸

۲-۷-۲ انتقال پلاسمید نوترکیب pBI121 **حاوی ژن** TRII **به سلول های مستعد آگروباکتریوم**.....۴۹

۲-۸ مواد گیاهی و تیمار جوانه زنی.....۵۱

۲-۸-۱ ضد عفونی بذرها.....۵۱

۲-۸-۲ کشت بذرها.....۵۲

۲-۹ تراریخت کردن گیاه.....۵۲

۲-۹-۱ تهیه ریز نمونه.....۵۲

۲-۹-۲ تهیه مایع تلقیح آگروباکتریوم ۵۲

۲-۹-۳ تراریخت کردن ریز نمونه ها.....۵۳

۲-۱۰ تایید تراریختگی از طریق واکنش زنجیره ای پلی مراز.....۵۵

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱ استخراج فاژمید **pBluescriptII SK/KS (-)** تراریخت از ***E.coli*** سوش **DH5α** **به** روش تحلیل قلیایی **SDS** ۵۷

۳-۲ هضم آنزیمی فاژمید نوترکیب و خالص سازی قطعه ژن ***TRII*** از روی ژل آگارز۵۸

۳-۳ هضم آنزیمی و خالص سازی ناقل بیانی دو تایی **pBI121** ۵۹

۳-۴ واکنش اتصال بین ژن ***TRII*** و ناقل بیانی دوتایی **pBI121**.....۶۰

۳-۵ مستعد سازی.....۶۱

۳-۶ انتقال مولکول **DNA** نوترکیب به درون سلول مستعد ***E.coli***.....۶۳

۳-۷ تایید کلونی های نوترکیب ۶۳

۳-۷-۱ شناسایی سریع کلونی های نوترکیب.....۶۳

۳-۷-۲ تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی ۶۴

۳-۸ تعیین جهت ژن ***TR*II** همسانه سازی شده در حالت وجود ژن ***gus*** با استفاده از هضم آنزیمی.....۶۶

۳-۹ انتقال ناقل نوترکیب **pBI121** در هر دو جهت سنس و آنتی سنس به سلول های مستعد آگروباکتریوم.....۶۷

۳-۱۰ تایید کلونی های نوترکیب آگروباکتریوم.....۶۸

۳-۱۱ تیمار جوانه زنی.....۶۹

۳-۱۲ تراریخت گیاه.....۷۰

جمع بندی کلی.....۷۴

پیشنهادات.....۷۵

منابع.....۷۵

پیوست ها

پیوست ۱ توالی نوکلوتیدی ژن *TRII* از گیاه بنگدانه ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI **با شماره دسترسی L2048 و به نام HYSTR2A**.....۸۵

پیوست ۲ نقشه ژنتیکی پلاسمید pBI121.....۸۷

پیوست ۳ مشخصات جایگاه های برشی ژن HYSTR2A.....۸۸

فهرست اشکال

شکل ۱-۱ سه مرحله لازم برای انتقال ژن به گیاه..... **۲**

شکل ۱-۲ خاموشی ژن از طریق mRNA **۷**

شکل ۱-۳ تکامل آکالوئید ها در فیلوژنی گیاهی..... **۱۱**

شکل ۱-۴ محل های هدف متابولیت های ثانویه بویژه آلکالوئید ها..... **۱۲**

شکل ۱-۵ مسیر سنتز تروپان آکالوئید های هیوسیامین و اسکوپولامین..... **۱۷**

شکل ۱-۶ مدل پروتئینی دو آنزیم تروپونین رداکتاز II و تروپینون رداکتاز I **۱۹**

شکل ۳-۱ فاژمید (-)pBluescript II SK/KS غیر تراریخت..... **۶۱**

شکل ۳-۲ الکتروفورز فاژمید نوترکیب و غیر نوترکیب **۶۲**

شکل ۳-۳ هضم آنزیمی فاژمید نو ترکیب در حجم زیاد..... **۶۳**

شکل ۳-۴ هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 در حجم زیاد وپلاسمید pBI121 و قطعه خالص شده..... **۶**

شکل ۳-۵ کلونی های E.coli تراریخت با پلاسمید pBI121..... **۶۵**

شکل ۳-۶ PCR کلون های تراریخت..... **۶۶**

شکل۳-۷ هضم آنزیمی کلون های تراریخت..... **۶۷**

شکل ۳-۸ پلاسمید pBI121 نوترکیب..... **۶۷**

شکل ۳-۹ تعیین جهت ژن همسانه سازی شده در پلاسمید pBI121 در حالت وجود ژن gus..... **۶۸**

شکل ۳-۱۰ پلاسمید pBI121 نوترکیب واجد ژن gus در حالت سنس و آنتی سنس..... **۶۹**

شکل ۳-۱۱ کلونی های آکرباکتریوم تومفشین LBA4404 تراریخت با پلاسمید نوترکیب pBI121.. **۷۰**

شکل ۳-۱۲ PCR و هضم آنزیمی آگروباکتریوم تراریخت..... **۷۱**

شکل۳-۱۳ گیاهان تنباکو و بنکدانه در محیط MS بعد از ضد عفونی..... **۷۲**

شکل۳-۱۴ گیاهان تنباکو تراریخته شده با ژن TRII رشد کرده در محیط حاوی کانامایسین..... **۷۴**

شکل۳-۱۵ ژل الکتروفورز DNA کل استخراج شده از گیاهان مشکوک به تراریختگی..... **۷۴**

شکل۳-۱۶ الکتروفورز PCR با پرایمر های اختصاصی ژن مقاومت به کانامایسین..... **۷۵**

شکل۳-۱۷ الکتروفورز PCR با پرایمر های اختصاصی ژن TRII..... **۷۵**

فهرست جداول

جدول ۱-۱ روش های انتقال ژن، توضیح مختصر و منبع آن..... ۳
جدول۱-۲ مسیر های انتقال الکالوئیدها در گیاهان..... ۱۱
جدول ۱-۳ دسته بندی آنزیم های TRI و TRII بواسطه اختلاف در فعالیت..... ۲۰
جدول ۲-۱ مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی فاژمید (-)pBluescript II SK/KS ترارخت..... ۳۸
جدول ۲-۲ مقدار و ترکیبات واکنش اتصال DNA هدف به ناقل پلاسمیدی pBI121..... ۴۲
جدول۲-۳ مشخصات پرایمر های اختصاصی ژن TRII..... ۴۹
جدول۲-۴ ترکیبات محلول واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر..... ۵۰
جدول۲-۵ انواع محیط های کشت استفاده شده در تراریخت تنباکو..... ۵۷
جدول۲-۶ توالی های آغاز گر ژن nptii..... ۵۹
جدول۳-۱ بررسی کیفیت و کمیت فاژمید استراجی با اسپکتروفتومتر..... ۶۲

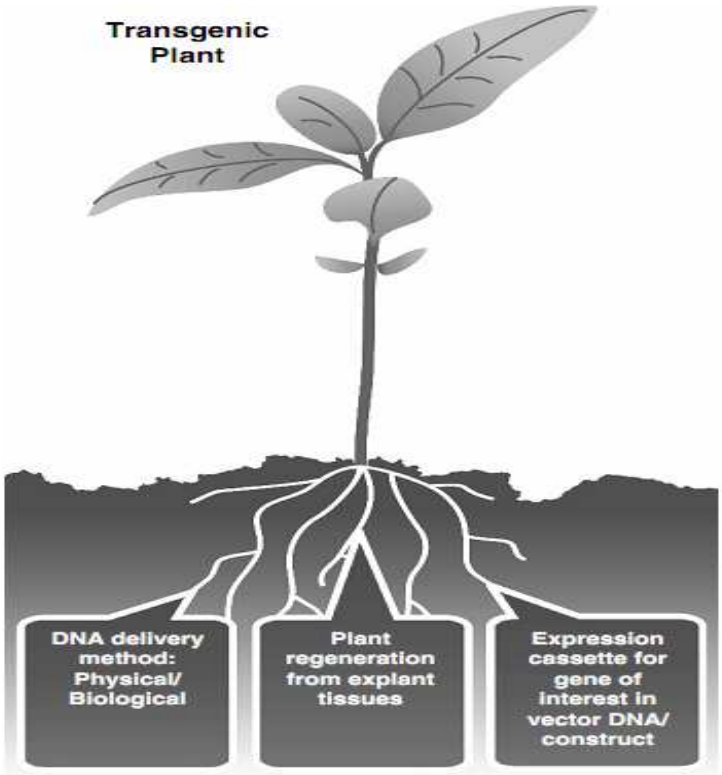
فصل اول:

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱ انتقال ژن

انتقال ژن به گیاه شامل ترکیب سه مرحله کلی (شکل ۱-۱)که عبارتند از الف) سیستم رها سازی DNA ب) سیستم کشت بافت ج) ناقل برای حمل DNA جهت انتقال به گیاه می باشد.(کول[1] و همکاران ۲۰۱۰)

یک روش ایده آل برای رها سازی ژن شامل انتقال DNA به سلول با کمترین آسیب به بافت گیرنده، تراریختگی پایدار ژنوم و مطالعه ازدیاد سلول بافت گیرنده برای باززایی بعدی گیاه تراریخته می باشد. روشهای انتقال عمومی ژن به دو دسته بیولوژیکی و فیزیکی تقسیم می شوند جدول(۱-۱). گروه بیولوژیکی شامل ارگانیسم های زنده از قبیل باکتری و ویروس برای رهایی و روش های فیزیکی شامل تکنیک های رها سازی DNA به طور مستقیم که با استفاده از مواد شیمیایی یا نیروی فیزیکی از قبیل فشار یا شارژ الکتریکی باعث رها سازی ناقل به سلول میزبان می شوند.(کول و همکاران ۲۰۱۰)



سه مرحله لازم برای انتقال ژن به گیاه (کول و همکاران ۲۰۱۰)

[1] Kole et al.

جدول ۱-۱ روش های انتقال ژن، توضیح مختصر و منبع آن(کول[1] و همکاران ۲۰۱۰).

روش	شرح مختصر	منبع
Physical delivery methods		
Bioactive beads	Calcium alginate microbead-immobilized DNA molecules for uptake by protoplasts	Sone et al. (2002), Liu et al. (2004), Murakawa et al. (2008a,b)
Electric discharge	Gold particle acceleration via electric discharge to target cells (ACCELL™ technology)	McCabe and Christou (1993)
Electrofusion	Fusion of protoplasts by electric pulses	Morikawa et al. (1986b)
Electrophoresis	DNA transferred electrophoretically to embryos	Ahokas (1989), Griesbach (1994)
Electroporation	Electric pulses delivered to protoplasts, mesophyll cells, intact tissues	Fromm et al. (1985), Lorz et al. (1985), Morikawa et al. (1986a), Li et al. (1991), Arencibia et al. (1995)
Laser micropuncture	Laser-mediated perforations in cells and tissues allow uptake of exogenous DNA	Guo et al. (1995), Badr et al. (2005), Kajiyama et al. (2008)
Liposomes	Liposome containing DNA taken up by protoplasts	Deshayes et al. (1985)
Macroinjection	Injection of DNA into floral tillers	de la Pena et al. (1987)
Microinjection	Injection of DNA into protoplasts, intact cells such as callus and embryoids	Griesbach (1983), Morikawa and Yamada (1985), Crossway et al. (1986), Griesbach (1987)
Nanoparticles	Honeycomb mesoporous silica nanoparticles containing DNA taken up by protoplasts	Torney et al. (2007)
Particle bombardment	Acceleration of microprojectiles such as tungsten and gold	Klein et al. (1988a), Sanford (1990), Vasil et al. (1991)
PEG-mediated DNA uptake	Protoplasts	Uchimiya et al. (1986)
Pollen	Pollen/plant DNA mixture used for self-fertilization in maize	Ohta (1986)
Pollen tube pathway	DNA applied to cut styles just after pollination and flows along pollen tube to the ovule	Luo and Wu (1989)
Silicon carbide whiskers	Vigorous shaking or vortexing of silicon carbide fibers with DNA and suspension cells, embryogenic callus	Kaeppler et al. (1992), Frame et al. (1994), Petolino et al. (2000)
Somatic cell hybrids	Fusion between protoplasts and generation of somatic hybrids	Carlson et al. (1972), Kao et al. (1974), Wallin et al. (1974)
Biological delivery methods		
Agrobacterium rhizogenes	Carrot disks, tobacco, and morning glory stem segments inoculated	Chilton et al. (1982), Tepfer (1984)
Agrobacterium tumefaciens	Tobacco stem segments, leaf disks	Barton et al. (1983), Fraley and Horsch (1983)
Agroinfection	Turnip leaves inoculated with *Agrobacterium* containing viral DNA engineered into T-DNA	Grimsley et al. (1986)
In planta	By-passes tissue culture, and *Agrobacterium* suspension applied by vacuum infiltration or dip to floral parts, meristems, embryo axis	Bechtold et al. (1993), Clough and Bent (1998)
Other microorganisms	*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, and *Mesorhizobium* strains engineered with disarmed Ti plasmid and used to inoculate tobacco and *Arabidopsis*	Broothaerts et al. (2005)
Combination of physical and biological methods		
Agrolistics	Combination of biolistic DNA delivery and *Agrobacterium*, wherein *vir*D1 and *vir*D2 genes are delivered biolistically and cause in planta excision of T-DNA	Hansen and Chilton (1996)
Sonication assisted	Plant tissue subjected to short periods of ultrasound in the presence of *Agrobacterium*	Trick and Finer (1997)

[1] Kole et al.

۱-۱-۱ انتقال DNA از طریق آگروباکتریوم

آگرو باکتریوم تومفاشینس[۱] یک باکتری گرم منفی و پاتوژن خاکزی است که با انتقال T-DNA به گیاه میزبان باعث ایجاد تومور گال قهوه ای می گردد (اسمیت و تاونسند[۲] ۱۹۰۷).

بر هم کنش آگروباکتریوم و سلول های یوکاریوتی تنها مکانیزم شناخته شده انتقال DNA بین سلسله های مختلف در طبیعت است. آگروباکتریوم می تواند T-DNA را به گروه وسیعی از ارگانیسم ها از قبیل گیاهان نهان دانه (تک لپه ای، دو لپه ای) بازدانگان و قارچ ها (مخمر[۳]، اسکومایست[۴] و بازیدو مایست[۵]) انتقال دهد مشخص شده که اگروباکتریوم می تواند DNA را به سلول های انسانی نیز منتقل کند(قلوین[۶] ۲۰۰۳).

تراریخته کردن با استفاده از آگروباکتریوم به طور گسترده برای تحقیقات در زیست شناسی و اصلاح گیاهان زراعی از سال ۱۹۸۳ مورد استفاده قرار می گیرد. مزیت های این روش نسبت به بقیه روش های دیگر عبارتند از:

۱- در درصد بالایی از ریز نمونه های تراریخته شده تنها یک کپی از T -DNA به داخل کروموزوم سلول تراریخت[۷] شده وارد می شود (کروزت[۸] و همکاران ۲۰۰۲).

۲- بیان پایدار ژن به علت درج ژن خارجی در کروموزم گیاه میزبان[۹]

۳- با این روش امکان انتقال قطعات بزرگی از DNA شامل کروموزم های مصنوعی باکتری وجود دارد(همیلتون[۱۰] و همکاران ۱۹۹۲).

۴- امکان تراریخته کردن in plant بدون نیاز به کشت بافت در بعضی از گونه ها از قبیل *Arabidopsis thaliana* و *Medicago trunculata* (تریو[۱۱] وهمکاران ۲۰۰۰) وجود دارد.

۵- سیستم های ناقل متعددی که شامل T-DNA، ژن های گزارشگر[۱۲] و نشانگر های انتخابی[۱] هستند در دسترس می باشند.

---

[1] Agrobacterium tumefaciens
[2] Smith and Townsend
[3] yeast
[4] ascomycete
[5] basidiomycete
[6] Gelvin
[7] Transform
[8] Crouzet *et al.*

۹

[10] Hamilton *et al.*
[11] Trieu *et al.*
[12] Reporter genes

با وجود همه این مزیت ها رسیدن بـه قابلیـت تکـرار پـذیر و سـازگار کـه پـیش نیـاز آزمـایش هـای تراریختگی در مقیاس بزرگ در زیست شناسی گیاهی هستند، سخت است.

۱-۱-۲ مکانیزم انتقال DNA از طریق آگروباکتریوم

اسید های آمینه، پلی ساکارید ها و اسید های آلی که از بافت های گیاهان زخمی ترشح مـی شود باعث جذب آگروباکتریوم به بافت زخمی می گردد در پاسخ به این جذب شیمیایی بعد از حرکت آگروباکتریوم به طرف سلول های زخمی از طریق مکانیزم جذب قطبی[۲] به آنها متصل می شود(تزفیرا و وینانس[۳]۲۰۰۲). در مدت جذب بیان هماهنگ یک سلسله اپران های ژنتیکی برای انتقـال ژن آغـاز می شود (استاچل[۴]۱۹۸۵). این اپران هـا vir B، *vir*C ، *vir*D، *vir*E و *vir*G کـه regulan vir نامیـده می شوند، به طور هماهنگ توسط یک سیستم دوگانه virA/virG تنظیم می شوند.

ترکیبات فنولیک و پلی ساکاریدی به طور مستقیم و غیر مستقیم سبب اتو فسفوریلاسـیون[۵] کیناز گیرنده انتقالی غشایی[۶] وابسته به *vir*A می شوند که به نوبه خود باعث فعالیت فـاکتور نسـخه برداری وابسته به *vir*G محلول در سیتوپلاسم از طریق دیگر وقایع فسفوریلاسیون[۷] می گردد. فعالیت *vir*G متعاقبا باعث تحریک نسخه برداری از اپران های تخصصی vir از طریق اتصال به بالا دست جعبه vir عناصر افزایش دهنده/سیس[۸] می شوند (زوپان و وینـانس[۹]۲۰۰۰). محصـولات ژن تولیـد شـده از اپران های vir نقش کارکردی مهمی در انتقال T-DNA از T پلاسـمید در بـاکتری بـه سـلول هـای گیاهی دارند.

تولیدات ژن های *vir*D1 و *vir*D2 به طور هماهنگ مسئول شکسـته شـدن رشـته T محـدود شده به وسیله توالی های حاشیه[۱۰] (چپ و راست) (استاچل[۱۱]۱۹۸۵) می باشـند. پـروتئین *vir*D2 بـه صورت کووالانسی به انتهای ۵ رشته T متصل شده و سپس با *vir*E2 یک پروتئین تک رشته ای دیگر درباکتری یا گیاه، پوشیده شده و تشکیل کمـپلکس T را مـی دهنـد. کمـپلکس T از طریـق سیسـتم

---

[1] Selectable marker
[2] polar attachment mechanism
[3] Tzfira and winans
[4] Stachel
[5] autophosphorylation
[6] virA transmembrane receptor kinase
[7] phosphorylation
[8] vir box cis/enhancer elements
[9] Zupan and Winans
[10] border sequences
[11] Stachel

ترشحی نوع چهار باکتری که به وسیله اپران *vir*B و*vir*B4 کد می شوند صادر می گردد.(ورگونست[1] ۲۰۰۰)

*vir*D2 و *vir*E2 شامل توالی های موضعی هسته ای هستند که با اثر متقابل ترکیبات گیاهی شامل Importin-α و یک نوع فسفات پروتئین ۲c[2] و سه سیکلوفیلین[3] (فاکتور های واکنش دهنده با virD2) و vip1 و vip2 (فاکتور های واکنش دهنده با virE2) با هم کمک می کنند تا کمپلکس T وارد هسته گیاه گردد.

سمت دیگر رشته T از طریق نوترکیبی غیر هومولوگ از طرق پروتئین های کد شده به وسیله گیاه که شبیه بخشی از فرایند نوترکیبی یا فرایند تعمیر در گیاهان است به هسته متصل می شود.(تزفیرا و چیلتون[4] ۲۰۰۲)

بیان ژن های *vir* از Ti ناقل آگروباکتریوم به وسیله چندین فاکتور آزمایشی افزایش می یابد که عبارتند از:

۱-ترکیبات فنولی(اسپنسر و تووزر[5] ۱۹۸۸)

۲- استوسیرینگون[6] از ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرو مولار(شیمودا و همکاران[7] ۱۹۹۰)

۳- ساکاروز

۴-PH محیط هم کشتی بین ۵/۶-۵/۴(موندال و همکاران[8] ۲۰۰۱)

۵-دما فاکتور مهم در اتصال باکتری و بیان ژن های vir (فولنر[9] ۱۹۹۶)

۱-۲ فناوری RNA آنتی سنس

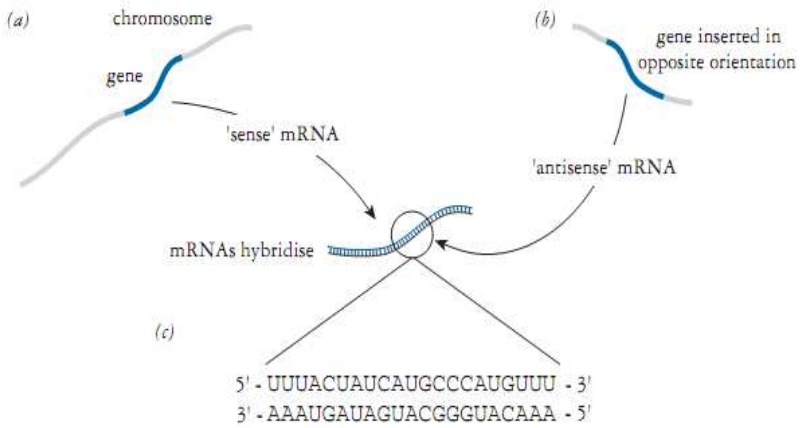
RNA آنتی سنس فرایندی است که طی آن یک مولکول RNA دو رشته ای از بیان ژن معینی جلو گیری می کند. این ژن ضرورتا از نظر توالی با RNA دو رشته ای همولوگ است. مهار

[1] Vergunst
[2] 2C protein phosphatase
[3] cyclophilins
[4] Tzfira and Chilton
[5] Spencer and Towers
[6] acetosyringone
[7] Shimoda *et al.*
[8] Mondal *et al.*
[9] Fullner *et al.*

بیان ژن، ازطریق تجزیه mRNA انجام می شود و به همین دلیل این فرایند را نوعی مکانسیم خاموشی بعد از ترجمه ژن (PTGS[1]) می نامند(فیر[2]۱۹۹۹).

۱-۲-۱ مکانیسم

در این فناوری توالی معکوس ژن در جهت بر عکس به گیاه منتقل می شود. بعد از نسخه برداری از ژن و توالی آنتی سنس منتقل شده، به دلیل مکمل بودن به هم دیگر متصل می شوند. mRNA دو رشته ای تولید شده نمی تواند ترجمه شود و باعث خاموشی بیان ژن می گردد شکل۱-۲.



شکل۱-۲ خاموشی ژن از طریق mRNA آنتی سنس، (a) ژن موجود در ژنوم خود گیاه سنس، (b) ژن دست ورزی شده در ژنوم گیاه به صورت آنتی سنس، (c) RNA دو رشته ای تولید شده.

۱-۲-۲ مکانیسم تجزیه mRNA

مهره های کلیدی در فرایند تجزیه mRNA دو رشته ای دو آنزیم به نام های دایسر[3] وآرگونات[4] و یک نوع مولکول RNA کوچک به نام siRNA[5] است. مراحل این فرایند را می توان در دو بخش در نظر گرفت.

[1] Post-transcriptional gene silencing
[2] fire
[3] Dicer
[4] Argonaut
[5] Small interfering RNA

۱- مرحله آغاز: RNA دو رشته ای بلند(dsRNA[1]) توسط آنزیم دایسر به قطعاتی با طول ۲۱-۲۳ جفت باز شکسته می شوند که به siRNA معروفند و مولکول های اجرایی این فرایند هستند(برنستین[2] و همکاران۲۰۰۱).

۲- مرحله اثر: siRNA داخل یک کمپلکس چند پروتئینی به نام RISC[3] قرار می گیرند. سپس رشته آنتی سنس siRNA این کمپلکس را به سمت mRNA هدف هدایت می کند(این mRNA دارای توالی مکمل با siRNA است). در این موقع آنزیم آرگونات که عضوی از کمپلکس RISC است سبب شکسته شدن در mRNA می شود. با تخریب mRNA بیان ژن متوقف می گردد(بلازسزیک[4] و همکاران ۲۰۰۱)

۱-۳ متابولیت های ثانویه گیاهی[5]

در بسیاری از گیاهان قسمت اعظم انرژی و کربنی که جذب و تجزیه می شود به سنتز مولکول های آلی اختصاص می یابد که ممکن است نقش آشکاری در رشد و نمو نداشته باشند این مولکول ها به متابولیت های ثانویه معروفند متابولیت های ثانویه عموما در مقادیر کم یافت می شوند. در تعریف عمومی، متابولیت های ثانویه ترکیب های حد واسطی هستند که در گروه ترکیبات مختلفی قرار گرفته و برای رشد و حیات نیازی به آنها نیست و از راه های متابولیکی مختلف که خود از راه های تولید متابولیت های اولیه منشعب شده اند، بیوسنتز می شوند. تمایز متابولیت های اولیه وثانویه همیشه کار ساده ای نیست، به عبارت دقیق تر، متابولیت های ثانویه بخشی از ساختمان مولکولی سلول نیستند بلکه در صورت نیاز معمولا در بافت ها یا اندام های خاص و یا مراحل خاصی از نمو یافت می شوند(جوسس[6] ۲۰۰۳).

گیاهان عالی بسیاری از متابولیت های ثانویه را که از لحاظ دارویی حائز اهمیت هستند تولید می کنند (یان مین[7] و همکاران ۲۰۰۷). اگرچه تا به حال ۲۰ تا ۳۰ درصد از گیاهان عالی شناخته شده اند اما ۱۰۰۰۰ متابولیت ثانویه مختلف از آنها استخراج و شناخته شده است. به طور کلی متابولیت ها به دو گروه نیتروژن دار و بدون نیتروژن تقسیم می شوند(جوسس ۲۰۰۳).

[1] double stranded RNA
[2] Bernstein *et al.*
[3] Blaszczyk *et al.*
[4] Blaszczyk
[5] Plant Secondary Metabolite(PSM)
[6] Juses
[7] Yun Min *et al*

بزرگترین گروه از متابولیت های ثانویه شناخته شده ایزوپرنوئیدها با بیش از یک سوم تمام ترکیبات شناخته شده هستند و در مرتبه بعدی آلکالوئید ها قرار دارند که شامل خیلی از داروها و سموم می باشند(لی زانگ [1] و همکاران ۲۰۰۵).

۱-۳-۱ آلکالوئید ها

آلکالوئیدها توسط میسنر [2] در سال ۱۸۱۹ به عنوان جزء اصلی شیمیایی گیاهان کشف و این نام را به خود اختصاص دادند. آلکالوئید ها شامل آن دسته از ترکیباتی هستند که در ساختمان آنها ازت وجود دارد و از مهمترین فراورده های ازت دار گیاهان محسوب می شوند ترکیبات این گروه غالبا خواص دارویی دارند.

آلکالوئید ها به نوبه خود به گروه های زیر تقسیم می شوند:

الف: آلکالوئیدهای مشتق شده از اسید های آمینه

اسید های آمینه لیزین [3]، اورنتین [4]، فنیل الانین [5]، تیروزین [6]، تریپتوفان [7] و هیستیدین [8] منابع ازت اغلب آلکالوئیدهای موجود در گیاهان می باشند در همه موارد اولین مرحله در تولید آلکالوئیدها دکربوکسیلاسیون است. این واکنش که توسط آنزیم دکربوکسیلاز [9] کاتالیز می شود در محل انشعاب از راه اصلی متابولیسم اولیه اتفاق می افتد. پس از حذف عامل کربوکسیل از اسید های آمینه، آمین های به دست آمده ممکن است مستقیما در تولید آلکالوئید ها به کار روند و یا در واکنش های حلقوی شدن شرکت نمایند(صفری ۱۳۸۰).

ب: سایر آلکالوئیدها

اتم ازت این آلکالوئیدها در آخرین مرحله مسیر چرخه متابولیک ساخته شدن آلکالوئید به کمک ترانس آمیناسیون [10] با انتقال عامل آمین که احتمالا از اسید آمینه آرژنین [11] تامین می گردد، به

[1] Lei zhang *et al.*
[2] Meissner
[3] Lysine
[4] Ornitine
[5] Phenyl alanin
[6] Tyrosine
[7] Yryptophan
[8] Hystidine
[9] Decarboxylase enzyme
[10] Transamination
[11] Arginine

مولکول آلکالوئید اضافه می شود. به این متابولیت ها آلکالوئید های کـاذب گفتـه مـی شـود(صـفری، ۱۳۸۰).

فعالیت های بیولوژیکی آلکالوئید ها در گیاهان به وضوح شناخته شده نیست اما واضـح اسـت که آنها برای یک فعالیت خاص در گیاهان تولید نمی شوند از فعا لیت ها و وظایف آنها می تـوان بـه این موارد اشاره کرد(کومار[1] وهمکاران ۲۰۰۸) ۱-ترکیبات ذخیره ای تامین کننده نیتـروژن ۲- مـواد سمی هستند که گیاهان را در برابر حشرات و حیوانات حفظ می نمایند. ۳- محرک یـا تنظـیم کنـده های رشد گیاهی می باشند.

۱-۳-۲ مسیرهای انتقال و محل ذخیره آلکالوئید ها در گیاهان:

بیوسنتز متابولیت های ثانویه در قسمت های مخلف گیـاه بـه ویـژه در سیتوپلاسـم،[2] شـبکه آندوپلاسمی[3] یا در ارگانل ها صورت می گیرد و تجمع ، ذخیره و آزاد سازی آنها در اندام هـا و بافـت های خاصی انجام می شود این ترکیبات قابل حل بوده و معمولا در واکوئل ذخیره می شوند در حـالی که ترکیبات چربی دوست در مجاری رزین[4]، لاکتیفرها[5]، و یا غشا های تیلاکوئیدی ذخیره می شـوند. برای انتقال فلاوونوئید ها یک ناقل خاص وجود دارد این ناقل ترکیبات را به درون واکوئـل پمـپ مـی کند. مطالعات نشان داده است که گروهی از کاست های حامل متصل بهATP یا ABC در لایه غشایی سیتوپلاسمی وجود دارند که نقش مهمی در ورود متابولیت های ثانویـه بـه داخـل واکوئـل ایفـا مـی کنند(جوسس ۲۰۰۳). برخی از آلکالوئید ها در گیاهان از طریق آوند آبکش[6] و برخـی از طریـق آونـد چوبی[7] منتقل می شوند. در جدول۱-۲ مسیر هـای انتقـال و در شـکل ۱-۳ تکامـل آلکالوئیـد هـا در فیلوژنی گیاهی آورده شده است.

[1] Kumar *et al.*
[2] cytoplasm
[3] endoplasmic reticulum
[4] Resin
[5] Lactifers
[6] Phloem
[7] Xylem