مولف: سمیه دهقان کوهستانی

دکترای تخصصی رشته بیوتکنولوژی پزشکی از دانشگاه تربیت مدرس تهران

فهرست مطالب

۱) مقدمه‌ای بر تاریخچه بیوتکنولوژی کشاورزی..... ۱۰

۲) پتانسیل‌های بیوتکنولوژی در بهبود محصولات..... ۱۴

۲-۱) پتانسیل‌های بیوتکنولوژی در ویژگی‌ها و صفات زراعی..... ۱۵

۲-۲) پتانسیل‌های بیوتکنولوژی در ویژگی‌ها و صفات کیفی ۱۷

۳) تکنیک‌ها و راهبردهای متداول مهندسی ژنتیک برای ایجاد گیاهان تراریخته..... ۱۸

۳-۱) روش‌های انتقال ژن برای ایجاد گیاهان تراریخته..... ۲۰

۳-۱-۱) انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم..... ۲۰

۳-۱-۲) بیولیستیک..... ۲۱

۳-۱-۳) الکتروپوریشن..... ۲۲

۳-۱-۴) ریزتزریقی..... ۲۳

۳-۱-۵) انتقال ژن با واسطه لیپوزوم..... ۲۴

۳-۲) راهبردهای ایجاد گیاهان تراریخته..... ۲۴

۴) استراتژی‌های مهندسی ژنتیک برای تحمل تنش تنش زیستی در گیاهان..... ۲۷

۴-۱) ویروس‌ها..... ۳۱

۴-۲) عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی..... ۳۳

۴-۳) حشرات آفت..... ۳۵

۴-۴) انگل نماتد..... ۳۷

۴-۵) علف‌های هرز..... ۳۷

۵) پاسخ گیاهان تراریخته به استرس‌های محیطی مختلف..... ۳۸

۵-۱) رویکردهای تراریخته برای تحمل تنش غیر زیستی در گیاهان..... ۳۹

۵-۱-۱) استرس خشکی..... ۴۰

۵-۱-۲) استرس شوری..... ۴۲

۵-۱-۳) تنش سرمایی..... ۴۳

۵-۱-۴) دمای بالا..... ۴۶

۵-۱-۵) استرس مواد مغذی..... ۴۸

۵-۱-۶) فلزات سنگین..... ۵۱

۶) کشت بافت گیاهی، کاربردها و چشم‌انداز آینده..... ۵۵

۶-۱) تاریخچه کشت بافت گیاهی..... ۵۹
۶-۲) الزامات کشت بافت گیاهی..... ۵۹
۶-۳) فرایند کشت بافت گیاهی..... ۶۲
۶-۴) مراحل کشت بافت گیاهی..... ۶۶
۶-۵) کاربرد و پتانسیل کشت بافت گیاهی..... ۶۹
۶-۵-۱) تراریختی ژنتیکی..... ۷۱
۶-۵-۲) ویرایش ژنوم..... ۷۳
۶-۵-۳) اومیکس و کشت بافت گیاهی..... ۷۳
۶-۵-۴) اپی‌ژنتیک در کشت بافت گیاهی..... ۷۴
۶-۵-۵) گیاهان به عنوان بیوراکتور..... ۷۴
۶-۵-۶) تکثیر و حفاظت..... ۷۴
۶-۵-۷) اصلاح نژاد گیاهان و بهبود ژنتیکی..... ۷۶
۶-۵-۸) حفظ و نگهداری ژرم‌پلاسم گیاه..... ۷۸

۷) کشت بافت گیاهی ابزاری برای تولید ترکیبات فعال زیستی..... ۷۹

۷-۱) روش‌های کشت بافت گیاهی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه..... ۸۳

۷-۲) جایگزین‌های کشت گیاهی آزمایشگاهی..... ۹۴

۷-۳) راهبردهایی برای بیان ترکیبات فعال بیولوژیک گیاهی..... ۹۶

۸) راکتورهای زیستی گیاهی جهت تولید مواد برای مصارف پزشکی و دامپزشکی..... ۹۹

۸-۱) مزایای سیستم‌های گیاهی..... ۱۰۰

۸-۲) بیوراکتورهای گیاهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب..... ۱۰۳

۸-۲-۱) ترانسفورماسیون گیاهی..... ۱۰۴

۸-۲-۲) سیستم‌های بیانی در راکتورهای زیستی گیاهی..... ۱۰۷

۸-۲-۳) بیان همزمان بازدارنده‌های پروتئیناز در راکتورهای زیستی گیاهی..... ۱۲۰

۸-۲-۴) پروتئین‌های نوترکیب تولیدی در بیوراکتورهای گیاهی..... ۱۲۲

۸-۳) رویکردهای بیان کارامد در سیستم‌های گیاهی..... ۱۲۷

۸-۴) کاربردهای ۲-اینترفرون در پزشکی و دامپزشکی..... ۱۲۸

۹- قارچ‌ها و نقش آن‌ها در بیوتکنولوژی کشاورزی..... ۱۳۰

۹-۱) ایجاد موتانت‌های با اختلال ژنی از قارچ‌های بیماریزای گیاهی..... ۱۳۱

۹-۲) بازیافت مواد مغذی..... ۱۳۲

۹-۳) منبع کودهای زیستی..... ۱۳۳

۹-۴) علف‌کش‌های زیستی (علف‌کش‌های قارچی)..... ۱۳۵

۹-۵) آفت‌کش‌های زیستی..... ۱۳۷

۹-۶) نماتدکش‌های زیستی..... ۱۳۸

۹-۷) قارچ‌کش‌های زیستی..... ۱۳۹

۹-۸) تولید غذا..... ۱۳۹

۹-۹) هم زیستی‌های مفید قارچ و محصولات زراعی..... ۱۴۰

۹-۱۰) پایداری کشاورزی در شرایط خشکی یا شوری از طریق هم‌زیستی قارچی..... ۱۴۲

۹-۱۱) نقش قارچ‌ها در تجزیه زیستی..... ۱۴۳

۱۰) کاربردهای نانوتکنولوژی در کشاورزی..... ۱۴۴

۱۰-۱) نانوتکنولوژی در سموم دفع آفات و کودها..... ۱۴۷

۱۰-۱-۱) کنترل آفات گیاهان..... ۱۴۹

۱۰-۱-۲) فعالیت ضدمیکروبی..... ۱۵۲

۱۰-۲) کاربرد نانوتکنولوژی به عنوان ضدقارچ..... ۱۵۳

۱۰-۳) نانوتکنولوژی برای کنترل ویروس گیاهی..... ۱۵۶

۱۰-۴) نانوتکنولوژی در بسته‌بندی موادغذایی..... ۱۵۷

۱۱) کشاورزی سلولی..... ۱۵۷

۱۱-۱) سلول‌های جانوری..... ۱۵۹

۱۱-۲) سلول‌های گیاهی..... ۱۶۲

۱۱-۳) سلول‌های میکروبی..... ۱۶۶

۱۲) کاربردها و دستاوردهای بیوتکنولوژی کشاورزی..... ۱۶۸

۱۲-۱) دستاوردهای مهندسی ژنتیک در بهبود محصولات..... ۱۶۸

۱۲-۱-۱) محصولات *Bt*..... ۱۶۹

۱۲-۱-۲) برنج طلایی..... ۱۷۰
۱۲-۱-۳) محصول مقاوم در برابر علف‌کش..... ۱۷۱
۱۲-۱-۴) محصول مقاوم در برابر عوامل بیماریزا..... ۱۷۲
۱۲-۱-۵) تحمل کم آبی..... ۱۷۳
۱۲-۲) دستاوردهای کشت بافت گیاهی در بهبود محصولات..... ۱۷۴
۱۲-۲-۱) تکثیر غیرجنسی..... ۱۷۵
۱۲-۲-۲) میکروگرافت..... ۱۷۵
۱۲-۲-۳) تنوع سوماکلونال..... ۱۷۵
۱۲-۲-۴) تولید گیاهان هاپلوئید..... ۱۷۶
۱۲-۲-۵) امتزاج سوماتیک..... ۱۷۶
۱۲-۳) محصولات تراریخته به منظور کشاورزی مولکولی..... ۱۷۶
۱۲-۳-۱) واکسن‌ها..... ۱۷۸
۱۲-۳-۲) آنتی‌بیوتیک‌ها..... ۱۷۸

۱۲-۳-۳) تولید آنزیم‌ها..... ۱۷۹

۱۲-۳-۴) تولید کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و مشتقات آن‌ها..... ۱۷۹

۱۳) نگرانی‌های احتمالی در تولید و آزادسازی محصولات تراریخته..... ۱۸۰

۱۳-۱) در حوزه سلامت انسان..... ۱۸۰

۱۳-۲) در حوزه زیست محیطی..... ۱۸۲

۱۳-۳) در حوزه اقتصاد..... ۱۸۴

۱۳-۴) در حوزه اجتماعی و اخلاقی..... ۱۸۶

۱۳-۵) محافظت‌های پیشنهادی..... ۱۸۶

۱۴) نتیجه‌گیری و چشم‌انداز آینده بیوتکنولوژی کشاورزی..... ۱۸۸

واژه‌نامه..... ۱۹۸

منابع..... ۱۹۹

۱) مقدمه‌ای بر تاریخچه بیوتکنولوژی کشاورزی

بیوتکنولوژی، کاربرد تکنیک‌های علمی برای اصلاح و بهبود گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها به منظور افزایش ارزش آن‌ها است. بیوتکنولوژی کشاورزی بخشی از بیوتکنولوژی است که شامل کاربردهایی در زمینه کشاورزی است. سال‌هاست که از بیوتکنولوژی کشاورزی استفاده می‌شود؛ زیرا مردم همواره سعی کرده‌اند گیاهان و محصولات زراعی مهم را با انتخاب و تولید مثل بهبود دهند. نمونه‌ای از بیوتکنولوژی سنتی کشاورزی، توسعه انواع گندم مقاوم در برابر بیماری، از طریق تلاقی بین انواع مختلف گندم و بروز مقاومت به بیماری خاص در نوع جدید گندم است (۲).

دانشمندان با استفاده از اصول ژنتیکی و فهم ساختار DNA، راه حل‌هایی را برای افزایش بهره‌وری در کشاورزی ایجاد کرده‌اند. بیوتکنولوژی کشاورزی با شناسایی ژن‌هایی که در تولید بهینه محصولات نقش دارند، توانایی تولیدکنندگان برای بهبود محصولات را افزایش داده است. همچنین بیوتکنولوژی کشاورزی بهبود گونه‌هایی را که با روش‌های قدیمی مانند آمیزش گونه‌های مرتبط امکان‌پذیر نیست، فراهم می‌کند (۲).

بیشترین سرمایه‌گذاری در بیوتکنولوژی کشاورزی روی محصولات پرمصرف است؛ مانند ذرت، برنج، گندم، پنبه، سویا و کلزا که در سطح بین‌المللی در حال داد و ستد هستند. به طور معمول از فناوری‌های ژنتیکی برای تغییر محصولات کم مصرف و نادری که اغلب در مناطق محروم دنیا بسیار مهم هستند، استفاده نمی‌شود و سرمایه گذاری روی این محصولات بسیار کم است. از آنجا که محصولات کم مصرف، مناطق کوچکتری را اشغال می‌کنند و بازارهای محدودتری دارند، به ندرت هدف علوم پیشرفته قرار می‌گیرند (۲).

حوزه بیوتکنولوژی کشاورزی در چند دهه گذشته پیشرفت‌های قابل توجهی داشته است و در لیست سریع‌ترین فناوری‌های زراعی در جهان قرار گرفته است. بیوتکنولوژی کشاورزی توانایی‌هایی را در اختیار تولیدکنندگان برای دستیابی به اهداف خاصی قرار می‌دهد که در غیر این صورت از طریق روش‌های معمول اصلاح گیاه غیرممکن است. امروزه در جهان، محصولات اصلاح شده ژنتیکی در مزارعی با مقیاس تجاری (مقیاس وسیع) کاشته می‌شوند. بنابراین، سطح محصولات بیوتکنولوژی کشاورزی از ۱,۷ میلیون هکتار در سال ۱۹۹۶ به ۱۶۰ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۱ افزایش یافته است. همان طور که انتظار میرفت "ژنومیکس" نقش مهمی در پیشرفت بیوتکنولوژی گیاهی داشته است. ژنومیکس و ترنسکریپتومیکس در اصل مبتنی بر DNA و رونوشت‌های حاصل از آن است، اما اخیراً استفاده از پروتئوم و متابولوم نیز در این حوزه گسترش یافته است (۲).

رشد و بهره وری گیاه به شدت تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی و زیستی قرار دارد. در گیاهان زینتی به دلیل کمبود ژن‌های مقاومتی، پرورش گیاهان مقاوم به تنش دشوار است. در طی چند سال گذشته، استفاده از استراتژی‌های بیوتکنولوژی کشاورزی برای ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی مثل خشکسالی و حمله پاتوژن‌ها (عوامل بیماری زا) مورد توجه قرار گرفته است. ارزیابی‌ها نشان می‌دهد مقاومت در برابر تنش‌های زیستی، در گیاهان زینتی تراریخته در مقایسه با گیاهان وحشی بیشتر است. پاتوژن‌های قارچی، ویروسی یا باکتریایی با کاهش رشد و عملکرد، گیاه را به شدت تحت تأثیر قرار داده و کیفیت محصولات را کاهش می‌دهند (۲).

قوانین ژنتیک مندل در سال ۱۹۰۰ دوباره کشف شدند. مندل کار خود را در مورد الگوهای وراثت نخود در سال ۱۸۶۵ منتشر کرده بود، اما ۳۵ سال طول کشید تا دیگران اهمیت آن‌ها را درک کنند. از سال ۱۹۰۰، شاهد پیشرفت مداوم در درک ترکیب ژنتیکی تمام موجودات زنده از میکروب‌ها تا انسان هستیم. در دهه ۱۹۲۰ هنگامی که مولر[1] و استدلر[2] دریافتند که تابش امواج الکترومغناطیس می‌تواند باعث جهش در جانوران و گیاهان شود، گامی مهم در کنترل خصوصیات ژنتیکی برداشته شد (۱۵).

در دو دهه ۱۹۳۰ و ۱۹۴۰، چندین روش جدید برای دستکاری کروموزوم و ژن از جمله استفاده از کلشیسین[3] جهت دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها، بهره‌برداری تجاری از دورگه‌سازی در ذرت و سایر محصولات، استفاده از مواد شیمیایی مانند نیتروژن موستارد و اتیل متان سولفونات برای القای جهش و تکنیک‌هایی مانند کشت بافت و نجات رویان برای ساختن دورگه‌های زنده از گونه‌های مجزا کشف شدند. ساختار مارپیچ دورشته DNA (دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید)، ماده شیمیایی وراثت، در سال ۱۹۵۳ توسط جیمز واتسون و فرانسیس کریک کشف شد. این امر باعث پیشرفت قابل توجهی در زمینه‌های مختلف علم ژنتیک شد (۱۵).

در دهه ۱۹۷۰، پیشرفت در حوزه زیست‌شناسی مولکولی باعث شد تا دانشمندان بتوانند DNA را، که مشخص‌کننده ویژگی‌های موجود زنده در سطح مولکولی است، دستکاری کنند. این فناوری را مهندسی ژنتیک می‌نامند. مهندسی ژنتیک همچنین امکان انتقال DNA بین موجودات کاملاً متفاوت از یکدیگر را فراهم می‌کند. امروزه این فناوری به

[1] Muller
[2] Stadler
[3] Colchicine

مرحله‌ای رسیده است که دانشمندان می‌توانند تقریباً از هر موجودی از جمله گیاهان، حیوانات، باکتری‌ها یا ویروس‌ها یک یا چند ژن استخراج کرده و این ژن‌ها را به موجود دیگری وارد کنند. موجودی که با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک تغییر داده شده است به عنوان موجود تراریخته یا موجود مهندسی ژنتیکی شده، گفته می‌شود (۲).

دهه ۱۹۹۰ شاهد پیشرفت چشمگیری در درک ما از نحوه عملکرد موجودات زیستی در سطح مولکولی و همچنین توانایی تجزیه و تحلیل، درک و دستورزی مولکول‌های DNA یعنی ماده زیستی که از آن ژن‌ها در همه موجودات بالاتر ساخته شده‌اند، بوده است. کل فرآیند توسط پروژه ژنوم انسان که سرمایه قابل توجهی از منابع عمومی و خصوصی را جهت توسعه فناوری‌های جدید برای کار با ژن‌های انسانی خرج کرده است، تسریع شده است. فناوری‌های مشابه به طور مستقیم برای موجودات دیگر از جمله میکروب‌ها، گیاهان و جانوران عالی‌تر قابل استفاده هستند. بنابراین، رشته علمی جدید ژنومیک که به رویکردهای جدید قدرتمند برای شناسایی عملکرد ژن‌ها و کاربرد آن‌ها در کشاورزی و پزشکی کمک کرده است، به وجود آمد (۱۵).

در حالی که به سمت قرن بیست و یکم می‌رویم، شاهد تغییر سریع کاربردهای ژنتیک مندلی به ژنتیک مولکولی در کشاورزی، پزشکی و صنعت هستیم. این خلاصه اجمالی از پیشرفت‌های ژنتیکی از سال ۱۹۰۰ تا ۱۹۹۹ تأکید می‌کند که دانش و اکتشاف یک زنجیره پیوسته را نشان می‌دهند، که با هر نسل درک ما را از شبکه پیچیده زندگی به سطح بالاتری می‌برند. بنابراین طرفداری کردن یا کنار گذاشتن ابزارهای تجربی یا نوآوری‌های علمی به این دلیل که قدیمی

هستند یا جدید، اشتباه است. همانطور که ۳۵ سال طول کشید تا زیست‌شناسان به طور کامل اهمیت کار مندل را درک کنند، ممکن است چند دهه یا بیشتر طول بکشد تا درک کاملی از مزایا و خطرات مرتبط با جانداران جدید بهبود یافته ژنتیکی حاصل شود (۱۵).

چندین شرکت بزرگ در اروپا و ایالات متحده آمریکا سرمایه‌گذاری‌های کلانی برای مطابقت دادن این فناوری‌ها جهت تولید انواع گیاهان بهبود یافته و سایر موارد با اهمیت کشاورزی برای کشاورزی تجاری در مقیاس بزرگ انجام داده‌اند. همین فناوری‌ها برای رفع امنیت غذایی در کشورهای در حال توسعه از کاربردهای بالقوه مهمی برخوردارند (۱۵).

۲) پتانسیل های بیوتکنولوژی در بهبود محصولات

از بیوتکنولوژی کشاورزی نباید به عنوان جایگزینی برای ابزارهای سنتی اصلاح محصولات استفاده کرد. اما استفاده همزمان از تکنیک‌های جدید و سنتی به طور قابل توجهی تحقیق و توسعه در کشاورزی را افزایش می‌دهد. انتقال هدفمند ژن‌های مورد نظر به محصول، باعث افزایش تولید محصولات می‌شود. از طرف دیگر، بیوتکنولوژی می‌تواند صفات جدیدی را در محصول ایجاد کند که مطابق با رویکرد مرسوم نیستند. در حالی که آمیزش انتخابی به روش سنتی، محدود به تبادل مواد ژنتیکی در یک نوع محصول خاص است، اما تکنیک‌های بیوتکنولوژی انتقال ژن‌های ارزشمند را در گونه‌های نزدیک و حتی در گونه‌های دورتر نیز امکان پذیر می‌کند. یک نمونه از این موارد ذرت *Bt*[1]

[1] *Bt* maize

است، که در آن یک ژن از باکتری خاک‌زی به نام *باسیلوس تورنژینسیس*[1] در ژنوم گیاه گنجانده شده است که باعث ایجاد مقاومت در برابر حشرات خاص می‌شود (۲).

۲-۱) پتانسیل بیوتکنولوژی در ویژگی‌ها و صفات زراعی

ویژگی‌های زراعی شامل تمام تغییرات ژنتیکی گیاهان است که به ایجاد ثبات و پایداری یا افزایش بازده در مزارع کمک می‌کند. از آنجا که ژن‌های انتقالی باعث ایجاد صفات جدیدی در گیاه می‌شوند اغلب از آن‌ها به عنوان "صفات ورودی[2]" یاد می‌شود. مکانیسم‌های مقاومت در برابر آفات و بیماری‌ها از جمله صفات ورودی، هستند که اغلب توسط یک ژن کد می‌شوند (صفات تک‌ژنی). در حال حاضر گیاهان مختلفی با مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌ها تجاری شده اند. در ارزیابی ارزش چنین صفاتی باید در نظر گرفته شود که هدررفت محصولات جهانی به خاطر عوامل تنش‌زای زیستی ۲۵-۳۰٪ است. استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای دفع آفات بدون استفاده از سموم، این مقدار هدررفت را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد (۲). کشاورزی فشرده[3](متمرکز) روی محیط زیست تأثیر منفی می‌گذارد؛ زیرا کشاورزان از مواد شیمیایی برای بهینه‌سازی شرایط مواد مغذی خاک و آفت‌کش‌ها برای کنترل حشرات، عوامل بیماری‌زا و علف‌های هرز استفاده می‌کنند. گیاهان مقاوم به آفت‌کش‌ها، به کشاورزان این امکان را می‌دهند تا علف‌های هرز اطراف آنها را به طور انتخابی از بین ببرند و آسیبی به محصول این گیاهان وارد نکنند (۶).

[1] *Bacillus thuringiensis*
[2] Input traits
[3] *Intensive agriculture*

سایر صفات مطلوب محصولات زراعی شامل افزایش بازده ژنتیکی و مکانیسم‌های تحمل و مقاومت به تنش‌های غیرزیستی، مانند خشکسالی، سرما و کمبود عناصر غذایی در خاک است. از آنجا که این صفات معمولاً توسط چندین ژن کد می‌شوند (صفات چند ژنی)، مطالعه و بررسی انتقال این ژن‌ها به گیاهان اغلب پیچیده‌تر است (۲). کمتر از ۲۰٪ از کره زمین، زمین‌های قابل زراعت است؛ اما برخی از محصولات از نظر ژنتیکی تغییر داده شده‌اند تا در شرایطی مانند شوری، سرما و خشکی، آزادی بیشتری داشته باشند. شناسایی ژن‌های مسئول جذب سدیم در گیاهان به تولید گیاهان اصلاح‌شده‌ای منجر شده است که قادر به رشد در محیط‌های پرنمک هستند. تنظیم بیان به صورت کاهش یا افزایش بیان برخی از ژن ها معمولاً روشی است که برای تغییر مقاومت به خشکی در گیاهان استفاده می‌شود. یک دیدگاه جهانی بیان می‌کند که برخی پیشرفت‌ها در جهت افزایش بهره‌وری حاصل شده است، زیرا انواع گیاهان تراریخته مقاوم در برابر حشرات، مقاوم در برابر خشکی و مقاوم در برابر علف‌کش‌ها، خطر تلفات محصول را کاهش می‌دهند. یکی از این پیشرفت‌ها شناسایی یک ژن گیاهی به نام $At\text{-}DBF_2$ در *آرابیدوپسیس تالیانا*[1] است. *آرابیدوپسیس تالیانا* (علف کوچک) مقاومت به نمک، خشکی، گرما و سرما را در گیاهان نشان می‌دهد. وقتی این ژن وارد سلول‌های گوجه فرنگی و توتون شد، این سلول‌های دستکاری شده بسیار بهتر از سلول‌های معمولی در برابر این شرایط مقاومت کردند (۶). پیشرفت‌های اخیر در علوم سلولی مولکولی و ژنومیک، نشان می‌دهد که تولید محصولات بیوتکنولوژی با صفات چندژنی مورد نظر در آینده نزدیک کاملاً واقع بینانه است (۲).

[1] *Arabidopsis thaliana*

۲-۲) پتانسیل‌های بیوتکنولوژی در ویژگی‌ها و صفات کیفی

برخلاف ویژگی‌های زراعی که به افزایش تولید محصولات کشاورزی کمک می‌کند، صفات کیفی به شکل ظاهری یا ترکیب شیمیایی محصول زراعی مربوط می‌شود. از این رو، اغلب به آن‌ها "صفات خروجی" گفته می‌شود. صفات کیفی می‌توانند شامل افزایش مقدار مواد درشت و ریز مغذی ضروری در مواد غذایی در جهت رژیم غذایی سالم در انسان باشند. اگر چنین صفاتی در محصولات غذایی اصلی گنجانده شود، می‌تواند برای اقشار ضعیف جامعه که اغلب توانایی کمی در خرید غذاهایی با ارزش غذیی بالا دارند، مفید باشد (۲). در تلاش برای دستیابی به سلامتی بهتر انسان، به طور عمده در کشورهای توسعه نیافته، ایجاد تعادل در تغذیه انسان با تأمین منابع تغذیه‌ای متعادل با ایجاد غذاهای تغییر یافته از نظر ژنتیکی که مواد مغذی شناخته شده برای کمک به مبارزه با بیماری یا گرسنگی را نگه می‌دارند، انجام شده است. جزء اصلی رژیم غذایی انسان، روغن و چربی است که در آن ترکیبات اسید چرب اشباع وجود دارد که برای سلامتی خطرناک هستند. غذاهای GM[1]، با کاهش سطح اجزای اسید چرب اشباع در سویا و کرچک تولید شده‌اند. غذاهای اصلاح شده ژنتیکی (GM foods)، غذاهایی هستند که از جاندارانی تولید شده‌اند که با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک تغییراتی در DNA آن‌ها ایجاد شده‌است (۶). علاوه براین، محققان موفق به تولید انواع برنج‌های تراریخته با محتوای قابل توجهی ویتامین A شدند که اکنون در کشت‌های زراعی برنج استفاده می‌شود. طبق آمارها، بیش از ۴۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان از کمبود ویتامین A رنج می‌برند که اغلب منجر به نابینایی غیرقابل برگشت و سایر مشکلات جسمی می‌شود. پیشرفت‌های امیدوارکننده‌ای در تحقیقات بیوتکنولوژی

1 *Genetically modified*

برای افزایش میزان مواد مغذی (ویتامین‌ها و مواد معدنی) در گیاهان گزارش شده است (۲). بعلاوه، با روش‌های بیوتکنولوژی می‌توان تغییراتی اعمال کرد که میوه اصلاح شده که هنوز بر روی گیاه است در مدت زمان طولانی‌تری رسیده شود و سپس با خطر فساد کمتر و ماندگاری مناسب و معقول به مصرف‌کننده منتقل شود. اولین محصول غذایی اصلاح شده ژنتیکی، یک گوجه فرنگی بود که برای تأخیر در رسیدن و افزایش ماندگاری آن، تراریخته شد. این گوجه فرنگی تراریخته در سال ۱۹۹۴ توسط محققین یک شرکت کالیفرنیایی تولید و به بازار عرضه شد. علاوه بر این، با افزایش فعالیت آنزیم‌های گیاهی که پیش‌سازهای عطر را به ترکیبات طعم‌دهنده تبدیل می‌کنند، می‌توان طعم را تغییر داد. فلفل و خربزه تراریخته با طعم بهبود یافته در حال حاضر در آزمایش‌های میدانی هستند (۶). همچنین در بیوتکنولوژی کشاورزی، اجازه اصلاح به گیاهانی که توانایی تولید مقدار قابل توجهی از مواد شیمیایی خاص مانند واکسن‌ها، داروهای دیگر یا پلاستیک‌های زیست تخریب پذیر را داشته باشند، داده می‌شود (۲).

۳) تکنیک‌ها و راهبردهای متداول مهندسی ژنتیک برای ایجاد گیاهان تراریخته

مهندسی ژنتیک مهم‌ترین بخش بیوتکنولوژی است که شامل چندین رشته علمی به هم وابسته می باشد و طبق تعریف، مجموعه‌ای از روش‌هاست که انتقال ژن یا بخشی از توالی آن را در سلول میزبان با پایداری بیشتر یا کمتر فراهم می‌کند. در شکل ۱ مقایسه مهندسی ژنتیک و اصلاح نژاد مرسوم را به اجمال نشان داده شده است.

محصولات ارگانیک محصولاتی هستند که در تمام مراحل رشد با سیستم طبیعی هماهنگ بوده و در خاکی که از چند سال قبل هیچ‌گونه سموم دفع آفات گیاهی نظیر: علف کش‌ها، قارچ‌کش‌ها و مواد شیمیایی در آن استفاده نشده و فقط با مواد طبیعی مانند کمپوست گیاهی تقویت می‌شود، رشد می‌کنند. محصول اصلاح نژاد شده اعم از بذر یا

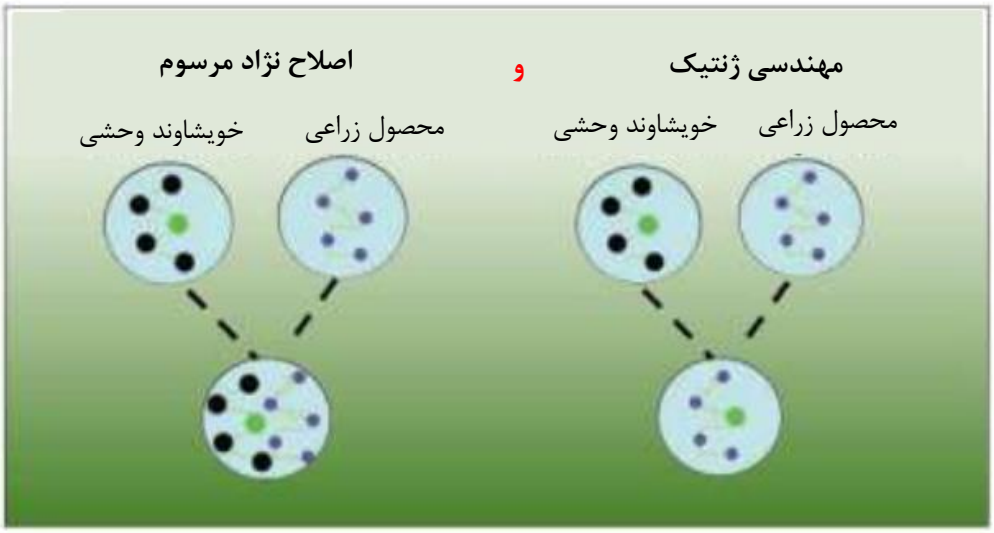
نهال به هیچ وجه ناقض کشاورزی ارگانیک نیست، برای تولید محصول اصلاح نژاد شده به روش کشت بافت یا اصلاح از طریق تکثیر بذر به دست آمده و هیچ دستکاری ژنتیکی برای تولید آن صورت نمی گیرد. این در حالی است که در محصول تراریخته دی ان ای تغییر کرده و ژنهایی از یک موجود زنده مانند حشرات یا حیوانات با گیاه آمیخته می شود و نقشه ژنتیکی آن تغییر می‌کند، چنین محصولی با طبیعت و خلقت در تقابل هست و به عنوان تراریخته شناخته می شود.

روش‌های مهندسی ژنتیک شامل موارد زیر است:

۱. تکنیک‌های نوترکیبی DNA که از ناقل‌ها (وکتورها) استفاده می‌کنند؛

۲. تکنیک‌هایی که به طور مستقیم ماده وراثتی را به جاندار وارد می‌کنند.

۳. تکنیک‌های دورگه‌سازی که با استفاده از آن، سلول‌های زنده جدیدی با یک ترکیب جدید از ماده ژنتیک وراثتی تشکیل می‌شوند. این امر با ادغام دو یا چند سلول به روشی که بعید است در طبیعت رخ دهد، انجام شده است (۱۵).



شکل۱- اصلاح نژاد مرسوم در مقابل مهندسی ژنتیک. برای بدست آوردن صفت موردنظر در روش اصلاح نژاد محصول زراعی، گیاه مورد نظر با خویشاوند وحشی خود تلاقی داده می شود و لذا صفاتی غیر از صفت اولیه در گیاه حاصل از تلاقی بروز می‌کنند، اما در مهندسی ژنتیک ژن منتخب از گونه خویشاوند وحشی خارج شده و در ژنوم گیاه زراعی قرار داده می‌شود و لذا گیاه ایجاد شده حاوی صفت موردنظر خواهد بود.

۳-۱) رو

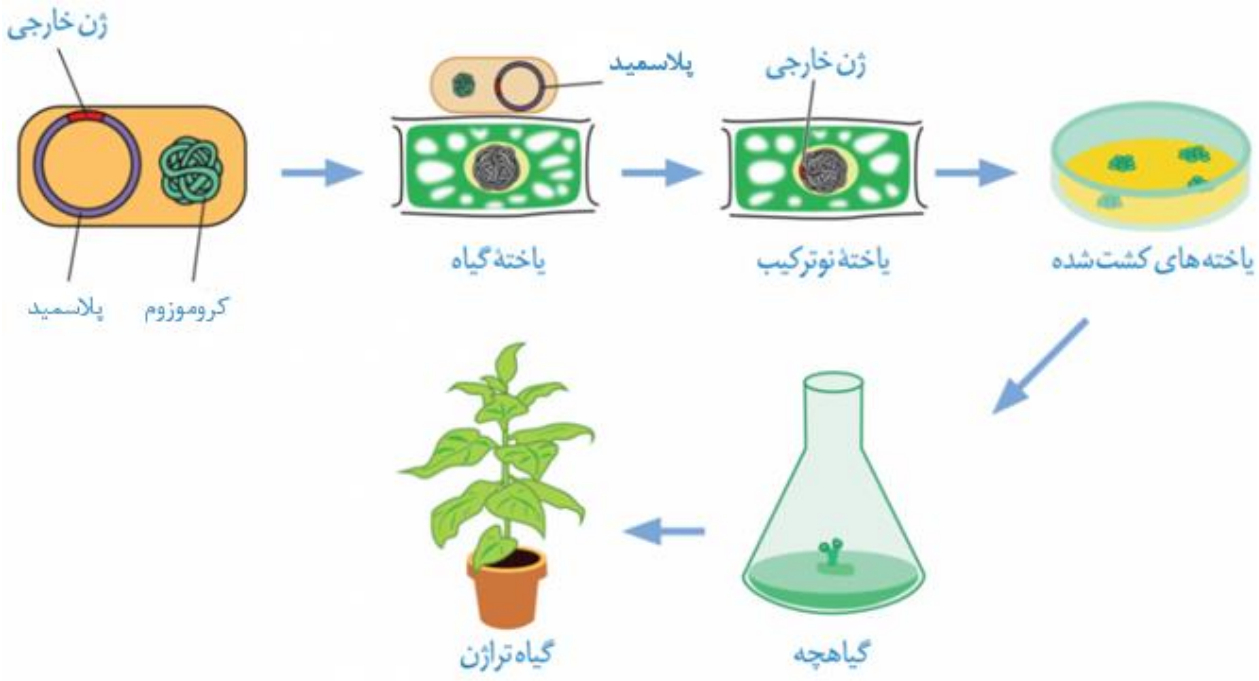
گیاهان تراریخته نتیجه آزمایش‌های مهندسی ژنتیک هستند که در آن مواد ژنتیکی از یک جاندار به جاندار دیگر منتقل می‌شوند، به طوری که گیاه دوم ویژگی مطلوبی را نشان دهد (۶).

۳-۱-۱) انتقال ژن با واسطه *آگروباکتریوم*

آگروباکتریوم نوعی باکتری است که به دلیل توانایی اش در انتقال DNA بین خود و گیاهان به یک ابزار مهم در مهندسی ژنتیک تبدیل شده‌است. *آگروباکتریوم تومفاشینس* باعث بیماری گال تاجی در گیاهان می‌شود. این بیماری با رشد تومور یا گال بر روی گیاه آلوده (اغلب در محل اتصال بین ریشه و ساقه) شناخته می‌شود. تومورها به علت انتقال یک قطعه DNA ایجاد می‌شود. این قطعه T-DNA نام دارد که از پلاسمید القاکننده تومور باکتریایی انتقال می‌یابد. پلاسمید T-DNA به صورت نیمه تصادفی به ژنوم سلول میزبان وارد می‌شود و بیان ژنهای ایجاد کننده تومور موجود در T-DNA، باعث شکل‌گیری گال می‌گردد. این روش تراریختی بیشترین کاربرد را در ارائه ژن‌های خارجی به سلول‌های گیاهی دارد. *آگروباکتریوم تومفاشینس*[1] می‌تواند یک قطعه DNA خاص (T-DNA) از پلاسمید القاکننده تومور (Ti) را به هسته سلول‌های آلوده یعنی جایی که به طور پایدار با ژنوم میزبان ادغام شده و رونویسی و باعث

[1] *Agrobacterium tumefaciens*

بیماری گال طوقه[1] می‌شود، منتقل کند (شکل ۲). T-DNA حاوی دو نوع ژن است: ژن‌های تومورزا[2]، که رمزکننده آنزیم‌های دخیل در سنتز اکسین‌ها و سیتوکین‌ها و مسئول تشکیل تومور هستند و ژن‌های رمزگذار برای سنتز اُپین‌ها[3]. خارج از T-DNA، ژن‌های کاتابولیسم اُپین واقع شده‌اند که با حذف ژن‌های القا کننده تومور و جایگزینی آن‌ها با ژن‌های مطلوب، می‌توان پلاسمید تراریخته را ساخت و بنابراین باکتری‌ها را به یک حامل عالی برای انتقال DNA خارجی تبدیل کرد (۶).

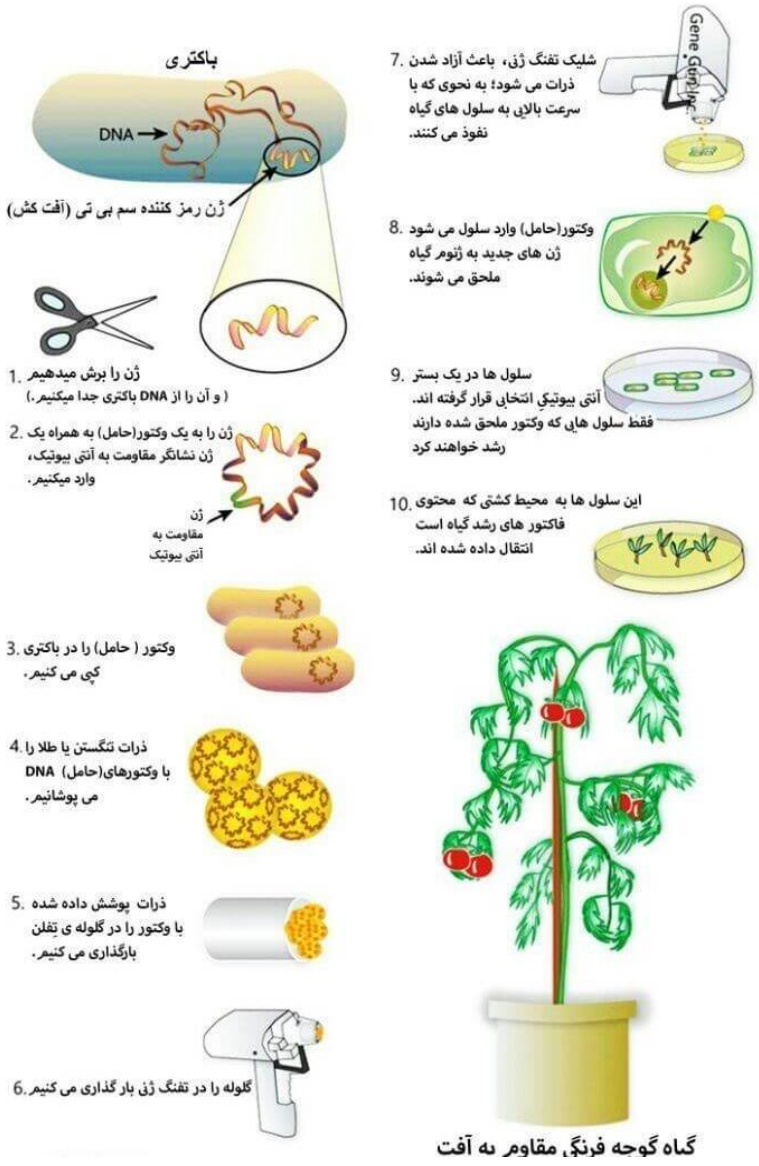


شکل ۲– تولید گیاه تراریخته به روش انتقال ژن توسط *آگروباکتریوم*

۳-۱-۲) تفنگ ژنی یا بیولیستیک[4]

[1] Crown gall disease
[2] Oncogenic
[3] Opines
[4] Biolistic

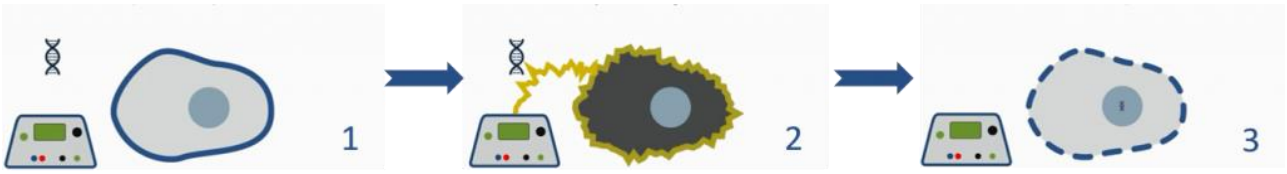
برخی از سلول‌ها، بافت‌ها و اندامک‌های داخل سلولی به ویژه در سلول‌های گیاهی، به DNA خارجی نفوذ ناپذیر هستند. برای رفع این مشکل در انتقال ژن، از تفنگ ژنی برای انتقال ژن مورد نظر استفاده می‌شود. در این روش، DNA یا RNA به ذرات بی‌اثر زیستی یعنی طلا یا تنگستن می‌چسبند. مجموعه DNA-ذره در شرایط خلأ در بالای بافت هدف قرار گرفته و در اثر شلیک شدید، شتاب‌دار شده و سپس DNA به طور مؤثر به سلول‌های هدف وارد می‌شود (شکل ۳) (۶).



شکل ۳ – مراحل انتقال ژن توسط تفنگ ژنی جهت تولید گیاه تراریخته

۳-۱-۳) الکتروپوریشن

الکتروپوریشن فرآیندی است که در آن سلول‌ها با یک سازه DNA مخلوط می‌شوند و سپس به مدت کوتاهی در معرض تکانه‌های ولتاژ الکتریکی بالا قرار می‌گیرند. غشای سلولی سلول میزبان نفوذپذیر می شود؛ در نتیجه اجازه می‌دهد DNA خارجی وارد سلول میزبان شود. برخی از این سلول‌ها DNA جدید را دریافت کرده و ژن مورد نظر را بیان می‌کنند (شکل ۴) (۶).

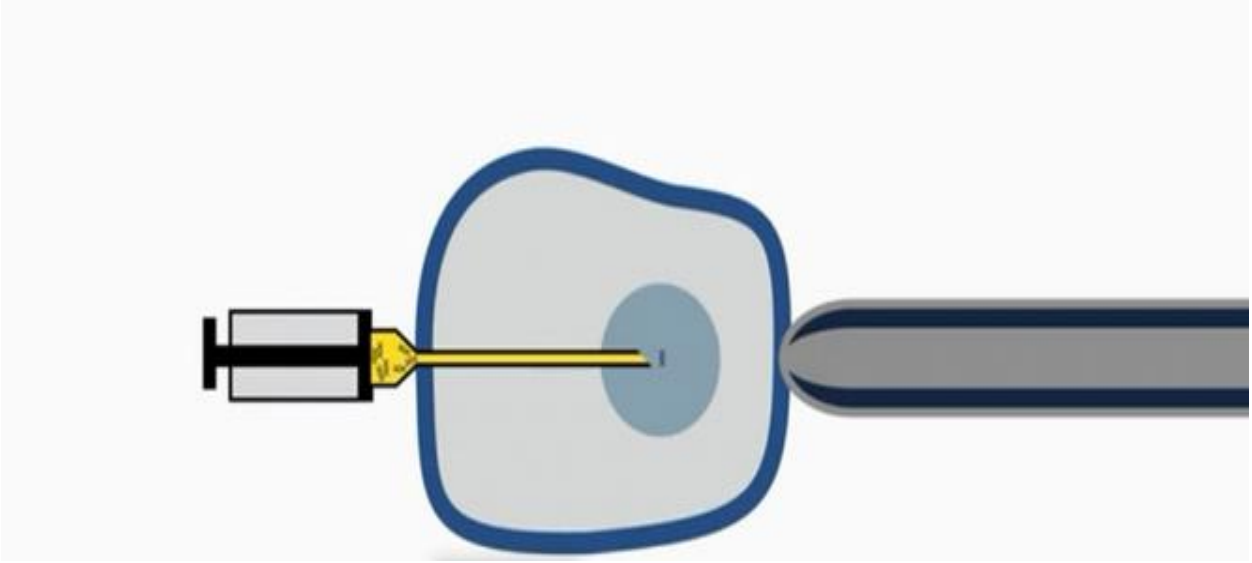


شکل ۴– تصویر شماتیکی از انتقال ژن به روش الکتروپوریشن

۳-۱-۴) ریزتزریقی

ریزتزریقی ارائه مستقیم DNA به صورت مکانیکی، تحت کنترل میکروسکوپی است. هدف می‌تواند یک سلول مشخص در یک ساختار چند سلولی مانند رویان، تخمک و سلول‌های مریستمی یا یک جزء معین از یک سلول باشد. با کمک میکروسکوپ، یک سلول در حالی که با استفاده از یک ابزار مویین صاف، دست‌ورزی می‌شود، با مکش ملایم در محل

خود نگه داشته می‌شود. سپس از پیپت باریک برای قرار دادن DNA در سیتوپلاسم یا هسته استفاده می‌شود. این روش در مورد پروتوپلاست‌ها و بافت‌های گیاهی مؤثر است (شکل ۵) (۶).



شکل ۵– تصویر شماتیکی از انتقال ژن به روش فیزیکی ریزتزریقی

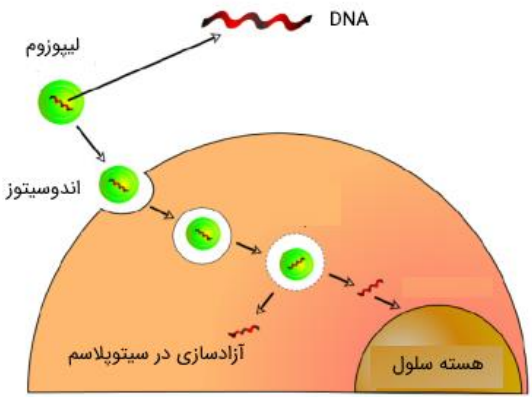
۳-۱-۵) انتقال ژن با واسطه لیپوزوم

لیپوزوم‌ها وزیکول‌های چربی مصنوعی هستند که توسط غشای فسفولیپیدی سنتزشده احاطه شده‌اند و در کشت سلول‌های جانوری برای سیستم دارو رسانی استفاده می‌شوند. این فرآیند به طور کلی شامل سه مرحله است (شکل ۶):

۱. چسبیدن لیپوزوم‌ها به سطح پروتوپلاست؛

۲. هم‌جوشی لیپوزوم‌ها در محل چسبیدن (اندوسیتوز)؛

۳. رهاسازی پلاسمید یا DNA به درون سلول.



شکل ۶– تصویر شماتیکی از انتقال ژن به کمک لیپوزوم

۳-۲) راهبردهای ایجاد گیاهان تراریخته

راهبردهایی برای دستیابی به بهترین کیفیت و کمیت محصول مورد نظر اتخاذ شده‌اند. سه راهبرد به قرار زیر است:

۱. **بیان ژن گیاه:** با توجه به هدفی که محصول باید تولید شود، می‌توان از سه روش زیر برای بیان ژن استفاده کرد:

بیان گذرا: با بیان گذرا[1] (TE)، یک توالی ژنی بدون ترکیب مواد ژنتیکی جدید با کروموزوم گیاه، درون سلول‌های گیاهی قرار می‌گیرد. سیستم‌های TE می‌توانند به سرعت به کار گرفته شوند و مقدار زیادی پروتئین تولید کنند، اما از آنجا که DNA غیرکروموزومی با روند میتوز یا میوز کپی نمی‌شود، بیان ژن نه دائمی است و نه توارثی. اگرچه سیستم‌های TE برای تحقیق و توسعه بسیار مفید هستند و ممکن است برای

[1] Transient expression

تولید دارو نیز مفید باشند، برای هر کاشت نیاز به تولید تازه گیاهان تراریخته دارند و ممکن است برای تولید طولانی مدت یا حجم زیاد پروتئین، جذابیت کمتری داشته باشند (۶).

بیان پایدار ژن: از طرف دیگر می‌توان کروموزوم اولیه گیاه را جهت بیان دائمی و وراثتی یک پروتئین خاص تغییر داد. در حالی که اصلاح دائمی ژنوم گیاه هزینه‌بر و وقت‌گیرتر است، مزیت بارز تولید ثابت و مداوم پروتئین را فقط با کاشت مکرر فراهم می‌کند (۶).

تراریختی کلروپلاست: سرانجام، سیستم‌هایی وجود دارند که DNA کلروپلاست را در گیاهان اصلاح می‌کنند و می‌توانند منجر به تغییرات وراثتی در بیان پروتئین شوند. این سیستم‌ها به ویژه با توجه به اینکه هر سلول ممکن است صدها یا هزاران اندامک از این نوع را حمل کند، توانایی حفظ تعداد بسیار زیادی از نسخه‌های عملکردی ژن را دارند و مزیت‌هایی نسبت به تراریختی هسته‌ای دارند (۶).

۲. **محل بیان پروتئین نوترکیب در یک تراریخته:** همچنین باید در نظر گرفت که در کدام محل از گیاه، پروتئین دارویی تولید می‌شود. در حالی که تولید در توده سبز می‌تواند مقدار زیادی پروتئین تولید کند، اما بخش سبز گیاه از نظر فیزیولوژیکی بسیار فعال است و اگر بخش سبز گیاه به سرعت خشک نشود و رطوبت بالایی داشته باشد به علت فعالیت بالای آنزیم‌های گیاهی، ممکن است سطح پروتئین پایین نگه داشته شود یا غیرفعال شود. بنابراین، به جز مواردی که پروتئین یا پپتید بسیار پایدار باشند، تولید در ماده سبز ممکن است منجر به بازیابی ضعیف پروتئین شود و معمولاً به پردازش فوری نیاز دارد. تولید در غده یا ریشه، اگرچه عملی است، بسیاری از ویژگی‌های سیستم‌های تولید در ماده سبز را دارد. برخلاف ماده سبز، بذرها به طور

کلی دارای ترکیبات فنلی کمتر و مخلوط ساده‌تری از پروتئین‌ها هستند و به ویژه برای ذخیره‌سازی پایدار و طولانی مدت پروتئین‌ها و سایر مواد به منظور اطمینان از جوانه‌زنی موفقیت آمیز و با تأخیر، تکامل یافته‌اند (۶).

۳. **انتخاب گونه و مشخصه‌های گیاهی**: همچنین لازم است تصمیم گرفته شود که کدام گونه گیاهی برای تولید یک محصول دارویی خاص، تراریخته شود. گرچه از نظر تئوری تقریباً هر گیاهی توانایی تبدیل به یک گیاه تراریخته را دارد، اما ملاحظات عملی، استفاده از گیاهانی را که ما با آن‌ها بیشتر آشنا هستیم و در حال حاضر روش‌های تثبیت شده‌ای برای تراریختی ژنتیکی، تولید با حجم زیاد، برداشت و فراوری دارند، پیشنهاد می‌کنند. برای تولید در ماده سبز، توتون معمولاً به دلیل تولید بسیار کارآمد زیست‌توده، ماده مورد انتخاب بوده است، گرچه سیستم‌های دیگر مانند یونجه و حتی عدسک آبی[1] نویدبخش هستند. کاملا مشخص است که برای تولید بذر، گیاه بهینه شده برای تولید دانه درشت با پروتئین بالا، در اولویت قرار دارد. گیاهان زراعی غذایی به طور خاص برای تولید پایه‌های بذر با پروتئین بالا که برای آن‌ها فناوری برداشت، پردازش و ذخیره‌سازی در حال حاضر موجود است، پرورش داده شده‌اند (۶).

۴) استراتژی‌های مهندسی ژنتیک برای تحمل تنش زیستی در گیاهان

[1] Duckweed

امروزه تغییر شرایط آب و هوایی علاوه بر تأثیر مستقیم بر عملکرد کشاورزی، باعث کاهش در دسترس بودن زمین حاصلخیز برای کشاورزی نیز شده است، بنابراین در دسترس بودن، کیفیت و ایمنی غذا در اولویت قرار دارد. از دست دادن عملکرد محصول می‌تواند ناشی از تنش‌های زیستی و یا غیرزیستی باشد. تنش‌های زیستی مانند آفت زدگی، افزایش علف‌های هرز و بروز بیماری می‌تواند در کنار تنش‌های غیرزیستی مانند خشکسالی، شوری و دمای شدید باعث کاهش چشمگیر تولید مواد غذایی در بسیاری از نقاط جهان شود. با توجه به پیش‌بینی تغییر شرایط آب و هوایی در مناطق مختلف جهان، محققان شروع به ایجاد مدل‌هایی برای پیش‌بینی اثرات نامطلوب عوامل زنده و غیر زنده بر روی بهره‌وری محصولات کرده‌اند. در مطالعه‌ای که توسط کالیر و همکاران[1] در سال ۲۰۰۸ انجام شد، مشخص گردید که تغییر شرایط آب و هوایی در آینده می تواند منجر به تغییر در چرخه زندگی آفت ها شود. چنین تغییراتی برای عوامل بیماری‌زای گیاهی نیز پیش بینی شده است. علاوه بر این، افزایش چشمگیر جمعیت انسانی به طور قطع تقاضای غذا را از نظر کمی و کیفی افزایش می‌دهد. در حقیقت، پیشنهاد شده است که برای تأمین امنیت غذایی برای نسل‌های آینده، تولید مواد غذایی باید تا سال ۲۰۵۰ دو برابر شود (۱۲).

با استراتژی‌های مختلف می‌توان به افزایش تولید مواد غذایی دست یافت که برخی از این استراتژی ها عبارتند از:

۱) افزایش سطح زیر کشت

۲) توسعه گونه‌های اصلاح شده با روش‌های سنتی تکثیر

[1] Collier et al.

۳) کاربرد تکنیک‌ها و ابزارهای کشاورزی بهتر

۴) استفاده از رویکردهایی برای تولید محصولات تراریخته.

روش اول نه عملی است و نه پایدار؛ زیرا دیگر نمی‌توان مناطق کم جنگل را به زمین‌های قابل کشت تبدیل کرد. اگرچه اصلاح سنتی در این امر سهیم است، اما دارای محدودیت‌هایی مانند عدم انتقال دقیق ژن، انتقال ژن‌های ناخواسته، زمان بر و پرزحمت بودن است. در عین حال، افزایش استفاده از زمین برای مقاصدی غیر از کشاورزی (مانند مسکن، ساختمان‌های صنعتی، حفاظت از جنگل و غیره) نیز باید مورد توجه قرار گیرد. در شرایط فعلی، یک عمل مؤثر و چالش برانگیز، به حداکثر رساندن کارایی استفاده از زمین با افزایش بهره‌وری محصول در واحد سطح است (۱۲).

در این راستا، فناوری تراریخته برای بهبود محصول اهمیت پیدا کرده است. درک بهتر از عوامل زیستی و غیر زیستی در بهبود محصولات، و دستکاری آن‌ها برای نتایج بهتر، به عنوان یک استراتژی بالقوه در حال توسعه است. سطح زیر کشت محصولات اصلاح ژنتیکی شده (GM) سال به سال در حال افزایش است. اگرچه این یک نشانه مثبت برای افزایش استقبال از محصولات تراریخته در بازار تجاری است، اما نگرانی در مورد تأثیرات محصولات تراریخته بر روی سلامتی انسان همچنان ادامه دارد (۱۲).

گونه‌های گیاهی در معرض تهدید مداوم تنش‌های زیستی هستند که همزمان در طبیعت وجود دارند. حمله عوامل بیماری‌زا و انگلی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و نماتدها، نقشی اساسی در رشد و تولید گیاه دارد. جدا از این،

حشرات گیاه‌خوار و استفاده از مواد مغذی توسط علف‌های هرز، نیز موجب خسارات اقتصادی جدی در عملکرد محصولات می‌شود (۱۲).

برای محافظت از گیاهان در برابر تنش‌های زیستی، استراتژی‌های مختلف پیشگیری و کنترل، آزمایش شده است. چندین دهه است که روش‌های متداول اصلاح برای تولید ارقام مقاوم در برابر تنش‌های مختلف زیستی در گیاهان بطور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر روش‌های معمول کشاورزی، کشاورزان تا حد زیادی به سموم شیمیایی و علف کش‌ها وابسته هستند که منجر به افزایش قابل توجه بازده محصول می‌شود. با این حال، نگرانی‌های روزافزون زیست محیطی و بهداشتی در مورد استفاده از مواد شیمیایی در کشاورزی، راه را برای توسعه عوامل کنترل‌کننده زیستی[1] (BCA) هموار می‌کند. اقدامات کنترل‌کننده زیستی شامل استفاده از BCAها، مانند استفاده از آنتاگونیست‌های سرکوب کننده‌ی بیماری‌های گیاهی، استفاده از حشرات شکارچی، قارچ‌های حشره کش، باکتری‌ها و نماتدها برای کنترل حشرات آفت و استفاده از پاتوژن‌های خاص علف‌های هرز برای کنترل جمعیت آن‌ها است. از محصولات گیاهی طبیعی فرموله شده نیز در استراتژی‌های مدیریت تلفیقی آفات[2] (IPM) استفاده می‌شود (۱۲).

اگرچه از BCAها و ارقام مقاوم گیاهان زراعی به طور موفقیت آمیزی برای برخی بیماری‌های گیاهی و کنترل آفات استفاده می‌شود، اما از طرفی بیوتایپ‌هایی که فاقد مقاومت می باشند نیز به سرعت در حال ظهور هستند. تکنیک‌های متداول اصلاح گیاه، دشوار و زمان‌بر است. برای مقابله با ظهورگونه های مقاوم به آفات، پرورش دهندگان باید به

[1] Biological control agents
[2] Integrated pest management

دنبال صفات مقاومت جدیدی باشند که از دوام بیشتری برخوردار باشند. با این وجود، با توجه به زمان لازم برای تولید یک رقم جدید (کولتیوار[1]: (مخفف عبارت «واریته‌های کشت شده») گیاهانی هستند که اغلب نه از طریق بذر، بلکه به صورت رویشی (مثلاً از طریق قلمه‌های ساقه) تکثیر شده‌اند.)، اتکا به چنین راهکاری دشوار می‌شود. پیشرفت در حوزه مهندسی ژنتیک و زیست شناسی مولکولی طی دو دهه گذشته منجر به استفاده از فناوری تراریخته برای بهبود محصولات شده است (۱۲).

پتانسیل بالای مهندسی ژنتیک در توسعه گیاهان زراعی تراریخته‌ی مقاوم در برابر بیماری با موفقیت به عنوان یک رویکرد جایگزین برای اصلاح متعارف مورد استفاده قرار گرفته است. در طول سال‌ها، گیاهان تراریخته مقاوم در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی و آفات حشرات با موفقیت تولید شده است و این محصولات مهندسی شده به جای اینکه فقط به عنوان تحقیقات آزمایشگاهی باقی بمانند، به مزارع منتقل شده‌اند. بنابراین، علاوه بر گیاهان زراعی تراریخته که برای مقاومت در برابر باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، عوامل بیماری‌زا و نماتدها مهندسی شده‌اند، مقاومت در برابر حشرات گیاه‌خوار و علف‌های هرز ناخواسته نیز به واقعیت تبدیل شده است (۱۲).

تنش‌های زیستی در گیاهان شامل حمله عوامل بیماری‌زا و انگلی مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و نیز حشرات گیاه‌خوار (آفات) و علف‌های هرز می‌باشند. در ادامه به تفکیک این موارد و استراتژیهای مهندسی ژنتیک برای مقابله با هر یک از انواع تنش‌های زیستی توضیح داده شده است.

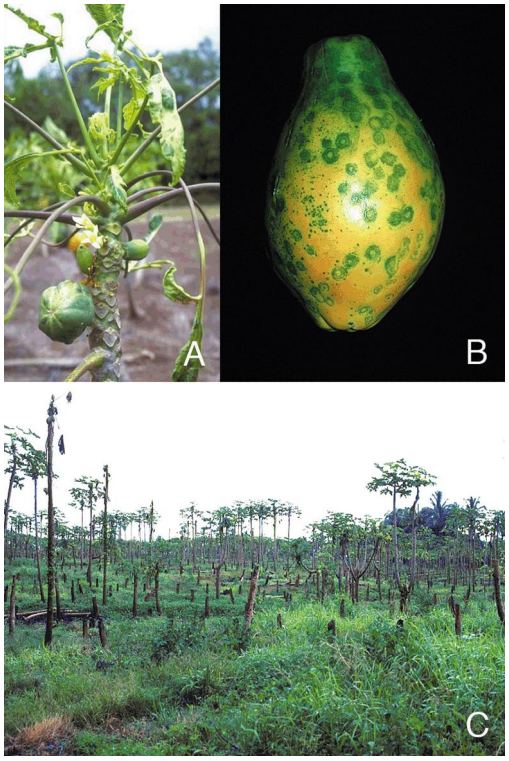
[1] Cultivar

۴-۱) ویروس‌ها

ویروس‌های گیاهی باعث خسارات قابل توجهی در عملکرد محصول و بهره‌وری در مقیاس جهانی می‌شوند. ویران‌کننده‌ترین بیماری‌های عفونی گیاهان توسط ویروس‌های گروه *توسپوویروس*[1] ایجاد می‌شوند که بیش از یک میلیارد دلار خسارت در سال وارد می کنند. با توجه به اثربخشی محدود مکانیسم‌های کنترل، مانند استفاده از بذرهای عاری از ویروس، ضدعفونی بذرها، اصلاح ارقام مقاوم یا جلوگیری از انتقال ناقل، از روش تراریخته استفاده شده است. با استفاده از مهندسی ژنتیک می‌توان ژن‌های طبیعی و مقاوم در برابر ویروس را به یک رقم موجود و مطلوب وارد کرد. مقاومت گرفته شده از پاتوژن[2] (PDR) متداول‌ترین پدیده‌ی مورد استفاده است. گیاهان تراریخته که ژن‌های یک پاتوژن ویروسی را بیان می‌کنند، در برابر ویروس‌های مشابه مقاومت نشان می‌دهند. اولین کاربرد پدیده PDR در رابطه با ویروس‌های گیاهی توسط پاول-آبل و همکاران[3] در سال ۱۹۸۶ نشان داده شد، که گیاه توتون بیان کننده ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک تنباکو[4] در برابر حمله ویروس موزاییک تنباکو مقاومت نشان داد. نمونه‌هایی از ژن‌های مشتق شده از پاتوژن‌ها شامل پروتئین رپلیکاز، پروتئین پوششی، پروتئیناز، پروتئین حرکتی یا ژن‌های کدکننده پروتئین‌های کشنده سلول میزبان مانند ترکیبات ضد ویروسی (پروتئین‌های مهار کننده ریبوزوم) یا

[1] *Tospovirus*
[2] Pathogen-derived resistance
[3] Powell-Abel et al.
[4] Tobacco mosaic virus

ریبوزیم‌ها و ریبونوکلئازها که ژن یا ذره ویروسی را به طور مستقیم هدف قرار می‌دهند، هستند. علائم و نحوه خسارت ویروس *پاپایا رینگ‌اسپات*[1](PRSV) (ویروس لکه حلقوی پاپایا) در شکل ۷ نشان داده شده است (۱۲).



شکل ۷– علائم و نحوه خسارت ویروس لکه حلقوی پاپایا به درخت، میوه و مزارع پاپایا

۴-۲) عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی

دسته‌ای از عوامل بیماری زای گیاهی، باکتریها و قارچهای بیماری زا هستند که باعث خسارت به محصولات گیاهی می‌شوند. تحقیقات در طول سال‌ها منجر به استفاده از استراتژی‌های مختلف برای توسعه گیاهان تراریخته مقاوم در برابر حمله باکتریها و قارچها شده است. اولین مورد بیان ژن‌های مقاومت (ژن‌های R[2]) است. ژن‌های R، پپتیدهای

[1] *Papaya ringspot*
[2] Resistance Genes

متصل‌شونده به نوکلئوتید با تکرارهای غنی از لوسین را که ماهیت آن‌ها از نوع غشایی است، کد می‌کنند. این پپتیدها محصولات ژن‌های آویرولانس[1] (ژن‌های بی‌خطر (avr) در واقع ژن‌های عامل بیماری زا هستند که منجر به تشخیص اختصاصی آن عامل بیماری زا توسط ژنوتیپ‌های گیاهی خاص می شوند. این تشخیص اختصاصی به وجود یک جفت ژن منطبق وابسته می باشد که شامل یک ژن avr در عامل بیماری و یک ژن مقاومت (R) در گیاه می باشد.) تولید شده توسط عامل بیماریزا (پاتوژن) را تشخیص می‌دهند و پس از آن باعث فعال شدن فرآیندهای پایین دستی متنوعی می‌شوند که شامل فعال شدن ژن‌های مرتبط با بیماری زایی[2] (ژن‌های PR)، تولید مقادیر زیاد مولکول‌های بازدارنده و تجمع آن‌ها و القا واکنش فوق حساسیت است. معرفی ژنِ R، Rxo_1 از ذرت به برنج منجر به مقاومت برنج در برابر بیماری باکتریایی ناشی از *Xanthomonas oryzae pv. Oryzicola* می‌شود. بیان ژن R ($RPI\text{-}BLB_2$) حاصل از سیب زمینی وحشی، باعث مقاومت سیب زمینی کشت شده در برابر حمله *Phytophthora infestans* می‌شود (۱۲).

بسیاری از عوامل بیماری‌زای قارچی، توکسین‌هایی (سم) تولید می‌کنند که به طور کلی مایکوتوکسین نامیده می‌شوند. *فوزاریوم کولموروم*[3] و *فوزاریوم گرمینارووم*[4]، یک مایکوتوکسین تریکوتسن به نام دئوکسی‌نیوالنول[5] تولید می‌کنند که به این سویه‌های قارچی سمیت می‌بخشد و همچنین درمان سمیت را برای انسان و حیوانات سخت می‌کند. محققان با بررسی نحوه برخورد قارچ با مایکوتوکسین، ارقام تراریخته گندم، برنج و جو را ایجاد کردند. این گیاهان اصلاح‌شده

[1] Avirulence
[2] Pathogenesis-related genes
[3] *Fusarium culmorum*
[4] *Fusarium graminearum*
[5] Deoxynivalenol

ژنتیکی، ژن تریکوتسن ۳-او-استیل ترنسفراز (tri101) را بیش از حد بیان کردند، که محصول آن در استیل شدن دئوکسی‌نیوالنول نقش دارد که منجر به سمیت بسیار کمتر آن می‌شود. این گندم تراریخته عفونت سنبله گندم کمتری را نشان داد و برنج و جو تراریخته دانه‌هایی با آلودگی مایکوتوکسین به مراتب کمتر از نوع وحشی به همراه داشتند (۱۲).

استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی و پروتئین‌های PR در گیاهان مهندسی‌شده برای مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا رایج ترین راهکار است. این پروتئین‌ها به طور سازنده‌ای در گیاهان بیان می‌شوند. با این حال، سطح آن‌ها با حمله پاتوژن افزایش می‌یابد. متابولیت‌های ضد میکروبی که بدین ترتیب تولید می‌شوند در تخریب اجزای قارچی مانند دیواره سلولی، غشای سلول یا RNA نقش دارند، یا باعث تولید متابولیت ثانویه می‌شوند یا موانع فیزیکی سلول‌های گیاهی را افزایش می‌دهند. طیف گسترده‌ای از این پپتیدها که در گیاهان برای ایجاد مقاومت در برابر عوامل مختلف بیماری‌زا بیش از حد بیان شده‌اند، عبارتند از کیتینازها، β1-3 گلوکانازها، دفنسین‌ها، تیونین‌ها، پروتئین‌های شبیه توماتین، پروتئین‌های انتقال دهنده لیپیدها و فنیل آلانین آمونیاک لیاز. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که ورود گلوکاناز یونجه به بادمجان منجر به افزایش مقاومت در برابر قارچ‌های بیماری‌زا مانند *Verticillium dahlia* و *Fusarium oxysporum* می‌شود (۱۲).

۴-۳) حشرات آفت

حشراتی که با تغذیه از گیاهان باعث خسارت به محصول می‌شوند، حشرات آفت نامیده می‌شوند. داستان موفقیت گیاهان تراریخته برای مقاومت در برابر حشرات آفت با تغییر گیاهان با ژن‌هایcry حاصل از *باسیلوس تورینژینسیس* آغاز شد. این ژن‌ها پروتئین‌های کریستالی حشره‌کش به نام توکسین‌های *Bt* را بیان می‌کنند. پس از بلع، توکسین به گیرنده‌های خاص در اپیتلیوم روده حشره متصل می‌شود و با فعالیت پروتئازها، توکسین را فعال می‌کند. این توکسین فعال باعث تشکیل منافذ لیتیک در سلول‌های اپیتلیال روده و منجر به لیز آن‌ها می‌شود و بدین ترتیب لارو حشرات را از بین می‌برد. بیش از ۴۰۰ ژن کدکننده توکسین‌های مختلف از انواع سویه‌ها *باسیلوس تورینژینسیس* شناسایی شده است (۱۲).طیف حشره‌کشی هر یک از انواع توکسین‌ها مشخص است.

ابتدا گیاهان توتون و گوجه فرنگی تراریخته حامل ژن‌های cry ایجاد شدند، و سپس بیان بافتی یا سازنده توکسین‌های *Bt* در بسیاری از گیاهان زراعی علیه گونه‌های خاص آفت ایجاد شد. پنبه *Bt* یکی از آن‌هاست و موفقیت تجاری دارد. فارغ از توکسین *Bt*، *باسیلوس تورینژینسیس* پروتئین‌های دیگری مانند پروتئین حشره کش Vip را نیز بیان می‌کند که طبیعتاً حشره‌کش است. مصرف پروتئین‌های Vip منجر به تورم و لیز اسمزی سلول‌های اپیتلیال روده و درنتیجه باعث مرگ حشره هدف می‌شود. برخلاف توکسین‌های cry، این ژن‌ها هم در هنگام رشد رویشی و هم اسپورزایی باکتری بیان می‌شوند (۱۲).

علاوه بر ژن‌های موجود در میکروب‌ها، از ژن‌های خود حشره نیز برای از بین بردن آفت استفاده می‌شود. یکی از این ژن‌ها، ژنی است که آنزیم پروتئینی کیتیناز را تولید می کند. این ژن مرتبط با رشد در حشرات است و در طی پوست‌اندازی لارو، یعنی تخریب اسکلت خارجی بیان می‌شود. آفات حشره‌ای که از گیاهان تراریخته ای که بیان

کننده کیتیناز حشرات هستند، تغذیه می‌کنند، در طی چرخه رشد خود در معرض سطح ثابت این آنزیم قرار می‌گیرند، که این امر روند حیات منظم آن‌ها را مختل می‌کند. دینگ و همکاران[1] در سال ۱۹۹۸، نشان دادند که گیاهان توتون تراریخته که کیتیناز را بیان می‌کنند، به آفت حشره ای لپیدوپتران[2] مقاومت نشان می‌دهند (۱۲).

همچنین نشان داده شده است که گیاهان ترانسفورم شده با ژن‌های گیاهی کدکننده متابولیت‌های ثانویه حشره‌کش مانند مهارکننده‌های پروتئیناز، آلفا آمیلاز و لکتین‌ها، در برابر حمله حشرات باعث ایجاد مقاومت می‌شوند. در حشرات، پروتئینازها از جمله آنزیم‌های هضم ضروری برای تجزیه کاتالیزوری اسیدهای آمینه از پروتئین‌ها هستند که در نتیجه به رشد و نمو حشرات کمک می‌کنند. از این رو، مصرف مهارکننده‌های پروتئیناز می‌تواند برای حشرات، کشنده باشد. مهارکننده‌های پروتئیناز در حجم وسیع تولید می‌شوند و توسط گیاهان در پاسخ به حمله گیاهخواران یا آسیب مکانیکی تجمع می‌یابند (۱۲).

بیان مهارکننده‌های پروتئینی پروتئازها در گیاهان، تأثیر قابل توجهی بر تکثیر حشرات آفت دارد. بهره‌برداری از نوروپپتیدها و مهارکننده‌های بیوسنتز پلی آمین با فعالیت حشره کش بالقوه ممکن است برای ایجاد مقاومت به حشرات در گیاهان مفید باشد (۱۲).

۴-۴) انگل نماتد

[1] Ding et al.
[2] Lepidopteran

نماتدهای (یا (کرم‌های گرد) موجودات استوانه‌ای شکل و فاقد ساختار بند بندی هستند که هم به‌عنوان گونه‌های آزاد و هم به‌عنوان پاتوژن‌های انسانی و حیوانی در سراسر جهان یافت می‌شوند.) انگلی گیاهان می‌توانند در یک محصول، باعث کاهش عملکرد محصول تا ۲۰٪ شوند و در بیشتر موارد، این تلفات ناشی از حمله نماتدهای گره ریشه و نماتدهای کیست است. رویکرد های متداول مانند تناوب زراعی، برای کنترل نماتدهایی که دامنه وسیعی از میزبان ها می باشند مفید نیستند و از طرف دیگر اقدامات شیمیایی نیز پرهزینه هستند. از اینرو، رویکردهای تراریخته جایگزین زمینه بهتری برای کنترل نماتدهای انگلی گیاهان فراهم می‌کند. برخی از استراتژی‌های مورد استفاده برای توسعه گیاهان تراریخته مقاوم در برابر نماتدها شامل ضد تهاجم و حرکت، تغذیه و رشد و نمو نماتد است. بیان مهارکننده سیستئین پروتئیناز (سیستاتین) در گیاهان تراریخته سیب زمینی به این گیاه کمک کرد تا در برابر حمله نماتد مقاومت کند. مهارکننده سیستاتین، از طریق مهار آنزیم‌های گوارشی هضم پروتئین را در نماتدها مختل کرده و منجر به توقف رشد آنها در گیاهان میزبان می‌شود (۱۲).

۴-۵) علف‌های هرز

علف‌کش‌ها مواد شیمیایی هستند که برای از بین بردن علف‌های هرز استفاده می‌شوند، اما در عین حال برای گیاهان زراعی کشت شده نیز کشنده هستند. از این رو، توسعه گیاهان تراریخته مقاوم در برابر علف کش‌ها انجام شد. یکی از علف‌کش‌های متداول، گلیفوسات است که آنزیم ۵-انول پیرورویلشیکیمات-۳-فسفات[1] (EPSP) سنتاز را مهار

[1] 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate

می‌کند. بیان بیش از حد این آنزیم در گل اطلسی، باعث مقاومت در برابر این علف‌کش می‌شود. بدین صورت که علف‌کش گلیفوسات باعث مهار بخشی از آنزیم گلیفوسات EPSP سنتاز موجود در اطلسی تراریخته شده اما به علت بیان بیش از حد این آنزیم، قادر به مهار بخش اضافی آنزیم نشده و لذا آنزیم کار حیاتی خود را انجام داده و گیاه مقاومت می‌کند. بیان یک فرم حساس از سنتاز EPSP نیز نتایج مشابهی را نشان داد. از آن زمان، این راهکار برای چندین گیاه زراعی نیز استفاده شده است. سویای مقاوم به گلیفوسات در سال ۱۹۹۶ با موفقیت تجاری شد و بعدا محصولات GM مانند ذرت مقاوم به علف‌کش، پنبه و غیره نیز توسط کشاورزان پذیرفته شد (۱۲).

۵) پاسخ گیاهان تراریخته به استرس‌های محیطی مختلف

در زیست شناسی گیاهی، روش‌های ترانس ژن[1] به منظور سازگار کردن گیاهان زراعی با تغییرات سریع محیطی به کار گرفته می‌شود. استفاده از گیاهان زراعی تراریخته طی یک دهه گذشته بسیار افزایش پیدا کرده است. اولین قدم به منظور دستیابی به گیاهان زراعی تراریخته، شناخت ژن‌ها به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی مسیرهای متابولویکی مختلف، شامل سنتز اوسمولیت[2]، هموستازی یون‌ها با جذب انتخابی یون، سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و سایر سیستم‌های دفاعی گیاهان است (۱).

ویرایش ژنوم با فراهم کردن گزینه‌هایی برای انتخاب و یا وارد کردن ژن‌های مورد نظر به درون گونه‌ها و یا ارقام زراعی، انقلابی در زیست فناوری گیاهی به وجود آورد. یک استرس مشخص می‌تواند بیان ژن‌های مشخصی را به

[1] Transgenic
[2] Osmolyte

شیوه وابسته به گونه تغییر دهد. این مسئله منجر به بروز تفاوت و تنوع در کارایی ادراک سیگنال‌ها و مسیرهای سیگنالینگ متأثر از آن‌ها می‌شود. بدین ترتیب گونه گیاهی پاسخ‌های مشخصی از خود تولید می‌کند که باعث سازگاری بیشتر و در نهایت افزایش مقاومت در برابر استرس می‌شود (۱).

ژن‌های خارجی را می‌توان با استفاده از روش‌های فیزیکی و یا زیستی وارد گیاه کرد. برای موفقیت در وارد کردن ژن به گیاه، نیاز است مسائلی مانند پتانسیل بازتولید، شایستگی بافت‌های هدف، بهره گیری از روش انتقال DNA بهینه و جلوگیری از شکل گیری واریته‌های با تنوع ژنتیکی و مورفولوژی بالا بوسیله رعایت شرایط استریل، در نظر گرفته شود. چندین تکنیک مانند ترانسفورماسیون پروتوپلاست، بیولیستیک یا بمباران ریزپرتابه‌ای[1] و ترانسفورماسیون به کمک آگروباکتریوم این شرایط را فراهم می‌کند (۱).

۵-۱) رویکردهای تراریخته برای تحمل تنش غیر زیستی در گیاهان

در دهه گذشته، دانش بشر به طرز چشمگیری نسبت به افزایش مقاومت گیاهان به استرس‌های محیطی با استفاده از روش‌های ترانس ژن بهبود یافته است. اغلب گیاهان تراریخته در برابر عوامل مختلف غیرزنده (مانند تنش های غیر زیستی) فقط در محفظه‌های رشد، گلخانه‌ها و یا در شرایط تحت کنترل، آزمایش و بررسی شده‌اند. مطالعات کمی بر روی مقاومت گیاهان تراریخته به استرس‌های محیطی در شرایط طبیعی زیستی انجام شده است (۱).

۵-۱-۱) استرس خشکی

[1] Microprojectile bombardment

سازگاری به استرس خشکی یکی از اصلی‌ترین و مهم‌ترین چالش‌های گیاه شناسان و زیست فناوران در شرایط فعلی تغییر اقلیم است. دانشمندان تلاش‌هایشان را برای روشن ساختن فرآیندهای متابولیکی درسطح ژن‌ها و سلول‌ها که تحت شرایط خاص اقلیمی فعال می‌شوند، افزایش داده‌اند. کارآزمایی‌های تحقیقاتی بر روی بهینه کردن ژنوم گیاهان به منظور افزایش مقاومت در برابر استرس‌های آبی و افزایش محصول نهایی تولیدی متمرکز شده‌اند تا در نهایت بتوان به ازای هر قطره آب محصول بیشتری تولید کرد. این روند رو به رشد در اصل به دنبال این است تا بهینگی مصرف آب[1] (WUE) را توسط گیاهان زراعی افزایش دهد تا بتوان به شکل مناسب‌تری از آب موجود بر روی کره زمین استفاده کرد (۱).

تفاوت میان روش‌های ترانس ژن و روش‌های سنتی افزایش مقاومت گیاهان به استرس‌های آبی بسیار چشمگیر است. یکی از روش‌های ترانس ژن مورد توجه، مهندسی ژن‌های مرتبط با مسیرهای متابولیکی و دفاعی مهم مانند مسیرهای سنتز محافظ اسمزی[2] و سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی است. برای مثال تولید هورمون گیاهی آبسیزیک اسید (ABA) منجر به بسته شدن روزنه‌ها و بیان ژن‌های پاسخ دهنده به استرس می‌شود (۱).

سه مسیر اصلی جذب و تثبیت CO_2 در گیاهان وجود دارد: مسیر C_3، مسیر C_4 و مسیر متابولیسم اسید کراسولا (CAM). تنفس نوری یک مسیر پر هزینه است که زمانی رخ می دهد که روبیسکو (آنزیم چرخه کالوین) به جای دی اکسید کربن روی اکسیژن اثر می گذارد. اکثر گیاهان از نوع گیاهان C3 هستند که هیچ ویژگی خاصی برای

[1] Water use efficiency
[2] Osmoprotectant

مبارزه با تنفس نوری ندارند. گیاهان C4 با جداسازی فضایی تثبیت اولیه CO2 و چرخه کالوین، تنفس نوری را به حداقل می‌رسانند و این مراحل را در انواع مختلف سلول انجام می‌دهند. گیاهان C_4 می‌توانند تنفس نوری را با جدا کردن تثبیت اولیه CO_2 و چرخه کلوین در انوع سلول متفاوت به حداقل برسانند. گیاهان CAM می‌توانند کربن را در شب تثبیت کنند و در نتیجه نسبت به تنش خشکی به واسطه تثبیت کربن بهینه‌تر و ویژگی‌های آناتومی‌خاص مقاوم‌تر هستند. اخیراً دانشمندان به طور کامل پیشرفتی که طی دو دهه گذشته بر روی تولید لاین‌های گیاهان تراریخته از گیاهان زراعی مختلف C_3 را توضیح دادند؛ این گیاهان فتوسنتز بهینه‌تری بواسطه ورود ژن‌های کدکننده آنزیم‌های C_4 داشتند، همچنین بیان بیش از حد معمول آنزیم‌های C_3 و یا بیان فاکتورهای رونویسی (TF) را نیز نشان داده‌اند. معمولاً گیاهان C_4 و CAM در محیط‌های خشک نسبت به سایر گیاهان مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند؛ زیرا فتوسنتز کارآمدتری دارند و WUE آن‌ها نسبت به گیاهان C_3 بالاتر و بهتر است (۱).

در کل ژن‌های زیادی مرتبط با مقاومت به خشکی در گیاه *آرابیدوپسیس*[1] (شکل ۸) کشف و شناسایی شده‌اند. با این وجود تعداد کمی از این ژن‌ها در سایر گیاهان زراعی و تنها تحت شرایط کنترل شده و آزمایشگاهی و نه شرایط طبیعی زیستی مورد آزمایش قرار گرفته اند (۱).

[1] *Arabidopsis*

شکل ۸- تصویری از گیاه مدل *آرابیدوپسیس تالیانا*

۵-۱-۲) استرس شوری

شوری یک استرس محیطی اولیه است که بر روی رشد و نمو گیاهان از طریق مسمومیت یونی، کاهش میزان جذب آب، به هم ریختن هورمون‌ها و استرس اکسیداتیو اثرات منفی می‌گذارد. مانند سایر استرس‌های غیرزیستی، در گیاهان چندین پاسخ به شرایط با شوری بالا آغاز می‌شود. یکی از این پاسخ‌ها محافظت کردن و حذف یون‌های زیان آور مانند Na^+ و Cl^- از بافت‌های حساس مانند مزوفیل (جایی که مسمومیت بوسیله سدیم می‌تواند با K^+ برای اتصال به گیرنده‌های اختصاصی آن رقابت کند) و هدایت آن‌ها به آپوپلاست و یا واکوئل است (۱).

حفظ غلظت بالایی از پتاسیم و نگه‌داشتن یون‌ها و مواد محلول آسیب رسان در ریشه‌ها و نواحی آپوپلاستی، یکی از اصلی‌ترین استراتژی‌های گیاهان برای مقابله با تنش شوری است. بوسیله این استراتژی نسبت میان K^+ و Na^+ بالا نگه داشته شده و طی عملکرد انتقال دهنده‌ها به خوبی انجام می‌پذیرد (۱).

برای مثال گیاهانی که ژن‌های انتقال دهنده یون‌ها را بیش از حد بیان می‌کنند (مانندهالوفیت‌ها) مقاومت بیشتری نسبت به تنش شوری از خود نشان می‌دهند. بیان بیش از حد ناقل Na^+/H^+ (AINHX) حاصل از یک هالوفیت در گیاه توتون، منجر به افزایش مقاومت این گیاه به تنش شوری به دلیل حفظ Na^+ و K^+/Na^+ در یک سطح مطلوب می‌شود (۱).

این مطالعات بیان می‌کنند که مهندسی ژن‌های دخیل در مقاومت به سطح شوری بالا در علف‌های هالوفیت می‌تواند منجر به مقاومت گیاهان زراعی ارزشمند و حساس به شوری شود.

۵-۱-۳) تنش سرمایی

زنده ماندن گیاهان در دماهای پایین به پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی ایجاد شده درون گیاه بواسطه دماهای پایین بستگی دارد. این مسئله می‌تواند با پاسخ به دوره‌های نوری اشتباه گرفته شود؛ زیرا اغلب مرزهای جغرافیایی که در آن‌ها دوره تاریکی طولانی است، سرد هستند. اصلی‌ترین عوامل اقلیم‌زدایی و اقلیم‌زایی مجدد گیاهان تحت تنش سرمایی شامل در دسترس بودن آب، رشد و نمو، متابولیسم انرژی و دوره‌های نوری می باشد. املاح سازگار، پروتئین‌های غشایی، آنتی اکسیدان‌ها و بیان ژن‌های پاسخ به سرما، نقش‌هایی اساسی در مقاومت به سرما در گیاهان ایفا می‌کنند. استرس سرمایی، بیان ژن‌های پاسخ به سرما که مجموعه‌ای از پروتئین‌های بسیار مهم را رمزگذاری می‌کنند، تغییر می‌دهد. برای مثال آنزیم‌های دخیل در تنفس، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، فنیل پروپانوئیدها، لیپیدها، آنتی اکسیدآن‌ها، چاپرون‌ها و پروتئین‌های ضد یخ از جمله این پروتئین‌ها هستند. ژن‌های دیگری که در مکانیسم‌های

تنظیمی طی آب‌زدایی بواسطه سرما دخیل هستند نیز در تنش سرمایی فعال می‌شوند. تغییر الگوی بیان ژن و پس از آن تولید پروتئین‌های خاص، نقشی اساسی در مقاومت به سرما ایفا می‌کنند. این ژن‌ها در پخش شدن، زنده ماندن و میزان محصول نهایی گیاهان نیز نقش اساسی دارند (۱).

اصلاح سنتی وابسته به هیبریداسیون بین گونه‌ای و بین جنسی، تا به امروز نتوانسته است نتایج مناسبی در توسعه ارقام زراعی مقاوم به سرما ایجاد کند. با این وجود روش‌های زیست فناورانه و مولکولی شامل توالی‌یابی ژنوم و دستکاری ژنوم برای تولید گیاهان تراریخته، فرصتی برای فهم و دستیابی به مکانیسم‌های پیچیده مقاومت به سرما در سطوح رونویسی و ترجمه را در اختیار ما قرار می‌دهد. بیان تغییر یافته ژن، میزان متابولیت‌های مختلفی که نقشی اساسی در مقاومت به سرما دارند، افزایش می‌دهد. بیان بیشتر ژن‌هایی که تحت دماهای پایین فعال می‌شوند و تا به امروزه جداسازی شده‌اند، بوسیله فاکتورهای رونویسی CBF/DREB تنظیم می‌شوند (۱).

استرس سرمایی بیان تعدادی از پروتئین‌ها مانند پروتئین‌های دخیل در مسیر متیونین و پروتئین‌های پایدارکننده غشا را فعال می‌کند. مسیر متابولیسم متیونین نقش مهمی در سنتز زیستی متابولیت‌های ضروری مانند پلیول‌ها و پلی‌آمین‌ها که در سازگاری به تنش سرمایی مهم هستند، ایفا می‌کند. اگرچه نقش دقیق آن‌ها در مقاومت به سرما همچنان ناشناخته است ولی تجمع آن‌ها در گیاهانی که در معرض تنش سرمایی بوده‌اند گزارش شده است. بیان بیش از حد متیونین سولفواکسیدردوکتاز A (MsrA)، آنزیمی مهم در تنظیم متابولیسم متیونین، مقاومت نسبت به

آسیب‌های اکسیداتیو در دماهای پایین را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد استرس سرمایی به بخش‌های دخیل در فتوسنتز مانند فتوسیستم‌ها و پیگمان‌های فتوسنتزی بوسیله تغییر در بیان ژن‌های فتوسنتزی، آسیب می‌رساند (۱).

گیاهان تراریخته‌ای که ژن‌های پاسخ به این استرس را بیش از حد بیان می‌کنند، از نقش دیگر این ژن‌ها در کم کردن اثرات بازدارندگی و اکسیداسیون نوری استفاده می‌کنند و حساسیت بخش‌های دخیل در فتوسنتز را به سرما کاهش می‌دهند. گیاه تراریخته *A. thaliana* که ژن *CcCDR*،کد کننده پروتئین تنظیمی در تنش خشکی و سرما را بیش از حد بیان می‌کند، در برابر سرما و شوری بوسیله بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی متنوعی مانند افزایش فعالیت آنتی اکسیدان‌ها و تجمع اسمولیت‌ها مقاومت دارد (۱).

سرما تجمع الیگوساکاریدها و فعالیت گالاکتوزیل سنتاز را در گیاه تحریک می‌کند. گالاکتینول سنتاز، سنتز گالاکتینول را که به عنوان دهنده گالاکتوزیل طی سنتز الیگوساکاریدهای خانواده رافینوز عمل می‌کند، برعهده دارد. درخت *فوتینیا سرولاتا*[1] که ژن گالاکتینول سنتاز *(AmGSI)*، از منشا یک درخت مقاوم به سرما *(Ammopiptanthus mongolicus)* را بیش از حد بیان می‌کند، نسبت به سرما از خود مقاومت نشان می‌دهد. گالاکتینول و رافینوز از بین‌برندگان فعال رادیکال‌های هیدروکسیلی هستند. نقش گالاکتینول سنتاز در خشکی و شوری به خوبی بررسی شده است، با این وجود تعدادی گزارش در خصوص نقش احتمالی آن در مقاومت به سرما نیز وجود دارد. یکی از این معدود گزارش‌ها بیان می‌کند که وارد کردن و بیان بیش از حد ژن *MfGolS1* در توتون، منجر به افزایش مقاومت

[1] *Photinia serrulate*

گیاه به سرما و افزایش تولید گالاکتینول، رافینوز و استاکیوز می‌شود. مطالعه و بررسی مکانیسم‌های دخیل در مقاومت به استرس سرمایی علف‌ها در سطح شیمیایی و مولکولی می‌تواند در رمز گشایی از پاسخ ژن‌ها و نقش آن‌ها در افزایش مقاومت گیاهان زراعی اقتصادی به این استرس مفید باشد (۱).

۵-۱-۴) دمای بالا

دمای بالا می‌تواند تعدادی از فرآیندهای دخیل در رشد و حفظ شرایط فیزیولوژیکی مانند جوانه زنی دانه، تکوین گیاه، فرآیندهای تولید مثل و فتوستز را تحت تاثیر منفی قرار دهد که این مسئله در نهایت منجر به کاهش محصول تولیدی می‌شود. برای مثال اختلال در مراحل تکثیر جنسی گیاه بواسطه درجه حرارت بالا، منجر به مهار تورم دانه گرده و عدم تجزیه بساک و پراکندگی گرده می‌شود، که در نهایت بر تولید بذر تأثیر منفی می‌گذارد. درک مکانیسم‌های تحمل دمای بالا در سطوح فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی با توجه به گرم‌شدن جهانی برای تولید ارقام زراعی مقاوم به دماهای بالا ضروری است (۱).

مکانیسم‌های ژنتیکی و مولکولی نقشی کلیدی در مقابله با اثرات نامطلوب ایجاد شده در اثر گرما ایفا می‌کنند. حس کردن استرس دمایی بالا و ایجاد مقاومت در برابر آن بسیار پیچیده است و شامل شبکه‌های درگیر در اجزای مختلف سلولی می‌شود. سنسورهای متفاوتی مانند سنسورهای هیستونی موجود در هسته، سنسورهای پروتئینی موجود در شبکه آندوپلاسمی و سیتوپلاسم و یک کانال غشایی، جریان ورود کلسیم به سمت داخل را فعال می‌کنند و بدین طریق ژن‌های پاسخ به شرایط دمایی بالا که در مقاومت به گرما نقش دارند، فعال می‌شوند (۱).

چپرون‌های مولکولی مانند پروتئین‌های شوک گرمایی (HSP[1]) نقشی کلیدی در از بین بردن اثرات منفی ایجاد شده بواسطه شوک گرمایی ایفا می‌کنند. کاهش سطح HSPها باعث بروز ناهنجاری‌های تکوینی می‌شود. پنج خانواده HSP به شدت حفاظت شده تا به امروز شناسایی شده‌اند که جرم مولکولی نسبی آن‌ها با هم متفاوت است. تحت شرایط متابولیسمی نرمال، HSPها در چندین فرآیند مانند تاخوردن پروتئین‌ها، بازآرایی، جا به جایی، تجزیه پروتئین‌ها، سیگنالینگ و کنترل چرخه سلولی دخالت دارند. با این وجود، تحت شرایط استرس، HSPها با سایر چپرون‌های کمکی برهمکنش برقرار می‌کنند تا پروتئین‌ها را مجدداً تا بزنند و بدین ترتیب کانفورماسیون پروتئین‌ها و هموستازی (حفظ شرایط پایدار سلول) سلولی مناسب برای شرایط حفاظت از گیاه شود. ماهیت مقاومت موفقیت آمیز گیاهان در مقابل دماهای بالا به تجمع رونوشت‌های کدکننده HSPها و آنزیم‌های سم‌زدایی ROS مانند آسکوربات پراکسیداز (APX) دارد. برای مثال گیاهان جهش یافته ذرت[2] و آرابیدوپسیس برای ژن *HSP100*، تأخیر در رشد و سازگاری به دماهای بالا را از خود نشان می‌دهند (۱).

تا مدتی قبل، ژن‌های شناسایی شده و یا وارد شده به گیاهان تراریخته عموماً به سیستم‌های دفاع اکسیداتیو ارتباط داشتند. با این وجود، تعداد دیگری از سیستم‌های متابولیکی و فعالیت گیاهان تحت تأثیر تغییر دما قرار می‌گیرد و می‌توانند در گیاهان تراریخته القا شوند. علاوه براین، افزایش دمای محیط که در طی ده سال گذشته مشاهده شده

[1] Heat shock proteins
[2] *Zea mays*

است، چالشی جدی برای تولید محصولات زراعی ایجاد می‌کند و بدین ترتیب نیاز به تولید گیاهان مقاوم به استرس گرمایی بیش از هر زمان دیگری احساس می‌شود (۱).

۵-۱-۵) استرس مواد مغذی

تغییر در شرایط محیطی می‌تواند به طور مستقیم بر میزان دریافت مواد مغذی توسط گیاهان اثر بگذارد. در میان انواع کمبود مواد مغذی، معمول‌ترین کمبودها مربوط به کمبود آهن، روی و کلیسم است و کمبود سایر مواد مغذی به نظر چندان متداول نیست. بسیاری از کودهای شیمیایی که با مواد مغذی دلخواه غنی می‌شوند، ممکن است میزان توده زیستی را افزایش دهند اما فوایدشان برای گیاه طی سنگ‌شویی، شخم زدن زمین، تبخیر شدن و یا مصرف توسط میکروب‌ها، به حداقل می‌رسد (۱).

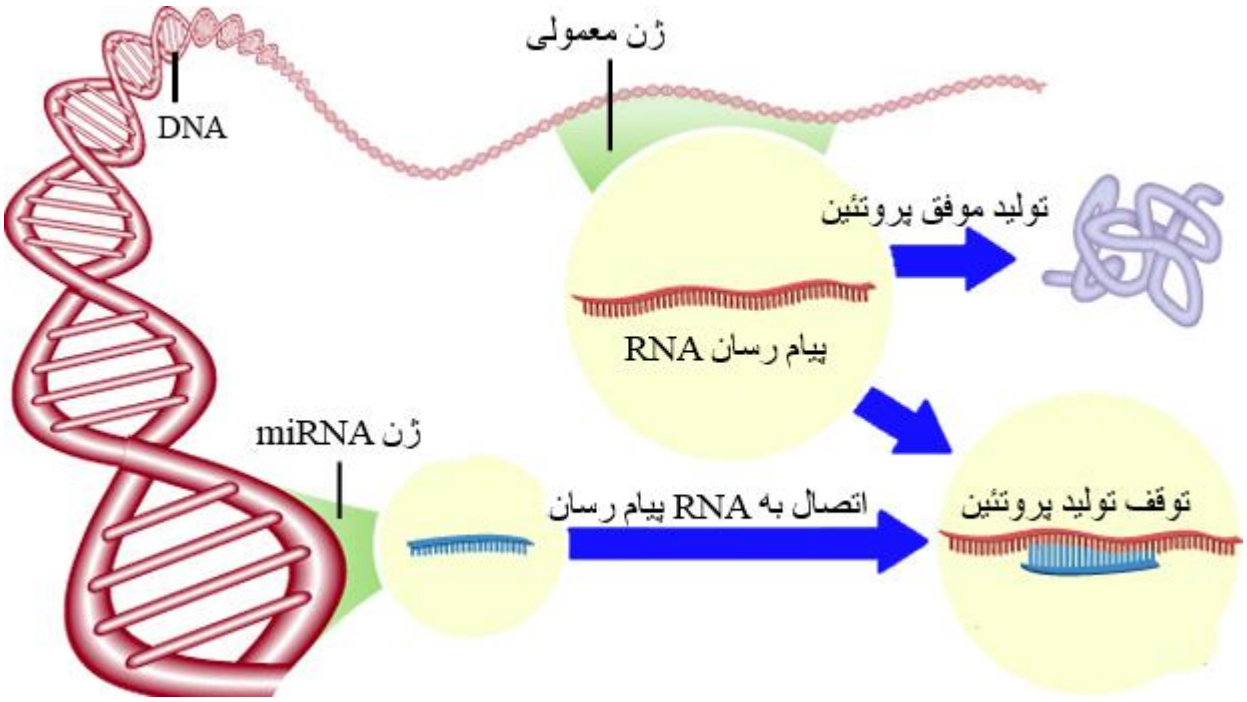
افزایش بهینگی مصرف مواد مغذی[1](NUE) گیاهان زراعی برای جلوگیری از کمبود مواد مغذی بسیار حیاتی است. در طی دهه‌های گذشته روش‌های سنتی اصلاح گیاهان به منظور افزایش NUE انجام شده است و به نتایج مناسبی هم رسیده است. اما استفاده از تکنیک‌های پیشرفته مولکولی نتوانسته نتایج قابل توجهی به بار بیاورد. فعالیت بهینه ناقلین و آنزیم‌های درگیر در جذب مواد مغذی برای بهبود جذب مواد مغذی بسیار ضروری است و روی محصول نهایی گیاه زراعی تاثیر مستقیم می‌گذارد. برای مثال، بیان بیش از حد ژن گلوتامین سنتتاز *(GS1)* (آنزیمی است که نقش مهمی در متابولیسم نیتروژن از طریق ساختن گلوتامین از گلوتامات و آمونیاک دارد)در گندم منجر به تجمع

[1] Nutrient use efficiency

نیتروژن در تنه[1] و دانه گیاه می‌شود در حالی که بیان بیش از حد *GS1-3* منجر به افزایش (۳۰٪) تعداد کرنل (میوه گیاه ذرت می باشد که در بسیاری از کشور ها ذرت نامیده می شود) در ذرت خواهد شد. در سطح مولکولی گزارش اندکی پیرامون مکانیسم‌ها و ژن‌های دخیل در انتقال و جذب مواد مغذی وجود دارد. با این وجود اکثر افراد معتقدند که فاکتورهای رونویسی و کینازهای مرتبط (آنزیم هایی که فسفات را اضافه می کنند) با آن‌ها دراین فرآیند دخالت دارند (۱).

بهینه کارکردن ناقل آمونیوم، *OsAMT1*، به برنج‌های تراریخته برای جذب مقادیر بهینه از آمونیوم که منبع اصلی نیتروژن در گیاهان برنج است کمک می‌کند. این مسئله نقش ناقل‌ها در بهبود NUE، رشد و میزان محصول نهایی تحت شرایط بهینه و یا حتی غیر بهینه نیتروژن را نشان می‌دهد. micro RNAها (مولکول های تک رشته ای کوچک RNA غیر کد کننده (حاوی حدود ۲۲ نوکلئوتید) که در گیاهان، حیوانات و برخی ویروس ها یافت می شوند و در خاموش کردن RNA و تنظیم بیان ژن پس از رونویسی عمل می کنند) نقش تنظیمی بر روی ژن‌های گرسنگی در سطح پسا ترجمه دارند (شکل ۹) (۱).

[1] Shoot



شکل۹ نحوه عملmiRNA

گیاهان زراعی غنی از مواد مغذی را می‌توان به صورت انتخابی از ژرم‌پلاسم‌های موجود و یا از طریق دستکاری ژنتیکی تولید کرد. دستکاری آرایش ژنتیکی گیاهان زراعی به منظور افزایش سطح مواد غذایی، به یکی از حوزه‌های جذاب با هدف کم کردن سوءتغذیه گیاهان تبدیل شده است. روش‌های مهندسی ژنتیک به منظور افزایش NUE بر روی افزایش محلولیت مواد مغذی معدنی، انتقال مجدد آن‌ها در درون گیاه و در نهایت تجمع آن‌ها در اندام‌های ذخیره سازی متمرکز شده است. برای مثال بیان بیش از حد ژن *GmPT1* (کد کننده یک ناقل) حرکت فسفات را درون گیاه افزایش می‌دهد و منجر به افزایش میزان محصول نهایی و بهینه شدن مصرف فسفر در سویا می‌شود. به منظور افزایش NUE از طریق مهندسی ژنتیک، به دانشی عمیق و جامع درباره عوامل دخیل در جذب مواد مغذی و تحرک آن‌ها در گیاهان نیاز است. استفاده از روش‌هایی مانند ساخت پروفایل رونوشت‌ها، آنالیز موتانت‌های ناقص در پاسخ به کمبود

مواد مغذی و بررسی رشد طبیعی برخی از گیاهان تحت شرایط استرس مواد مغذی از جمله موارد مهم و لازم برای رسیدن به دانش کافی در این زمینه است (۱).

به منظور تقویت گیاهان زراعی مهم، روش‌های مبتنی بر دست‌ورزی ژنتیکی بر روش‌های سنتی ارجحیت دارند؛ زیرا این روش‌ها مطمئن هستند و منجر به صرفه جویی در زمان و نیروی کار می‌شوند. گزارش شده است که گیاه برنجی که پروتئین ذخیره کننده آهن، فریتین، را بیش از حد بیان می‌کند، در دانه‌هایش محتوای آهن بیشتری خواهد داشت. سازگار کردن گیاهان زراعی تراریخته فرآیندی زمان بر است و نیاز است پیش از آنکه این محصولات وارد بازار شوند و به شکل تجاری مورد استفاده قرار بگیرند، برخی از قوانین و سیاست‌ها بازنگری شده و با شرایط فعلی سازگار شوند. در یک گیاه و یا واریته که برای یکی از مواد مغذی به شکل ژنتیکی دست‌کاری شده است، می‌تواند بیان یک آبشار ژنی تغییر یافته باشد (کم شده باشد و یا افزایش پیدا کرده باشد) و این مسئله می‌تواند برای سلامت انسان خطراتی به دنبال داشته باشد. تعدادی از موسسات دولتی، عموماً در کشورهای توسعه یافته، در حال مطالعه و بررسی این مشکلات و مسائل هستند. روش‌های دست‌ورزی ژنتیکی را می‌توان ابزاری بسیار کارا و مفید در گیاه‌شناسی پایه دانست اما باید توجه کرد که فهمیدن و اشراف بر شبکه ژنی و مولکولی فیزیولوژیک دخیل در پاسخ گیاه به کمبود و یا وجود بیش از حد یک ماده مغذی، شرط لازم برای انجام دستکاری‌های ژنتیکی بر روی گیاهان است (۱).

۵-۱-۶) فلزات سنگین

آلودگی به فلزات سنگین، عاملی تعیین کننده در توزیع جهانی گونه‌های گیاهی و محصولات کشاورزی است به خصوص در کشورهایی که اقتصادشان شدیداً وابسته به فعالیت‌های صنعتی است. بسیاری از گیاهان، علائم مسمومیت به فلزات سنگین را زمانی نشان می‌دهند که میزان غلظت فلز از حدآستانه مشخصی عبور کند. در کل، نکروزه شدن یا مردن بافت گیاهی و رشد ناقص تنه گیاه علایمی آشکار از آلودگی به فلزات سنگین هستند (۱).

گیاه پالایی[1] به منظور رفع آلودگی‌های محیطی مانند آلودگی به فلزات سنگین بسیار مورد توجه قرار گرفته است. علاوه براین پاکسازی به وسیله ریزوسفر (محیط اطراف ریشه گیاهان)[2] نیز انجام می پذیرد که در آن همزمان هم گیاه و هم میکروب‌های ریزوسفر آن وارد فرآیند می شوند. این فرآیند هم به طور طبیعی در طبیعت و هم به طور مصنوعی و بوسیله القا توسط مهندسی ژنتیک، رخ می‌دهد و به رفع و یا کاهش سطح آلودگی و رشد طبیعی گیاه کمک می‌کند (۱).

بیشتر نمک‌های فلزات سنگین، آب دوست هستند و به راحتی در فاضلاب حل می‌شوند در نتیجه به سختی می‌توان آن‌ها را توسط روش‌های فیزیکی جداسازی کرد. در سطوح پایین فلزات سنگین، روش‌های فیزیکی شیمیایی ناکارآمد و یا هزینه‌بر هستند. از اینرو، روش‌های جایگزین مانند جذب زیستی و یا تجمع زیستی برای حذف فلزات سنگین به کار گرفته می‌شود. استفاده از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان با هدف پاکسازی، روشی کارا و مفید به منظور غلبه یا کاهش آلودگی به فلزات سنگین است. فارغ از پتانسیل این روش‌ها برای احیای خاک‌های آلوده، اطلاعات جزئی درباره

[1] Phytoremediation
[2] Rhizoremediation

مکانیسم‌های دخیل دراین فرآیند هنوز در دسترس نیست و تلاش‌ها برای تبدیل این استراتژی‌ها از روش‌هایی موفق در سطح آزمایشگاه و یا گلخانه به روش‌هایی کارا در سطح مزارع کشاورزی همچنان ادامه دارد. دو عامل، این روش‌ها را تبدیل به روش‌هایی با کارایی پایین می‌کند:

۱) عوامل استراس‌زای فراوان موجود در مزارع کشاورزی که آن‌ها را نمی‌توان در سطح آزمایشگاه و یا گلخانه بررسی کرد.

۲) ناکافی بودن و بهینه نبودن روش‌ها و تکنیک‌هایی که می‌توان به منظور بررسی کاهش غلظت آلودگی‌های مختلف به کار گرفت (۱).

گیاه پالایی (استفاده از گیاهان زنده برای پاکسازی خاک، هوا و آب آلوده به آلاینده های خطرناک)، روشی مفید برای محیط زیست، کم هزینه و غیر تهاجمی است که می‌توان امروزه آن را برای حذف و یا خنثی کردن اثرات مضر فلزات سنگین از محیط زیست به کار برد. مکانیسم‌های مختلفی مانند کلات سازی یا رسوب دادن (استفاده از عوامل کلات‌کننده فلزات سنگین جهت افزایش جذب آنها توسط گیاه)، جابه جا کردن آلودگی‌ها، محصور کردن آلودگی‌ها و.... برای سم زدایی از فلزات سنگین سمی و متالوئیدها وجود دارد. علاوه بر این، تولید لیگاندهای (مولکول های

محرک) با میل بالا در مقیاس زیاد مانند فیتوکلاتین[1] (PCs) و متالوتیونئین[2] (MTs) و پپتیدهای واکنش پذیر به تیول غنی از سیستئین با اتصال به فلزات سمی و متالوئیدها، فرآیند سم زدایی را وساطت می‌کنند.

تولید مجموعه‌های PC-metal و یا MT-metal و وارد شدن آن‌ها به واکوئل‌ها، برای مقاومت در برابر فلزات سنگین ضروری هستند. آنزیم فیتوکلاتین سنتاز (PCS) سنتز PCsها را با استفاده از GSH و یا گاما گلوتامیل سیستئین به عنوان ماده اولیه به پیش می‌برد (۱).

در مطالعه ای نشان داده شد بیان بیش از حد هر دو ژن *AsPCS1* و *GSH1* به شکل همزمان (از *A. sativum* و *ساکارومیسز سرویزیه*) مقاومت گیاه *A. thaliana* را به فلزات سنگین و متالوئیدها افزایش می‌دهد. همچین لاین‌های سلولی که تنها یک ژن آن‌ها دست‌ورزی شده بود، مقاومت بیشتری نسبت به گیاهان وحشی نشان می‌دادند درحالی که کادمیم و آرسنیک تجمع یافته بیشتری نیز در آن‌ها یافت شد. گیاهانی که هر دو ژن در آن‌ها دستکاری شده بود، مقاومت بیشتر نسبت به فلزات سنگین و تجمع بیشتری (حدود دو برابر) از کادمیم و آرسنیک در مقایسه با گیاهانی که تنها یک ژن در آن‌ها دستکاری شده بود، نشان می‌دادند (۱). افزایش توامندی گیاهان برای تجمع فلزات سنگین یک راهکار موثر گیاه پالایی برای زدودن محیط از این فلزات سنگین می باشد.

افزایش تولید *GSH* و *PCs* منجر به تجمع و مقاومت به کادمیم و آرسنیک می‌شود. گیاهان مورد استفاده در گیاه‌پالایی می‌بایست به طور ذاتی ظرفیت بالایی برای جمع کردن و مقاومت به مقادیر بالایی از متالوئیدها را در توده

[1] Phytochelatins
[2] Metallothioneins

زیستی سطحی خود داشته باشند. علاوه بر این گیاهان می‌بایست سرعت رشد و تولید زیست‌توده بالایی داشته باشند (تا مقادیر بالایی از مواد آلاینده رو جذب کنند) و دافع آفات باشند (آفات تمایلی به تغذیه از این گیاهان نداشته باشند و در نتیجه آلودگی به مواد آلاینده جذب شده توسط این گیاهان به آفات منتقل نشود) تا از انتقال فلزات سنگین میان اجزای مختلف زنجیره غذایی جلوگیری شود. علاوه براین ویژگی‌های اولیه، گیاهان با توانایی بالا در جمع کردن فلزات سنگین باید سیستم ریشه‌ای گسترده‌ای داشته باشند، از نظر جغرافیایی توزیع گسترده‌ای داشته باشند و به راحتی کشت و درو شوند (۱).

دستکاری ژنتیکی برای تولید گیاهانی با ویژگی‌های مورفولوژیکی خاص که در عین حال کارآمدی‌های آناتومیکی خاصی به منظور جمع کردن متالوئیدها داشته باشند، به شکل وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است. اندامک های درون سلولی گونه‌های گیاهی مقاوم، میزان جذب و اتصال به فلزات بالاتری دارند و این گیاهان به شکل بهینه‌ای فلزات سمی را در واکوئل‌ها محصور می‌کنند تا فرآیند سم زدایی و حذف این مواد انجام پذیرد. این فرایند توسط مجموعه‌ای از ژن‌های تنظیم کننده، کنترل می‌شود. برای مثال پروتئین مخمری YCF1 ورود سرب و کادمیم به درون واکوئل‌ها را ممکن می سازد. گیاه *A. thaliana* تراریخته که YCF1 را به میزان بالایی بیان می‌کند، در برابر سرب و کادمیم مقاوم است (۱).

پیشرفت در روش‌های دستکاری ژنتیکی (تکی و یا ترکیبی) می‌تواند موفقیت گیاه پالایی متالوئیدهای سمی(سلنیم و آرسنیک) و فلزات (به خصوص مس، سرب و کادمیم) را به همراه داشته باشد. پیشرفت در مبانی مکانیکی روش‌های

دست‌ورزی ژنتیکی می‌تواند منجر به فهم بهتر ما از مبانی ژنتیکی مقاومت، تحمل و یا جمع کردن فلزات و متالوئیدها شود و اهمیت آن از این جهت است که جابه‌جایی و سایر فاکتورهای محیطی بر روی گیاه پالایی اثرگذارند و این مشکلات مانعی بر سر راه عملیاتی کردن آن هستند (۱).

۶) کشت بافت گیاهی، کاربردها و چشم‌انداز آینده

کشت بافت گیاهی اصطلاح گسترده‌ای است که به کشت هر قسمت از گیاه (سلول‌ها، بافت‌ها یا اندام‌ها) و جدا از گیاه در محیط‌های کشت مصنوعی، در شرایط آسپتیک (استریل) و در محیط‌های کنترل شده اشاره دارد. این مجموعه تکنیک‌ها به عنوان یک رویکرد تجربی، جهت نشان دادن نظریه‌ی سلولی به وجود آمده‌اند؛ نظریه‌ی سلولی بیان می‌کند که همه‌ی موجودات زنده از سلول‌ها که واحدهای اساسی ساختاری و تولیدمثلی هستند، تشکیل شده‌اند و همچنین کشت بافت گیاهی بر اساس مفهوم همه‌توانی[1] سلول ها ، یعنی پتانسیل ژنتیکی یک سلول برای تولید یک جاندار کامل چندسلولی، تعریف می‌شود. برخی از محققین جهت بررسی شرایط رشد و تأمین نیازهای پیچیده تغذیه‌ای و هورمونی مورد نیاز برای شکل‌گیری اندام‌ها یا بافت‌ها از سلول‌های منفرد جداشده در یک محیط کشت مصنوعی، تلاش‌های مختلفی کردند (۷).

محلول‌های مغذی به تنهایی یا همراه با عصاره‌های طبیعی به عنوان محیط کشت اولیه استفاده شده اند و چند نتیجه مهم گزارش شد؛ در این راستا دستیابی و کشف تنظیم‌کننده‌های رشد در گیاه، برای موفقیت کشت بافت گیاهی در

[1] Totipotency

شرایط آزمایشگاهی، تعیین‌کننده بود. پیشرفت کلیدی در کشت بافت گیاهی، کنترل ریخت‌زایی[1] با استفاده از سطوح مختلف و ترکیبات متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد بود؛ زیرا این امر سبب بازسازی کل گیاه می‌شود، هم‌چنین امکان استفاده از سیستم‌های درون آزمایشگاهی[2] برای مطالعه جنبه‌های اساسی تمایز سلولی، تکوین و همچنین استفاده از کشت بافت برای اهداف مختلف را فراهم می‌کند. شاید مهم‌ترین پیشرفت در کشت بافت گیاهی، ایجاد و استقرار سیستم‌های تراریختی ژنتیکی با استفاده از عوامل عفونت‌زا مانند *آگروباکتریوم تومفاشینس* و یا بمباران ذرات جهت امکان‌پذیر ساختن دستکاری ژنتیکی گونه‌های گیاهی است (۷).

تولید تجاری گیاهان دارویی و زینتی در سراسر جهان در حال رشد است. ارزش مالی آن‌ها طی دو دهه گذشته به طور قابل توجهی افزایش یافته است و پتانسیل بالایی برای رشد بیشتر در بازارهای داخلی و بین‌المللی وجود دارد. در سال‌های اخیر داروهای طبیعی که از اجزای گیاهان یا عصاره‌های گیاهی به دست می‌آیند، مجددا مورد توجه قرار گرفته‌اند. در حال حاضر، تقریباً ۴۰٪ یا بیشتر داروهایی که در کشورهای غربی استفاده می‌شوند، حداقل تا حدی از مشتقات منابع طبیعی هستند. در آیورودا[3]، سیستم بومی طب هندی، هزاران گونه گیاهی با جزئیات توصیف می‌شود. هند با داشتن مناطق متنوع آب و هوایی، از تنوع غنی گیاهان دارویی برخوردار است. جنگل‌ها گونه‌های گیاهی زیادی را در خود جای می‌دهند، اما جنگل‌زدایی باعث از بین رفتن سریع گیاهان دارویی شده است، به طوری که بسیاری از گیاهان دارویی با ارزش در معرض خطر انقراض قرار دارند. شرکت‌های دارویی به میزان زیادی به موادی که از

[1] Morphogenesis
[2] *In vitro*
[3] *Ayurveda*

منابع طبیعی تهیه شده، وابسته هستند. کشت بافت گیاهی یک روش جایگزین برای تکثیر تجاری بوده و به طور گسترده برای تکثیر تجاری گونه‌های گیاهی زیادی از جمله بسیاری از گیاهان دارویی استفاده می‌شود. در این میان، کاربرد گیاهان دارویی سنتی برای استفاده‌های انسانی نیز گزارش شده است (۱۳).

گیاهان گلدانی زینتی مانند بگونیا[۱]، فیکوس[۲]، آنتوریوم[۳]، داوودی[۴]، رز[۵]، بنفشه آفریقایی[۶] و اسپاتی‌فیلوم[۷] در کشورهای پیشرفته در حال تولید هستند. حدود ۲۱۲,۵ میلیون گیاه از جمله ۱۵۷ میلیون گیاه زینتی به میزان ۷۸٪ از کل تولید گزارش شده است. هلند در صادرات گیاهان زینتی از جمله گیاهان گلدانی مانند بگونیا، فیکوس، سیکلامن[۸]، فیلودندرون[۹]، بنفشه آفریقایی، اسپاتی‌فیلوم و گل صدتومانی[۱۰] پیش قدم است. حدود ۱۵۶ جنس گیاه زینتی از طریق کشت بافت در آزمایشگاه‌های تجاری مختلف در سراسر جهان تکثیر می‌شوند. سهم تولیدکنندگان عمده به قرار زیر است؛ هلند (۳۳٪)، ژاپن (۲۴٪)، ایتالیا (۱۱٪)، ایالات متحده امریکا (۱۲٪)، تایلند (۱۰٪) و سایرین (۱۴٪). کشورهای صادرکننده عمده هلند (۵۹٪)، کلمبیا (۱۰٪)، ایتالیا (۱۶٪)، اسرائیل (۴٪)، اسپانیا (۲٪)، کنیا (۱٪) و سایر کشورها (۱۸٪) هستند (۱۳).

[1] *Begonia*
[2] *Ficus*
[3] *Anthurium*
[4] *Chrysanthemum*
[5] *Rosa*
[6] *Saintpaulia*
[7] *Spathiphyllum*
[8] *Cyclamen*
[9] *Philodendron*
[10] *Rhododendron*

چهار صادرکننده برجسته (هلند، کلمبیا، ایتالیا و اسرائیل) حدود ۸۰٪ از بازارهای جهانی را تشکیل می‌دهند. سهم کشورهای در حال توسعه آفریقا، آسیا و آمریکای لاتین کمتر از ۲۰ درصد است. امروزه گیاهان زینتی جهت تولید تجاری و کاشت در باغ‌های خانگی و محوطه‌سازی تقاضای زیادی دارند. نیاز اساسی تولیدکنندگان برای افزایش بهره‌وری، کیفیت بهتر مواد گیاهی برای کاشت است. دانشمندان همچنین استفاده از رویکردهای بیوتکنولوژی برای بهبود تولید محصولات باغی را گزارش داده‌اند (۱۳).

کشت بافت گیاهی به میزان گسترده‌ای در بیوتکنولوژی استفاده می‌شود و سیستم‌های کشاورزی یک عامل کلیدی در حمایت از اهداف تولید محصولات دارویی و صنعتی هستند. کشت بافت گیاهی گونه‌های تراریخته سبب کاهش استفاده از حشره‌کش‌ها و بهبود کیفیت مواد غذایی می‌شود که در جهت کمک به کشاورزان و شرکت‌های تولیدی است (۱۳).

۶-۱) تاریخچه کشت بافت گیاهی

اولین گزارش از موفقیت کشت بافت در سال ۱۹۰۲ بود که گاتلیب هابرلند[1] توانست سلول‌های مزوفیل گیاهی را با خاصیت همه‌توانی سلول ها کشت، تولید و حفظ نماید. از آن زمان به بعد، کشت بافت به طور مداوم با گزارش‌هایی که استفاده از آن را در برنامه‌های اصلاحی، تولید زیست‌دارو و حفظ تنوع زیستی ژنتیکی نشان می‌داد، توسعه داده شد. گیاه‌شناس آلمانی گاتلیب هابرلند به عنوان پدر کشت بافت گیاهی شناخته می‌شود. وی بعدها کار خود را در

[1] Gottlieb Haberlandt

این حوزه ادامه داده و بافت پارانشیم نردبانی[1] رشد کرده روی محلول نمکی را توسعه داد. دقیقاً دو سال بعد هانینگ[2] (۱۹۰۴) رویان‌های بالغ را جدا کرده و آن‌ها را در شرایط آزمایشگاهی روی یک محلول قندی و نمکی معدنی رشد داد. این امر نقطه عطف توسعه کشت رویان بود. پس از آن در دهه ۱۹۵۰ بود که از صنعت کشت بافت در مقیاس وسیع برای تولید صنعتی گل ارکیده استفاده شد. سال‌ها بعد، در ۱۹۷۲، کارلسون[3] و همکاران با ادغام پروتوپلاست دو گیاه *Nicotiana gluca* و *N.langschorffii*، اولین گیاه دورگه سوماتیک را تولید کردند (۱۳).

۶-۲) الزامات کشت بافت گیاهی

نیازهای اساسی کشت بافت گیاهی به صورت شماتیک در شکل ۱۰ نشان داده شده است.

با توجه به مرحله‌ی جداکشت‌های[4] استفاده شده (جداکشت: بخش زنده و کوچکی که از بافت گیاه جدا شده و در محیط کشت مغذی قرار داده می‌شود)، از دو حالت محیط کشت در کشت بافت استفاده می‌شود؛ در ابتدا برای قرار دادن جداکشت‌ها، محیط کشت جامد به کار می‌رود اما در صورت مطلوب بودن سوسپانسیون سلولی، می‌توان آن را مستقیماً در محیط مایع نیز قرار داد. همانند روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها، محیط‌های کشت بافت گیاهی نیز از مواد مغذی مصنوعی همراه با مواد مغذی آلی و غیر آلی که برای رشد جداکشت‌های گیاه مورد نیاز است، تشکیل

[1] Palisade tissue
[2] Hanning
[3] Carlson
[4] Explants

می‌شود. محیط جامد فقط یک فاز ژله‌ای از محیط مایع است. به طور کلی گیاهان یا جداکشت‌ها به سه ماده مغذی اصلی نیاز دارند؛ که شامل انواع یون‌ها ، مکمل‌های آلی و یک منبع کربن ثابت است (۱۳).

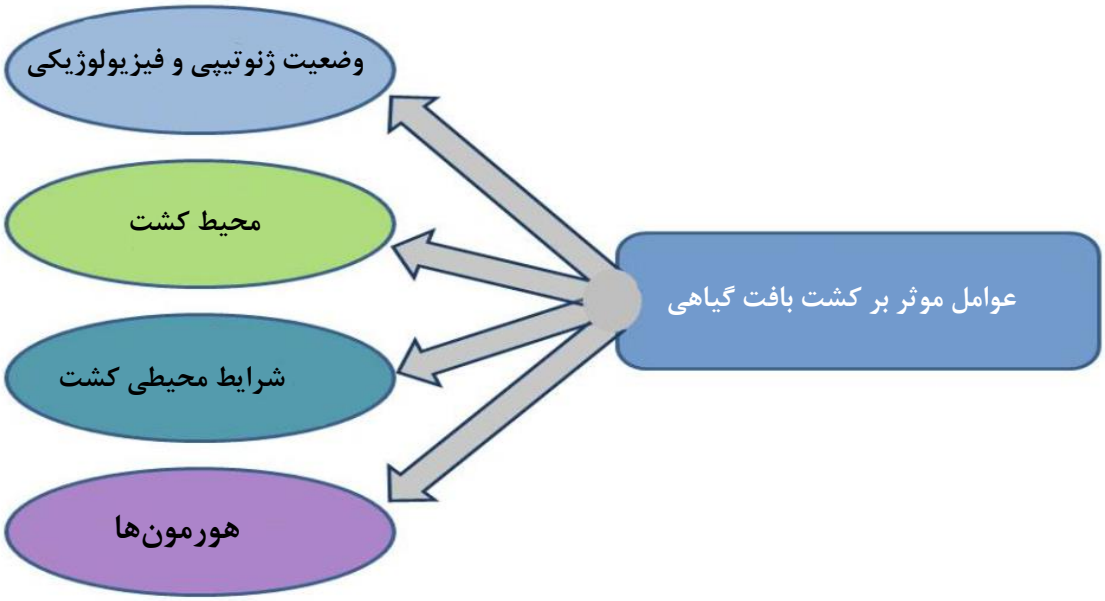
محیط‌های کشت، شامل سه جزء زیر است:

۱. نیازهای اساسی- یون‌ها به صورت ترکیب پیچیده‌ای از نمک‌ها.

۲. مکمل‌های اضافی- مکمل‌های آلی مانند ویتامین‌ها و آمینواسیدها.

۳. منابع کربن- معمولاً به صورت سوکروز تأمین می‌شود.

به جز این موارد، یک محیط کشت کامل حاوی هورمون‌های اکسین[1] و سیتوکینین[2] است که به عنوان هورمون رشد گیاهی استفاده می‌شوند. موفقیت رشد جداکشت‌ها با ترکیب مناسب محیط کشت مورد استفاده در کشت آزمایشگاهی سلول‌های گیاهی، تعیین می‌شود. ترکیب محیط کشت روی ظاهر بافت‌هایی که از جداکشت‌ها رشد می‌کنند، بسیار اثرگذار است. اکسین اضافی ممکن است باعث تکثیر سریع ریشه شده و میزان بیش از حد سیتوکینین ممکن است باعث تشکیل ساقه شود. بنابراین باید در طول مرحله اولیه، تعادل حفظ شود تا یک رشد سازمان‌دهی نشده یا کالوس تولید شود (۱۳).



شکل ۱۰- نیازهای اساسی کشت بافت گیاهی

[1] Auxin
[2] Cytokinin

برای دست‌یابی به یک کشت موفقیت‌آمیز، کل فرآیند باید در شرایط استریل (آسپتیک) با استفاده از یک هود جریان آرام[1] مجهز به فیلتر هپا انجام گردد. منبع جداکشت‌ها قبلاً به شدت توسط محیط آلوده شده است، بنابراین بخشی که باید برای استفاده خارج شود، با ضدعفونی‌کننده‌ها که معمولاً الکل و هیپوکلریت سدیم یا کلسیم هستند، استریل می‌شوند (۱۳).

۶-۳) فرآیند کشت بافت گیاهی

رشد جداکشت‌ها به دو خاصیت بنیادی سلول‌های گیاهی یعنی همه‌توانی و انعطاف‌پذیری[2] سلول بستگی دارد. این دو ویژگی سلول‌های گیاهی، ظرفیت سلول‌های زنده را برای تبدیل شدن به یک سلول جدید که پس از فرآیندهای تمایز قادر به تشکیل بافت‌ها، اندام‌ها، دستگاه‌ها و افراد کامل است، تعیین می‌کند (۱۳).

در شرایط کنترل شده با استفاده از محیط کشت معین[3]، یک گیاه کامل از جداکشت‌های کوچک تولید می‌شود که اکنون «گیاهان پرورش یافته با کشت بافت» نامیده می‌شوند. کل فرآیند در شرایط آسپتیک با گیاهان پرورش یافته فاقد بیماری، دارای سیستم‌های ریشه‌ای سالم، رشته‌ای‌تر، و با میزان بقای بالاتر انجام می‌شود. در حین کشت، مهم‌ترین موضوع وجود یک محیط کشت مناسب همراه با اکسین و سیتوکینین است که منجر به رشد خوب جداکشت‌ها و تبدیل آن‌ها به توده سلولی نامنظم در حال رشد موسوم به کالوس[4] می‌شود. کالوس از نظر بافت و

[1] Laminar flow cabinet
[2] Plasticity
[3] Defined culture media
[4] Callus

شکل، ظاهری متغیر دارد. جداکشت‌ها از طریق سازوکارهایی که رشدشان را از یک سلول یا یک قطعه بافتی آغاز می‌کنند، دنبال کرده و سرعت رشد آن‌ها به عوامل مختلفی بستگی دارد که با توجه به سن، گونه، نوع و بافت متفاوت است و ترکیب محیط کشت و شرایط آب و هوایی رشد، آن را از نظر تجربی مدیریت می‌کند (۱۳).

هنگامی که جداکشت‌ها رشد می‌کنند، قسمت مورد نیاز آن‌ها بریده شده و در یک محیط جدید کاملاً تازه قرار می‌گیرند که امکان رشد آن‌ها را با تغییر شکل فراهم می‌نماید. تجربه‌ی فرد متخصص برای تشخیص جداکشت مناسب برای کشت بافت امری بسیار ضروری است. به عنوان مثال، در صورت ظهور ساقه‌ها، می‌توان با استفاده از اکسین گیاهچه‌هایی را ایجاد کرد که در خاک گلدان می‌تواند رشد بیشتری داشته باشند (۱۳).

مراحل مهم قبل از شروع فرآیند کشت بافت:.

۱. **آماده‌سازی محیط**: اولین و ابتدایی‌ترین مرحله کشت بافت، نیاز به محیط مغذی دارد؛ این محیط می‌تواند با در نظر گرفتن نوع جداکشت، مایع یا جامد باشد. محیط باید شامل تمام اجزای اساسی مانند عناصر میکرو و ماکرو، آمینواسیدها، ویتامین‌ها، منبع آهن و منبع کربن باشد.

۲. **تکثیر کشت** آسپتیک: این روش طراحی شده برای ایجاد مانعی بین میکروارگانیسم‌های موجود در محیط و کشت سلولی استریل و به مجموعه‌ای از روش‌ها برای کاهش احتمال آلودگی از این منابع بستگی دارد. کشت کامل نیاز به ماده اولیه‌ای دارد که به طور معمول ساقه جانبی یا رأس گیاه یا در غیر این صورت جوانه یا ساقه انتهایی باشد.

۳. **فرایند تلقیح جداکشت** : همانطور که قبلاً گفته شد، تمام مراحل پیش از این در شرایط آسپتیک انجام شدند و در این مرحله، جداکشت‌های مورد نظر در محیط استریل شده قرار داده می شوند.

۴. **رشد جداکشت**: محیط‌های دارای جداکشت به صورت آسپتیک مهر و موم شده و در اتاق برای رشد بیشتر در زیر نور پراکنده در ۲۵ ± ۲ درجه سانتیگراد با رطوبت نسبی ۵۰ تا ۶۰٪ نگهداری می‌شوند.

۵. **مقاوم‌سازی ریزگیاهان**: همانند شرایط مصنوعی، رطوبت و سایر نیازها، معین می‌شوند و از آنجا که گاهی اوقات این گیاهان حاصل از جداکشت‌ها آماده نیستند تا با شرایط مزرعه کنار بیایند، برای سازگاری با شرایط مزرعه مقاوم می‌گردند.

مراحل فوق باید در هنگام کشت بافت گیاهی دنبال شوند، اما در نهایت با توجه به مشکلی که باید حل شوند مرحله انتخاب ژنوتیپ شروع می‌شود. برای هر نوع خاص از ژنوتیپ و مشکلی که باید حل شود، یک فرایند خاص هر بار دنبال می‌شود. کشت‌های گیاهی مختلفی وجود دارد که با عناوینی همچون ریزازدیادی[1] گیاه، جهش‌زایی، تراریختی ژنتیکی و غیره شناخته می شوند. همه ی این روش ها کشت گیاهی دو فرآیند به نام های اندام‌زایی[2] و رویان‌زایی سوماتیک[3] را احتیاج دارند (۱۳).

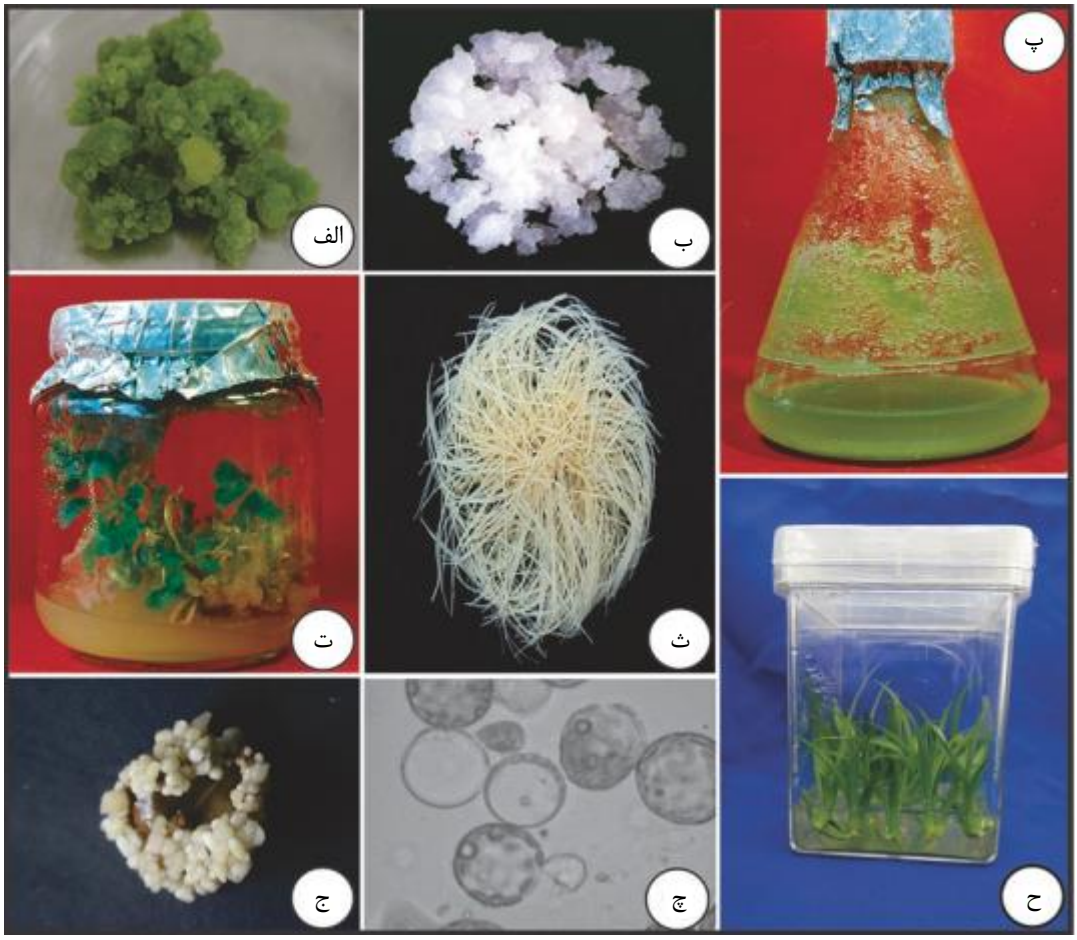
[1] Micropropagation
[2] Organogenesis
[3] Somatic embryogenesis

اندام‌زایی: فرایند تشکیل اندام‌های گیاهی از یک جداکشت با ماهیت بافتی تعیین شده آن مرتبط است و این بدان معنی است که یک اندام بافتی منفرد به یک گیاه کاملاً جدید، تکوین می‌یابد. این فرایند دو نوع است که نوع اول یک روش مستقیم است؛ یعنی ساقه‌ها مستقیماً از جداکشت‌ها به دست می‌آیند و در روش دوم، اندام‌زایی غیر مستقیم از کالوس تشکیل شده از جداکشت‌ها رخ می‌دهد. در این حالت، هر عضوی مانند ریشه، ساقه یا برگ به طور مستقیم یا غیرمستقیم از توده‌های سلولی مریستم یا تمایز نیافته (کالوس) ایجاد می‌شوند. این روش شامل تولید کالوس و تمایز مریستم اکتسابی[1] به اندام‌ها است (۱۳).

رویان‌زایی سوماتیک: روش بازتولید گیاه در آزمایشگاه است که به طور عمده برای تکثیر کلونال (تکثیر نسخه‌های یکسان ژنتیکی یک رقم با تولید مثل غیرجنسی، تکثیر کلونال نامیده می‌شود و جمعیت گیاهی که از یک فرد منفرد با تولید مثل غیرجنسی به دست می‌آید، یک کلون را تشکیل می‌دهد) پایدار استفاده می‌شود (شکل ۱۱). در این روش سلول‌ها یا بافت‌های سوماتیک به رویان تمایز می‌یابند که در نتیجه با فرار از فرآیند لقاح به گیاهان کامل تبدیل شده و هیچ گونه سلول تخمی تشکیل نمی‌شود. مشابه اندام‌زایی، رویان‌زایی سوماتیک نیز به طور مستقیم از جداکشت‌ها یا غیر مستقیم از توده سلول‌های نامنظم آغاز می‌گردد. این امر، بازسازی[2] از طریق القای کشت‌های رویانی را به دنبال داشته و سپس جهت تکوین گیاهچه‌هایی که به خاک منتقل شده‌اند، جوانه‌زنی[3] انجام می‌شود (۱۳).

[1] Adventitious meristem
[2] Regeneration
[3] Germination

فرآیند رویان‌زایی سوماتیک با موفقیت در بسیاری از خانواده‌های مختلف گیاهی انجام شده است. عوامل مختلفی در شروع و گسترش رویان‌های سوماتیک کشت شده تأثیر می‌گذارند. پروتکل‌های مختلفی نیز برای اینکه این کشت را به عنوان یک رویداد در حال رشد بسازند، آزمایش شده است. بر این اساس، پروتکل گزارش شده در انگور با استفاده از رویان‌زایی سوماتیک نشان داد که گیاهان در محیط مایع بیشتر رشد می‌کنند. رویان‌زایی سوماتیک برای بازسازی گیاه یا تکثیر گیاه به صورت انبوه استفاده نمی‌شود اما ابزار دستکاری ژنتیکی ارزشمندی است (۱۳).



شکل ۱۱- (الف) کالوس میکسوتروف گیاه *Catharanthus roseus* (ب) کالوس هتروتروف این گونه. (پ) کشت غوطه‌ور آن. (ت) بازسازی این گیاه از کالوس. (ث) کشت ریشه این گونه. (ج) رویان‌زایی سوماتیک در قهوه کانفورا (*Coffeacanephora*). (چ) پروتوپلاست قهوه کانفورا. (ح) ریزازدیادی گیاه *Agave fourcroydes*.

(منبع: *Loyola-Vargas V.M. and Ochoa-Alejo N; 2018)*

۶-۴) مراحل کشت بافت گیاهی

آماده‌سازی کشت بافت گیاهی: انتخاب یک جداکشت مناسب از یک گیاه سالم و قوی از اصول اساسی کشت است. اگرچه از هر بخش از گیاه می‌توان به عنوان جداکشت استفاده کرد، رشد و استقرار موفقیت‌آمیز آن به بهینه‌سازی و نیاز فیزیولوژیک گیاه در محیط بستگی دارد. برای اینکه شانس رشد جداکشت به حداکثر برسد، باید شرایط کشت مناسب، تغذیه کافی، کنترل درجه حرارت و آبیاری فراهم گردد. در هنگام کشت، جداکشت‌ها بیشتر در معرض عفونت هستند، بنابراین از ضدقارچ، ضدباکتری و حشره‌کش‌ها استفاده می‌شود تا از عفونت میکروارگانیسم‌های موجود در سراسر بافت جلوگیری کند. در صورت لزوم، جداکشت‌ها برای بهبود پاسخ ریخت‌زایی[1] در طی استقرار در شرایط آزمایشگاهی با تنظیم‌کننده‌های رشد مناسب پیش‌تیمار می‌شوند. با توجه به بخشی از گیاه که کشت می‌شود، می‌توان آن را به عنوان کشت سلول (سلول‌های گامتی، سوسپانسیون سلولی و کشت پروتوپلاست)، کشت بافت (کالوس و بافت‌های تمایزیافته) و کشت اندام (هر اندامی از جمله رویان‌های زیگوتی، ریشه‌ها، ساقه‌ها و بساک[2]ها) منتسب کرد. از هر نوع کشت برای کاربردهای بیوتکنولوژی و پایه‌ای مختلف استفاده می‌شود (۷، ۱۳).

مرحله استقرار: حذف آلودگی میکروبی از سطح جداکشت از اصول اساسی کشت است. این گام مرحله‌ای بسیار مهم و دشوار در سیستم تکثیر آزمایشگاهی است، زیرا کاملاً به وضعیت فیزیولوژیک جداکشت‌ها بستگی دارد. در این

[1] Morphogenic
[2] Anther

مرحله، بافت گیاه از طریق ضدعفونی (محصولات ضدباکتری و ضدقارچ) به صورت سطحی استریل می‌شود؛ ماهیت شیمیایی مواد ضدعفونی‌کننده بستگی به نوع جداکشت‌ها تفاوت دارد. رایج‌ترین ضدعفونی‌کننده‌هایی که برای گندزدایی در کشت بافت استفاده می‌شوند، هیپوکلریت سدیم، اتانول و هیپوکلریت کلسیم هستند. گیاهانی که محتوای سلولز و لیگنین بالایی دارند و چوبی هستند یا در خاک رشد بیشتری داشته‌اند، نیاز به تیمار شدید با شستشوی جیوه (II) و یا کلرید جیوه ($HgCl_2$) دارند (۷، ۱۳).

مرحله تکثیر: در این مرحله تعداد واحدهای کشت به تعداد دلخواه افزایش می‌یابد. مجدداً مرحله تکثیر با توجه به گونه یا ژنوتیپ‌های گیاه به یک تکنیک و پروتکل خاص نیاز دارد. به عنوان مثال، ساقه‌های جانبی سیب‌زمینی شیرین از طریق اندام‌زایی تکثیر می‌شوند، در حالی که قهوه برای تکثیر کارآمد، به رویان‌زایی سوماتیک احتیاج دارد. علاوه بر این، برای دستیابی به یک پاسخ ریخت‌زایی مطلوب، دوز مناسبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه ارائه می‌گردد (۱۳).

آماده‌سازی جداکشت‌ها برای شرایط خارج آزمایشگاهی[1]: این مرحله می‌تواند همراه با انتشار و تکثیر جداکشت‌ها در همان محیط‌های قدیمی یا جدید انجام شود. گاهی اوقات لازم است که محیط تغییر کند و در چنین مواردی نیاز است که محیط با اصلاح تغذیه‌ای و تنظیم‌کننده رشد تغییر کند تا طبق پروتکل، باعث ریشه‌دهی یا ایجاد ساقه شود. گیاهان برای فاز خارج آزمایشگاهی با اصلاح ترکیب محیط و تبادل گاز در داخل کشت تنظیم شده آماده می‌شوند (۱۳).

[1] *Ex vitro*

سازگاری[1] گیاه: این مرحله سازگاری گیاهان آزمایشگاهی است تا با خارج از محیط آزمایشگاه روبه‌رو شوند. بنابراین بسیار مهم است که شدت نور، دما، رطوبت اتاق و رطوبت بستر در حد مطلوب حفظ شود. در شرایط آزمایشگاهی، یک رطوبت بالا به طور ثابت حفظ می‌شود تا ریشه‌های فعال تشکیل شوند و سازگاری را در یک محیط واقعی که از دست دادن آب بیشتر است، تسهیل کند (۱۳).

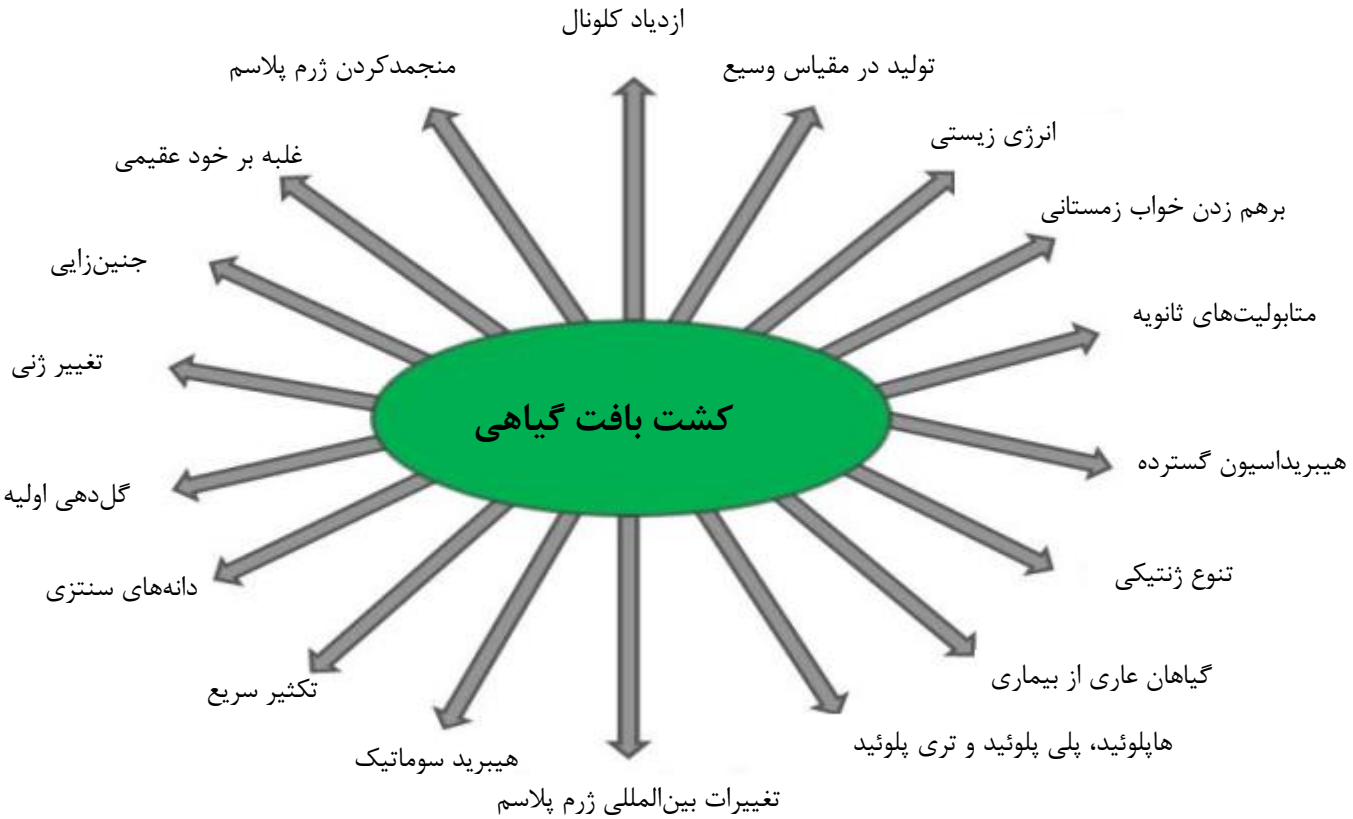
۶-۵) کاربرد و پتانسیل کشت بافت گیاهی

استفاده از کشت بافت گیاهی را می‌توان براساس رفتار سلول‌های گیاهی، اصلاح گیاه، تکثیر کلونال، تولید محصول، ذخیره ژرم‌پلاسم و گیاهان عاری از پاتوژن بررسی کرد (شکل ۱۲). کشت بافت گیاهی کاربردهای گسترده‌ای دارد و برای بسیاری از تحقیقات دانشگاهی علوم گیاهی کاربردی ضروری است. در دانشگاه از کشت بافت گیاهی برای بررسی ماهیت همه‌توانی سلول‌های گیاهی و تجزیه و تحلیل نقش هورمون‌های تمایز سلولی در اندام‌زایی استفاده می‌شود. از گیاه مبتنی بر کشت بافت می‌توان در مطالعه گونه‌های مهندسی شده ژنتیکی استفاده کرده و تنظیم ژن را در گونه‌های تراریخته بررسی کرد (۱۳).

تکنیک‌های کشت بافت کاربردهای دیگری نیز در حوزه علوم گیاهی کاربردی، کشاورزی و بیوتکنولوژی گیاهی دارند (شکل ۱۲). ایده اصلی استفاده از کشت بافت گیاهی این است که رشد گیاهان همسان‌سازی شده به شکل سلول‌های

[1] Acclimatization

معلق آسان بوده و می‌توان آن‌ها را برداشت کرد. سلول‌های مهندسی ژنتیکی شده از گیاهان کامل تراریخته نیز به فرآیند کشت بافت نیاز دارند. تشکیل رویان‌های هاپلوئید سوماتیک به این تکنیک‌ها نیاز دارد، بنابراین این روش در علوم گیاهی دانشگاهی و کاربردی اهمیت زیادی دارد (۱۳).



شکل۱۲- استفاده و چشم اندازهای متفاوت کشت بافت گیاهی

از کشت ساقه و مریستم گیاه برای ایجاد تعداد زیادی جداکشت یکسان استفاده می‌شود تا در تولید تجاری گلدان‌ها، گل‌فروشی‌ها و مناظر طبیعی مورد استفاده قرار گیرند. این امر به حفظ گونه‌ای که نادر و در معرض خطر است کمک

می‌کند. از جداکشت‌ها یا کشت بافت یا سلول‌ها می‌توان برای غربالگری سلول‌ها در مقاومت و تحمل در برابر علف‌کش‌ها و گیاهان مقاوم در برابر تنش استفاده کرد که نسبت به استفاده از گیاه کامل، در وقت صرفه‌جویی می‌شود. با توجه به توسعه و تمایل به رشد و تولید در مقیاس بالا در چند دهه گذشته، از روش‌های کشت بافت برای بهبود رشد گیاه، فعالیت‌های زیستی و تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده‌است. با استفاده از این روش‌ها پیشرفت قابل توجهی جهت مقابله با مشکلات غلظت پایین متابولیت‌های ثانویه (محصولات طبیعی مفیدی هستند که از طریق متابولیسم ثانویه در گیاهان سنتز می شوند) در گیاهان کامل انجام شده است. گیاهچه‌های استریل بر مشکل آلودگی غلبه خواهند کرد و زمان فرآیند استریل‌سازی را کاهش می‌دهند. تکثیر در شرایط آزمایشگاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات مهم دارویی به صورت انتخابی، بسیار حائز اهمیت است (۱۳).

از تولید جداکشت‌ها در مقیاس وسیع جهت تولید متابولیت‌های ثانویه و زیست‌داروها استفاده می‌شود. این امر حتی زمانی که به تولید گونه‌های مرتبط با بازسازی دورگه‌های جدید و یا ادغام پروتوپلاست نیاز است، مفیدتر است. همچنین کشت بافت گیاهی در دگر-گرده‌افشانی[1] برای دستیابی به گونه‌هایی با خویشاوندی دور جهت نجات گونه‌های کمیاب نیز آزمایش شده است (۱۳). در ادامه برخی از کاربردهای کشت بافت گیاهی توضیح داده شده اند.

۶-۵-۱) تراریختی ژنتیکی

[1] Croos-pollination

برای تقویت رشد و قابلیت کاشت محصولات زراعی، گیاهان تراریخته همچنان به میزان گسترده در سراسر جهان کشت می‌شوند. امکان تولید و تکثیر گیاهان با ژنتیک یکسان و عاری از بیماری از طریق کشت بافت فراهم می‌شود. بنابراین این روش حساسیت گیاهان به عوامل بیماری‌زا را از بین می‌برد. از اینرو، یکی از پرکاربردترین، توسعه‌یافته‌ترین تکنیک و مناسب ترین کاربرد کشت بافت به دلیل استفاده عملی آن، تولید گیاهان تراریخته است. برای تولید گیاهان تراریخته ژنتیکی از دو روش استفاده می‌شود:

۱-روش مستقیم است که در آن صفات ژنتیکی مطلوب به گیاهی که قرار است برداشت شود منتقل می‌شود. روش های انتقال مستقیم ژن شامل ورود DNA خارجی مستقیماً به ژنوم گیاه از طریق واکنش های فیزیکی یا شیمیایی است.

۲- روش غیر مستقیم، انتقال غیرمستقیم ژن (همچنین به عنوان انتقال ژن با واسطه ناقل شناخته می شود) شامل ورود DNA خارجی به ژنوم گیاه از طریق ناقل های بیولوژیکی است (۱۳).

مهندسی ژنتیک گیاهی، به لطف استفاده از سیستم‌های کشت بافت گیاهی به همراه تکنیک‌های مولکولی نوترکیب امکان‌پذیر است. هدف مهندسی ژنتیک گیاهی، دستکاری مواد ژنتیکی موجودات مختلف به گونه‌ای است که توالی‌های خاصی که ژن‌های خاصی را رمزگذاری می‌کنند، هنگام وارد شدن و ادغام در ژنوم گیاه، ویژگی‌های خاصی را به آن اعطا کنند. هنگامی که ژن مطلوب جدا شد، سازه‌ای در یک وکتور مناسب برای انجام تراریختی ژنتیکی با استفاده از هر دو روش بیولوژیکی (عفونت با واسطه *آگروباکتریوم تومه فاشینس*) یا فیزیکی (معمولاً بمباران با ریزذره) تهیه می‌شود (۷).

تراریختی ژنتیکی با محصولات مهمی مانند ذرت، گندم، پنبه، برنج و سویا انجام شده و در حال حاضر میلیون‌ها هکتار زیر کشت محصولات تراریخته مقاوم در برابر آفات یا علف‌کش‌ها قرار گرفته است. انتظار می‌رود با استفاده از گیاهان تراریخته مقاوم در برابر حشرات، برای کنترل آفات متعدد، مصرف حشره‌کش‌های سمی (حشره‌کش‌های ارگانوفسفر) کاهش یابد. علاوه بر عوامل زیستی، تولید و بازده محصول بیشتر تحت تأثیر عوامل غیر زیستی (از جمله تنش آب، شوری و سرما) قرار می‌گیرد. گیاهان سازوکارهای سازگاری با عوامل غیر زیستی را تکامل داده‌اند، اما به طور کلی آن‌ها کاملاً پیچیده هستند؛ زیرا شامل فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی هستند. با این حال، محصولات گیاهی تراریخته مقاوم در برابر خشکی یا شوری قبلاً ساخته شده‌اند، که فرصت‌های جدیدی را برای دستکاری صفات پیچیده مقاوم در برابر عوامل غیر زیستی جهت مقابله با تنش‌های مختلف محیطی ایجاد می‌نمایند. تراریختی ژنتیکی همچنین یک رویکرد قدرتمند در علوم پایه برای انجام مطالعات عملکردی ژن‌های گیاهی بوده است (۷).

۶-۵-۲) ویرایش ژنوم

در دهه گذشته، تکنیک‌های مختلف ویرایش ژنوم بر اساس استفاده از نوکلئازهای مؤثر بر توالی‌های اختصاصی، امکان دستکاری دقیق توالی‌های ژنومی هدف را فراهم کرده است که ایجاد جهش‌های مطلوب خاص را امکان‌پذیر می‌سازند. فناوری ویرایش ژنوم همراه با کشت بافت گیاهی و تراریختی ژنتیکی، انقلابی در برنامه‌های اصلاح نژاد و بهبود چندین محصول ایجاد کرده است. یکی از این فناوری‌ها، سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 را شامل می‌شود. در مقایسه با تراریختی ژنتیکی، فناوری‌های ویرایش ژنومی به معنای استفاده از DNA خارجی برای ایجاد تغییر ژنتیکی در گیاه

گیرنده نیست، بلکه تغییر ژنتیکی در ژنوم خود گونه‌های گیاهی انجام می‌گردد تا از نظر ژنتیکی اصلاح شوند. نمونه‌هایی از گیاهان اصلاح شده از طریق ویرایش ژنتیکی موفق با استفاده از CRISPR/Cas9 شامل محصولات مهمی مانند برنج، گندم، ذرت، گوجه‌فرنگی و سیب زمینی است. سیستم‌های ویرایش ژنوم در حال حاضر برای مطالعات عملکردی ژن نیز از ارزش بالایی برخوردار هستند (۷).

۶-۵-۳) اومیکس و کشت بافت گیاهی

ژنومیکس[1] (مطالعه ساختار، عملکرد و تنظیم ژن و تکنیک‌های مربوط به آن)، ترنس‌کریپتومیکس[2] (مطالعه ترنس‌کریپتوم یا مجموعه رونوشت ژن‌هایی که در یک جاندار رونویسی می‌شوند)، پروتئومیکس[3] (مطالعه مجموعه پروتئین‌های ترجمه شده در یک جاندار)، و متابولومیکس[4] (مطالعه تمام متابولیت‌های موجود در یک جاندار) برای مطالعه فرآیندهای بیولوژیکی در گیاهان ضروری شده است. آگاهی در مورد ژنوم‌ها، ترنس‌کریپتوم‌ها، پروتئوم‌ها و متابولوم‌های گیاهی در درک فرآیندهای تکوینی پیچیده، مانند اندام‌زایی، جنین‌زایی یا تمایز در آزمایشگاه و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در شرایط آزمایشگاهی تأثیر مثبتی گذاشته است. علاوه بر این، متابولومیکس می‌تواند برای بررسی

1 Genomics
2 Transcriptomics
3 Proteomics
4 Metabolomics

متابولیسم ثانویه نه تنها در طی فرایندهای ریخت‌زایی، بلکه به طور عمده در کشت سلول، بافت و اندام گونه‌های گیاهی که تولید کننده متابولیت‌های ثانویه مطلوب از نظر صنعتی و دارویی هستند، بسیار مفید باشد (۷).

۶-۵-۴) اپی‌ژنتیک در کشت بافت گیاهی

تغییرات اپی‌ژنتیکی (تغییرات قابل وراثت در عملکرد ژن که شامل تغییر در توالی DNA نمی‌باشند) بر بازسازی گیاه در شرایط آزمایشگاهی تأثیر می‌گذارد، و همچنین تغییراتی را که اغلب در سلول‌ها یا گیاهان بازسازی شده مشاهده می‌شود، توضیح می‌دهد. با توجه به تأثیر این تغییرات اپی‌ژنتیکی در کشت‌های بافت، گنجاندن پروتکل‌هایی در رابطه با تجزیه و تحلیل تغییرات هیستون و تنظیم بیان ژن که در ارتباط با اپی ژنتیک می باشند، مناسب به نظر می‌رسد (۷).

۶-۵-۵) گیاهان به عنوان بیوراکتور

از کشت بافت گیاهی برای تکثیر و نگهداری گیاهان تراریخته استفاده می شود که این گیاهان تکثیر شده می توانند در اثر تغییرات ژنتیکی که در انها اعمال می شود به عنوان رآکتورهای زیستی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و مطلوب دارویی - صنعتی با ظرفیت بالا استفاده شوند (۱۳).

۶-۵-۶) تکثیر و حفاظت

کشت بافت، روش جایگزینی برای مدیریت منابع ارزشمند مانند متابولیت‌های ثانویه است و از طریق ریزازدیادی، به تکثیر گونه‌های در معرض خطر و حفظ تنوع زیستی گیاهان از حداقل مواد گیاهی موجود، کمک می‌کند (۱۳). بدون شک، ریزازدیادی یا تکثیر کلونال آزمایشگاهی، یکی از گسترده‌ترین‌کاربردهای تجاری کنونی کشت بافت است. کشت

بافت گیاهی ابزاری عالی برای تکثیر غیرجنسی گونه‌هایی است که به طور طبیعی به صورت غیرجنسی تولیدمثل می‌کنند، اما برای غلبه بر برخی از مشکلات جوانه‌زنی بذرها در گونه‌های مختلف گیاهی نیز به کار می‌رود؛ به عنوان مثال، گونه‌های کم‌عمر[1] به طور خاص با عمر کوتاه دانه‌های خود (بذرهای کم عمر[2]) مشخص می‌شوند، بنابراین تکثیر غیرجنسی یک جایگزین خوب برای کشت چنین گونه‌هایی است. اگرچه از کشت بافت می‌توان برای ریزازدیادی تقریباً هر گونه گیاهی استفاده کرد، اما این روش فقط برای گیاهانی توصیه می‌شود که از نظر اقتصادی سودآور باشند. در میان گونه‌های گیاهی که در حال حاضر در سطح تجاری با ریزازدیادی تکثیر می‌شوند، گیاهان زینتی مقام اول را به خود اختصاص داده‌اند. ریزازدیادی گیاهان از طریق سه روش مختلف انجام می‌گیرد:

۱- با تقویت تکثیر جوانه‌های انتهایی یا جانبی و سپس ریشه‌زایی آن‌ها،

۲- با القای تشکیل جوانه نابه‌جا[3] و ریشه‌زایی متعاقب آن،

۳- با تشکیل رویان سوماتیک، بلوغ و جوانه‌زنی.

هر کدام از این روش‌ها می‌تواند با توجه به زمینه ژنتیکی یا ظرفیت بازسازی، محیط کشت و شرایط انکوباسیون در مورد گونه‌های گیاهی مختلف با بازدهی متفاوت به کار رود (۷).

۶-۵-۷) اصلاح نژاد گیاهان و بهبود ژنتیکی

[1] Recalcitrant species
[2] Recalcitrant seed
[3] Adventitious bud

تکنیک‌های کشت بافت گیاهی قطعاً می‌توانند ابزار کمکی قدرتمندی برای برنامه‌های اصلاح نژاد گیاه و بهبود ژنتیکی باشند. تنوع ژنتیکی تشخیص داده شده در بافت کالوس و کشت‌های سلولی می‌تواند به دلیل تغییرات ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی باشد و یک احتمال مهم برای بازیابی انواع سوماکلونال یا جهش‌یافته‌هایی با ویژگی‌های خاص زراعی یا صنعتی را نشان دهد که می‌تواند در سطح سلول یا گیاه به نمایش گذاشته شود (۱۳). تنوع سوماکلونال[1] ابزاری مفید در کمک به القای تغییرات جزئی یا تمایز درون گونه است. این تکنیک‌ها زمانی مورد نیاز هستند که لازم است جداکشت‌ها در معرض دوز دقیقی برای انجام جهش مورد نظر قرار بگیرند (۷). هزاران یا میلیون‌ها سلول، قطعه‌ای از کالوس یا سوسپانسیون سلولی را تشکیل می‌دهند و می‌توان آن‌ها را برای جداکردن سلول‌های مقاوم در شرایط کنترل‌شده، تحت فشار انتخابی تنش‌های مختلف قرار داد. سلول‌های مقاوم بازیابی شده، ممکن است گیاهان مقاوم کامل را در محیط کشت مناسب بازسازی نمایند. به این ترتیب می‌توان گیاهانی را تولید کرد که در برابر خشکی، شوری و سرما و یا در برابر تنش‌های زیستی تأثیرگذار بر بازده محصول، مقاوم باشند (۱۳).

مدیریت و اصلاح سطوح پلوئیدی در گیاهان می‌تواند بیان بسیاری از صفات را تعیین کرده و تولید رده‌های هوموزیگوت هاپلوئید، برنامه‌های تراریختی ژنتیکی و دورگه‌سازی را امکان‌پذیر سازد (۷). گیاهان هوموزیگوس گزینه‌های مهمی برای برنامه‌های اصلاح نژاد هستند؛ زیرا از آن‌ها به عنوان رده‌های والدی برای تولید بذرهای دورگه‌ای استفاده می‌شود که گیاهان حاصله، بازده زیادی دارند. با این حال، تولید رده‌های هم‌ژن یا هوموزیگوس با تکنیک‌های سنتی تولیدمثل،

[1] Somaclonal

ممکن است پنج تا ده چرخه خود-لقاحی[1] طول بکشد. با استفاده از کشت بساک یا میکروسپور، ممکن است زمان تولید رده‌های هم‌ژن به طرز چشمگیری کاهش یابد؛ زیرا گیاهان هاپلوئید را می‌توان فقط در یک چرخه کشت بازسازی کرد و سپس می‌توان آن‌ها را با استفاده از تیمار کلشیسین دیپلوئید کرد تا گیاهان هاپلوئید مضاعف[2] با مجموعه‌های کروموزومی هوموزیگوس ثابت شده، به دست آیند. از کشت بساک یا میکروسپور می‌توان برای تصحیح مشخصات گیاهان دورگه تولید شده توسط آمیزش‌های والدین و تکنیک‌های متداول نیز استفاده کرد (۱۳).

نجات رویان[3] نقش بالقوه‌ای در تولیدمثل و انتخاب ژنوتیپ بعد از لقاح دارد، در غیر این صورت بقای افراد در همان مراحل اولیه با شکست رو به رو می‌شود. گونه‌هایی که توانایی تولیدمثل را از دست داده و از جوانه‌زنی بذر جلوگیری می‌کنند، می‌توانند با استفاده از نجات رویان پرورش داده شوند (۷). نجات و کشت رویان، امکان بازیابی گیاهان دورگه از گونه‌های تا حدی سازگار از نظر جنسی را فراهم می‌کند. پس از گرده‌افشانی متقابل بین دو گونه مختلف، تکوین رویان دورگه اتفاق می‌افتد، اما لزوماً آندوسپرم با کل روند تکوین بذر همراه نبوده و در مرحله خاصی، رویان دورگه از بین می‌رود(سقط می‌شود)؛ در چنین لحظه‌ای می‌توان رویان را نجات داده و برای تکوین بیشتر کشت داد (۱۳).

[1] Self-fertilization
[2] Double-haploid plants
[3] Embryo rescue

گیاهان دورگه درون یا بین-گونه‌ای نیز می‌توانند از گونه‌های گیاهی ناسازگار جنسی از طریق دورگه‌سازی سوماتیک با استفاده از پروتوپلاست دو منبع مختلف، که با روش‌های فیزیکوشیمیایی ادغام شده‌اند، تولید گردند. سلول‌های دورگه برای بازسازی گیاهان دورگه کشت می‌شوند (۱۳).

۶-۵-۸) حفظ و نگهداری ژرم‌پلاسم گیاه

حفاظت از ژرم‌پلاسم[1]، از انقراض گونه‌های مختلف گیاهی جلوگیری و از میراث گیاهی کشورها محافظت می‌کند (۱۳). ژرم‌پلاسم‌های گیاهان منابع ژنتیکی‌ای هستند که برای برنامه‌های اصلاح نژاد و بهبود محصولات، جمع و نگهداری می‌شوند و گنجینه‌های واقعی حفظ شده از تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهند که پرورش‌دهندگان گیاهان از آنجا به جستجوی خصوصیات مطلوب خاصی که برای افزایش عملکرد محصولات انتخاب می‌شوند، شروع می‌کنند. ژرم‌پلاسم گیاهی محصولات مهمی مانند ذرت و گندم به عنوان مجموعه بذر در دمای پایین در مرکز بین‌المللی بهسازی ذرت و گندم[2] CIMMYT در مکزیک حفاظت می‌شود، در حالی که ژرم‌پلاسم برنج در مؤسسه تحقیقاتی بین‌المللی برنج[3] (IRRI) در فیلیپین متمرکز شده است. ژرم‌پلاسم گیاهی محصولات رویشی تکثیری مانند سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum L.*) و سیب‌زمینی شیرین (*Ipomoea batatas L.*) به صورت غده یا تحت شرایط کشت بافت در مرکز بین‌المللی سیب زمینی[4] IPC در پرو حفظ می‌شود. کشت بافت گیاهی جایگزین‌های بسیار خوبی را برای حفاظت از ژرم‌پلاسم آن دسته از محصولاتی که از طریق رویشی تکثیر می‌شوند، عرضه می‌کند؛ زیرا هزاران

[1] Germplasm conservation
[2] International Maize and Wheat Improvement Center
[3] International Rice Research Institute
[4] International Potato Center

گیاهچه در فضاهای کوچک تحت شرایط کنترل شده‌ای محافظت می‌شوند که می‌تواند رشد کشت‌ها را کاهش داده (حداقل رشد) یا حتی کاملاً متوقف کند (حفاظت انجمادی[1]) (۷).

۷) کشت بافت گیاهی ابزاری برای تولید ترکیبات فعال زیستی

اصطلاح متابولیت ثانویه به ترکیبی اشاره دارد که توسط گیاهان، میکروارگانیسم‌ها یا جانوران تولید می‌شود اما برای رشد آن‌ها مورد نیاز نیست. انسان مدت‌هاست که از محصولات متابولیسم ثانویه گیاهی برای تأمین نیازهای مختلف استفاده می‌کند. استفاده اولیه از این ترکیبات به عنوان عوامل دارویی، ابتدا به روش تجربی و متعاقباً با شروع قرن نوزدهم، به روشی منطقی‌تر پس از ظهور جداسازی مولکولی بوده است. با وجود تحقیقات گسترده در مورد متابولیت های ثانویه طی مدتی طولانی، برآوردهای فعلی نشان می‌دهند که فقط حدود ۶٪ از گیاهان عالی (بین ۳۰۰،۰۰۰ تا ۵۰۰،۰۰۰ گونه) به طور سیستماتیک از نظر پتانسیل دارویی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و به طور کلی فقط ۱۵٪ از جهت مواد شیمیایی گیاهی ارزیابی شده‌اند. بنابراین، فرصت‌های بسیاری برای ادامه مطالعات در این زمینه وجود دارد. بلافاصله پس از شناسایی و جداسازی یک ترکیب زیست‌فعال مفید، به روشی برای تولید مداوم آن نیاز است. یک متابولیت ثانویه به طور معمول با ساختار شیمیایی متنوع و پیچیده، مشخص می‌شود که معمولاً شامل مراکز کایرال متعدد و پیوندهای ناپایدار است و این باعث می‌شود سنتز شیمیایی آن چالش برانگیز باشد. بنابراین، مولکول‌های فعال زیستی معمولاً از منابع طبیعی خود استخراج می‌شوند. با این حال، از آنجا که بیشتر گیاهان منبع

[1] Cryopreservation

وحشی هستند، برداشت از زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها، خطر بهره‌برداری بیش از حد و همچنین ایجاد تنگنا در تولید ترکیبات را به همراه دارد. از عوارض بعدی می‌توان به سرعت کم رشد بسیاری از گیاهان منبع، غلظت کم ترکیبات فعال مورد نظر در آن‌ها و نیاز به تنش زیستی یا غیرزیستی برای القای بیوسنتز ترکیبات ثانویه اشاره کرد. این عوامل باعث می‌شوند که استخراج متابولیت‌های ثانویه از گونه‌های گیاهی منبع، بسیار ناکارآمد بوده و به ضرورت رویکردهای جدید در تولید متابولیت‌های ثانویه تأکید نماید (۵).

کشت آزمایشگاهی سلول‌ها و بافت‌های گیاهی تحت شرایط کنترل شده، بستر مناسبی برای تولید محصولات طبیعی گیاهی ارائه می‌دهد. تکثیر آزمایشگاهی (ریزازدیادی) گیاهان یا کشت آزمایشگاهی اندام‌های گیاهی (معمولاً ریشه‌ها) یا کالوس به طور معمول می‌تواند گیاهانی را با توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه فراهم نماید. بنابراین ریزازدیادی به یک سرمایه‌گذاری تجاری سودآور تبدیل شده است و با تسهیل تولید تعداد زیادی گیاه مشابه در طول سال، تولید قطعات تکثیری[1] عاری از بیماری و افزایش قابل توجه نرخ تکثیر، مزایای قابل توجهی نسبت به روش‌های متداول تکثیر باغی فراهم می‌کند. در حال حاضر، پروتکل‌های بسیاری برای ریزازدیادی گیاهان دارویی و همچنین برخی گیاهان تجاری مهم مانند *آگاو سالمیانا*[2]، کنگر فرنگی[3]، *استویا ربادیانا*[4] و *مورینگا اولیفیرا*[5] (گز روغنی[6]) در دسترس است. با این حال، هزینه‌های بالای ریزازدیادی در مقایسه با نمونه سنتی آن (به عنوان مثال، جمع‌آوری از طبیعت) و

[1] Propagules
[2] *Agave salmiana*
[3] Artichoke
[4] *Stevia rebaudiana*
[5] *Moringa oleifera*
[6] Drumstick tree

غیرقابل پیش‌بینی بودن نیازهای بازار، استفاده از ریزازدیادی را در سطح تجاری محدود کرده است. با این حال، تلاش‌های اخیر ریزازدیادی با هدف حفاظت از گیاهان دارویی بیش از حد بهره‌برداری شده، با تاکید ویژه بر گیاهان مورد استفاده به منظور داروهای سنتی در چین و هند انجام شده است (۵).

پیشرفت‌های اخیر در کشت سلول‌های گیاهی که نتیجه تجربیات حاصل از کشت سلول‌های میکروبی و جانوری هستند، منجر به افزایش مقیاس مؤثر از مرحله آزمایشی به مقیاس صنعتی شده است. اکنون کشت سلول‌های گیاهی یک روش کارآمد برای تولید چندین محصول طبیعی با ارزش به شمار می‌رود (۵).

طیف وسیعی از محصولات مهم تجاری شامل رنگدانه‌ها (به عنوان مثال آنتوسیانین‌ها[۱] و بتاسیانین‌ها[۲])، عوامل ضد التهاب (مانند بربرین[۳] و رزمارینیک اسید[۴]) و مولکول‌های ضد سرطان (از جمله پاکلیتاکسل[۵] و پودوفیلوتوکسین[۶] هستند (۵).

گزینه‌های متعددی از گیاهان مدل و محصولات زراعی تا گیاهان وحشی، هنگام انتخاب یک ماده گیاهی مناسب برای تولید مولکول‌های زیستی، در دسترس است. انتخاب گیاه مورد استفاده با ملاحظات اصلی که هدف مطالعه و در دسترس بودن گیاه است، به عوامل مختلفی بستگی خواهد داشت. بیشتر گیاهانی که برای تولید متابولیت‌های ثانویه

[1] Anthocyanins
[2] Betacyanins
[3] Berberine
[4] Rosmarinic acid
[5] Paclitaxel
[6] Podophyllotoxin

استفاده می‌شوند، انواع وحشی غیر زراعی هستند؛ زیرا آن‌ها گیاهانی هستند که از قبل حاوی ابزارهای متابولیکی برای سنتز بسیاری از متابولیت‌های مورد نظر هستند(۵).

برخی از این نمونه‌ها شامل *آگاو سالمیانا* برای ساپونین‌ها[1]، *Rhaponticoide mykalea* برای کلروژنیک اسیدها و ترکیبات فنولی، *Leucophyllum frutescens* برای ترکیبات فنولی و *Poliomintha glabrescens* برای لوتئولین[2] است. تمام این ترکیبات در صنایع غذایی، دارویی یا آرایشی مفید هستند. از سایر گیاهان زراعی برای تولید متابولیت‌هایی مانند بتالایین‌ها[3] که مواد رنگی طبیعی و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های خوبی هستند، استفاده می‌شود. منابع اصلی متابولیت‌های بتالایین، میوه نوعی کاکتوس[4] (*Opuntia ficus-indica*) و چغندر (*Beta vulgaris*) بوده و این متابولیت‌ها معمولاً با استفاده از کشت ریشه‌های مویین[5] در بیوراکتورها یا کشت کالوس تولید می‌شوند. کشت ریشه های مویینمی توانند یک منبع پایدار برای متابولیت های ثانویه باشند که با استفاده از نوعی باکتری خاکزی به نام آگروباکتریوم رایزوژنز ایجاد می شوند که رشد آنها سریع بوده و اغلب میزان رشدشان از کشت سلول های گیاهی سریع تر می باشد. سایر گیاهان زراعی یا قطعات آن‌ها که برای تولید ترکیبات مهندسی شده زیستی استفاده می‌شوند، شامل سلول‌های هویج (جایگزینی آنزیمی)، برنج (سرم آلبومین)، ذرت (واکسن‌هایی مانند ضد HBV) و کاهو

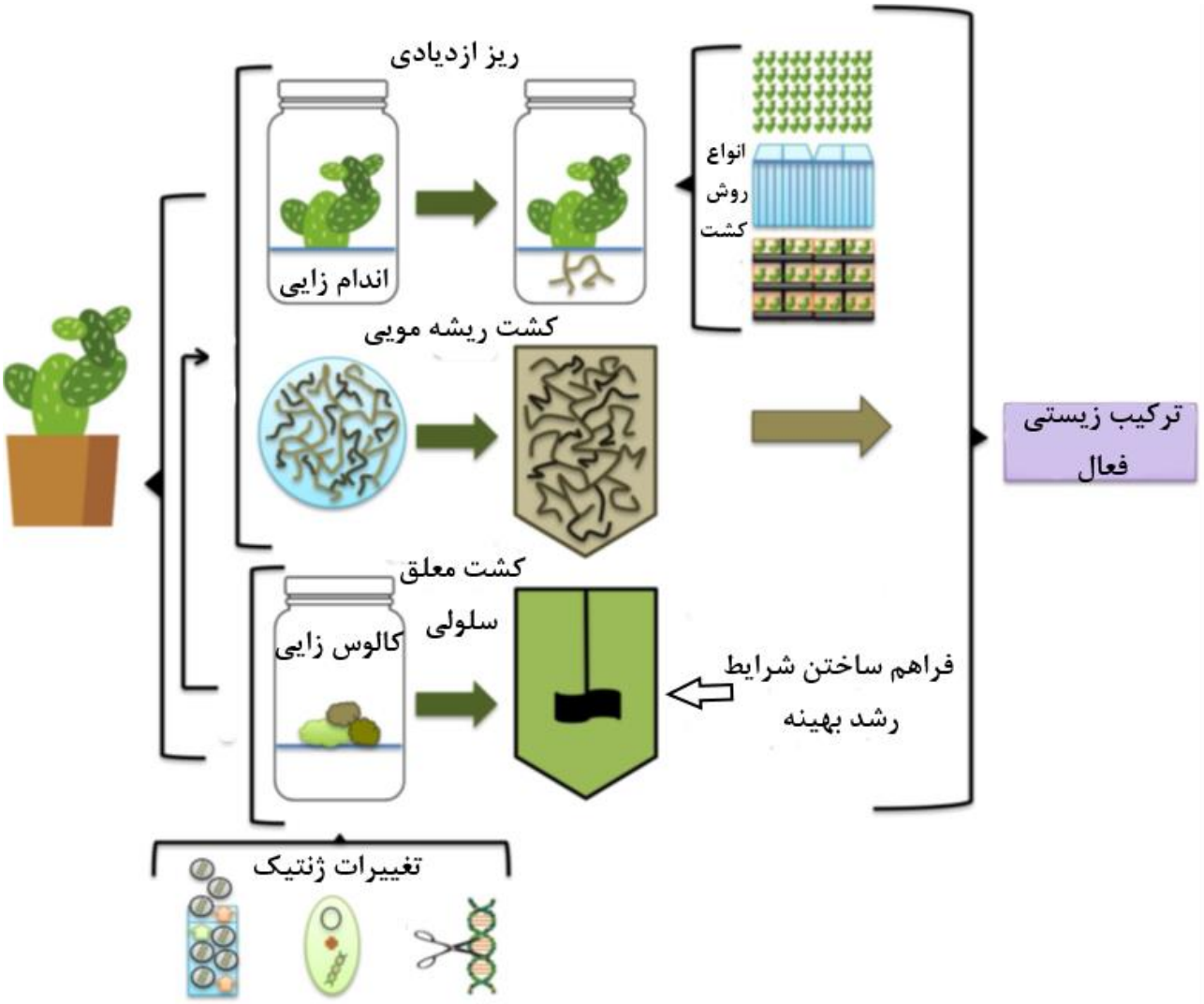
[1] Saponins
[2] Luteolin
[3] Betalains
[4] Cactus pear
[5] Hairy roots

(واکسن‌ها و آنتی‌بادی‌ها) هستند. گیاهان مدل، مانند نوعی توتون[1]، نیز برای تولید داروهای گیاهی، تراریخته شده‌اند (۵).

۷-۱) روش‌های کشت بافت گیاهی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه

روش‌های مختلفی برای کشت بافت گیاهی وجود دارد؛ دو مورد که بیشترین استفاده را داشته‌اند در شکل شماره ۱۳ ارائه شده‌اند. اندام‌زایی که به تولید اندام‌های گیاهی (ریشه‌ها یا ساقه‌ها) اشاره دارد، می‌تواند به طور مستقیم از مریستم‌ها یا به طور غیرمستقیم از سلول‌های تمایززدایی شده (کالوس) انجام گردد. کشت‌های حاصل بعداً می‌توانند برای تولید انبوه گیاهان (ریزازدیادی) یا رشد اندام‌های خاص (به عنوان مثال ریشه در کشت ریشه مویین) مورد استفاده قرار بگیرند. کالوس‌زایی[2] در پاسخ به قرار گرفتن قطعات جداشده از گیاه در برابر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد و توده بی‌شکلی از سلول‌ها را تولید می‌کند. سپس می‌توان از کالوس برای بازسازی گیاهان کامل استفاده کرد یا متابولیت‌های مهم را با کشت سلولی غوطه‌ور، در مقیاس وسیع تولید نمود (۵).

[1] *Nicotiana benthamiana*
[2] Callogenesis



شکل ۱۳- روش‌های رایج کشت بافت گیاهی شامل اندام‌زایی و کالوس‌زایی که برای تولید ترکیبات فعال زیستی در مقیاس وسیع بکار می‌روند (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود).

همانطور که در جدول ۱ ذکر شده است، تمام روش‌های کشت بافت گیاهی مجموعه‌ای از مراحل را دنبال می‌کنند. ابتدا گیاه مورد نظر باید انتخاب شود؛ این امر به طور کلی به هدف مطالعه بستگی دارد، اما گیاهان عاری از بیماری و حشرات ترجیح داده می‌شوند. در صورت نیاز، می‌توان از برخی پیش‌تیمارها (قارچ‌کش‌ها و آفت‌کش‌ها) استفاده کرد. گام بعدی شروع کشت در شرایط آزمایشگاهی است. این فرآیند نیاز به برش قطعات کوچک گیاه (جداکشت‌ها) یا استفاده از بذرها و استریل کردن سطحی آن‌ها با مواد شیمیایی دارد. سپس جداکشت‌ها در محیط کشت مناسب

قرار گرفته و برای مدت زمان کوتاهی انکوبه می‌شوند. جداکشت‌های آلوده، دور ریخته شده و آن‌هایی که سالم مانده‌اند مرحله بعدی را ادامه می‌دهند. در ادامه، مراحل بسته به نوع کشت مورد نظر، متفاوت است. در اندام‌زایی، در این فاز تکثیر انجام می شود که در آن جداکشت‌ها در محیط کشت مناسب برای ساقه یا ریشه کشت می‌شوند، و به همین ترتیب در کالوس‌زایی، کالوس تکثیر می‌گردد. در مرحله بعد، کشت‌های کالوس و ریشه برای تولید در مقیاس وسیع با استفاده از بیوراکتورها کشت می‌شوند، درحالی‌که ساقه‌های تکثیر یافته به منظور ریزازدیادی به محیط‌های کشت تقویت‌کننده ریشه منتقل می‌شوند. سرانجام، گیاهان ریزازدیادشده برای رشد گیاهان منفرد با قابلیت فتوسنتز، مقاوم‌سازی می‌شوند. مقاوم سازی فرایندی است که طی آن ریزازدیادشده سازگاری لازم به شرایط خارج آزمایشگاهی را بدست می آورد. گیاه مقاوم‌سازی به تدریج انجام می‌شود تا امکان سازگاری گیاهان به شرایط خارج آزمایشگاهی را فراهم کند. به طور معمول گیاهان از رطوبت بالا به پایین و از شدت نور کم به زیاد منتقل می‌شوند. بخش‌های زیر تحولات جدیدی را در کشت بافت گیاهی که امکان تولید مؤثرتر ترکیبات زیست‌فعال را فراهم می‌کند، پوشش می‌دهد (۵)

جدول ۱- لیست مراحل کشت بافت در آزمایشگاه

مرحله	نام	توضیحات
۰	پیش ازدیادی	انتخاب گیاه مناسب پیش تیماری گیاه
۱	ابتدایی	انتخاب جداکشت (نوک ساقه، نوک مریستم، جوانه جانبی، مریستم گل و غنچه) استریلیزاسیون سطحی(سدیم هیپوکلریت، اتانول، آب مقطر استریل‌شده، شوینده)
۲	ازدیاد	ریزازدیادی: القای ساقه سایر: تکثیر کالوس ریشه
۳	ازدیاد۲	ریزازدیادی: القای ریشه

		سایر: تولید در مقیاس وسیع در بیوراکتور
۴	مقاوم‌سازی	سازگاری با شرایط خارج ازآزمایشگاه

ریزازدیادی روش انتخابی برای تولید گیاهان کامل جهت اهداف دارویی، حفاظت، جنگل‌زایی و تجاری بوده است. کشت بافت گیاهانی با توانایی تولید مولکول‌های زیستی مهم، مزایای زیادی نسبت به کشت سنتی در مزرعه دارد؛ از جمله وابسته نبودن به تغییرات جغرافیایی، فصلی و محیطی؛ تولید بدون وقفه با کیفیت و عملکرد یکنواخت؛ عدم نیاز به استفاده از آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها و دوره نسبتاً کوتاه رشد (۵).

تولید متابولیت‌های ثانویه با کشت بافت گیاهی به عوامل مختلفی بستگی دارد که از جمله آن‌ها مواد مغذی تأمین شده برای رشد گیاه است. غلظت بهینه مواد مغذی، تعیین‌کننده رشد جداکشت‌ها و تجمع متابولیت‌های ثانویه است. نوع محیط کشت مورد استفاده، غلظت نمک محیط کشت و نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده از عوامل کلیدی هستند که باید برای هر کشت، معین شوند. غلظت نمک‌های موجود در محیط کشت مورد نیاز یک گیاه خاص با توجه به نیازهای ویژه کشت متفاوت است. انتخاب یک محیط مناسب برای کشت سلول و اندام ضروری است. سه مورد از محبوب‌ترین محیط‌های کشت مورد استفاده MS[1]، B5[2] و WPM[3] هستند که در جدول ۲ ذکر شده‌اند (۵).

[1] Murashige and Skoog media
[2] Gamborg B5 medium
[3] Woody Plant Medium

جدول ۲- لیست محیط‌های کشت رایج استفاده شده در کشت بافت گیاهی

محیط کشت	مقدار نمک(g/L)	مقدار نیتروژن(mM)
WPM	2.68	14.70
B5	3.28	26.75
MS	4.63	60.01

محیط پایه MS حاوی بالاترین محتوای نمک و نیتروژن است. نیتروژن یک عنصر اساسی است که رشد جداکشت‌ها را تقویت می‌کند؛ زیرا به طور مستقیم روی تولید آمینواسید و نوکلئیک‌اسید در سلول‌ها تأثیر می‌گذارد. محیط پایه MS (۱۹۶۲) متداول‌ترین محیط کشت گیاه است. همانطور که در جدول ۲ ارائه شده است، محتوای نمک بسیار بالایی دارد؛ با وجود این، محیط ترجیحی برای رشد گونه‌های متعدد است. غلظت‌های مختلف نمک MS در رشد گونه‌های مختلف تأثیرگذار است. به طور کلی، غلظت‌های کم نمک باعث تحریک ریشه‌زایی می‌شود. فارگوسو مونفورت[1] و همکارانش دریافتند که در *Ocimum basilicum*، ترکیبات فرار با غلظت نمک بالاتر کاهش می‌یابند. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه می‌توانند روی تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر بگذارند، در یک بررسی جدید خلاصه‌ای از تولید محصولات طبیعی با استفاده از تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد گیاه ارائه شده است. با وجود این، یکی از اصلی‌ترین معایب کشت بافت آزمایشگاهی، هزینه بالای این روش، به ویژه هزینه‌های مربوط به محیط کشت (به طور عمده منبع کربن، عامل ژلی‌کننده و تنظیم‌کننده‌های رشد)، برق و نیروی کار است. در برخی از مطالعات سعی شده است هزینه محیط کشت با استفاده از مواد جایگزین مانند قند خانگی یا سایر قندها به عنوان منابع کربن و انواع

[1] Fargoso Monfort

نشاسته و صمغ‌های گیاهی به جای آگار برطرف شود. سایر گزینه‌ها شامل استفاده از محیط مایع و کشت‌های سلولی غوطه‌ور، سیستم‌های غوطه‌وری موقتی و مهره‌های شیشه‌ای[1] قابل استفاده مجدد به عنوان بسترهای حمایتی جایگزین بوده است (۵).

هزینه برق می‌تواند۶۰٪ هزینه‌ی تولید کشت بافت باشد. انرژی الکتریکی بیشتر برای اتوکلاو کردن، روشنایی اتاق رشد و فیلتراسیون هوا در کابینت‌های جریان آرام و تهویه هوا استفاده می‌شود. استفاده از نور مصنوعی در اتاق‌های رشد، گران‌ترین و ناکارآمدترین روش در فناوری کشت بافت است؛ زیرا گرمایی تولید می‌کند که باید با استفاده از تهویه مطبوع دفع شود و با نور طبیعی مطابقت ندارد. علاوه بر این، حتی اگر گیاهان قادر به انطباق با طیف وسیعی از شرایط باشند، به محض اینکه سازگاری رخ دهد، سازگاری مجدد با شرایط جدید کند و دشوار است. استفاده از نور طبیعی یک گزینه کم‌هزینه برای کشت بافت است که باعث کاهش هزینه‌های برق و سرمایه‌گذاری و همچنین کیفیت گیاه می‌شود. چندین روش برای دستیابی به این هدف وجود دارد؛ یک گزینه ساده پخش نور طبیعی در زیر پلاستیک یا شیشه است که در آب و هوای معتدل بهترین عملکرد را دارد؛ برخی از آزمایشگاه‌ها را می‌توان تغییر داد تا از سیستم نورگیری سولاتیوب[2] استفاده کنند که نور روز را از طریق بازتاب از پشت‌بام هدایت می‌کنند. برخی از آزمایشگاه‌ها مانند کارخانه‌های زیستی در کوبا، می‌توانند پنجره‌های رو به جنوب غربی را در اتاق‌های رشد قرار دهند که باعث می‌شود نور طبیعی به طور غیرمستقیم پخش گردد، و در نهایت برخی از کشت‌ها با استفاده از کیسه‌های

[1] Glass beads
[2] Solatube

پلاستیکی به عنوان محفظه‌های کشت و آویزان کردن آن‌ها در گلخانه‌ها و بنابراین کاهش نیاز به اتاق‌های رشد با تهویه مطبوع، با موفقیت تکثیر یافته‌اند. اکثراً از تنظیم دما که از دلایل مصرف برق زیاد گیاه در شرایط آزمایشگاهی است، می‌توان اجتناب کرد؛ زیرا بسیاری از گیاهان تحمل نوسانات گسترده دما را دارند (۵).

نیروی کار، منبع دیگری از هزینه‌های بالای کشت بافت آزمایشگاهی است. هنگامی که کارایی نیروی کار در انتقال تعداد قطعات تکثیری در ساعت به حداکثر ممکن رسیده باشد، فضای کمی برای پیشرفت وجود دارد مگر اینکه یک سیستم خودکار یا نیمه خودکار اجرا شود. به عنوان مثال، نشان داده شده است که استفاده از بیوراکتورها و رسیدگی مکانیکی به قطعات تکثیری، هزینه تولید را ۵۰٪ کاهش می‌دهد (۵).

مشکل دیگری که در کشت بافت گیاهی وجود دارد، پایداری ژنتیکی گیاهان است. موارد مختلف ریزازدیادی گیاهان بازسازی‌شده در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که آن‌ها همیشه نسخه‌های مشابه گیاه مادری نیستند. شرایط کشت آزمایشگاهی، به ویژه برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد و الیسیتورها[1] (ترکیبات شیمیایی از منبع زیستی یا غیرزیستی که پاسخ به تنش را در گیاهان تحریک و منجر به افزایش سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه یا القای متابولیت‌های ثانویه جدید می‌شوند)، به عنوان عوامل تنش‌زا عمل می‌کنند که باعث ایجاد تغییراتی در مناطق حساس ژنوم گیاه شده و موجب ایجاد ناپایداری در سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های کشت شده می‌شوند که به عنوان تنوع

[1] Elicitors

سوماکلونال شناخته می‌شود. تغییرات ژنتیکی تجربه شده توسط این کشت عبارت‌اند از: جهش جایگزینی DNA، تکثیر، فعال‌سازی عناصر قابل انتقال، پلی‌پلوئیدی، تغییراتی در تعداد کروموزوم یا توالی DNA (۵).

به طور معمول پروتکل‌های بازسازی که شامل یک مرحله کالوس هستند، کمترین حد اطمینان برای تکثیر کلونال در نظر گرفته می‌شوند، درحالی‌که گیاهچه‌های بازسازی شده با شاخه‌زایی جوانه‌های جانبی یا رویان‌های سوماتیک مستقیم، از نظر ژنتیکی یکنواخت‌ترین هستند. وقوع تنوع سوماکلونال در طی تکثیر آزمایشگاهی، تولید صنعتی مواد شیمیایی گیاهی یا گیاهان مهندسی شده ژنتیکی می‌تواند منجر به عواقب گسترده اقتصادی شود و یک مانع جدی در استفاده عملی از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی برای تولید متابولیت‌های فعال به شمار می‌آید. بنابراین، برای غربالگری تنوع سوماکلونال در یک کشت سلولی، لازم است که ساختار ژنتیکی و پایداری گیاهان بازسازی شده در شرایط آزمایشگاهی کنترل و ارزیابی شود. روش‌های درگیر در آن فرایند، شامل استفاده از چندین تکنیک برای ارزیابی تغییرات احتمالی در سطوح مختلف است (۵).

فلوسایتومتری و شمارش کروموزوم به میزان گسترده برای ارزیابی تغییرات پلوئیدی و تعداد کروموزوم‌ها استفاده می‌شود؛ نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR، چندشکلی قطعات DNA تکثیریافته تصادفی[1] (RAPD)، چند شکلی طولی قطعات بریده شده[2] (RFLP) ، توالی‌های تکراری ساده بینابینی[3] (ISSR)، چند شکلی طولی قطعات تکثیریافته[4]

[1] Random amplified polymorphic DNA
[2] Random fragmented length polymorphism
[3] Inter simple sequence repeat
[4] Amplified fragment length polymorphism

(AFLP)، نشانگرهای ریزماهواره‌ای[1] و چندشکلی هدف‌گذاری‌شده با کدون آغاز (ScoT)[2] برای ارزیابی پایداری ژنومی گیاهان بازسازی شده، با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ترکیب مناسبی از دو یا چند نشانگر، آزمایش قابل اطمینان و کارآمد پایداری ژنتیکی را در گیاه تضمین می‌نماید (۵).

کشت غوطه‌ور سلولی بهترین روش برای تولید متابولیت‌های فعال، به ویژه محصولات طبیعی می‌باشدکه برجسته‌ترین مثال آن‌ها، پاکلیتاکسل[3] از گونه سرخدار است. برای تولید کشت‌های غوطه‌ور سلولی، ابتدا کالوس‌ها در محیط‌های جامد ایجاد شده و سپس سلول‌ها به محیط مایع منتقل می‌شوند. در آزمایشگاه‌های کوچک، سلول‌ها ابتدا در فلاسک‌های لرزان رشد داده شده و بعداً به بیوراکتورهای فاز مایع در مقیاس بزرگ منتقل می‌شوند. انواع مختلفی از راکتورها از جمله راکتورهای مخزنی، تخت‌های حبابی[4] و راکتورهای دوار وجود دارند (۵).

در مقایسه با کشت‌های میکروبی، محدودیت‌هایی از جمله سرعت رشد آهسته و بازده کم و متغیر متابولیت‌ها، با این روش‌ها همراه هستند و این محدودیت‌ها هنوز هم استفاده صنعتی از کشت‌های غوطه‌ور سلول گیاهی را محدود می‌کنند. با این حال، تولید متابولیت‌های مهم می‌تواند با تغییراتی که در محیط کشت ایجاد می‌شود، مانند افزودن الیسیتورها یا پیش‌سازها یا شرایط محیطی، افزایش یابد (۵).

[1] Microsatellite markers
[2] Start codon targeted polymorphism
[3] Paclitaxel
[4] Bubble beds

الیسیتورها، تولید محصولات طبیعی گیاهی را که به عنوان ترکیبات دفاعی گیاه کار می‌کنند، تحریک می‌نمایند. انواع مختلفی از الیسیتورها از جمله پکتین و سلولز (اجزای تشکیل‌دهنده دیواره سلول‌های گیاهی)، کیتین و گلوکان (از میکروارگانیسم‌ها) و سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات (مولکول‌های سیگنالینگ ایمنی گیاه)، می‌توانند تولید متابولیت ثانویه را افزایش دهند. از تراوشات کشت‌های قارچی مختلف به عنوان الیسیتورهای زیستی در کشت‌های ریشه گیاه چریش[1] برای تقویت تولید آزادیراکتین[2] استفاده شده و مشخص گردید که تراوشات پاتوژن قارچی *Curvularia lunata* بیشترین تولید ترکیب هدف را نسبت به شاهد داشت. با استفاده از عصاره مخمر، پکتین و زایلان، تولید آنتراکینون‌ها را در کشت‌های *Oldenlandia umbellate* انجام دادند که افزودن پکتین به بالاترین نتیجه منجر شد. انتخاب الیسیتور مناسب به متابولیتی که تولید می‌شود و نوع کشتی که به کار برده می‌شود، بستگی دارد (۵).

راهبرد دیگر، افزودن پیش‌سازهایی است که ترکیبات واسطه مسیر متابولیک محصول طبیعی مورد نظر هستند. اضافه کردن محیط کشت با پیش‌سازهای متابولیت‌های ثانویه می‌تواند عملکرد محصول نهایی را افزایش دهد و در موارد مختلفی از جمله تولید ترکیبات فنولی، تری‌ترپنوئیدها و ویتانولیدها[3] با موفقیت استفاده شده است. در کشت‌های *Antrodia cinnamomea* که جهت افزایش محتوای تری‌ترپنوئید، با استرول‌های برون‌زا از جمله اسکوالن، کلسترول و استیگماسترول تغذیه شدند، تغذیه با دوزهای بالای استیگماسترول منجر به افزایش مقدار ترپن‌ها شد. هنگام

[1] *Azadirachta indica*
[2] Azadirachtin
[3] Withanolides

جستجوی پیش‌سازهای مناسب، باید به کل مسیر بیوسنتزی توجه شود و مولکول‌های متفاوت درگیر در مراحل مختلف فرایند به حساب آورده شده و برخی از نمونه‌هایی که به روش‌های غیرمستقیم بر تولید ترکیب هدف تأثیر می‌گذارند، گنجانده شوند. گروه‌های مطالعاتی جهت افزایش تولید آزادیراکتین، استفاده از پیش‌سازهایی از جمله سدیم استات، کلسترول، اسکوالن، ایزوپنتنیل پیرو فسفات و سایر موارد را مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها بهترین نتایج را با استفاده از کلسترول به عنوان پیش‌ساز غیرمستقیم به دست آوردند. همچنین اثر پیش‌سازهای مختلف بیوشیمیایی در تولید اسیدهای چرب در کشت سلول‌های کاکائو از جمله بیوتین، پیروات، استات و بی‌کربنات را ارزیابی کردند. آن‌ها از گلیسرول نیز استفاده کردند زیرا در سرهم‌بندی تری‌گلیسیریدها نقش دارد. مشخص شد که مورد آخر تولید چربی بیشتری در مقایسه با سایر پیش‌ماده‌ها و شاهد ایجاد می‌کند. همچنین برای دستیابی به ترکیب مورد نظر، پیش‌ساز باید آسان‌تر و ارزان‌تر باشد. یک روش جایگزین برای افزایش تولید محصول طبیعی، دست‌ورزی عوامل محیطی است. گیاهان به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را از طریق مکانیسم‌های پاسخ به تنش، کنترل می‌نمایند. تنش‌های غیرزیستی مرتبط با عوامل محیطی شامل شدت نور، در دسترس بودن آب، دما (زیاد یا کم)، تابش (UV)، سموم گازی (اوزن)، حشره‌کش‌ها و فلزات (Ni، Cd، Co، Fe، Zn) هستند. تنش آبی هنگامی ایجاد می‌گردد که گیاه از نظر دسترسی به آب یا به دلیل عدم وجود آب (خشکی) یا به دلیل اینکه آب حاوی املاح است (شوری) محدود باشد. تنش خشکی را می‌توان در شرایط آزمایشگاهی با افزودن حل‌شونده‌هایی با وزن مولکولی بالا، مانند پلی‌اتیلن گلایکول (PEG)، به محیط کشت ایجاد کرد. ثابت شده است که این روش تولید متابولیت های ثانویه ای مانند ساپونین در *A. salmiana*، ترکیبات فنولی در *Poliomintha*

glabrescens و رزمارینیک اسید در *Salvia miltiorrhiza* را افزایش می‌دهد. برای القای تنش شوری می‌توان غلظت‌های مختلف نمک‌هایی مانند NaCl و Na_2CO_3 را به محیط کشت افزود. این نوع استرس منجر به افزایش تولید متابولیت ثانویه استویول[1] گلیکوزید در *Stevia rebaudiana*، سوربیتول در *Lycopersicon esculentum* و فلاونوئیدها در *Hordeum vulgare* شده است (۵).

نور یک جزء غیرزیستی محیطی ضروری برای گیاهان است، زیرا فتوسنتز را امکان‌پذیر می‌کند؛ با این حال، سطح بالای اشعه فرابنفش می‌تواند مضر باشد. گیاه برای محافظت از خود در برابر آسیب اکسیداتیو، چندین متابولیت آنتی‌اکسیدانی مانند پلی‌فنول‌ها و توکوفرول‌ها[2] را تولید می‌کند. بنابراین می‌توان از اشعه فرابنفش برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، به طور معمول با قرار دادن کشت‌ها در معرض نور فرابنفش با استفاده از یک لامپ مخصوص برای مدت زمان مشخص استفاده کرد. این روش در کالوس‌های *Vitis vinifera* برای تولید فلاونول‌ها استفاده شده است. مواد شیمیایی مختلف، از جمله فلزات سنگین می‌توانند استرس شیمیایی ایجاد نمایند. یون‌های فلزی بر تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارند و با توجه به نوع گیاه و نوع و غلظت فلزات سنگین، حتی می‌توانند تولید آن‌ها را افزایش دهند. به عنوان نمونه، می‌توان به کشت سلولی غوطه‌ور *Thalictrum rugosum* که از $CuSO_4$ برای تحریک تولید بربرین[3] استفاده کرده است، اشاره کرد. با این حال، این پیشرفت‌ها برای ادامه تولید کافی در مقیاس وسیع ترکیبات زیست‌فعال کافی نیستند، بنابراین هم‌چنان به روش‌های دیگری نیاز است (۵).

[1] Steviol
[2] Tocopherols
[3] Berberine

۷-۲) جایگزین‌های کشت گیاهی آزمایشگاهی

بازده پایین متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی را می‌توان به عنوان نتیجه‌ای از عدم تمایز سلول توضیح داد. یک راهبرد جایگزین برای کشت سلولی، کشت سازمان‌یافته ریشه‌ها یا ساقه‌ها است. کشت ریشه مویین یک مثال کامل است که با آلوده‌سازی ریشه‌ها با باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* و انتقال متعاقب پلاسمید Ri القا می‌شود که موجب رشد فراوان ریشه‌های نئوپلاستیک[1] شده و می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی حفظ شود. برخی از مزایای ارائه شده توسط کشت ریشه مویین شامل میزان رشد بالا بدون نیاز به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، کشت‌های پایدار از نظر ژنتیکی و بیوشیمیایی و ظرفیت مشابه برای تولید متابولیت‌های ثانویه نسبت به کشت‌های سلولی غوطه‌ور است (۵).

طیف گسترده‌ای از محصولات طبیعی از جمله لیگنان‌ها، استروئیدها، آنتراکینون‌ها و آلکالوئیدها با استفاده از این سیستم تولید شده‌اند. با این حال، برای تولید متابولیت نیاز است ترکیب مورد نظر، ترکیبی باشد که به صورت طبیعی در ریشه گیاه منبع تولید شود؛ بنابراین، این امر کارایی سیستم ریشه مویین را محدود می‌کند. با وجود این، بزرگ ترین عامل محدودکننده در استفاده صنعتی از ریشه‌های مویین جهت تولید متابولیت‌های ثانویه، افزایش مقیاس آن

[1] Neoplastic roots

هاست، زیرا این امر به توسعه مخازن کشت مناسب که مخلوط کردن بدون آسیب برشی به توده ریشه به هم پیوسته را امکان‌پذیر می‌کند، نیاز دارد (۵).

علاوه بر این، کشت ریشه مویین به استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی برای افزایش تولید متابولیت‌های مورد نظر، حساس است. روش دیگر برای جلوگیری از برخی مشکلات اساسی هنگام استفاده از کشت‌های سلولی، مانند تنوع در بیوسنتز محصول، تجمعات بزرگ سلولی و تنش برشی، استفاده از کشت سلول‌های مریستمی کامبیال[1] تمایزنیافته است. این کشت‌ها نه تنها فاقد مشکلاتی که در بالا گفته شد هستند، بلکه سلول‌ها از نظر فیزیولوژیکی پایدار بوده و سرعت رشد بالایی را نشان می‌دهند. سلول‌های مریستمی کامبیال سلول‌های تمایزنیافته‌ای هستند که به طور نامحدود رشد کرده و مانند سلول‌های بنیادی گیاه رفتار می‌نمایند. آن‌ها نیاز به تمایززدایی سلول‌های گیاهی برای ایجاد کشت‌های سلولی گیاهی را از بین می‌برند و پایداری بیشتری را در تجمع محصول طی دوره‌های طولانی ایجاد می‌کنند. این نوع کشت برای تولید محصولات غذایی، آرایشی و دارویی ایجاد شده و در حال حاضر یک بستر کلیدی برای تولید در مقیاس بزرگ محصولات طبیعی محسوب می‌شود. کشت‌های سلولی گیاهی، به ویژه کشت‌های کالوس به ندرت دارای ویژگی‌های فیزیولوژیکی یکنواخت هستند. طبیعت غیریکنواخت آن‌ها، انتخاب رده‌های سلولی با تولید بالا جهت ایجاد بسترهای تولید سودآور محصولات طبیعی را ضروری می‌سازد. محبوب‌ترین رده، سلول‌های Tobacco Bright Yellow-2 (BY-2) هستند که به دلیل نرخ رشد سریع، سهولت تراریختگی با *Agrobacterium*

[1] Cambial meristematic cells

و همگام‌سازی چرخه سلولی جذاب می‌باشند. علاوه بر این، مجموعه میکروارگانیسم‌ها و کشت‌های سلولی موسسه لایبنیز DSMZ-آلمان دارای کاتالوگ کافی از رده‌های سلول‌های گیاهی است. آن‌ها ۴۱ رده سلولی گیاهی را ارائه می‌دهند که ۱۸ مورد از آن‌ها به صورت کشت‌های در حال رشد فعال و ۲۳ مورد به صورت کشت‌های فریزشده منتقل می‌شوند. به دست آوردن رده‌های سلولی، کشت را تسهیل کرده و روند ساده‌تری از تراریختگی گیاه و تولید متابولیت را فراهم می‌نماید (۵).

۷-۳) راهبردهایی برای بیان ترکیبات فعال بیولوژیک گیاهی

میزان بیان پایین متابولیت‌های فعال گیاهی و بیان ترکیبات مهم جدیدی که به طور معمول در گیاهان بیان نمی‌شوند، مانند واکسن‌ها، نیاز به ابزاری دارد که امکان اصلاح مواد ژنتیکی گیاهی را فراهم نماید. مهندسی ژنتیک گیاهی از دهه ۱۹۸۰، ابتدا با آگروباکتریوم و سپس با تراریختگی توسط بمباران با ذرات، مورد استفاده قرار گرفته است. هر دو روش برای دسته‌ای از گیاهان مؤثر بوده و بیان بیش از حد متابولیت‌های ثانویه یا تولید داروهای گیاهی را امکان‌پذیر می‌سازند. با وجود این، علی‌رغم این موفقیت، این روش‌ها با چندین چالش همراه هستند که استفاده از آن‌ها را در بسیاری از محصولات محدود می‌کند. تراریختگی با واسطه *آگروباکتریوم* در اکثر گیاهان دولپه‌ای (البته بیشتر به برخی از ژنوتیپ‌های موجود در یک گونه محدود است) و در تعداد کمی از گیاهان تک‌لپه‌ای قابل انجام است. مشکلات ناشی از استفاده از *آگروباکتریوم* برای تراریختگی گیاه شامل مشکلات اخذ مجوز، هزینه‌های زیاد برای تأمین مجوزهای

قانونی و پاسخ‌های ذاتی گیاه به عفونت باکتریایی، مانند فعال‌سازی برخی از پروتئین‌هایی که باعث قهوه‌ای شدن بافت و نکروز شدن می شوند و به نوبه خود، فراوانی تراریختگی را کاهش می‌دهند، است (۵).

برخی از این مسائل را می‌توان به راحتی با اصلاحات کوچک در این روش، مانند کاهش بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به عفونت در گیاهان میزبان یا افزودن آنتی‌اکسیدان به محیط عفونی برطرف نمود. برای از بین بردن سایر مشکلات، محققان همچنان به دنبال یک سیستم جدید برای تحویل ژن بر اساس یک جاندار غیربیماری‌زا هستند که سرعت بالای تراریختگی را برای هر دو گونه تک‌لپه و دولپه فراهم کند. با چندین گونه *ریزوبیوم* (*Sinorhizobium meliloti*، *Mesorhizobium loti* و NGR 234) معروف به ترانس‌باکتر[1] پیشرفت‌هایی صورت گرفته است. یکی دیگر از اعضای باکتری‌های گرم-منفی خانواده *Rhizobiaceae*، سویه *Ensifer adhaerens* OV14، برخلاف *A. tumefaciens*، به نظر می‌رسد برای گیاهان مفید است و با موفقیت برای تراریختگی *آرابیدوپسیس تالیانا*، *Solanum tuberosum* و *Oryza sativa* L مورد استفاده قرار گرفته است. بیوبالیستیک[2] نسبت به تراریختگی با *آگروباکتریوم* در طیف وسیع‌تری از ژنوتیپ‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش فاقد مشخصه بیماری‌زایی باکتری‌ها بوده و فرآیند همسان‌سازی را ساده می‌کند؛ زیرا به وکتور خاصی احتیاج ندارد. با این حال، بافت‌های گیاهی که تحت این تکنیک قرار می‌گیرند اغلب در بازسازی پس از بمباران و عملکرد ژن خارجی مشکلاتی را نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد میزان اثر این روش به خصوصیات ذرات مانند نوع، اندازه، مقدار و ساختار DNA و به نوع بافت و پیش‌تیمار

[1] Transbacter
[2] Bioballistics

بستگی دارد. پیشرفت در این تکنیک‌ها می‌تواند پاسخ‌های بازسازی و تراریختی طیف وسیعی از گیاهان مورد نظر اقتصادی را افزایش دهد. ویرایش ژنوم با واسطه کریسپر پیشرفت جدیدی در تراریختی ژنوم گیاه است که ممکن است یک راه حل امیدوارکننده برای بسیاری از مشکلات تکنیک‌های موجود باشد. این فناوری جدید امکان تغییر در مناطق خاصی از ژنوم را با دقت بیشتر در الحاق فراهم می‌کند؛ درحالی‌که از سمیت سلولی جلوگیری کرده و سلول قابلیت بازتولید کامل را دارد (۵).

ویرایش ژنوم در حال حاضر به یکی از سه شکل زیر اعمال می‌شود:

۱) تغییر در تعداد کمی از نوکلئوتیدها،

۲) جایگزینی یک آلل با آلل از قبل موجود

۳) الحاق ژن‌های جدید در مناطق از پیش تعیین شده ژنوم.

از آنجا که تکنیک‌های ویرایش ژنوم تنها آثار کوچکی از تغییرات DNA ایجاد می‌کنند، لذا از بیشتر اقدامات نظارتی شامل نظارت کارآمد اثرات محصولات تراریخته بر سلامت آحاد جامعه، تضمین برچسب‌گذاری دقیق و صادقانه محصولات تراریخته و ارزیابی میزان پراکنش ژن‌های محصولات تراریخته در طبیعت اجتناب می‌شود و می‌توان از این روش برای ایجاد سریع محصولات جدید با مقاومت در برابر آفات، ارزش غذایی افزایش یافته و تحمل به خشکی

استفاده کرد. برخی از نمونه‌های موفق شامل تراریختی گیاهان زراعی بادمجانی[1] مانند سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی، سویا و برخی از غلات مانند جو، ذرت، برنج، گندم و ذرت خوشه‌ای[2] است (۵).

۸) رآکتورهای زیستی گیاهی جهت تولید مواد برای مصارف پزشکی و دامپزشکی

طی چند دهه‌ی گذشته، تقاضا برای استفاده از مولکول‌های درمانی نوترکیب جهت کاربردهای بالینی به‌طور چشم-گیری افزایش یافته است (۸). بیوتکنولوژی این امکان را فراهم می‌کند تا ارگانیسم‌ها را با ویژگی‌های خاص بسازیم و از آن‌ها به عنوان بیوراکتور برای تولید انواع مختلف پروتئین‌های انسانی و حیوانی برای کاربردهای پزشکی و دامپزشکی استفاده کنیم. در حال حاضر، از باکتری‌ها، مخمرها و همچنین کشت سلول‌های پستانداران و حشرات برای سنتز پروتئین‌ها استفاده می‌شود. روند تولید پروتئین غیر خودی در شیر جانور تراریخته و در سیستم‌های فاقد سلول نیز در حال توسعه است. استفاده از سیستم‌های گیاهی به عنوان بیوراکتور برای تولید مواد مختلف در صنعت داروسازی یکی از گرایش‌های مهندسی متابولیسم است (۱۱).

گیاهانی که پتانسیل بیوشیمیایی طبیعی و بالایی دارند می‌توانند منبعی عالی برای تولید مواد مختلف مانند قندها، ترکیبات فنولی، اسیدهای چرب، استروئیدها، آلکالوئیدها و سایر ترکیبات فعال زیستی باشند. بسیاری از این ترکیبات از نظر دارویی و پزشکی ارزش بالایی دارند (۱۱).

[1] Solanaceous
[2] Sorghum

۸-۱) مزایای سیستم‌های گیاهی

راکتورهای زیستی گیاهی برای تولید در مقیاس وسیع محصولات کشاورزی، مقرون به صرفه و ساده هستند. درنتیجه می‌توان داروهای زیستی خاص و گران‌قیمتی مانند آنزیم‌های لیزوزومی انسانی را در راکتورهای زیستی گیاهی به ویژه در کشورهای در حال توسعه، تولید کرد (۸). استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتور در بیوتکنولوژی بسیار جذاب است. مهمترین مزیت گیاهان نوع تغذیه اتوتروفیک آن‌هاست. اکثر سیستم‌های بیان هترولوگ[۱] و مبتنی بر باکتری‌ها و مخمرها بسیار پرهزینه هستند. استفاده از گیاهان تراریخته به عنوان بیوراکتور می‌تواند تولید مقدار زیادی بیومس را در زمین‌های نسبتاً کوچک با سرمایه اندک و کاهش هزینه‌ی نیروی کار فراهم کند، که می‌تواند مزایای مهمی برای تولید محصولات کشاورزی داشته باشد (۱۱).

قیمت نهایی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان فقط ۲ تا۱۰ درصد هزینه‌های تولید پروتئین غیر خودی در میکروارگانیسم‌ها می‌شود و نسبت به تولید در حیوانات ۱۰۰۰بار ارزان‌تر است. گیاهان بالغ را می‌توان در گلخانه‌ها، خاک یا در محیط کشت جامد استریل، پرورش داد. علاوه بر این، بیوراکتورهای گیاهی را برای تولید پروتئین‌های غیرخودی می‌توان تحت شرایط کشت برون‌تنی، به عنوان کالوس، ریشه موئین یا کشت سلولی معلق تولید کرد (۱۱).

تکنیک‌های جدید فرصتی برای رشد بیوراکتورهای گیاهی در شرایط کنترل‌شده فراهم می‌کند، که به دلیل نگرش مبهم مردم نسبت به ارگانیسم‌های اصلاح ژنتیکی شده و محدودیت‌های قانونی در مورد این مسئله بسیار مهم است.

[۱] بیان ژن غیر خودی در میزبان

امکان تولید مقدار زیادی توده گیاهی در بیوراکتورها در توسعه بیوتکنولوژی گیاهی نقش مهمی داشته است؛ زیرا از بیوراکتورها برای تولید مواد دارویی مهم، از اغلب گونه‌های گیاهی نادر استوایی و بومی که برای کشت محصولات کشاورزی-صنعتی در مناطق معتدل آب و هوایی در کشورهای پیشرفته ممکن نیست، استفاده می‌شود (۱۱).

یکی از جنبه‌های مهم بیوتکنولوژی گیاهی، ایمنی نسبی ترکیبات تولیدشده توسط گیاهان تراریخته برای مصرف انسان است. تولید مواد غیرخودی در سلول‌های گیاهی، برخلاف باکتری‌ها، مخمرها، حشرات و پستانداران، خطر انتقال عوامل بیماری‌زای ویروسی، پریون‌ها و اندوتوکسین‌ها را ندارند. با این حال، ممکن‌است مشکلات خاصی به دلیل ناخالصی‌های موجود در پروتئین تولیدشده مانند پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه سمّی گیاهی وجود داشته باشد. این مشکل از طریق تخلیص و تعدیل متابولیسم ثانویه در بیوراکتورهای گیاهی قابل حل است. سیستم ترجمه و رونویسی یوکاریوتی گیاهان، استفاده از آن‌ها را برای تولید ترکیبات مشابه با ترکیبات تولید شده توسط گیاه و همچنین ترکیبات غیر خودی با منشأ متفاوت امکان‌پذیر می‌کند. بیان یوکاریوتی توسط گیاهان باعث تاخوردگی مناسب پروتئین‌ها می‌شود (۱۱).

در سال۱۹۸۲، تولید بیش از ۹۵ پروتئین مورد استفاده در پزشکی با استفاده از کشت سلولی باکتری‌ها، مخمرها، حشرات و پستانداران تأیید شد. با این حال، چنین سیستم‌هایی معایبی نیز دارند. به عنوان مثال، تغییرات پس از ترجمه و فولدینگ مناسب زنجیره‌های پلی‌پپتیدی بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی در سلول‌های پروکاریوتی اتفاق نمی‌افتد. در مقابل، بیوراکتورهای گیاهی، مشابه سلول‌های جانوری، قادر به تولید فرم‌های فعال پروتئین‌های پیچیده

با تغییرات مناسب پس از ترجمه، به عنوان مثال گلیکوزیلاسیون هستند و فولدینگی مشابه پروتئین‌های پستانداران ایجاد می‌کنند (۱۱).

یکی دیگر از مزایای بیوراکتورهای گیاهی، در دسترس بودن روش‌های مختلف نسبتاً ساده و اثبات شده برای ایجاد تغییرات ژنتیکی است. ژن غیر خودی می‌تواند در ژنوم ادغام شود یا برای بیان گذرا (در مدت زمان محدود) در وکتور قرار گیرد. استفاده از پروموتورهای ویژه‌ی یک بافت خاص، امکان تجمع پروتئین هدف را در اندام‌های گیاهی خاصی (بذر، میوه، غده و گیاهان ریشه‌ای) فراهم می‌کند، که می تواند جمع‌آوری مواد گیاهی را تسهیل کند. نشانه‌گذاری پروتئین مورد نظر با برچسب‌های داخل سلولی، ذخیره‌سازی طولانی‌مدت و انتقال محصول بدون جداسازی، نگهداری یا انجماد را امکان‌پذیر می‌کند. سرانجام، انواع فرآیندهای تولید پروتئین‌های مورد استفاده در پزشکی و دامپزشکی بدون نیاز به جداسازی و خالص‌سازی ارائه شد (۱۱).

بیوراکتورهای گیاهی خوراکی می‌توانند به عنوان مکمل‌های پروبیوتیک در رژیم‌های غذایی انسان یا حیوانات استفاده شوند. این محصولات همچنین برای بیان آنتی ژن هایی که خاصیت ایمنی زایی دارند نیز می توانند به کار روند و در واقع واسط خوراکی انتقال واکسن های آنتی ژنی باشند. به چنین واکسن‌هایی که آنتی‌ژن‌های پروتئینی غیر خودی یا مهمترین قطعات ایمنی‌زای آنتی‌ژن‌ها را تولید می‌کنند، واکسن‌های خوراکی و واکسن‌های بیان شده در گیاهان گفته می‌شود. همچنین مواد تعدیل‌کننده سیستم ایمنی مثل سیتوکین‌ها و سایر پروتئین‌های محرک سیستم ایمنی

و هورمون‌ها را می‌توان به طور مشابه در گیاهان تولید کرد. این اقدامات فرصتی را برای کاهش هزینه تولید پروتئین نوترکیب و ساده‌سازی استفاده از آن فراهم می‌کند (۱۱).

۸-۲) بیوراکتورهای گیاهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب

از زمان انتشار اولین مطالعات پیرامون تولید توتون تراریخته در سال ۱۹۸۳، مهندسی ژنتیک گیاهان به سرعت توسعه یافت. در حال حاضر، گیاهان تراریخته به طور گسترده‌ای در صنعت دارو استفاده می‌شوند. در سال ۱۹۸۶ سنتز پروتئین‌های حیوانی در سیستم‌های گیاهی موفقیت آمیز بود. اولین پروتئین دارویی که توسط گیاه توتون و گل آفتابگردان تولید شد، هورمون رشد انسانی بود. امروزه بیش از صد ترکیب دارویی در گیاهان سنتز می‌شود. تعداد گونه‌های گیاهی اصلاح ژنتیکی شده بیش از ۱۵۰ گونه است و هر ساله این مقدار در حال افزایش است. گیاهانی مانند توتون، گوجه فرنگی، سیب زمینی، آرابیدوپسیس تالیانا، هویج، نخود، سویا، یونجه، شبدر، کاهو، موز، ذرت، گندم و برنج بیشتر به عنوان راکتور زیستی برای تولید پروتئین‌های مهم دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۱). از عدسک آبی، خزه و جلبک‌های تک سلولی نیز اخیراً استفاده شده‌است. خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب تولیدشده در جلبک‌ها بسیار آسان است. علاوه بر این، دست‌کاری ژنوم خزه‌ها و جلبک‌ها، حذف ژن‌های مسئول پروتئولیز و گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها یا ورود ژن‌های خارجی، به دلیل هاپلوئید بودنشان راحت‌تر است (۱۱).

از محصولات کشاورزی برای تولید واکسن‌های گیاهی خوراکی نیز استفاده می‌شود. انتخاب محصول برای ایجاد بیوراکتور گیاهی بسیار مهم است. تغییر ژنتیکی گیاه باید به راحتی انجام شود، در شرایط کشت برون‌تنی رشد کند و به یک گیاه کامل تبدیل شود (۱۱).

این گیاه باید سرعت رشد بالا و بیومس نسبتاً زیادی داشته باشد، در مورد گیاهان بذری خودگشن باشد (باروری مادگی یک گیاه با گرده همان گیاه) و یا گیاهی که به صورت غیرجنسی تولیدمثل کند و چرخه عمر نسبتاً کوتاهی (یک ساله یا دو ساله) داشته باشد. علاوه بر این، خوراکی بودن گیاه نیز یک مزیت محسوب می‌شود. در دسترس بودن ژنوم توالی یابی شده گیاه مانند آرابیدوپسیس و کلامیدوموناس یک معیار مهم برای انتخاب است؛ متأسفانه، تحقق همه الزامات همیشه ممکن نیست و گاهی انجام چنین کاری غیر منطقی است. به عنوان مثال، هنگام ایجاد بیوراکتورهای خوراکی، ممکن است تغییراتی در گونه گیاهی انجام شود (۱۱).

۸-۲-۱) ترانسفورماسیون گیاهی

در حال حاضر، اکثر بیوراکتورهای گیاهی گلدار با کمک ترانسفورماسیون اگروباکتریوم تولید می‌شوند. برای این اهداف از *اگروباکتریوم تومفاشینس*، *اگروباکتریوم ریزوژنز*[1] و سایر گونه‌های طبیعی قابل تغییر، استفاده می‌شود. از این روش برای ترانسفورماسیون ژنوم هسته‌ای به صورت پایدار در بیشتر دو لپه‌ای‌ها و طیف وسیعی از تک لپه‌ای‌ها استفاده می‌شود. روش دیگر برای ترانسفورماسیون پایدار، تفنگ ژنی است که بمباران سلول‌ها با وکتور DNA پوشیده شده

[1] *A. rhyzogenes*

از میکرو ذرات تنگستن یا طلا است. روش تفنگ ژنی، برای گونه‌های گیاهی مناسب است و قادر است ژنوم هسته و ژنوم اندامک‌ها (کلروپلاست و میتوکندری) را ترنسفورم کند. از معایب این روش می‌توان به نرخ ترانسفورماسیون پایین و امکان ورود چندین قطعه اشاره کرد (۱۱).

یک مزیت مهم در ترانسفورماسیون پایدار ژنوم هسته‌ای، انتقال ژنوم تراریخته به نسل‌های بعدی است که دستیابی به هیبریدهای خالص را برای کاربرد در مقیاس بزرگ امکان پذیر می‌کند. از معایب اصلی ترانسفورماسیون هسته‌ای، سطح پایین بیان ژن است؛ در نتیجه سطح پروتئین نوترکیب اغلب بیش از ۱٪ از کل پروتئین یک سلول نیست و می‌تواند حتی با برخی فرایند های داخل سلولی کاهش بیشتری یابد. علاوه بر این، احتمال هیبریداسیون مستقل بین گیاهان تراریخته و گیاهان وحشی، باعث گسترش کنترل‌نشده تراریخته به محیط طبیعی می‌شود (۱۱).

یک جایگزینی برای ترنسفورماسیون هسته‌ای، ورود ژن تراریخته به ژنوم کلروپلاست است. هر سلول گیاهی ممکن است تقریباً حاوی ۱۰۰ پلاست باشد؛ هر پلاست شامل ۱۰۰ نسخه از DNA پلاستی است. به همین دلیل گیاهان ترانسپلاستومیک در بیان سطح بالای پروتئین نوترکیب متفاوت هستند که می‌تواند به سطحی بالای ۷۰ درصد پروتئین کل سلول برسد. کلروپلاست‌های گیاه فقط از طریق تبار مادر به فرزندان منتقل می‌شوند. به همین دلیل رشد گیاهان ترانسپلاستومیک می‌تواند تهدید گسترش کنترل نشده تراریخته را از بین ببرد. سنتز پروتئین هترولوگ در پلاست‌ها می‌تواند اثر سمی آن را روی سلول میزبان کاهش دهد. با این حال، مشکل اصلی این سیستم، عدم امکان هدایت پروتئین نوترکیب به سیستم ترشحی سلول و پس از آن، اجرای تغییرات پس از ترجمه است (۱۱).

تولید گیاهان ترانسپلاستومیک روشی پیچیده‌تر از ترانسفورماسیون آگروباکتریومی است. به طوریکه این روش فقط برای گیاه توتون توسعه یافته است، اگرچه ترانسفورماسیون موفقیت آمیز پلاستوم‌ها در گیاهان گوجه فرنگی، بادمجان، پنبه، سویا و کاهو نیز گزارش شده است (۱۱).

فناوری بیان گذرا با عدم درج ژن غیر خودی در ژنوم سلول میزبان و تولید موقت پروتئین نوترکیب آینده‌ی خوبی به همراه دارد. آگرواینفیلتراسیون روشی برای فرآوری بافت گیاه توسط آگروباکتریوم‌ها است که باعث انتقال ژن به تعداد زیادی از سلول‌ها، ایجاد نسخه‌های متعدد T-DNA و تولید مقدار زیادی از پروتئین نوترکیب می‌شود (۱۱).

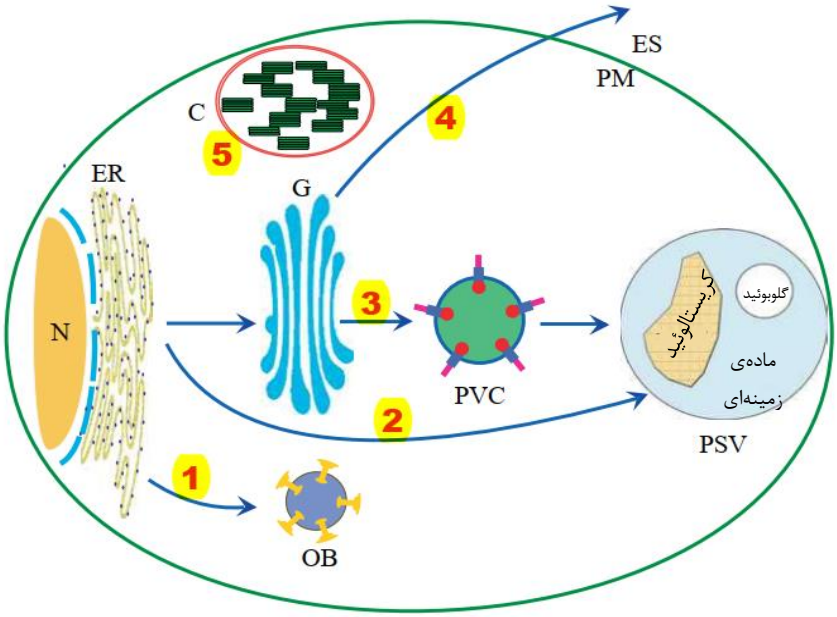
وکتورهای بیان گذرا هنگام تولید مثل جنسی در گیاهان به ارث نمی‌رسند بنابراین تهدید گسترش کنترل نشده تراریخته را از بین می‌برند. بیان گذرا برای استریل نگه داشتن شرایط به رشد گیاه در محیط‌های کنترل شده نیاز دارد. از معایب این روش مقدار ناکافی تولید پروتئین نوترکیب و ضرورت بهبود مداوم سیستم‌های وکتوری برای ترنسفورماسیون‌های بعدی است. بیان گذرا بدون نیاز به بازسازی کل گیاه ممکن‌است برای تولید سریع پروتئین‌های نوترکیب، مانند واکسن‌ها در مدت زمان محدودی اعمال شود (۱۱).

۸-۲-۲) سیستم‌های بیانی در راکتورهای زیستی گیاهی

در سلول گیاهی، پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در این راکتورهای زیستی، در معرض تقسیم و تجزیه هستند. با این وجود سیستم‌های بیانی متعددی در راکتورهای زیستی گیاهی گزارش شده است. واکوئل‌های ذخیره‌کننده‌ی پروتئین یا اجسام روغنی دانه، کشت‌های معلق سلولی، ترشحات ریشه و کلروپلاست‌ها از جمله این سیستم‌ها هستند.

مشکل اساسی راکتورهای زیستی گیاهی، بازده پایین تولید پروتئین‌های نوترکیب به دلیل وجود سیستم تجزیه‌کننده در گیاهان است. درنتیجه یکی از راه حل‌های ممکن برای این مشکل، بیان همزمان پروتئین هدف با بازدارنده‌ی پروتئاز (انزیم تجزیه کننده پروتئین ها) است که در این صورت این بازدارنده از تجزیه‌ی پروتئین جلوگیری می‌کند و منجر به افزایش تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخته می‌شود (۸).

شکل ۱۴، چند اندامک گیاهی را که در نگهداری پروتئین دارویی دخیل هستند، همراه با راهکارهای رهایی یا انتقال هدفمند آن‌ها را در راکتور زیستی گیاهی، نشان می‌دهد؛ برای مثال، پروتئین‌های نوترکیب بدون عبور از دستگاه گلژی و ایجاد تغییرات پیچیده‌ی قندی ویژه‌ی گیاهان، به واکوئل‌های ذخیره‌کننده‌ی پروتئین دانه(PSV[1]) می‌رسند (۸).



[1] Protein storage vacuole (PSV)

مسیر	اندامک ذخیره‌کننده	مکانیسم‌های هدف‌گیری
۱	جسم روغنی	اولئوسین[1]
۲	واکوئل ذخیره‌ی پروتئین	عبور نکردن از گلژی از طریق توالی‌های هدف ویژه (مثلا α-TIP)
۳	واکوئل ذخیره‌ی پروتئین	گیرنده بخش‌بندی واکوئلی[2]
۴	فضای خارج سلولی	انتهایN سیگنال پپتید پروتئین ترشحی از طریق مسیر پیش فرض
۵	کلروپلاست	پپتید انتقالی یا ترنسفورماسیون[3] اندامک

شکل ۱۴- سیستم راکتور زیستی گیاهی

تقسیم‌بندی پروتئین در راکتور زیستی سلول گیاهی. در شکل انواعی از اندامک‌های درون سلولی مختلف و فضاهای خارج سلولی(ES) که برای ذخیره‌ی پروتئین‌های بیانی نوترکیب در راکتور زیستی گیاهی به کار می‌روند، نشان داده شده است. پروتئین‌های نوترکیب بیان شده می‌توانند از طریق مسیرهای متفاوت انتقال وزیکولی برای تغییر و تقسیم‌بندی به مقصد نهایی برسند. پروتئین‌های نوترکیب بدون عبور از دستگاه گلژی و ایجاد تغییرات پیچیده‌ی قندی ویژه‌ی گیاهان، به واکوئل ذخیره‌ی پروتئین(PSV) منتقل می‌شوند. راهکارهای انتقال هدفمند در راکتورهای زیستی گیاهی. در شکل، پنج مکانیسم انتقال هدفمند قابل استفاده برای انتقال پروتئین‌های نوترکیب بیان شده به محل‌های ذخیره‌ی ویژه در راکتور زیستی گیاهی نشان داده شده است. ER (شبکه‌ی آندوپلاسمی)؛ G(دستگاه گلژی)؛ PSV(واکوئل ذخیره‌کننده‌ی پروتئین)؛ OB(جسم روغنی)؛ C(کلروپلاست)؛ N(هسته)؛ PM(غشاء پلاسمایی)؛ ES(فضای خارج سلولی)؛ PVC(بخش پیش واکوئلی).

بستر راکتور زیستی مبتنی بر دانه: دانه‌ها، محیط مناسبی برای ذخیره‌ی پروتئین‌های نوترکیب در راکتورهای زیستی گیاهی هستند، زیرا دانه‌های گیاهی میزان بالایی از تولید و انباشتگی پروتئین را طی نمو دانه در خود دارند. بیشتر پروتئین‌های محلول، در بخش ویژه‌ای به نام واکوئل ذخیره‌کننده‌ی پروتئین[4](PSV) یا جسم پروتئینی در دانه‌ها

[1] Oleosin
[2] Vacuolar sorting receptor
[3] Transformation
[4] Protein storage vacuole(PSV)

ذخیره می‌شوند تا در جوانه‌زنی دانه استفاده شوند. بنابراین راکتورهای زیستی دانه مزایای متعددی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارند:

۱- انباشت پایدار در حجم کم دانه،

۲- ذخیره‌ی طولانی‌مدت و آسان پروتئین که سبب جلوگیری از تجزیه‌شدن در دمای محیط می‌شود. برای مثال تحقیقات نشان داد، آنتی‌بادی‌های تولید شده در دانه‌ها به مدت حداقل پنج ماه در دمای اتاق فعالیت خود را از دست ندادند. بنابراین غلاتِ غنی از پروتئین، حبوبات دانه‌ای و دانه‌های روغنی بسترهای جذاب و مبتنی بر دانه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب هستند و آینده‌ای روشن در کشاورزی خواهند داشت. از میان غلات، اخیراً از ذرت به دلیل تولید بالای دانه و توانایی تولید درمقیاس وسیع، برای تولید سریع آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌های نوترکیب و واکسن‌ها استفاده شده است. از سایر گیاهان مانند حبوبات، دانه‌های نخودفرنگی و سویا که حدود ۴۰٪ حاوی پروتئین هستند برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، مانند آنتی‌بادی متشکل از قطعه‌ی Fv تک زنجیره[1] (در واقع قطعه ای از یک آنتی بادی نیست، بلکه یک پروتئین ترکیبی از نواحی متغیر زنجیره های سنگین (VH) و سبک (VL) ایمونوگلوبولین ها است که با یک پپتید پیوندی کوتاه از ده تا حدود ۲۵ اسید آمینه مرتبط است) و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (آنتی بادی است که از شبیه سازی یک گلبول سفید منحصر به فرد ساخته می شود. تمام آنتی بادی‌های بعدی که از این طریق به دست می‌آیند، به یک سلول والد منحصر به فرد بازمی‌گردند) انسانی ضد هرپس سیمپلکس۲[2] تحت کنترل پروموتر

[1] Single-chain Fv fragment antibody
[2] Anti-herpes simplex virus 2 monoclonal antibody

ویژه‌ی دانه استفاده شده‌اند. از طرف دیگر *آرابیدوپسیس تالیانا* نیز به دلیل ترنسفورماسیون ساده و زمان کوتاه تولید نسل، به عنوان مدلی برای بیان پروتئین‌های دارویی قبل از وارد کردن آن‌ها به محصولات گیاهی برای تولید در مقیاس وسیع مورد استفاده قرار گرفته است. آنزیم آلفا ال ایدورونیداز[1] نوعی آنزیم لیزوزومی انسانی است و در درمان اختلالات ذخیره‌ی لیزوزومی[2] کاربرد دارد که با موفقیت و با فعالیت آنزیمی بالا در دانه‌های *آرابیدوپسیس تالیانا* تولید شده است. علاوه بر این برای کنترل بیان پروتئین‌های نوترکیب در راکتور زیستی دانه، از پروموترهای مختلفی که ویژه‌ی دانه است مانند پروموتر گلوتلین Gt-1 [3] در برنج، گلوبولین-۱ در ذرت و پروموترهای ویژه‌ی الورن(پروتئین موجود در دانه‌ی گیاهان) از جو استفاده شده است که نتایج موفقیت آمیزی نیز به همراه داشته است (۸).

دانه‌ها سیستم‌هایی جذاب برای تولید صنعتی مولکول‌های دارویی و آنزیم‌های بالینی هستند. با این حال، بیان در دانه‌ها که محیط ذخیره‌ای هستند در سطوح پایین‌تر از سلول انجام شده و کارایی تغییرات پس از ترجمه از جمله عوامل متعدد اثرگذار برکاربرد نهایی و مؤثر دانه‌ها هستند. بهبود کارایی کشاورزی مولکولی در دانه‌ها، پیشرفت قابل توجهی در دهه‌های اخیر بوده است به طوری که دست‌ورزی مسیر انتقال پروتئینی و پروموترهای مخصوص دانه به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۸).

واکوئل ذخیره‌ی پروتئین دانه به عنوان راکتور زیستی: واکوئل‌های ذخیره‌ی پروتئین(PSV) بخش‌های عمده‌ی ذخیره‌ی پروتئین‌های نوترکیب در راکتورهای زیستی دانه هستند (شکل ۱۴).

[1] *alpha-L-iduronidase*
[2] Lysosomal storage disorder
[3] Glutelin promoter Gt-1

در بیشتر دانه‌ها PSV از نظر ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی به سه بخش تقسیم شده است: ماده‌ی زمینه‌ای، گلوبوئید و کریستالوئید. هر بخش از PSV خصوصیات ویژه و محیطی‌ای دارد که برای ذخیره‌ی پروتئین‌های نوترکیب مختلف مناسب است: ماده‌ی زمینه‌ای، مخزن اصلی ذخیره‌ی پروتئین‌های محلول است؛ گلوبوئید محیطی اسیدی حاوی کریستال‌های اگزالات[1] یا فیتیک اسید[2] است؛ و ساختار شبکه‌ی کریستالوئید احتمالاً از پروتئین‌های ذخیره تشکیل شده است. بنابراین آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ی دارویی را می‌توان به شکل هدفمند وارد بخش گلوبوئیدیPSV کرد که محیطی لیتیک برای تجمع پایدار آنزیم فراهم می‌کند؛ همچنین آنزیم را از پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود در دو بخش کریستالوئید و ماده‌ی زمینه‌ای جدا می‌کند که در این دو بخش نیز پایداری پروتئین و فعالیت آنزیمی می‌تواند حفظ شود (۸).

پروتئین‌های محلول، سیگنال‌های هدف مخصوصی دارند و به همین دلیل از طریق مسیرهای انتقالی ویژه به PSV دانه و زیرمجموعه‌های آن می‌رسند. بنابراین می‌توان با مسیرهای انتقالی متفاوت برای ایجاد تغییراتی به خصوص در پروتئین، از این سیگنال‌های هدف مخصوص برای انتقال هدفمند پروتئین‌های نوترکیب بیان شده به PSV و زیرمجموعه‌های آن استفاده کرد (۸).

[1] Oxalate crystals
[2] Phytic acid

برای مثال دومین تراغشایی(TMD)[1] و دم سیتوپلاسمیِ(CT)[2]در BP-80 می‌توانند ژن گزارشگری را از بخش پیش-واکوئلی(PVC) به گلوبوئیدِ PSV هدایت کنند در حالی که توالی‌های دومین تراغشایی BP-80 و دم سیتوپلاسمیِ پروتئین درونی آلفا تونوپلاست(TIP)[3] همان ژن گزارشگر را به بخش کریستالوئید PSV در دانه‌های تنباکوی تراریخته هدایت می‌کنند. مشابه آن AFVY، تعیین‌کننده‌ی طبقه‌بندی واکوئلی فازئولین، می‌تواند ژن گزارشگر یا پروتئین نوترکیب را به ماده‌ی زمینه‌ای PSV که از کریستالوئید و گلوبوئید مجزا شده، برساند (۸).

شکل ۱۵، مثال‌هایی از توالی‌های شناخته‌شده را نشان می‌دهد که می‌توان از آن‌ها برای رساندن پروتئین‌های نوترکیب به زیرمجموعه‌ی مشخصی از PSV در راکتور زیستی دانه استفاده کرد. درواقع زمانی که پروتئین نوترکیب محلول با لنگر سیگنالی PSV در دانه‌های تنباکو بیان شد، به مقدار زیاد و به صورت پایدار در PSV دانه تجمع می‌یابد (شکل ۱۶).

	ساختار اتصالی	مقصد مورد انتظار
(a)		کریستالوئید PSV
		گلوبوئید PSV
		ماده‌ی زمینه‌ای PSV
(b)		پروتئین نوترکیب
		دومین تراغشایی BP-80
		انتهای C ی TIP
		انتهای C ی BP-80

[1] Transmembrane domain(TMD)
[2] Cytoplasmic tail(CT)
[3] Alpha-tonoplast intrinsic protein (TIP)

	➤ سیگنال AFVY از فازئولین

شکل شماره ۱۵- لنگرهای غشایی برای هدف‌گیری به سمت PSV در راکتورهای زیستی دانه. در شکل، توالی‌های متفاوت پروتئینی ویژه‌ی گیاهان نمایش داده شده است که می‌توان از آن‌ها به عنوان لنگرهایی برای انتقال هدفمند پروتئین‌های نوترکیب به زیرمجموعه‌ی مشخصی از PSV برای تجمع در راکتور زیستی دانه استفاده کرد.

شکل شماره ۱۶- تجمع پایدار پروتئین‌های نوترکیب در واکوئل‌های ذخیره‌کننده‌ی پروتئین(PSVs) در دانه‌های تنباکوی تراریخته. دانه‌های بالغ گیاهان تنباکوی تراریخته در حال بیان پروتئین نوترکیب، تثبیت‌شـــده و با آنتی‌بادی‌های ویژه رنگ‌آمیزی شدند و به دنبال آن با استفاده از آنتی‌بادی‌های ثانویه‌ی متصل به رودامین و با میکروسکوپ کانفوکال، ردیابی شدند. سیگنال‌های قرمز نشان‌دهنده‌ی پروتئین‌های نوترکیب بیان شده هستند در حالی که مورفولوژی PSVهای دانه (که با پیکان مشخص شده‌اند) در DIC (تصویرتفاضلی تداخل کنتراست) نشان داده شده است.

نوار مقیاس=µm ۱۰

جسم روغنی دانه به عنوان راکتور زیستی: علاوه بر PSV دانه، جسم روغنی دانه(OB)[1] نیز به دلیل ذخیره‌ی مقدار زیادی از ماکرومولکول‌ها، می‌تواند به عنوان راکتور زیستی عمل کند. در دانه‌های گیاهان، پروتئین خاصی به نام اولئوسین، OBها را احاطه کرده است. اولئوسین با تراکم بالا در حفظ ساختار منسجم OBها نقش دارد همچنین سیگنال‌هایی جهت شناسایی و اتصال لیپاز حین تجمع روغن در جوانه بذری[2] را فراهم می‌کند. اولئوسین‌ها پروتئین-های آبگریزی با جرم ۱۵-۲۶کیلودالتون هستند و مقدار زیادی از آن‌ها در OBها وجود دارد. اندازه‌ی کوچک اولئوسین

[1] Seed oil body (OB)
[2] Seedlings

باعث شده است که حامل ایده‌آلی برای تولید پروتئین غیرخودی در راکتور زیستی گیاهی باشند. با توجه به خاصیت اولئوسین برای قرار گرفتن در جسم روغنی دانه هر پروتئین دیگری که توالی اولئوسین را به همراه خود داشته باشد با موفقیت به جسم روغنی دانه هدایت شده و در آنجا ذخیره می گردد که این ویژگی را می توان برای هدایت انواع پروتئین های بیان شده توسط گیاه به داخل ساختار جسم روغنی دانه استفاده کرد. برای مثال وقتی که بتا گلوکورونیداز[1] و یک پروتئین اتصال‌دهنده(فیوژن پروتئین)[2] حاوی اولئوسین در گیاهان تراریخته بیان شده باشد، با موفقیت و به صورت هدفمند وارد OBهای دانه شده و به صورت پایدار در آن تجمع می‌یابد (۸).

استفاده از OBها به عنوان اندامک‌های ذخیره‌کننده در راکتورهای زیستی گیاهی، مزایای متعددی دارد؛ اول این که OBها در بافت‌های متفاوتی از جمله دانه‌ها، دانه‌ی گرده و میوه‌ها وجود دارند اما به طور ویژه دانه‌های روغنی سرشار از OBها هستند. دوم این که به خاطر وجود میزان بالایی از تری آسیل گلیسیریدها در OBها، می‌توان با استفاده از روش سانتریفیوژ شناور در فرایندهای پایین دستی، OBها را از سایر بخش‌های سلولی جدا کرد و پروتئین‌های نوترکیب را به راحتی از طریق اتصال با اولئوسین‌ها از سیستم‌های OB تخلیص کرد. بنابراین پس از سانتریفیوژ دانه‌های روغنی، OBهای حاوی پروتئین‌های متصل به اولئوسین می‌توانند به میزان زیادی در بخش بالایی متمرکز شوند که بازیابی پروتئین و خالص‌سازی بیشتر را آسان می‌کند (۸).

[1] β-glucuronidase
[2] Fusion protein

هیرودین[1] با استفاده از این سیستم با موفقیت در دانه‌های کلزا (*براسیکا ناپوس*)[2] و خردل (*براسیکا کاریناتا*)[3] بیان و خالص‌سازی شده است. هیرودین یک پروتئین دارویی است که معمولاً به عنوان ضدانعقاد خون برای جلوگیری از ترومبوز استفاده می‌شود. هیرودین‌های مشتق‌شده از OBها، پایداری بالایی نشان داده‌اند به طوری که حتی پس از دو سال ذخیره در دانه هیچگونه تجزیه‌ی پروتئین اتصالی در آن‌ها مشاهده نشده است. ۴۵-۴۰٪ وزن خشک در دانه‌ی کلزا مربوط به تری آسیل گلیسیریدها است، درحالی که اولئوسین ۱۰-۸٪ کل پروتئین‌های دانه را شامل می‌شود(۲/۰-۱/۶درصد وزن خشک دانه)، به همین دلیلOBها بستر ایده‌آلی برای راکتورهای زیستی هستند (۸).

راکتور زیستی OB، سیستم بی عیبی نیست. برای مثال ممکن است پروتئین اتصالی به طور کامل از OBهای تجزیه شده آزاد نشود و سبب کاهش تولید پروتئین شود. علاوه بر آن، قطعاتی از پروتئین‌های نوترکیب از جمله هیرودین نیز در آن‌ها مشاهده شده است که پیچیدگی فرآیندهای پایین دستی در تولید پروتئین‌های نوترکیب را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، هزینه تجزیه اولئوسین از پروتئین نوترکیب، علی‌رغم موفقیت‌های اخیر در استفاده از پروتئازهای تثبیت‌شده، یکی دیگر از نگرانی‌های کاربرد تجاری در فناوری تقسیم اولئوسین است (۸).

[1] Hirudin
[2] *Brassica napus*
[3] *Brassica carinata*

استراتژی ترشح در راکتورهای زیستی گیاهی: گیاهان و دانه‌های تراریخته به عنوان راکتورهای زیستی ممکن است معایبی هم داشته باشند. خطر آلودگی محیط‌های کشت، هزینه بالای فرآیندهای پایین دستی و خالص‌سازی پروتئین-های نوترکیب از جمله این معایب هستند. اخیراً بسترهای ترشحی با استفاده از سلول‌های کشت معلق و سیستم‌های ریشه‌ای برای انتقال هدفمند مولکول‌های دارویی به داخل محیط کشت و فراهم کردن سیستمی اقتصادی و کارآمد برای خالص‌سازی پروتئین در فرآیندهای پایین‌دستی ابداع شده‌اند (۸).

بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از کشت‌های معلق گیاهی: سلول‌های کشت معلق گیاهی، سیستم سریعی برای تولید متابولیت‌های ثانویه، پروتئین‌های نوترکیب زیست‌فعال و آنتی‌بادی‌ها فراهم کرده‌اند. پروتئین‌های نوترکیب بیان شده می‌توانند از طریق مسیر پیش‌فرض در سلول‌های کشت معلق گیاهی به اندامک‌ها منتقل یا به فضای خارج سلولی ترشح شوند. روش ترشحی، راهکار مقرون به صرفه‌تری برای تجمع پایدار و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب ترشحی است. علاوه بر این، کشت‌های معلق همچنین بسترهای غربال‌گری‌ای در راکتورهای زیستی دانه فراهم می‌کند که برای آزمایش پروتئین‌های نوترکیب متعدد پیش از بیان بیشتر آن‌ها در گیاهان تراریخته استفاده می‌شود (۸).

دیواره‌ی سلول‌های گیاهی قبلاً به عنوان مانعی قابل توجه برای ترشح پروتئین‌هایی با اندازه‌ی بزرگتر از ۳۰ کیلودالتون توصیف شد. مشخص شده است که پروتئین اریتروپویتین انسانی وقتی در سلول‌های BY-2 تنباکوی تراریخته بیان شد، در ترشح به درون محیط کشت عملکرد مناسبی نداشتند. با این وجود مطالعات اخیر نشان داده است که یک

پروتئین لیزوزومی ۸۰ کیلودالتونی انسانی تحت کنترل پروموتر همواره فعال[1] 35S CaMV و یک سیگنال‌پپتید از پروتئین گیاهی می‌تواند با موفقیت بیان شده و به درون محیط کشت سلول‌های BY-2 تنباکوی تراریخته ترشح شود. این پروتئین‌های ترشح شده در انتهای N، گلیکوزیله هستند و فعالیت آنزیمی بسیار بالایی دارند که این نتیجه نشان می‌دهد آنزیم‌های لیزوزومی انسانی مشتق از سلول‌های BY-2 به درستی، تا (فولد) شده‌اند (۸).

پروتئین نوترکیب بیان شده در کشت معلق گیاهی حین انتقال به جسم گلژی ممکن است دچار تغییرات قندی پیچیده‌ای شود که شدیداً برای انسان ایمنی‌زا است. استراتژی‌های متعددی برای حل این مشکل در یک راکتور زیستی گیاهی مطرح شده است. جلوگیری از آنزیم‌های گلیکوزیل ترنسفراز گلژی گیاه، بیان گلیکوزیل ترنسفرازهای پستانداران و دست‌ورزی مسیر انتقال وزیکولی بدون عبور از گلژی از جمله این راه حل‌ها هستند (۸).

بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از سیستم ریشه‌ی مویین: سیستم ریشه‌ی مویین با آلوده شدن به باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز*[2] ایجاد می‌شود که یکی از عمده سیستم‌های بالغ است که در بافت گیاهی برای تولید زیست داروها استفاده می‌شود. رشد سریع، پایداری طولانی مدت ژنتیکی و بیوسنتزی، ویژگی‌هایی هستند که سیستم "ریشه‌ی مویین" را به یک سیستم راکتور زیستی فوق العاده تبدیل کرده‌است. ریشه‌ی مویین می‌تواند همان ترکیباتی که در ریشه‌های سالم گیاهان تراریخته تولید می‌شوند را بسازد. داروهای زیستی متعددی با استفاده از سیستم ریشه‌ی مویین با

[1] Constitutive promoter
[2] *Agrobacterium rhizogenes*

موفقیت تولید شده‌اند به طوری که در کشت ریشه‌ی مویین گیاه بذرالبنج[1] تولید اسکوپولامین (هیوسین)، ۱۰۰ برابر افزایش یافته است. علاوه بر این سیستم ترشحی ریشه‌ی مویین به نام "rhizosecretion" همچنین سیستم ساده شده‌ای برای جداسازی پروتئین‌های نوترکیب از محیط هیدروپونیک (نوعی کشت و زیرمجموعه ای از آبکاری است که شامل رشد گیاهان، معمولاً محصولات زراعی، بدون خاک، با استفاده از محلول های مغذی معدنی مبتنی بر آب در حلال های آبی است) ساده ارائه می‌دهد که در آن می‌توان پروتئین‌های نوترکیب را در طول زندگی گیاه تراریخته، به طور مداوم جمع آوری کرد. مشکل معمول در سیستم ریشه‌ی مویین خاموش کردن ژنهای تراریخت است و بنابراین مانع اصلی در برابر کاربرد تجاری آن محسوب می‌شود (۸).

کلروپلاست به عنوان راکتور زیستی: کلروپلاست‌ها اندامک‌هایی عمومی در سلول‌های گیاهی و جلبک‌های یوکاریوتی هستند. از زمان اثبات سیستم ترنسفورماسیون کلروپلاست در سال ۱۹۹۰، کلروپلاست‌ها به عنوان اندامک‌هایی ایده‌آل برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در نظر گرفته شده‌اند (۸).

دو روش متفاوت برای تولید و هدف‌گیری پروتئین‌های هترولوگ در کلروپلاست مورد آزمایش قرار گرفته است. یک استراتژی این است که ژن خارجی به صورت پایدار درون کروموزوم هسته‌ای وارد شود و سپس پروتئین‌های بیان شده از طریق پپتید انتقالی(سیگنال انتقال هدفمند به کلروپلاست) به درون کلروپلاست هدف گیری شود. رویکرد دیگر، بیان ترانس پلاستومیک، هدف‌گیری مستقیم و بیان ژن‌ها درون ژنوم کلروپلاست است. این نوع بیان رایج‌ترین

[1] *Hyoscyamus muticus L.*

و موفقیت‌آمیزترین روش برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از راکتور زیستی کلروپلاستی است. در این راکتور زیستی بسیاری از پروتئین‌های زیست‌دارویی مشتق از کلروپلاست شامل انسولین، اینترفرون و سوماتوتروپین ارزیابی شده‌اند (۸).

کشاورزی مولکولی پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از راکتورهای زیستی کلروپلاستی مزایای مختلفی دارد:

۱- بیان سطح بالایی از پروتئین؛

۲- پایداری بالای پروتئین؛

۳- دست‌ورزی ساده؛

۴- وجود تعداد زیادی کلروپلاست در برگ‌های سبز.

پس از ترنسفورماسیون کلروپلاست با تعداد زیادی از ژن هدف که به صورت پایدار داخل ژنوم کلروپلاست وارد شده است، گیاهان تراریخته می‌توانند پروتئین‌های نوترکیب را تا ۴۶٪ کل پروتئین‌های برگ انباشته کنند. حتی زمانی که انباشت نسخه‌های رونویسی در کلروپلاست ۱۶۹ بار نسبت به هسته بیشتر است، تقریباً هیچگونه خاموشی ژنی در راکتورهای زیستی کلروپلاستی مشاهده نشده است و این مزیت به دلیل سازمان‌دهی پروکاریوتی ژنوم کلروپلاست است. علاوه بر این ژنوم کلروپلاست را به دلیل اندازه‌ی کوچک می‌توان به دقت دست‌ورزی کرد. ژن‌های خارجی می‌توانند با استفاده از توالی DNA مشتق از ژنوم کلروپلاست، با نوترکیبی هومولوگ در محل‌های مشخصی وارد ژنوم کلروپلاست شده و با آن ترکیب شوند. همچنین با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک در هر بار ترنسفورماسیون،

بیان هم‌زمان چندین ژن امکان‌پذیر است. پس از رونویسی نیز پروتئین‌های بیگانه می‌توانند به درستی تا[1](فولد) بخورند (۸).

کاربرد راکتورهای زیستی کلروپلاستی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب قبلاً محدود به انواع مشخصی از بافت‌ها و گونه‌ها بوده است. با این حال پیشرفت بزرگی برای غلبه بر محدودیت‌های ترنسفورماسیون کلروپلاست انجام شده است بنابراین راکتور زیستی کلروپلاستی در محصولاتی مهم نظیر سویا، هویج، کاهو، برنج و دانه‌ی روغنی گسترش یافته است. راکتور زیستی کلروپلاستی از لحاظ ایمنی، خطر زیست محیطی کمتر و آلودگی کمتری برای زنجیره‌ی غذایی خواهد داشت؛ زیرا در اکثر گیاهان نهان‌دانه، ژن‌های کلروپلاست از طریق جنس ماده به ارث می‌رسند و گیاهان تراریخته که از ترنسفورماسیون کلروپلاست حاصل می‌شوند، با دانه‌ی گرده بارور نشده‌اند (۸).

۸-۲-۳) بیان همزمان بازدارنده‌های پروتئیناز در راکتورهای زیستی گیاهی

یکی از موانع اصلی در راکتورهای زیستی گیاهی، بازده پایین تولید پروتئین‌های نوترکیب است که احتمالاً به دلیل تجزیه‌ی پروتئین در سلول‌های گیاهی تراریخته رخ می‌دهد. بنابراین یکی از رویکردهای بالقوه برای بهبود تولید پروتئین‌های نوترکیب، کاهش فعالیت پروتئازی در گیاهان تراریخته است. می‌توان به طور مستقیم، بازدارنده‌های

[1] Fold

پروتئیناز(PIs[1]) را به گیاهان تراریخته، کشت‌ها یا به بافرهای استخراج پروتئین برای جلوگیری از تجزیه‌ی پروتئین اضافه کرد (۸).

با این که PIهای خارجی به شکل طبیعی یا مصنوعی می‌توانند در برابر پروتئازهای خارج سلولی باعث ایجاد حفاظت شوند اما هزینه‌ی تولید را بالا می‌برند؛ زیرا برای حذف این مواد، مراحل خالص‌سازی بیشتری نیاز است. به علاوه، PIهای خارجی کارایی پایینی در حفاظت از پروتئین‌های نوترکیب در برابر پروتئازهای درون‌سلولی دارند که مسئول تجزیه‌ی پروتئین‌های نوترکیب داخل سلول‌های گیاهی هستند (۸).

سه تکنیک در مهندسی ژنتیک برای کاهش تجزیه‌ی پروتئینی پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های گیاهی انجام می‌شود:

۱- حذف یا جایگزینی نواحی پروتئولیتیک از پروتئین‌های نوترکیب؛

۲- خاموش کردن ژن‌های بیان‌کننده‌ی پروتئازهای اصلی در سلول گیاهی؛

۳- جلوگیری از فعالیت پروتئولیتیک با بیان همزمان PIها.

در اولین تکنیک، جست و جو برای توالی‌های اسیدمینه‌ای ویژه که سبب برش پروتئینی می‌شوند نیاز است. در حالی که تغییر توالی پروتئین نوترکیب ممکن است سبب اثرات جانبی روی پروتئین نوترکیب شود. این توالی‌ها در بیشتر پروتئازهای گیاهی شناخته شده نیستند. کمتر شدن نیمه عمر، از دست رفتن فعالیت زیستی و پاسخ‌های آنتی‌ژنی

[1] Proteinase inhibitors

زمانی که به عنوان زیست‌دارو مصرف می‌شوند (برانگیختن پاسخ ایمنی) از جمله این اثرات نامطلوب است. درتکنیک دوم، شناسایی پروتئازهای ویژه‌ای که مسئول تجزیه‌ی پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های گیاهی هستند، مورد نیاز است. این استراتژی قابل اتکا است زیرا سویه‌های فاقد پروتئاز *ای‌کلای*[1] و مخمر کاربردهای موفقیت‌آمیزی داشته‌اند. با توجه به این حقیقت که رهایش پروتئازها در تمام مراحل تکوین گیاه انجام می‌شود و مکانیسم‌های برهم‌کنش بین پروتئازها و PIها کاملاً شناسایی شده است، سومین رویکرد یعنی بیان هم‌زمان PIها و پروتئازها در گیاه تراریخته برای حل مشکل تجزیه‌ی پروتئین نوترکیب در راکتورهای زیستی گیاهی، روشی عملیاتی‌تر خواهد بود (۸).

انتخاب PI خاصی که بتواند از تجزیه‌ی پروتئین‌های نوترکیب جلوگیری کند و در عین حال رشد طبیعی گیاه یا رشد سلول گیاهی را تحت تأثیر قرار ندهد قابل اهمیت است؛ چون برخی پروتئینازهای داخلی نقش مهمی در تنظیم تکوین و رشد گیاه دارند (۸).

جدول ۳، عوامل مختلفی که ممکن است روی کاربرد سیستم‌های راکتورهای زیستی گیاهی گوناگون در تولید صنعتی داروها اثر بگذارند را خلاصه کرده است. براساس تحقیقاتی که تا کنون انجام شده است، به احتمال زیاد یک نوع سیستم بیانی در راکتورهای زیستی گیاهی برای تولید همه‌ی داروها مناسب نیست و هر سیستم احتمالاً برای تولید چند پروتئین نوترکیب یا حتی برای تولید یک پروتئین نوترکیب مناسب است. علاوه بر این، تفاوت فیزیولوژیکی بافت‌ها یا گیاهان مختلف سبب پیچیدگی کاربرد عمومی یک سیستم بیانی شده است. با این وجود، بررسی مورد به

[1] *E.coli*

مورد و اثبات کاربرد راکتورهای زیستی گیاهی برای تولید موفقیت آمیز پروتئین‌های نوترکیب یا محصولات دارویی در بیوتکنولوژی گیاهی ضروری است (۸).

عوامل	دانه	سلول گیاهی در کشت معلق	سیستم ریشه‌ی موئین	جسم روغنی	کلروپلاست
هزینه کلی	پایین	بالا	بالا	پایین	پایین
زمان تولید	طولانی	کوتاه	کوتاه	طولانی	میانه
سختی خالص سازی	میانه	پایین	پایین	میانه	میانه
پایداری محصول	بالا	پایین	پایین	بالا	میانه
سختی ذخیره‌سازی	خشک-شده/پوشیده	سرد	سرد	خشک-شده/پوشیده	شدیداً خشک شده/فریزشده
هزینه ذخیره‌سازی	پایین	بالا	بالا	پایین	بالا
هزینه حمل	پایین	میانه	میانه	پایین	میانه
ظرفیت تولید درمقیاس وسیع	خیلی بالا	متوسط	بالا	خیلی بالا	خیلی بالا

جدول ۳- مقایسه سیستم‌های مختلف بیوراکتورهای گیاهی.

۸-۲-۴) پروتئین‌های نوترکیب تولیدی در بیوراکتورهای گیاهی

اولین پروتئین تولید شده در بیوراکتورهای گیاهی، هورمون رشد انسانی بود. آلبومین سرم انسانی در سال ۱۹۹۰ در گیاهان توتون و سیب زمینی سنتز شد. بسیاری از پروتئین‌های ارزشمند در انسان و حیوانات از گیاهان به دست آمدند. این پروتئین‌ها را می‌توان اینگونه تقسیم کرد: پروتئین‌های ساختاری و انتقالی، آنزیم‌ها، مهارکننده‌ها، هورمون‌ها، سیتوکین‌ها، آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن‌ها و طیف وسیعی از پروتئین‌های دیگر (۱۱).

پروتئین‌های ساختاری و انتقالی: علاوه بر آلبومین، طیفی از پروتئین‌های ساختاری دیگر نیز در گیاهان سنتز شد. در سال ۱۹۹۷ ذرت تراریخته‌ای سنتز شد که در دانه‌های آن آویدین نوترکیب حاوی گلیکوپروتئین اتصالی بیوتین

ذخیره می شد. آویدین به عنوان یک ماده تجاری در مجموعه‌های تشخیصی برای تشخیص بیوتینیلاسیون[1] پروتئین‌ها و DNA استفاده می‌شود. کلاژن و الاستین در گیاهان توتون سنتز شدند. از این گیاهان برای بدست آوردن پروتئین‌های شیر، کازئین و لاکت آلبومین استفاده می‌شود. از جمله پروتئین‌های انتقالی تولیدشده در گیاهان می توان به هموگلوبین، آپولیپوپروتئین و لاکتوفرین اشاره کرد (۱۱).

آنزیم‌ها و مهارکننده‌ها: موفقیت چشمگیری در ایجاد بیوراکتورهای گیاهی برای تولید آنزیم‌های نوترکیب حاصل شده است. لیزوزیم، تریپسین، فاکتور داخلی در انسان (فاکتور Castle) که ویتامین B12 را فعال می‌کند، به ترتیب در برنج و ذرت و آرابیدوپسیس سنتز می‌شوند. β-گالاکتوزیداز، β-گلوکورونیداز، پراکسیداز، لاکاز، سلولز، زیلاناز و سایر آنزیم‌های لیزکننده دیواره سلول‌های گیاهی در تعدادی از گیاهان تولید می‌شوند. از این آنزیم‌ها برای تخریب سلولز در طی تولید بیواتانول استفاده می‌شود. β-گلوکورونیداز به طور گسترده‌ای برای اهداف تشخیصی استفاده می‌شود. تولید گلوکوسربروزیداز (تالیگلوسراز α) از اهیمت بالایی برخوردار است؛ زیرا نقص در رمزگذاری این آنزیم در بدن انسان باعث یک بیماری ارثی شدید، گلوکوزیل سرامید لیپیدوز (نوع ۱ بیماری گوشر) می‌شود. ژن‌های هترولوگ رمزگذار مهارکننده‌های تریپسین (α1-آنتی تریپسین و آپروتینین) و ترومبین (هیرودین)، همچنین می‌توانند در گیاهان تراریخته بیان شوند (۱۱).

[1] اتصال بیوتین به پروتئین

پروتئین‌های تنظیم‌کننده: علاوه بر سوماتوتروپین، پروتئین‌های انکفالین‌ها، فاکتور رشد اپیدرمی، کالمودولین و فاکتور رشد شبه انسولین، در گیاهان توتون تولید شدند. گیاهان تراریخته *آرابیدوپسیس*، که بذر آن‌ها می‌تواند انسولین نوترکیب را در خود انباشته کنند، نیز تولید شده‌است. سیتوکین‌ها گروهی از اجزای مهم سیستم ایمنی بدن و واسطه‌های پروتئینی هستند که در تنظیم تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی نقش دارند. علاوه بر این، آن‌ها در جنین‌زایی نیز نقش دارند و می‌توانند بر سیستم عصبی و اندام‌های خون‌ساز تأثیر بگذارند (۱۱).

اریتروپوئتین، یک سیتوکین گلیکوزیله شده است که از اولین سیتوکین‌های نوترکیب تولیدشده در سلول‌های گیاه توتون بود. بیوراکتورهای گیاهی برای اریتروپوئتین با استفاده از توتون و گیاهان *آرابیدوپسیس* بدست آمد. علاوه بر اریتروپوئتین، بیوراکتورهای تولیدکننده انواع سیتوکین‌های انسانی و حیوانی، فاکتورهای محرک کلنی، فاکتورهای نکروز تومور، فاکتورهای رشد فیبروبلاست، اینترفرون‌ها و اینترلوکین‌ها در توتون، گوجه فرنگی، سیب زمینی، آرابیدوپسیس، کاهو، برنج، نیشکر و آلوئه ورا ایجاد شد (۱۱).

سیتوکین‌های نوترکیب برای پیشگیری و درمان نقص ایمنی، کم خونی، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی حاد و مزمن و سرطان استفاده می‌شوند. استفاده از سیتوکین‌ها، یک روش امیدبخش برای بهبود پاسخ ایمنی به واکسن‌ها محسوب می‌شود. گیاهان سنتزکننده پروتئین‌های تنظیم‌کننده (هورمون‌ها و سیتوکین‌ها) نیز ممکن است به طور مستقیم در غذای انسان و خوراک دام مورد استفاده قرار گیرند که احتمالاً مشابه واکسن‌های خوراکی گیاهی هستند (۱۱).

آنتی‌بادی‌ها (ایمونوگلوبولین‌ها): نقش اصلی آنتی‌بادی‌ها در ایمنی هومورال است. ایمونوگلوبولین‌های معمولی تترامرهایی هستند که هر کدام از دو زنجیره سنگین یکسان و دو زنجیره سبک یکسان تشکیل شده‌اند. علاوه بر این، برخی از اشکال پیچیده‌تر نیز در دسترس هستند؛ مثل آنتی‌بادی‌های ترشحی و ترکیب دو زنجیره پلی پپتیدی اضافی. همه آنتی‌بادی‌ها گلیکوزیله هستند. بیان آنتی‌بادی غیر خودی برای اولین بار در گیاه توتون انجام شد که نشان داد گیاهان می‌توانند پپتیدهای ساده هترولوگ را سنتز کرده و گلیکوپروتئین‌های عملکردی پیچیده متشکل از چندین زیر واحد را بسازند (۱۱).

توتون، *آرابیدوپسیس*، نخود، سویا، یونجه، برنج و گندم به عنوان بستری برای سنتز آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شوند. آنتی‌بادی‌ها در سیتوپلاسم سلول بیوراکتور گیاهی ناپایدار هستند. بنابراین آن‌ها باید برای مسیر ترشحی یا محفظه‌های داخل سلولی مورد هدف قرار گیرند. آنتی‌بادی‌های نوترکیبی که توسط گیاهان سنتز می‌شوند، پلنتی‌بادی(آنتی‌بادی گیاهی) نامیده می‌شوند. ممکن است از آنتی‌بادی‌های مشابه به عنوان داروهای پزشکی یا عوامل تشخیصی استفاده شود. گیاهان می‌توانند از آنتی‌بادی‌های گیاهی برای القا خودایمنی در برابر عوامل بیماری‌زا و طیف وسیعی از توکسین‌ها، از جمله علف‌کش‌ها استفاده کنند. یکی از اولین محصولات مبتنی بر گیاه توتون تراریخته، که در اتحادیه اروپا به عنوان دارو مورد تأیید قرار گرفت، CaroRx است که بیان کننده‌ی آنتی‌بادی‌های ترشحی IgA

علیه باکتری *استرپتوکوکس موتانس*[1]، عامل اصلی پوسیدگی دندان است. به نظر می‌رسد این آنتی‌بادی‌ها بسیار موثر بوده و می‌توانند مانع از عفونت مجدد در طی یک دوره دو ساله شوند (۱۱).

آنتی‌ژن‌ها (واکسن‌های گیاهی): در حال حاضر، مفهوم بیوسنتز آنتی‌ژن‌های نوترکیب برای عوامل بیماری‌زای مختلف در داخل گیاهان و ایجاد واکسن‌های گیاهی با استفاده از همان گیاهان که از دانه‌ها، برگ‌ها یا ریشه‌های آن‌ها می توان در غذا استفاده کرد، به شدت توسعه یافته‌است. استفاده از واکسن‌های خوراکی، جداسازی و خالص سازی آنتی‌ژن را که برای ایجاد واکسن‌های تزریقی لازم است و در عین حال گران قیمت است، حذف می‌کند (۱۱).

در سال ۱۹۹۲ گیاه توتون تراریخته، ژن آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) را بیان کرد. پس از آن، گیاهان سیب زمینی و کشت‌های معلق از سلول‌های توتون و سویا، که در آن‌ها مقدار آنتی‌ژن به ۱,۷ میلی گرم در هر گرم وزن خشک رسید، تولید شدند. HBsAg استخراج شده از برگ‌های توتون می‌تواند پاسخ ایمنی را در موش‌ها ایجاد کند. علاوه بر این، این آنتی‌ژن‌های ساخته شده توسط سیب زمینی بیش از آنتی‌ژن تولید شده توسط مخمرها ایمنی ایجاد کرد (۱۱).

آزمایش‌های مربوط به واکسن خوراکی ویروس هپاتیت B تولید شده در گیاه سیب زمینی تراریخته برای بررسی ایمنی‌زایی روی داوطلبان انجام شد. در حال حاضر، گیاهان تراریخته می‌توانند بیش از پنجاه آنتی‌ژن مختلف از عوامل بیماری‌زای انسانی و حیوانی را که باعث بیماری‌هایی از جمله اسهال باکتریایی و ویروسی، سیاه زخم، هاری، پاپیلوما،

[1] *Streptococcus mutans*

سرخک، ایدز، دیفتری، سیاه سرفه، کزاز، سل، بیماری آلزایمر، مالاریا، ورم معده و روده، تب خونریزی دهنده، عفونت پاروویروس سگ و آنفلوانزای مرغی می‌شود، در بیوراکتورهای گیاهی مبتنی بر کلزا، *آرابیدوپسیس*، تنباکو، سیب زمینی، گوجه فرنگی، یونجه، لوپین، هویج، کاهو، اسفناج، موز و گیاهان ذرت تولید می‌کنند (۱۱).

در سال ۲۰۱۰، بیش از ده واکسن گیاهی در مراحل کارآزمایی پیش‌بالینی و بالینی قرار داشتند که به زودی وارد بازار داروسازی خواهند شد. از میان آن‌ها واکسن‌های گیاهی توتون، علیه پوسیدگی دندان (شرکت Plant Biotechnology) و بیماری ناشی از ویروس نیوکاسل (شرکت Dow AgroScience) به ترتیب در اتحادیه اروپا و ایالات متحده آمریکا تأییدیه گرفته‌اند. به علاوه واکسن گیاهی توتون علیه بیماری هپاتیت B ساخت شرکت کوبایی CIGB وارد بازار شده است. همچنین واکسن گیاهی سیب‌زمینی علیه هپاتیت B مربوط به دانشگاه آریزونا در فاز ۲ بالینی قرار داشته است (۱۱).

۸-۳) رویکردهای بیان کارآمد در سیستم‌های گیاهی

یکی از مشکلات اساسی در بیوراکتورهای گیاهی، سطح نسبتاً پایین پروتئین نوترکیب تولیدشده است که اغلب از ۱٪ پروتئین‌های محلول داخل سلول فراتر نمی‌رود. تولید پروتئین هترولوگ به کارایی رونویسی، ترجمه، پردازش صحیح و مقاومت پروتئین سنتزشده در برابر پروتئولیز بستگی دارد. سطح بیان ژن هترولوگ بستگی به منطقه کروماتین هسته‌ای دارد که در آن قرار گرفته است (۱۱).

بسیاری از مطالعات و آزمایش‌ها در ترانسفورماسیون نشان داده‌است که میزان ورود قطعه ژن به ناحیه یوکروماتین، به طور قابل توجهی بالاتر از ورود به ناحیه هتروکروماتین است. با این حال، یک مشکل دیگر خاموش‌کردن ژن ورودی است که احتمال آن با افزایش تعداد نسخه‌های واردشده، افزایش می‌یابد. میزان بیان بالای پروتئین هترولوگ منجر به سمیت سلولی و لذا فعال شدن سیستم پروتئولیز گیاه می‌شود. اتصال نادرست و سیستم گلیکوزیلاسیون معمول برای گیاهان ممکن است باعث فعالیت‌های زیستی کم پروتئین‌های هترولوگ و واکنش‌های آلرژیک شود. تعدادی روش مختلف برای حل مشکلات ذکرشده، توسعه یافته‌است (۱۱).

یکی از روش‌های افزایش سطح بیان ژن ورودی، استفاده از پروموترهای ویژه یک نوع بافت است. این پروموترها می‌توانند باعث تجمع پروتئین‌های نوترکیب در بافت‌های خاص و در مراحل خاص رشد شوند و فرصت سنتز محصولات تراریخته در اندام‌های گیاهی مانند بذرها، میوه‌ها، برگ‌ها و اندام‌های ذخیره (مثل غده‌ها، ریزوم‌ها و پیازها) فراهم می‌کنند. سنتز پروتئین هدایت‌شده به اندام‌های خاص، اثرات منفی آن را بر رشد گیاه و بهره‌وری در بافت‌های دیگر کاهش می‌دهد (۱۱).

۸-۴) کاربرد γ-اینترفرون در پزشکی و دامپزشکی

یکی از مهمترین داروها که در زمینه پزشکی و دامپزشکی مصارف زیادی دارد و در بیوراکتورهای گیاهی تولید می‌شود، گاما اینترفرون است. فعالیت‌های بهداشتی و دامپزشکی پیچیده‌ای به منظور سلامت دام و حمایت از بهره‌وری، در تولیدات دام صنعتی مدرن انجام می‌شود. محققان، جستجوی راه‌های کاهش شیوع بیماری‌ها و همچنین

بهبود بهره‌وری از دام و کیفیت محصولشان را با حل مشکل نقص ایمنی در حیوانات پرورش یافته مرتبط می‌دانند. نقص ایمنی یکی از اصلی‌ترین مشکلات ایمونولوژی بالینی مدرن است. در سال‌های گذشته با به دست آوردن داده‌های جدید در مورد برخی اشکال بالینی نقص ایمنی اولیه و ثانویه، مکانیسم‌های بیماری‌زای احتمالی و روش‌های تشخیص و درمان آن‌ها مشخص می‌شود. به همین دلیل باید بیشتر به جستجو و بهبود ابزارهایی جهت تقویت دفاع بدن، توجه شود. سنتز اینترلوکین -۱ و فاکتورهای محلول دیگر که سلول‌ها به ویژه سلول‌های T را فعال می‌کند، برای سیستم ایمنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. اینترفرون‌ها (IFN)، گلیکوپروتئین‌هایی از دسته‌ی سیتوکین‌ها هستند و محرک‌های سیستم ایمنی بدن در برابر عوامل بیماری‌زا و تومورهای با منشأ مختلف هستند. اینترفرون‌های هترولوگ با منشأ باکتریایی معمولاً برای درمان سرطان خون میلوئید، ملانوم بدخیم و هپاتیت A و C استفاده می‌شود (۱۱). γ-اینترفرون نقش مهمی در پاسخ ایمنی به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* دارد. استفاده از داروهای سیتوکین، به ویژه اینترفرون‌ها، در درمان حیوانات در مقایسه با استفاده از آنتی بیوتیک‌های رایج و مواد شیمی‌درمانی دارای مزایای قابل توجهی است (۱۱).

سویه‌های *پیکیا پاستوریس*، که سنتزکننده‌ی سیتوکین‌های داخل سلولی و ترشحی، γ-اینترفرون گاوی و مرغی است، در آزمایشگاه ژنتیک بیوشیمیایی، دانشگاه ایالتی سن پترزبورگ ساخته شده‌است. اولین گزارش‌ها در مورد تولید اینترفرون انسانی در گیاهان، به ویژه با استفاده از گیاهان ترانسپلاستومیک، به اوایل دهه ۱۹۹۰ برمی‌گردد. در حال حاضر، طیف وسیعی از اینترفرون‌های خاص برای بهبود ایمنی غیر اختصاصی در حیوانات، توسط علم

بیوتکنولوژی تولید شده‌است، ازجمله α-اینترفرون گلبول‌های سفید خوکی برای جلوگیری از بیماری‌های ویروسی در خوک و α-اینترفرون گاوی برای جلوگیری از عفونت‌های تنفسی ویروسی در گاو. تولید بیوراکتورهای تراریخته برای تولید اینترفرون که ممکن‌است به طور مستقیم به خوراک دام اضافه شود و از خالص‌سازی گران‌قیمت جلوگیری شود، مورد توجه مطالعات است (۱۱).

اینترفرون‌های مرغی و اینترفرون‌های ماهی با موفقیت در بیوراکتورهای گیاهی تولید شدند. γ-اینترفرون انسانی در کشت معلق سلول‌های برنج تحت کنترل پروموتر سازنده یوبیکوئیتین ذرت و پروموتر ناشی از α-آمیلاز / αAmy3 RAmy3D سنتز شد (۱۱).

۹) قارچ‌ها و نقش آن‌ها در بیوتکنولوژی کشاورزی

تاکنون حدود ۸۰ هزار تا ۱۲۰هزار گونه قارچ (شکل ۱۷) توصیف شده است، اگرچه تعداد کل گونه‌ها حدود ۱,۵ میلیون تخمین زده می‌شود. این امر باعث می‌شود قارچ‌ها یکی از کمترین منابع تنوع زیستی روی کره زمین باشند. محدود کردن قارچ‌ها به عنوان یک گروه در برابر سایر یوکاریوت‌ها بسیار دشوار است. در سال‌های اخیر، مشاجرات اصلی بین تاکسونومسیت‌هاست که به دنبال تعریف فیلوژنتیک مبتنی بر شباهت توالی DNA مربوطه بوده و سایر افراد که رویکرد بیولوژیکی به این موضوع دارند و قارچ‌ها را به عنوان موجوداتی در نظر می‌گیرند که دارای تمام یا بسیاری از ویژگی‌های اصلی اکولوژیکی یا فیزیولوژیکی «اجتماع قارچ‌ها» هستند (۱۵).

شکل۱۷- تصویری از انواع قارچ.

۹-۱) ایجاد جهش یافته های ژنتیکی با اختلال ژنی از قارچ‌های بیماریزای گیاهی

قارچ‌هایی که به واسطه پوسیدگی یا تورم بافت میزبان با اختصاصیت محدود، باعث بیماری‌های گیاهی می‌شوند، سخت‌ترین قارچ‌ها برای کنترل هستند. این امر عمدتاً به دلیل ماهیت کمّی مقاومت میزبان و درک محدود از بیماری‌زایی قارچ است. درک ساز و کار بیماری‌زایی، به توانایی دستکاری ژن‌های کاندید عفونت‌زایی برای آزمایش فرضیه‌های مربوط به نقش آن‌ها در ایجاد بیماری نیازمند است (۱۵).

پاتوژن قارچی نکروتروفیک[1]، علت اصلی خسارت قابل توجه جهانی به محصولات به طور سالیانه است که منجر به عدم امنیت غذایی محلی و فقدان معیشت می‌شود. درک اساس این بیماری‌زایی تهاجمی با دامنه میزبان وسیع به دلیل ماهیت کمّی مقاومت میزبان و بیماریزایی پاتوژن با مانع مواجه می‌شود. *Sclerotinia sclerotiorum* از بدنام‌ترین

[1] *Necrotrophic*

بیماری‌زاهای گیاهی نکروتروفیک با دامنه میزبان وسیع است که با استفاده از تکنیک کریسپر می‌توان با اختلال ژنی در این پاتوژن و ایجاد موتانت‌هایی شیوع پاتوژن را مختل کرده و اثر آن به تدریج کاهش می‌یابد (۱۵).

۹-۲) بازیافت مواد مغذی

میکروارگانیسم‌های موجود در خاک نقش مهمی در بهبود بهره‌وری کشاورزی دارند. در واقع میکروارگانیسم‌هایی که در خاک زندگی می‌کنند به گیاهان کمک می‌کنند تا مواد مغذی بیشتری جذب کنند. گیاهان و این میکروب‌های مفید در «بازیافت مواد مغذی» نقش دارند. میکروب‌ها به گیاه کمک می‌کنند تا منابع انرژی ضروری را «برداشت» کنند. در عوض، گیاهان مواد جانبی زائد خود را به میکروب‌ها می‌دهند تا به عنوان غذا استفاده کنند. به عنوان مثال *تریکودرما*[1] توانایی ترشح مقدار زیادی آنزیم سلولزی و عوامل جوانه‌زنی بذر را دارد، خصوصیتی که در بازیافت مواد مغذی/تولید چای ارگانیک (کنسانتره مواد مغذی از مواد آلی تجزیه شده) به ویژه در تولید محصولات بدون خاک/گلخانه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵).

چای ارگانیک/کمپوست با استفاده از روش هوادهی یا غیر هوادهی دم می‌شود، مواد مغذی محلول در آب را برای گیاهان فراهم می‌کند و جمعیت و تنوع میکروارگانیسم‌های خاک را افزایش می‌دهد. قارچ مایکوریزای آربوسکولار یعنی *Glomus iranicum* var *tenuihypharum*، که جذب مواد مغذی (نیتروژن، فسفر، کلسیم، پتاسیم، سدیم، آهن، منگنز و غیره)، کارایی مصرف آب، نرخ فتوسنتز، افزایش زیست‌توده، بازده تولید (کمی و کیفی) را افزایش می‌دهد،

[1] *Trichoderma*

توسط *Symborg*، یک شرکت بیوتکنولوژی در بخش زیست-کشاورزی که در سال ۲۰۰۹ تأسیس شده است، به عنوان محرک زیستی، تجاری شده است و در حال حاضر در ۳۱ کشور در اروپا، ایالات متحده، آمریکای جنوبی و آسیا در حال استفاده است (۱۵).

۹-۳) منبع کودهای زیستی

این منابع سازگار با محیط زیست، کم حجم، کم‌هزینه و حاوی مواد مغذی گیاهی قابل تجدید هستند که کودهای شیمیایی را کامل کرده و نقش مهمی در بهبود منابع غذایی و در دسترس بودن محصولات آن‌ها برای گیاهان زراعی دارند. کود زیستی یک فرمولاسیون زنده و آماده استفاده از میکروارگانیسم‌های مفیدی است که با به کار بردن آن بر روی بذر، ریشه یا خاک، در دسترس بودن مواد مغذی را با فعالیت بیولوژیکی خود تحریک می‌کنند. کودها فقط سویه‌های منتخب از میکروب‌های مفید خاک هستند که در آزمایشگاه کشت شده و در یک حامل مناسب بسته‌بندی شده‌اند، که می‌توانند برای تیمار بذر یا کار روی خاک استفاده شوند. کودهای زیستی از طریق فعالیت‌های خود در خاک یا ریزوسفر، مواد مغذی گیاهی مانند نیتروژن و فسفر را تولید کرده و به صورت تدریجی در دسترس گیاهان قرار می‌دهند (۱۵).

اخیراً کودهای زیستی به دلیل در دسترس بودن برای حفظ سلامت خاک، به حداقل رساندن آلودگی زیست‌محیطی و قطع استفاده از مواد شیمیایی در کشاورزی در حال شتاب گرفتن هستند. در کشاورزی دیم، با توجه به هزینه کم این نوع کودها، اهمیت بیشتری پیدا می‌کنند؛ زیرا بیشتر کشاورزان زمین‌های کشاورزی کوچک و حاشیه‌ای دارند و

توانایی تهیه کودهای شیمیایی گران قیمت را ندارند. کودهای زیستی همچنین ورودی ایده‌آل برای کاهش هزینه‌های کشت و روش کشت ارگانیک هستند (۱۵).

کودهای زیستی شامل تلقیحات میکروبی یا مجموعه میکروارگانیسم‌های زنده هستند که از طریق مکانیسم‌های مختلف (محلول‌سازی فسفر، تجزیه مواد آلی، یا اکسید کردن گوگرد در خاک؛ خواصی که از نظر تأمین مواد مغذی برای تولید محصولات کشاورزی مفید هستند) فواید مستقیم یا غیرمستقیم بر رشد گیاه و عملکرد محصول دارند. یکی از انواع کودهای زیستی، قارچ‌های مایکوریزای آربوسکولار هستند که احتمالاً فراوان‌ترین قارچ‌ها در خاک‌های کشاورزی هستند. این تلقیح به دلیل افزایش در دسترس بودن برداشت یا جذب مواد مغذی، تحریک رشد گیاه با عمل هورمونی یا زیان‌زیستی[1] و با تجزیه باقیمانده‌های آلی، بازده محصول را افزایش می‌دهد. انسان‌ها از موجوداتی که به طور طبیعی در خاک وجود دارند برای توسعه کودها و آفت‌کش‌های زیستی جهت کمک به رشد گیاه و کنترل علف‌های هرز، آفات و بیماری‌ها استفاده می‌کنند. دانشمندان از این میکروارگانیسم‌های مفید برای تولید کودهای زیستی استفاده می‌کنند (۱۵).

فسفات و نیتروژن برای رشد گیاهان مهم هستند. این ترکیبات به طور طبیعی در محیط وجود دارند، اما گیاهان توانایی محدودی در استخراج آن‌ها دارند. فسفات نقش مهمی در تحمل تنش گیاه زراعی، بلوغ، کیفیت و به طور مستقیم یا غیر مستقیم در تثبیت نیتروژن نقش دارد (۱۵).

[1] Antibiosis

قارچ *پنی‌سیلیوم بیلایی*[1] به برداشت فسفات از خاک کمک می‌کند. این قارچ یک اسید آلی تولید می‌کند که فسفات را در خاک حل می‌کند تا ریشه‌ها بتوانند از آن استفاده کنند. به غیر از نقش گسترده AMF (قارچ‌های مایکوریزای آربوسکولار) در تأمین مزایای تغذیه‌ای، بسیاری از جنبه‌های دیگر این همزیستی مشاهده و مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵). این موارد شامل رقابت بین گونه‌ای، مسیر تثبیت جانشینی توده‌های خاک و تعیین و بهبود تنوع گیاهان است. کود زیستی ساخته شده از این جاندار با پوشاندن بذرها با قارچ به عنوان تلقیح یا قرار دادن مستقیم آن در زمین به کار می‌رود. مهندسی ژنتیکی چنین جاندارانی می‌تواند کارایی آن‌ها را به عنوان کودهای زیستی بهبود بخشد (۱۵).

۹-۴) علف‌کش‌های زیستی (علف‌کش‌های قارچی[2])

علف‌های هرز در کاربری‌های مختلف زمین باعث زیان می‌شوند. افزایش شیوع علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش و ممنوعیت استفاده غیرضروری از آفت‌کش‌ها، انگیزه‌ای قوی را برای ایجاد راهبردهای جدید در کنترل علف‌های هرز ایجاد کرده است. استعمال قارچ‌ها (در کنار باکتری‌ها و ویروس‌ها) برای دستیابی به این هدف طی چند دهه اخیر به طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. مزایای پیشنهادی این راهبرد شامل کاهش اثرات زیست‌محیطی، افزایش اختصاصیت هدف، کاهش هزینه‌های توسعه در مقایسه با علف‌کش‌های معمولی و شناسایی مکانیسم‌های جدید

[1] *Penicillium bilaii*
[2] Mycoherbicides

علف‌کشی است. در میان قارچ‌ها، جنس‌های برجسته‌ای که به عنوان نامزدهای علف‌کش زیستی مورد توجه قرار می‌گیرند شامل *Colletotrichum*، *Phoma* و *Sclerotinia* هستند (۱۵).

تحقیقی در مورد ژنوم‌های *Colletotrichum gloeosporioides* و *Colletotrichum orbiculare* آشکار کرد که هر دو گونه حاوی تعدادی ژن منتخب هستند که پیش‌بینی می‌شود با بیماری‌زایی همراه باشند، از جمله آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلول‌های گیاهی و عوامل بیماری ترشحی از جمله پروتئین‌های کوچک ترشحی[1] (SSP)، که مورد آخر نشان داده شده است با توجه به مرحله عفونت در گیاه به طور متفاوت بیان می‌شود و این امر بیانگر این است که برخی از این پروتئین‌ها ممکن است نقش خاصی در روند عفونت داشته باشند. همچنین شواهدی وجود دارد که هر دو گونه *Colletotrichum* توانایی تولید ایندول استیک اسید، یک هورمون گیاهی، را دارند که مشتقات آن ثابت شده است که علف‌کش‌های خوبی هستند (۱۵).

یکی دیگر از مواردی که پیشرفت چشمگیری در توسعه و استفاده از علف‌کش‌های قارچی داشته است، در زمینه کنترل علف‌های هرز انگلی (این گیاهان با یک اندام ارتباطی و نفوذ در بافتهای هادی سایر گیاهان آنها را مورد تهاجم قرار داده و بدین وسیله از قسمتی یا تمام مواد غذایی گیاه میزبان استفاده می‌کنند) است. گزارش شده است که شکل جهش‌یافته قارچ مایکوریزای آربوسکولار (AMF) با نام *Glomus mossea* به طور مؤثری علف هرز انگلی *Striga hermonthica* را از طریق کاهش بیش از حد استریگالاکتون‌هایش (مولکول های سیگنال دهی مشتق شده از

[1] Small secreted proteins

کاروتنوئید و هورمون های گیاهی هستند که گیاهان انگلی ریشه و قارچ های همزیست را قادر می سازند تا گیاهان میزبان خود را شناسایی کنند) و در نتیجه کاهش جذب فسفات توسط ریشه، کنترل می‌کند. علاوه بر این، سویه‌های والدی و جهش‌یافته *Fusarium oxysporum sp.f strigae* (بیماری‌زا برای *Striga hermonthica*) به عنوان علف‌کش قارچی به طور گسترده و قوی اثبات شده که مؤثر هستند (۱۵).

۹-۵) آفت‌کش های زیستی

بیوتکنولوژی همچنین می‌تواند به توسعه کنترل‌های جایگزین حشره‌کش‌های سنتزی برای مبارزه با آفات حشره‌ای کمک کند. قارچ‌ها باعث ایجاد بیماری در حدود ۲۰۰ حشره مختلف می‌شوند و از این صفت قارچ‌ها برای ایجاد بیماری به عنوان حشره‌کش زیستی استفاده می‌شود. از فناوری تخمیر برای تولید انبوه قارچ‌ها استفاده می‌شود. اسپورها برداشت و بسته‌بندی شده و در مزارع حشره زده اعمال می‌شوند. وقتی اسپورها به کار برده می‌شوند، از آنزیم‌ها برای شکستن سطح خارجی بدن حشرات استفاده می‌کنند. آن‌ها پس از ورود، شروع به رشد می‌کنند و در نهایت موجب مرگ حشره می‌شوند. برخی از محققان عوامل قارچی را به عنوان بهترین پتانسیل برای کنترل طولانی مدت حشرات توصیه می‌کنند. دلیل این امر این است که این حشره‌کش‌های زیستی هم‌زمان با روش‌های مختلف حمله می‌کنند و ایجاد مقاومت در حشرات را بسیار دشوار می‌کنند (۱۵).

حشره‌کش‌های زیستی در محیط دوام طولانی ندارند و ماندگاری کمتری دارند؛ در مقادیر کم مؤثر هستند، در مقایسه با حشره‌کش‌های سنتزی برای انسان و جانوران ایمن‌ترند؛ بسیار اختصاصی هستند به طوری که اغلب فقط یک گونه از حشرات را تحت تأثیر قرار می‌دهند و شیوه عمل آن‌ها بسیار اختصاصی است؛ کند عمل می‌کنند و زمان استفاده

از آن‌ها نسبتاً حیاتی است. کاربرد قارچ‌ها به عنوان حشره‌کش برای کنترل آفات ویرانگر حشره‌ای به طور مؤثر مورد استفاده قرار گرفته است. بسیاری از قارچ‌ها مانند *Metarhizium anisopliae* هم برای حشرات بیماری‌زا هستند و هم توکسین تولید می‌کنند که هر دو اثر حشره‌کش هستند. محصولات کشاورزی در شرق و جنوب آفریقا از ویرانگری با هجوم ملخ قرمز نجات یافته‌اند (اسپورهای قارچ در روغن‌های معدنی معلق، رقیق و پاشیده شد) (۱۵). به طور خاص، در تانزانیا، هجوم ملخ‌های قرمز از این که به یک حمله گسترده تبدیل شود، باعث نگرانی FAO[1] از اینکه امنیت غذایی میلیون‌ها نفر به خطر بیفتد، شد اما با انتشار حشره‌کش‌های زیستی مبتنی بر Metarhizium anisopliae (عضله سبز)، شیوع آن مهار شد. مثال دیگر، سوسک حنایی خرما *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)، یک آفت مهم/اصلی نخل در حوزه مدیترانه است که به طور مؤثر با *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae*، به عنوان حشره‌کش زیستی کنترل شد (۱۵).

۹-۶) نماتودکش‌های زیستی

کنترل زیستی نماتودهای انگلی گیاهان با قارچ‌ها، یک زمینه تحقیقاتی مهیج و به سرعت در حال توسعه است که توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است. جنبه‌های مختلف کنترل زیستی قارچی نماتودها مورد بررسی قرار گرفته و قارچ‌ها با خواص نماتودکشی به عنوان نماتودخوار[2]، پوسیده‌خوار[3] و اندوفیتی[4] که انگلی و/یا رقابت‌کننده هستند، طبقه‌بندی شده‌اند. قارچ‌های نماتودخوار به گروه متنوعی از قارچ‌ها اطلاق می‌شود که برای بهره‌برداری از

[1] Food and Agriculture Organization
[2] Nematophagous
[3] Saprophagous
[4] Endophytic

مواد مغذی با (۱) به دام انداختن نماتود (= قارچ‌های صیاد یا شکارچی)، (۲) انگل درونی، (۳) انگل تخم و ماده و/یا (۴) تولید توکسین در نماتودها ساکن و انگل می‌شوند (۱۵).

۹-۷) قارچ‌کش‌های زیستی

بسیاری از گونه‌های قارچی از جمله *Trichoderma* spp به تعداد قابل توجهی وجود دارند که به سمت مناطق هیفی (ساختاری طویل، شاخه دار و رشته ای از قارچ، اوومیست یا اکتینوباکتریوم است. در بیشتر قارچ ها، هیف ها شیوه اصلی رشد رویشی هستند و در مجموع به آنها میسلیوم می گویند) دیگر قارچ‌ها رشد می‌کنند، با یک واکنش توسط لکتین دور آن‌ها پیچیده می‌شوند و دیواره‌های سلولی قارچ های هدف را تخریب می‌کنند (قارچ‌انگلی) و گاهی اوقات، علاوه بر این، برخی از سویه‌ها، آنتی‌بیوتیک تولید کرده و از این رو به عنوان عوامل کنترل زیستی در برابر قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاه استفاده می‌شوند (۱۵).

Trichoderma spp. یکی از قارچ‌هایی است که به عنوان قارچ‌کش روی بذر، خاک و استعمال به صورت محلول‌پاشی تجاری گردیده است. Aflasafe نمونه دیگری از قارچ‌کش زیستی موجود در بازار برای کنترل *Aspergillus* spp. تولیدکننده آفلاتوکسین در محصولات به ویژه ذرت و بادام زمینی است (۱۵).

۹-۸) تولید غذا

انسان‌ها قرن‌ها از میکروب‌ها برای تولید غذا استفاده کرده‌اند. نان و پنیر نمونه‌های رایج از غذاهایی هستند که به ترکیبات و فعالیت‌های میکروبی بستگی دارند. امروزه، میکروارگانیسم‌ها حتی نقش پررنگ‌تری در تولید غذا دارند. آن‌ها نقش اولیه و ثانویه را در تخمیر و جلوگیری از فساد غذا دارند و می‌توانند آنزیم‌ها یا سایر متابولیت‌های مورد

استفاده در تولید و فرآوری مواد غذایی را تولید کنند. مخمر (به ویژه *ساکارومیسز سرویزیه*) پرمصرف‌ترین قارچ در کنار باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB[1]) است (۱۵).

بیوتکنولوژی (مهندسی ژنتیک وDNAی نو ترکیب) در صنایع غذایی از جمله جنبه های مختلف استفاده از میکروارگانیسم ها برای تولید مواد غذایی از قبیل اسیدهای آمینه، افزودنی های غذایی، طعم دهنده ها، ویتامین ها، پروتئین میکروبی و غیره، نقش عمده ای دارد. میکروارگانیسم‌های مربوط به تولید غذا و خوراک، جوامع پیچیده میکروبی (میکروبیوم‌ها) را تشکیل می‌دهند که با موجودات جانوری و گیاهی (میزبان‌ها) ارتباط تنگاتنگی دارند. به عنوان مثال، میکروبیوم‌های روده جانوران و گیاهان به دلیل اهمیت‌شان در جذب مواد مغذی میزبان، محافظت در برابر تنش‌های زیستی (عوامل بیماری‌زا) و غیرزیستی و همچنین فراهم کردن توانایی‌های متابولیکی مورد توجه هستند. قارچ‌های درشت (اعضای بسیاری از جنس‌ها) به دلیل محتوای مواد مغذی و نقش‌شان در سلامتی مصرف‌کننده، به عنوان محصولات با ارزش بالا کشت می‌شوند. پرورش قارچ (که معمولاً گوشت سلطنتی نامیده می‌شود) به ویژه به دلیل سهولت تولید، یکی از مقرون به‌صرفه‌ترین، سودآورترین (نیازمندی به فضا و ورودی‌های محدود؛ قیمت مناسب) زنجیره‌های باارزش کشاورزی است (۱۵).

۹-۹) هم‌زیستی‌های مفید قارچ و محصولات زراعی

[1] Lactic Acid Bacteria

اکثر گونه‌های گیاهی قادرند روابط هم‌زیستی مفیدی با قارچ‌های خاک ایجاد کنند؛ اصلاح ژنتیکی محصولات کشاورزی یا قارچ‌های هم‌زیست آن‌ها به منظور تسهیل این ارتباط یک چالش خواهد بود. اول، ژن‌های قارچی یا گیاهی مسئول رابطه هم‌زیستی باید مشخص شوند تا یک راهبرد بیوتکنولوژی برای تسهیل تعامل ایجاد گردد. برای مثال، در یونجه[1](*Medicago truncatula*)، ۲۹ ژن در طی ارتباط مایکوریزا با گیاه، بیان آنها افزایش یافت که ۱۱ ژن از آن‌ها در کلنی‌زایی باکتری‌ها در گیاهان افزایش بیان نداشتند، این امر نشان می‌دهد که فقط برخی ژن‌ها در تعامل‌های گیاهان و قارچ‌ها نقش دارند (۱۵).

به علاوه، برخی از ژن‌های گیاهی قبل از تماس فیزیکی با قارچ افزایش بیان داشتند. در طی مراحل اولیه ارتباط قارچی با گیاهان، در سیستم‌های دفاعی گیاه، به ویژه مسیرهای بیوسنتز جاسمونیک اسید (JA) و سالیسیلیک اسید (SA) افزایش وجود دارد. به طور کلی تنظیم مثبت مسیر SA به عنوان پاسخی به عوامل بیماری‌زای بیوتروفیک در نظر گرفته می‌شود (۱۵).

با وجود این در طی هم‌زیستی پایدار، تعادل حاصل شده و فعالیت این مسیر به حالت پایدار نزول می‌کند. اگر این‌گونه نبود، مکانیسم دفاع گیاه همچنان فعال می‌شد و می‌توانست همزیست قارچی را از بین ببرد. این امر نشان می‌دهد که قارچ‌های مفید، مسیر سالیسیلیک اسید (SA) را سرکوب می‌کنند، که برای ارتباط پایدار ضروری است.

[1] Barrel clover

بیماری‌زاهای گیاهی مضر قادر به سرکوب مسیر SA نیستند،که نشان‌دهنده ارتباط خاص بین گیاه و هم‌زیست‌های قارچی مفید است (۱۵).

شناسایی و کنترل ژن‌های مسئول ارتباطات قارچ-گیاه می‌تواند ارتباط را افزایش دهد. چندین ژن گیاهی و قارچی مربوط به هم‌زیستی شناسایی شده‌اند. به عنوان مثال *MtScp1* به عنوان یک ژن گیاهی شناسایی شد که یک کربوکسی‌پپتیداز درگیر در انتقال سیگنال‌های خاص قارچی را کد می‌کند. ژن‌های قارچی که در چسبندگی گیاه نقش دارند، مانند *mad2* و myc، در ارتباط قارچ-گیاه ضروری هستند؛ زیرا تنظیم مولکول‌های ترشح‌شده از قارچ را قبل از ارتباط، کنترل می‌کنند که رشد ریشه و بیان ژن‌های گیاهی مورد نیاز برای تعامل بین سلولی قارچی را تحریک می‌کنند (۱۵).

این ژن‌ها را می‌توان در سطح مولکولی دستکاری کرد تا ارتباط‌های قارچ-ریشه‌ای را تسهیل کنند. به منظور روشن ساختن مجموعه کامل ژن‌های درگیر در این مشارکت پیچیده، قابل جابه‌جایی و مفید بین گیاه و قارچ، گیاهان دارای و بدون قارچ‌های مایکوریزا را می‌توان با استفاده از آنالیز پروتئومیک و توالی‌یابی پیشرفته از نظر ژنتیکی ارزیابی کرد. درک بیشتر از ژن‌های درگیر در ارتباط گیاه-قارچی را می‌توان در روابط دیگر، مانند قارچ اندوفیت بیماری‌زای حشره‌ای *Metarhizium*، یک قارچ منتخب خوب برای آزمایش دست‌ورزی ژنتیکی مورد مطالعه قرار داد. اکثر قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار، که به عنوان قارچ‌های گیاهی مفید شناخته می‌شوند، بیوتروف‌های اجباری هستند،

که در کشت خالص رشد سختی دارند و قابلیت جوابگویی به سیستم‌های تراریختی سنتی را ندارند. از طرف دیگر، *Metarhizium* یک قارچ مشکل‌پسند[1] نبوده و به راحتی دستکاری ژنتیکی می‌شود (۱۵).

۹-۱۰) پایداری کشاورزی در شرایط خشکی یا شوری از طریق هم‌زیستی قارچی

بهره‌وری کشاورزی به خشکی و شوری خاک و آب حساس است. قارچ‌های مایکوریزا می‌توانند برداشت و نگهداری آب را در گیاهان زراعی تحت شرایط خشکی، بهبود دهند. تصور می‌شود که کلنی‌زایی ریشه گیاهان توسط قارچ‌های خاک باعث افزایش کارایی روزنه‌ای گیاهان می‌شود. علاوه بر این، میسلیوم‌های (قسمت رویشی قارچ‌ها متشکل از رشته‌های نخ مانند چندسلولی به نام هیف) اضافی به ریشه‌های مرتبط با مایکوریزا این امکان را می‌دهند تا در برداشت آب در خاک کارآمدتر شوند، ناحیه تخلیه آب را گسترش دهند و برای ریشه‌های گیاه، آبی را که قبلاً در دسترس نبوده فراهم کنند. از طرف دیگر، شوری خاک می‌تواند از طریق افزایش تجمع گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن که در اثر قرار گرفتن در معرض فشار طولانی مدت ایجاد شده‌اند، به گیاهان آسیب برساند (۱۵). از اینرو، جوامع اندوفیت می‌توانند تولید آنتی‌اکسیدان هایی مانند گلوتاتیون را القا کنند. به عنوان مثال، سویا با هم‌زیست‌های قارچی محتوای پرولین بیشتری در ریشه‌های خود دارد که برای حفظ تعادل اسمزی سلولی تحت شرایط شوری مورد نیاز است. نشان داده شد که *Metarhizium* یک ارتباط اندوفیتی با ریشه‌های سویا در شرایط شوری ایجاد می‌کند. استفاده از رویکرد

[1] Fastidius

بیوتکنولوژی به منظور ایجاد یا تقویت این مشارکت قارچی با سایر گیاهان زراعی می‌تواند به بهبود بهره‌وری کشاورزی کمک نماید (۱۵).

۹-۱۱) نقش قارچ‌ها در تجزیه زیستی

در طبیعت، تجزیه مواد گیاهی عمدتاً توسط قارچ‌ها با استفاده از آنزیم‌های قارچی ترشح شده انجام می‌شود. با انگیزه تمایل به انرژی زیستی مبتنی بر منابع غیرغذایی، تبدیل در مقیاس صنعتی زباله زیستی برای چندین سال مورد تحقیق و توسعه قرار گرفته است. پس از تمام این تحقیقات، نتیجه‌گیری این است که کارآمدترین و ملایم‌ترین روش تبدیل مواد لیگنوسلولزی سرسخت برای اهداف صنعتی، استفاده از آنزیم‌های قارچی است. از طریق چنین تبدیلاتی، عناصر سازنده مواد آلی دست‌نخورده نگه داشته می‌شوند و آماده استفاده در آبشار ارزش هستند. تبدیل آنزیمی زباله‌های زیستی و جریان‌های جانبی، پایه‌ای برای روشی کاملاً جدید در استفاده کارآمدتر از منابع طبیعی فراهم کرده و زمینه را برای یک بخش اقتصاد زیستی بزرگ‌تر در جامعه‌ای با پایه زیستی بیشتر امکان‌پذیر می‌نماید (۱۵). مواد گیاهی به دست آمده از بقایای محصول، زباله‌های شهری یا جریان زباله‌های کشاورزی و صنعتی، به طور فزاینده‌ای جایگزین کربن فسیلی نفت خام می‌شوند. نه تنها جایگزینی انرژی فسیلی با انرژی زیستی، بلکه مهم‌تر از آن جایگزینی مواد مبتنی بر فسیل، مانند پلاستیک‌ها و اجزای سازنده مواد شیمیایی، با مواد زیستی ساخته شده از مولکول‌های قند پلیمرهای دیواره سلولی گیاه است. بنابراین، تبدیل زباله زیستی در مرحله اول تبدیل مواد دیواره سلولی گیاهی به محصولات با ارزش بالاتر است که در درجه اول با یک فرآیند مبتنی بر استفاده تصفیه شده از قارچ‌ها و آنزیم‌های قارچی حاصل می‌شود (۱۵).

۱۰) کاربردهای نانوتکنولوژی در کشاورزی

نانوتکنولوژی در سال‌های اخیر به دلیل کاربردهای گسترده در زمینه‌هایی مانند پزشکی، داروها، کاتالیز، انرژی و مواد مورد توجه قرار گرفته است. نانوذرات با اندازه کوچک و سطح بزرگ (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) دارای کاربردهای بالقوه در پزشکی، صنعت و کشاورزی هستند. دانشمندان برای سنتز نانوذرات از طریق روش‌های مختلف، از جمله روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی، تلاش‌های قابل توجهی انجام داده‌اند. این روش‌ها به دلیل دشواری افزایش مقیاس فرآیند، جداسازی و خالص سازی نانوذرات از میکروامولسیون (روغن، سورفکتانت، کوسورفکتانت و فاز آبی) و مصرف مقدار زیاد سورفکتانت‌ها، معایب زیادی دارند. روش‌های سبز برای سنتز نانوذرات با عصاره‌های گیاهی بسیار سودمند است؛ زیرا ساده، راحت و سازگار با محیط زیست است و نیاز به زمان واکنش کمتری دارد. نانومواد تهیه شده با روش‌های سازگار با محیط زیست و سبز می‌توانند پتانسیل کشاورزی را برای بهبود روند کوددهی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهان و سموم دفع آفات افزایش دهند. علاوه بر این، آن‌ها میزان مواد شیمیایی مضر و آلوده کننده محیط زیست را به حداقل می‌رسانند. از این رو، این فناوری به کاهش آلاینده‌های زیست محیطی کمک می‌کند و نانوتکنولوژی اخیراً به دلیل کاربردهای گسترده در زمینه‌های مختلف مانند پزشکی، محیط زیست و کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است. به ویژه، سطح زیاد نانوذرات، آن‌ها را برای رسیدگی به چالش‌هایی که با آفت‌کش‌های فیزیکی، شیمیایی و روش‌های کنترل زیستی برآورده نشده‌اند، جذاب می‌کند (۱۴).

در طی یک دهه گذشته نانوتکنولوژی در کشاورزی جنبش خوبی پیدا کرده است، با وجود توسعه‌ی خوب، بسیاری از این روش‌ها زیر چتر کشاورزی قرار می‌گیرند. استفاده از روش‌های نانوتکنولوژی ممکن است به یک طبیعت منحصر

به فرد از تولید مزرعه نسبت داده شود، که به عنوان یک سیستم باز عمل می‌کند که به موجب آن، انرژی و ماده آزادانه تبادل می‌شوند. نانوتکنولوژی عوامل جدید کشاورزی و مکانیسم‌های جدید تحویل را برای بهبود بهره‌وری محصولات فراهم می‌کند و کاهش کاربردهای سموم دفع آفات را نوید می‌دهد. نانوتکنولوژی می‌تواند تولید محصولات کشاورزی را افزایش دهد و کاربردهای آن شامل موارد زیر است:

۱) نانو فرمولاسیون مواد شیمیایی کشاورزی برای استفاده از سموم دفع آفات و کودها برای بهبود محصولات.

۲) استفاده از نانوحسگرها در حفاظت از محصولات برای شناسایی بیماری‌ها و بقایای مواد شیمیایی.

۳) دستگاه‌های نانو برای مهندسی ژنتیک گیاهان؛

۴) تشخیص بیماری‌های گیاهی؛

۵) بهداشت و تولید مثل دام، تولید مرغ؛

۶) مدیریت پس از برداشت (۱۴).

تکنیک‌های دقیق زراعی، می‌تواند بدون آسیب به خاک و آب برای بهبود بیشتر محصول استفاده شود. همچنین، می‌تواند از دست دادن نیتروژن در اثر شستشو و انتشار، و میکروارگانیسم‌های خاک را کاهش دهد. کاربردهای نانوتکنولوژی شامل انتقال ژن یا DNA به واسطه نانوذرات در گیاهان برای توسعه انواع مقاوم در برابر حشرات، پردازش و ذخیره سازی مواد غذایی و افزایش ماندگاری محصول است. نانوتکنولوژی ممکن است توسعه تولید بیومس به

سوخت را افزایش دهد. کارشناسان بر این باورند که مزایای نانوتکنولوژی برای کشاورزی، غذا و پرورش شیلات باید در برابر نگرانی‌های مربوط به خاک، آب و محیط زیست و بهداشت کارگران متعادل شود. در حال حاضر کاربردهای نانوتکنولوژی مورد تحقیق و آزمایش هستند و در این میان برخی موارد در فناوری غذایی استفاده شده‌اند. نانومواد با خواص شیمیایی، فیزیکی و مکانیکی خاص در نظر گرفته می‌شوند. در سال‌های اخیر، مواد زائد کشاورزی به عنوان منبع مواد اولیه تجدیدپذیر مورد توجه قرار گرفته‌اند تا در کاربردهای مختلف پردازش و استفاده شوند. مقاومت به حشره‌کش‌ها یکی از بهترین نمونه‌های توسعه است. مطالعه مقاومت در برابر حشره‌کش به این دلیل که منجر به درک همزمان مکانیسم‌ها می‌شود و هم به دلیل اهمیت اقتصادی آن مورد نیاز است. مسئله حشرات به مشکلی روز افزون برای کشاورزی و بهداشت عمومی تبدیل شده است. روش‌های کشاورزی می‌تواند شامل طیف گسترده‌ای از روش‌های انتخابی باشد. کاربردهای نانوتکنولوژی در فناوری غذایی و کشاورزی در حال آزمایش است. هدف کاربردهای نانومواد در کشاورزی، کاهش اسپری کردن محصولات محافظتی گیاهان و افزایش عملکرد گیاهان است. نانوکپسول‌ها و نانوذره‌ها نمونه‌هایی از کاربرد نانوتکنولوژی در تشخیص و درمان بیماری‌ها هستند. استفاده از دستگاه‌های مشتق از نانوتکنولوژی همچنین در زمینه اصلاح نباتات و تغییر ژنتیکی نیز در حال بررسی هستند. پتانسیل نانوتکنولوژی در کشاورزی زیاد است، اما هنوز چند مسئله به عنوان ارزیابی ریسک نیازمند بررسی‌های بیشتر است. از این نظر، برخی از جاذب‌های نانوذره‌ای از بیوپلیمرهایی مانند پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها با تأثیر کم بر سلامت انسان و محیط حاصل می‌شوند. نانوتکنولوژی در تمام مراحل تولید، فرآوری، ذخیره سازی، بسته بندی و حمل محصولات کشاورزی

کاربردهای فراوانی دارد. نانوتکنولوژی، انقلابی در صنعت کشاورزی و صنایع غذایی ایجاد خواهد کرد، برای مثال در تکنیک‌های کشاورزی، توانایی گیاهان در جذب مواد مغذی، تشخیص بیماری و کنترل آفات را افزایش می‌دهد (۱۴).

۱۰-۱) نانوتکنولوژی در سموم دفع آفات و کودها

این روزها به کشاورزی پایدار نیاز است. کشاورزی پایدار (این روش به نگرانی های زیست محیطی، اجتماعی و اقتصادی در کشاورزی اهمیت یکسانی می دهد. پایداری کشاورزی بر این اصل استوار است که ما باید نیازهای زمان حال را بدون به خطر انداختن توانایی نسل های آینده برای برآوردن نیازهای خود برآورده کنیم) ممکن است به عنوان رویکرد خوبی از اکوسیستم که برای طولانی مدت ارائه می‌شود، در نظر گرفته شود. روش‌هایی که می‌توانند باعث آسیب دیدن طولانی مدت خاک شوند، شامل شخم زدن بیش از حد خاک است که منجر به فرسایش و آبیاری خاک بدون زه‌کشی می‌شود. این روش‌ها منجر به شور شدن خاک نیز می‌شود. کشاورزی پایدار، برای تأمین نیازهای غذایی انسان، دام و فیبر است (۱۴).

برای نشان دادن تأثیر روش‌های مختلف بر خصوصیات خاک که برای پایداری ضروری هستند و ارائه داده‌های مهم در مورد این هدف، آزمایش‌های طولانی مدتی لازم است. در ایالات متحده، تولید نانومواد شیمیایی به عنوان عوامل امیدوار کننده‌ای برای رشد گیاه و کنترل آفات ظاهر شده است. کودها برای رشد گیاهان ضروری هستند. کودهایی که به شکل نانومواد تولید می‌شوند، می‌توانند دارای خواصی مانند بهبود محصول و کاهش سموم زیست محیطی باشند. گیاهان می‌توانند راهی مهم برای تجمع زیستی خود در زنجیره غذایی ارائه دهند. تحولات اخیر در کشاورزی

کاربردهای نانوذرات را برای استفاده مؤثر و ایمن از مواد شیمیایی برای گیاهان پوشش می‌دهد. اثرات نانوذرات مختلف بر رشد و سمیّت گیاهی از جمله نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4) بر رشد گیاه، نانوذرات آلومینا، روی و اکسید روی بر جوانه زنی بذر و رشد ریشه پنج گونه گیاه تربچه، کلزا، کاهو، ذرت و خیار، نانوذرات نقره بر رشد گیاهچه در گندم، نانوذرات گوگرد بر گوجه فرنگی، اکسید روی بر ماش، نانو ذرات AlO، CuO، FeO، MnO، NiO و ZnO گزارش شده است. نانوذرات نقره می‌توانند رشد و عملکرد گندم را تحریک کنند. خاک با غلظت ppm ۲۵ از نانوذرات نقره، اثرات بسیار مطلوبی بر رشد و عملکرد گندم دارد (۱۴).

اگرچه روی، به مقدار کمی در گیاهان مورد نیاز است، به عنوان یک ریز مغذی ضروری برای فعالیت‌های متابولیکی در گیاهان در نظر گرفته شده است. مشخص شد که روی، نقش مهمی در مدیریت گونه‌های فعال اکسیژن[1] و محافظت از سلول‌های گیاهی در برابر تنش‌های اکسیداتیو دارد. روی، در سنتز اکسین یا ایندول استیک اسید (IAA) از تریپتوفان و همچنین در واکنش‌های بیوشیمیایی مورد نیاز برای تشکیل کلروفیل و کربوهیدرات‌ها، عملکردهای مهمی دارد. عملکرد و کیفیت محصول می‌تواند تحت تأثیر کمبود روی باشد. توسعه مقاومت به حشره‌کش یک مشکل روزافزون برای کشاورزی و بهداشت عمومی است (۱۴).

اکسید منیزیم (MgO) از مواد غیر آلی مهم است و دارای کاربردهای فراوانی مانند جاذب‌ها، بازدارنده‌های آتش، سرامیک‌های پیشرفته، بازسازی زباله‌های سمی و مواد فتوالکترونیک است. بنابراین، تکنیک‌ها و مسیرهای مختلفی

[1] *Reactive oxygen species*

برای سنتز نانوذرات MgO گزارش شده است. MgOH با روش‌های سنتز سبز (یک روش سازگار با محیط زیست است که روشی متفاوت از تفکر در شیمی را ارائه می دهد که هدف آن حذف زباله های سمی، کاهش مصرف انرژی و استفاده از حلال های زیست محیطی است) با استفاده از عصاره غیر سمی برگ چریش[۱]، و عصاره برگ لیمو تولید شد (۱۴).

۱۰-۱-۱) کنترل آفات گیاهان

پژمردگی فوزاریومی[۲](پلاسیدگی آوندها) یک بیماری مخرب در گوجه فرنگی و کاهو است که به دلیل از دست دادن شدید محصول، زنده ماندن طولانی مدت قارچ در خاک و تولید نژادهای مقاوم، در چندین کشور شایع است. با استفاده از ارقام مقاوم و مواد شیمیایی، می‌توان بیماری را تا حدی کاهش داد. با این حال، وقوع و توسعه نژادهای جدید بیماری‌زا یک مشکل مداوم است و استفاده از مواد شیمیایی پرهزینه است و همیشه مؤثر نیست. در سال‌های اخیر، استفاده از نانومواد به عنوان یک راه حل جایگزین برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی در نظر گرفته شده است. قیدان و همکاران نانوذرات اکسید منیزیم (MgO) را سنتز کرده و اثر غلظت‌های مختلف را بر شته سبز هلو[۳] (GPA) تحت شرایط گلخانه آزمایش کردند. سنتز نانومواد اکسید مس (CuO)، اکسید روی (ZnO)، هیدروکسید منیزیم (MgOH) و اکسید منیزیم (MgO) با استفاده از عصاره‌های پوست انار[4]، برگ‌های زیتون[۵] و گل‌های بابونه رومی[۶] با

[1] Neem
[2] *Fusarium wilt*
[3] *Green peach aphid*
[4] *Punica granatum*
[5] *Olea europaea*
[6] *Chamaemelum nobile*

موفقیت انجام شده است. غربالگری نانوذرات زیستی سنتز شده نشان داد که این نانوذرات در افزایش درصد مرگ و میر شته سبز هلو مؤثر هستند. پس از آزمایش‌های گلخانه‌ای، تجمع نانوذرات اکسید فلز در میوه‌ها و برگ‌های فلفل دلمه‌ای سبز مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که تجمع فلز در هیچ یک از میوه‌ها وجود ندارد. محلول‌پاشی (محلول پاشی روشی تکمیلی برای کاهش مصرف کود و جذب آن از طریق برگ می باشد. بعضی از گیاهان آبزی و جلبکها کلیه مواد غذائی مورد نیاز را از طریق سطح برگها جذب مینمایند. یکی از راههای تغذیه گیاه، ارگان های بالای خاک نظیر برگها هستند. این عمل بیشتر زمانی که گیاه نیاز فوری به عنصر خاصی داشته و نیز در اوایل بهار که جذب عناصر از خاک به دلیل فعالیت پایین ریشه ها کم است، به کار می رود) با استفاده از نانوذرات MgOH برای برگ‌های فلفل سبز، نشان داد که محلول‌پاشی با ppm ۱۰۰-۸۰۰ از نانوذرات فلزی برای رشد گیاه بسیار مفید است و گیاهان سالمی با برگ‌های سبزتر و کیفیت بالای میوه در مقایسه با شاهد تولید می‌کنند. محققان با استفاده از روش‌های مختلف، از جمله روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی، تلاش زیادی در جهت سنتز نانوذرات انجام دادند. روش‌های سبز برای سنتز نانوذرات با عصاره‌های گیاهی از آنجایی که ساده، راحت و سازگار با محیط زیست است و به زمان واکنش کمتری نیاز دارد، سودمند است. نانومواد تهیه شده با روش‌های سازگار با محیط زیست و سبز ممکن است پتانسیل کشاورزی را برای بهبود روند کوددهی، رشد گیاهان و سموم دفع آفات افزایش دهد. علاوه بر این، این فناوری میزان مواد شیمیایی مضر آلوده کننده محیط زیست را به حداقل می‌رساند. شته سبز هلو به عنوان یک آفت کلیدی در مورد هلو و آفت مهم جهانی در طیف وسیعی از محصولات زراعی و باغی در نظر گرفته می‌شود. این آفت به عنوان مهمترین آفت کشاورزی در جهان طبقه بندی می‌شود. این آفت با تولید بیش از حد کربوکسیل

استراز تخریب کننده حشره‌کش، با حشره‌کش‌های ارگانوفسفر و کاربامات مبارزه می‌کند. علاوه بر این، کنترل چنین آفتی به دلیل تولید بیش از حد مقاومت برای شته، هنگام استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی مانند کاربامات‌ها، ارگانوفسفرها و پیرتروئیدها دشوار است (۱۴).

نانومواد مانند اکسید مس (CuONPs)، اکسید روی (ZnONPs)، هیدروکسید منیزیم (MgOHNPs) و اکسید منیزیم (MgONPs) با روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی سنتز شده‌اند. با افزایش نیازها برای به حداقل رساندن استفاده از مواد خطرناک برای محیط زیست، مانند حشره‌کش‌ها، بیوسنتز نانوذرات به عنوان فصل مشترک نانوتکنولوژی و بیوتکنولوژی مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. تسریع کاهش یون‌های فلزی با استفاده از گیاهان در مقایسه با میکروارگانیسم‌ها و همچنین تشکیل پایدار نانوذرات گزارش شده است (۱۴).

نانوذرات اکسید مس (CuONPs) از طریق روش‌های مختلف مانند رسوب و کاهش شیمیایی سنتز می‌شوند. بسیاری از عصاره‌های آبی گیاهان مانند آب لیمو و برگ خرنوب گزارش شده است. این برنامه‌ها بسیاری از محققان را بر آن داشت تا روش‌های مختلفی را برای سنتز ZnONP مانند مسیر شیمیایی، روش رسوب، هیدرولیز در حلال‌های آلی قطبی و سنتز مایکروویو استفاده کنند. عصاره‌های مختلف گیاهی در سنتز سبز ZnONPs مانند زیتون، برگ بادنجان تاجریزی[1] و چریش در منابع آزاد گزارش شده است. روش‌های مختلفی برای سنتز MgOHNP و MgONP مانند مسیر هیدروترمال، میکروامولسیون آب در روغن و واکنش مایکروویو گزارش شده است. MgOH با استفاده از

[1] *Solanum nigrum*

روش‌های سبز و غیر سمی و سازگار با محیط زیست مانند عصاره برگ چریش، عصاره برگ لیمو، صمغ اقاقیا، کلم وحشی[1] و پوست انار سنتز شد. در بخش کشاورزی، استفاده‌های مختلفی از جمله سموم دفع آفات و کودهای مبتنی بر نانوتکنولوژی با تأثیر بر رشد گیاهان و کشاورزی مولکولی با کمک نانوحامل‌ها وجود دارد که امیدوارند بتوانند جایگزین حامل‌های ویروسی شوند (۱۴).

۱۰-۱-۲) فعالیت ضد میکروبی

چندین نانومواد به عنوان عوامل ضد میکروبی در بسته بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند که در آن‌ها نانوذرات نقره بسیار مورد توجه است که به دلیل استفاده گسترده از آن می باشد. برخی از نانوذرات که در حال حاضر استفاده می‌شوند دی اکسید تیتانیوم (TiO_2)، اکسید روی (ZnO)، اکسید سیلیسیم (SiO_2)، اکسید منیزیم (MgO)، طلا و نقره هستند. همه آن‌ها دارای ویژگی‌ها و عملکردهای خاصی هستند؛ به عنوان مثال، نانوکریستال روی، فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی را نشان می‌دهد. نقره یک ماده ضدعفونی‌کننده است. سازمان غذا و داروی امریکا در سال ۲۰۰۹، استفاده مستقیم از نقره به عنوان ضد عفونی کننده به دلیل نتیجه مؤثر در برابر میکروارگانیسم‌ها در آب تجاری را تأیید کرد. اثر ضد میکروبی آنها بر *ای کلای*، *ال. مونوسیتوژنز*[2] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[3] است. نانوذرات نقره پوشیده شده با سلولز استات فتالات[4] نیز نتایج مشابهی را ارائه می‌دهند. طلا نیز دارای پایداری دمایی بالا و نوسان کم و اثرات ضد قارچی و ضد میکروبی خوبی در برابر ۱۵۰ باکتری مختلف است. برخی از نانوذرات فعالیت ضد

[1] *Brassica oleracea*
[2] *L. monocytogenes*
[3] *Staphylococcus aureus*
[4] *Cellulose acetate phthalate*

قارچی نشان داده‌اند. این قارچ‌ها شامل *کاندیدا آلبیکنز*[1]، *آسپرژیلوس نیجر*[2] و مخمر هستند. نانوذرات نقره همچنین در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین موثر واقع شده است. علاوه بر نقره، سایر نانوذرات مانند اکسید تیتانیوم (TiO_2) نیز همچنین دارای ویژگی‌های ضد میکروبی هستند. فعالیت ضد میکروبی آن‌ها در نور فرابنفش آشکار می‌شود. گزارش شده است که اکسید روی نیز در مواد بسته بندی فعالیت ضد میکروبی دارد (۱۴).

نانوذرات اکسید روی سنتز شده با استفاده از عصاره آبی پوست انار به عنوان عوامل ضد باکتری در برابر سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* گرم مثبت و *اشریشیاکلی* گرم منفی، اثربخشی نشان داده است (۱۴).

۱۰-۲) کاربرد نانوتکنولوژی به عنوان ضد قارچ

استفاده از نانوذرات نقره اخیراً علیه پاتوژن گیاهی *Colletotrichum gloeosporioides* مورد مطالعه قرار گرفته است. گزارش شده است که سایر نانوذرات (Fe، Cu، Si، Al، Zn، ZnO، TiO_2، CeO_2، Al_2O_3 و نانولوله‌های کربنی) به غیر از خواص ضد میکروبی، تأثیرات سوئی بر رشد گیاه دارند. بعضی اوقات، نانوذرات در رشد باکتری‌های مفید خاک مانند *سودوموناس پوتیدا KT2440*[3] نیز تأثیر دارند. گروه‌های مختلف تحقیقاتی تمرکز خود را بر استفاده از سموم دفع آفات دوستدار محیط زیست قرار داده‌اند. مشابه سموم دفع آفات شیمیایی، سموم دفع آفات و علف کش‌های مبتنی بر نانوذرات برای استفاده از عوامل ضد میکروبی برای محافظت از محصولات در برابر بیماری‌های مختلف در حال بررسی هستند. مطالعات گسترده بر روی سیستم‌های مبتنی بر نانوذرات ممکن است استفاده فشرده از سموم

[1] *Candida albicans*
[2] *Aspergillus niger*
[3] *Pseudomonas putida KT2440*

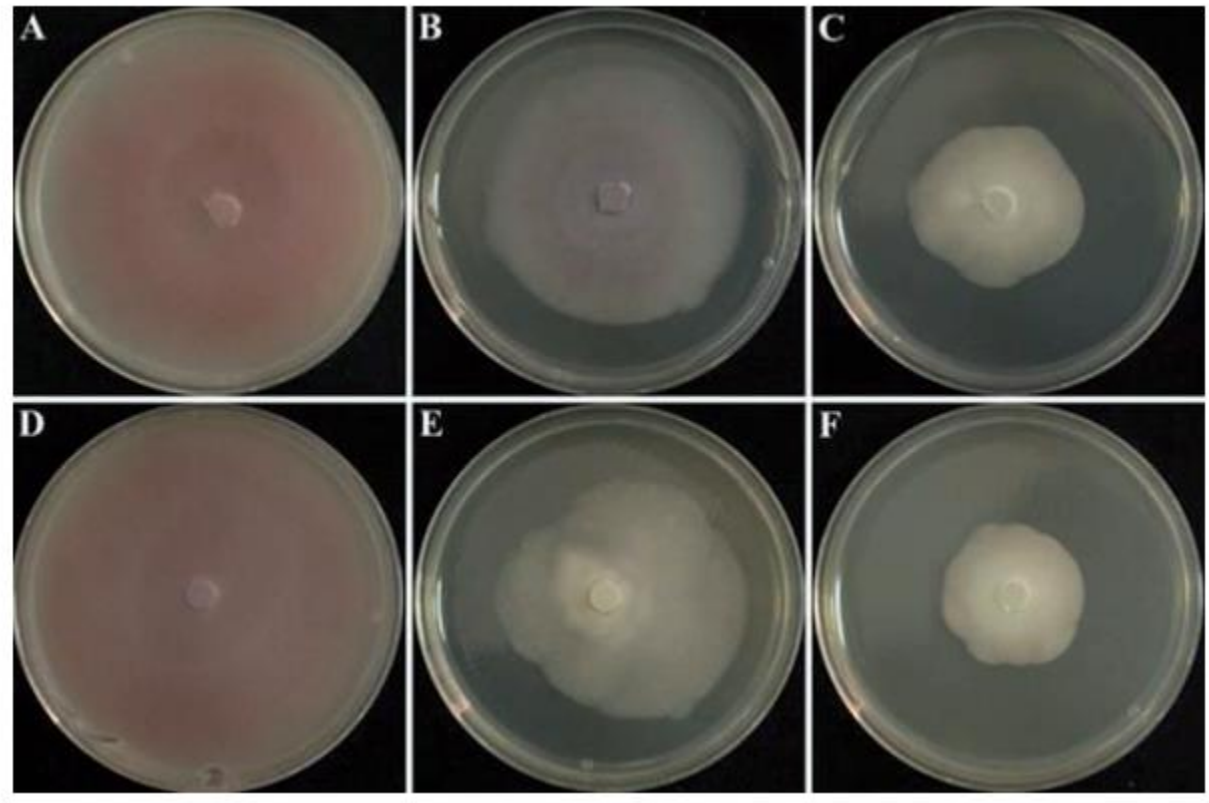
دفع آفات را در بخش کشاورزی از بین ببرد. خواص ضد قارچی نانوذرات می‌تواند به ساخت آفت کش‌های مبتنی بر نانوذرات کمک کند. در میان عوامل مختلف ضد میکروبی مبتنی بر نانوذرات معدنی، نقره توسط بسیاری از محققان به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است؛ زیرا نسبت به سایر نانوذرات مانند مس، روی، طلا، ZnO، Al_2O_3 و TiO_2 چندین مزیت دارد (۱۴).

اثر نانوذرات نیکل بر رشد میسیلیوم قارچ: هر دو غلظت نانوذرات نیکل (ppm ۵۰ و ۱۰۰)، رشد میسلیوم قارچ را در محیط جامد مهار می‌کند و مهار ($p \geq ۰/۰۵$) نسبت به کنترل قابل توجه بود (شکل ۱۸). نانوذرات نیکل در غلظت ppm ۱۰۰ رشد میسیلیوم *F. oxysporum f. sp. lactucae* و *F. oxysporum f. sp lycopersici* به ترتیب با ۶۰,۲۳ و ۵۹,۷۷ درصد بیش از کنترل مهار می‌کند.

اثرات مهاری نانوذرات نیکل نیز در محیط مایع بررسی شد و نتایج آن با محیط جامد مشابه بود. در محیط مایع، وزن میسلیوم پاتوژن‌های قارچی آزمایش شده به طور قابل توجهی کاهش یافته و بیش از ۵۰٪ کاهش با استفاده از نانوذرات نیکل در غلظت ppm ۱۰۰ ثبت شد. نتایج نشان داد که رشد میسلیوم پاتوژن‌های آزمایش شده به شکل وابسته به غلظت مهار می‌شود. این نتایج حاکی از آن است که استفاده از محلول نانوذرات نیکل می‌تواند به طور قابل توجهی باعث افزایش سطح تأثیر بر میسلیوم‌های فوزاریوم و رشد میسیلیوم شود (۱۴).

نانوذرات نیکل در غلظت ppm ۱۰۰ تعداد رشد اسپورها را ۸۱/۴۱ و ۷۴/۶۰ درصد در *F. oxysporum f. sp. Lactucae* و *F. oxysporum f. sp. lycopersici* به ترتیب کاهش داد. جوانه زنی نیز تحت تأثیر منفی ذرات نیکل قرار گرفت (شکل ۲۰).

اثر مهاری نانوذرات نیکل در جوانه زنی هاگ می‌تواند به دلیل اثر قارچ کشی آن‌ها باشد. این نتایج با نتایج به دست آمده در مورد اثرات ضد قارچی نانوذرات فلزات مختلف مانند نانو ذرات نقره و نانو ذرات روی و نانو ذرات مس در برابر برخی از قارچ‌های بیماری‌زا موافق است. اثر مهاری نانوذرات نیکل می‌تواند به دلیل تولید آنزیم‌های خارج سلولی از



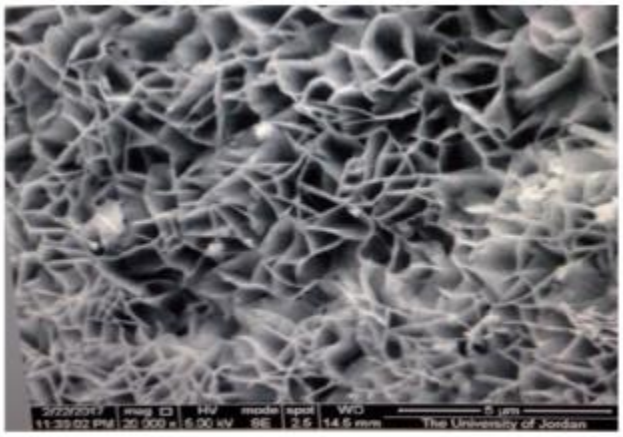
شکل ۱۸- پتری دیش‌های نشان دهنده مهار پاتوژن‌های عامل پژمردگی فوزاریومی. ردیف اول *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* (A) کنترل (B) ۵۰ ppm نانوذرات نیکل (C) ۱۰۰ ppm نانوذرات نیکل. ردیف دوم *Fusarium oxysporum f. sp. Lactucae* (D) کنترل (E) ۵۰ ppm نانوذرات نیکل (F) ۱۰۰ ppm نانوذرات نیکل

قارچ‌ها به عنوان عوامل بقاء ناشی از تنش مواد سمی باشد یا می‌تواند به دلیل سطح وسیع (شکل ۱۹) و اندازه‌های کوچکشان به غشای سلول پاتوژن نفوذ کرده و در سیتوزول کار کنند (۱۴).

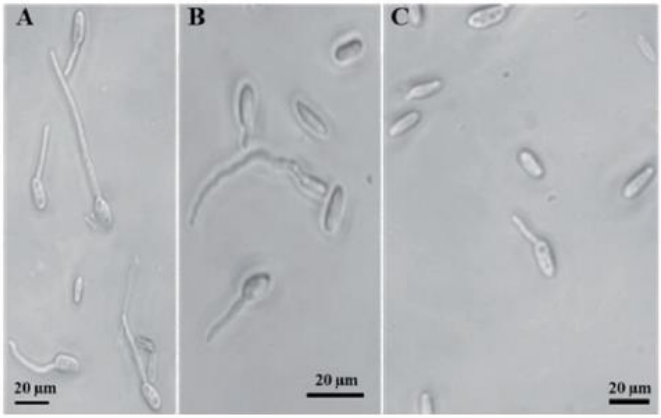
۱۰-۳) نانوتکنولوژی برای کنترل ویروس گیاهی

ویروس گیاهی به ویژه ویروس‌های کروی، به عنوان یک نانومواد طبیعی در نظر گرفته می‌شود. کوچکترین ویروس‌های گیاهی شناخته شده تا به امروز ویروس نکروز توتون ماهواره‌ای[1] است که قطر آن فقط ۱۸ نانومتر است. ویروس‌های گیاهی از RNA/DNA تک رشته‌ای یا دو رشته‌ای به عنوان ژنوم ساخته شده‌اند که توسط یک پوشش پروتئینی محصور می‌شوند. توانایی آن‌ها در آلوده کردن، رساندن ژنوم اسید نوکلئیک به یک مکان خاص در سلول میزبان، تکثیر، بسته‌بندی اسید نوکلئیک و بیرون آمدن از سلول میزبان به طور منظم، استفاده از آن‌ها را در نانوتکنولوژی ضروری کرده است (۱۴).

[1] *Satellite tobacco necrosis*



شکل ۱۹- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره. پیچ و خم نانویی سطح بزرگی از نانوذرات MgO



شکل ۲۰- جوانه زنی *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici conidia* (A) کنترل (B) ۵۰ *ppm* نانوذرات نیکل (C) ۱۰۰ *ppm* نانوذرات نیکل

۱۰-۴) نانوتکنولوژی در بسته بندی مواد غذایی

صنایع غذایی در تشکیل مواد غذایی با ارزش غذایی مناسب پیشتاز هستند. به عنوان مثال، از نانومواد بسته بندی با نفوذ ناپذیری بالا، برای محافظت از مواد غذایی در برابر اشعه فرابنفش و ایجاد قدرت بیشتر برای نگهداری مواد غذایی محافظت شده از محیط، و افزایش ماندگاری آن‌ها استفاده می‌شود. نانوحسگرها برای تشخیص مواد شیمیایی، گازها و عوامل بیماری‌زا در مواد غذایی استفاده می‌شوند. به این نوع بسته بندی، بسته بندی هوشمند گفته می‌شود. برخی مطالعات حاکی از آن است که افراد به دلیل برخی از خطرات، درگیری مستقیم نانوذرات در غذا را نمی‌پذیرند. بنابراین، لازم است برخی از اقدامات ایمنی برای کاهش خطر انجام شود (۱۴).

۱۱) کشاورزی سلولی

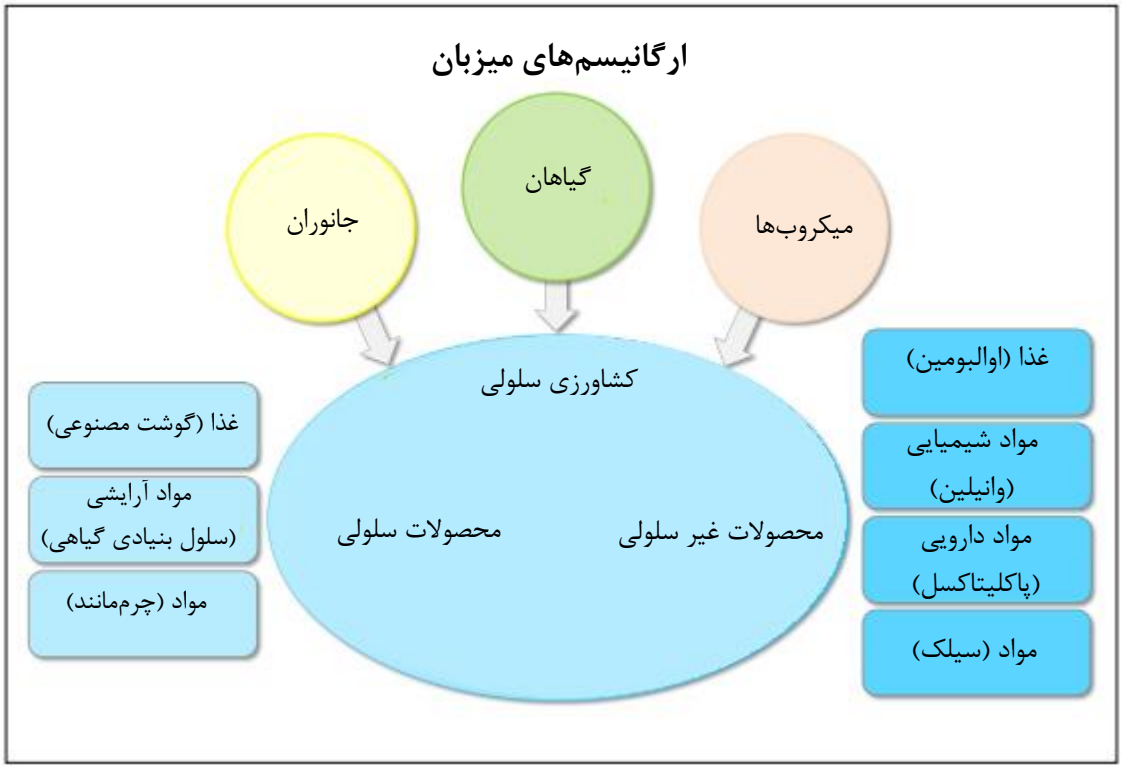
تغییر سیستم غذایی فعلی به طور همزمان به سمت اهداف تأمین رژیم‌های غذایی سالم و پایداری محیط زیست یکی از بزرگترین چالش‌های کنونی است. دستیابی به این اهداف یک پیش نیاز اساسی برای تحقق اهداف توسعه پایدار[1] (SDGs) سازمان ملل متحد است. حتی اگر تولید جهانی غذا تاکنون با رشد جمعیت همگام بوده باشد، از طرفی هنوز یک فاصله قابل توجه در تأمین غذای کافی وجود دارد و از طرف دیگر، مشکلات همزمان با رژیم‌های کم کیفیت باعث کمبود ریز مغذی‌ها و چاقی مرتبط با رژیم غذایی می‌شود. بعید به نظر می‌رسد که کشاورزی معمولی به تنهایی بتواند از پس چالش‌های بزرگ پیش رو برآید. برآوردهای فعلی، نیاز جهانی به غذا تا سال ۲۰۵۰ را بیشتر از ٪۶۰ پیش بینی می‌کنند؛ در حالی که در نهایت فقط ۲٪ زمین کشاورزی در دسترس است که ۴۰٪ از کل زمین را پوشش می‌دهد. بر خلاف تصور عمومی، فعالیت‌های انسانی، از جمله اهلی کردن دام، سازگاری با کشاورزی و انقلاب صنعتی که باعث افزایش چشمگیر جمعیت انسانی می‌شود، بیومس کل زمین را بیش از دو برابر کاهش داده است. این امر بیشتر به دلیل مدیریت جنگل و مراتع است. محصولات زراعی فقط حدود ۲٪ از کل بیومس گیاهی کره زمین را به خود اختصاص می‌دهند. این رقم محصولات غیر غذایی را نیز شامل می‌شود و نشان می‌دهد که تضاد رشد مواد غذایی یا بیومس برای موادی مانند فیبر و اخیراً برای سوخت، جدی است. در نتیجه، گزینه‌های کارآمد برای تولید مواد غذایی به شدت مورد نیاز است.

بیوتکنولوژی صنعتی کلید تأمین مواد غذایی مغذی، ایمن و سالم به همراه مواد شیمیایی و مواد نوآورانه است، در حالی که علاوه بر دستیابی به استقلال فصلی و جغرافیایی و کاهش ضایعات، ورودی منابع مانند انرژی، زمین و آب

[1] *Sustainable development Goals*

را نیز به حداقل می‌رساند. بیوتکنولوژی سبز، انقلاب سبز، افزایش عملکرد محصولات را از طریق اصلاح گونه‌هایی با بهبود صفات زراعی، ارزش غذایی و مقاومت در برابر بیماری امکان پذیر ساخت. تمرکز اصلی بیوتکنولوژی قرمز و سفید روی محصولات غیر سلولی یعنی ترکیباتی با کاربردهای دارویی، مواد شیمیایی جزئی و عمده با طیف وسیعی از کاربردها مانند افزودنی‌ها و مکمل‌های غذایی، رنگدانه‌ها، طعم دهنده‌ها، اجزای معطر، اجزای سازنده پلیمر و سوخت بوده است. اخیراً، علاقه به محصولات سلولی برای استفاده به عنوان غذا و مواد آرایشی افزایش یافته است. اصطلاح "کشاورزی سلولی[1]" برای استفاده از کشت سلولی انواع مختلف ارگانیسم‌های میزبان (شکل ۲۱) برای تولید کالاهای کشاورزی به جای تولید توسط حیوانات پرورشی یا محصولات زراعی پیشنهاد شده است.

[1] *Cellular agriculture*



شکل ۲۱- نمای شماتیک از کشاورزی سلولی. ارگانیسم‌های میزبان شامل حیوانات، گیاهان و سلول‌های میکروبی هستند. محصولات سلولی همراه با مثال در سمت چپ و محصولات غیر سلولی همراه با مثال در سمت راست نشان داده شده است.

۱۱-۱) سلول‌های جانوری

گوشت یکی از منابع مهم غذایی برای بسیاری از اجزای حمایت کننده از رشد و تکامل بدن انسان و حفظ سلامتی در طول زندگی است. با این حال، مصرف گوشت قرمز با خطر بالای بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت نوع ۲ و برخی سرطان‌ها، مثل سرطان روده بزرگ به دلیل اسیدهای چرب اشباع و ترکیبات سرطان‌زا که در فرآوری مواد غذایی

گوشت قرمز ایجاد می‌شود، همراه است. تأثیر منفی ناشی از بیماری‌های ناشی از گوشت، به عنوان مثال، آنفلوانزای مرغی یا تب خوکی و همچنین مسائل اخلاقی نیز مورد توجه بسیاری قرار گرفته است (۱۰).

پرورش حیوانات (دام و طیور)، یکی از بزرگترین عوامل ایجادکننده مشکلات زیست محیطی است که مسئول ۱۰٪ انتشار گازهای گلخانه‌ای در ایالات متحده و در سطح جهانی حدود ۳۷٪ انتشار متان است. عواقب آن شامل تغییرات آب و هوایی، آلودگی آب و هوا و همچنین جنگل‌زدایی است. علاوه بر این، افزایش جمعیت، افزایش رفاه در کشورهای در حال توسعه و تغییر شیوه‌های غذایی منجر به افزایش فوق العاده تقاضای پروتئین‌های غذایی، به ویژه پروتئین‌های مشتق شده از حیوانات و در نتیجه افزایش مصرف گوشت شده است. علاوه بر این، به خصوص تولید گوشت گاو ناکارآمد است؛ زیرا نرخ تبدیل از خوراک به پروتئین حیوانی کم است و تقریباً برابر ۱۵٪ است. به دلیل تأثیرات عظیم زیست محیطی دام، به ویژه گاو، در چشم انداز جهانی، کشاورزی سلولی فرصت‌های خوبی را برای سالم نگه داشتن محیط فراهم می‌کند (۱۰).

گوشت مصنوعی[1]، به جایگزین‌های گوشت گفته می‌شود که می‌توان آن‌ها را به سه دسته تقسیم کرد: گوشت حاصل از گیاهان و قارچ‌ها، گوشت حاصل از حیوانات تراریخته و گوشت مبتنی بر سلول. گوشت مبتنی بر سلول[2]، گوشت تمیز، گوشت کشت شده در آزمایشگاه یا گوشت آزمایشگاهی نیز نامیده می‌شود. این یک محصول غذایی پیچیده است که از سلول‌های حیوانی عمدتاً عضله اسکلتی، چربی و بافت‌های همبند مانند میوبلاست (یک سلول تمایز نیافته

[1] *Artificial meat*
[2] *Cell based meat*

که قادر به ایجاد سلول های عضلانی است) تشکیل شده است که این سلول‌ها بر روی میکرو حامل‌ها (بیدهای کروی شکل که رشد سلولهای چسبنده در بیوراکتور را فراهم می‌کنند) کشت می‌شوند. سلول‌های بنیادی میوساتلایت (همچنین به عنوان سلول های ماهواره ای، سلول های بنیادی عضلانی یا MuSCs شناخته می شوند، سلول های چند توان کوچکی هستند که سیتوپلاسم بسیار کمی داشته و در ماهیچه های بالغ یافت می شود.) یا چربی که در محیط رشد خارج از حیوان در یک راکتور بیولوژیکی رشد می‌کنند، سلول‌های چندتوان و قادر به تمایز هستند؛ بنابراین باید هر از گاهی دوباره برداشت شوند. گوشت مبتنی بر سلول از نظر ژنتیکی با گوشت معمولی حیوانات یکسان است اما به دلیل پیچیدگی ساختاری، تولید آن دشوار است. علاوه بر این، تقلید از بافتی که به شدت در طعم کمک می‌کند سخت است. در حقیقت، تکثیر گوشت چرخ شده به مراتب ساده تر از استیک است و گزینه‌های رقابتی دائماً وارد بازار می‌شوند. چاپ سه بعدی ممکن است گزینه‌ای برای تقلید از یک استیک گوشتِ کشت شده باشد. در حال حاضر یک روند بزرگ، هرچند جدید نیست، جایگزینی پروتئین‌های حیوانی با مواد حاصل از بیوتکنولوژی مانند توفو (کشک لوبیا که حاصل تخمیر شیرسویاست)، سیتان (متشکل از پروتئین اصلی گندم یعنی گلوتن) یا تمپه (حاصل تخمیر دانه‌های سویا) و اخیراً محصول پروتئین قارچی با نام کورن است. با این حال، گوشت مبتنی بر سلول ممکن است در طولانی مدت از دیدگاه مصرف کننده یک مزیت داشته باشد؛ زیرا گوشت حیوانی است. از طرف دیگر، این گزینه‌ای برای گیاهخواران نیست. اولین همبرگر مبتنی بر گوشت کشت آزمایشگاهی در سال ۲۰۱۳ توسط پروفسور مارک پست رونمایی شد. هزینه در آن زمان ۲۵۰۰۰۰ یورو تخمین زده شد. از آن زمان علاقه زیادی به جایگزینی تولید گوشت کشاورزی دامی توسط کشاورزی سلولی مطرح شده است. این کار ساده‌ای نیست؛ زیرا گوشت

کشت شده باید ترجیحاً از نظر غذایی مشابه گوشت گاو تولید شده از حیوانات و دارای طعم، بافت و شکل مناسب باشد. با این حال، هنگامی که این فناوری پیشرفت می‌کند، هزینه‌ها نیز کاهش می‌یابد. مهمترین مشکلات در تهیه گوشت آزمایشگاهی عبارتند از نیاز به استفاده از حیوانات برای بدست آوردن سلول‌های مناسب، نیاز به سرم گران قیمت و مشتق شده از حیوانات به عنوان یک جز اصلی محیط کشت سلول‌ها و همچنین افزایش مقیاس تولید است. چالش دیگر نیاز سلول‌های حیوانی به سطح چسبنده در کشت آزمایشگاهی می‌باشد. با این حال، استفاده از میکروب‌ها به عنوان سیستم‌های تولیدی جایگزین جهت تولید پروتئین‌های حیوانی ضروری نیاز است؛ زیرا با قیمت‌های کنونی، برآورد می‌شود که درآمد گوشت گاو و محصولات لبنی ایالات متحده که امروزه بیش از ۴۰۰ میلیارد دلار است، به۵۰٪ تا سال ۲۰۳۰ کاهش یابد. علاوه بر این سایر دام‌ها و شیلات نیز همین روند را دنبال خواهند کرد. بنابراین، تولیدکنندگان عمده محصولات دامی در سطح جهانی در معرض خطر جدی اقتصادی قرار دارند (۱۰).

۱۱-۲) سلول‌های گیاهی

اثرات زیست محیطی (به ازای هر کیلوگرم محصول) محصولات زراعی برای مصارف انسانی بسیار کمتر از محصولات حیوانی است اما در کل هنوز به دلیل حجم بالای تولید و اتلاف مواد غذایی و ضایعات بیشتر، حداقل یک سوم از تأثیرات کشاورزی را به خود اختصاص می‌دهد. کاهش تأثیرات محیطی، یکی از مهمترین عوامل ایجاد بیوتکنولوژی صنعتی سلول‌های گیاهی برای کاربردهای غذایی است. تمرکز مطالعات اولیه و آنالیز چرخه زندگی برای تعیین صرفه جویی در مصرف آب و غیره، به منظور بهینه سازی فرآیند می باشد که نشان دهنده یک پتانسیل قابل توجه در

کاهش هزینه و منابع است. استفاده گسترده از "سلول‌های بنیادی گیاهی"، یعنی سلول‌های گیاهی تمایزنیافته به عنوان منبع مواد آرایشی نیز به شدت توسط تقاضای مصرف کننده برای مواد پایدار تأمین می‌شود. فناوری کشت سلولی، شرط دستیابی و بهره برداری از گیاهان نادر در عین تأمین بدون به خطر انداختن بیشتر جمعیت وحشی بود. اکثر محصولات آرایشی و بهداشتی در این بخش از عصاره‌های کشت سلولی به دست می‌آیند اما تعدادی از فرمولاسیون‌ها حاوی سلول‌های کامل هستند و بنابراین در گروه کشاورزی سلولی قرار می‌گیرند (۱۰).

انگیزه دیگر برای استفاده از سلول‌های گیاهی به عنوان غذا از توصیه‌های تغذیه‌ای برای افزایش مصرف رژیم غذایی گیاهی ناشی می‌شود. در حال حاضر روند شدیدی نسبت به جایگزینی پروتئین‌های حیوانی با گزینه‌های گیاهی مانند سویا و حبوبات وجود دارد. با این حال، بسیاری از محصولات گیاهی در مقایسه با اکثر پروتئین‌های مشتق شده از حیوانات حاوی مقادیر کمی اسیدهای آمینه ضروری هستند. به طور کلی، قابلیت هضم پروتئین‌های زراعی در شکل طبیعی آن‌ها کمتر از پروتئین‌های منابع حیوانی است، که می‌تواند به دلیل عوامل ضد تغذیه‌ای، برهم کنش و یا به دام افتادن فیزیکی ترکیبات باشد. تحقیقات اخیر در مورد ترکیبات تغذیه‌ای سلول‌های گیاهی کشت شده حاوی محتوای بسیار مطلوبی از تقریباً ۲۱ تا ۳۷ ٪ فیبر غذایی، ۰,۳ تا ۱,۳٪ نشاسته، ۱۸ تا ۳۳٪ قندها و همچنین چربی‌های با کیفیت خوب همراه با ۱۴ تا ۱۹٪ پروتئین است. نمونه‌ها، پروفایل‌های متعادل اسیدهای آمینه ضروری تغذیه‌ای نشان دادند که بیش از محتوای جدا شده پروتئین سویا هستند و از همه مهمتر قابلیت هضم را نشان می‌دهند، که بستگی به نوع و فرآیند جذب مناسب دارد (۱۰).

بر خلاف کشت سلول‌های حیوانی، سابقه طولانی در کشت سلول‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله مواد غذایی در مقیاس وجود دارد. بر اساس کار پیشگامانه Haberland در توصیف قدرت سلولی، توسعه سریع فناوری برای ایجاد روش‌های کشت سلول هتروتروف در بیوراکتورها صورت گرفت. اولین محصولات تجاری، عمدتاً متابولیت‌های ثانویه به عنوان دارو، در دهه ۱۹۸۰ در بازار ایالات متحده امریکا ظاهر شد. یک بررسی نشان می‌دهد که چگونه کشت سلول‌های گیاهی از نظر فنی، تولید داروی ضد سرطان پاکلیتاکسل در راکتورهای زیستی ۷۵۰۰۰ لیتری را برای تأمین بیشتر تقاضای جهانی فراهم می‌کند (۱۰).

محیط کشت سلول‌های گیاهی از نظر شیمیایی کاملاً مشخص است و بیشتر متشکل از مواد غیر آلی مانند نمک‌ها، شکر (معمولاً ساکارز) به عنوان منبع کربن و برخی ویتامین‌ها و فیتوهورمون‌های با غلظت کم (هورمون های گیاهی) است. بنابراین در مقایسه با محیط کشت سلول‌های حیوانی از پیچیدگی و هزینه کمتری برخوردار است. از آنجا که بسیاری از مواد آرایشی در حال حاضر از نظر اقتصادی از سلول‌های گیاهی تولید می‌شوند، انتظار می‌رود که حداقل مواد غذایی لوکس، مانند شکلات ساخته شده از سلول‌های گیاهی نیز به زودی پس از ایجاد روش‌های فرآوری مناسب برای بیومس، دنبال شوند. کشت سلول‌های مشتق شده از لینگونبری (لینگونبری یک گیاه است که از برگ ها و توت ها برای تهیه دارو استفاده می شود.) به روش‌های مختلف پردازش شد تا تطبیق پذیری گسترده مواد اولیه به نمایش گذاشته شود (شکل ۲۲).

سلول‌های گیاهی نیز می‌توانند به عنوان مواد تشکیل دهنده عمل کنند، اگرچه کارهای کمتری در این زمینه منتشر شده است. از آنجا که سلول‌های گیاهی در سطح کشت به سطوح نمی چسبند بلکه بیشتر به عنوان سلول‌های منفرد یا تجمعات سلولی رشد می‌کنند، ساختار ۳ بعدی بافت مانع اصلی است. رویکردهای چاپ سه بعدی می‌تواند راهی برای دستیابی به رشد منظم باشد (۱۰).

شکل ۲۲- سلول‌های گیاهی کشت شده به عنوان ماده‌ی خام متنوع برای کاربردهای غذایی آینده. مرکز: کشت سلول گیاهی لینگونبری؛ از بالا سمت راست به پایین به صورت ساعتگرد: محصولات غیر سلولی - سلول‌های فیلتر شده، مکعب‌های ژلی، مرواریدهای در دام انداخته‌ی آگارز، عصاره‌ی سلولی؛ از بالا سمت چپ به پایین به صورت پاد ساعتگرد: محصولات سلولی - پودر لیوفیلیزه شده، نان گوشتدار ساخت یافته، چیپس گوشتی خشک و ساخت یافته.

شکل ۲۳- هدست کوروا با استفاده از مواد ساخته شده میکروبی. طراحی اولیه از پلاستیک‌های زیستی، میسلیوم‌های چرم‌مانند، سیلک مصنوعی، فوم پروتئین- سلولز، و کامپوزیت میسلیوم و سلولز باکتریایی. این هدست توسط Aivan طراحی شد و مواد آن توسط مرکز تحقیقاتی VTT فنلاند و دانشگاه آلتو ساخته شد.

۱۱-۳) سلول‌های میکروبی

مدت هاست که تولید پروتئین غذایی توسط سلول‌های میکروبی تثبیت و تجاری‌سازی شده است. این فرایند تولید به اصطلاح پروتئین قارچی یا پروتئین تک سلولی به دلیل وجود مقدار ناخواسته RNA بایستی تحت کنترل و پایش قرار گیرد (۱۰).

از کشت میکروب‌ها می‌توان برای ساخت مواد سنتتیک یا مصنوعی استفاده کرد. در طبیعت مواد ماکروسکوپی حاصل از میکروب‌ها مانند بیوفیلم‌ها، قارچ‌ها و گلسنگ‌ها، خیلی کم به عنوان مواد ساختاری مصنوعی شناخته می‌شوند. با این حال، میکروب‌ها می‌توانند برای تولید انواع مختلف پلیمرها و پیش سازهای پلیمری استفاده شوند. استفاده از فرآیند رشد میکروبی برای تولید مواد سنتتیک رو به افزایش است. کنترل رشد و ریخت زایی سلول‌ها جهت تولید مواد شبه بافتی، چالش اصلی است. تولید مواد با استفاده از موجودات زنده اغلب به عنوان سنتز بیولوژیکی مواد نامیده می‌شود و در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی به کار می‌رود (۱۰).

به عنوان مثال میسیلیوم قارچی می‌تواند به صورت صفحات یا مواد کامپوزیتی رشد کند. قارچ‌های رشته‌ای با گسترش نوک و منشعب شدن به صورت هیف‌های طولانی رشد می‌کنند و در نهایت یک شبکه فیبریلی تشکیل می‌دهند. قرن‌هاست که انسان‌ها از بدنه زایشی قارچ‌های براکتی برای تولید پارچه‌های چرم مانند، استفاده کرده‌اند. امروزه طراحان و محققان (شکل ۲۳) این هنر تقریباً فراموش شده را احیا می‌کنند و قادرند رشد میسلیوم را به مواد و اشکال دلخواه کنترل کنند. در حقیقت، شرکت Ecovative Design پیشگام استفاده از میسلیوم به عنوان یک جزء ماده‌ای است. میسلیوم قارچی را می‌توان به صورت کامپوزیت‌های جامد بیولوژیکی، فوم و پارچه‌های غیر بافته چرمی رشد

داد. بسیاری از قارچ‌های رشته‌ای، طیف وسیعی از آنزیم‌های هیدرولیتیک را ترشح می‌کنند که بخش‌های لیگنوسلولزی درختان و سایر لایه‌های آلی را تجزیه کرده و بنابراین می‌توانند مواد زائد را به مواد مفید تبدیل کنند (۱۰).

دیواره سلولی قارچ، شبکه‌ی متصلی را تشکیل می‌دهد و نقش ساختاری آن را بر عهده دارد. با این حال، درک عوامل مولکولی و ژنتیکی مؤثر بر بیومکانیک هیف‌ها در حال حاضر محدود است. نشان داده شده است که محتوای کیتین دیواره سلولی بر خصوصیات کششی مواد تأثیر می‌گذارد و پروتئین‌های دیواره سلولی در تراکم میسلیوم و در نتیجه در مقاومت ماده نقش دارند (۱۰).

میکروب‌های دیگر نیز می‌توانند مواد کاربردی و مفیدی را تولید کنند. سلول‌های باکتریایی مقاوم به قلیا، مانند برخی از گونه‌های باسیلوس، می‌توانند برای ایجاد آجرهای زیست-معدنی در یک فرآیند رسوب کلسیت (کلسیت یک ماده معدنی سنگ ساز با فرمول شیمیایی$CaCO3$)، کشت شوند. سلول‌های میکروبی و ویروس‌ها همچنین می‌توانند به عنوان الگوهای زیستی (داربست های زیستی در مقیاس نانویی) در سنتز نانوذرات کشت شوند. گلوکوناستوباکتر را می‌توان برای تولید فیلم‌های سلولزی بسیار خالص و اخیراً نیز به صورت سه بعدی کشت کرد. فیلم‌های سلولزی باکتریایی می‌توانند جلبک‌های ریز را در یک هیدروژل منعطف به دام بیندازند و این امر همزیستی مصنوعی بین دو گونه را نشان می‌دهد (۱۰).

فرآیندهای ساخت مواد از پایین به بالا (از جزء به کل)، توسط اطلاعات ژنتیکی موجود در سلول‌های در حال رشد هدایت می‌شوند. بنابراین، درک عوامل ژنتیکی برای طراحی مواد کاربردی بیوسنتتیک جدید بسیار مهم خواهد بود. پیشرفت‌هایی در این حوزه قبلاً به نمایش گذاشته شده است، مانند مواد متصل‌شونده به آلاینده‌های سازگار که زمینه را برای مواد زنده مهندسی شده هموار می‌کند (۱۰).

۱۲) کاربردها و دستاوردهای بیوتکنولوژی کشاورزی

دستاوردهای بیوتکنولوژی کشاورزی در تولید محصولات زراعی بهبودیافته بر اساس استفاده از تکنیک های مهندسی ژنتیک و یا تکنیک‌های کشت بافت گیاهی در تولید و ایجاد این محصولات به دو دسته طبقه‌بندی شده‌اند: دستاوردهای مهندسی ژنتیک در بهبود محصولات و دستاوردهای کشت بافت گیاهی در بهبود محصولات.

۱۲-۱) دستاوردهای مهندسی ژنتیک در بهبود محصولات

تغییر ژنوم ارگانیسم با افزودن یک یا چند ژن خارجی خاص به نام "مهندسی ژنتیک" یا "ترنسفورماسیون ژنتیکی" شناخته می‌شود و ارگانیسم اصلاح شده به عنوان ارگانیسم "ترانس‌ژن" یا "تراریخته" نامیده می‌شود. مهندسی ژنتیک با انتقال ژن هدف در ارگانیسم مورد نظر، نقش مهمی در افزایش پروتئین، انواع ویتامین ها از جمله ویتامین A و E و همچنین آهن و روی دارد. پیشرفت در مهندسی ژنتیک امکان دست‌ورزی محصولات را برای افزایش بازده امکان پذیر کرده است که وجود منابع غذایی برای جمعیت در حال افزایش جهان را تضمین می‌کند (۲). نمونه‌ای از

محصولات کشاورزی بهبودیافته با روش مهندسی ژنتیک که از دستاوردهای بیوتکنولوژی کشاورزی می‌باشند، شامل محصولات ***Bt***، برنج طلایی و ... در ادامه توضیح داده شده‌اند.

۱۲-۱-۱) محصولات *Bt*

بیشتر کاربردهای تجاری بیوتکنولوژی مدرن در کشاورزی، کاهش وابستگی کشاورزان به محصولات شیمیایی است. محصولات کشاورزی مقاوم در برابر حشرات و آفات، هدف‌گیری مؤثرتری را بر روی حشرات آفت می‌توانند فراهم کنند و هم‌زمان موجب کاهش استفاده از آفت‌کش‌ها و سموم می‌شوند. به علاوه کاهش استفاده از سموم باعث آسیب کمتر به کشاورزان، کارگران و حشرات مفید خواهد شد (۶). با روش‌های مهندسی ژنتیک، چندین محصول با قابلیت تولید پروتئین‌های *Bt* ساخته شده‌اند که آن‌ها را در برابر گروه‌های خاصی از حشرات مقاوم می‌کند. از باکتری *باسیلوس تورنژینسیس* برای تولید گیاهان تراریخته معروف به گیاهان *Bt* استفاده شده است. این باکتری بلورهای توکسینی تولید می‌کند که هنگام بلع توکسین، آفات را از بین می‌برد. البته از خود این باکتری به عنوان یک حشره‌کش هم استفاده می‌شود که به طور مستقیم روی محصولات پاشیده می‌شود. با این حال، ژن تولید توکسین جدا شد و در گیاهانی مانند ذرت، پنبه، سویا و سیب زمینی وارد گردید و اولین محصولات *Bt* در سال ۱۹۹۶ کاشته شدند. تا سال ۲۰۰۰ بیش از نیمی از محصول سویا در ایالات متحده آمریکا با گیاهان مهندسی‌شده *Bt* کاشته می‌شدند، اگرچه مشکل ایجاد مقاومت در برخی آفات نسبت به توکسین *Bt* جود داشت (۲).

پنبه *Bt* به منظور دارا بودن و بیان ژن‌های توکسین *Bt*، که به شکل فعال آن را تولید می‌کند، مهندسی شده است. هنگامی که یک حشره حساس، محصول تراریخته را که پروتئین *Bt* را بیان می‌کند، هضم کند، تغذیه را متوقف کرده و پس از مدت کوتاهی در نتیجه اتصال توکسین *Bt* به دیواره روده خود می‌میرد (۶).

ذرت *Bt* گونه‌ای از ذرت تراریخته است که توکسین *Bt* باکتریایی را بیان می‌کند، که برای حشره ساقه‌خوار اروپایی ذرت[1] سمی است. بنابراین، چندین موادغذایی تراریخته وجود دارد که در برابر علف‌کش‌ها (گلیفوسات) یا در برابر حشرات (با استفاده از توکسین *Bt*) مقاوم هستند، از جمله محصولاتی مانند سویا، کلزا، ذرت شیرین و چغندرقند. با این وجود، علی‌رغم دستاوردهای مختلف بیوتکنولوژی، مصرف محصولات تراریخته به دلیل کمبود اطلاعات در مورد تأثیرات این نوع مواد غذایی روی محیط و سلامت انسان، با محدودیت روبرو است (۲).

۱۲-۱-۲) برنج طلایی

در سال۱۹۹۲، پروژه برنج طلایی آغاز شد. برنج طلایی نوعی از برنج آسیایی[2] است که برای تولید بتاکاروتن، پیش ماده ویتامین A، در اندوسپرم که قسمت خوراکی برنج است، طراحی شده است. این مهندسی توسط اینگو پوتریکوس[3] از انستیتوی علوم گیاهی[4] در انستیتوی فناوری فدرال سوئیس[5] و با همکاری پیتر بایر[6] از دانشگاه فرایبورگ[7] انجام

[1] The European corn borer
[2] *Oryza sativa*
[3] Ingo Potrykus
[4] Institute of Plant Sciences
[5] The Swiss Federal Institute of Technology
[6] Peter Bayer
[7] The University of Freiburg

شد. برنج طلایی به عنوان یک ماده غذایی غنی‌شده، تولید شد تا در مناطقی که کمبود ویتامین A در رژیم غذایی مردم وجود دارد، استفاده شود. خبر تولید نوع جدیدی از این برنج با نام برنج طلایی۲[1] نیز در سال ۲۰۰۵ اعلام شد (شکل ۲۴). این برنج نسبت به محصول قبلی ۲۳ برابر بیشتر بتا کاروتن تولید می‌کند (۲).

شکل ۲۴- تصویری از برنج معمولی در مقابل برنج طلایی ۱ و برنج طلایی ۲

۱۲-۱-۳) محصول مقاوم در برابر علف کش

اگر گیاهان بتوانند در برابر علف‌کش‌ها مقاوم باشند، می‌توان علف‌های هرز را بدون آسیب به گیاه زراعی از بین برد. یکی از رایج‌ترین علف‌کش‌ها، گلیفوسات است که به صورت تجاری در دسترس است. گلیفوسات با مهار یک آنزیم بیوسنتز آمینو اسید، به نام ۵-انول‌پیروئیل شیکیمات-۳-فسفات سنتاز[2](EPSPS) عمل می‌کند (۲).

گیاهان مقاوم به علف‌کش گلیفوسات به دو طریق ایجاد شده‌اند، یا از طریق اضافه کردن نسخه‌های بیشتری از ژن سنتزکننده آنزیم EPSPS در DNAی گیاه و یا انتقال ژن آنزیم EPSPS باکتریایی به داخل گیاه، که در هر دو صورت منجر به افزایش تولید این آنزیم در گیاه و در نتیجه مقاومت گیاه به علف‌کش گلیفوسات شده‌اند. آنزیم EPSPS

[1] Golden Rice 2
[2] 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase

باکتریایی کمی از آنزیم گیاهی متفاوت است اما همانند آنزیم گیاهی، پروتئینی را تولید می‌کند که در برابر اثرات گلیفوسات مقاوم است (۲). برای اولین بار در سال ۱۹۹۸، شرکت آمریکایی مونسانتو[1]، گیاهان زراعی مختلفی مانند سویا را با فناوری Roundup-Ready تولید کرد که در برابر علف‌کش گلیفوسات مقاوم هستند (۲، ۶). کاهش نیاز به علف‌کش‌ها (۱۰ تا ۴۰٪) بر روی ارقام گیاهی که نسبت به آن علف کش مقاوم هستند باعث کنترل بهتر علف‌های هرز، افزایش بازده، عدم انتقال بقایای علف‌کش، کیفیت بهتر خاک، آب و هوا همراه با صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌های مربوط به خاک‌ورزی سنتی در کاهش علف‌های هرز یا استعمال چندین نوع علف‌کش برای از بین بردن انتخابی دقیق گونه‌های علف هرز گردید (۶). این گیاهان اکنون به طور گسترده در ایالات متحده آمریکا و برخی دیگر از کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرند و مقاومت به علف‌کش‌ها بیشترین ویژگی موجود در گیاهان اصلاح‌شده ژنتیکی است (۲).

۱۲-۱-۴) محصول مقاوم در برابر عوامل بیماریزا

بیوتکنولوژی کشاورزی با معرفی صفاتی به عنوان مقاومت در برابر بیماری به افزایش بهره‌وری محصولات کمک کرده است. به عنوان مثال، محققان دانشگاه هاوایی و دانشگاه کرنل دو رقم پاپایا مقاوم به ویروس لکه حلقوی پاپایا[2] را تولید کردند. بدین صورت ژن‌های پروتئین پوششی (Coat Protein) ویروس را به پاپایا منتقل کرده و در این گیاهان ایجاد مقاومت کردند، چراکه ژن‌های CP همانندسازی ویروس را در گیاه پاپایا دچار اختلال می‌کنند. بذرهای این دو

[1] Monsanto
[2] *Papaya ringspot virus*

رقم به نام‌های «SunUp» و «Rainbow» از سال ۱۹۹۸ تحت توافق‌نامه‌های صدور پروانه برای تولیدکنندگان پاپایا توزیع شده‌اند (۶).

۱۲-۱-۵) تحمل کم آبی

مطالعه روی گیاهان مقاوم به خشکی به دلیل ژنوتیپ پیچیده و همچنین اثر متقابل محیط زیست روی آن‌ها، دشوار است. پیشرفت‌های اخیر در ژنومیک، ارزیابی کارآمدتر و افزایش تنوع در مجموعه‌های ژرم پلاسم (ماده ژنتیکی سلول‌های زایا)، انتقال صفات ارزشمند به گیاهان و شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده‌ی صفات را فراهم کرده است. انتخاب به کمک نشانگرها به کاهش اثرات زیست محیطی می انجامد. در توسعه روش‌های انتخاب آزمایشگاهی پیشرفت‌های چشمگیری حاصل شده است. استفاده گسترده‌تر از صفات سایر گونه‌ها و روش‌های هیبرید و پلی‌پلوئیدی، دیدگاه‌های جدیدی را برای بهبود پتانسیل بازده و سازگاری با تنش‌های غیرزیستی ایجاد می‌کند (۲).

جدول ۴- نمونه هایی از گیاهان تراریخته حاصل از بیوتکنولوژی کشاورزی (Phillips, T., 2008)

صفت ژنتیکی	موجود نمونه	تغییر ژنتیکی
محصولات تجاری تایید شده		
مقاومت به علف‌کش	گیاه سویا	مقاومت به علف‌کش گلیفوسات (Roundup) با بیان آنزیم EPSPS جدا شده از باکتری *آگروباکتریوم تومفاشینس*؛ سویهCP4.
مقاومت در برابر حشرات	ذرت	بیان پروتئین حشره‌کش Cry1Ab از *باسیلوس تورنژینسیس*.
ترکیب تغییریافته اسیدهای چرب	کلزا	افزایش سطح لورئات با انتقال ژن ACP تیواستراز از درخت خلیج کالیفرنیا[1] به کلزا.
مقاومت به ویروس	آلو	مقاومت به ویروس آبله آلو با انتقال ژن پروتئین پوششی (CP) از ویروس به گیاه.
محصولات در حال توسعه		
غنی‌سازی ویتامین	برنج	سه ژن برای تولید بتاکاروتن، پیش ماده ویتامین A، در آندوسپرم برنج قرار داده شد که از حذف آن در طی آسیاب جلوگیری می‌کند.
واکسن‌ها	توتون	آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت تولید شده در توتون تراریخته باعث ایجاد یک پاسخ ایمنی هنگام تزریق به موش‌ها می‌شود.
واکسن‌های خوراکی	ذرت	فیوژن پروتئین از ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) بیان شده در دانه‌های ذرت باعث ایمنی جوجه‌هایی که از آن تغذیه می‌کنند، می‌شود.

۱۲-۲) دستاوردهای کشت بافت گیاهی در بهبود محصولات

کشت بافت، بازسازی گیاهان از قسمت‌های گیاهی عاری از بیماری در محیط آزمایشگاه است. این روش امکان تولید مثل بخش‌های عاری از بیماری را برای محصولات کشاورزی فراهم می‌کند. نمونه‌هایی از محصولات تولید شده با استفاده از کشت بافت شامل مرکبات، آناناس، آووکادو، انبه، موز، قهوه، نیشکر، سیب و پاپایا هستند. کشت بافت گیاهی یک فناوری است که با استفاده از آن، محصولات بسیاری تولید شده است. از این ابزارها می‌توان برای افزایش

[1] *Umbellularia californica*

سرعت یا کارایی فرآیند تکثیر، بهبود قابلیت دسترسی به ژرم پلاسم موجود و ایجاد تغییرات جدید برای اصلاح محصولات استفاده کرد. در این جا به بعضی از آن‌ها اشاره می‌شود (۲).

۱۲-۲-۱) تکثیر غیرجنسی

استفاده از تکنیک‌های مختلفی از جمله ریزازدیادی نشان می‌دهد که این روش‌ها بسیار پیشرفته بوده و از آن‌ها برای توسعه محصولات استفاده می‌شود. به عنوان مثال، کشت بافت مریستم در محصولات غده‌ای و ریشه‌ای مانند گیاهان کاساوا، یَم، سیب زمینی شیرین، سیب زمینی ایرلندی و درختان میوه مانند مرکبات با موفقیت همراه بوده است (۲).

۱۲-۲-۲) میکروگرافت[1]

در این روش مریستم‌های بالغ از درختان میوه و جنگلی جدا می‌شود و در شرایط ضدعفونی شده و کاملاً تمیز روی پایه‌های نهال قرار داده می‌شود. اهداف این روش به دست آوردن نهال‌های پیوندی عاری از بیماری‌های گیاهی به عنوان مثال در مرکبات و نیز به دست آوردن شاخه‌های جوان از درختان بالغ می‌باشد (۲).

۱۲-۲-۳) تنوع سوماکلونال[2]

تنوع سوماکلونال ابزاری‌است که توسط اصلاح کنندگان گیاه، استفاده می‌شود. عوامل تأثیرگذار روی تنوع تولید شده از این نوع کشت بافت عبارت‌اند از: (۱) مرحله رشد گیاه، (۲) ژنوتیپ، (۳) تنظیم‌کننده‌های رشد و (۴) منبع بافتی. انواع سوماکلونال تولید شده از کشت بافت کالوس نیشکر، توتون، سورگوم، سیب زمینی، برنج و گندم منابع جدیدی

[1] Micrografting
[2] Somaclonal Variability

از تنوع را در اختیار تولیدکنندگان قرار داده‌است تا از آن‌ها در روش‌های اصلاح سنتی استفاده کنند. صفات مفید زراعی مانند افزایش تحمل به استرس فیزیولوژیک، آفات و بیماری‌ها از این نمونه‌ها گرفته شده است (۲).

۱۲-۲-۴) تولید گیاهان هاپلوئید

در صورت امکان تولید گیاهان هاپلوئید یا دیپلوئید از گرده‌های نابالغ، مدت زمان نسبتاً کوتاهی برای تولید گیاهان هموزیگوت نیاز است. روش‌های مرسوم بازسازی گیاهان هموزیگوت ۵-۶ سال و بیشتر طول می‌کشد اما در برخی موارد به عنوان مثال برای جو، توتون و برنج، بازسازی گیاهان هاپلوئید در کمتر از دو سال انجام شده‌است. بنابراین، این روش باعث صرفه‌جویی در وقت و زمین مورد نیاز برای کشت می‌شود (۲).

۱۲-۲-۵) امتزاج سوماتیک[1]

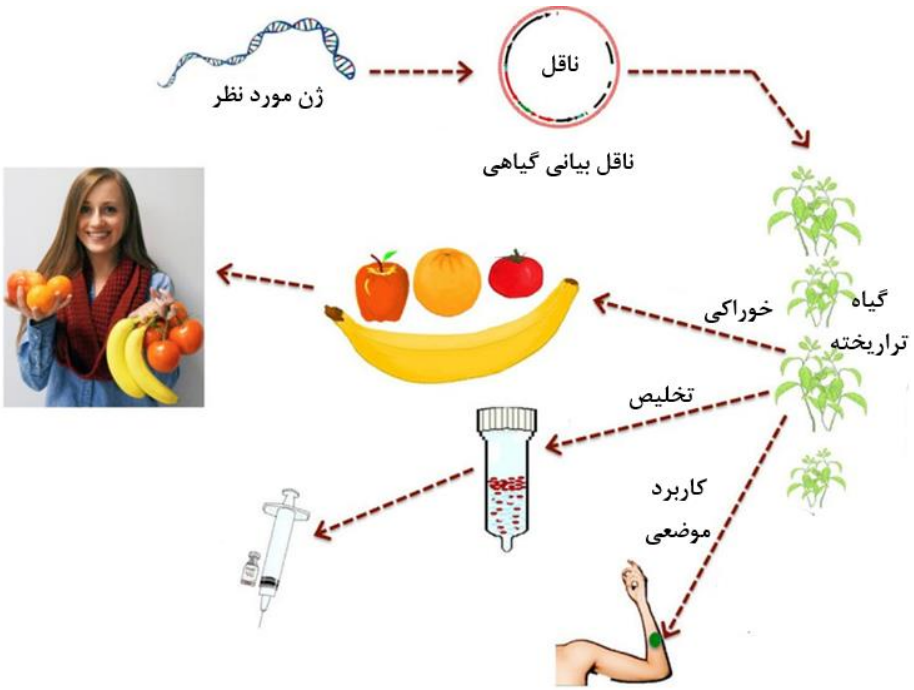
همجوشی پروتوپلاست یکی از راه‌های ایجاد جریان ژن بین گونه‌های وحشی با ویژگی‌های تحمل تنش و گونه‌های کشت‌شده غیرمقاوم است. احیای گیاهان از پروتوپلاست‌های جداشده امکان‌پذیر است. تکنیک‌های کشت‌بافت گیاهی مانند کشت بذر، کشت مریستم، کشت جوانه نیز دستاورد بیوتکنولوژی از طریق تکنیک‌های کشت بافت گیاهی است که برای بهبود محصولات استفاده می‌شود (۲).

۱۲-۳) محصولات تراریخته به منظور کشاورزی مولکولی

کشاورزی مولکولی به عنوان صنعتی نوین در زیست فناوری (بیوتکنولوژی) کشاورزی محسوب می‌شود و به معنی ایجاد گیاهان تراریخته به منظور تولید پروتئین های خارجی و یا دیگر ترکیبات ارزشمند دارویی و درمانی در گیاهان

[1] Somatic Hybridization

مهندسی ژنتیک شده می‌باشد. به عبارت دیگر، کشاورزی مولکولی گیاهی[1] (PMF) شامل استفاده از گیاهان تراریخته به عنوان بسترهای تولید (بیوراکتور) برای ترکیبات با اهداف دارویی یا صنعتی است (شکل ۲۵). انسولین تولید شده توسط باکتری‌های مهندسی شده با DNA انسانی نوترکیب، اولین داروی زیستی بود که در سال ۱۹۸۲ به بازار عرضه شد. Andrew و همکاران در سال ۱۹۸۹ تولید آنتی‌بادی IgG گیاهی را گزارش دادند. اولین پروتئین دارویی نوترکیب گیاهی[2] (PDP) آلبومین سرم انسانی بود که ابتدا در سال ۱۹۹۰ در گیاهان تراریخته توتون و سیب زمینی تولید شد (۶). در ادامه به تفکیک در خصوص استفاده از تکنولوژی کشاورزی مولکولی در تولید واکسن‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، کربوهیدراتها و لیپیدها اشاره شده است.



شکل ۲۵– تصویری از فرایند کشاورزی مولکولی گیاهی (PMF). انتخاب ژن هدف، قراردادن ژن در وکتور مناسب بیانی، انتقال به گیاه موردنظر و تولید گیاه تراریخته که می‌تواند محصول موردنظر بصورت خوراکی یا پس از خالص‌سازی به صورت دارو و یا به صورت موضعی استفاده شود.

[1] Plant Molecular Farming
[2] Plant-derived pharmaceutical protein

۱۲-۳-۱) واکسن‌ها

واکسن‌های خوراکی از گذشته به عنوان یک راه حل احتمالی برای حل مشکل افزایش بیماری در کشورهای توسعه نیافته که هزینه‌های زیادی برای واکسیناسیون گسترده وجود دارد، در دست بررسی بوده‌اند. محصولات مهندسی شده ژنتیکی، اغلب میوه‌ها یا سبزیجات، برنامه‌ریزی شده‌اند تا پروتئین‌های آنتی‌ژنیک را از عوامل بیماری‌زای قابل انتقال که هنگام تزریق، پاسخ ایمنی را فعال می‌کنند منتقل نمایند. نمونه‌ای از این دست، واکسن اختصاصی برای درمان سرطان است. یک واکسن ضد لنفوم با استفاده از گیاهان توتون حامل RNA از سلول‌های B بدخیم همسان‌سازی شده، ساخته شده است. سپس پروتئین حاصل برای واکسیناسیون بیمار و تقویت سیستم ایمنی بدن وی در کنار سرطان استفاده می‌شود. واکسن‌های سفارشی ساخته شده برای درمان سرطان در مطالعات اولیه بسیار نوید بخش بوده‌اند (۶).

واکسن گیاهی: از گیاهان تراریخته می توان به جای فرمانتورها (وسیله ای است که برای انجام فرآیند تخمیر با استفاده از میکروارگانیسم ها استفاده می شود) برای بیان پروتئین‌های نوترکیب استفاده کرد، پروتئین‌های ایمنی‌زای عوامل بیماری زای انسانی و حیوانی را در بافت‌های گیاهی سنتز کردند و سپس به صورت واکسنهای خوراکی توسط انسان و حیوانات اهلی مصرف شد. بدین ترتیب، گیاهان تراریخته برای بیان آنتی‌ژن‌ها توسعه یافتند.

۱۲-۳-۲) آنتی‌بیوتیک‌ها

از گیاهان برای ساخت آنتی‌بیوتیک مورد استفاده انسان و جانوران استفاده می‌شود. یک پروتئین آنتی‌بیوتیک بیان‌شونده در غذا، که به طور مستقیم به جانوران خورانده می‌شود، هزینه کمتری نسبت به تولید سنتی آنتی‌بیوتیک دارد؛ اما این عمل بسیاری از مسائل مربوط به اخلاق زیستی را موجب می‌شود؛ زیرا نتیجه آن استفاده شایع و احتمالاً غیرضروری از آنتی‌بیوتیک‌ها است که ممکن است باعث گسترش سویه باکتریایی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک شود. مزایای استفاده از گیاهان در ساخت آنتی‌بیوتیک برای انسان، هزینه‌های کمتر به دلیل مقدار بیشتری از محصول است که می‌تواند از گیاهان در برابر یک واحد تخمیر تولید شود، سهولت تصفیه و خطر آلودگی کمتر در مقایسه با استفاده از سلول‌های پستانداران و محیط‌های کشت است (۶).

۱۲-۳-۳) تولید آنزیم‌ها

آنزیم های مختلفی توسط گیاهان قابل بیان و تخلیص می باشد که هر یک از آنها در صنایع گوناگون کاربرد دارند. جدول زیر تولید آنزیم نوترکیب در گیاهان را به طور خلاصه نشان می‌دهد.

آنزیم	کاربرد
آویدین	کیت‌های تشخیصی
β-گلوکورونیداز	کیت‌های تشخیصی
تریپسین	دارویی، مراقبت از زخم
سلولاز	تولید اتانول از زباله‌های سلولزی
زایلاناز	فراوری زیست‌توده
فیتاز	تجزیه فیتاز، استفاده بهبود یافته از فسفات
α-آمیلاز	فراوری غذا
(۱-۳)(۱-۴) β-گلوکاناز	آبجوسازی
لیگنین پراکسیداز	ساخت کاغذ
منبع: (Drake and Christou; 2003)	

۱۲-۳-۴) تولید کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و مشتقات آن‌ها

کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و مشتقات آن‌ها نیز توسط گیاهان قابل تولید است که کاربردهای گوناگونی در صنایع مختلف دارند در جدول زیر به برخی از این محصولات اشاره شده است.

ترکیب	منشأ ژن‌ها	کاربرد	گیاه تراریخته
نشاسته فاقد آمیلوز	سیب زمینی	غذایی، صنعتی	سیب زمینی
سیکلودکسترین‌ها	*کلبسیلا پنومونیه*	غذایی، دارویی	سیب زمینی
پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات	*Alcaligenes eutrophus*	پلاستیک زیست تخریب‌پذیر	سویا
منبع: (Christou, P and Harry, K; 2004)			

۱۳) نگرانی‌های احتمالی در تولید و آزادسازی محصولات تراریخته

تولید و استفاده از محصولات تراریخته نگرانی‌هایی از منظر سلامت انسان، اثرات زیست محیطی، مسائل و مشکلات اقتصادی و مسائل اجتماعی و اخلاقی ایجاد کرده است که در ادامه به طور مختصر به آنها اشاره شده است.

۱۳-۱) در حوزه سلامت انسان

یک نگرانی عمده در زمینه ایمنی که با توجه به فناوری مهندسی ژنتیک مطرح شده است، خطر ورود آلرژن‌ها و توکسین‌ها به غذاهای غیر ایمن است. به عنوان مثال مصرف سویای تراریخته (حاوی ژن کد کننده متیونین از بلوط برزیلی[1]) باعث واکنش آلرژیک در افرادی که به مغزهای برزیلی آلرژی دارند، می‌شود (۶).

[1] Brazil nut

مثال دیگر مربوط به کرفس است که در برابر پلاسیدگی پس از برداشت مقاوم بود و مشخص شد این گیاه عامل بثورات پوستی در افرادی است که در سوله‌های بسته‌بندی آن کار می‌کنند. نوع جدید کرفس تراریخته، دارای مقادیر بیشتری از یک محصول طبیعی، یعنی پسورالن[1] است که در برابر پلاسیدگی مقاوم است و این ماده باعث تحریک پوست می‌شود (۶).

هنگامی که ژن ارائه شده از منبع آلرژن استخراج شده باشد، نیاز به آزمایش غذای جدید در افرادی که آلرژی شناخته شده به جاندار دهنده دارند، وجود دارد. سازمان غذا و داروی آمریکا بررسی می‌کند تا مطمئن شود سطح آلرژن‌های موجود در غذاهای ساخته شده از جانداران تراریخته بیش از حد طبیعی موجود در غذاهای معمولی افزایش پیدا نکرده باشد. همچنین از فناوری تراریخته برای از بین بردن آلرژن‌ها در بادام زمینی که یکی از جدی‌ترین دلایل آلرژی غذایی است، استفاده می‌شود (۶).

انتقال ژن نشانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی از محصول اصلاح شده ژنتیکی به باکتری‌های روده‌ای یکی دیگر از نگرانی‌ها در حوزه سلامت انسان است. WHO ژن‌های نشانگر آنتی‌بیوتیکی را ایمن ارزیابی کرده است اما اگر آن‌ها منبع اصلی مقاومت در برابر دسته وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها باشند، ممکن است نتیجه استفاده از آن‌ها خطرناک باشد. این مسئله در هنگام تجاری‌سازی گوجه فرنگی Flavour Savor مطرح شد اما رایزنی شد که آنزیم در سطح پایین تولید می‌شود و مطلقاً هیچ تأثیری بر آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی ندارد. با این حال، FDA[2] (سازمان غذا و داروی ایالات متحده) برای

[1] Psoralen
[2] U.S. Food and Drug Administration

اطمینان خاطر، به توسعه‌دهندگان مواد غذایی توصیه کرده است که استفاده از ژن‌های نشانگر که مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مهم از نظر بالینی را رمزگذاری می‌کنند، خودداری نمایند (۶).

از جمله نگرانی‌های دیگر در این حوزه این است که کارگران مزرعه ممکن است با جذب محصولات به دست آمده از برگ از طریق پوست، استنشاق گرده، یا تنفس غبار هنگام برداشت، در معرض سطوح ناسالم یک ماده زیست‌دارویی باشند (۶).

۱۳-۲) در حوزه زیست‌محیطی

یکی از بحث برانگیزترین موضوعات، ترس از این است که یک محصول تراریخته به مجرای بالقوه انتقال ژن‌ها به گیاهان غیر GMO[1] (موجود تغییر ژنتیکی یافته) از همان نوع یا گونه‌های نزدیک مرتبط تبدیل شود. بنابراین، هنگامی که بدون کنترل دقیق علمی وارد گونه‌های دیگر شود، ممکن است اثرات غیر قابل پیش‌بینی ایجاد کند. به عنوان مثال می توان به گسترش علف هرز مقاوم (کودزو[2]) با دستیابی به ژن مقاوم به علف‌کش‌ها اشاره نمود(۶).

علاوه بر این، اگر انتقال ژن از محصولات تراریخته به یک محصول غیر GMO روی دهد، این امر می‌تواند برای کشاورزانی که فروشنده این محصولات به مشتریان هستند و همین طور نهادهایی که مایل به مصرف محصولات غیر GMO هستند، تأثیر منفی داشته باشد (۶).

[1] Genetically Modified Organism
[2] Kudzu

حتی بدون انتقال ژن به گونه‌های وحشی، گیاهان تراریخته ممکن است یک اکوسیستم را مختل کنند. به عنوان مثال، یک ژن ارائه شده ممکن است مقاومت به آفت یا علف‌کش را در مزرعه ایجاد کند تا عملکرد کلی محصول را بهبود بخشد. اکوسیستم‌ها شامل اتصالات پیچیده و یکپارچه بین جانداران موجود در محیط هستند. ارائه یک متغیر جدید می‌تواند به اندازه کافی قابل توجه باشد که بر جانداران غیر هدف که در همان محیط محصول تراریخته زندگی می‌کنند، تأثیر بگذارد. اغلب این عواقب تا قبل از ورود محصول به یک اکوسیستم، مورد مطالعه یا توضیح قرار نمی‌گیرند. مثلاً ذرت *Bt*، آفت‌کش بسیار خاصی تولید می‌کند که هدف آن فقط از بین بردن آفاتی است که از ذرت تغذیه می‌کنند. با این حال، در سال ۱۹۹۹، محققان دانشگاه کرنل دریافتند که گرده ذرت *Bt* می‌تواند لارو پروانه بی‌ضرر مونارک را از بین ببرد. هنگامی که آن‌ها لاروهای پروانه مونارک را با غذای اصلی نوزاد این پروانه یعنی گیاه علف شیر[1] آغشته شده با گرده ذرت *Bt* در آزمایشگاه تغذیه کردند، نیمی از لاروها مردند. اما مطالعات میدانی بعدی نشان داد که در شرایط زندگی واقعی، بسیار نامحتمل است که لارو پروانه‌های مونارک با گرده ذرت *Bt* که به سمت برگ‌های علف شیر کشیده شده تماس داشته باشند یا مقدار کافی از آن را بخورند تا به آن‌ها آسیب برساند (۶).

محصولات GM می‌توانند برداشت تک کشتی مشارکت کننده در کاهش بیشتر بهره‌وری زمین و تنوع ژنتیکی را تقویت کنند. ژن معرفی شده یا محصول آن ممکن است اثرات منفی بر محیط طبیعی داشته باشند. به عنوان مثال، حیوانات وحشی که از محصولات کشاورزی تغذیه می‌کنند ممکن است مقادیر مضر PMP[2] (پروتئین‌های دارویی

[1] Milkweed
[2] Plant-Made Pharmaceutical(s)

تولید شده در گیاهان با تکنیک‌های زیست‌فناوری) را بلعیده و یا میکروارگانیسم‌های خاک با تجزیه باقیمانده محصول یا مواد خارج شده از ریشه گیاهانی که برای تولید پروتئین‌های دارویی مهندسی شده‌اند، مهار گردند. اگر ژن تولید حشره‌کش به گیاهان وحشی گسترش یابد، می‌تواند تأثیرات جدی بر روی طیف وسیعی از حشرات از جمله از دست دادن برخی از گونه‌های مفید داشته باشد. مثال: ذرت نشأت گرفته از مکزیک بیشترین تنوع زیستی گونه‌های ذرت را در جهان دارد اما اکنون گزارش شده است که انواع ذرت وحشی موجود در برخی مناطق مکزیک توسط برخی ژن‌های جاندار اصلاح شده ژنتیکی آلوده شده است (۶).

استفاده از گیاهان تراریخته مقاوم به آفات، ممکن است با گذشت زمان منجر به سازگاری آفات به این روش کنترل شده و حشرات آفت مقاومی تولید شوند که برای مقابله با آن‌ها مجبور به استفاده از سموم شیمیایی قوی‌تر شویم و لذا این سموم بر روی محیط زیست اثرات منفی بگذارند (۶).

وجود گیاهان مقاوم در برابر ویروس می‌تواند ویروس‌ها را به قدرتمندتر شدن ترغیب کند و یا باعث ایجاد نوع جدید و قوی‌تری شود که می‌تواند گیاه را آلوده کند (۶).

۱۳-۳) در حوزه اقتصاد

سیستم IPR[1] (حقوق مالکیت فکری) WTO[2] (سازمان تجارت جهانی) به شدت در برابر کشورهای در حال توسعه مغرضانه عمل می‌کند. نه تنها این حق را برای MNC[3]ها (شرکت‌های چند ملیتی) فراهم می‌کند که منابع ژنتیکی

[1] Intellectual Property Rights
[2] World Trade Organization
[3] Multinational corporation

را بدون هیچ گونه جبران خسارت یا به میزان کافی تصاحب کنند، بلکه از ذخیره و استفاده مجدد بذرهای اصلاح شده توسط کشاورزان نیز جلوگیری می‌کند. بنابراین، مجبور شدن به اینکه سال به سال برای خرید بذر به غول‌های بذر مراجعه کنند، از نظر مالی برای آن‌ها غیرقابل تحمل است و منجر به افزایش آسیب‌پذیری می‌گردد. از سال ۱۹۹۰ مونسانتو (یکی از شرکت های پیشرو در مهندسی زنتیک) از ۱۴۵ کشاورز به دلیل «نقض حق ثبت اختراع» شکایت کرده است. مونسانتو ادعا می‌کند که کشاورزان از گیاهان تراریخته آن‌ها بدون پرداخت هزینه استفاده می‌نمایند (۶). پرورش گیاه برای پیشرفت و نگهداری، به ژرم پلاسم متنوع از نظر ژنتیکی متکی است، که در کشاورزی سنتی به عنوان یک منبع مشترک با ارزش بسیار زیاد در نظر گرفته می‌شود و به طور آزاد در دسترس است. رفتار با چنین اشکال سنتی کشاورزی به عنوان بازارهایی که توسط منافع خصوصی تسخیر می‌شوند غیراخلاقی می‌باشد (۶).

برخی از محصولات تراریخته با فناوری خاتمه‌دهنده طراحی شده‌اند که بذرهای نابارور تولید می‌کند. این امر جریان مداوم درآمد شرکتی را که بذرها را طراحی و به فروش می‌رساند تضمین می‌نماید. به همین دلیل کشاورزان به جای اینکه بذر حاصل از محصول یک سال را برای کاشت سال بعد ذخیره کنند هر ساله به خرید بذر وابسته می‌شوند و تنها کشاورزان بزرگ مقیاس سود می‌برند (۶).

بذرهای GM کشاورزان را قادر می‌سازد تا کشاورزی دقیق و کشت در ردیف باریک انجام دهند، برای کشاورزان کوچک، دستیابی به زمین‌های تقسیم‌بندی شده با ورودی‌های تکنولوژیکی اندک، بسیار دشوار است. فقط کشاورزان ثروتمند قادر به تهیه این بذرهای گران‌تر هستند. علاوه بر این، این محصولات منجر به افزایش انعطاف‌پذیری در شیوه‌های کشاورزی مانند کنترل ساده علف‌های هرز، خاک‌ورزی حفاظتی، کنترل در طیف گسترده و غیره شده است

که همگی به کاهش نیاز به نیروی کار منجر گردیده‌اند. از این رو، تأثیرات اقتصادی نامطلوب بر کشور در حال توسعه پر کارگر دارند (۶).

محصولات گیاهانی که برای تولید پروتئین‌های دارویی با روش‌های زیست‌فناوری دستکاری شده‌اند (PMP) ممکن است با محصولات غذایی انسان یا خوراک دام مخلوط شوند. این امر می‌تواند از طریق برچسب‌گذاری نامناسب محصولات تراریخته، مخلوط شدن بذر در کاشت، برداشت، حمل و نقل یا فرآوری اتفاق بیفتد. در یک مورد در سال ۲۰۰۱، ProdiGene در حذف گیاهان ذرت PMP از محصول سویا که بعدا در همان زمین کاشته شده بود، شکست خورد. این شرکت توسط USDA[1] (وزارت کشاورزی ایالات متحده) به میزان ۲۵۰هزار دلار جریمه شد و به بازپرداخت ۳ میلیون دلار به دولت برای هزینه‌های مربوط به از بین بردن ۱۲,۷۰۰,۰۰۰ کیلوگرم سویای بالقوه آلوده ملزم گردید (۶).

۱۳-۴) در حوزه اجتماعی و اخلاقی

از منظر اجتماعی و اخلاقی نیز تولید و آزادسازی محصولات تراریخته و استفاده از آنها در زندگی بشر، نگرانی‌ها یی را در پی دارد. نقض ارزش‌های ذاتی موجودات طبیعی، دستکاری در طبیعت با مخلوط کردن ژن‌ها در بین گونه‌ها، رنج بردن جانور، استفاده از جانوران فقط به عنوان کارخانه‌هایی برای تولید پروتئین‌های دارویی، ورود به قلمروهایی که تنها متعلق به خداست، نگرانی گیاه‌خواران از ورود توالی ژنی جانوران به گیاهان و نهایتا استفاده از جاندران دارای

[1] United States Department of Agriculture

وجهه ی مقدس و مذهبی در تحقیقات تراریخته از جمله نگرانی‌های اجتماعی و اخلاقی در تولید و استفاده از گیاهان تراریخته یا دستکاری ژنتیکی‌شده در زندگی بشر می‌باشند (۶).

۱۳-۵) محافظت‌های پیشنهادی

به منظور کاهش نگرانی‌ها یا اعتراضات مختلف در حوزه‌های اشاره شده در بالا در خصوص تولید و رهاسازی محصولات تراریخته در طبیعت، راهکارهای حفاظتی پیشنهاد شده است که در ادامه به آنها پرداخته می شود.

- **مهار فیزیکی**: رشد گیاهان تراریخته در ساختارهای فیزیکی (تونل‌های پلاستیکی، گلخانه) به جلوگیری از آلودگی محیط یا مواد غذایی کمک می‌کند.
- **مهار فضایی**: شامل چندین استراتژی با هدف به حداقل رساندن میزان لقاح بین گیاهان دارویی، صنعتی و سایر محصولات است.
- **زمین اختصاصی**: شامل تولید محصولات کشاورزی مولکولی یعنی محصولات تراریخته با هدف تولید مواد با ارزش دارویی یا صنعتی، در مناطقی است که محصولات مشابه غیرتراریخته یعنی محصولات زراعی سنتی با هدف غذای انسان یا علوفه دام در آن‌ها رشد نمی‌کنند یا در مکان‌هایی که از این مناطق بسیار دور است.
- **استفاده محدود**: بدین معناست که بعد از استفاده از زمین برای کشت گیاه تراریخته به هدف تولید داروی زیستی، در سال بعد در آن زمین محصول غذایی کشت نشود.

- **تراریختی پلاستید:** از آنجا که گرده بسیاری از گونه‌های زراعی فاقد کلروپلاست است، ممکن است تراریخته از طریق گرده‌افشانی قابل انتقال نباشد.
- **عقیم‌سازی نر:** آقای چیس گزارش داد که القای عقیم کردن نر در گیاهان تراریخته وسیله‌ای است که از طریق آن از انتقال ژن‌ها به سایر گیاهان جلوگیری می‌شود.
- **جلوگیری از رهاسازی از ریشه:** این امر شامل جلوگیری از رهاسازی یا انتشار محصول از ریشه گیاهان تراریخته و در نتیجه کاهش «آلودگی پروتئین» و کاهش خطر برای جوامع میکروبی خاک و ریزوسفر است.
- **بیان القایی پس از برداشت:** در این روش، ژن تراریخته به هیچ وجه در گیاهان مزرعه بیان نمی‌شود بلکه پس از برداشت محصول آن را در معرض یک محرک شیمیایی یا محیطی قرار می دهند که باعث بیان تراژن در درون محصول شده و ویژگی مد نظر را در محصول اعمال می‌کند (۶).

۱۴) نتیجه گیری و چشم انداز آینده بیوتکنولوژی کشاورزی

بیوتکنولوژی در کشاورزی دارای کاربردهای متنوع، رویکردهای مختلف فناوری و مجموعه وسیعی از محصولات است. تولید بذر هیبرید در گیاهان به سرعت در حال توسعه است. توسعه‌ی بیوتکنولوژی‌های جدید که شامل دستکاری ژن، امتزاج سوماتیک و جهش‌زایی است، منجر به شناسایی نقش‌های خاص میتوکندری، کلروپلاست و DNA هسته‌ای در رشد سلول، باروری و کنترل گل‌زایی شد (۲).

بیوتکنولوژی از دو جنبه مهم می‌تواند به توسعه پایدار کمک کند. اول، یکپارچه‌سازی برنامه‌هایی برای بهبود محصولات موجود؛ بیوتکنولوژی بهره‌وری کشاورزی را فراتر از آنچه فقط با تکنیک‌های مرسوم امکان پذیر است، افزایش می‌دهد. این امر ضمن ترویج الگوهای تولید سازگار با محیط زیست، در دسترس بودن مواد غذایی با قیمت‌های مقرون به صرفه را نیز افزایش می‌دهد. دوم، تکنولوژی‌های مناسب زیستی می‌توانند درآمد حاصل از تولیدات کشاورزی را که منبع اصلی درآمد و اشتغال روستاییان در مناطق بزرگ جهان است، افزایش دهند (۲).

البته به طور کلی، از بیوتکنولوژی محصولات کشاورزی برای افزایش مواد غذایی و کاهش فقر نباید بیش از حد انتظار داشت. بسیاری از مشکلات در کشورهای با درآمد کم و متوسط با راه حل‌های تکنولوژی قابل حل نیستند. محصولات تراریخته یعنی محصولاتی که توسط مهندسی ژنتیک تغییر یافته‌اند، به ویژه آن‌هایی که در برابر عوامل تنش‌زا، چه عوامل تنش‌زای زیستی و چه عوامل تنش‌زای غیرزیستی، مقاومت دارند، به خوبی در سیستم‌های کشاورزی در مقیاس کوچک قرار می‌گیرند و به راحتی می‌توانند بدون بررسی و تنظیم روش‌های سنتی کشت، ادغام شده و تکثیر شوند. هزینه‌ی نسبتاً کم استفاده از فناوری‌های مهندسی ژنتیکی در سطح مزارع، استفاده از این فناوری‌ها را در کشاورزی افزایش می‌دهد (۲).

کشت سلول، بافت و اندام گیاهی جهت اهداف مختلفی استفاده می‌شود؛ از جمله ریزازدیادی که گسترده‌ترین و موفقیت‌آمیزترین کاربرد در سطح تجاری است و به یقین در آینده نیز ادامه خواهد داشت. هدف دیگر مهندسی ژنتیک است که برای اعطای قابلیت تحمل نسبت به آفات و علف‌کش‌ها در محصولات مهم کشاورزی استفاده می‌شود

و باعث افزایش تولید و بازده همراه با استعمال کمتر حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌های سمی در میلیون‌ها هکتار در سراسر جهان می‌گردد. پیش بینی شده است تولید محصولات تراریخته مختلف مقاوم به خشکی، شوری یا سرما، در آینده تأثیر قابل توجهی خواهد داشت. علاوه بر این، تراریختی ژنتیکی قطعاً ابزاری راهبردی برای مقابله با گرم شدن کره زمین و پیامدهای آن از طریق تولید گیاهان تراریخته مقاوم در برابر عوامل غیر زیستی خواهد بود. هنوز انتظار می‌رود مهندسی ژنتیک به توسعه محصولات تراریخته با افزایش ارزش غذایی یا دارویی یا مقاوم در برابر بیماری‌های ناشی از قارچ، باکتری یا ویروس کمک کند. سهم مهندسی متابولیک گیاهی در توسعه محصولات با کارایی بیشتر متابولیکی یا دارای مسیر بیوشیمیایی اصلاح شده که منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه تجاری می‌شود، کند و متوسط بوده است، اما باید نویددهنده تنظیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه متنوع مطلوب صنعتی و دارویی باشد. ارزیابی کمّی تأثیری که کشت بافت در اصلاح گیاهان و بهبود محصولات با استفاده از نجات رویان، تولید هاپلوئید مضاعف یا دورگه‌سازی سوماتیک داشته و خواهد داشت بسیار دشوارتر است، اما مطمئناً می‌توانند در دستیابی به محصولات دورگه بهبودیافته نقش داشته باشند و تولید را افزایش دهند. از تنوع سوماکلونال در کشت بافت برای نجات یا بازیابی مواد جالبی که منجر به تولید ارقام جدیدی می‌شوند، استفاده شده است و بدون شک در آینده نیز استفاده از آن برای جداسازی سوماکلونال‌هایی با صفات جدید پلی‌ژنیک که سازوکارهای پشت صحنه ویژگی‌های زراعی پیچیده آن‌ها ناشناخته است، ادامه خواهد یافت (۷).

تکنیک‌های ویرایش ژنوم راهی جدید و گسترده برای انقلاب سبز دوم ایجاد کرده‌اند و مطمئناً امکان ایجاد انواع گیاهان جدید با صفات زراعی مفید از طریق دستکاری دقیق تغییرات خاص ژنتیکی در گونه‌های محصولات مهم را فراهم خواهد کرد. توسعه تکنیک‌های توالی‌یابی ژنوم و ترنس‌کریپتوم با توان بالا[1]، کاربرد جداسازی و تعیین توالی پروتئین و بهبود استخراج، جداسازی و شناسایی متابولیت‌ها و همچنین در دسترس بودن داده‌ها در پایگاه‌های داده عمومی، به رمزگشایی تشکیلات ژنوم، عملکرد و تنظیم ژن، پیش‌بینی عملکرد پروتئین و آگاهی از مجموعه متابولیت‌های تولید شده در گونه‌های مختلف گیاهی کمک نموده است. بنابراین اومیکس به ابزاری اساسی برای مطالعه فرآیندهای اصلی بیولوژیکی در گیاهان تبدیل شده است. ادغام اومیکس برای درک بهتر تمام پدیده‌های بیولوژیک مطلوب است. بدیهی است که اومیکس برای بررسی فرآیندهای ریخت‌زایی در شرایط آزمایشگاهی بسیار مفید خواهد بود و اگر ژن‌های کنترلی اصلی تمایز و تکوین، شناسایی و مشخص شوند، می تواند به کار بردن پروتکل‌های بازسازی گیاه در شرایط آزمایشگاهی را تسهیل نماید. از طرف دیگر، ترکیبی از اومیکس‌های مختلف باید مهندسی متابولیک مسیرهای بیوشیمیایی جالب توجه را به منظور دستکاری ویژگی‌های اختصاصی جهت بهینه‌سازی و تولید متابولیت‌های ثانویه مهم از نظر صنعتی و دارویی امکان‌پذیر سازد (۷).

ظهور ابزارهای جدید مولکولی امکانات جدیدی را برای تولید متابولیت‌های مهم با استفاده از سیستم‌های گیاهی ارائه می‌دهد. مهم‌ترین مورد در این زمینه، استفاده از مهندسی ژنوم هدفمند، به ویژه ویرایش ژنوم به کمک کریسپر[2]

[1] High-throughput
[2] CRISPR/Cas9

است. استفاده از این رویکرد فناورانه، امکان تولید انواع جدید گیاهی بدون ارائه ژن‌های خارجی را ایجاد می‌کند. ویرایش ژن می‌تواند به طور بالقوه برای ابداع آلل‌های جدید، جایگزینی پروموتر یا ارائه مسیرهای جدید مورد استفاده قرار گیرد که تمام این موارد می‌توانند به ایجاد سیستم‌های مبتنی بر گیاه که قادر به بیان جدید مولکول‌های فعال مفید هستند، منجر شوند (۵).

هنگامی که گیاه مهندسی شد (با ویرایش ژن توسط کریسپر یا با روش‌های سنتی) و از کشت آزمایشگاهی عبور کرد، می‌توان مواد ژنتیکی را با استفاده از بانک‌های بذر اصلی و در حال کار ذخیره کرد. سپس می‌توان از این گیاهان برای تولید متابولیت‌های مورد نظر از جمله داروهای گیاهی، در مقیاس وسیع استفاده کرد. سه گزینه برای کشت گیاهان مهندسی شده در دسترس است: در صورت قانونی بودن، تحت شرایط باز مزرعه، در گلخانه‌های معمولی یا در واحدهای کشاورزی عمودی، که دو گزینه آخر، سهولت در افزایش مقیاس و نگهداری مناسب از گیاهان را امکان‌پذیر می‌کنند. برخی از گیاهان از جمله گیاهان دارویی، در شرایط آزمایشگاهی (نرخ رشد سریع‌تر) دارای مزیت هستند و بنابراین باید در این شرایط حفظ شوند. با در نظر گرفتن این موضوع چندین اقدام می‌تواند باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه توسط سلول های گیاهی شود. امروزه به دستکاری عوامل محیطی از جمله دمای بالا/پایین، خشکی، اشعه فرابنفش، قلیایی بودن، شوری، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین و سایر موارد تأکید می‌شود. این شرایط که به طور بالقوه به گیاهان آسیب می‌رسانند، غالباً ظرفیت تولید را افزایش داده یا حتی سنتز متابولیت‌های ثانویه را در کشت‌های آزمایشگاهی، تحریک می‌کنند (۵).

استفاده از کشت بافت آزمایشگاهی همچنان یک راهبرد عملی برای تولید محصولات طبیعی با ساختار پیچیده و ارزش بالا است. به ویژه اگر گیاه منبع بیش از حد بهره‌برداری شده، کند رشد یا کم بازده باشد. با این حال، به دلیل هزینه‌های بالا، قبل از اجرای این روش، تحلیل هزینه و سود حاصل از کشت آزمایشگاهی عاقلانه است. به همین ترتیب، تولید داروها با استفاده از سیستم‌های کشت گیاهان می‌تواند مزایای قابل توجهی از جمله کاهش هزینه‌ها، تولید سریع، بار کم عوامل بیماری‌زای انسانی و تولید در مقیاس وسیع را ارائه دهد؛ تمام این مزایا در مقایسه با مزایای تولید توسط منابع جایگزین، ویژه محصول گیاهی بوده و به بازده تولید بستگی دارند. در دهه آینده، کشت بافت باید با استفاده از فناوری‌های جدید مانند ویرایش ژن و دستکاری عوامل محیطی، به پتانسیل کامل خود برسد (۵).

تحقیقات در مورد تولید بیوراکتورهای گیاهی تراریخته برای تولید ترکیبات مهم دارویی مانند پروتئین‌ها، آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها و سایر اجزای منحصر به فرد با منشأ حیوانی، آینده‌ی خوبی دارند. استفاده از گیاهان به عنوان کارخانه‌های تولید مواد مشابه، بدون شک دارای مزایایی نسبت به استفاده از کشت میکروارگانیسم‌ها و سلول‌های حیوانی می‌باشد. به عنوان مثال، تولید پروتئین‌های ناهمسان و فولدینگ مناسب که فعالیت عملکردی آن‌ها و سود اقتصادی بیشتر آن‌ها را تضمین می‌کند، در گیاهان ممکن است. همچنین ایمنی زیستی سنتز پروتئین هترولوگ در گیاه احتمال آلودگی توسط آنتی‌ژن‌ها و سموم میکروبی را از بین می‌برد. در آخر باید ذکر کرد که ایجاد واکسن‌های گیاهی که می‌توانند به عنوان مواد افزودنی غذایی استفاده شوند، باعث کاهش قیمت محصول مورد نظر می‌شود (۱۱).

مهمترین نکته‌ای که در استفاده از روش تراریخته برای کاهش تنش زیستی در گیاهان نیاز به توجه دارد، پایداری مقاومت در گیاهان مهندسی شده است. اگرچه تعداد زیادی از گیاهان تراریخته مقاوم در برابر تنش‌های مختلف زیستی در دست تولید هستند، اما تعداد کمی از آن‌ها با موفقیت تجاری شده اند. نمونه‌هایی از این موفقیت‌های تجاری محصولات *Bt* است. یکی از دلایل اصلی پذیرش محصولات *Bt* در بازار تجاری، اثبات بی‌تاثیری توکسین *Bt* بر پرندگان و پستانداران از جمله انسان است. برای پذیرش گسترده فناوری‌های تراریخته در مقیاس عمومی، لازم است که تراریخته‌ها از نظر ایمنی برای مصرف انسان و حیوان مطمئن باشند. همچنین، توازن اقتصادی، یعنی هزینه‌های تولید، پرورش و ثبت محصولات تراریخته، باید متناسب با سود تولید کنندگان باشد و در نهایت، سهولت دسترسی آن‌ها به مصرف کننده باید تضمین شود (۱۲).

زمانی که گیاهان در معرض استرس‌های محیطی قرار می‌گیرند، چندین مکانیسم محافظت کننده ذاتی در آن‌ها آغاز می‌شود. رمزگشایی از مکانیسم‌های تنظیمی دخیل در شروع این مسیرهای مقاومتی از دهه‌ها پیش تا به همین امروز در حال مطالعه هستند. بررسی اعتبار این مفروضات، فرصتی جدید برای درک بهتر و بیشتر تغییرات استرس‌زا در گیاهان فراهم کرده است. فیزیولوژیست‌ها و بیوشیمیست‌های گیاهی نقشی اساسی در روشن کردن مبانی این مکانیسم‌ها، که امروزه به شکل گسترده‌ای در سطوح ژنتیکی و مولکولی بوسیله روش‌های مختلف مولکولی، ژنتیکی و زیست فناورانه در حال مطالعه هستند، ایفا می‌کنند (۱).

تشخیص و انتخاب ژن‌های پاسخ دهنده به استرس و استفاده از آن‌ها به منظور تولید گیاهان زراعی مقاوم از طریق روش‌های سنتی آمیزش گیاهی، روشی زمان بر است. زیست فناوری گیاهی، فارغ از اینکه در مقایسه با روش‌های سنتی قدری پرهزینه تر است، بسیار بهینه و کارآمد است. ژن‌های متعددی برای پاسخ به استرس تا به امروزه شناسایی و با موفقیت وارد گیاهان زراعی شده‌اند تا بتوان گیاهان زراعی دستکاری شده با قابلیت تحمل و مقاومت در برابر استرس‌ها تولید کرد. با این وجود مهم است که در طی فرآیند تولید و توسعه انواع دستکاری شده از گیاه زراعی، توجه شود تا ژن‌هایی که منجر به افزایش مقاومت و تحمل نسبت به استرس‌های متعدد، خصوصا در سطح کل گیاه می‌شوند، به کار گرفته شوند (۱).

مزیت روش‌های زیست فناورانه در تولید گیاهان زراعی دستکاری شده بدون شک چشمگیر است اما تجاری سازی این گیاهان تنها پس از انجام آزمایش‌های میدانی کافی، حقیقتی انکار ناپذیر و لازم است. علاوه بر این بررسی میزان خطر تولید گیاهان زراعی و غیر زراعی دستکاری شده، یک مرحله بسیار ضروری پیش از مجاز کردن استفاده از گیاهان تراریخته است. تعیین استانداردهایی در سراسر دنیا که بتواند خطر را تشریح کند و ثبت رسمی گیاهان و محصولات گیاهی تراریخته باید با جدیت صورت پذیرد. بعلاوه خطرات زیست محیطی گیاهان زراعی می‌بایست بوسیله آزمایشات میدانی متعدد و پیش از شروع فرآیند تجاری سازی مطالعه شود. تصمیم براینکه چه گیاهان و یا واریته‌هایی می‌بایست تجاری شوند و اعمال مدیریت قدرتمند می‌تواند برای مقابله با خطرات ذاتی استفاده از گیاهان تراریخته موثر باشد. به منظور تصمیم گیری موثر، بررسی خطرات موجود می‌بایست از طریق روش‌های علمی، معقول

و شفاف انجام شود. امروزه قوانین دولتی متعددی در بسیاری از کشورها به منظور بررسی ایمنی گیاهان زراعی تراریخته در حال پیاده سازی است. علاوه بر این چندین معاهده بین المللی به منظور کنترل کشت و تجاری سازی گیاهان تراریخته و محصولات آن‌ها وجود دارد. در سراسر دنیا، تمامی این قوانین و روش‌های بررسی مخاطرات، بر روی محافظت از محیط زیست و سلامتی انسان و جانوران متمرکز شده‌اند. بهره‌برداری از گیاهان تراریخته کاملاً به بررسی دقیق مخاطرات و مزایا، تایید نهادهای ناظر، هزینه و دوره زمانی، تجاری سازی، شرایط اقتصادی و نیازها و ارزش‌های کشورهای مختلف بستگی دارد (۱).

توافقنامه‌های بین‌المللی گسترش یافته و به درخواست‌های حفظ تنوع زیستی، ایمنی زیستی، حمایت از مالکیت معنوی و تجارت بین‌المللی پاسخ می‌دهند. سرمایه‌داران، بیوتکنولوژی را به عنوان یک فناوری کاملاً جدید ترویج داده و آن را به عنوان راهی برای دستیابی به ثروت آسان برای سرمایه‌گذاران معرفی می‌کنند. شرکت‌های بزرگ به این باور رسیدند که بیوتکنولوژی کشاورزی امکان رشد چشمگیر تجارت را فراهم می‌کند؛ بنابراین شروع به خرید شرکت‌های نوپا و تولید بذر کردند. برخی از ناظران، مباحث اخلاقی را در مورد انتقال مواد ژنتیکی در بین گونه‌ها مطرح کردند و طرفداران عدالت اجتماعی نگران تراکم تولید بذر در دست چند شرکت بودند؛ مخالفت قابل توجهی با محصولات مهندسی ژنتیکی به عنوان منابع غذایی به وجود آمد (۶).

به نظر می‌رسد که نگرش‌های عمومی عامل تعیین‌کننده مهمی در انتظار مصرف مواد غذایی تولید شده توسط مهندسی ژنتیک است. عموم مردم باید بیوتکنولوژی را ابزاری ایمن برای بهبود علمی محصولات بدانند؛ زیرا در مبارزه

با گرسنگی و فقر کمک می‌کند. بنابراین، باید بودجه تحقیقاتی متناسب با برنامه‌های طولانی مدت اصلاح نباتات اختصاص یابد که بیوتکنولوژی به عنوان یکی از ابزارهای آن است. به این ترتیب، ما ممکن است به طور مؤثر با چالش جدی تغذیه جمعیت در حال رشد سریع در هزاره بعدی روبرو شویم (۶).

تولید بیوتکنولوژی ترکیبات غیرسلولی در حال حاضر صنایع را تحت تأثیر قرار داده است و جایگزینی فرآیندهای متداول با گزینه‌های اقتصادی پایدار را تسهیل می‌کند. محصولات سلولی، تازه در حال ظهور هستند و توانایی ایجاد اختلال در تولید مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی را دارند. با این حال، از آنجا که این محصولات برای کاربران نهایی بیشتر دیده می‌شوند، اطمینان از مقبولیت مصرف کننده از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. در مورد محصولات غذایی، فرآوری برای تعدیل طعم و بافت نیاز به توسعه دارد. ایمنی باید با رعایت چارچوب‌های نظارتی مربوط به مواد غذایی و مواد آرایشی تضمین شود. به محض تحقق همه این شرایط، پایداری و مسائل اقتصادی تأیید شده، این فناوری می‌تواند با یک موفقیت واقعی روبرو شود (۱۰).

واژه‌نامه

پروتئوم: به کلیه پروتئین‌هایی که در یک سلول در یک زمان مشخص بیان می‌شود، پروتئوم آن سلول گفته می‌شود و این پروتئوم است که فاصله بین ژنوم و مکانیسم مولکولی رفتار سلولی را پر می‌کند.

متابولوم: به مجموعه متابولیت‌های کوچک شـــامل متابولیت‌های واســـط، هورمون‌ها و ملکول‌های ســـیگنال دار و همچنین متابولیت‌های ثانویه در یک نمونه زیستی اطلاق می‌گردد.

هاپلوئید: سلول دارای تنها یک سری کروموزوم می‌باشد یعنی سری کروموزوم دیگری برای در سلول وجود ندارد که با سری موجود جفت شود.

دیپلوئید: سلول دارای دو دسته کروموزوم می‌باشد.

کشاورزی فشرده: معمولی ترین روش کشت خاک و منبع ا صلی غذا در سرا سر جهان ا ست. متکی به بردا شت محصول بالا با بهره برداری قوی و اغلب شدید از زمین و اغلب نهاده های شدید است.

اُپین: یک فلاونوئید طبیعی اســت، یک دی گلیکوزید از فلاون آپیژنین که در گیاهان مقاوم به زمســتان، جعفری و کرفس و در برگ موز یافت می شود.

پروتوپلاست: یک یاخته گیاهی یا باکتریایی است که دیواره سلولی آن برداشته شده باشد.

اندوسیتوز: ابه بردن مواد خارجی اعم از جامد یا مایع از طریق غشای یاخته (سلول) به درون آن اطلاق می‌شود.

آنتاگونیست: نوعی لیگاند و ماده شیمیایی قابل پیوند با گیرنده سلولی یا گونه‌ای دارو است که در سلول با اتصال به گیرنده‌های آن سلول عمل پیوند لیگاند-گیرنده را انجام داده ولی باعث هیچ‌گونه پاسخ و واکنش از سوی سلول نمی‌شود.

متابولیت: در بیوشیمی، متابولیت محصول واسطه یا نهایی متابولیسم است.

نماتد: کرم های لوله ای هستند که به عنوان انگلهای کرم لوله ای شناخته میشوند و به اصطلاح آن را نماتد می گویند.

ترانس ژن: یک ژن مصنوعی است که در آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دستکاری می شود و تمام عناصر مناسب برای بیان ژن که عموماً از گونه های مختلف مشتق شده اند را در خود جای داده است.

واریته: نام یک رتبه در رتبه آرایه‌شناختی می‌باشد که پس از گونه قرار می‌گیرد. گونه‌ها از واریته‌ها تشکیل می‌شوند.

استرس اکسیداتیو: عدم تعادل بین رادیکال های آزاد و آنتی اکسیدان ها در بدن شما است.

آپوپلاست: در داخل یک گیاه، آپوپلاست فضای خارج از غشای پلاسمایی است که مواد می توانند آزادانه در داخل آن پخش شوند.

فاکتور رونویسی (TF): یا فاکتور اتصال به DNA اختصاصی پروتئینی است که با اتصال به یک توالی DNA خاص، سرعت رونویسی اطلاعات ژنتیکی از DNA به RNA پیام رسان را کنترل می کند.

اسمولیت: ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم هستند که بر خواص سیالات بیولوژیکی تأثیر می گذارند.

چپرون: پروتئین هایی هستند که پروتئین ها را در مسیرهای مناسب برای تا شدن هدایت می کنند.

ژرم پلاسم: ماده ژنتیکی یک فرد است که ممکن است از طریق جنسی یا جسمی از نسلی به نسل دیگر منتقل شود.

متالوئید: در شیمی، اصطلاحی نادقیق است که برای توصیف یک عنصر شیمیایی استفاده می‌شود که ماده ساده‌ای را تشکیل می‌دهد که دارای ویژگی‌های میانی بین خواص یک فلز معمولی و یک نافلز معمولی است.

زیست توده: اصطلاحی است که برای توصیف هر نوع سوختی که از گیاهان به دست می آید استفاده می شود.

زیست دارو: هر فرآورده دارویی است که در منابع بیولوژیکی تولید، استخراج شده یا نیمه سنتز شده است.

ریزازدیادی: روشی برای تکثیر گیاهان با استفاده از قطعات بسیار کوچک بافت گیاهی است که از یک گیاه مادری که با دقت انتخاب و آماده شده است، و پرورش آنها در شرایط آزمایشگاهی برای تولید گیاهان جدید.

هوموزیگوس: داشتن دو آلل یکسان از یک ژن یا ژن خاص.

نئوپلاسم: یا نورُسته نوعی رشد غیر طبیعی و بیش از حد بافت است. رشد نئوپلاسم با بافت‌های اطرافش تناسب ندارد.

اتوتروف: موجودی است که می تواند غذای خود را با استفاده از نور، آب، دی اکسید کربن یا سایر مواد شیمیایی تولید کند.

برون تنی: در زیست‌شناسی، به آزمایش‌هایی که به جای به کار بردن جانداران زنده، بخشی از بدن آن‌ها مانند یاخته‌هایشان یا بافت‌هایشان را در محیط آزمایشگاهی کشت می‌دهند گفته می شود، به این آزمایشها در محیط کشت نیز می‌گویند.

پریون: نوعی پروتئین است که می تواند پروتئین های طبیعی در مغز را تحریک کند تا به طور غیر طبیعی تا شوند.

اندوتوکسین: لیپوپلی ساکاریدهایی هستند که در دیواره سلولی باکتری های گرم منفی یافت می شوند و می توانند التهاب و تب را به عنوان یک پاسخ ایمنی در ارگانیسم های بالاتر القا کنند.

پروبیوتیک‌ها: میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف یا استفاده از بدن برای سلامتی مفید هستند.

پروموتر: ناحیه‌ای از DNA بالادست یک ژن است که در آن پروتئین‌های مربوطه (مانند RNA پلیمراز و فاکتورهای رونویسی) برای شروع رونویسی آن ژن متصل می‌شوند.

فرایندهای پایین دستی (DSP): مجموعه ای از عملیات مورد نیاز برای استخراج و به دست آوردن یک محصول پروتئینی خالص و همگن از مواد بیولوژیکی مانند سلول ها، مایع کشت بافت یا بافت های گیاهی.

ترومبوز: زمانی رخ می دهد که لخته های خون رگ ها یا شریان ها را مسدود کنند.

ایمنی هومورال: فرآیند ایمنی تطبیقی است که با تولید آنتی بادی توسط لنفوسیت های B آشکار می شود.

گیاه ترانس پلاستومیک: گیاهی است که از نظر ژنتیکی اصلاح شده است که در آن ژن‌ها غیرفعال، اصلاح شده یا ژن‌های خارجی جدید به جای DNA هسته‌ای در DNA پلاستیدهایی مانند کلروپلاست قرار می‌گیرند.

تاکسونومی: مطالعه اصول کلی طبقه بندی علمی

فیلوژنتیک: مطالعه روابط تکاملی بین موجودات بیولوژیکی است.

ریزوسفر: محیط اطراف ریشه گیاهان را ریشه‌گاه یا ریزوسفر (Rhizosphere) می‌گویند.

زیان‌زیستی: یک ارتباط متضاد بین دو موجود زنده (به ویژه میکروارگانیسم ها) که در آن یکی از آنها تحت تأثیر نامطلوب قرار می گیرد.

لکتین: نوعی پروتئین است که به کربوهیدرات های خاصی متصل می شود.

میکروبیوم: مجموعه ای از همه میکروب ها مانند باکتری ها، قارچ ها، ویروس ها و ژن های آنهاســـت که به طور طبیعی روی بدن و درون ما زندگی می کنند.

بیوتروفیک: انگل یا همزیستی که برای زنده ماندن به میزبان خود نیاز دارد.

اندوفیت: یک درون همزیســت، اغلب یک باکتری یا قارچ اســت که حداقل بخشــی از چرخه زندگی خود را بدون ایجاد بیماری ظاهری در گیاه زندگی می کند.

سورفکتانت ها: ترکیباتی هستند که کشش سطحی (یا کشش سطحی) بین دو مایع، بین گاز و مایع، یا بین مایع و جامد را کاهش می دهند.

صفت چند ژنی: یک ویژگی است، مانند قد یا رنگ پوست، که تحت تأثیر دو یا چند ژن است.

اومیکس: شاخه های علم که به طور غیررسمی به نام اومیکس شناخته می شوند، رشته های مختلفی در زیست شــناســی هســتند که نام آنها به پســوند -omics ختم می شــود، مانند ژنومیکس، پروتئومیکس، متابولومیکس، متاژنومیکس، فنومیکس و رونویسی.

کشاورزی عمودی: فرآیند کشاورزی است که در آن محصولات بر روی هم رشد می کنند، نه در ردیف های افقی سنتی.

منابع:

1. Ahanger, MA., Akram, NA., Ashraf, M., Alyemeni, MN., Wijaya, L. and Ahmad, P. 2017. Plant responses to environmental stresses—from gene to biotechnology. AoB PLANTS 9: plx025. doi:10.1093/aobpla/plx025.

2. Babiye, B., Haile, G. and Adamu, M. 2020. Major Achievements of Plant Biotechnology in Crop Improvements. American Journal of Life Sciences. 8(5): 102-106. Doi:10.11648/j.ajls.20200805.13.

3. Christou, P. and Harry, K. 2004. Handbook of plant biotechnology. West Sussen, England: John Wiley: 741-810.

4. Drake, PMW. and Christou, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics. 4(10): 794-805.

5. Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A. and García-Lara, S. 2018. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta. 248: 1–18. https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1.

6. Gupta, S. and Kaushal, R. 2018. General Application of Biotechnology in Agriculture. Acta Scientific Agriculture. 2(2): 12-19.

7. Loyola-Vargas, V.M. and Ochoa-Alejo, N. 2018. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In: Loyola-Vargas, V. and Ochoa-Alejo, N. (eds) Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology. 1815. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1.

8. Miao, Y., Ding, Yu., Sun, QY., Xu, ZF. and Jiang, L. 2008. Plant Bioreactors for Pharmaceuticals. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 25(1): 363-380. DOI:10.5661/bger-25-363.

9. Phillips, T. 2008. Genetically modified organisms (GMOs): Transgenic crops and recombinant DNA technology. Nature Education. 1(1): 213.

10. Rischer, H., Szilvay, G.R. and Oksman-Caldentey, K.M. 2020. Cellular agriculture — industrial biotechnology for food and materials. Current Opinion in Biotechnology

61: 128-134. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.003.

11. Saveleva, N.V., Burlakovskiy, M.S., Yemelyanov, V.V. et al. 2016. Transgenic plants as bioreactors to produce substances for medical and veterinary uses. Russ J Genet Appl Res. 6: 712–724. https://doi.org/10.1134/S2079059716060071.

12. Sowjanya Sree K. and Rajam, M.V. 2015. Genetic Engineering Strategies for Biotic Stress Tolerance in Plants. In: Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L. and Krishnamurthy, K. (eds) Plant Biology and Biotechnology. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_30.

13. Twaij, B. M., Jazar, Z. H. & Hasan, M. N. 2020. Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. International Journal of Plant Biology, 11(1). https://doi.org/10.4081/pb.2020.8385.

14. Yousef Ghidan, A. and Al Antary, T.M. 2019. Applications of Nanotechnology in Agriculture, Applications of Nanobiotechnology, Margarita Stoytcheva and Roumen Zlatev. IntechOpen. DOI:10.5772/intechopen.88390.

15. Zarafi, A.B. and Dauda, W.P. 2019. Exploring the importance of fungi in agricultural biotechnology. International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine. 7 (1): 1-12.