بسم الله
الرحمن
الرحيم

معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری

ستاد توسعه زیست فناوری

# آشنایی با کاربردهای زیست فناوری

جلد اول

معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری
ستاد توسعه زیست‌فناوری
برنامه ریزی و نظارت بر تالیف: گروه سرمایه انسانی، آموزش و ترویج ستاد توسعه زیست‌فناوری
مولفان: دکتر ابوالفضل لطفی، دکتر سعیده میلانی، مهندس زهرا جهانبخشیان داوران
مهندس سید مصطفی حسینی، زیر نظر دکتر سید مهدی سیدی
صفحه آرایی: آتلیه طراحی دیبا رنگ
چاپ دوم: تابستان ۱۳۹۶
لیتوگرافی ، چاپ و صحافی : دیبارنگ www.dibarang.com
ارتباط با گروه سرمایه انسانی، آموزش و ترویج ستاد توسعه زیست فناوری
آدرس پست الکترونیکی: manpower@biodc.isti.ir
تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۱۴۱۹۱-۶

**کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به ستاد توسعه زیست فناوری و مولفین می باشد.**

# فهرست


پیشگفتار: ..... ۱
مقدمه: ..... ۲

**بخش اول:** ..... ۵
۱- کاربردهای زیست فناوری در پزشکی ..... ۵
۱-۱- زیست فناوری پزشکی ..... ۶
۱-۲- کاربردهای زیست فناوری پزشکی در حوزه پیشگیری ..... ۸
۱-۲-۱- واکسن نوترکیب ..... ۸
۱-۲-۲- DNA واکسن ..... ۱۱
۱-۳- کاربردهای زیست فناوری پزشکی در حوزه تشخیص ..... ۱۲
۱-۳-۱- تستهای تشخیصی بر پایه تکثیر اسیدهای نوکلئیک ..... ۱۲
۱-۴- کاربردهای زیست فناوری پزشکی در حوزه درمان ..... ۱۷
۱-۵- برخی علوم موثر در پیشرفت زیست فناوری پزشکی ..... ۲۲
۱-۵-۱- ژنومیکس ..... ۲۳
۱-۵-۲- پروتئومیکس ..... ۲۳
۱-۵-۳- بیوانفورماتیک ..... ۲۵
۱-۵-۴- انتقال ژن ..... ۲۵
۱-۵-۵- سلولهای بنیادی ..... ۲۸
۱-۵-۶- مهندسی بافت ..... ۳۰
۱-۵-۷- ویرایش ژن ..... ۳۱

**بخش دوم:** ..... ۳۴
۲- کاربردهای زیست فناوری در صنعت (زیست فناوری سفید) ..... ۳۴
۲-۱- زیست فناوری صنعتی ..... ۳۵
۲-۲- توسعه پایدار و نقش زیست فناوری صنعتی ..... ۳۵
۲-۳- فرآیند کلی تولید محصول در برخی فرآیندها در زیست فناوری صنعتی ..... ۳۷
۲-۴- کاربردهای زیست فناوری صنعتی ..... ۳۹

# فهرست


۲-۴-۱- سوخت زیستی ..... ۴۰
۲-۴-۲- پروبیوتیک‌ها ..... ۴۴
۲-۴-۳- استارتر کالچرها ..... ۴۵
۲-۴-۴- آنزیم‌های صنعتی ..... ۴۵
۲-۴-۵- اسیدهای آمینه ..... ۴۹
۲-۴-۶- اسیدهای آلی ..... ۵۰
۲-۴-۷- پلیمرهای زیستی ..... ۵۲
۲-۴-۸- مواد آرایشی ..... ۵۵
۲-۴-۹- یزجلبک ها یا میکروآلگ ها.استفاده از زیست فناوری صنعتی در محیط زیست ..... ۵۷
۲-۴-۱۰- استفاده از زیست فناوری صنعتی در محیط زیست ..... ۶۱

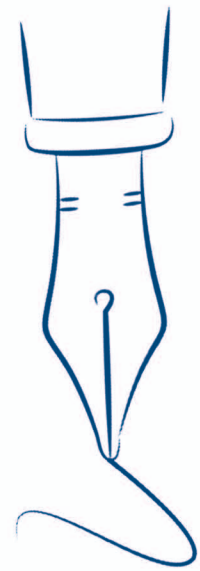
**بخش سوم:** ..... ۶۲
۳- کاربردهای زیست فناوری در کشاورزی ..... ۶۲
۳-۱- مقدمه: ..... ۶۳
۳-۲- کاربردهای زیست فناوری در زراعت، باغبانی و اصلاح نباتات ..... ۶۳
۳-۲-۱- کشت بافت گیاهی ..... ۶۳
۳-۲-۲- مهندسی ژنتیک ..... ۷۹
۳-۲-۳- نشانگرهای مولکولی ..... ۸۵
۳-۳- کاربردهای زیست فناوری در دامپروری ..... ۹۰
۳-۳-۱- تلقیح مصنوعی ..... ۹۰
۳-۳-۲- انتقال جنین ..... ۹۱
۳-۳-۳- تولید جنین‌های لقاح خارج رحمی ..... ۹۱
۳-۳-۴- تعیین جنسیت ..... ۹۱
۳-۳-۵- شبیه‌سازی ..... ۹۲
۳-۳-۶- کنترل بیماریها ..... ۹۳
۳-۴- کاربردهای زیست فناوری در گیاهپزشکی ..... ۹۴
۳-۴-۱- شناسایی عوامل بیماری‌زای گیاهی ..... ۹۴

# فهرست

۳-۴-۲- حشره کشهای بیولوژیک ..... ۹۴
۳-۴-۳- عوامل کنترل‌کننده بیماریهای گیاهی و علف‌های هرز ..... ۹۵

واژه‌نامه ..... ۹۷
منابع ..... ۱۰۵

## پیشگفتار



زیست فناوری را می‌توان کاربرد روش های علمی و فنی در تبدیل بعضی مواد به کمک عوامل بیولوژیک (میکروارگانیسم ها، یاخته‌های گیاهی و جانوری، آنزیم‌ها و...) برای تولید کالا و خدمات در کشاورزی، صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و ... در نظر گرفت. گستردگی کاربرد زیست فناوری به حدی است که اقتصاد، بهداشت، درمان، محیط زیست، کشاورزی، صنعت، تغذیه و سایر جنبه‌های زندگی بشر را تحت تأثیر شگرف خود قرار داده است. به همین دلیل زیست فناوری یکی از محورهای اساسی توسعه در بسیاری از کشورها قلمداد شده و در تنظیم راهکارها و برنامه‌های ملی توجه جدی به آن شده تا جایی که بیش از ۱۰ درصد تولید ناخالص داخلی در بعضی از کشورها به زیست فناوری اختصاص دارد. این نشان دهنده اهمیت و جایگاه این علم در اقتصاد بوده و در آینده این نقش پررنگ‌تر خواهد شد.

در نظام جمهوری اسلامی ایران نیز بر اساس اسناد بالادستی، زیست¬فناوری به عنوان یکی از حوزه‌های اقتدار آفرین برای کشور لحاظ شده و توسعه آن مورد توجه قرار گرفته است. از آنجا که توسعه و رشد پایدار در هر زمینه‌ای بدون توجه به نیروی انسانی ممکن نیست، آموزش زیست‌فناوری یکی از حوزه‌های کلیدی و حیاتی در این زمینه بوده و تربیت ریشه‌ای و عمیق نیروی انسانی متخصص و متعهد مهم¬ترین موضوع در راستای نیل به اهداف کشور در این زمینه است.

از آنجا که پیاده‌سازی سازوکارهای آموزشی مستقل توسط نهادهای مختلف موجب کارایی پایین، دوباره-کاری و اتلاف منابع می‌شود، رشد جهشی در تربیت نیروی متخصص در این حوزه مستلزم اجرای نظامی یکپارچه با هدفی مشخص است که روابط بین نهادهای درگیر را به گونه‌ای تنظیم نماید که تحقق اهداف آن را تسهیل کند. ستاد توسعه زیست فناوری در کشور به عنوان نقطه کانونی تمامی فعالیت‌های زیست فناوری در کشور محسوب می‌شود و سیاست‌گذاری و برنامه‌ریزی کلان فعالیت‌ها را بر عهده دارد. گروه آموزش، منابع انسانی و ترویج این ستاد بدنبال ایجاد زمینه‌های جدیدی است تا بتواند حوزه‌های مختلف آموزش زیست فناوری را تحت تأثیر قرار داده تا در پی آن شاهد آموزشی قدرتمندتر و پویاتر در کشور باشیم. کتاب حاضر که به معرفی سه حوزه کلان زیست فناوری با رویکرد کاربردی پرداخته، به دنبال ساده‌سازی مفاهیم و تقویت ارتباط‌گیری با علاقه‌مندان این رشته است. تهیه کتاب‌هایی جهت معرفی علم زیست‌فناوری و کاربردهای آن به زبان ساده بخشی از اهداف آموزشی این نظام بوده و کتاب حاضر در این راستا تهیه شده است.

# مقدمه

زیست فناوری بخشی از فناوری‌هاست که در آن از موجودات زنده و یا اجـزای آنها بهره گرفته مـی‌شود. این تعریف، گستره وسیعی از رشته‌های مختلف علوم و فنون را در بر گرفته چنانکه می‌تواند زمـینه فعالیت زیسـت فنـاوری را در بخـش‌های کشاورزی، پزشـکی، دام و آبزیان، فراورده‌های غـذایی و داروئی، صنـعت و محیط زیست فراهم نماید.
تاریخچه بسیار مختصر علم زیست فناوری به سه دوره قابل طبقه بندی می‌باشد که عبارت‌اند از:

## دوره سنتی

در این دوره انسان‌ها از فرآیندهای بیـولوژیکی ماننـد تخمیر برای تولید محـصولاتی همـچون نان، الکل، محصولات لـبنی، سرکه و غیره استفاده می‌کردند. به طور مثال ۶ هزار سال پـیش از میلاد مسیح، سومری‌ها و بابلی‌ها برای تولید سرکه از این فرایندها استفاده می‌کردند و یا مصری‌ها برای تولید نان از مـخمر و فرایند تخمیر بهره می‌برده‌اند.

## دوره میانی

در این دوره (اوایل قرن ۲۰) انسان‌ها با ایجاد شرایط مناسب اقدام به تخمیر و کشت میکروارگانیسم‌ها نمـودند. مـعادل انگلیـسی واژه زیسـت فناوری[۱]، برای اولیـن بار در سـال ۱۹۱۹ بوسیـله مهـندس مـجارسـتانی، کارل ارکـی[۲] مورد استفاده قرار گرفت. وی برای تولید فرآورده‌های کشاورزی از مواد خام، از موجـودات زنده استفاده مـی‌کرد. در این دوره مفاهیم علمی زیست فناوری از جمله اصول توارث، ساختمان DNA، آنزیم‌های مورد استفاده در زیست فناوری و... شناخته شدند. دستاوردهای این دوره زمینه‌ی هرچه کاربردی‌تر کردن این حوزه از علم فراهم نمود.

## دوره مدرن

در این دوره علم ژنتیک برای ایجاد تغییر در زندگی جوامع بـشری پا به عرصه ظـهور نهاد. در سـال ۱۹۷۰ با کشـف آنزیم‌های محدودکننده[۳] توسط هامیلتن اسمیت[۴]، الحاق ژن‌های جدید به باکتری‌ها مورد توجه قرار گرفت. شروع زیست فناوری مدرن در سال ۱۹۷۶ و با انتقال ژن از یک میکروارگانیسم به میکروارگانیسم دیگر همراه بود. مـیکروارگانیـسم حاضر با کسب تغییرات و خصوصیات جدید قادر به تولید محصول مورد نظر در مقادیر زیاد و با کارآیی بالاتر شد. کشف روش‌هایی جدید برای مبارزه با بیماری‌های نادر و ناتوان کننده،

۱. Biotechnology
۲ Karl Erkey
۳. Restriction enzymes
۴ Hamilton Smith

کاهش تأثیرات مضر بر محیط زیست، بدست آوردن انرژی‌های سالم و پاک و بهبود فرآیندهای تولید ازجمله دستاوردهای زیست فناوری مدرن می‌باشند.

## دوره کنونی

با وجود پیشرفت‌های گسترده در دوره مدرن، مخاطرات و هزینه‌های حاصل از این روش‌ها دانشمندان را به سوی ابداع روش‌هایی با افزایش دقت و کاهش مخاطرات سوق داد. فناوری ویرایش ژنوم را شاید بتوان مهم‌ترین دستاورد زیست‌فناوری طی چند سال اخیر دانست که به دانشمندان امکان می‌دهد بسیار دقیق-تر و بهتر از روش‌های قبل، هر ژنی را در هر موجود زنده‌ای ویرایش و تغییرات لازم را در آن اعمال کنند.

در سال ۲۰۰۷ بود که مشخص شد توالی‌های تکرار شونده در ژنوم باکتری در واقع سیستم ایمنی اکتسابی آن به خصوص در مقابل ویروس‌ها می‌باشد. همان گونه که سیستم ایمنی موجودات پیچیده‌تر مثل انسان با قرار گرفتن در معرض میکروب‌ها نحوه مقابله با آنها را یاد می‌گیرد، باکتری‌ها نیز با استفاده از بخش‌های خاصی از توالی ژنوم خود، ژنوم ویروس را تخریب و از خود محافظت می‌کنند. این بخش از توالی باکتری، تناوب‌هایِ کوتاهِ پالیندرومِ فاصله‌دارِ منظمِ خوشه‌ای[۱] نامیده شده که مخفف آن به انگلیسی کریسپر بوده و به روش‌هایی که از این توالی‌ها استفاده میکنند نیز کریسپر گفته می‌شود. اعلام این پدیده در سال ۲۰۱۲ و آزمایشات اولیه استفاده از تکنیک کریسپر به عنوان یک فناوری جهت ویرایش ژنوم طی سال‌های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۵ انجام شده است.

یکی از مهم ترین مزایای استفاده از این سیستم در مقایسه با سیستم انتقال ژن، این است که انجام آن بدون دخالت در مکانیسم های داخل سلولی، منجر به غیر فعال کردن یک ژن یا خارج نمودن کامل ژن از سلول می‌گردد. بنابراین از این روش می توان در درمان بیماری هایی همچون انواع سرطان و تحقیقات مربوط به شناسایی ژن های معیوب در بیماری های ژنتیکی و همچنین تولید گیاهانی با ویژگی‌های خاص استفاده کرد.

## زیست فناوری از حیث کاربرد

زیست فناوری از لحاظ کاربرد و حیطه مورد بررسی گاه به ۴ گروه مجزا طبقه‌بندی می‌شود که عبارت‌اند از:

---

۱. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)

**زیست فناوری سبز**[۱]: زیست فناوری کشاورزی که در زمینه فرآیندها و تولید محصولات کشاورزی فعالیت می کند.

**زیست فناوری قرمز**[۲]: زیست فناوری پزشکی که در حوزه تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری ها همچون آنزیم، آنتی بادی، واکسن و ... فعالیـت دارد.

**زیست فناوری سفید**[۳]: زیست فناوری صنعتی که به کاربرد زیست فناوری در فرآیندهای صنعتی و سایر فرآیندهای تولیدی می‌پردازد

.

**زیست فناوری آبی**[۴]: زیست فناوری دریایی که کاربرد زیست فناوری در استفاده از دریا و موجودات آبزی را مورد هدف قرار داده است.

البته زیست فناوری دارای حوزه‌ها و زیر حوزه‌های بسیاری است و اینگونه دسته‌بندی‌ها عمدتاً برای ساده‌سازی مفاهیم و طبقه‌بندی آنهاست.

در این کتاب سعی شده است تا برخی از کاربردهای زیست فناوری معرفی شود.

۱ . Green Biotechnology
۲ . Red Biotechnology
۳ . White Biotechnology
۴ . Blue Biotechnology

## بخش اول:

# کاربردهای زیست فناوری در پزشکی

## ۱-۱- زیست فناوری پزشکی[۱]

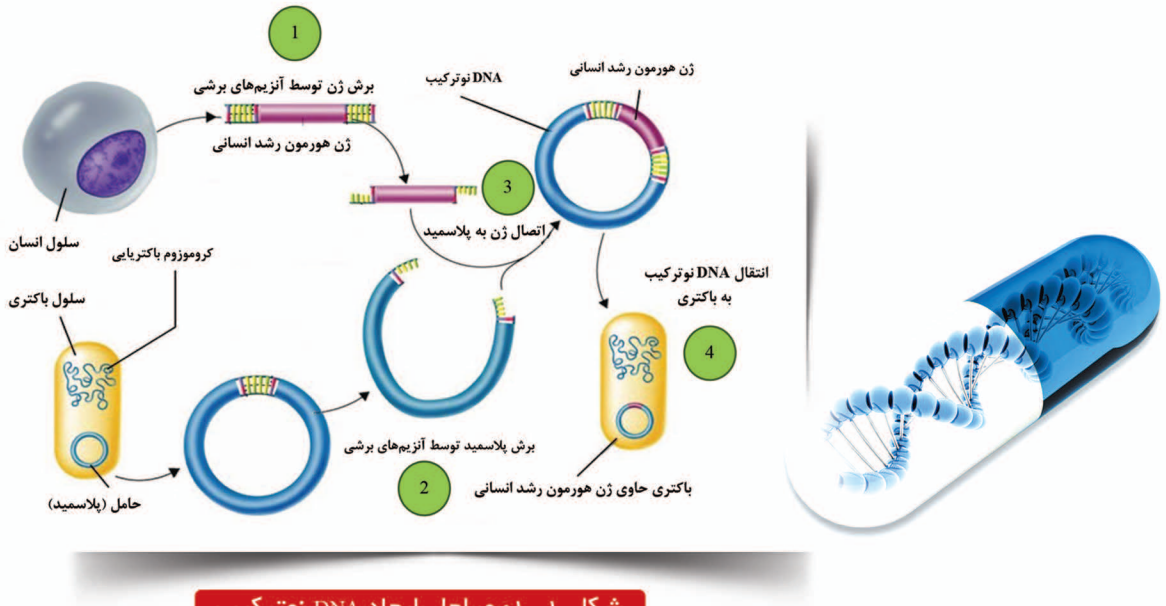
هدف اصلی زیست فناوری پزشکی، افزایش سلامت انسان‌ها از طریق تحقیق و توسعه و با به کار بردن موجودات زنده و یا فرآورده‌های آنها می‌باشد. ابداع تست‌های دقیق‌تر برای تشخیص بیماری‌ها، استفاده ازعلوم ژنومیکس و پروتئومیکس برای مهار بیماری‌ها، ژن‌درمانی، بیوانفورماتیک، تولید آنتی‌بادی بر علیه اهداف مولکولی مشخص درون سلول، تولید انواع واکسن‌های نوترکیب و DNA واکسن‌ها و ... از بخش‌های عمده زیست فناوری پزشکی به شمار می‌آیند. اهمیت و کاربرد این علوم در زیست‌فناوری پزشکی در سه حوزه پیشگیری، تشخیص و درمان بیماری‌ها قابل بررسی می‌باشد.

از مهم‌ترین و ابتدایی‌ترین یافته‌ها در زمینه زیست فناوری پزشکی کشف آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین از کپک پنی سیلیوم در سال ۱۹۲۸ بوسیله الکساندر فلمینگ است که در سال ۱۹۴۰ به تولید انبوه رسید اما عصر طلایی زیست‌فناوری پزشکی از سال ۱۹۷۰ و با توسعه تکنیک DNA نوترکیب آغاز شد. در این فرآیند قطعه‌ای از DNA مورد نظر که معمولا یک ژن خاص می‌باشد به کمک آنزیم‌های محدودکننده برش یافته و از طریق حامل مناسب (به طور مثال پلاسمید باکتریایی) به یک میزبان (میکروارگانیسمی مانند باکتری Ecoli) منتقل میشود. بعد از این انتقال میزبانِ حاوی ژن جدید قادر به تکثیر ژن و همچنین تولید محصول پروتئینی ژن مربوطه میشود. پاول برگ[۲] در سال ۱۹۷۲ برای اولین بار ژنوم ویروس SV۴۰ را به بخشی از DNA باکتری متصل و اولین DNA نوترکیب را ایجاد نمود.

اولین کاربرد فناوری DNA نوترکیب، تولید انسولین نوترکیب در سال ۱۹۷۸ بود. هورمون رشد انسانی و فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (TPA) نیز مثال‌های دیگری در این زمینه می‌باشند. کمپانی Gentech اولین کمپانی تولیدکننده محصولات بر مبنای DNA نوترکیب در سال ۱۹۷۶ تأسیس شد. با پیشرفت این فناوری، در مورد اساس مولکولی بیماری‌ها نیز اطلاعات بیشتری بدست آمد و علم پزشکی مولکولی پایه‌گذاری گردید.

۱ . Medical Biotechnology
۲ . Paul Berg

تولید بیوفارماسوتیکال[1]ها که نام دیگر آنها محصولات زیست پزشکی[2] می‌باشد از دیگر اتفاقات حوزه زیست فناوری پزشکی محسوب می شود. بیوفارماسوتیکال ها به محصولات پزشکی گفته می شود که از منابع زیستی یا استخراج گردیده و یا به صورت سنتزی و نیمه سنتزی ساخته می شوند. اسیدهای نوکلئیک (DNA واکسن، الیگو نوکلئوتیدهای آنتی‌سنس)، پروتئین‌ها (آنتی‌بادی‌های منوکلونال)، برخی سلول‌ها (واکسن‌های باکتریایی)، بعضی از ویروس‌ها (باکتریوفاژها و حامل‌ها) و ابزارهای تشخیصی در محیط In vivo از مهم‌ترین بیوفارماسوتیکال‌ها هستند.




شکل ۱-۱: مراحل ایجاد DNA نوترکیب

۱. جداسازی ژن مورد نظر با استفاده از آنزیم‌های برشی، ۲. انتخاب حامل مناسب و برش آن توسط آنزیم‌های برشی، ۳. وارد کردن ژن مورد نظر به حامل و ایجاد DNA نوترکیب، ۴. وارد کردن حامل دارای DNA نوترکیب به میزبان مناسب.

۱. Biopharmaceutical
۲. Biomedicine

کاربردهای زیست فناوری در پزشکی را می‌توان در سه حوزه پیشگیری، تشخیص و درمان دسته‌بندی نمود که در ادامه هر حوزه به طور جداگانه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

## ۱-۲- کاربردهای زیست فناوری پزشکی در حوزه پیشگیری

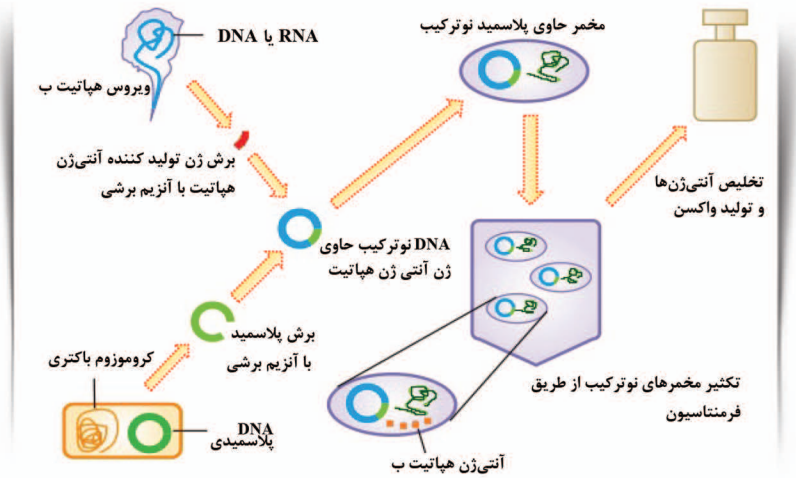
پیشگیری همیشه و در همه زمان‌ها، بهتر، آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر از درمان بوده و بخش مهمی از تحقیقات حوزه پزشکی از جمله زیست‌فناوری پزشکی به مسئله پیشگیری از بیماری‌ها اختصاص دارد. روش قدیمی تولید واکسن که مبنای آن استفاده از پاتوژن‌ها (تضعیف شده یا کشته شده) یا قطعاتی از پاتوژن‌ها می‌باشد، از مهم‌ترین راه‌های پیشگیری محسوب می‌شود. بیماری‌هایی مانند اوریون، آبله، کزاز و فلج اطفال به کمک چنین واکسن‌هایی کنترل یا ریشه‌کن شده‌اند. اولین بار ادوارد جنر در سال ۱۷۹۸ از ویروس آبله گاوی[۱] برای ایمن‌سازی بر علیه آبله انسانی استفاده کرد. با توسعه زیست‌فناوری پزشکی، واکسن‌های حاصل از زیست‌فناوری مانند واکسن‌های نوترکیب و DNA واکسن‌ها نیز ظهور پیدا کردند.

### ۱-۲-۱- واکسن نوترکیب[۲]

در تولید واکسن‌های نوترکیب به جای پاتوژن ضعیف یا کشته شده، که در واکسن‌های معمولی استفاده می‌شود، از ترکیبات ایمنوژن (تحریک کننده سیستم ایمنی) استفاده می‌شود در نتیجه عوارض جانبی که ممکن است بعد از تزریق واکسن‌های معمولی ایجاد شود حذف می‌گردد. مراحل ساخت واکسن‌های نوترکیب شامل یافتن ترکیبات ایمنوژن موجود در میکروارگانیسم (این ترکیبات معمولا شامل پروتئین‌ها یا گلیکوپروتئین‌های غشایی هستند)، شناسایی توالی ژن مربوط به ترکیب ایمنوژن، جداسازی و تکثیر ژن شناسایی شده و انتقال آن به پلاسمید مناسب، انتقال پلاسمید نوترکیب (حاوی ژن سازنده ترکیب ایمنوژن) به سلول میزبان و فراهم نمودن شرایط مساعد بیان پروتئین مورد نظر (پروتئین‌های ایمنوژن) در مقادیر انبوه می‌باشد.

اولین واکسن نوترکیب، واکسن هپاتیت ب بود که با انتقال ژن تولید کننده آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت ب، به پلاسمید باکتریایی و بیان آن ژن در سلول‌های مخمر ایجاد گردید. جهت تولید واکسن قابل عرضه به بازار، مخمرهای حاوی DNA نوترکیب در تانک‌های مخصوص به نام فرمانتور تکثیر شده و سپس آنتی‌ژن بیان شده در مخمرها استخراج و در فرمولاسیون واکسن قرار می‌گیرد (شکل ۱-۲).

۱. Cow pox
۲. Recombinant Vaccine




شکل ۱ – ۲:مراحل تولید واکسن نوترکیب هپاتیت ب

شکل ۱ – ۳: شکل ۱ ۳: تصویری از یک فرمانتور

فرمانتـــور دستگـــاهی است متشکل از تجهیزات و قطعات مختلف که شرایط بهینه و کنـــترل شده را برای رشـــد میکروارگانیسم‌هایی همـــچون قـــارچ، باکتری و مخمر را در حالت استریل فراهم می‌کند. رشد میکروارگانیسم‌ها در فرمانتور به هدف تولیـــد فرآورده‌های زیستی همچون آنـــزیم‌ها، اســـیدهای آمینه، آنتی بیوتیک‌ها و یا پروتئین‌های نوترکـــیب می‌باشد.

ازآنجا که تولید بیوفارماسوتیکال‌ها همچون واکسن‌ها، نیاز به کشت‌های گسترده سلول‌های میکروبی یا انسانی دارد، روشی پرهزینه محسوب می‌شود. در نتیجه محققین همیشه به دنبال روش‌های جایگزین با هزینه‌های کمتر بوده‌اند.

**چگونه میتوان جایگزینی برای مرحله مشکل و هزینهبر فرمنتاسیون، که طی آن کشت انبوه سلولی صورت می‌گیرد، پیدا نمود؟**

یکی از راه حل های محققین در این زمینه استفاده از موجودات عالی به عنوان کارخانه ها یا فرمانتورهای زنده بوده است. در همین راستا تولید واکسن‌های نوترکیب خوراکی[۱] در بافت‌ها و اندام‌های مختلف گیاهی همچون برگ، میوه و یا دانه طی سال‌های اخیر مورد توجه بسیار قرار گرفته است. بدین منظور DNA نوترکیب که حاوی ژن مورد نظر می‌باشد به گیاه انتقال داده شده و به گیاه حاصل تراریخته گفته می‌شود.

به طور کلی به کشت گیاهان جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب، آنزیم‌ها یا متابولیت‌های ثانویه با کاربردهای صنعتی و درمانی با استفاده از فناوری DNA نوترکیب، کشاورزی مولکولی[۲] گفته می‌شود. در حالیکه برای تولید پروتئین‌های دارویی از اصطلاح فارمینگ[۳] یا بیوفارمینگ[۴] استفاده می‌شود. تولید واکسن‌های خوراکی در گیاهانی مانند گوجه‌فرنگی، توت‌فرنگی، موز و ذرت بر علیه GI عوارض ایجاد شده بوسیله باکتری Ecoli، ویبریو کلرا، رترو ویروس‌ها، هپاتیت ب، دیابت نوع I و بیماری‌های خود ایمن، مثال‌هایی در این زمینه هستند. علیرغم غیر تهاجمی، سالم و آسان بودن این روش، استفاده از واکسن‌های خوراکی با محدودیت‌هایی همراه است و یکی از عمده‌ترین محدودیت‌ها، مشخص نبودن دوز مورد نیاز برای تحریک مؤثر سیستم ایمنی می‌باشد.

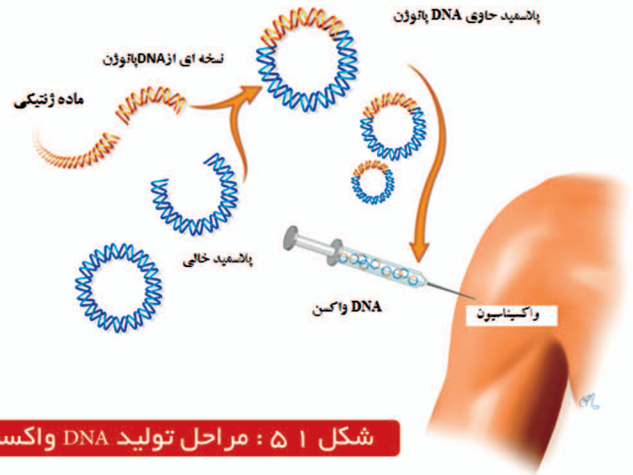
به غیر از گیاهان، دیگر موجودات زنده نیز می‌توانند با استفاده از فناوری DNA نوترکیب به کارخانه تولید کننده یک بیوفارماسوتیکال تبدیل شوند. به عنوان نمونه می‌توان به تولید چنین ترکیباتی در شیر حیوانات مزرعه‌ای و یا تخم‌مرغ اشاره کرد. در این حالت ژن بیگانه هدف به سلول های حیوانی همچون غدد شیری انتقال داده میشود. در نتیجه حیوان حاصل که به عنوان یک حیوان تراریخته شناخته می‌شود قادر به تولید ترکیب مورد نظر در شیر خود می‌گردد. تولید TPA در بز، فاکتور ۸ در گوسفند، هموگلوبین در خوک و لاکتوفرین در گاو از جمله مثالهایی هستند که با استفاده از این روش تولید شده‌اند.

۱ . Edibles Vaccine
۲ . Molecular farming
۳ . Pha rming
۴ . Biopharming

شکل ۱ – ۴: شنگول و منگول اولین بزغاله های تراریخت خاورمیانه حاوی ژن فاکتور انعقادی خون که در سال ۱۳۸۸ در ایران متولد شدند.

### ۱-۲-۲- واکسن DNA

استراتژی دیگر در تولید نسل جدید واکسن‌ها، تزریق مستقیم DNA کد کننده آنتی‌ژن پروتئینی می‌باشد. DNA پلاسمیدی حاوی ژن مورد نظر به عضله تزریق و ایمنی هومورال و سلولی را برمی‌انگیزد. این پلاسمید می‌تواند در DNA کروموزومی الحاق گردیده یا به صورت اپی‌زومی داخل سلول باقی بماند. ارائه طولانی مدت آنتی‌ژن به سیستم ایمنی با تزریق DNA واکسن، منجر به تولید سلول‌های ایمنی خاطره می‌گردد.




شکل ۱ ۵ : مراحل تولید DNA واکسن

## ۱-۳- کاربردهای زیست فناوری پزشکی در حوزه تشخیص[۱]

کاربردهای زیست‌فناوری پزشکی در حوزه تشخیص، باعث افزایش حساسیت و دقت در ردیابی و تشخیص بسیاری از بیماری‌ها شده است. استفاده از کیت‌های تشخیصی که محصول زیست‌فناوری می‌باشند، کمک شایانی در تشخیص بیماری، پیش‌بینی درصد بهبود بیماری و همچنین پیش‌بینی تأثیر درمان روی بیماری می‌نماید.

اکثر آزمایش‌های تشخیصی تجاری موجود در حوزه زیست فناوری پزشکی، یا بر اساس بررسی اسیدهای نوکلئیک فرد مراجعه کننده بوده و یا آزمایش‌هایی بر مبنای استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال می‌باشند. علاوه بر این موارد، تست‌هایی بر پایه ترکیب پروتئومیکس و نانوتکنولوژی[۲] نیز در تشخیص بیماری کاربرد دارند

شکل ۱-۶ : نمونه ای کیت تشخیصی، تولید کیت های تشخیصی با استفاده از فناوری های زیستی از جمله حوزه هایی است که جمهوری اسلامی ایران در آن گام برداشته و هم اکنون تعدادی از شرکت های دانش بنیان بخش خصوصی دارای تکنولوژی تولید انواع مختلفی از این کیت ها می باشند.

### ۱-۳-۱- آزمایش های تشخیصی بر پایه تکثیر اسیدهای نوکلئیک

از مهم ترین مسائل در درمان موفق یک بیماری، تشخیص صحیح و به موقع آن می باشد. طی سال های اخیر تاثیر ژنوتیپ افراد بر بروز بسیاری از بیماری ها ثابت شده است. به عبارتی وجود برخی از ژن ها و یا آلل های خاصی از آنها و یا رخ دادن جهش در برخی از ژن ها می تواند منجر به بروز بیماری شود. بر همین اساس یکی از راه‌های تشخیص یک بیماری بررسی وجود و یا عدم وجود آلل خاصی از یک ژن می‌باشد. برای مثال سرطان کلورکتال فامیلی (FAP) به علت جهش در ژن مهارکننده تومور (APC) ایجاد می‌شود.

۱. Diagnosis
۲. Nanodiagnostics

**وجود آلل خاص یک ژن در یک فرد و یا رخ دادن جهش در یک ژن چگونه بررسی می شود؟**

از طرف دیگر عامل بسیاری از بیماری ها نیز عوامل میکروبی مانند باکتری ها و ویروس ها بوده و یکی از راه های تشخیص چنین بیماری هایی، تائید وجود عامل بیماری‌زا در بدن فرد می‌باشد. البته تائید وجود باکتری یا ویروس در بدن یک فرد به تنهایی کافی نبوده و تجویز داروی مناسب مستلزم شناسایی دقیق نوع باکتری یا ویروس می‌باشد. یکی از دقیق‌ترین راه‌های شناسایی عوامل میکروبی بررسی برخی از ژن‌های اختصاصی آنها می‌باشد به عبارتی وجود ژنی اختصاصی یک عامل میکروبی در نمونه DNA استخراج شده از خون یک فرد، تائید کننده وجود آن عامل میکروبی در خون خواهد بود.

**وجود ژن اختصاصی یک عامل میکروبی در یک فرد چگونه بررسی می شود؟**

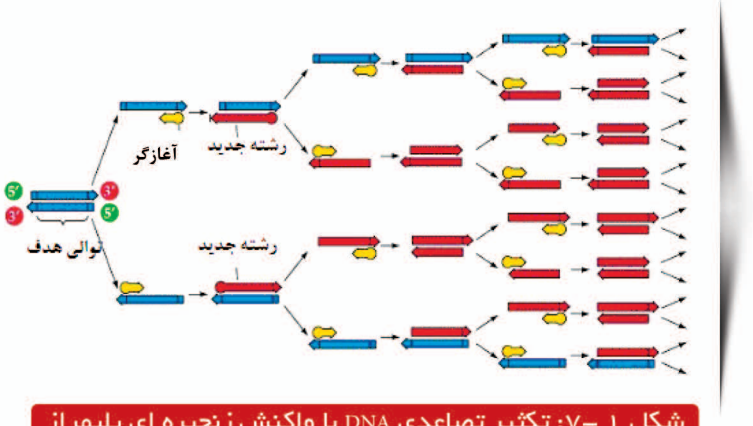
اصول همانندسازی ماده ژنتیکی برای اولین بار در سال ۱۹۵۳ توسط واتسون و کریک معرفی شد و ۲۲ سال بعد با ابداع تکنیک ساودرن بلات[۱] مفهوم کاربردی پیدا کرد. در این روش قطعات مختلف DNA الکتروفورز شده به یک فیلتر غشایی منتقل می گردند. سپس با اضافه کردن پروب هایی با توالی مشخص به فیلتر حاوی قطعات DNA، ایجاد هیبریداسیون بین DNA و پروب، DNA ناشناخته، شناسایی می‌گردد. با این حال این روش با محدودیت هایی همراه می باشد که از آن جمله می توان به زمان بر بودن و عدم توانایی انجام آن در مقادیر زیاد اشاره کرد.

اختراع تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR[۲] بوسیله کری مولیس[۳] در سال ۱۹۸۳ انقلابی در تشخیص مولکولی به وجود آورد.PCR مجموعه‌ای از واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز است که در آن یک یا تعداد محدودی از کپی‌های DNA از طریق همانندسازی بوسیله آنزیم‌های اختصاصی (Taq DNA Polymerase) به صورت تصاعدی تکثیر می‌شوند. در این روش، حتی مقادیر بسیار کم DNA اختصاصی نیز قابل تکثیر و آشکارسازی می باشند.

اصول PCR بدین صورت می باشد که ابتدا دو رشته DNA بوسیله حرارت از هم جدا شده و یا به عبارت دیگر واسرشت می‌شوند. بعد از واسرشت شدن دو رشته، روند تکثیر DNA بوسیله جفت شدن آغازگرهای

۱ Southern blot
۲ Polymerase Chain Reaction
۳ . Karry Mullis

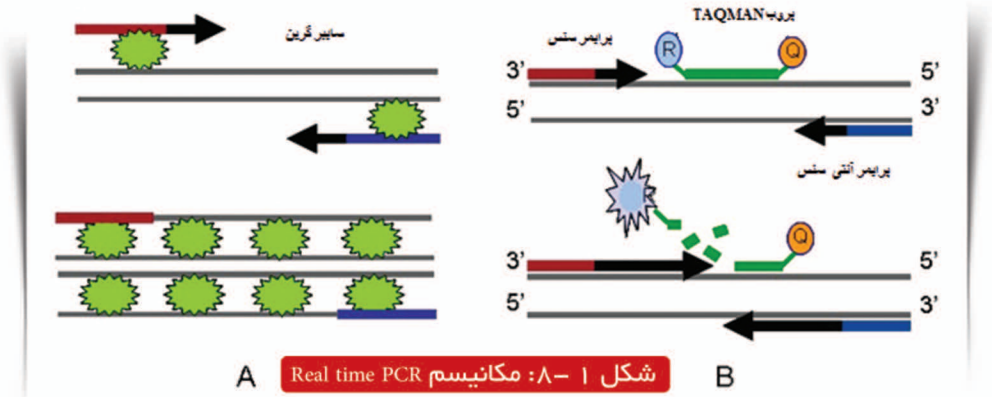
الیگونوکلئوتیدی تک‌رشته‌ای در محلی اختصاصی از رشته DNA آغاز می‌شود. بدین صورت که با پایین آوردن دما، آغازگرها به توالی اختصاصی در DNA تک رشته‌ای واسرشت شده متصل گردیده و با افزایش مجدد حرارت به دمای مطلوب جهت فعالیت آنزیم DNA Taqپلی‌مراز، ساخت رشته جدید از روی DNA واسرشت شده صورت می‌گیرد. در این مرحله مجدداً مولکول‌های DNA دو رشته‌ای ایجاد می‌شوند. دور بعدی ساخت را می‌توان با گرم کردن و واسرشت نمودن مجدد DNAهای دو رشته‌ای حاصل از مرحله قبل، کاهش دما و اتصال آغازگر و سپس ساخت رشته‌های مکمل بوسیله آنزیم DNA پلی‌مراز را تکرار کرد. هر تکرار از ساخت DNA شامل یک چرخه تکثیر است و هر رشته DNA تازه ساخته شده، الگویی برای چرخه‌های بعدی تکثیر می‌باشد. هر آزمایش PCR معمولا دارای ۲۵ تا ۳۵ چرخه بوده که طی آن یک رشته الگوی اولیه به طور تصاعدی تبدیل به میلیون‌ها قطعه می‌شود (شکل ۱-۷).




شکل ۱ -۷: تکثیر تصاعدی DNA با واکنش زنجیره ای پلیمراز

یکی دیگر از روش‌های پرکاربرد در تشخیص‌های بالینی و تحقیقات بر مبنای تکثیر اسیدهای نوکلئیک، روش Real Time PCR می‌باشد. در این روش علاوه بر جستجو وشناسایی یک توالی خاص در DNA هدف، می‌توان مقدار DNA مورد نظر را نیز در نمونه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری، و به صورت کمی بیان نمود. اصول کلی PCR و Real time PCRبا هم مشابه اند با این تفاوت که در Real time PCR پس از تکثیر DNA در هر چرخه، مقدار دقیق DNA نیز اندازه‌گیری می‌شود.

مبنای کار در روش Real time PCR استفاده از پروب‌ها و نشانگرهایی است که از خود نور فلورسانس منتشر می‌کنند. نحوه ساطع شدن نور در این پروب‌ها دارای دو نوع سازوکار می‌باشد. در گروه اول که TAQMAN نامیده میشود مولکول ساطع کننده نور از ابتدا به DNAهای تک رشته‌ای متصل و خاموش می‌باشد. ساخت شدن رشته مکمل هر مولکول DNA باعث جدا شدن پروب از DNA و ساطع شدن نور می‌شود. در نتیجه با افزایش ساخت DNA میزان بازتاب نور نیز افزایش می‌یابد. در گروه دوم، پروب که مولکول سایبرگرین می‌باشد تنها قادر است به DNA دورشته‌ای متصل شود و برخلاف پروب قبلی بعد از اتصال است که از خود نور ساطع می‌کند اما در این حالت نیز به ازاء ساخته شدن هر رشته DNA میزان انتشار نور افزایش می‌یابد. در نتیجه در طی واکنش PCR، به موازات تکثیر و افزایش غلظت DNA، شدت فلورسانس نیز در محلول افزایش می‌یابد با اندازه‌گیری میزان نور فلورسانس در انتهای هر چرخه، نهایتاً یک منحنی بدست می‌آید که با استفاده از نمودارهای استاندارد و فرمول‌های مربوطه، غلظت DNA هدف در نمونه مورد مطالعه، محاسبه می‌شود.

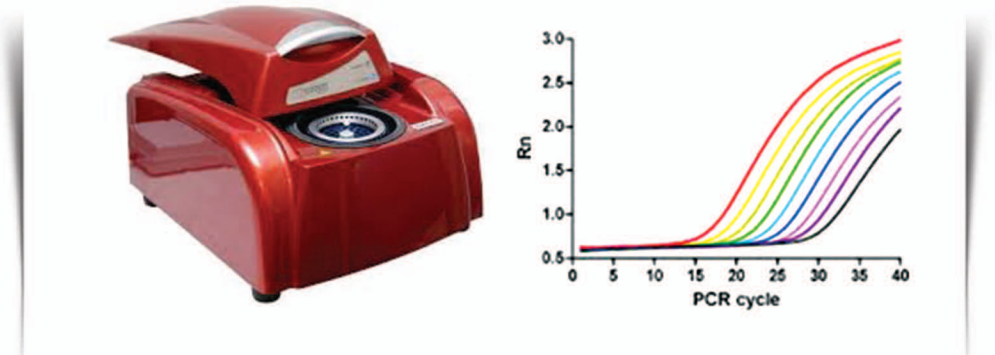



شکل ۱ -۸: مکانیسم Real time PCR

A) پروتئین فلورسنت سایبر به DNA دو رشته‌ی متصل شده و طی سنتز رشته‌های DNA از خود سیگنال سبز رنگ فلورسنت ساطع می‌کند.

B) در این روش غیر از آغازگر اصلی، پروب Taqman نیز با توالی مکمل خود به DNA تک رشته‌ای متصل است. این پروب در دو طرف خود به دو ترکیب فلورسنتی متصل است. با ساخته شدن DNA، آنزیم DNA پلی مراز پروب را تجزیه و از رشته جدا کرده در نتیجه سیگنال فلورسنت آن آشکار می‌شود.

این پروتئین، کنترل واکنش‌های التهابی و آسیب‌های بافتی ایجاد شده بوسیله عفونت‌های باکتریایی و ویروسی می‌باشد.




شکل ۱ -۹: نمونه ای از دستگاه Real Time PCR و منحنی¬های مربوط به تکثیر DNA مورد نظر
(هر نمودار رنگی مربوط به یک نمونه مجزا می‌باشد)

از جمله تست‌های تشخیصی مبتنی بر سنجش اسید های نوکلئیک، تشخیص بیماری‌های ویروسی همچون ایدز می‌باشد. بررسی مقدار DNA ویروسی در نمونه خون بیمار، بررسی حضور ویروس در نوزادان متولد شده از مادران HIV مثبت، غربال‌گری خون در بانک‌های خون برای شناسایی خون‌های سالم از خون‌های آلوده به ویژه در حالتی که بیماری دارای دوره کمون می‌باشد (دوره‌ای که ویروس در بدن وجود دارد ولی قابل ردیابی نیست) و در نهایت ارزیابی میزان موفقیت داروهای ضد رترو ویروسی با محاسبه میزان کاهش بار ویروس در بیماران تحت درمان، از جمله آزمایشات تشخیصی مبتنی بر سنجش اسید نوکلئیک هستند که با استفاده از تکنیک¬های PCR و یا Real Time PCR در بیماری ویروسی ایدز انجام می‌شوند. از این تست‌ها برای بررسی میزان ویروس موجود در بیماران مبتلا به هپاتیت B، هپاتیت C، سایتومگالو ویروس (CMV) و اپیشتاین بار (EBV) نیز استفاده می‌شود.

همانطور که قبلا نیز مطرح شد بررسی وجود یک ژن خاص و یا یک آلل خاص از یک ژن از دیگر مسیرهای تشخیصی برای برخی بیماری‌ها می‌باشد به طور مثال بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی سیلین در باکتری استاف اورئوس (باکتری گرم مثبت عامل مرگ‌ومیر در بیمارستان) با بررسی یک ژن در این باکتری انجام می‌شود. حضور ژن MecA در باکتری باعث ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین در آن می‌گردد. با توجه به ویژگی روش PCR در توانایی تکثیر مقادیر حداقلیDNA، حضور ژن MecA در نمونه‌های باکتریایی گرفته شده از بیماران بررسی و مقاومت بدن این افراد به آنتی¬بیوتیک بررسی می‌شود. استفاده از تکنیک PCR زمان تشخیص را از ۹۶-۴۸ ساعت (با روش قدیمی کشت نمونه‌ها) به ۴-۲ ساعت کاهش داده است.

از دیگر کاربردهای تست‌های تشخیصی مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک، تشخیص انواع سرطان‌ها می‌باشد؛ به عبارت دیگر، غربال‌گری ژنتیکی بوسیله تکنیک PCR ، امکان تشخیص زودهنگام و شروع درمان را فراهم می‌کند. برای مثال سرطان کلورکتال فامیلی (FAP) به علت جهش در ژن مهارکننده تومور (APC) ایجاد می‌شود. این ژن اتوزومال غالب بوده و باعث ایجاد سرطان در سنین زیر ۴۰ سالگی می¬گردد. تست‌های ژنتیکی احتمال شناسایی اعضای خانواده فرد بیمار که حامل ژن مورد نظر بوده و در نتیجه ریسک ابتلا در آنها زیاد است را بالا برده است. مثال دیگر در این زمینه شناسایی ژن‌های BRCA۱ و BRCA۲ به عنوان ژن‌های مستعد کننده سرطان سینه و تخمدان در افراد حامل این ژن‌ها است. شناسایی حاملین ژن باعث ارائه مشاوره به افراد در معرض خطر، تشخیص سریع‌تر و پیشگیری از ابتلا به سرطان می‌گردد. از دیگر کاربردهای این آزمایشات، در غربال‌گری‌های پیش از تولد می‌باشد. در بیشتر کشورهای توسعه‌یافته، غربال-گری ژنتیکی با هدف تعیین ناهنجاری‌های کروموزومی و ژنتیکی و دادن توانایی انتخاب به والدین برای پایان حاملگی صورت می‌گیرد. از جمله آزمایشات ژنتیکی رایج میتوان به آزمایش بیماری‌های سندروم داون، هموفیلی، سیستیک فیبروزیس و ... اشاره کرد. هرچند هنوز بحث‌های قانونی و اخلاقی زیادی در زمینه اجازه پایان حاملگی بر اساس نتایج چنین آزمایشاتی در کشورهای مختلف مطرح می‌باشد.

## ۱-۴- کاربردهای زیست فناوری پزشکی در حوزه درمان

تولید ترکیبات بیوفارماسوتیکال یا همان محصولات زیست پزشکی، از مهم‌ترین کاربردهای زیست‌فناوری در حوزه درمان می‌باشند. این محصولات یا از منابع زیستی استخراج می‌گردند و یا به صورت سنتزی و نیمه سنتزی و با استفاده از منابع زیستی ساخته می‌شوند. این ترکیبات که در درمان بیماری‌ها نقش مهمی بر عهده دارند به ۵ گروه زیر تقسیم‌بندی می‌شوند:

### الف) واکسن‌های نوترکیب

این واکسن‌ها علاوه بر بحث پیشگیری که قبلاً هم ذکر شد، در درمان انواع بیماری‌ها و سرطان‌ها نیز مفید بوده و به عنوان داروی نوترکیب مطرح می‌باشند. تاکنون واکسن‌های درمانی مختلفی برای بیماری‌هایی همچون ایدز، لنفوما، سرطان سینه، سرطان کولون و سرطان پروستات روانه بازار گردیده‌اند.

شکل ۱ – ۱۰: انستیتو پاستور ایران به عنوان یکی از مراکز مطرح کشور در زمینه تولید داروهای نوترکیب محسوب می شود.

### ب) سایتوکاین ها

یکی دیگر از ترکیبات بیوفارماسوتیکال، سایتوکاین‌ها هستند. این ترکیبات توانایی فعال کردن سلول‌های سیستم ایمنی مانند ماکروفاژها و منوسیت‌ها را داشته و در کنترل ویروسها و مهار تکثیر غیرعادی سلول‌ها نقش دارند. اینترلوکین ۱ از مهم‌ترین محصولات تولیدی عضو این خانواده می‌باشد که بوسیله ماکروفاژها تولید شده و نقش مهمی در افزایش دمای بدن بر عهده دارد. مهم‌ترین نقش این پروتئین، کنترل واکنش‌های التهابی و آسیب‌های بافتی ایجاد شده بوسیله عفونت‌های باکتریایی و ویروسی می‌باشد.

### ج) آنزیم‌ها

آنزیم‌ها، مولکول‌های زیستی بزرگی هستند که مسئول انجام واکنش‌های شیمیایی متعدد برای بقا و حیات سلول بوده و از طرف دیگر کاتالیزورهایی برای سرعت بخشی به واکنش‌های متابولیک می‌باشند. درنتیجه اختلال در فعالیت یک آنزیم می‌تواند منجر به آسیب و بیماری گردد. از آنجا که این مولکول‌ها منشاء زیستی داشته و هر کدام ژن¬های اختصاصی تولید کننده خود را دارند، با شناسایی ژن‌های مربوطه و با استفاده از روش‌هایی همچون تکنولوژی DNA نوترکیب می‌توان آنها را تهیه نمود. به طور مثال Altepase (TPA فعال) سرین، پروتئازی است که نقش مهمی در حذف لخته‌های خونی داشته و با تکنیک‌های زیست فناوری ساخته شده است. Dornaseα نیز یک DNase که برای جداسازی رشته‌های DNA از هم به کار می‌رود و با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب تهیه شده است

### د) هورمون‌ها

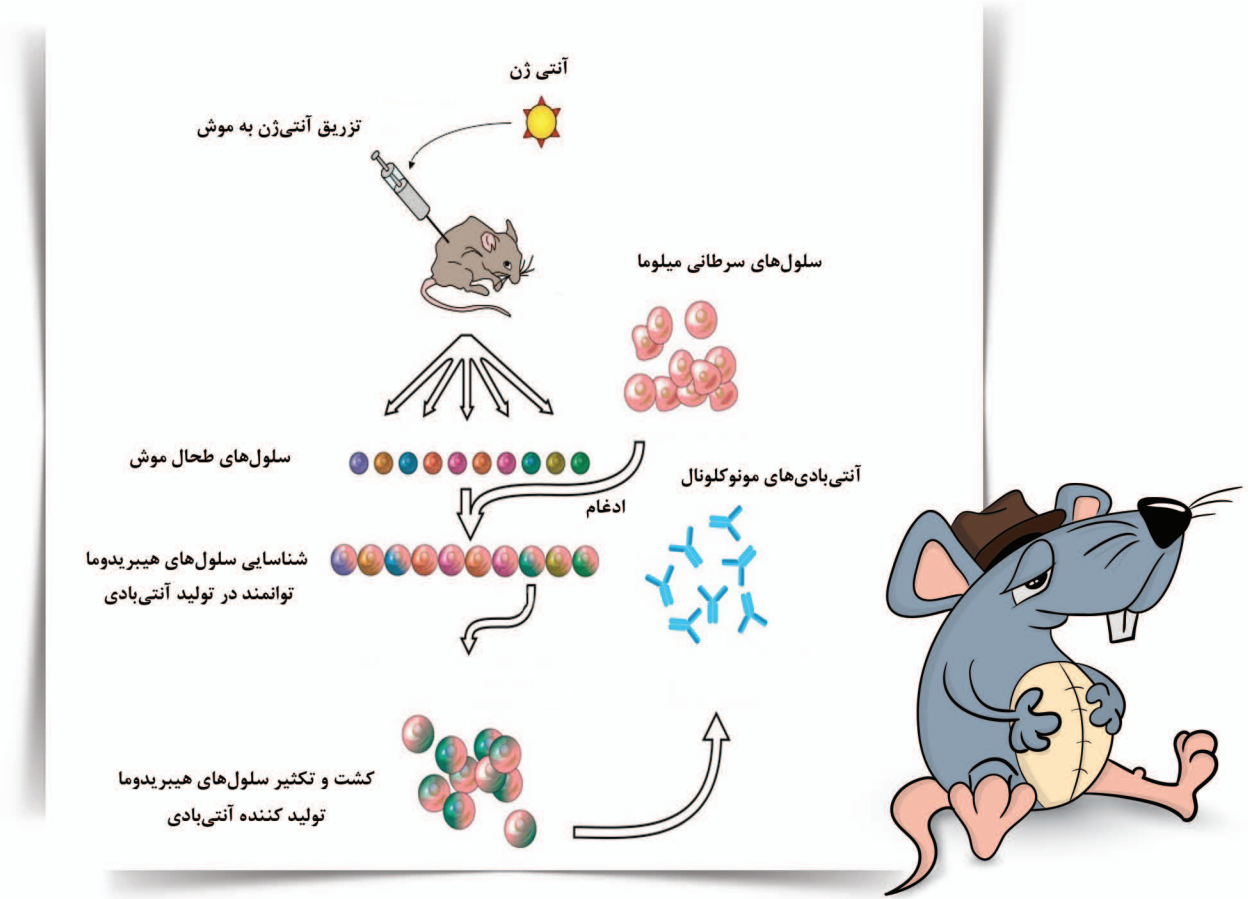
پروتئومیکس به معنی مطالعه ساختار و عملکرد کلیه پروتئین‌های یک سلول، بافت و یا فرد می‌باشد. به علت نقش کلیدی که پروتئین‌ها در مسیرهای متابولیکی و فیزیولوژیکی دارند به عنوان اجزای حیاتی سلول‌های موجودات زنده به شمار می‌روند.
هورمون‌ها ترکیباتی هستند که بوسیله سلول‌ها و غدد خاصی ترشح شده و باعث فعالیت سلول ها یا بافت های ویژه ای می گردند. هر گونه نقص در تولید هورمون ها باعث ایجاد مشکلات جدی در موجودات زنده می‌شود. از مهم‌ترین آنها می‌توان به هورمون های رشد، انسولین و گنادوتروپین ها اشاره کرد. هورمون‌ها گروه دیگری از مولکولی‌های زیستی هستند که امروزه در آزمایشگاه به کمک تکنیک‌های زیست فناوری و با تکیه بر تکنولوژی DNA نوترکیب ساخته شده و به عنوان دارو در اختیار بیماران قرار می‌گیرند.

### ه) آنتی‌بادی‌های مونوکلونال

آنتی‌بادی‌ها پروتئین‌هایی هستند که بوسیله لنفوسیت‌های B و در پاسخ به مواجهه با عوامل بیگانه موسوم به آنتی‌ژن‌ها تولید می‌شوند. آنتی‌بادی‌ها به طرز شگفت‌آوری متنوع بوده و در شناسایی و خنثی کردن عوامل بیگانه و پاتوژن‌هایی همچون باکتری‌ها و ویروس‌ها به طور اختصاصی عمل می‌کنند. این مولکول‌های بزرگ شامل دو زنجیره سبک و سنگین بوده و بر اساس اختلافات ساختمانی نواحی C زنجیره خود به پنج کلاس ایمونوگلوبولین تقسیم می‌شوند این پنج کلاس ( IgM، IgA، IgE، IgD و IgG ) را ایزوتایپ نامنده و از از دیدگاه زیست‌فناوری IgG مهم‌ترین آنها محسوب می‌شود. آنتی‌بادی‌ها به دو گروه پلی‌کلونال و مونوکلونال تقسیم می‌شوند. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال مخلوطی از ایمونوگلوبولین‌ها هستندکه اپی‌توپ‌های مختلفی از آنتی‌ژن را شناسایی می‌کنند، در حالیکه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تنها به یک اپی-توپ آنتی‌ژن متصل می‌شوند. توانایی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال منشاء تحولات بزرگی در زمینه مطالعات و تشخیص‌های پزشکی شده است. برای اولین بار در سال ۱۹۷۵، کهلر[۱] و میلستین[۲] ، فرآیند تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با تکنیک هیبریدوما را معرفی نمودند. در این روش، ابتدا آنتی‌ژن هدف به موش تزریق گردیده سپس لنفوسیت‌های B تولید کننده آنتی‌بادی از طحال موش استخراج می‌گردد. با الحاق لنفوسیت B تولید کننده آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن هدف با سلول سرطانی میلومای موشی، سلولی نامیرا تحت عنوان هیبریدوما ایجاد می‌شود که با تکثیر خود آنتی‌بادی‌هایی با منشا اولیه و یکسان خواهد ساخت. به این تکنیک هیبریدوما گفته شده و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولیدی آن به صورت کاملا اختصاصی به مولکول‌های هدف متصل می شوند (شکل ۱-۱۱).
آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کاربردهای بسیار گسترده‌ای در حوزه تشخیص‌های پزشکی دارند. شناخته شده‌ترین و شاید پرکاربردترین کیت تشخیصی مبتنی بر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، کیت تست بارداری می‌باشد. در این کیت آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه هورمون HCGα[۳] ، با تشخیص این هورمون افراد باردار را شناسایی می‌کنند.

۱. Kohler
۲. Milstein
۳. Human Chorionic gonadotropin

در تائید تشخیص بیماری‌هایی همچون ایدز که تشخیص با تکنیک وسترن بلات انجام می¬گیرد نیز از آنتی‌بادی‌های مـــونوکلونال اختصاصی علیه پروتئین‌های ویروس استفاده می‌گردد..




شکل ۱ – ۱۱: مراحل تولید آنتی بادی مونوکلونال در موش

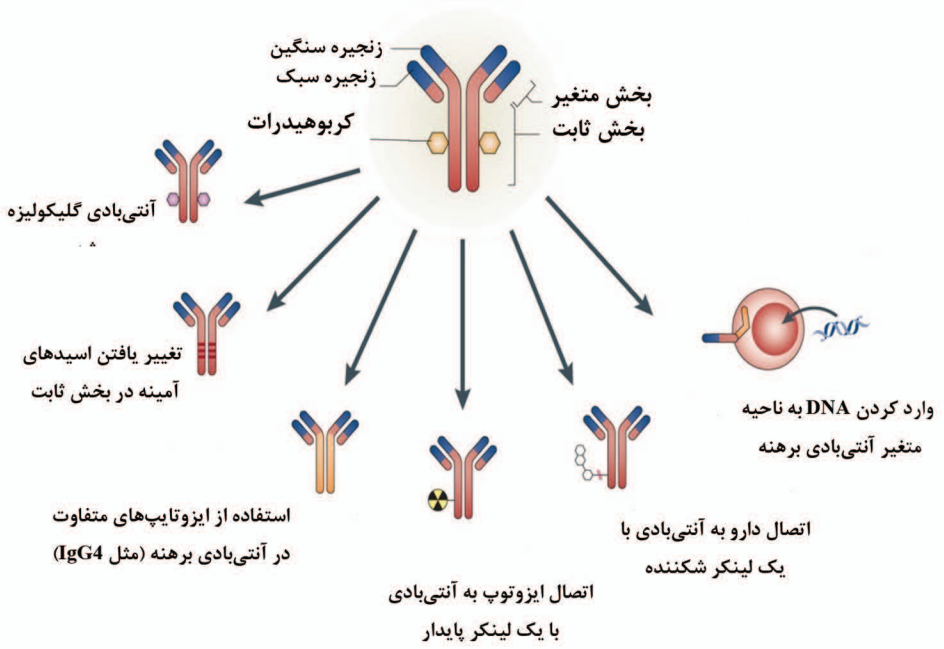
با وجود کاربردهای گسترده آنتی بادی های مونوکلونال، اما تاثیر آنها در درمان بیماری ها بسیار کمتر از میزان پیـــش بیـــنی شده بود، عدم وجود گیرنده برای برخی از آنتی بادی ها، عامل بیگانه شناخته شدن آنتـی بادی ها در بدن با توجه به اینکه منـــشاء آنها ژن های موش می باشد، اندازه بزرگ و نیمه عمر طولانی آنتی‌بادی‌ها از جمله عوامل کاهش دهنده موفقیت آنها شمرده می‌شود.

**به نظر شما زیست‌فناوری قادر به برطرف کردن چنین مشکلاتی می‌باشد؟**

فناوری DNA نوترکیب و مهندسی پروتئین امکان دست‌ورزی ساختار آنتی‌بادی‌ها را فراهم کرده است. به عبارت دیگر بسیاری از این مشـکلات را می‌توان با مهندسی آنتی‌بادی برای رسیدن به ویژگی‌های مطلوب حل نمود. امروزه با توسعه فناوری‌های نوترکیبی، آنتی‌بادی‌های مـــونوکلونال به قطعاتی کوچکتر با توانایی اتصال به آنتی‌ژن‌ها با میل ترکیبی و ظرفیت بیشتر تبدیل شده‌اند. همچنین این امکان نیز فراهم شده که طیف وسیعی از مولکول‌ها همچون آنزیم‌ها به منظور پیش‌دارو درمانی، ذرات رادیواکتیو و توکسین‌ها برای درمان سرطان، ویـروس‌ها و DNA برای ژن درمـــانی، دنباله‌های کاتیونی برای رها سازی DNA، لیپوزوم‌ها برای دارو رسانی هدفمند و حسگرها برای تشخـــیص با قطعیت بیشتر مولکول‌های هـــدف، با آنتی‌بادی‌ها ادغام می‌شـوند. چنین آنتی‌بادی‌هایی که آنتی‌بادی ترکیبی[۱] نامـــیده می‌شوند، در مـــقابل آنتی‌ادی‌های سـاده که آنتی‌بادی برهنه[۲]، کاربردهای آنتی‌بادی ها را بسیار گسترده‌تر کرده است به طور مثال نشان‌دار کردن آنتی‌بادی های مونوکـلونال با مواد رادیو ایزوتوپ و تـــزریق به بیمار به‌منظور آشکارسازی محل سلول‌های هدف، میزان دقت عمل در جراحی‌ها را بالا می‌برد.

از انواع آنتـــی‌بادی‌های مونوکلونال مورد استفاده در درمـــان ســـرطان می‌توان به Bevacizumab و Vitaxin (مهارکننده‌های رگ‌زایی) و Herceptin (مهارکننده HER۲ -Human Epidermal Growth Factor Receptor ۲) اشاره کرد.

۱ . Conjugated mAb
۲ . Nacked mAb




شکل ۱-۱۲ : انواعی از آنتی‌بادی‌های منوکلونال ترکیبی

## ۱-۵- برخی علوم موثر در پیشرفت زیست فناوری پزشکی

یکی از عوامل سرعت بخشی و پیشرفت علوم در بخش های مختلف به وجود آمـــدن حوزه های بین رشـــته ای می باشد. به کاربردن نتـایج علوم مختلف در حوزه پزشـــکی به ویژه زیست فناوری پزشکی از عوامل پیشرفت سریع این حوزه می باشد. در ادامه توضیحاتی در مورد بعضی از علوم موثر بر زیست فناوری پزشکی آورده می شود.

### ۱-۵-۱- ژنومیکس[۱]

ژنومیکس یکی از زیر شاخه‌های علم ژنتیک مولکولی است که در زیست فناوری پزشکی نیز کاربرد دارد. این علم به نقشه برداری، تعیین توالی و آنالیز ژنوم موجودات مختلف می‌پردازد. ژنومیکس برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ بوسیله توماس رادریک[۲] معرفی و همـوفیلوس آنفـولانزا اولیـن میکروارگانیسمی بود که ژنوم آن تعیین توالی گردید. از پروژه ژنوم انسانی میتوان به عنوان بزرگ‌ترین و ارزشـمندترین پروژه در زمیـنه عـلوم زیستی و نقطه عطف ظهور و درخشش ژنومیکس نام برد. پروژه ژنوم انسانی[۳] که به تعیین توالی نواحی یوکروماتین ژنوم انسان پرداختـه، در سـال ۱۹۹۶ آغاز شد و در سال ۲۰۰۱ به نقطه اوج خود رسید. نسخه اولیه این پروژه در سال ۲۰۰۳ تکمیل و امروزه تقریباً ۹۹٫۹۹٪ ژن‌های انـسانی با این روش تعیین توالی شده و جایگاه و توالی دقیق آنها در ژنوم انسانی مشخص شده‌اند.

با در دست داشتن اطلاعات ژنوم انسان می‌توان ظهور علائم کلینیکی بیماری در فرد (فنوتایپ) را از روی محتوای ژنتیکی فرد (ژنوتایپ) تا حـدود زیادی پیش‌بینی کرد. همچنین شناسایی تمامی نواقص ژنتیکی در انسان و تعیین منشأ و کنترل بیماری‌های فیـزیکی و روانی با ایـن روش قابل انجام است. امروزه ژن‌های جدید مؤثر در بیـماری‌های فیزیولوژیکی (بیماری‌های قلبی و عروقی و ...) و روانی (شـیزوفرنی و ...) بوسیله ژنومیکس شناسایی شده‌اند. تعیین توالی ژنوم که چند سال قبل هزینه‌هایی میلیون دلاری داشت، امروزه و با استفاده از روش‌های جدید به حدود ۱۰۰ دلار رسیده و پیـش‌بینی می‌شود از این نیز کمتر شود. از حیث زمانی نیز مدت زمان انجام این آزمایـشات با روش ژنومیکـس امروزه بسـیار کوتاه‌تر گردیده است. بنابراین بسـیاری از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی در جهان مجهز به دسـتگاههای تعیین توالی ژنوم افراد برای اهداف پزشـکی و سلامت می‌باشند.

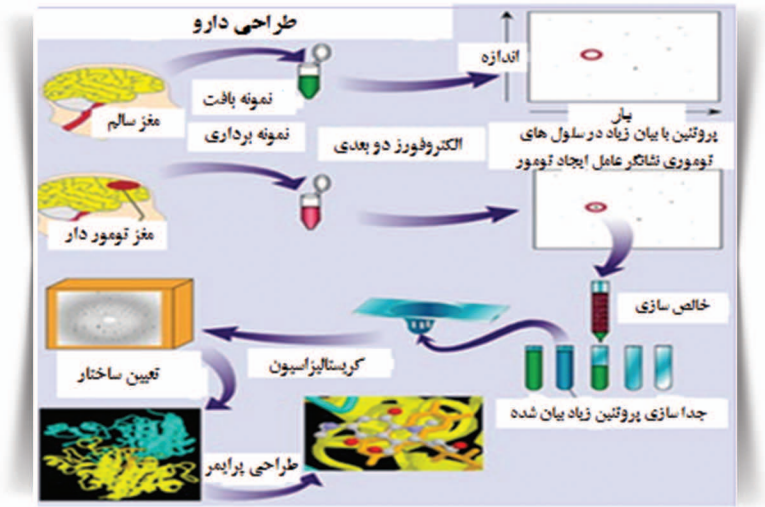
### ۱-۵-۲- پروتئومیکس[۴]

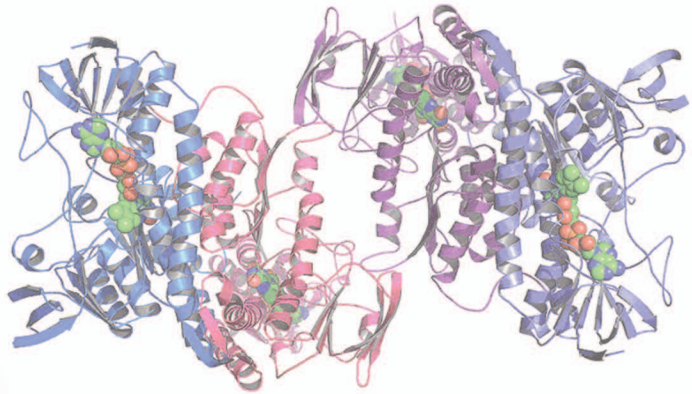
پروتئومیکس به معنی مطالعه ساختار و عملکرد پروتئین‌های یک سلول، بافت و یا فرد می‌باشد. به علت نقش کلیدی که پروتئیـن‌ها در مسیرهای متابولیکی و فیزیولوژیکی بر عهده دارند به عنوان اجزای حیاتی سلول‌های موجودات زنده به شمار می‌روند.

اولیـن مـطالعه در زمینه پروتئومیـکس بر روی پروتئـین‌های باکتـری Ecoli بوسـیله الکـتروفورز دو بعدی توسـط پترسـون[۵] در سـال ۱۹۷۵ انجام پـذیرفت. در ایـن روش ابتـدا پروتئـین‌ها بر اسـاس pH ایزوالکـتریک خـود در یـک

۱. Genomics
۲. Thomas Roderick
۳. Human Genome Project
۴. proteomics
۵ Patterson

فاز جداسازی گردیده و در فاز بعدی بر مبنای جرم مولکولی خود از یکدیگر تفکیک می‌گردند. با مقایسه باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز نمونه بیمار و نمونه سالم، پروتئین ناقص شناسایی گردیده و طراحی دارو برای مهار آن صورت می‌گیرد. تعیین مقدار پروتئین در سلول‌ها، بافت ها و مایعات بدن، محاسبه تغییرات بیان پروتئین در سلول‌های بیمار در مقایسه با سلول‌های سالم، بررسی تغییرات پس ترجمه‌ای، بررسی میانکنش های پروتئین-پروتئین، شناسایی و تعیین موقعیت پروتئین‌های سطحی سلول، شناسایی ژن‌های ناشناخته از روی محصولات پروتئینی آنها از دیگر کاربردهای این علم در زیست فناوری پزشکی می‌باشند. مهم‌ترین کاربرد پروتئومیکس در تشخیص‌های کلینیکی، تحقیق و شناسایی بیومارکرهای جدید پروتئینی بیماری‌ها از طریق بررسی و مقایسه نمونه‌های کلینیکی بیماران با افراد سالم می‌باشد. این امر منجر به شناسایی اهداف درون سلولی و طراحی مستقیم و صحیح دارو بر علیه آن می‌گردد..



شکل ۱-۱۳: مراحل پروتئومیکس در طراحی دارو

با این همه پروتئومیکس تا کنون با موفقیت‌های چندانی همراه نبوده است. از دلایل عدم موفقیت آن می‌توان به عوامل زیر اشاره کرد:

- تکنولوژی‌های موجود قادر به ردیابی و آشکارسازی مقادیر بسیار کم پروتئین نیستند.
- مقدار پروتئین مورد نظر ممکن است با توجه به سن یا جنسیت بیمار متفاوت باشد.
- در بیشتر بیماری‌ها بیش از یک شاخص پروتئینی نقش و دخالت دارد.
- پروتئومیکس هزینه‌بر بوده و نیاز به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی دارد.

### ۱-۵-۳- بیوانفورماتیک[۱]

یکی از ابزارها و زمینه‌های جدید مرتبط با علم زیست فناوری که امروزه به میزان زیادی کاربرد پیدا کرده است بیوانفورماتیک می‌باشد. بیوانفورماتیک با بهره‌گیری هم‌زمان از علوم کامپیوتر، ریاضیات و مهندسی به بررسی و تفسیر داده‌های بیولوژیکی می‌پردازد. بررسی اطلاعات بدست آمده از پروژه ژنوم انسانی برای تبدیل آنها به اطلاعات کاربردی ارزشمند در جهت اهداف علمی از جمله ثمرات بیوانفورماتیک به حساب می‌آید. امروزه با همه‌گیر شدن تعیین توالی ژنوم افراد، استفاده از بیوانفورماتیک وارد فازهای جدیدی شده و همه روزه شاهد پیشرفت این بخش میان‌رشته‌ای می‌باشیم.

### ۱-۵-۴- انتقال ژن

انتقال ژن از جمله پیشرفت‌های حوزه ژنتیک مولکولی است که منجر به ایجاد تکنیک ژن درمانی[۲] در حوزه زیست‌فناوری پزشکی گردیده است. در ژن درمانی پلیمرهای اسید نوکلئیک سالم به سلول‌های بیمار انتقال داده می‌شود تا به عنوان جایگزینی برای عملکرد ژن ناقص عمل کنند. برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ بود که فرنچ آندرسون[۳] اقدام به انتقال مستقیم DNA انسانی به ژنوم هسته‌ای با هدف درمانی نمود. این روش با روشن یا خاموش کردن ژن هدف در سلول مورد نظر به تصحیح عملکرد ژن‌های ناقص می‌پردازد. دو گروه اصلی از روش های ژن درمانی روش‌های مبتنی بر استفاده از ویروس‌های نوترکیب ( که گهگاهی نانوذرات زیستی و یا وکتورهای ویروسی نامیده می شوند) و روش‌های غیرویروسی که با انتقال DNA برهنه[۴] بوسیله روش‌هایی همچون تفنگ ژنی، روش الکتروپوریشن[۵] و یا با کمک لیپوزوم[۶] به درون هسته سلول صورت می پذیرد، می‌باشد.

۱. Bioinformatics
۲. Gene therapy
۳. French Anderson
۴. Nacked
۵ Electroporation
۶ Liposomes

تمامی ویروس‌ها با الحاق به سلول میزبان و انتقال مواد ژنتیکی، سیکل همانندسازی خود را داخل سلول میزبان کامل می‌کنند. این مواد ژنتیکی دستورالعمل‌های پایه‌ای نحوه‌ی تولید نسخه‌های زیادی از ویروس‌ها را به ژنوم میزبان انتقال داده و باعث می‌شوند دستگاه همانندسازی سلول میزبان در راستای تامین نیازهای ویروس فعالیت نماید. در نتیجه سلول میزبان نسخه‌های فراوانی از ویروس‌ها را که منجر به آلوده شدن سلول‌های بیشتری می‌شوند را تولید می‌کند. این رفتار ویروس‌ها باعث شده تا ابزار مناسبی برای انتقال ژن‌های مورد نظر به داخل ژنوم میزبان باشند در این راستا ژنوم ویروس‌ها با دو هدف حذف ژن‌های بیماریزا و الحاق ژن مورد نظر دستکاری شده و ویروس‌های نوترکیب حاصل به عنوان حامل یا وکتور به بدن میزبان انتقال داده می‌شوند. ویروس‌ها انواع مختلفی داشته که هر کدام می توانند برای اهداف خاص به عنوان وکتور در ژن درمانی استفاده شوند. از آن جمله می‌توان به رتروویروس‌ها و آدنوویروس‌ها اشاره کرد.

روش‌های غیرویروسی در مقایسه با روش‌های ویروسی دارای مزایای خاصی از جمله امکان تولید در مقیاس بالا می‌باشند. سطوح پایین انتقال و بیان ژن از نقاط ضعف روش‌های غیرویروسی بوده که پیشرفت‌های اخیر در فناوری وکتور باعث افزایش عملکرد مولکول ها شده و کارایی روش‌های غیر ویروسی به سطح روش‌های انتقال مبتنی بر وکتورهای ویروسی رسیده است. به طور مثال تزریق DNA برهنه روشی ساده برای انتقال DNA به صورت غیرویروسی است اما آزمایشات بالینی اجرا شده در زمینه تزریق درون عضلانی پلاسمیدهای حاوی DNA برهنه با چندین بحث روبرو است؛ در این روش در مقایسه با سایر روش ها میزان بیان کم است. علاوه بر آزمایشات انجام شده با پلاسمیدها، آزمایشاتی با محصولات PCR برهنه نیز انجام شده است. جذب سلولی DNA برهنه به طور کلی ناکارآمد است به همین محققان روی بهبود کارآیی جذب DNA تمرکز کرده اند که باعث ایجاد روش های جدیدی از جمله الکتروپوریشن، سونوپوریشن و استفاده از تفنگ ژنی شده است.

الکتروپوریشن روشی است که از پالس‌های کوتاهی از ولتاژ بالا برای حمل DNA در امتداد غشای سلولی استفاده می‌کند. تصور می‌شود که این شوک سبب شکل گیری موقت منافذ در غشای سلولی شده و این منافذ موجب انتقال مولکول DNA می‌شود. در سونوپوریشن از فرکانس‌های اولتراسونیک برای ورود DNA به داخل سلول‌ها استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد فرآیند حفره‌سازی صوتی غشای سلولی را تخریب کرده در نتیجه منجر به حرکت DNA به داخل سلول می‌شود. استفاده از بمباران ذرات یا تفنگ ژنی روش فیزیکی دیگری برای انتقال DNA می باشد. در این فناوری DNA بر روی ذرات طلا پوشیده شده و درون یک وسیله ای که به منظور دست یابی به نفوذ DNA تولید نیرو می کند، بارگذاری می شوند.

یکی از لازمه‌های بهبود انتقال DNA به داخل سلول، حفاظت DNA از صدمات می‌باشد. بدین منظور ساختار لیپوزوم که یک وزیکول میکروسکوپی شامل دو لایه‌ی فسفولیپیدی است مورد توجه می¬باشد. در ابتدا، از لیپیدهای آنیونی و خنثی برای ساخت لیپوپلکس‌هایی (ترکیب لیپید و DNA) با نقش وکتورهای مصنوعی استفاده می‌شد. علیرغم سمیت کم و سازگاری بالای این ترکیبات با مایعات بدن، تولید آنها پیچیده و وقت گیر بوده و توجهات به سمت تولید نسخه های کاتیونی پیش رفت. اولین بار به منظور متراکم نمودن و تسهیل کپسوله کردن مولکول‌های DNA داخل لیپوزوم‌ها از لیپیدهای کاتیونی با بار مثبت استفاده شد. اندکی بعد مشخص شد که استفاده از لیپیدهای کاتیونی به طور معناداری پایداری لیپوپلکس‌ها (ترکیب لیپوزوم و DNA) را ارتقا می‌دهد. همچنین با توجه به بار مثبت، لیپوزوم‌های کاتیونی با غشای سلولی تعامل داشته و به نظر می‌رسد روش اصلی جذب لیپوپلکس‌ها توسط سلول اندوسیتوز است. متداولترین استفاده از لیپوپلکس‌ها در انتقال ژن به داخل سلول‌های سرطانی می‌باشد.

شکل ۱-۱۴: برخی از راه‌های مختلف انتقال ژن در ژن درمانی

## ۱-۵-۵- سلول‌های بنیادی[۱]

به سلول‌های تمایز نیافته موجودات پرسلولی که از یک سو قادر به تقسیم‌های متعدد و از سویی دیگر توانایی تمایز به سلول‌های اختصاصی را دارند سلول‌های بنیادی گفته می‌شود. سلول‌های بنیادی در پستانداران به دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند:

الف) سلول‌های بنیادی جنینی که از بلاستوسیت جنین بدست می‌آیند.

ب) سلول‌های بنیادی نوزادی و بزرگسالی که از بافت‌های مختلف بدن بدست می‌آیند.

شکل ۱۵ ۱: پژوهشکده رویان یکی از مراکز اصلی فعال در حوزه سلول‌های بنیادی

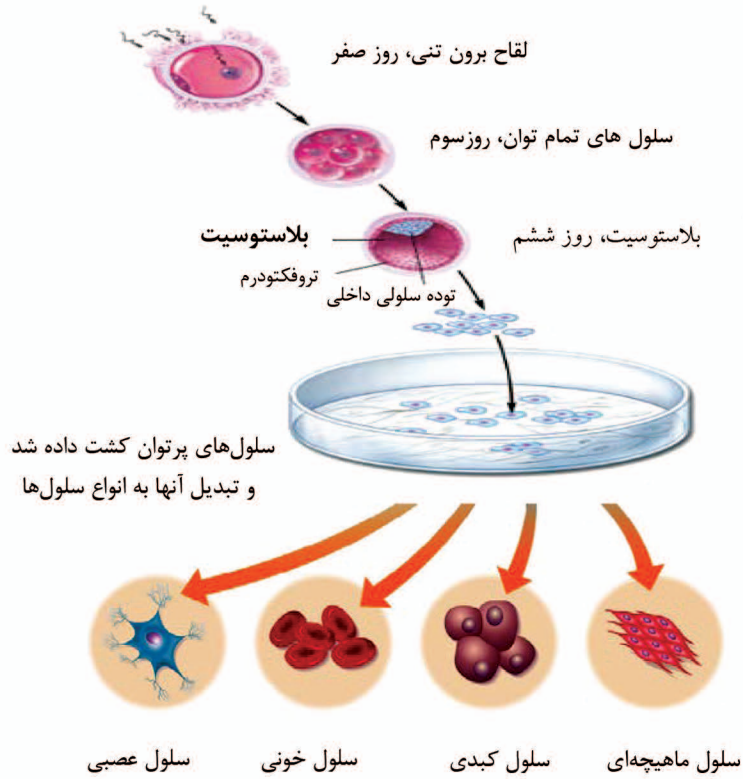
پیشرفت‌های اخیر در حوزه سلول‌های بنیادی[۲]، راه را برای استفاده از این سلول‌ها در درمان بیماری‌ها باز نموده است. درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی به استفاده از این سلول‌ها برای مهار یا درمان بیماری گفته می‌شود. از بین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی داشتن کاریوتیپ نرمال، حفظ فعالیت بالای تلومراز و پتانسیل تکثیر طولانی مدت قابل توجه هستند.

سلول‌های بنیادی جنینی حاصل از بلاستوسیت جنین اولیه پستانداران، پرتوان بوده، می توانند تمایز یافته و اکتودرم ابتدایی را تولید کنند که در نهایت در طول گاسترولاسیون به همه اجزا سه لایه جوانه شامل اکتودرم، مزودرم و اندودرم تمایز می‌یابند. این سه لایه بیشتر از ۲۲۰ نوع سلول را در بدن بزرگسالان تشکیل می دهند.

۱. Stem cells
۲. Stem cell therapy

به عبارتی سلول های بنیادی جنینی ازسلول‌های بنیادی بالغ که در بزرگسالان وجود دارند، توسط خاصیت پرتوانی متمایز می‌شوند. درحالـــیکه، سلول های بنیادی جنینی می‌توانند انواع سلول‌ها را ایجاد کنند، سلول های بنیادی بالغ چندتوان بوده و قادرند تنها تعداد محدودی از انواع سلولی را تولید کنند.

چنانچه بتوانیم پتانسیل پرتوانی ســلول‌های بنــیادی جنیــنی (تمایز به انواع سلول‌ها) را بصورت برون تنی تحت کنــترل درآوریم، ممـکن است بتوان از این سلول‌ها به عنوان وســیله‌ای برای ایجــاد انــواع ســلول یـا انواع بافت¬های مورد نیاز استفاده کرد. مغز استخوان و سلول‌های خــونی بند ناف به ترتیب از جمله منابع اصلی سلـول‌های بــنیادی بزرگســالی و نوزادی می‌باشند. با تزریق سلول‌های بنــیادی به بافت یا انــدام هــدف، سلول بنــیادی به جستجو پرداخــته و ناحیه آسیب دیده را شناسایی و به ترمیم و درمان ناحیه مزبور می‌پردازد. همچــــنین سلول‌های بنـیادی در ناحیه آسیب به سرعت تــکثیر می‌یابند که این امــر نیــز به تحــریک مکانیسم‌های ترمیمی بدن منجر می‌شــود. از ســلول‌های بنیــادی برای درمان بیــماری‌های تحلیل ســلول‌های عــصبی[1] همــچون آلزایــمر و هـمچنــین ناراحتی‌های قلبی، دیابت، درمان طاســی سر و... استــفاده می‌شود.

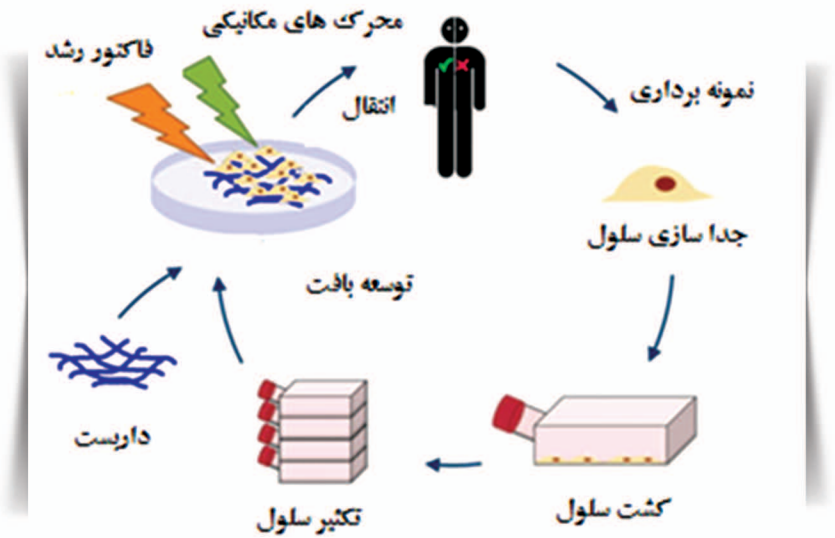



شکل ۱-۱۶ : مسیر بدست آمدن انواع سلول‌ها از سلول‌های بنیادی جنینی

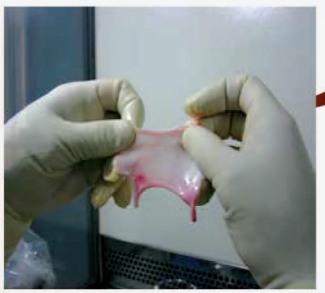
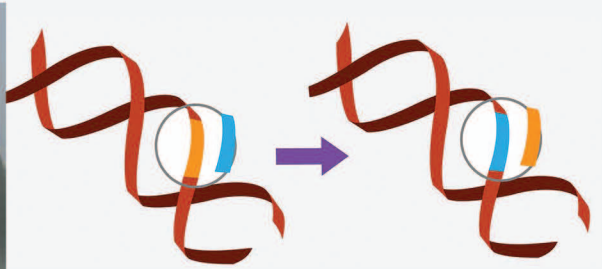
۱ . neurodegenerative

### ۱-۵-۶- مهندسی بافت[۱]

به رشد بافت‌های پیوندی یا ارگان‌های جدید روی داربست‌های کلاژنی برای تولید یک اندام دارای عملکرد و جایگزین کردن مجدد آن به فرد بیمار، مهندسی بافت گفته می‌شود. این بخش در سال‌های اخیر پیشرفت‌های خوبی داشته و تولید بافت‌هایی همچون استخوان، غضروف، پوست، عضله، قلب و کلیه نمونه‌هایی از موفقیت‌های آن محسوب می‌شود. به چنین بافت‌هایی بیوایمپلنت[۲] گفته می‌شود. جمهوری اسلامی ایران نیز در این زمینه سرمایه‌گذاری قابل توجهی نموده و هم‌اکنون تکنولوژی ساخت بیوایمپلنت‌های استخوانی و بیوایمپلنت تاندون‌های بیولوژیکی را در اختیار دارد. ساخت بیوایمپلت کار بسیار حساسی است و در اتاق‌های تمیز[۳] و تحت شرایط کاملاً استریل صورت می‌گیرد.




۱. Tissue engineering
۲. Bio implant
۳. Clean room

شکل ۱ -۱۸: نمونه ایمپلنت ساخت ایران و نمونه اتاق تمیز

### ۱-۵-۷- ویرایش ژن[۱]

ویرایش ژن که با استفاده از روش‌هایی مانند کریسپر[۲] مقدور شده، امروزه یکی از روش‌های نوین برای درمان بسیاری از بیماری‌ها محسوب می‌شود. اگرچه این روش با محدودیت‌های اخلاقی روبروست ولی بسیاری از کشورها برنامه‌های کلانی برای اجرایی شدن آن در پیش گرفته‌اند.

کریسپرکه مخفف تناوب‌هایِ کوتاهِ پالیندرومِ فاصله‌دارِ منظمِ خوشه‌ای[۳] می‌باشد، نوعی فناوری جدید برای ویرایش DNA است که به دانشمندان امکان می‌دهد بسیار دقیق‌تر و بهتر از روش‌های قبل، هر ژنی را در هر موجود زنده‌ای ویرایش و تغییرات لازم را در آن اعمال کنند.

کریسپر در سال ۱۹۸۷ در باکتری اشرشیاکلی کشف شد. دانشمندان متوجه شدند که در ژنوم باکتری، قطعاتی از مولکول DNA پشت سر هم یا با فاصله تکرار می‌شوند. سال‌ها بعد و در سال ۲۰۰۷ بود که مشخص شد این توالی‌های تکرار شونده در واقع سیستم ایمنی اکتسابی باکتری به خصوص در مقابل ویروس‌ها می‌باشد.

همان گونه که سیستم ایمنی موجودات پیچیده‌تر مثل انسان با قرار گرفتن در معرض میکروب‌ها نحوه مقابله با آنها را یاد می‌گیرد، باکتری‌ها نیز با استفاده از کریسپر، ژنوم ویروس را تخریب و از خود محافظت می کنند. اعلام این پدیده در سال ۲۰۱۲ و آزمایشات اولیه استفاده از این تکنیک به عنوان یک فناوری جهت ویرایش ژنوم طی سال‌های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۵ انجام شده است.

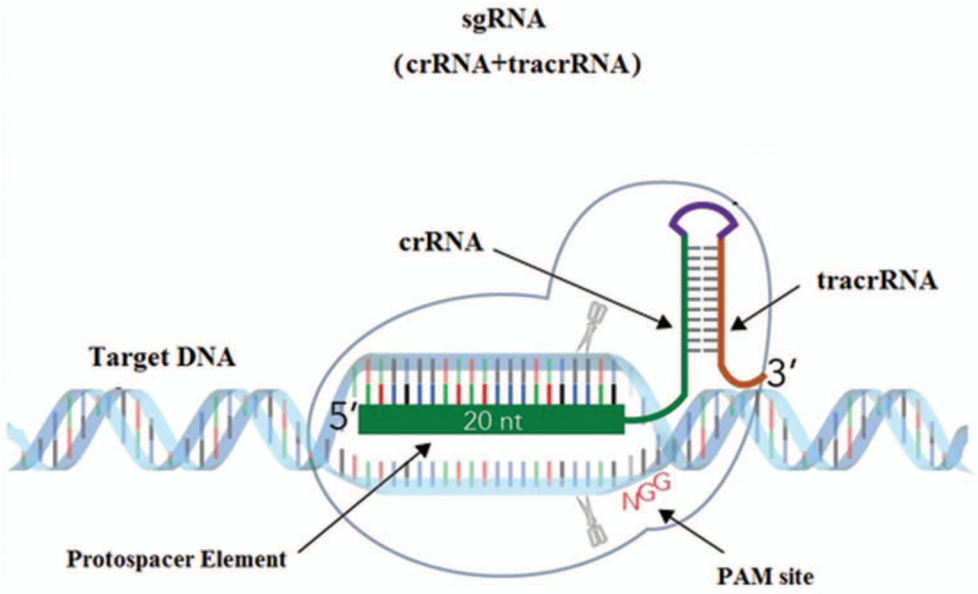
بخشی از سیستم کریسپر، پروتئینی به نام کَس[۴] ۹ است، که قابلیت جستجو، برش زدن و استحاله DNA ویروس را به روشی خاص دارد. بر این اساس فناوری کریسپر به دانشمندان اجازه می‌دهد، تغییرات مورد نظر

۱ . Gene editing
۲ . crisper
۳ . Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
۴ . Cas9

را در DNAسلول‌ها و بدون انتقال DNA خارجی به ژنوم، ایجاد کنند. به زبان ساده‌تر کریسپر را میتوان تکنیکی با توانایی بریدن و جداکردن ژن معیوب از ترکیب ژنتیکی سلول معرفی نمود.

پروتئین Cas۹ یک پروتئین با خاصیت اندونوکلئازی بوده که توالی‌های مشخص در DNA هدف را شناسایی و سه یا چهار نوکلئوتید بالادست آن را برش میدهد. در این سیستم tracrRNA[۱] بعد از هیبریداسیون با crRNA[۲] به کمک sgRNA[۳] و سپس اتصال به Cas۹ باعث فعال شدن سیستم کریسپر می‌گردد. با جفت شدن توالی اختصاصی protospacer element در crRNA (یا sgRNA ) با توالی هدف در DNA مورد نظر، Cas۹ با خاصیت اندونوکلئازی خود برش دلخواه را در ناحیه اختصاصی در DNA هدف ایجاد میکند . بعد از برش توسط کریسپر ویرایش توسط دو مسیر احتمالی ادامه داده خواهد شد. مسیر اول اتصال پایانه‌های غیرهمسان است که مستعد خطا بوده ولی کارآیی بالاتری داشته و مسیر دیگر نوترکیبی همولوگ است که طبق الگوی DNA طراحی شده صورت میگیرد. یکی از مهم ترین مزایای استفاده از این سیستم آن است که انجام آن بدون دخالت در مکانیسم‌های داخل سلولی منجر به غیر فعال کردن یک ژن یا خارج نمودن کامل ژن از سلول می‌گردد. بنابراین از این روش می‌توان در درمان بیماری‌هایی همچون انواع سرطان و تحقیقات مربوط به شناسایی ژن‌های معیوب در بیماری‌های ژنتیکی استفاده کرد.

۱ transactivating RNA
۲ CRISPR RNA
۳ single-guide RNA




شکل ۱-۱۹. نمایی شماتیک از سیستم CRISPR-Cas۹

بخش دوم:

# کاربردهای زیست فناوری در صنعت

## ۲-۱ - زیست فناوری صنعتی

زیست فناوری صنعتی که عمدتاً در اروپا به عنوان زیست‌فناوری سفید شناخته می‌شود، استفاده از زیست فناوری برای اهداف صنعتی است. این عمل با استفاده از میکروارگانیسم‌ها و یا اجزای سلولی آن‌ها، همچون آنزیم‌ها، برای تولید محصولات صنعتی مفید و در صنایع مختلف مانند مواد شیمیایی، غذا و تغذیه، مواد شوینده، کاغذ و خمیرکاغذ، منسوجات، سوخت‌های زیستی و مواد پلیمری انجام می گیرد.

شکل ۱ - ۱: برخی از محصولات حاصل از زیست فناوری صنعتی

## ۲-۲ - توسعه پایدار و نقش زیست فناوری صنعتی

توسعه پایدار به معنای تلفیق اهداف اقتصادی، اجتماعی و زیست محیطی برای رفاه حداکثری انسان بدون آسیب به توانایی نسل‌های آتی برای برآوردن نیازهایشان می‌باشد.

بعد از صنعتی شدن جوامع، پیشرفت‌های چشمگیری در شرایط اقتصادی و اجتـماعی بسیاری از کشورها حاصل شد اما مسئله‌ای که مورد غفـلت واقع گردید محیط‌زیست بود، به نحوی که بسیاری از این صنایع مخرب محیط‌زیست بوده و لطمات جبران ناپذیری به محیط‌زیست وارد نمودند. همین مسئله باعث شده تا توسعه پایدار و حفاظت از محیط‌زیست در مقابل پیشرفت‌های صنعتی از اهمیت بالایی برخوردار گردد..

طی چند سال گذشته پیشرفت‌های چشمگیر زیست‌فناوری و استفاده از موجودات زنده برای تولید بسیاری از مـحصولات صنعتی مسـیر را برای جلوگیری از تخریب محیط‌زیست باز نموده است. بر این اساس باید گفت زیست فناوری صنعتی تأثیر مستـقیم و مثبتی بر هر سـه بخش توسعه پایدار یعنی جامعه، اقتصاد و محیط‌زیست دارد. به‌طور خلاصه می‌توان گفت که زیست فناوری صنعتی نقش اساسی در اقتصاد زیسـتی دانش‌بنیان داشته، باعث افزایش ارزش مواد حاصل از صنعت و کشاورزی شده و همچنین در تولید مواد جدید نقش داشته است.

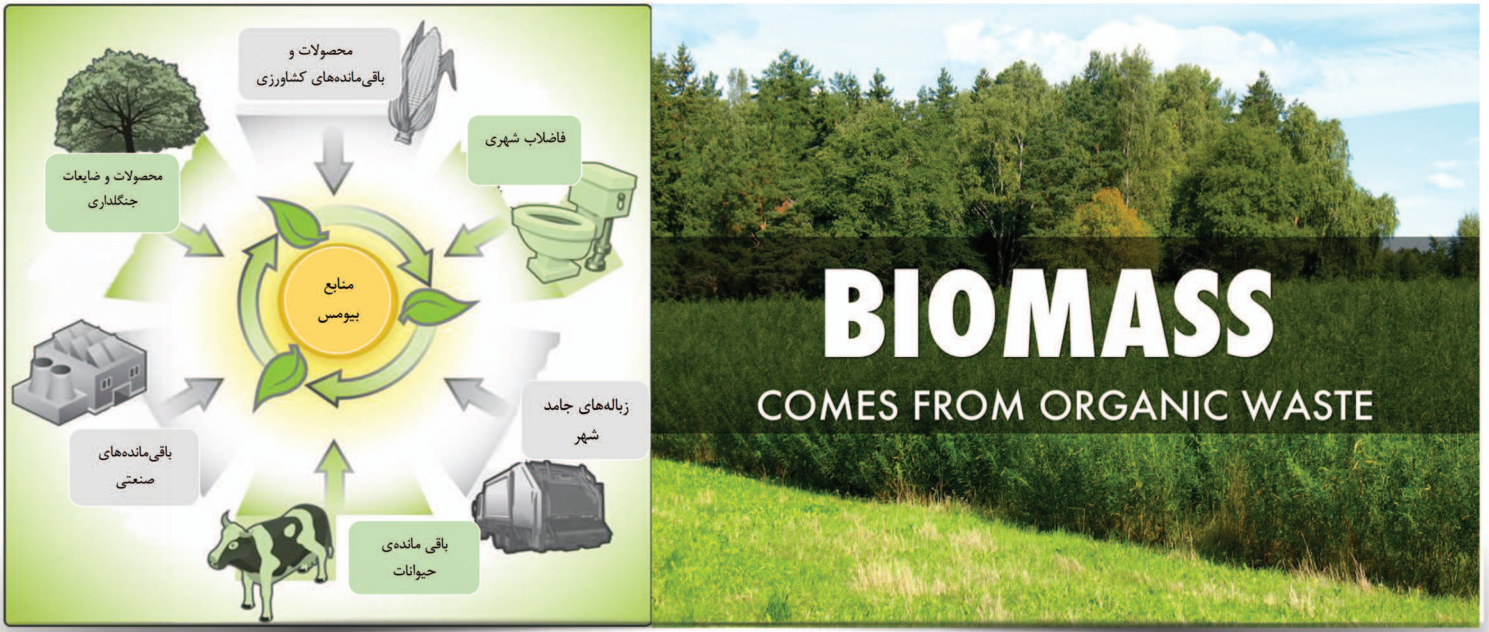
تعدادی از قابلیت‌های زیست‌فناوری صنعتی در زمینه‌ی محیط‌زیست را میتوان تولید حداقل ضـایعات و مواد آلایـنده و مضـر برای محیط‌زیست، تولید محصولات زیست‌تخریب‌پذیر، استفاده بهینه و حداقلی از انرژی، حداقل استفاده از حلال‌ها و مواد شیمیایی در طول فرآیند، تولید محصولات غیر مضر برای محیط‌زیست، تولید سوخت‌های زیستی ( همچون بیواتانول، بیودیزل و...)، استفاده از منابع تجـدیدپذیر به عنوان مواد خام به جای سوخت‌های فسیلی و جلوگیری از انتشار گازهای گلخانه‌ای نام برد.

طی سال‌های گذشته از فرآیندهای آنزیمی و تخمیر عموماً در تولید مولکول‌هایی با ارزش مانند ویتامین‌ها، حد واسط‌های دارویی و طـعم‌دهنده‌ها استفاده شده که مزایای اقتصادی همچون معرفی فرآیندهای مؤثرتر و کم هزینه‌تر را به دنبال داشته است. همچنـین فعالـیت‌هایی جهـت تولید موادی مانند پلیمرهای زیستی، محلول‌های شیمیایی و سوخت‌های زیستی صورت گرفته است..

به طور کلی مزایای محیط زیستی و اقتصادی زیست¬فناوری صنعتی با ایجاد فرصت‌های شغلی جدید و کاهش وابستگی به منابع فسیلی است که منجر به جامعه‌ای پایدار می‌شود.

## ۳-۲- فرآیند کلی تولید محصول در زیست فناوری صنعتی

به اجزای قابل تجزیه زیستی محصولات، پسماندها و مواد زائد کشاورزی (شامل مواد گیاهی و دامی)، جنگل‌ها و صنایع وابسته و همچنین مواد زائد صنعتی و شهری، زیست توده[۱] می‌گویند. در فرآیندهای تخمیر صنعتی که در زیست‌فناوری انجام می‌پذیرد، عموماً از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها برای تولید فرآورده‌های زیستی از زیست توده استفاده می‌شود. در این فرآیندها زیست توده به عنوان منبع قند استفاده شده و سپس میکروارگانیسم با استفاده از فرآیند تخمیر، محصول مورد نظر را تولید می‌کند. این محصول گاه محصول نهایی است ولی در پاره‌ای از اوقات نیاز به تغییرات دیگری دارد تا به محصول نهایی تبدیل شود.




شکل ۱ -۲: منابع مختلف زیست توده

۱. Biomass

صرف نظر از نوع تخمیر، یک فرآیند تخمیری به طور کلی به مراحل زیر تقسیم می‌شود:

**۱ - فرآیند بالادستی[۱]**

این بخش شامل چندین مرحله فرعی می‌باشد: انتخاب میکروارگانیسم صنعتی، انتخاب محیط کشت مناسب صنعتی ارزان و مناسب از نظر رشد و تولید محصول، سترون سازی محیط و لوازم کشت و...

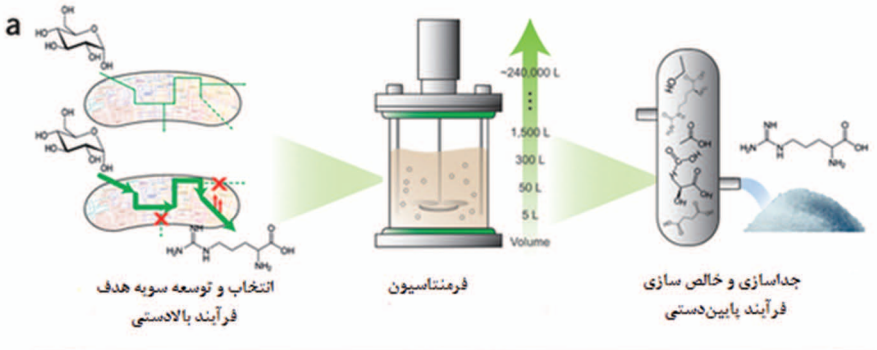
**۲ - رشد و تکثیر میکروارگانیسم (فرمنتاسیون[۲])**

این بخش به منظور تولید محصول مورد نظر در میکروارگانیسم منتخب است که با توجه به وضعیت تعیین شده قبلی خود شامل مراحل فرعی مانند کنترل فرآیند در حین تخمیر، حفظ وضعیت سترون در حین تخمیر، تأمین مواد افزودنی در حین تخمیر و... می‌باشد.

**۳- فرآیند پایین دستی[۳]**

شامل مراحل فرعی مانند جداسازی توده زیستی، تخریب دیواره سلولی برای خارج سازی محصولات درون سلولی، تغلیظ محصول[۴]، خالص سازی محصول[۵]، کنترل کمی و کیفی محصول، بسته بندی و ... است.

۱ Upstream processing
۲ Fermentation
۳ Downstream processing
۴ concentration
۵ purification




شکل ۱ -۳: شمای کلی از فرآیند تولید محصول در زیست فناوری صنعتی

## ۲-۴ کاربردهای زیست فناوری صنعتی

کاربردهای زیست‌فناوری صنعتی بسیار گسترده بوده و از صنایع غذایی و دارویی تا استخراج برخی کانی‌ها از معادن را شامل می‌شود. امروزه در برخی از معادن دنیا، استخراج و بازیافت کانی‌های پرارزشی مانند طلا، نقره، مس و اورانیوم به کمک میکروارگانیسم‌ها و با روش‌های زیستی[۱] صورت می‌گیرد. تولید صنعتی بسیاری از اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، اسید استیک و اسید لاکتیک و همچنین تولید روغن‌هایی با ترکیبات اسیدهای چرب ویژه که دارای ارزش بالایی در صنایع غذایی و مواد پاک‌کننده و یا آرایشی هستند، از دیگر زمینه‌های حضور فعال زیست فناوری در صنعت است.

تولید پلاستیک‌های قابل تجزیه[۲]، تولید انرژی‌های تجدید پذیر با استفاده از زیست توده، بکارگیری روش‌های زیست فناوری در افزایش بازیافت و سولفور زدایی نفت خام و پاک‌سازی آلودگی‌های زیست محیطی به کمک فرآیندهای زیستی، از جمله عرصه‌های نوین و با ارزش زیست فناوری به شمار می‌روند.

به طور کلی کاربردهای زیست فناوری صنعتی را می‌توان در حوزه‌های زیر دسته‌بندی می‌شود:

- تولید سوخت‌های زیستی
- تولید استارترها و پروبیوتیک‌ها
- ساخت آنزیم‌های صنعتی

۱ Bioleaching
۲ Green Plastics

- ساخت اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی
- تولید مخمرها و خمیرمایه نان
- تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و ویتامین‌ها و ترکیبات مرتبط
- ساخت زیست پلیمرها، زیست امولسیفایرها
- تولید و تکثیر ریزجلبک‌ها و
- کاربرد در حوزه محیط زیست

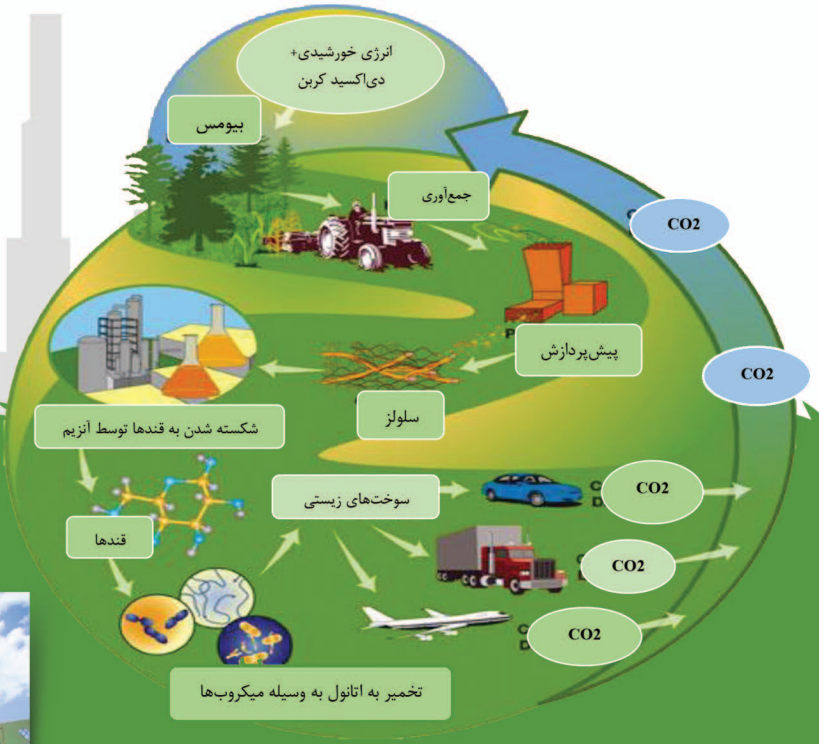
در ادامه در مورد برخی از این کاربردها توضیحات بیشتری ارائه شده است:

### ۱-۴-۲ سوخت زیستی

فناپذیری سوخت‌های فسیلی، ایجاد تنوع در منابع انرژی، توسعه پایدار، ایجاد امنیت انرژی و مشکلات زیست محیطی ناشی از مصارف انرژی فسیلی از یک طرف، تجدید پذیر بودن منابع انرژی‌های نو؛ نظیر خورشید، باد، زیست توده و ... از طرف دیگر، باعث جلب توجه جدی جهانیان به توسعه و گسترش استفاده از انرژی‌های تجدیدپذیر و افزایش سهم این منابع در سبد انرژی جهانی شده است. امروزه شاهد افزایش چشمگیر در نحوه فعالیت‌ها، میزان بودجه دولت‌ها و شرکت‌ها در امر تحقیق و توسعه و عرضه سیستم‌های انرژی‌های تجدیدپذیر می باشیم. این فعالیت‌ها همراه با صرف بودجه‌های کلان در این زمینه موجب کاهش قیمت تمام‌شده انرژی‌های تجدید پذیر شده و در نتیجه رقابت تکنولوژی با سیستم‌های انرژی سنتی موجود را به دنبال خواهد داشت.

یکی از انواع انرژی‌های تجدیدپذیر سوخت زیستی است که امروزه تولید آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

همان‌طور که در صفحات قبل با زیست توده آشنا شدید، یک منبع عظیم برای فعالیت‌های صنعتی زیست توده می‌باشد. این منبع می‌توان برای تولید سوخت استفاده شود در این صورت سوخت¬های حاصل، سوخت زیستی نام داشته و شامل زیست سوخت‌های جامد، سوخت‌های مایع و زیست گازهای مختلف می‌باشد.




شکل ۲ –۵: چرخه کلی تولید سوخت‌های زیستی

شکل ۲ –۴: خوراک اولیه برای تولید سوخت زیستی

دو نوع سوخت زیستی اصلی عبارت‌اند از:

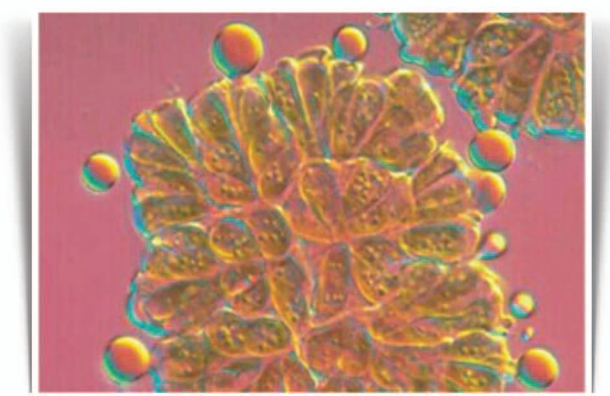
### ۱-۱-۴-۲ بیواتانل (اتانول زیستی)

اتانول زیستی الکلی است که از تخمیر مواد قندی (مانند شکر و نشاسته) موجود در گیاهان به‌دست می‌آید. در سال‌های اولیه برای تولید این نوع سوخت زیستی عمدتا از گیاهانی مانند نیشکر و ذرت استفاده می‌شد، اما امروزه از سلولزهایی مانند درختان و چمن‌ها و زیست توده به عنوان ماده اولیه استفاده می شود. اتانول زیستی را می‌توان به‌صورت خالص به‌عنوان سوخت خودرو به‌کار برد اما عمدتا بصورت ترکیبی با بنزین استفاده می‌شود. اتانول زیستی به‌صورت گسترده‌ای در ایالات متحده و برزیل به‌کار می‌رود.

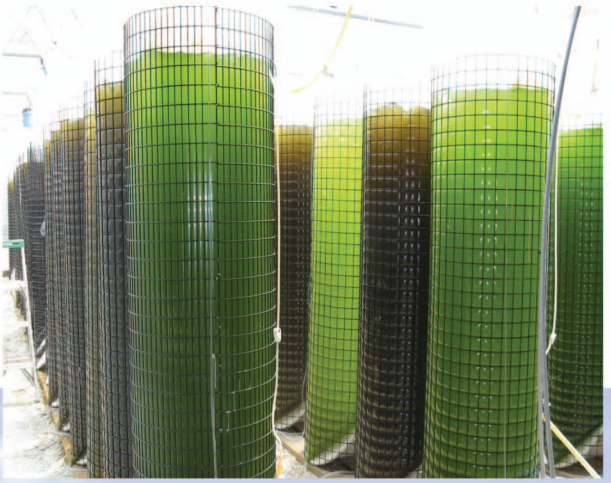
فرآیند کلی تولید این سوخت زیستی بدین شرح است که میکروارگانیسم تخمیر کننده در کارخانه‌های وسیع (فرمانتورهای بزرگ) که خوراک اولیه آنها زیست توده می باشد، کشت داده می‌شوند، میکروارگانیسم با استفاده از فرآیند تخمیر، زیست توده را به اتانول زیستی تبدیل می کند و سپس در مراحل انتهایی این اتانول زیستی جداسازی می گردد.

### ۲-۱-۴-۲ بیودیزل (دیزل زیستی)

دیزل زیستی یکی دیگر از انواع سوخت‌های گیاهی است که می‌توان از روغن‌های گیاهی و چربی حیوانات آن را تولید و به جای گازوئیل در موتورهای گازوئیلی استفاده کرد. یکی از منابع اصلی بیودیزل روغن‌های جلبکی است، بدین صورت که جلبک‌ها کشت داده شده و سپس روغن آنها جداسازی می‌شود و در ادامه با بکارگیری یکسری فرآینده های اضافی این روغن به بیودیزل تبدیل می شود. بیودیزل از ترکیب شیمیایی روغن‌های گیاهی یا حیوانی با هیدروکسید سدیم و متانول (یا اتانول) تولید می‌شود. بسیاری از کشورها در اروپا به استفاده از دیزل زیستی روی آورده‌اند. در حقیقت از میان دیگر انواع سوخت‌های زیستی، دیزل زیستی مصرف بیشتری در این قاره دارد.



شکل ۲ – ۶: تصویری از یک کلنی جلبک سبز که قطرات روغن مترشحه از آن مشخص است



شکل ۲-۷: نمونه‌هایی از سیستم کشت انبوه جلبک

## ۲-۴-۲ پروبیوتیک‌ها

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مـــصرف آنها سبـــب نمایان شدن اثرات سلامت بخش در بدن میزبان می‌شود. پروبیوتیک، به عنوان یک صفت برای مواد غذایی حاوی این باکتری‌ها نیز به کار می‌رود. چنین میکروارگانیسم‌هایی نه تنها در غذای انسان بلکه امـروزه در غذای طیور صنعتی نیز به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. حضور این باکتری‌ها در مقابله با گســـترش میکروارگانیسم‌های مضر که باعث اسهال‌های عفونی، التهاب دستگاه گوارش (معده) و بیماری‌های روده می‌شوند، بسیار مفید می‌باشند. همچنین پروبیوتیک‌ها مانع رشد میکروب‌ها و اتصال آنها با سطح مخاط روده شده و در تعادل فلور روده نیز نقش مفیدی ایفا می‌کنند.

با بهینه سازی کشت و تخمیر این میکروارگانیسم‌های و فرآیندهای پایین دستی، می توان آنها را در مقیاس صنعتی تولید و کارایی این محصولات را افزایش داد.

معمول‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به سه گروه باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تقسیم می‌شوند. بعضی از این میکروارگانیـــسم‌ها ســـویه‌های انتخابی باکتری‌های لاکتوباسیل ها[۱] و بیفیدوباکتریوم[۲] هستند گرچه سویه‌هایی از انتروکوکوس[۳] ، اســـترپتوکوکوس[۴] و اشـرشـــیاکلی[۵] نیز برای این منظور استفاده می‌شوند. از مخمرها، ساکارومایسس سرویزیه[۶] و ساکارومایسس بولاردی[۷] را می‌توان نام برد.

انواع محصولات پروبیوتیک

- کپسول‌های پروبیوتیک
- پروبیوتیک‌ها در دام و طیور
- محصولات لبنی (انواع نوشیدنی‌های پروبیوتیک، شیر، انواع پنیر، دوغ و ماست نوشیدنی، ماست سفت یا هم زده، بستنی، خامه ترش، شیر بدون چربی و نوشیدنی‌های به دست آمده از دوغ، کره از جمله این محصولات هستند)

۱ lactobacilli
۲ bifidobacteria
۳ Enterococcus
۴ Streptococcus
۵ Escherichia coli
۶ Saccharomyces cerevisiae
۷ Saccharomyces boulardii

شکل ۲ –۸: دو نوع از محصولات پروبیوتیک

### ۲-۴-۳- استارتر کالچرها[۱]

در برخی از محصولات مانند ماست‌ها، باکتری‌های مطلوبی را به صورت کنترل شده و آگاهانه جهت ایجاد تغییراتی به شیر می‌افزایند از آنجاکه این موجودات فرآیند تخمیر را آغاز یا استارت می‌کنند، به آنها باکتری‌های آغازگر یا استارتر می‌گویند. در دانش میکروبیولوژی به میکروارگانیسم های زنده حاضر در یک محیط رشد اصطلاحاً کشت یا کالچر گفته می‌شود در نتیجه این موجودات استارترکالچر نامیده شده که به معنی گروهی از میکروب‌های زنده و قابل رشد و تکثیر بوده که می‌توانند نوعی خاص از تخمیر مورد نظر را شروع کنند. بدیهی است که هر گروه از میکروارگانیسم ها دارای الگوی تخمیری مخصوص به خود هستند؛ مواد خاصی را مصرف می‌کنند و در نهایت توان تولید مواد خاصی را نیز دارند.

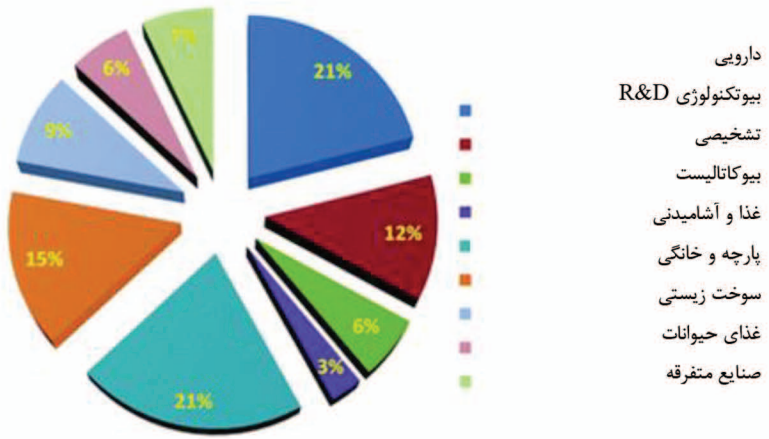
### ۲-۴-۴- آنزیم‌های صنعتی

آنزیم‌ها کاتالیزورهای زیستی هستند که باعث سرعت بخشیدن به انجام واکنش‌های زیستی بدن می‌گردند. اغلب آنزیم‌ها ساختار پروتئینی داشته و یکی از کاربردهای اصلی زیست فناوری تولید آنزیم‌های صنعتی است که دامنه کاربرد بسیار وسیعی داشته و در صنایع مختلف بکار می‌روند.
مقدار و کیفیت آنزیم‌های صنعتی متفاوت است. برای مثال آنزیم‌های دارویی کمترین حجم و آنزیم‌های صنعتی بیشترین حجم تولید را دارند. آنزیم‌های صنعتی در فرمانتورهایی با حجم بیش از ۱۰۰ متر مکعب تولید می‌شوند، ولی آنزیم‌های مورد استفاده در پزشکی و آنزیم‌های تجزیه‌گر اغلب در فرمانتورهای کوچک‌تر تولید

۱. Starter Culture

می‌شوند. پایین بودن غلظت و بازده تولید آنزیم‌های تولیـــدشده به طور طبـــیعی (در نژادهای وحشی یا طبیعی) باعث شده است که امـــروزه از موجودات دستکاری و مهندسی شده برای تولید آنزیم‌ها استفاده شود. همچنین تغییرات هدفمـــند و ایجاد ژن‌های مهندسی شده امری مرسوم در تولید آنزیم‌هاست، زیرا به این روش می‌توان قابلیت‌های مهم آنزیم‌ها را تقویت کرد. برای مثال برخی آنزیم‌ها باید بتـــوانند در دمای نســـبتاً بالا فعالیت کنند که به طور طبیعی امکان فعالیت در آن دما را ندارند که در چنین حالتی توسط روش‌های مهندسی ژنتیـک، می‌توان آنزیـــم‌هایی با pH مناسب قابلیت تحمل دمایی بالا به دست آورد. به همین ترتیب می‌توان آنزیم‌هایی با عمر و ماندگاری بیشتر، فعالیت بیشـــتر و یا فعـالیت در تولید کرد. همچنین می‌توان با تغییرات ژنتیکی یا تغییرات ایجاد شده در میکروارگانیسم‌های تولید کننـــده، سرعت و میزان تولید آنزیم را افزایش داد.

در سال ۱۹۷۲ حدود ۲۰۰۰ آنزیم شناخته شده موجود بود که تنها ۱۴۰ آنزیم از میان آنها قابلـیت تولید و فروش داشتـــند. پروتئازها مهمترین آنزیم‌های صنعتی هستند و تقریباً ٪۶۰ فروش آنزیم‌های صنعتی در دنـــیا مربوط به آنها می‌باشد. از پروتئازها در صنایع غذایی، پزشکی و سلامت، فرمولاسیون مواد شـــوینده، تصفیه و تجزیه فاضلاب ها، تولید سوخت¬های زیستی و به عنوان افـــزودنی در غذای دام و طـــیور استفاده می‌شود. رنین میکروبی نیز در ردیف آنزیم‌های مهم، محسوب می‌شود و از سال ۱۹۶۵ به جای رنین گوساله، در تولید پنیر مورد استفاده قرار گرفته است.




شکل ۲ –۹ ارزش کل بازار در سال ۲۰۱۰ در زمینه آنزیم‌های صنعتی

برخی از کاربردهای رایج آنزیم‌های صنعتی

یکی از کاربردهـــای اصلی آنزیم‌های صنـــعتی، در صنعت شویندگی است. این آنزیم‌ها، نقش مؤثری در توســعه و پیشـــرفت شوینده‌های جدیـــد خانگی و صنعتی داشته‌اند. از مهم‌ترین ایـــن آنزیم‌ها می‌توان پروتئاز، لیپاز، آمیلاز و ســـلـــولاز را نام برد که هـــر کدام، دارای ویژگی خاصـــی در شوینده‌های لـباس و فراورده‌های مورد استفاده در ماشین‌های ظرف‌شویی هستند. آنزیم‌ها، با اســـتفاده از فناوری‌های تخمیر، از منابع تجدید پذیر تولید می‌شوند.

توســعهٔ فرایندهای تخمیر در محیط‌های آبی و پیشـــرفت‌های حوزه مهـــندسی ژنتیک، باعث پیشـــرفت‌های زیادی در صنعت تهیـــهٔ آنزیم شده است. امروزه بسیاری از شوینده‌ها در بازار کشور از این آنزیم ها استفاده می کنند.

برخی از کاربردهای آنزیم‌ها شامل موارد زیر می‌باشد:

**۱- صنایع غذایی**

✅ صنعت نشاسته: استفاده از آنزیم های تجزیه کننده نشاسته اولین کاربرد آنزیم های میکروبی در مقیاس وسیع در صنایع غذایی بوده است. دو آنزیم آلفا-آمـــیلاز و گلوکوآمیلاز اصلی ترین آنزیم ها در این صنعت هستند. این آنزیم ها نشاسته را به گلوکز تبدیل می کنند.

- صنایع پخت‌وپز: افزودن آلفا-آمیلاز باعث افزایش کیفیت و طول عمر نان می شود. علاوه بر آلفا-آمیلاز، از مقادیر کم سلولز، گلوکان هم در تهیه خمیر استفاده می شود
- تولید لبنیات مانند آنزیم کیموزین در تهیه پنیر و بتاگالاکتوزیداز.
- صنعت ماءالشعیر
- صنعت آب میوه سازی : افزودن آنزیم های پکتیناز، زایلاناز و سلولاز آب گـــیری از پالپ میوه ها را راحتر می کنند. این آنزیم کاربرد +زیادی در این صنعت دارند.

شکل ۲ – ۱۰ : کاربرد آنزیم‌ها در صنایع لبنی

۲ – صنایع نساجی : از آمیلاز برای کاهش دادن اندازه های فیبرهای منسوجات استفاده می شود و از سلولاز برای تغییر و اصـلاح فیبرهای سلولزی استفاده می شود.

۳ – صنایع شویندگی: از آنزیم های پروتئاز، آمیلاز ، لیپاز و البته سایر آنزیم ها در تهیه پودرهای شویندگی استفاده می شود

۴ – صنایع کاغذ و پالپ: زایلاناز برای سفید کردن کاغذها بکار می رود، از سلولازها برای فرایند جوهرزدایی فیبرهای سلولزی در بازیـافت استفاده می شود و از آمیلازها در تغییر نشاسته که استحکام، و قابلیت پاک شوندگی را بهبود می دهد، استفاده می شود.

۵ – صنایع غذایی حیوانی: استفاده از آنزیم‌ها در غذای حیوانات باعث کاهش گرانروی و افزایش جذب مواد غذایی می شود. آنزیم های بتا-گلوکاناز و فیتاز در این صنعت کاربرد زیادی دارند

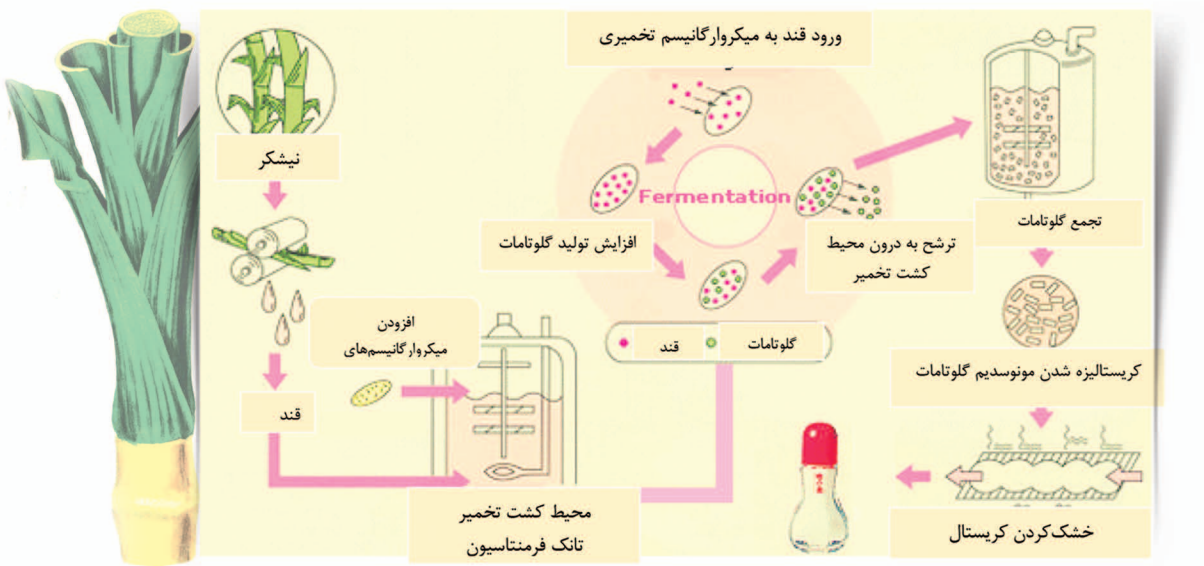
۶ – صنایع سوخت‌های زیستی : تولید سوخت‌های زیستی از دیگر بخش‌هایی است که آنزیم‌های صنعتی در آن مسیر کاربرد دارند.

### ۲-۴-۵- اسیدهای آمینه

اسیدآمینه در شیمی به هر مولکولی که شامل گروه‌های کاربردی آمین و کربوکسیلیک اسید باشد، گفته می‌شود. اسیدآمینه‌ها واحدهای تشکیل دهنده پروتئین هستند که در صنایع غذایی و دارویی، به عنوان افزودنی خوراک دام و تولید مواد آرایشی کاربرد دارند. در صنایع غذایی جهت تشدید طعم، از اسیدآمینه استفاده می‌شود. آسپارتات و DL-آلانین جهت تکمیل طعم به آب میوه‌ها اضافه می‌شوند. L-سیستئین باعث بهبود کیفیت نان در حین پخت می‌شود و در آب‌میوه‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند. هم چنین در صنایع شیمیایی، اسیدهای آمینه به عنوان ماده اولیه‌ی ساخت پلیمرهایی مانند فیبرهای پلی‌آلانین و رزین‌های لیزین ایزوسیانات استفاده می‌شوند.

اگرچه اسیدهای آمینه به روش‌های سنتز شیمیایی، سنتز آنزیمی و هیدرولیز پروتئین‌ها تولید می‌شوند اما روش تخمیر میکروبی اصلی‌ترین روش تولید آنها است. میزان مصرف سالانه این ترکیبات در صنایع غذایی حیوانی حدود ۲/۴۳ تن است که معادل حدود ۶ میلیارد دلار آمریکا است. تخمین زده می‌شود که میزان بازار اسیدهای آمینه در سال ۲۰۱۷ به حدود ۱۲/۸ میلیارد دلار برسد.

از جمله اسیدآمینه‌هایی که بیشترین کاربرد را در صنعت دارند می‌توان به گلوتامیک اسید، لیزین، متیونین، ترئونین و... اشاره کرد.




شکل ۲ – ۱۱: نمای کلی از فرآیند تولید اسیدآمینه گلوتامیک اسید

### ۶-۴-۲ - اسیدهای آلی

اسیدهای آلی ترکیبات با وزن مولکولی پایین هستند که از یک یا تعداد بیشتری گروه‌های کربوکسیل تشکیل شده‌اند و در همه موجودات دیده می‌شوند. به دلیل اینکه اسیدهای آلی واحدهای سازنده بسیار مهمی هستند، بازار این محصولات روز به روز در حال افزایش است. آنها به عنوان مواد افزودنی در صنایع غذایی و همچنین به عنوان مواد شیمیایی اولیه، کاربرد وسیعی دارند.

تا امروز اسیدهای آلی بیشتر به روش های شیمیایی سنتز می شدند که لازمه این روش ها استفاده از منابع فسیلی (مانند نفت و محصولات صنایع پتروشیمی) و در نتیجه انتشار گازهای گلخانه های است. با توجه به افزایش قیمت منابع فسیلی، محدود بودن این منابع و از طرفی نگرانی های زیست محیطی، تولید این اسید ها با روش های تخمیری و با استفاده از میکروب ها روش جایگزین بسیار مناسبی است، به همین دلیل طی سال های اخیر توجه به این روش ها بیشتر شده است و امروزه بخشی از این اسیدها به روش تخمیر تولید می شوند.

اکثر اسیدهای عالی محصول طبیعی مسیر متابولیک میکروارگانیسم ها هستند. برخی از میکروارگانیسم ها این اسیدها را به میزان زیاد تولید می‌کنند، از طرفی برای افزایش میزان تولید این اسیدها، از روش‌های تخمیری مختلف و همچنین از روش های مهندسی ژنتیک استفاده می شود. اسید استیک ، اسید پروپیونیک، اسید لاکتیک و اسید سیتریک پراستفاده‌ترین اسیدهای آلی هستند. علاوه بر این اسید اگزالیک، اسید سوکسینیک و اسید آسکوربیک هم با روش های تخمیری تولید می شوند. منابع مختلفی مانند گلوکز، فروکتوز، مالتوز، سوکروز و زایلوز حتی گلیسرول به عنوان منبع کربن برای تولید اسیدهای عالی استفاده می شوند.

#### ۱-۶-۴-۲ - اسید پروپیونیک

این اسید جزء بی‌ضررترین اسیدهای آلی می‌باشد زیرا در بدن به‌راحتی تجزیه شده و هیچ خطری را ایجاد نمی‌کند. به همین جهت جزء GRAS perservative شناخته می‌شود. یعنی مواد نگهدارنده‌ای که به‌طور کلی سلامت محصول غذایی را به خطر نمی‌اندازد. این اسید در نوعی خاص از پنیرها به نام پنیر سوئیس توسط پروپیونی باکتریوم تولید شده و همراه با آن گاز دی اکسید کربن آزاد می‌شود که حباب‌های خاصی را در این پنیر ایجاد می‌کند. از نظر کاربردی در فرآورده‌های نانوایی و انواع کیک‌ها به عنوان ضد قارچ کاربرد دارد. همچنین از بروز پدیده‌ای به نام نخ نخی شدن یا راپینز که در اثر رشد باکتری باسیلوس سوبتیریز زیر گونه مزانتوریکوس ایجاد می‌شود، جلوگیری می‌کند.

مقدار زیادی از اسید پروپیونیک موجود به صورت شیمیایی تولید می‌شود، اما در سال های اخیر و با توجه به معایب سنتز شیمـیایی مانند مصرف سوخت‌های فسیـلی و ایجاد آلودگی در طی فرآیند ساخت، توجه به تولید این اسید از روش‌های تخمیری بیشتر شده است. گونه‌های مخـــتلفی از پرپیونی باکتریوم برای تولید این اسید به روش‌های تخمیری استفاده و از گلوکز، گلیسرول و یا اسید لاکتیک به عنوان ماده اولیـــه برای تولید این اسید در پرپیونی باکتریوم استفاده می شود.

از روش های تخمیری مختلفی برای تولید این اسید استفاده می شود که بهترین روش، خوراک دهی ناپیوسته[۱] می‌باشد. با پیشـرفت های اخیر در مهندسی ژنتیک، تلاش¬های فروانی در حال انجام است تا با دستـــکاری ژنتیکی سویه¬های تولید کننده این اسید، میزان تولید آن افزایـش یابد.

از کاربردهای این اسید می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- به عنوان نگهدارنده در غذاهای حیوانی و انسانی
- سنتز فیبرهای سلولزی
- در ساخت علف کش ها
- عطر سازی
- داروسازی

### ۲-۴-۶-۲- اسید استیک

کاربرد اسیداستیک به دو گروه عمده صنعتی و غذایی طبـقه‌بندی می‌شود. کاربرد غذایی آن بیشتر در سرکه‌ســـازی است و از طـرفی محلول‌های اسیداستـــیکی به طور مستقیم به عنوان یک چاشنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در صنعت به عنوان ماده اولیه تولیـــد برخی مواد همچون ونیل استات مونومر (VAM)[۲] و اندرید استیک[۳] و نیز حلال تترافتالیک اسید (PTA) و حلال‌های شیمیایی مانند اتیل استات[۴]، بوتیل استات[۵]، گلیکول دی استات[۶] استفاده می‌شود.

۱ fed-bach
۲ Vinyl acetate monomer(VAM)
۳ Acetic anhydride
۴ Ethyl acetate
۵ Butyl acetate
۶ Ethylene glycol diacetate

### ۲-۴-۷ - پلیمرهای زیستی

شکل ۲ -۱۲: انواع کاربردهای پلیمرهای زیستی

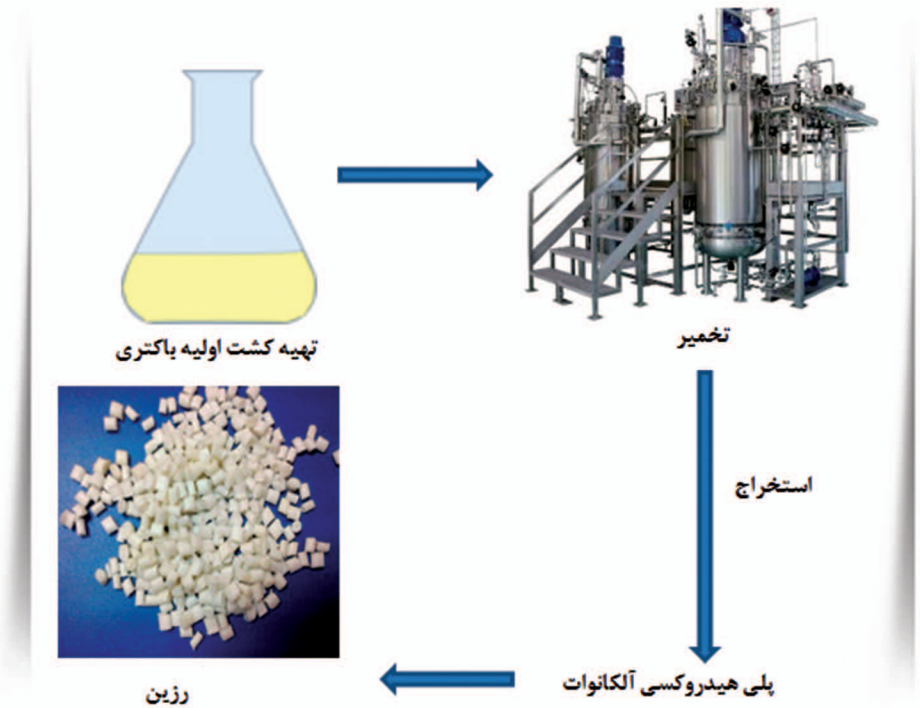
واژه زیست تخریب پذیر[۱] به معنی موادی است که به سادگی توسط فعالیت موجودات زنده به زیرواحدهای سازنده خود تجزیه شده و بنابراین در محیط باقی نمی‌مانند.

تخریب زیستی مهم‌ترین فرآیند در چرخش مواد در طبیعت می‌باشد. پلیمرهای زیستی دارای خواصی شبیه به پلیمرهای پتروشیمیایی هستند که کاربردهای وسیعی در صنعت دارند؛ اما مزیت بسیار مهم این پلیمر در مقایسه با پلیمرهای پتروشیمیایی، قدرت زیست تخریب پذیری آنها می‌باشد. استفاده از این پلیمرهای زیستی که به صورت گرانول‌های درون سلولی در میکروارگانیسم‌های مختلف تشکیل می‌شوند، راه حل مناسبی جهت رفع مشکلات زیست‌محیطی ناشی از تولید روزافزون پلیمرهای مقاوم به تخریب زیستی و تجمع ضایعات پلیمری در طبیعت می‌باشد. دو نوع اصلی این پلیمرها عبارت‌اند از:

۱. Biodegradable

### ۲-۴-۷-۱- پلی هیدروکسی آلکانوات (PHA)[۱]

پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها خانواده ای متنوع از پلیمرهای زیستی هستند که در باکتری‌ها تولید می شوند و به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌شوند، می‌توان با بهینه سازی سویه های تولید کننده این پلیمرها آنها را در مقیاس صنعتی تولیدکرد. باکتری‌های زیادی وجود دارند که این پلیمر زیستی را تولید می‌کنند. به عنوان مثال حدود ۳۰ درصد از باکتری های خاک این پلیمر را تولید می کنند.




شکل ۲ -۱۳ فرایند کلی تولید پلی هیدروکسی الکانوات

از کاربردهای این پلیمر می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ساخت پلاستیک‌ها
- صنایع بسته‌بندی
- پزشکی
- داروسازی (انتقال دارو)
- کشاورزی
- صنایع غذایی

۱ Polyhydroxyalkanoates

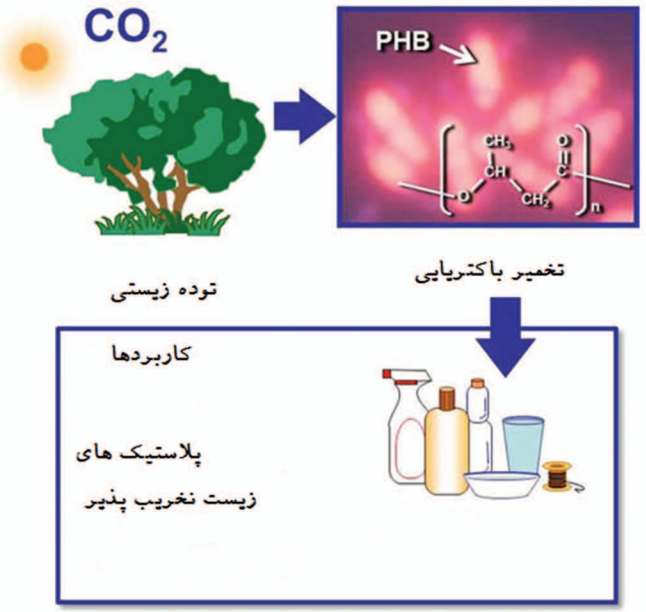
### ۲-۷-۴-۲ پلی هیدروکسی بوتیرات[۱] PHB :

یکی از مهمترین پلیمرهای خانواده آلکانوات ها، پلی هیدروکسی بوتیرات است. این ماده یک پلیمر خطی است و در اندازه های مختلفی از گرانول در داخل سلول موجود است. پلی هیدروکسی بوتیرات به عنوان یک منبع انرژی و کربن برای میکروارگانیسم است و تحت شرایطی مانند محدودیت نیتروژن، فسفر، اکسیژن، یون ها و غیره در داخل سلول تجمع می یابد و با رفع این محدودیت ها تجزیه می‌گردد. پلی هیدروکسی بوتیرات جامد به عنوان یک ترموپلاستیک زیست تخریب پذیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است زیرا خواصی شبیه خواص تعدای زیادی از پلاستیک های سنتزی معمولی را دارد.

از این پلیمر در زمینه های مختلفی مانند کشاورزی، پزشکی، بسته بندی مواد غذایی و غیره استفاده می شود.

باکتری های زیادی در سیتوپلاسم شان، پلیمرهای زیست تخریب پذیر با خواص ترموپلاستیکی مشابه با پلاستیک های معمولی را تولید می کنند. بنابراین از این پلیمرهای زیست تخریب پذیر می توان برای ساخت برخی پلاستیک‌ها استفاده کرد. بالغ بر ۳۰۰ نوع باکتری شناخته شده است که قادر به ساخت این پلیمرها هستند.

۱. Polyhydroxybutyrate




شکل ۲ -۱۴: تولید پلیمرهای زیستی و کاربرد آنها

### ۲-۴-۸- مواد آرایشی

مواد آرایشی محصولاتی هستند که برای زیبایی بکار می‌روند. صنعت آرایشی بازار بسیار رو به رشدی دارد و میزان سود این بازار در سال ۲۰۱۳ حدود ۲۴۴ میلیارد دلار بوده و در هر سال چیزی حدود ۴/۶ درصد رشد دارد. در گذشته ساخت مواد آرایشی فقط بر اساس ساخت ترکیباتی بود که عمدتاً از صنعت پتروشیمی مشتق می‌شدند؛ اما امروزه بخش عمده‌ای از محصولات این صنعت با استفاده از زیست‌فناوری صنعتی تولید می‌شوند که نسبت به روش‌های سنتی مزیت‌های فراوانی دارند.

دسته‌بندی اجزاء آرایشی تولید شده در زیست فناوری به صورت زیر می‌باشد:

الف) پلی فنل ها، ترپن ها و کاراتنوئیدها (اسید الاجیک[۱] ، اسید گالیک[۲] ، اسید فرولیک[۳] ، رسوراتول[۴] ، آستاگزانتین[۵] ، فلوروتانین ها[۶] )

۱ Ellagic acid
۲ Gallic acid
۳ Ferulic acid
۴ Resveratrol
۵ Astaxanthin
۶ Phlorotannins

پلی فنل یا فلاوئیـــدهایی که از گیـــاهان گرفته می شود، کاربرد وسیعی در تولید مواد آرایشی دارند. در محـــصولات محافـــظت کننـــده پوست، عصاره‌های گیاهی غنی از پلی فنل‌ها به فراوانی دیده می شود که نقش ممانعتی برای رادیکال های آزاد دارند. یکی از معـــروفترین این عـــصاره‌ها چای سبز است. در گیاهان این پلی فنل ها عمدتاً به ماکرومولکول های دیگر مانند لیگنین متصل هستند و از طرفی شرکت های تولید کننده مواد آرایشی از فرم خالص این مواد استفاده می کنند، بنابراین استفاده از میکروب ها برای تولیـــد این مواد بصورت خالص و یا استـــفاده از روش های آنزیمی برای خالص سازی این مواد بسیار با اهمیت است و امروزه کاربرد وسیعی دارد.

ب) اسیدهای آلی (هیدروکسی اسیدها، کاجیک اسید[۱] )

ج) اسیدهای آمینه و سایر ترکیبات نیتروژن دار (اسیدهای آمینه، مایکوسپورین و MAA ها، بتائین)

اکثر اسیدهای آمینه در صنعت آرایشی و بهداشتی کاربرد دارند. اسید آمینه ها به عنوان آنتی اکسیدان-های طبیعی، مرطوب کننـــده، ضد آفتاب، ضد چرکیدگی و جوان کننده پوست عمل می کنند.

اسیدهای آمینه آرژنین، گلوتامیک اسید، لیزین، فنیل آلانین، ترئونین و تیروزین در مقیاس تجاری به روش تخـمیر تولید و به فروش می رســـند. منبع اصلی تولید تجاری اسیدهای آمینه گونه‌های کورینوباکتریوم[۲] می باشد، هر چند امروز بعضی از این اسیدهای آمینه در باکتری اشیـــرشیاکلی هم تولید می شوند.

د) ویتامین ها و ترکیبات شبه ویتامین (ویتامین A و مشتقات آن، ویتامین C، ویتامین E، ویتامین B۲، ویتامین B۵، ویتامین B۳ و نیکوتین اسید،) ویتامین ها گروهی از ترکیبات عالی هستند که عملکردهای زیادی در بدن دارند. این ترکیبات با ارزش ترین جزء مواد آرایشی هستند. ویتامین ها در بدن نقش محافظت کننده در مقابل رادیکال های آزاد را دارند. شرکت های معروف تولید کننده مواد آرایشی و بهداشتی با اسـتفاده از ویتامین ها در محصولات خود، خواصی از قبیل مرطوب کنندگی پوست و محافظت از آن را فراهم می کنند. ویتامین هایی که در صنعت آرایشـــی استفاده می شود باید بسیار خالص باشند، از این رو تولید این ویتامین ها به روش تخمیر در مقایسه با استـخراج آنها از عصاره گیاهان، بسیار مفیـدتر است و امروزه کاربرد بیشتری پیدا کرده است. مزیت دیگر تولید ویتامین ها به روش تخمیر، اقتصادی تر بودن این روش در مقایسه با روش های سنتزی است.

ه) پلی ساکاریدها (مانند صمغ زانتان، دکستران[۳] ، کیتین و کیتوسان[۴]، اسید هیالورونیک[۵] )

۱. kojic acid
۲ Corynebacterium
۳ Dextran
۴ Chitin and Chitosan
۵ Hyaluronic Acid

۲هر کدام از این پلی ساکاریدهای اهیمت ویژه ای در صنایع مختلف دارند. یکی از مهمترین آنها اسید هیالورونیک است که امروزه به میزان زیادی با اســـتفاده از روش های زیســـت فناوری تولید می شود. اسید هیالورونیک ترکیب قندی است که از تکرار زیرواحدهای ان-استیل گلوکز آمین و گلوکرونیک اسید تشکیل شده است. وجود گروهای کربوکـــسیل فروان در ساختار این ماده که عملاً تعداد آن توسط وزن مولکولی این ماده تعیین می شود. قابلیت جذب آب فراوانی به آن داده است. که همیـــن ویژگی منجر به کاربردهای فروان این ماده گردیده است. مهمترین کاربردهای این ماده گران قیمت در صنعت داروسازی و آرایشی و بهداشتی است. منبع اصلی تولید انبوه اسید هیالورونیک باکتری استرپتوکوکوس زوئـپیدمیکوس[۱] است.

د) پلی پپتید و پروتئین ها :گاما-پلی گلوتامیک اسید[۲] ، کلاژن[۳] ، کراتین و کراتین هیدرولیزات[۴]، هورمون رشد انسانی[۵] و آنزیم ها

و) اسیدهای چرب ضروری، استرول ها و مشتقات لیپیدها (اسیدهای چرب اشباع نشده، اسکوالن[۶] ، سرآمیدها[۷] )

## ۲-۴-۹- جلبک ها[۸] و ریزجلبک ها[۹]

جلبک ها گـــروهی از موجودات فتوسنتز کننده آبی هستند. اندازه آنها از مقادیر بـسیار کوچک با قطر یک میکرومتر تا اندازه های بسیار بزرگ که طول آنها به ۶۰ متر می رسد متفاوت است. جلبک ها بخش عمده ای از اکسیژن زمین را فراهم می کنند، مواد غذایی موجودات دریایی را فراهـــم می کنند، منبعی از روغن خام هستند، مواد غذایی، دارویی و محصولات صنعتی مورد نیاز انسان هم از جلبک ها بدست می آید.

تاریخ استفاده از جلبک ها به هزاران سال پیش بر می گردد، یعنی زمانی که مردم در چین، چاد و مکزیک از سیانوباکتری نوستوک[۱۰] و آرتروســـپیا[۱۱] (اسپیرولینا) به عنوان غذا استفاده می¬کردند. کشت جلبک ها با کشت ریزجلبک "nori" )پورفیرا) در سال ۱۶۴۰ آغاز شـــد. ۱۸ سال بعد آگار در کشور ژاپن تولید شد. از قرن هجده‌ام تا اولیل قرن بیستم از جلبک قهوه ای برای تولید ید و جوش شیرین استفاده شد. کشت ریزجلبک

۱ Streptococcus zooepidemicus
۲ λ-Polyglutamic Acid
۳ Collagen
۴ Keratin and Keratin Hydrolysate
۵ Human Growth Factor
۶ Squalene
۷ Ceramides
۸ Algae
۹ microalgae
۱۰ Nostoc,
۱۱ Arthrospira (Spirulina)

کلرلا ولگاریس[1] برای اولـین با در سال ۱۸۹۰ انجام و در اویل دهه ۱۹۵۰ تحقیـقات گسترده ای بر روی جلبک ها برای تولید مـواد غذایی از آنها صورت گرفت.

کشت وسیع و تجاری ریز جلبک کلرلا در اویل ۱۹۶۰ در ژاپن شروع شد. در سال ۱۹۸۰ حدود ۴۶ کارخانه بزرگ در آسیا بیش از ۱۰۰۰ کیگوگرم ریز جلبک (عمدتا کلرلا) تولید می کردند. در سالهای بعدی تولید انبوه ریزجلبک ها در استرالیا، آمریکا، اسرائیل و هـــند شروع شد. بیـن سالهای ۱۹۷۸ تا ۱۹۹۶ تمرکز بر روی تولید دیزل زیستی از جلبک ها بود و بودجه های زیادی را به این کار اختصاص داده شد. کارهای تحقیقاتی وسیعی در این زمینه انجام شد و نتایج خیلی خوبی هم بدست آمد.

در مطالعات بعدی مشخص شد که تولید دیزل زیستی با استفاده از ریزجلبک ها بسیار اقتصادی تر از تولید آن با استـــفاده از روغن های گـیاهی مانند روغن سویا و غلات است. نتایج این مطالعات همراه با تغییرات شرایط جهانی مانند تغییرات آب و هـوایی و افزایـش میزان $CO_2$ ناشـــی از سوخت های فسیلی، افزایش تقاضا برای سوخت ها، افزایش نگرانی در مورد امنیت انرژی و محدود بودن منابع سوخـــت های فسیلی، باعث تغییر نگاهها به سمت ریزجلبک ها برای تولید سوخت زیستی شد.

ریزجلبک ها به دلیل داشتن ویژگی ها منحصر به فرد از جمله اینکه میزان زیست توده زیادی تولیـد می کنند، رشد سـریعی دارند، در شـرایط مختلف قابل کشت هستند و محصولات منحصر به فردی تولید می کنند، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند و امـروز در زیســت فناوری از آنـــها استفاده های فراوانی می شود. از جمله کاربردهای آنها می توان به موارد زیر اشاره کرد :

- تولید انرژی (سوخت زیستی) از زیست توده آنها
- تولید سوخت زیستی از کربوهیدارت‌های آنها
- تولید سوخت زیستی از روغن آنها
- تهیه غذای آبزیان، حیوانات و کودهای آلی استفاده
- تولید مواد آرایشی-بهداشتی، مواد دارویی و همچنین مواد غذایی

۱. Chlorella vulgaris

یکی از محـــصولاتی که کاملا اختصاصی و منحصر به فرد ریزجبک‌ها می‌باشند، پلی ساکاریدها هستند. این پلی ساکاریدها عمدتا در جلـبک های قرمز تولید شده و شامل سه دسته آگار، کاراگینان و پروفیران می‌باشند. آگار ترکیبی از ۷۰ درصد آگارز غیـــر یونی ژلاتیه کننـــــده و ۳۰ درصد آگاروپکتین یونی ژلاتینه کننده است. آگارز پلی ساکاریدی خطی است. کارآگینان از لحاظ شیمیایی شبیه آگار است، و به عنوان عامل ژله کننده و thickener در صنایع غذایی، افزودنی در خیمرداندان¬ها، شامپوها و کرم¬های آرایشی-بهداشتی استفاده می¬شود.

کلرلا در مقادیر وسیع کشت داده می شود، بیشترین آن مربوط به TCMC که سالانه بیش از ۴۰۰ تن تولید می کند. ترکیب ســـلولی کلرلا غنی از پروتئین، ویتامین، مواد معدنی، فاکتورهای رشد و مواد مفید دیگری است. از کلرلا محصولات مختلفی اعم از پودر کلرلا، قرص های کـلرلا و عصاره مایع کلرلا که در غذای آسیایی ها به وفور استفاده می شود، تولید می شود. آرد این جلبک که مقدار زیادی لیـــپید و روغن دارد به طور وسـیع به عنوان افزودنی در غذاها استفاده می شود

شکل ۲ – ۱۵: کشت ریزجلبک ها در استخرهای باز

شکل ۲ –۱۴: تولید پلیمرهای زیستی و کاربرد آنها

## اسپیرولینا

اسپیرولینا به دلیل اینکه غنی از پروتئین و سایر مواد باارزش است، سال هاست به عنوان ماده غذایی انسان استفاده می شود. بطور خاص این جلبک دارای لینولئیک اسید که در بدن انسان ساخته نمی شود. سالانه حدود ۳۰۰۰ تن اسپیرولینا تولید می شود.

شکل ۲ –۱۷ : کشت وسیع ریزجلبک اسپیرولینا

۱. Spirulina

### ۲۲-۴-۱۰- استفاده از زیست فناوری صنعتی در محیط زیست

یکی از حوزه‌های مهم که زیست‌فناوری صنعتی در آن کاربرد دارد مباحث پیرامون دفع آلودگی‌ها و حفاظت از محیط زیست می‌باشد. از جمله این کاربردها میتوان به موارد زیر اشاره کرد :

- رفع آلودگی‌های زیست محیطی مانند فلزات سنگین، ترکیبات آروماتیک و آلیفاتیک نفتی با استفاده از روش‌های زیست فناوری
- حذف رنگ از پساب‌های صنعتی
- تصفیه فاضلاب‌های صنعتی و خانگی به روش زیستی (در این روش‌ها از میکروارگانیسم‌هایی استـــفاده می‌شود که به طور طبیعی در سیستم تصفیه فاضلاب رشد می‌کنند).

بخش سوم:

# کاربردهای زیست فناوری در کشاورزی

### ۳-۱- مقدمه:

در حال حاضر بسیاری از طرح‌های حوزه کشاورزی جهان، توسط شرکت‌های زیست فناوری انجـام می‌گیرد که هدف آنـها بالا بردن ارزش‌افزوده محصولات کشاورزی با بهره‌گیری از روش‌های مختلف این علم می‌باشد. به‌طور مثال تکنیک کشت‌بافت گیاهی به عنوان یکی از بخـش‌های مـهم زیست‌فناوری کشاورزی ضمن فراهم نمودن امکان تکثیر انبوه واریته‌های مهندسی‌شده، در تولید بذر، نشا و نهال بسیـاری از گیاهان زراعی و باغی نقش ایفا می‌کند. همچنین این روش امکان نگهداری و حفاظت از ژرم‌پلاسم‌های[۱] گیاهی را در شرایط فراسرد و محیط درون شـیشه فراهم آورده است. بهره‌برداری از پتانسیل اضافه یا حذف کردن ژن‌ها در جـهت بهبود محصولات کشاورزی از دیگر بخش¬های زیست¬فناوری کشاورزی است که منجر به تولید گیاهان تراریخته مقاوم به حشرات و علف‌کش‌ها، گـیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های محیـطی و بـهبود کیفـیت انبـارمانی میوه‌ها با تأخیر در رسیدن و جلوگیری از فساد آن‌ها، شده است. طی سـال‌های اخیر نیز مبحث جدید ویرایش ژن ضـمن فراهـم نمـودن امکان اصلاح ژنتیکی گیاهان، در راستای کاهش هرچه بیشتر مخاطرات مهندسی ژنتیک گام برداشته است. افزایش دانش در شناسایی مسیـرهای تولید متابولیت‌های ثانویه بخش دیگری از زیست‌فناوری گیاهی را به سیستم‌های کشت سلولی و ریشه‌های موئین با هـدف تولید متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌های هترولوگ اختصاص داده است. سیستم‌هایی که می‌توانند باعث گسترش و بهبود سودمندی گیاهان عالی به عنوان منابع احیا شـدنی مواد شیمـیایی، خصوصاً ترکیـبات دارویی گردند. با توجه به اهمیت و کاربرد زیسـت فناوری کشاورزی در ادامه توضیحاتی جامع‌تر پیرامون کاربردهای این علم در حوزه‌های مختلف کشاورزی آورده می‌شود.

### ۳-۲- کاربردهای زیست فناوری در زراعت و باغبانی

زراعت و باغـبانی جزء بخش‌های اصلی علوم کشـاورزی بوده و بسـیاری از کاربردهای زیست‌فناوری مـربوط به این بخـش¬ها می‌باشد. کاربرد زیست فناوری در این علوم را می‌توان در سه بخش کشت بافت گیاهی، مهنـدسی ژنتیک و نشانگرهای مولکولی مورد بررسی قرار داد. در ادامه در مورد هر بخش توضیحاتی آورده می‌شود.

#### ۳-۲-۱- کشت بافت گیاهی

وقتـی درباره کـشت گیاه صحبت می‌شـود معمولاً منظور کشـت گیاهان در گلدان، زیرپـلاستیک، گلـخانه و یا مـزرعه مـی‌باشد. تکـثیر رویشی که شـامل قلـمه‌زدن، خوابانیدن و پیـوندزدن می‌باشد از دیـرباز در کشـاورزی اهمـیت داشته

۱. Germplasm

و از آن در تکثیر گیاهان زراعی، درختان میوه و ... استفاده می‌شود. روش‌های تکثیر رویشی در شرایط طبیعی در برخی موارد کارآمد نبوده و یا از سرعت کافی به ویژه برای تولید انبوه برخوردار نمی‌باشد، بر این اساس روش جدیدی از کشت گیاهان، تحت عنوان کشت سلول و بافت گیاهی معرفی شده است.

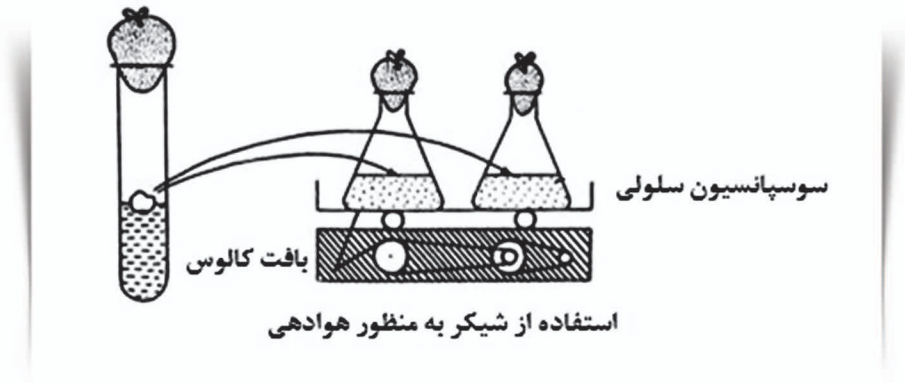
به عبارت دیگر کشت سلول و بافت گیاهی که به عنوان کشت درون شیشه[1] نیز مطرح می‌شود، به انواع کشت‌های استریل که در شرایط درون شیشه‌ای انجام می‌گیرد، اطلاق می‌شود. در حال حاضر تکنیک‌های کشت‌بافت گیاهی به عنوان ابزاری قوی جهت مطالعه مشکلات اساسی و کاربردی بیولوژی گیاهی درآمده و در سال‌های اخیر کاربردهای تجاری گسترده‌ای در تکثیر گیاهان مختلف از جمله گیاهان زینتی و دارویی و نیز حذف عوامل بیماری‌زا از گیاهان، پیدا نموده است. کاربردهای مختلف کشت‌بافت و توانمندی آن در اصلاح گیاهان این تکنیک را به یک موضوع جهانی درآورده و افزایش تعداد کشورهای عضو شرکت‌کننده در موسسه بین‌المللی کشت‌بافت گیاهی گواهی بر این ادعا می‌باشد. علاوه بر آن هیئت بیولوژی گیاهی سازمان تحقیقات سلولی یونسکو، کشت‌بافت گیاهی را به عنوان یکی از برنامه‌های اولویت‌دار خود معرفی کرده است و تدریس تکنیک‌های کشت‌بافت جزو برنامه درسی دانشجویان رشته‌های داروسازی، پزشکی، کشاورزی، گیاه‌شناسی، زیست شناسی، جنگلداری و ... در آمده است. در ادامه ضمن معرفی مقدماتی کشت درون شیشه، کاربردهای گوناگون این تکنیک در حوزه باغبانی و اصلاح نباتات آورده می¬شود.

### الف ) انواع کشت درون شیشه

با توجه به هدف مورد نظر محقق و یا فرد استفاده کننده، کشت درون شیشه انواع مختلفی دارد که در هر کدام بافت مورد استفاده متفاوت می‌باشد. در ادامه توضیحاتی در مورد هر روش آورده می‌شود.

**۱- کشت سلول**[2] : کشت سلول نوعی کشت درون شیشه است که در آن سلول‌ها یا به طور مجزا و تک[3] و یا به صورت توده‌های کوچک سلولی در محیط کشت مایع و به حالت سوسپانسون رشد داده می‌شوند. در این نوع از کشت با توجه به مایع بودن محیط کشت، معمولاً ظروف با استفاده از شیکر تکان و هوادهی می‌شوند. منشاء سلول‌های کشت شده می‌تواند بافت‌های مختلف گیاهی و یا کالوس[4] باشد. کاربرد اصلی این نوع کشت در مطالعات اصلاحی به ویژه ایجاد لاین های جدید با استفاده از جهش زایی، تولید متابولیت های ثانویه و داروئی و همچنین جنین‌زایی سوماتیکی می‌باشد.

۱ . in vitro
۲ . Cell culture
۳ . Singell cell
۴ . Callus




شکل ۱۳ : ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی با استفاده از بافت کالوس

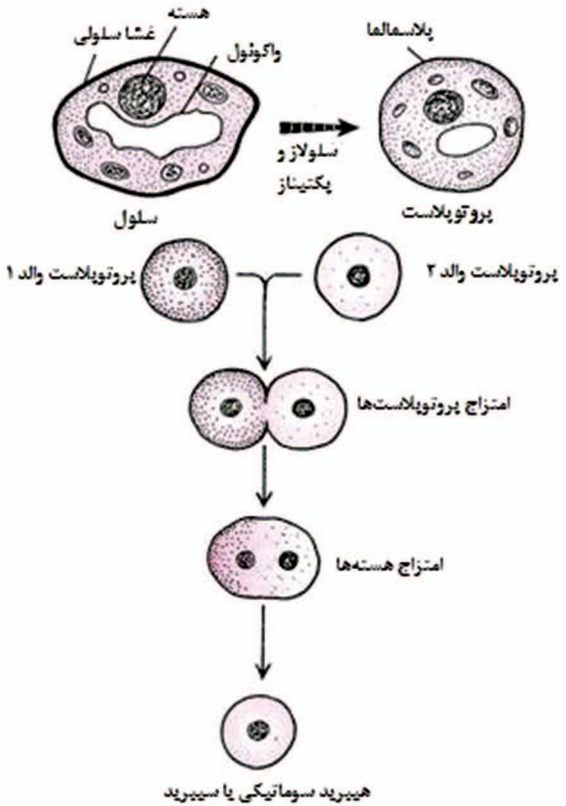
**۲- کشت پروتوپلاست:** به سلول‌های گیاهی بدون دیواره سلولی، پروتوپلاست گفته می‌شود. کشت پروتوپلاست تکنیکی است که در آن دیواره سلولی با روش‌های مکانیکی یا شیمیایی از سلول جدا شده و از پروتوپلاست‌های حاصل در شرایط کنترل شده برای ایجاد تغییرات ژنتیکی و هیبریداسیون سلولی استفاده می‌شود. علیرغم وجود مشکلات تکنیکی که استفاده از پروتوپلاست را در پاره‌ای از مطالعات محدود کرده است، در حال حاضر از پروتوپلاست در زمینه‌های تحقیقاتی متعددی به شرح زیر استفاده می‌شود:

الف - ایجاد پیوند پروتوپلاستی بین دو یا چند سلول و تهیه گیاهان دورگ: در برخی موارد که به دلیل ناسازگاری جنسی و یا فیزیکی امکان تهیه گیاه دورگ با روش‌های ژنتیکی معمولی و گرده‌افشانی کنترل شده میسر نیست می‌توان با روش امتزاج پروتوپلاست نسبت به ایجاد گیاهان دورگ اقدام نمود.

ب - وارد کردن مواد ژنتیکی خارجی به داخل سلول: پس از حذف دیواره سلولی، پروتوپلاست مجزا شده می‌تواند با فرآیندی مشابه با فرآیند آندوسیتوز[۱] در بعضی از سلول‌های جانوری، مواد خارجی را به داخل سیتوپلاسم جذب نماید. با استفاده از این روش می‌توان اندامک‌هایی مانند کلروپلاست، میتوکندری، پلاسمید و... را وارد پروتوپلاست کرد.

ج- مطالعه نحوه سنتز و ترشح دیواره سلولی : پروتوپلاست کشت شده به سرعت دیواره سلولی تشکیل می‌دهد به همین دلیل کشت پروتوپلاست پتانسیل مناسبی جهت مطالعه چگونگی ساخت و ترشح دیواره سلولی دارد.

۱. Endocytos




شکل ۳ – ۲: نمودار تولید هیبرید سوماتیکی

**۳- کشت بساک[۱]، کشت دانه گرده[۲] وکشت تخمک[۳]**: از این روش برای تولید گیاهان هاپلوئید در شرایط درون شیشه استفاده می شـود. هدف از کشت بساک یا تخمدان تولید گیاهان هاپلـوئید[۴] از راه تولید جنـین های سوماتیکی از تقسـیمات دانه های گرده نابالغ و یا تخمـک نـابالغ می باشد. سلول های گیاهان هاپلوئید دارای مجموعه کاملی از کروموزم های منفرد هسـتند که می توان با استفاده از کلشی سین[۵] آنها را دو برابر و به صورت دیپلوئید درآورد. در نتیجه دیپلوئیدهایی کاملاً هموزیگوت و بارور ایجاد می شود که به آنها دابل هاپلوئید[۶] گفته شده و در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۱. Anther culture.
۲. Pollen Culture.
۳. Ovary Culture.
۴. Haploid.
۵. Colchicine
۶. Doubled haploid.

**۴- کشت تک جوانه**[۱]: منظور از کشت تک جوانه، جداکردن یک جوانه به همراه قسمتی از شاخه به منظور تشکیل ساقه از طریق نمو جوانه است که طبیعی‌ترین روش تکثیر رویشی درون شیشه می‌باشد. جوانه‌های جانبی که در محور برگ‌ها قرار دارند مشابه با جوانه نوک شاخه، می توانند در شرایط درون شیشه و بر روی محیط کشت رشد داده شوند.

شکل ۳ -۳: مسیر تولید گیاه هاپلوئید مضاعف در شرایط درون شیشه

۱. Single node culture

**۵- کشت رأس شاخه**[۱]: رأس شاخه شامل سیستم انتهایی ساقه همراه با چندین پریموردیوم برگ‌های مجاور می‌باشد. رشد رأس شاخه در محیط کشت مناسب معمولاً منجر به تشکیل چندین ساقه به طور همزمان می‌شود. این روش برای تکثیر در سطح وسیع استفاده فراوان دارد.

**۶- کشت مریستم**[۲]: تنها نقطه‌ای در گیاه که عاری از آلودگی ویروسی است، مریستم می‌باشد چرا که سرعت و قدرت تقسیم در مریستم به حدی زیاد است که ویروس¬ها فرصت تقسیم و رشد پیدا نمی‌کنند. کشت مریستم عمدتاً در گیاهان باغی مورد استفاده قرار می‌گیرد هر چند برای تعداد زیادی از گیاهان زراعی مثل سیب زمینی¬، شبدر و تنباکو نیز از این روش استفاده شده است. گیاهان عاری از ویروس در گونه‌هایی همچون گیلاس، تمشک و انگور نیز از طریق کشت مریستم به دست آمده است.

شکل ۳ -۴: مریستم نوک شاخه

**۷- کشت کالوس**[۳]: کشت قطعاتی از بافت‌های تخصصی و تمایز یافته گیاهان بر روی محیط‌های حاوی آگار که منجر به تولید توده‌های سلولی غیرتخصصی و بی‌شکل می‌گردد را کشت کالوس گویند. فرآیند ایجاد کالوس از یک قطعه گیاهی کشت شده را می‌توان به ۳ مرحله شروع ایجاد کالوس، تقسیم سلولی و تکثیر کالوس و در نهایت تمایز سلول‌های کالوس، تقسیم کرد. در مقایسه با دیگر روش‌ها، ایجاد تنوع سوماتیکی در کشت کالوس رایج‌تر می‌باشد. استفاده عمده کشت کالوس، تمایز سلول‌های کالوس به جنین‌های سوماتیکی است که از نظر ریخت شناسی شبیه جنین‌های بذری بوده اما برخلاف جنین‌های بذری، از لحاظ ژنتیکی شبیه گیاهان مادری بوده و تفرق ژنتیکی در آنها وجود ندارد. کاربرد جالب توجه در این مورد، تولید بذر مصنوعی می‌باشد که از طریق قرار دادن جنین‌های سوماتیکی در یک پوشش مناسب، تهیه می‌شوند (شکل ۳-۱۳).

۱. Shoot tip culture
۲. Meristem Culture
۳. Callus Culture

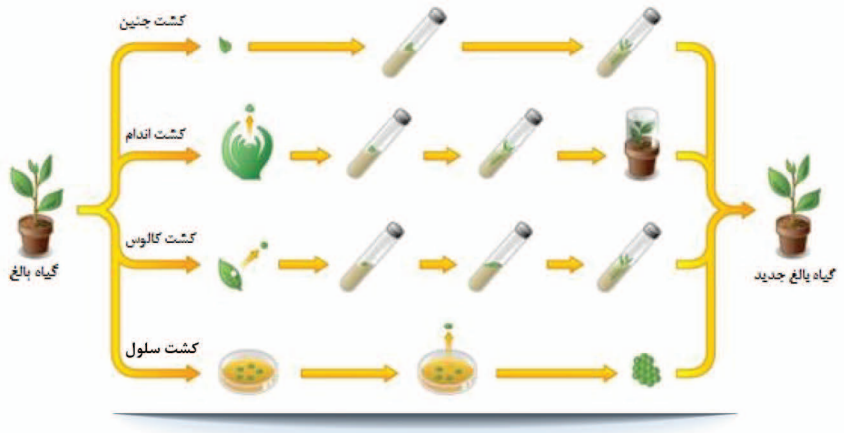
**۸- کشت جنین**[۱] : توانایی گیاهان برای تولید جنین محدود به تکامل سلول تخم بارور شده نبوده بلکه ایجاد جنین از بافت های رویشی گیاهان در شرایط درون شیشه نیز امکان پذیر می‌باشد. یکی از بافت‌هایی که جهت ایجاد جنین های سوماتیکی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد جنین‌های بذری گیاه مورد نظر می‌باشد. بدین منظور جنین با احتیاط و گاهی اوقات زیر میکروسکوپ پس از حذف پوسته‌ها از درون دانه خارج شده و به محیط کشت مناسب انتقال داده می‌شود.

**۹- کشت جنین نارس:** کشت جنین نارس به دست آمده از بذور دو کاربرد اصلی دارد.

الف) نجات جنین حاصل از تلاقی‌های بین گونه‌ای و یا بین ارقام ناسازگار: گاهی اوقات ناسازگاری بین گونه‌ها یا ارقام، بعد از تشکیل جنین منجر به سقط جنین می‌شود. چنین جنین‌هایی را می‌توان در حالت نارس و قبل از سقط شدن از درون دانه خارج کرده و در شرایط درون شیشه‌ای رشد داد.

ب) ممانعت از بین رفتن دانه در اثر ریزش و یا حمله آفات. ممکن است به دلیل ریزش بذر پس از رسیدن و از دست رفتن آنها، بذر بالغ ایجاد نگردد یا اینکه بذور در حال تشکیل قبل از بلوغ توسط حمله آفات از بین روند در چنین شرایطی نیز کشت جنین نارس مفید واقع می‌شود.

جنین کشت شده یک گیاه کامل است و به تمایز مجدد نو ساقه یا ریشه نیازی ندارد. در بعضی از گونه¬های گیاهی نیز جنین نارس به عنوان بافت مناسب جهت تولید جنین‌های سوماتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد.




شکل ۳ – ۵: مسیرهای مختلف ایجاد گیاه جدید با روشهای مختلف کشت درون شیشه

۱. . Embryo Culture

## ب) باز زایی[1]

خاصیت توتی‌پوتنسی[2] یا توانمندی، به قابلیت ارثی تبدیل یک سلول گیاهی به گیاهی کامل گفته می‌شود. به عبارتی طبق این خاصیت تمام اطلاعات مورد نیاز برای رشد و تولید مثل در داخل یک سلول گیاهی وجود داشته و طی فرآیند باززایی بروز می یابد. به لحاظ تئوری تمام سلول‌های گیاهی دارای این توانمندی هستند اما بهترین سلول‌ها جهت بروز این توانمندی سلول‌های مریستمی می‌باشند. در حال حاضر تکنیک‌های کشت بافت گیاهی به اندازه ای پیشرفت کرده است که با اجرای آن می توان گونه های گیاهی مختلف را در شرایط درون شیشه باززائی و تولید نمود. به عبارتی سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های مختلف انتخاب شده از گونه‌های گیاهی متعدد را می‌توان با موفقیت کامل کشت و از آنها گیاهان کامل تولید کرد. موفقیت بسیاری از کاربردهای کشت بافت نیز به قدرت باززایی بافت مورد استفاده وابسته بوده و بدون باززائی، بسیاری از مطالعات از جمله مباحث رشد و تمایز، تولید گیاهانی با اطلاعات ژنتیکی مختلف، کشت بساک، تکثیر سریع گونه های گیاهی مطلوب، حذف بیماری‌های گیاهی با استفاده از کشت مریستم و بسیاری از مطالعات مربوط به تنظیم کننده‌های رشد انجام پذیر نخواهد بود. باززائی و تولید گیاه از طریق آن به یکی از دو روش زیر صورت می‌پذیرد:

۱- جنین‌زائی سوماتیکی: در این روش، لازم است تا سلول گیاهی قطبی شود. به این صورت که تمامی واکوئل‌ها در یک قطب و تمامی میتوکندری‌ها در قطب مقابل آن قرار می‌گیرند. از محل تجمع واکوئل‌ها، شاخه و از قطب مقابل آن ریشه به وجود می‌آید. جنین‌زائی می‌تواند مستقیم یا غیر مستقیم باشد. در نوع مستقیم، جنین‌زائی بدون تشکیل کالوس صورت گرفته اما در نوع غیرمستقیم بافت مورد استفاده در ابتدا به کالوس تبدیل شده و بعد از آن جنین‌زایی از سلول‌های کالوس رخ می‌دهد (شکل ۳-۶).

۲- اندام‌زائی: در اندام‌زایی بافت مورد استفاده به سمت تولید اندام شاخه و یا ریشه می‌رود. نوع و غلظت هورمون‌های مورد استفاده در نوع اندام ایجاد شده بسیار اثر گذار بوده و از آنجا که اندام حاصل از مریستم به وجود نیامده، به عنوان اندام نابجا نامیده می‌شود (شکل ۳-۶).

۱. Regeneration
۲. Totipotency

شکل ۳ – ۶ :باززایی در کشت درون شیشه. الف) ایجاد جنین بر روی بافت کالوس. ب) شاخه زایی ج) ایجاد ریشه بر روی بافت برگ

### ج) کاربردهای کشت بافت در باغبانی و اصلاح نباتات

الف- ریز ازدیادی[۱]

ریز ازدیادی نوعی تکثیر درون شیشه ای است که طی آن یک ژنوتیپ برگزیده (دارای یک ویژگی معین مثل مزه میوه، رنگ گل، شکل بوته، تحمل به بیماری یا آفت و غیره) انتخاب شده به صدها و یا هزاران گیاه مشابه تبدیل می‌شود. این روش که یکی از کاربردهای مهم و تجاری کشت بافت گیاهی می‌باشد به تکثیر رویشی گیاهان سرعت بخشیده و در تکثیر گیاهان زینتی و پایه درختان میوه کاربرد بسیار دارد. مزیت اصلی این روش تکثیر غیرجنسی و در نتیجه تولید گیاهان کاملاً یکسان از لحاظ ژنتیکی می‌باشد. اهمیت این مسئله زمانی مشخص می‌شود که هدف تکثیر گیاهان کاملا مشابه به طور مثال یک گل زینتی با رنگی خاص باشد، ریزازدیادی منجر به تولید هزاران نشا خواهد شد که در شرایط محیطی یکسان، گل‌های کاملاً یک اندازه و یک رنگ تولید خواهند نمود. ریز ازدیادی معمولاً شامل ۵ مرحله به ترتیب زیر می‌باشد.

۱. ضدعفونی نمودن بافت مورد نظر (جدا کشت )[۲]

۲. استقرار نمونه در شرایط درون شیشه

۳. شاخه زایی

۴. ریشه‌زایی

۵. سازگاری با محیط

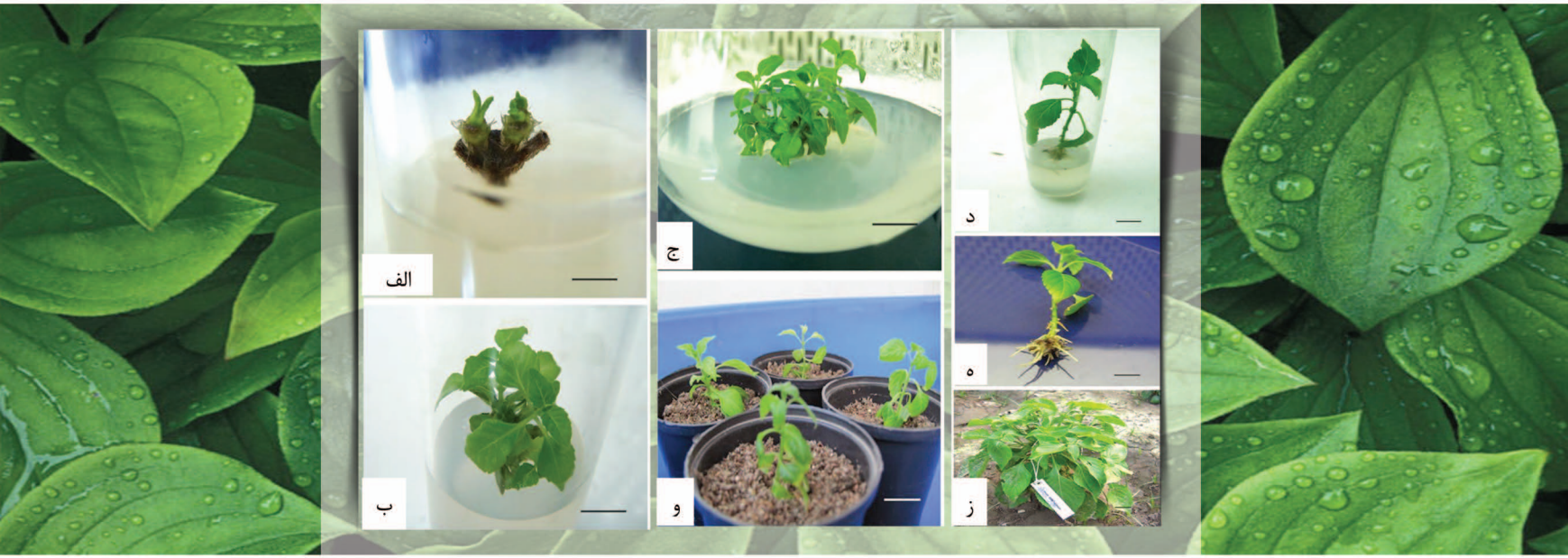
هر کدام از این مراحل تحت تأثیر تعدادی از عوامل فیزیکی، تغذیه‌ای و هورمونی قرار دارند.

اولین مرحله در ریز ازدیادی رفع آلودگی است به این معنی که قطعه جدا کشت باید سترون گردد. پرکاربردترین روش استفاده از کلر (که در محلول های ضدعفونی کننده تجاری وجود دارد) است که با توجه به نوع جدا کشت (دانه، نوشاخه، ساقه، برگ...) از رقت‌های مختلف آن استفاده می‌شود. سپس نمونه ۲ تا ۳ بار با آب

۱ . Micropropagation
۲ . Explant

مقطر سترون شستشـــو، با کاغذ صافی سترون خشک و به منظور استقرار به محیط کشت مناسب انتقال داده می‌شود. ظروف کشـــت حـــاوی نمونه به اتاقک‌های رشد با شدت و مـــدت نور و میزان دمای کامـــلاً کنترل شده انتقال داده می‌شوند. جدا کشت‌ها پس از تثبیت در محـــیط شـــروع به شاخه‌زائی نموده و در مرحله شاخه‌زایی از همین شاخه‌ها به عنوان بافت مناسب جهت تهیه جدا کشت استفاده می‌شود. جهت تکثیر و افزایش شاخه‌ها، مـــعمولاً نمونه‌ها ماهی یک بار واکشت می‌شوند یعنی محیط کشت آنها تعویض و در صورت رشد مناسب تقسیم نمودن بافت به اجزاء کوچک‌تر صورت می‌گیرد. به دنبال رشد جدا کشت‌ها کاهـــش غلظت مواد غذایی در محیط رخ داده و توازن مواد تشکیل دهنده آن به هم می¬خورد. همچنین غلظت مـواد دفعی جدا کشت در محیط نیز افزایش یافته که مانعی برای رشد نمونه می‌باشد. این دو مشکل نیز با واکـــشت نمودن جدا کشـــت‌ها در محـیط جدید مرتفع می‌گردد. هورمون مورد استفاده در مرحله شاخه‌زایی، با توجه نوع گیاه معمولاً یک نوع سایتوکینین بوده که محرک رشد بخش هوایی و شاخـــه‌زایی می‌باشد.

بعد از تولید تعداد قابل قبول شاخه، تحریک ریشه‌زائی در نمونه‌ها با انتقال شاخه‌ها به محیط‌های غنی از اکسین صورت می‌پذیرد. پس از ریشه‌دار شدن شاخه‌ها و ایجاد گیاه کامل، ریشه‌ها جهت حذف آگار موجود در سطح آنها با دقت کامل شسته شده و گیاه کامل به گلدان منتـقل می‌گردد. خاک گلدان معمولاً ترکیبی از پرلیت (خاک آتشفشانی) و پیت (خاک مردابی) به نسبت ۳ به ۱ می‌باشد. در ابتدا بایستی رطوبت محیـط صـــددر صد باشـــد به همین دلـــیل در هفته اول بعد از انتقال باید روی گلدان سرپوشی قرارداد (ساده‌ترین کار گذاشتن یک لیوان یکبار مـصرف شـــفاف روی گیاه است) تا گیاه به طور تدریجی با محیط سازگار شود (شکل ۳-۷). همانطورکه می‌دانیم گیاهی که قبلاً در محـــیط کشت به سر می‌برده گیاهی هتروتروف بوده (از مواد غذایی محیط کشت استفاده می‌کرده است) که باید به گیاهی اتوتروف تبدیل شود (یعنی فتوسنتز کرده و قند تولید نماید).




شکل ۳ –۷: مراحل مختلف ریز ازدیادی الف)استقرا جداکشت ساقه حاوی دو جوانه جانبی ب) رشد جوانه ها ج) شاخه زایی
د) ریشه زایی ه)گیاه کامل حاصل از ریز ازدیادی آماده انتقال به خاک و) انتقال گیاه به گلدان و سازگاری ز) انتقال گیاه حاصل به خاک

ب- تولید گیاهان عاری از ویروس

گیاهان معمولاً دارای آلودگی‌های درونی قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها می‌باشند که اغلب سبب کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شوند. مبارزه با چنین آلودگی‌هایی بسیار مشکل بوده به ویژه آنکه امکان انتقال بعضی از آنها از طریق بذر نیز وجود دارد. سرعت تکثیر سلول‌ها در ناحیه مریستم و نبود بافت آوندی در این قسمت مانع انتقال ویروس شده و کشت مریستم را به عنوان یکی از کاربردهای کشت بافت گیاهی جهت تولید گیاهان عاری از ویروس مطرح نموده است. اگر مریستم انتهایی (به اندازه ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌متر) برداشته و به محیط کشت مناسب انتقال داده شود، گیاهان حاصل از آن بدون آلودگی خواهند بود. این روش برای تولید گیاهان مادری همچون توت‌فرنگی و سیب‌زمینی عاری از ویروس استفاده می‌شود (شکل ۳-۸).

شکل ۳ -۸: تولید ریز غده (مینی تیوبر) سیب زمینی عاری از ویروس یکی از کابردهای تجاری کشت بافت

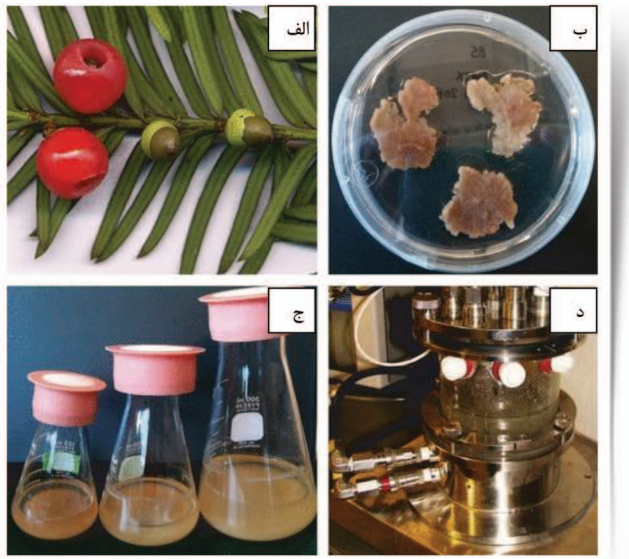
ج- تولید متابولیت‌های ثانویه

فراورده‌های ثانویه دامنه وسیعی از ترکیبات آلی مانند آلکالوئیدها، فنولیـــک‌ها، فلاونوئیدها، اســتروئیدها و ترپنـــوئیدها را در بر می‌گیـرد که در گیاهان تولید می‌شوند. این فرآورده‌ها در صنایع غذایی، بهداشتی و داروسازی از جایگاه خاصی برخوردارند به طور مثال از بعضی از این ترکیـبات به عنوان طعم‌دهنده غذاها، آب‌میوه‌ها و یا نوشابه‌ها استفاده می‌شود یا روغن‌های گیاهی که در صنایع آرایشی و عطرسازی کاربرد دارند.

با ارزش‌ترین فراورده‌های ثانویه گیاهی، ترکیباتی¬اند که در صنایع داروسازی برای درمان بیماری¬ها استفاده می‌شوند. به ظـــور مثال میـــتوان به وین‌بلاستین و تاکسول برای درمان سرطان، آتروپین به عنوان یک ماده ضد صفرا و یا دیگوکسین به عنوان یک محرک قلبی اشاره کرد.

فراورده‌های ثانویه افزون بر ساختار پیچیده، مسیر بیوسنـــتزی پیچیده‌ای نیز داشـــته بنابراین بررسی آنها دشـوار و زمان‌بر اسـت. هرچند امروزه بسیاری از گیـــاهانی که فراورده ثانویه آنها در صنایع مختـــلف استفاده می‌شود به صورت زراعی کشـت می‌شوند اما تولید این گـیاهان به دلیل شـــرایط اقلیمی نامناسب محدود است و از این رو ایجاد صنایع پایدارتر برای تولید این مواد، ضروری به نظر می‌رسد.

یکی از روش‌های توسعه یافته برای این منظور، کشت سوسپانسیون سلولی است که مشابه سیستم‌های تخمیر صنعتی به کار می‌رود. کشـت‌های سلول گیاهی، منـــابع تولید متابولیت‌های ثانویه بوده که در مقایسه با منابع گیاهی دارای مزایایی همـــــچون عدم تأثیر پذیری از محیط (اقلیم، آفت‌ها و بیماری‌ها) قابلیت تنظیم و کنترل، امکان مکانیزه کردن و کیفیت پایدار فراورده‌های صنعتی حاصل از آنها می‌باشد.




شکل ۳ –۹: تولید تاکسول از برگهای گیاه سرخدار در کشت سلولی
الف) برگ های سرخدار که بعد از ضدعفونی کردن به محیط کشت انتقال داده می شوند ب) تولید کالوس از برگ در محیط کشت جامد ج) انتقال کالوس به محیط کشت مایع و تولید سوسپانسیون سلولی د) استخراج تاکسول از سلولها

شکل ۳ –۱۰: بیوراکتورهای افقی کشت سلولی و تولید انبوه متابولیت ثانویه گیاهی

د- تنوع سوماتیکی[1]

بافت‌های حاصل از کشت یک جداکشت و یا سلول منفرد در شرایط درون شیشه‌ای و پس از واکشت‌های متوالی ممکن است از نظر صفات مورفولوژیکی مانند سرعت رشد، رنگ، قدرت جنین‌زایی و قابلیت باززایی

۱. Single node culture

دچار تنوع و اختلاف شوند. این اختلاف‌ها که اغلب نتیجه ناپایداری ژنتیکی است، تنوع سوماتیکی نامیده می‌شود.
ایجاد جـــمعیت‌های مـــتنوع در شرایط درون شیشه فرصتی برای اصلاح گران جهت شناسایی ژنوتیپ‌هایی با توانایی‌های خاص می‌باشد. پیدایش چنین تنوع‌هایی در کشت‌های کالوس، سوسپانسیون سلولی و پروتوپلاست، اساس انتخاب در شرایط درون شیشه را تشکیل می‌دهند. به طوری که می‌توان با استفاده از روش‌های انتخاب مناسب، سلول‌های دارای ویژگی‌های مطلوب همچون تحمل تنش‌های غیر زیستی و یا قدرت بیـــشتر برای تولید متابولیت‌های ثانویه را شناسایی و جدا کرد.

شکل ۳ – ۱۱ : ایجاد تنوع در گلهای بنفشه آفریقایی با استفاده از تنوع سوماتیکی حاصل از کشت بافت

ه- ایجاد گیاهان هاپلوئید مضاعف[۱]

امروزه منبع اصلی تولید بسیاری از بذرهای تجاری را ژنوتیپ‌های خالص تشکیل می‌دهد زیرا می‌توانند تولید ژنوتیپ‌های کاملا یکسان را تـــضمین نمایند. همچنین ژنوتیپ‌های خالص به عنوان لاین‌های والدینی به منظور تولید بذرهای هیبرید F۱ به کار می‌روند که به طور گســـترده در زراعت، باغبانی و اصلاح نباتات مورد استفاده قرار می‌گیرند. با وجود اهمیت لاین‌های خالص در مسیر کارهای اصلاحی، طولانی بودن مســـیر تولـــیدشان،

۱. Doubled Haploid

محدودیت مهمی در استفاده از آنها محسوب می‌شود به ویژه برای گیاهان درختی که دوران نونهالی آنها چندین سال بوده و پروسه اصلاحی را گاهی تا ۵۰ سال طولانی می‌کند. یکی از روش‌هایی که این مشکل را تا حد بسیاری برطرف می‌نماید، تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد.
در علوم گیاهی واژه هاپلوئید به گیاهانی گفته می‌شود که از اسپروفیت سرچشمه گرفته و در هسته سلول‌های رویشی آنها نصف تعداد کروموزوم‌های گونه اصلی موجود باشد. این گیاهان به طور معمول از باززایی دانه گرده و یا تخمک در شرایط درون شیشه به دست می‌آیند. چنین گیاهانی با اعمال تیمار کلشی‌سین به گیاهان هاپلوئید مضاعف (دابل هاپلوئید)، که اکنون از لحاظ تعداد کروموزوم به حالت طبیعی بازگشته‌اند، تبدیل می‌شوند. به این ترتیب کشت دانه گرده و یا تخمک به یک روش جایگزین تولید لاین‌های خالص تبدیل می‌شود.

و- نگهداری ژرم پلاسم

افزایش شدید جمعیت و مداخله بشر در زیستگاه¬های طبیعی گیاهان سبب فشار بر منابع زراعی و جنگلی شده است که کاهش فراوانی برخی گونه‌های مهم اقتصادی و دارویی را به دنبال دارد و برخی از آنها در معرض انقراض قرار گرفته‌اند. چنین گونه‌هایی با واژه تهدید شده خوانده می‌شوند. در سال‌های اخیر تلاش‌هایی در سطح ملی و بین‌المللی برای حفاظت و نگهداری گونه‌های گیاهی تهدید شده[۱] و دیگر گونه‌هایی که ممکن است در برنامه‌های اصلاحی آینده مورد استفاده قرار گیرند، صورت گرفته است. به طور کلی حفاظت از ژرم‌پلاسم یا نگهداری مواد ژنتیکی از دو راه در محل[۲] و خارج از محل[۳] امکان‌پذیر است. نگهداری در محل، با تاسیس پارک‌های ملی و مناطق حفاظت شده صورت می‌پذیرد. محدودیت این روش کاهش منابع ژنتیکی حفاظت شده به دلیل تهدیدات محیطی می‌باشد. روش نگهداری اصلی، نگهداری خارج از محل است که مواد ژنتیکی به صورت بذر و یا کشت‌های آزمایشگاهی نگهداری می‌شوند. از آنجا که بذر اکثر محصولات زراعی مهم تحت شرایط سیستم¬های متداول، قوه نامیه خود را در مدت کوتاهی از دست می‌دهند و با توجه به موارد بالا، ضرورت وجود بانک ژن و نگهداری نمونه‌ها در کشت‌های آزمایشگاهی آشکار می‌گردد. در شرایط آزمایشگاهی یا نمونه در شرایط درون شیشه و به صورت سترون با شرایط رشد کند (نور کم، دمای پایین) نگهداری¬می‌شود و یا در شرایط فراسرد[۴] مورد محافظت قرار می¬گیرد. برای نیل به این هدف مواد گیاهی باید در ازت مایع انبار شوند.

۱. Threatened
۲. in situ
۳. ex situ
۴. Cryopreservative

نگهداری ژرم‌پلاسم‌ها در دمای ۱۹۶- برای مدت زمانی نامحدود امکان‌پذیر است. برای نگهداری نمونه‌ها در این شرایط بایستی تیـــمارهای خاص بر روی آنها اعمال گردد تا یخ زدن آب نمونه‌ها در ازت مایع از نوع شیشه‌ای باشد و منجر به آسیب غشاهای ســـلولی نشود. یخ زدن در فریزرهای معمولی از نوع کریستالی است که پارگی و آسیب غشاهای سلولی را در پی دارد.

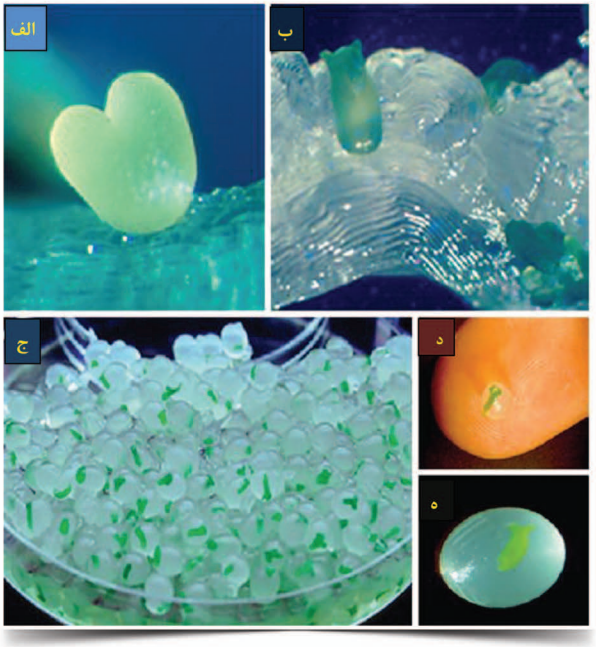
شکل ۳ – ۱۲: قرار دادن جعبه های حاوی نمونه در تانک ازت مایع

ز- تولید بذر مصنوعی[۱]

بذر مصنوعی با قرار دادن جنـــین‌های سوماتیکی در یک پوشـــش مناسب مانند آگارز یا آلژینات کلسیم به دست می‌آید. تولید موفقیـت آمیز بذر مصنوعی یونجه در سال ۱۹۹۲، که با کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی یونجه در آلژینات کلســـیم به دست آمـــدند، جزء اولین گزارشـات این تکنیک می‌باشد.

از مهم‌ترین کاربردها و اهداف تولید بذر مصنوعی، تولید بذور کاملاً یکسان با توجه به غیر جنسی بودنشان می‌باشد. البته امروز مفهوم بذر مصنوعی گسترش یافته و به هر نوع بافت کپسوله شده اطلاق می‌گردد. پوشش مورد استفاده در ساخت بذر مصنوعی دو نقش مهم حفـــاظت و تـغذیه اولیه بافت درون خود را بر عهد دارد. یکی از کاربردهای دیگر بذر مصنوعی، نگهداری ژرم‌پلاسم‌ها در شرایط فرا سرد به صورت بذر مصـــنوعی می‌باشـد. در این صورت ترکیب کپسوله اطراف بافت بایستی به خوبی نقش محافظتی ریزنمونه در مقابل دمای پایین ازت مایع را ایفا نماید.

۱. Artificial seed




شکل ۳ – ۱۳: بذر مصنوعی. الف) جنین سوماتیکی در مرحله قلبی شکلی گیاه کلزا (Brassica napus ssp. Oleifera) ب) جنین زایی ثانویه از بافت هایپوکوتیل در گیاه کلزا ج، د و ه) بذور مصنوعی کلزا با قرار دادن جنین های سوماتیکی در پوشش حاوی آلژینات کلسیم.

### ۳-۲-۲- مهندسی ژنتیک[۱]

افزایش تحمل گیاهان زراعی به بیماری ها، آفات و تنش های محیطی سبب افزایش کمی و کیفی محصولات زراعی می شود. متداول ترین روش جهت تولید ارقام پرمحصول متحمل، دورگ‌گیری بین گیاهان متحمل و گیاهان پرمحصول می‌باشد. در این روش که مبنای اصلاح سنتی می‌باشد، گیاهان نسل اول (F۱) در یک برنامه تلاقی برگشتی متوالی یا خودگشنی همراه با انتخاب برای صفت مورد نظر استفاده می‌شوند. اگرچه این فرآیند موفقیت آمیز و بدون مخاطره است، ولی به زمان طولانی نیاز داشته و از طرفی دورگ‌گیری گیاهان به دلیل ناسازگاری بین گونه‌ها همیشه امکان‌پذیر نمی‌باشد.

۱. Genetic Engineering

با پیشرفت علم در حوزه ژنتیک مولکولی و شناسایی ابزارهایی همچون آنزیم¬های محدودگر (برشی) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، شاخه‌ای از علم به نام مهندسی ژنتیک ایجاد شد که قادر به ویرایش، جداسازی، خالص‌سازی، واردکردن، بیان و یا تغییر بیان یک ژن خاص در میزبان مورد نظر می‌باشد.

یکی از دستاوردهای اصلی مهندسی ژنتیک انتقال ژن به گیاهان است به نحوی که محدودیت منبع ژن، که بازدارنده اصلی موفقیت در برنامه های اصلاحی کلاسیک است، برداشته می‌شود. به عبارت دیگر در اصلاح سنتی برای انتقال یک ژن با ارزش باید آن ژن در منابع ژنتیکی آن گونه خاص و یا حداکثر گونه‌های نزدیک قابل تلاقی با گونه مدنظر موجود باشد. در صورتی که این صفت در گونه‌ای دور از خانواده یا راسته‌ای متفاوت یافت شود اصلاح نباتات سنتی نمی تواند کاری از پیش ببرد. اما روش های مختلف انتقال ژن، امکان انتقال ژنهای مورد نظر را از هر موجودی به موجود دیگر را فراهم کرده است.

طبق تعریف کمسیون اروپا به چنین موجوداتی که ماده ژنتیکی آنها با روش‌هایی غیر از تلاقی‌ها و نوترکیبی‌های طبیعی، تغییر یافته، موجودات تغییریافته ژنتیکی (GMO )[1] یا موجودات مهندسی شده (GEO )[2] اطلاق می‌شود. هرچند همه موجودات تغییر یافته ژنتیکی با ورود یک DNA خارجی حاصل شده‌اند اما با توجه به منبع DNA دریافتی به دو گروه Transgenic و Cisgenic تقسیم می‌شوند. اگر ژن وارد شده به ژنوم یک موجود از همان گونه و یا یک گونه نزدیک به آن (که توانایی تولید مثل و تبادل طبیعی اطلاعات ژنتیکی را با گونه مورد نظر را دارد) گرفته شده باشد، به موجود حاصل یک Cisgenic و یا Interagenic گفته می‌شود و اگر ژن یا DNA ورودی از یک گونه دور که توانایی تبادل ژنتیکی طبیعی با موجود مورد نظر را نداشته باشد اخذ گردد، موجود حاصل Transgenic یا تراریخته نامیده می‌شود.

مقاومت به علف‌کش، مقاومت به آفت، افزایش ارزش غذایی و افزایش خاصیت انبارداری جزء مهم‌ترین صفاتی هستند که تاکنون برای انتقال به ارقام زراعی گونه‌هایی همچون ذرت، سویا، پنبه، کلزا و گوجه فرنگی مورد استفاده محققین قرار گرفته‌اند.

روش های انتقال ژن در گیاهان به دو گروه روش‌های مستقیم و روش‌های غیر مستقیم تقسیم می‌شود.

**الف) انتقال ژن به روش غیر مستقیم:**

توسعه و تکامل انتقال ژن در گیاهان غالبا بر اساس انتقال DNA از طریق میزبان‌های واسطه باکتریایی صورت گرفته و در این زمینه باکتری اگروباکتریوم[3] بیشترین کاربرد را داشته است. گزارش Townsend و Smith در سال ۱۹۰۷ مبتنی بر این که عامل ایجاد بیماری گال طوقه[4] یک باکتری گرم منفی هوازی و میله ای شکل

۱ Genetically modified organism
۲ Genetically engineered organism
۳. Agrobacterium
۴ . Crown Gall

به نام آگروباکتریوم تومفاسینس[۱] می‌باشد مقدمه‌ای بر آغاز مبحث انتقال ژن در گیاهان بود. این پاتوژن بطور عمده از طریق زخم‌های ایجاد شده بر روی اندامهای زیرزمینی و طوقه، وارد گیاه شده و از طریق القای رشد بی رویه در سلول‌های این منطقه ایجاد بیماری گال طوقه می نماید. در سال ۱۹۷۴ مطالعات Zaenen و همکارانش حاکی از این بود که ژن‌های موجود بر روی یک قطعه DNA خارج کروموزومی در این باکتری بطول بیش ۲۰۰ کیلو جفت باز (kb) عامل ایجاد آلودگی در گیاه می باشد. این قطعه در واقع مربوط به پلاسمیدی بود که در سال ۱۹۷۵ توسط Van Larebecke و همکاران بعنوان پلاسمید القاء کننده تومور[۲] یا پلاسمید Ti نام گرفت. از این زمان باکتری آگروباکتریوم بخاطر قابلیت انتقال قطعه‌ای از پلاسمید خود به نام DNA انتقالی[۳] یا T-DNA به درون سلول میزبان و بیان طبیعی ژن‌های انتقال یافته این قطعه به همراه ژن‌های میزبان مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفت.

اولین گزارش انتقال ژن به گیاه با استفاده از پلاسمید Ti توسط Herrera-Estrella و در سال ۱۹۸۳ گزارش شد. دانشمندان با استفاده از پتانسیل T-DNA و توانایی این قطعه برای ورود به ژنوم گیاهی، پلاسمیدهایی را طراحی کرده که حاوی ژن مورد نظرشان بوده و انتقال ژن را به گیاه انجام می‌دهند.

**ب) انتقال ژن به روش مستقیم:**

در واقع انتقال ژن مستقیم روشی است که در آن سلول‌های میزبان بدون کمک میزبان واسطه DNA خارجی را دریافت می کنند. این روش‌ها در راستای انتقال ژن به گیاهانی که حساسیت کمتری نسبت به آلودگی از طریق آگروباکتریوم از خود نشان می دهند، توسعه یافته‌اند. غلات، بعنوان عمده ترین محصولات زراعی جزء این گروه از گیاهان می‌باشند.

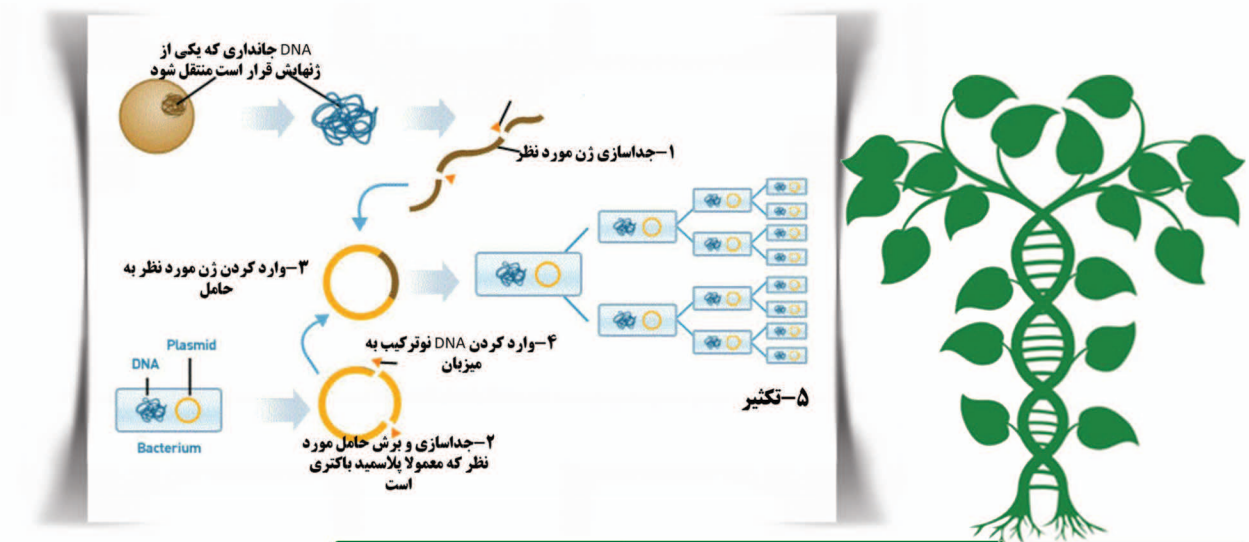
در انتقال ژن مستقیم DNA خارجی از طریق تکنیک‌های مختلف فیزیکی به درون پروتوپلاست سلولی انتقال داده می‌شود. موارد زیر از جمله این روش‌ها می‌باشند

- انتقال ژن به روش بمباران ذره ای
- انتقال ژن به روش الکتروپوریشن
- انتقال ژن به روش ریز تزریقی و درشت تزریقی
- انتقال ژن به روش لیپوزوم
- انتقال ژن با استفاده از پلی کاتیون ها

۱ . Agrobacterium tumefaciens
۲ . Tumor inducing Plasmid
۳ . Transfer DNA

مراحل انتقال ژن به گیاه و تولید گیاه تراریخته به شرح زیر می‌باشد.

۱.انتخاب و جداسازی ژن مورد نظر
۲.انتخاب حامل[۱] مناسب و برش دادن آن جهت وارد کردن ژن مورد نظر
۳.وارد کردن ژن مورد نظر به حامل
۴.انتقال حامل حاوی ژن مورد نظر به سلول میزبان مناسب
۵.تکثیر ژن در میزبان
۶.انتقال حامل ژن به سلول یا بافت هدف (گیاه)
۷.فراهم نمودن شرایط باززایی سلول‌های دریافت کننده ژن و تولید گیاه کامل از آنها




شکل ۳–۱۴ : مراحل تکثیر ژن منتخب جهت انتقال به گیاه با استفاده از باکتری

۱ Vector

شکل ۳ –۱۵ : انتقال ژن خارجی به سلول گیاهی و باززایی گیاه کامل از سلول‌های هدف

درحالیکه داروهای مهندسی شده ژنتیکی به طور گسترده مورد قبول واقع شده‌اند اما محصولات کشاورزی که با روشی مشابه به وجود آمده‌اند چنین مقبولیتی به دست نیاورده‌اند. یکی از دلایل این امر این است که محصولات حاصل از این فناوری در کشاورزی به عنوان غذا و یا فرآورده غذایی مستقیما به مصرف انسان و یا دام می‌رسند. از طرف دیگر تولید محصول کشاورزی حاصل از مهندسی ژنتیک مستلزم کشت در مزارع و رهاسازی در طبیعت است، اتفاقی که در تولید محصولات صنعتی و پزشکی رخ نمی‌دهد.

به عبارت دیگر هرچند این تکنولوژی تا حد زیادی ایرادات روش‌های کلاسیک مانند نیاز به تلاقی‌های متوالی و یا ناسازگاری بین گونه‌ای را برطرف نمود و طی ۳۵ سال گذشته منجر به معرفی ارقام زراعی جدید در برخی گیاهان شده است، اما مانند بسیاری از فناوری‌ها این علم نیز مخاطراتی به همراه داشته که باعث شده بسیاری از کشورهای جهان قوانین سختی را در رابطه با موجودات تراریخته وضع نمایند. ساختار قوانین وضع شده نشان‌دهنده ریسک‌های حاصل از رهاسازی موجودات تراریخته برای محیط زیست و سلامت انسان و حیوانات بوده و این قوانین باعث ایجاد محدودیت‌هایی برای مصرف این موجودات شده است.

به طور مثال ممکن است یک محصول تراریخته طبق قانون قابل استفاده برای تغذیه دام باشد اما اجازه استفاده آن برای انسان داده نشده باشد (مانند ذرت Star Link TM در آمریکا). در بسیاری از کشورها از جمله ژاپن،

استرالیا، نیوزلند، تایلند، چین و اتحادیه اروپا به منظور حمایت از حق انتخاب مصرف کننده، نه تنها موجودات تراریخته مانند محصولات کشاورزی، بلکه مواد حاوی موجودات تراریخته همچون غذاها نیز بایستی دارای نشان مخصوص باشند. کمسیون اروپا آستانه یک محصول غیر تراریخته را ۰/۹ درصد دانسته و محصولاتی با بیش از ۱ درصد مواد تراریخته مجبور به استفاده از نشان مخصوص می باشند.

از بین رفتن ارقام بومی و رخ دادن فرسایش ژنتیکی، فرار ژنی از طریق تلاقی های صورت گرفته در طبیعت بین گیاهان تراریخته و علف‌های هرز، افزایش مصرف علف‌کش‌ها (با تولید گیاهان مقاوم به علف‌کش)، ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل حضور ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در گیاهان تراریخته، آلرژی‌زا بودن گیاهان تراریخته برای موجودات مختلف به ویژه انسان، خطرات زیست محیطی ... جزء مخاطرات این محصولات محسوب می‌شوند.

به دلیل چنین مخاطراتی است که بعد از انتقال ژن به یک گیاه زراعی، جهت رهاسازی و تجاری نمودن آن لازم است تا مطالعات ایمنی زیستی فراوانی روی آن انجام گردد، مطالعاتی که چندین سال به طول انجامیده و ضمن زمان‌بر بودن هزینه زیادی را نیز در بر دارد.

طی چند سال اخیر تلاش‌های زیادی جهت معرفی تکنیک‌های جدیدی که تا حدی معایب انتقال ژن به روش کلاسیک را پوشش می‌دهند ایجاد شده‌اند. یکی از این فناوری‌ها، فناوری ویرایش ژن[۱] به ویژه تکنیک کریسپر[۲] می‌باشد که در بخش ۱-۵-۷ نیز به آن پرداخته شد.

از آنجا که ایجاد تغییر ژنتیکی در گیاهان با روش کریسپر بدون انتقال DNA خارجی انجام می‌شود گیاه حاصل به عنوان یک گیاه غیرتراریخته مطرح می‌باشد. کمپانی سیبوس[۳] اولین گیاه زراعی حاصل از این تکنولوژی را، که یک رقم کلزا به نام SU Canola ™ می‌باشد، در سال ۲۰۱۶ ثبت نموده است.

اگر چه این روش تا حدودی ساده‌تر و سریع‌تر از تولید گیاهان تراریخته است ولی مخاطراتی دارد که باید بدقت مورد بررسی قرار گیرد. یکی دیگر از جدیدترین تکنولوژی‌های ایجاد شده جهت به کار بردن مزایای مهندسی ژنتیک و حذف مخاطرات آن، انتقال مستقیم RNA مورد نظر به گیاهان مزرعه و بروز یک ویژگی مقطعی در آنها می‌باشد. برای دستیابی به این هدف (انتقال مستقیم RNA به گیاه)، مشکلاتی نظیر هزینه‌ی بالای تولید RNA و ناپایداری RNA های تولید شده وجود داشت که در چند سال اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای رفع این مشکلات انجام شده است. بر طبق گزارش ۲۰۱۷ مجله نیچر، محققان استرالیایی دانشگاه‌های Queensland وSurrey موفق به ابداع روش جدیدی برای حفاظت از گیاهان در مقابل ویروس‌ها با رفع

۱ . Gene Editing
۲ . CRISPR
۳ . Cibus

مشکلات انتقال مستقیم RNA شدند. بر این اساس این روش می‌تواند جایگزین مناسبی برای استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی و گیاهان تغییر یافته ژنتیکی باشد.

محصول تولید شده با این تکنولوژی، یک اسپری غیر سمی و تجزیه‌پذیر بر پایه نانوتکنولوژی می‌باشد که به مقاومت گیاهان در مقابل آفات و بیماری‌ها کمک می‌کند. این اسپری با نام رس زیستی بدون ایجاد هیچگونه تغییر در ساختار DNA گیاه، منجر به غیرفعال کردن ژن‌های خاصی در گیاهان و در نتیجه ایجاد مقاومت در آن‌ها می‌شود. این محصول به صورت پودر قابل حل در آب و مقاوم در برابر شستشو بوده که به سادگی بر روی گیاهان اسپری می‌شود و مقدار کمی از RNA را روزانه و برای مدت طولانی (۶-۸ هفته) آزاد می‌کند.

این روش تاکنون با تولید dsRNA های اختصاصی بر علیه دو بیماری ویروسی، موزاییک خیار (CMV) و موزائیک تنباکو (PMMoV)، آزمایش شده و بر اساس نتایج به دست آمده این رس زیستی[۱] قادر است در حداقل ۲۰ روز پس از استفاده، مقاومت در برابر بیماری را از خود نشان دهد.

### ۳-۲-۳- نشانگرهای مولکولی

نشانگر ژنتیکی عبارت است از بخشی از توالی نوکلئوتیدهای DNA که دارای توارث مندلی بوده و با یک صفت یا ویژگی مشخص پیوستگی دارد. در نتیجه میتوان آن را برای شناسایی افراد یا گونه‌ها به کار برد.

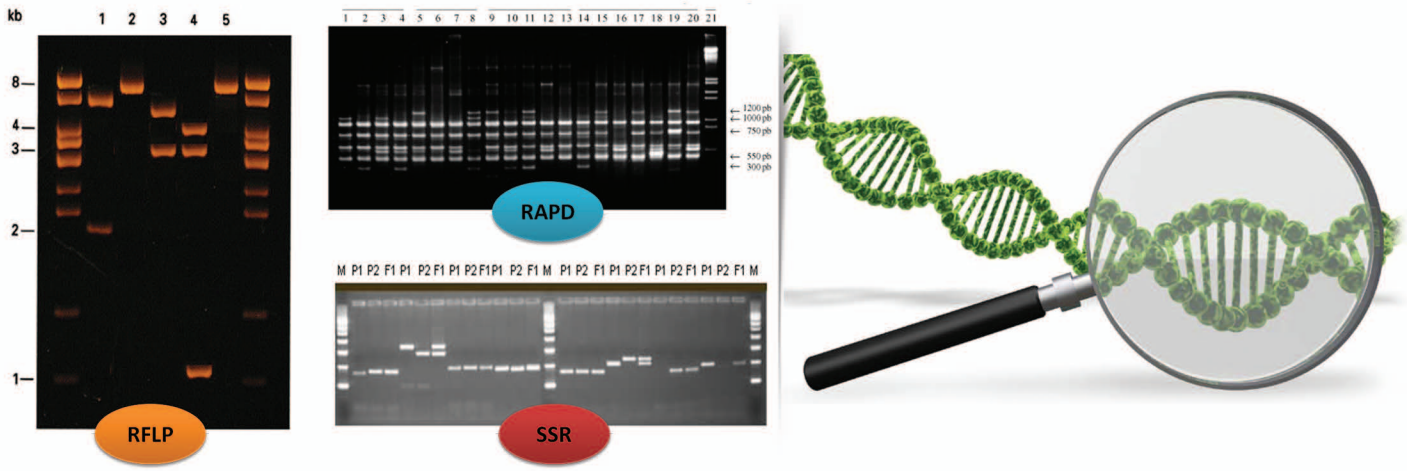
خصوصیات مورفولوژیکی از جمله اولین نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده در شناسایی افراد و ارزیابی تنوع درون و بین جمعیت ها به‌شمار می آیند که امروزه نیز اهمیت خود را حفظ کرده اند. هرچند ارزیابی این نشانگرها معمولا کم هزینه و آسان است. اما عوامل نامطلوب متعددی استفاده از این نشانگرها را محدود کرده است. اولین عامل وابستگی بالای این صفات به شرایط محیطی است. علاوه بر شرایط محیطی تظاهر این نشانگرها به‌وسیله‌ی برهم‌کنش های ناشی از اپیستازی[۲] و پلیوتروپی[۳] تغییر کرده و در مورد صفات کمی نیز به‌وسیله ژن های متعددی کنترل می شوند. تعداد نشانگرهای مورفولوژیکی خصوصا در تلاقی های بین گونه ای بسیار محدود است. در این حالت با توجه به این‌که رابطه آللی عمدتا از نوع غالب و مغلوب است، تشخیص افراد هموزیگوس و هتروزیگوس غیر ممکن است. علاوه بر این به علت اثر پلیوتروپی ژنی برخی از نشانگرهای مورفولوژیکی می توانند سایر نشانگرها و یا صفات مطلوب دیگر را در برنامه های اصلاحی تحت تاثیر قرار دهند. یکی دیگر از ایرادات این نشانگرها این است که بروز برخی از آنها زمان‌بر بوده و بررسی آن نیاز به طی نمودن مراحل مختلف نموی گیاه می‌باشد. نهایتا انجام آزمایشات اصلاحی به کمک این نشانگرها زمان بر

۱. Bioclay
۲. Epistazi
۳. Pleiotropy

بوده و نیازمند نیروی کار زیاد، جمعیت های بزرگ گیاهی و نیز فضای زیاد (زمین و یا گلخانه) به منظور پرورش آن‌ها است.
محدودیت این نشانگرها موجب گرایش به نژادگران به سمت نشانگرهای مولکولی گردیده است که از مهم ترین آنها نشانگرهای پروتئین و نشانگرهای DNA می باشند.
در دهه ۱۹۵۰، نشانگرهای مولکولی قابل مشاهده توسط الکتروفورز پروتئین ها تحول شگرفی را ایجاد نمودند. معمول‌ترین نوع نشانگرهای پروتئینی آیزوزایم ها هستند که فرم های مختلف یک آنزیم را نشان می دهند. نشانگرهای پروتئینی تغییرات را در سطح ردیف و عمل ژن به صورت نشانگرهای همبارز نشان می دهند.
از معایب این نشانگرها محدود بودن آنهاست. همچنین این نوع نشانگرها تحت تأثیر تغییرات پس از ترجمه هستند و تظاهر کمی برخی از آنزیم ها و پروتئین ها تحت تأثیر مراحل رشد گیاه قرار می گیرد. با توجه به اینکه روش های رنگ آمیزی پروتئین ها در مورد ایزوزایم های چندان زیاد نیست، تعداد ایزوزایم های قابل ثبت و مشاهده که می توان از آنها به عنوان نشانگر استفاده کرد، به یکصد عدد هم نمی رسد.
از نکات منفی دیگر این نشانگرها، محدودیت تنوع ژنتیک قابل ثبت در آیزوزایم هاست. به عبارت دیگر آیزوزایم ها نه تنها کم هستند، بلکه چند شکلی و تفاوت قابل ثبت نیز در آنها چندان زیاد نیست.
اما امروزه واژه نشانگرهای مولکولی بیشتر با نشانگرهایDNA مترادف می‌باشد. انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی DNA تا به امروز معرفی شده‌اند و دقیق ترین ابزار را برای بررسی ساختار ژنتیکی موجودات فراهم نموده‌اند. وجود ویژگی‌هایی همچون ثبات و استقلال از شرایط محیطی و فصلی، قابل ردیابی و بررسی بودن در تمام بافت‌ها و مراحل نموی، هم بارز بودن بیشتر آنها، عدم بروز اپیستازی، درجه بالایی از پلی مورفیسم، عدم بروز اثرات پلیوتروپیک و فراوانی زیاد باعث شده که نشانگرها DNA بیشتر مورد استفاده قرار گیرند. به دلیل نقش موثر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR در تکامل نشانگرهای DNA این نشانگرها را به دو گروه عمده نشانگرهای مبتنی بر کاربرد PCR و غیر مبتنی بر PCR تقسیم بندی می نمایند. از مهم ترین نشاگرهای DNA که بر پایه کاربرد PCR به وجود آمده اند میتوانAFLP[۵] ,SCAR[۴] ,DAF[۳] ,RAPD[۲] ,SSR[۱] را نام برد.
با توجه به تعداد روش های توسعه یافته بر مبنای PCR سوالی که مطرح می شود. این است که در یک پروژه از کدام نشانگر استفاده شود؟ برای پاسخ به این سوال باید عواملی مانند هدف از کاربرد نشانگر، دسترسی به نشانگر، سهولت کاربرد، تفسیر نتایج، تکرار پذیری، عدم استفاده از مواد خطرناک مانند رادیو اکتیو، هزینه

۱. Simple Sequence Repeats
۲. Random Amplified Polymorphic DNA
۳. DNA Amplification Fingerprint
۴. Sequence Characterised Amplification Regions
۵. Amplified Fragment Length Polymorphism

کاربرد نـشانگر و زمان مورد نیاز جهت آنالیز در انتخاب نوع نشانگر مورد توجه قرارگیرد. بدیهی است که هر نـشانگر دارای مزایا و معایبی است و بنابراین بایستی هر سیستم نشانگری را قبل از استفاده ارزیابی نمود.




شکل ۳ – ۱۶ : نمونه ای از نتایج نشانگرهای مولکولی مختلف

نشانگرهای مولکولی در حوزه کشاورزی نیز کاربرد فراوان دارند و در ادامه تعدادی از کاربردهای نشانگرها آورده شده است

**الف) تهیه نقشه ژنتیکی:**

یکـی از اجـزای زیربـنایی برای مـطالعات ژنتیـکی در برنامـه‌های اصـلاحی، نقشـه‌های ژنتیـکی است که بر اسـاس آن می‌توان جـایگاه ژنی و کـروموزومی ژن‌های تعیین کننده صفات مطلوب (ترتیب و فاصله ژن‌ها و نشانگرها از یکدیگر بر روی کـروموزوم‌ها) را مکان‌یابی کرد. در نتیجه با دانستن جایگاه ژن روی نقشه ژنتیکی نیازی به انتظار برای ظهور آثار ژن نیست.

### ب) گزینش به کمک نشانگرها:

امروزه ردیابی صفات مطلوب و گزینش به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS)[1] از طریق تعیین پیوستگی (لینکاژ) آنها با صفات مهم زراعی (کمی و کیفی) امکان‌پذیر شده است. این موضوع، امکان گزینش سریع و دقیق ژنوتیپ¬های مطلوب را در مراحل اولیه رشد فراهم کرده و طول دوره بهنژادی را کوتاه می‌نماید. این مقوله به خصوص طی سال‌های اخیر به شدت مورد توجه قرار گرفته است و موفقیت‌های زیادی از قبیل تشخیص گیاهان مقاوم به یک آفت یا بیماری که در برنامه‌های بهنژادی و اجرای مقررات قرنطینه نباتی اهمیت دارند، به دست آمده است. این جنبه کاربردی در گیاهان چندساله و به خصوص درختان که اغلب طول دوره جوانی در آنها زیاد می‌باشد، اهمیت بیشتری دارد و باعث افزایش دقت و صرفه جویی در زمان، نیروی کار، هزینه‌ها و امکانات مزرعه‌ای می‌شود.

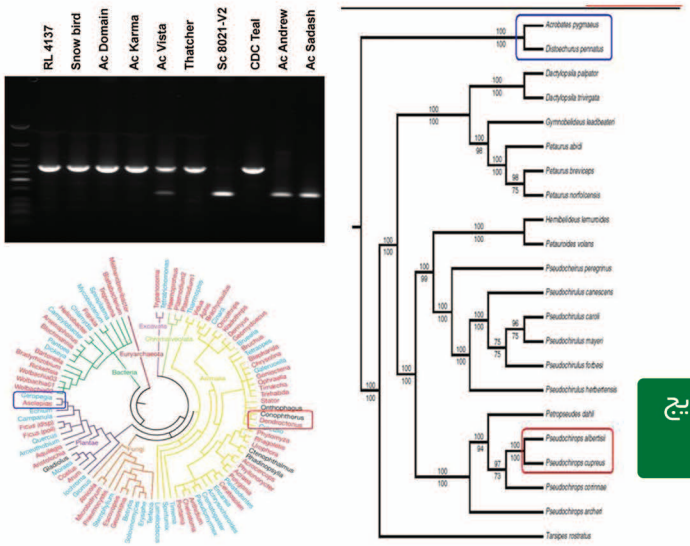
شناسه‌های مولکولی در گیاهان زراعی توسط انواع مختلف نشانگرهای مولکولی تهیه شده است. مثال‌هایی از پیوستگی نشانگرهای مولکولی بیوشیمیایی و DNA برای برخی از صفات مهم در گیاهان مختلف از قبیل گوجه فرنگی، گندم، ذرت، جو، سویا، نخودفرنگی و برنج که در انتخاب به کمک نشانگرها (MAS) قابل استفاده هستند وجود دارند. انتخاب به کمک نشانگرها به خصوص برای شناسایی صفات کمی و مقاومت گیاهان به آفات و بیماری‌ها سودمند می‌باشد. اگرچه روش¬های مرسوم (سنتی) برای ارزیابی مقاومت به آفات و بیماری‌ها توانسته‌اند نتایج بسیار خوبی ارائه دهند ولی اغلب به هزینه و زمان زیاد نیاز دارند.

تشخیص و انتخاب تلاقی‌های موفق دورگ نسل اول کاربرد دیگری است که به کمک برنامه‌های اصلاحی کشاورزی آمده است.

### ج) بررسی تنوع ژنتیکی:

به سبب از دست رفتن بسیاری از ژن‌های مفید، کاهش ذخایر ژنتیکی در اثر قرار گرفتن در شرایط محیطی نامناسب، آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی اهمیت زیادی دارد. این امر اهمیت بسیار زیادی در گیاهان چوبی در مقایسه با دیگر گیاهان به سبب دوره نسل طولانی، بزرگی اندازه درخت و سیستم تکثیر رویشی دارد. از بین نشانگرها، ریزماهواره‌ها به خاطر میزان بالای چندشکلی، وراثت هم‌بارز و تکرارپذیری بالا مناسب‌ترین سیستم نشانگر انتخابی می‌باشد. همچنین بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان به مدیریت گیاهان وحشی برای حفظ گونه‌های نادر و در حال نابودی و کنترل بیماری‌ها در اصلاح برای تولید گیاهان با مقاومت پایدار به کار می‌رود.

۱. Markers Assisted Selection




شکل ۳- ۱۷ : نمونه ای از درخت فیلوژنتیک حاصل از نتایج نشانگرهای مولکولی مختلف

**د) همسانه‌سازی بر پایه نقشه:**

این عمل به ژنتیک معکوس نیز معروف است که نیاز به دانستن جایگاه ژن روی کروموزوم است. مراحل آن به ترتیب، شناسایی نشانگرهای دو سمت ژن، اشباع کردن فاصله نشانگر تا ژن با دیگر نشانگرها، تهیه نقشه فیزیکی، کروموزوم پیمایی و شناسایی ژن هدف از بین ژن‌های کاندیدای همسانه انتخاب شده می‌باشد.

**ه) هرم بندی ژن‌ها:**

انتقال بیش از یک ژن به رقم مطلوب برای کنترل صفتی خاص، هرم‌بندی نام دارد. این کار در مورد انتقال مقاومت¬های جداگانه در برابر آفات و بیماری‌ها به منظور ایجاد مقاومت‌های پایدار در رقم اهمیت دارد.

**و) مدیریت بانک‌های ژن:**

به صورت تخمین میزان همپوشانی ژن‌های یک بانک با ژن‌های موجود در طبیعت و کاهش احتمال ورود نمونه‌های تکراری در بانک ژن

**ز) قرنطینه‌های گیاهی:**

در صورت دسترسی به آغازگرهای ویژه هر یک از عوامل بیماری‌زا به راحتی می‌توان به وجود آلودگی حتی در مقدار بسیار کم را نشان داد.

## ۳-۳- کاربردهای زیست فناوری در دامپروری

ژنتیک کمی در طی دوران متوالی دو دهه اخیر شگفتی‌های بسیاری آفرید که حاصل همکاری دو علم ژنتیک مولکولی و آمار ریاضی بوده است. در طی ۲۵-۲۰ سال اخیر با توسعه مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، بیوتکنولوژی مدرن توانست پیشرفت‌های بسیاری در علم بیولوژی ایجاد کند که بخشی از این تکنیک‌ها را می‌توان در توسعه صنعت دامپروری مشاهده کرد. تکنیک‌های بیولوژی مدرن مانند کلونینگ مولکولی ژن‌ها، انتقال ژن، دستکاری ژنتیکی حیوانات، انتقال جنین، دستکاری ژنتیکی میکروب‌های شکمبه، تیمار بیولوژیکی و شیمیایی خوراک‌های کم کیفیت حیوانی در جهت بهبود ارزش تغذیه‌ای، روش‌های افزایش سیستم ایمنی و تهیه واکسن‌های دامپزشکی بخشی از کاربردهای بیوتکنولوژی می‌باشد که در جهت افزایش تولید محصولات کشاورزی و حفاظت از محیط زیست بکار گرفته می‌شوند. در این بخش کاربردهای زیست فناوری که در پیشرفت ژنتیکی حیوانات اهلی نقش داشته و در کشورهای در حال توسعه بکار گرفته می‌شود آورده می‌شود.

### ۳-۳-۱- تلقیح مصنوعی

تکنیک تلقیح مصنوعی به طور گسترده و در مقیاس اقتصادی در گله‌های گاو شیری مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش اسپرم گاوهای نر ممتاز جمع‌آوری شده و پس از انجام یک سری فرایندها منجمد شده و به محل‌های تلقیح فرستاده می‌شود و گاوهای ماده فحل با این اسپرم‌ها تلقیح می‌گردند. تلقیح مصنوعی، آزمون نتاج گاوهای نر را در سطح وسیعی امکان‌پذیر می‌سازد و دام‌هایی که ارزش ژنتیکی بالاتری دارند با آزمون نتاج تشخیص داده می‌شود و با استفاده از تلقیح مصنوعی به‌کارگیری این مولدین در برنامه‌های اصلاح نژادی و تولیدی تسهیل می‌گردد. در برخی کشورها مانند دانمارک و هلند تلقیح مصنوعی به طور ۱۰۰٪ انجام می‌پذیرد در حالی که برخی از کشورها هم هنوز دنباله‌رو تلاقی‌های سنتی و طبیعی می‌باشند.

شکل ۳ -۱۷ : تلقیح مصنوعی گاو ماده با اسپرم گاوهای نر ممتاز

### ۳-۳-۲- انتقال جنین

در این تکنیک تخمک‌های بارور شده از رحم گاو دهنده جدا شده و به رحم گاوهای گیرنده منتقل می‌گردد و گاوهای دهنده مجدداً جهت تولید تخمک‌های بارور بکار گرفته می‌شوند. مزیت اصلی انتقال جنین در این است که بر خلاف شـرایط طبیعی تعداد بیشتری گوساله از گاوهای ماده ممتاز تولید می‌شود هر گاو در طول حیات خود در حدود ۵۷۰۰۰ تخمک در تخمدان¬های خود به صورت بالقوه ذخیره دارد. که به مـرور زمان تعدادی از آنها در چرخه‌های تولیدمثلی مورد استفاده قرار می‌گیرند. انتقال جنین باعث افزایش میزان تولید مـثل گاو می‌شود و در این حـالت گاوهای ممتاز از لحاظ ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی بیشتری شرکت می‌کند.

### ۳-۳-۳- تولید جنین‌های لقاح خارج رحمی

در این روش تخمک‌های بالغ از حیوانات زنده و یا حیوانات کشتار شده جمع آوری می‌گردند و سپس در آزمایشگاه به اندازه کافـی بالغ شده و با تلقیح بارور می‌گردند و تا یک مرحله ویژه‌ای کشت داده شده و سپس به حیوانات گیرنده انتقال داده می‌شوند. در این صـورت می‌توان از دام‌های ماده با ارزش تعداد بیشتری جنین به دست آورد که این تکنیک تا حدودی مشابه به انتقال جنین است با این تفاوت که مراحلی از حیات جنـین در آزمایشگاه سپری می‌گردد. که این دو تکنیک در واقع اساس استفاده بیشتر از حیوانات ماده در برنامه‌های اصلاحی و تولیدی می‌باشند.

### ۳-۳-۴- تعیین جنسیت

برای حصول بیشترین سود در تولید نیاز به تعیین جنسیت جنین (بخصوص در مورد گاو و اسـب‌های مسابقه) اسـت روش‌های مخـتلفی برای تعیین جنسیت جنین بکار رفته گرفته می‌شود. یکی از این روش‌ها که به طور مستقیم کاربرد پیدا کرده است سیـتوژنتیک است در این تکنیک سلول‌های جنین از طریق بیوپسی نمونه برداری می‌گردند و پس از کشـت سلـول‌ها، کروموزوم‌های آنها اسـتخراج می‌گردد و جنسیت جـنین مشخص می‌شود. روش دوم بر اساس استفاده از اسـپرم اسـتوار است که با روش فلوسایتومتری[۱] اسپرم‌ها به دو منطقه مخـصوص X و Y تقسیم می‌گردند که مشـخص کننده جنسـیت می‌باشند. در روش سوم جنـسیت جنـین برخی از گـونه‌ها با کاوشگرهای مخصوص DNA موجود در کرومـوزوم Y مشخـص می‌گردند. که ژن ZFY که عامل رشد بیـضه است یکی از ژن‌های کاندیدا می‌باشد. در طیـور هم ژن‌های مـشابهی جهت این منظور وجود دارد. در پـستانداران کرومـوزوم y تعیین کننده جنسیت می‌باشـد و از ژن‌هایی که فـقط بر روی کرومـوزوم Y قرار گرفـته باشند می‌توان برای تعیـین جنسـیت اسـتفاده کرد. که برای این منـظور نمـونه برداری‌های بسـیار کوچـک

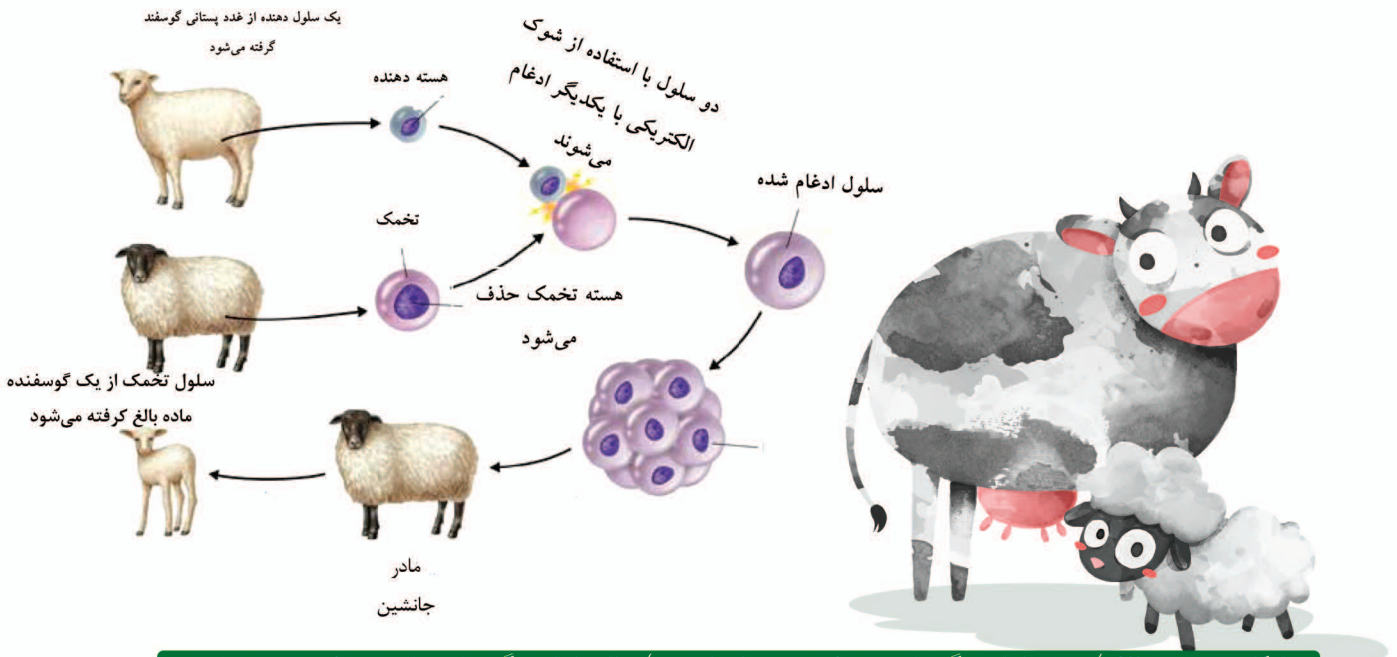
۱. Flowcytometry

کافی خواهد بود. استفاده از روش PCR که مـی‌توان با اسـتـفاده از آن قسمت‌های مختلفی از DNA را تکثیر کرد تعیین جنسیـت را بسیار آسان ساخته است.

شکل ۳ -۱۸ : تولید جنین خارج از بدن حیوان با تلقیح مصنوعی

### ۳-۳-۵- شبیه‌سازی

اولین مورد از کلونینـگ مهره‌داران در سال ۱۹۲۵ در قورباغه گزارش شده است و در حیوانات اهلی برای اولین بار ۱۵ سال قبل در گوسفند انجام گرفت که این بره Dally لقب گرفـت ولی به علت مشکلات مانند پیری زودرس و اختلالات رفتاری که در این گوسفند مشاهده گردید به زندگی این حیوان پس از ۷ سال پایان داده شد. اخیراً دانشمندان ایرانی نیز موفق شدند که بره شبیه‌سازی شـده از اسـپرم گوسـفند برولا مرینـوس (حاوی ژن دوقلوزایی) و قدرت مادری گوسفند افشاری تولید کنند.




شکل ۳ – ۲۰: الف) بنیانا اولین گاو شبیه‌سازی شده ایران ب) دالی اولین گوسفند شبیه‌سازی شده جهان

### ۳-۳-۶- کنترل بیماری‌ها

پیشرفت‌های اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی روش‌هایی را برای کنترل بیماری در گاوهای شیری به ارمغان آورده است ولی برای به دست آوردن روش‌های جدید و قدرتمند در کنترل بیماری‌ها، بیوتکنولوژی مدرن در ابتدای راه است. متدهای جدید و قدرتمند در کنترل بیماری که بر اساس PCR استوار شده است بسیار سریع و علمی می‌باشند که برای این منظور دو مرحله کلیدی وجود دارد: ۱(باید بتوان یک نقطه خاصی از DNA مربوط به عامل بیماری‌زا را که قابلیت تکثیر داشته باشد انتخاب کرد. ۲) روش‌های نوین و مناسبی برای استخراج مقادیر کافی از موجودات بیماری‌زا را از مدفوع و زخم‌های بافتی میزبان بکار گرفت تا بتوان در روشCR استفاده کرد. تولید واکسن بر علیه بیماری‌های دامی با استفاده از تکنیک‌های زیست‌فناوری از دیگر کاربردهای این علم در دامپروری می‌باشد.

## ۳-۴- کاربردهای زیست فناوری در گیاه‌پزشکی

گیاه پزشکی از دیگر بخش های کشاورزی است که طی چند سال گذشته زیست فناوری در پیشرفت آن نقش ایفا کرده است. در ادامه به بخشی از این کاربردها اشاره می شود.

### ۳-۴-۱- شناسایی عوامل بیماری‌زای گیاهی

عوامل بیماری‌زای گیاهی شامل باکتری ها، قارچ ها و ویروس ها سالانه در مزارع مختلف بین ۳۰ تا ۱۰۰ درصد خسارت وارد می کنند و این آمار به طور واضح نمایانگر اهمیت آنها در کشاورزی و لزوم مبارزه با آنها را نشان می‌دهد. شناسایی عوامل بیماری‌زا در مراحل اولیه گسترش عامل بیماری امری بسیار حیاتی در مدیریت کنترل بیماری‌های گیاهی می‌باشد. بسیاری از عوامل بیماری‌زا را می‌توان با روش‌های معمول مورفولوژیک گیاهی و سیستماتیک قارچها و باکتری‌ها و یا تست‌های بیوشیمیایی به عنوان روش معمول در شناسایی و مکانیسم عمل پاتوژن های گیاهی شناسایی کرد. بسیاری از عوامل بیماری‌زا از این طریق به سختی قابل شناسایی بوده و از طرفی وقت‌گیر می‌باشد. با پیشرفت تکنولوژی‌های جدید در ۱۵ سال اخیر در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک روش‌های شناسایی جدید برای شناسایی و تشخیص عوامل بیماری‌زای گیاهی به وجود آمده است. آنتی‌بادی‌های منو و پلی کلونال،ELIZA و تکنولوژی‌هایی بر پایه RNA و DNA مثل PCR در شناسایی فیلوژنتیکی و مکانیسم عمل کاربرد وسیعی پیدا کرده‌اند. ژنومیکس و بیوسیستماتیک مولکولی علومی می‌باشند که اطلاعات بسیار جامعی در خصوص عوامل بیماری‌زا به محققین می‌دهد و در کنار آن شناسایی به طور دقیق‌تری انجام می‌گیرد. در حال حاضر علاوه بر روش‌های معمول شناسایی مولکولی روش‌های مولتی پلکسینگ[۱] (شناسایی چند عامل بیماری‌زا در یک آزمایش) در دنیا استفاده می‌شوند که سرعت شناسایی را بسیار بالا برده است. از روش‌های جدید استفاده از توالی ژن‌های ریبوزومی، SNP، ریزآرایه‌ها[۲] ، میکروچیپ‌ها ، فیلوژنومیکس و فانکشنال فیلوژنومیکس[۳] می‌باشند که در حال توسعه بوده و میزان استفاده از آنها روزبه‌روز در حال گسترش می باشد.

### ۳-۴-۲- حشره کش های بیولوژیک

پاتوژن های حشرات که همان میکروب های کنترل کننده آفات کشاورزی می باشند از سال ۱۹۲۰ تاکنون شناسایی و جداسازی شده اند ولی تولید تجاری آنها تقریباً از ۳۰ سال قبل شروع شده است. در حال حاضر صدها نوع حشره کش بیولوژیک در شرکت های مختلف تولیدی بر علیه حشرات مختلف تولید می‌شود.

۱ . Multiplexing
۲ . Microarray
۳ Micro chip

سموم شیمیایی مورد استفاده در دنیا غیر اختصاصی عمل کرده و برای محیط زیست خطر آفرین می باشند و از طرفی تاکنون تعداد زیادی از گونه‌های حشرات به آنها مقاومت نشان داده‌اند. این در حالی است که میکروب‌های پاتوژن حشرات اختصاصی عمل کرده، در محیط سریعاً تجزیه شده و در نتیجه برای انسان و حشرات مفید، ایمن می‌باشند، از طرفی آفات به آنها مقاومت نشان نمی‌دهند. لذا از ۳۰ سال قبل دیدگاه عمومی بشر موافق استفاده از این عوامل میکروبی در قالب برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات بوده و هست. در حال حاضر حدود ۲ درصد از کل سموم حشره‌کش تولیدی در دنیا از نوع Bacillus thuringiensis و باکالوویروس‌ها می‌باشند که ۹۰ درصد سموم بیولوژیک تولیدی در را شامل می‌شود. برای مثال در سال ۲۰۰۵ فروش جهانی سموم Bt حدود ۲۰۰ میلیون دلار بوده است و میزان تولید آن نیز حدود ۵ میلیون کیلوگرم بوده است.
از مهمترین دلایل کم بودن میزان تولید سموم حشره‌کش بیولوژیک در دنیا، کند بودن قدرت کنترل توسط این عوامل می‌باشد. لذا در دنیا در حال حاضر به دنبال یافتن جدایه‌ها و یا اصلاح آنها از طریق روش های موتاسیون‌زایی، امتزاج پروتوپلاست و از همه مهمتر از طریق مهندسی ژنتیک می‌باشند. در چند سال اخیر تعداد زیادی سویه‌های پاتوژن حشرات اصلاح شده از طریق مهندسی ژنتیک ایجاد و تولید شده‌اند. متاسفانه در ایران درزمینه پاتوژن‌های حشرات اقدامات کامل صورت نگرفته است. هرچند چندین طرح و پروژه در زمینه جداسازی و شناسایی این عوامل در مراکز تحقیقاتی در جریان می‌باشند ولی در زمینه اصلاح و تولید تجاری گام‌های کوتاهی برداشته شده است. لذا از اولویت‌های مهم در بخش بیوتکنولوژی میکروبی و کنترل بیولوژیک در کشور در مرحله اول تجاری سازی سویه‌های موثر و در مرحله دوم اصلاح آنها از طریق مهندسی ژنتیک می‌باشد.

پاتوژن های مهمی که در دنیا به طور تجاری مورد استفاده قرارگرفته‌اند به شرح زیر می‌باشند:

- ویروس‌های حشرات (باکولوویروس ها) شامل گرانولو ویروس ها NPV
- باکتری‌ها Bacillus popilliae و Bacillus sphericus و Bacillus thuringiensis
- قارچ‌ها Beauveria, Metarhizium, Paecilomyces, Nomuraea
- نماتدها Nosema, Thelohania, Vairimorpha
- پروتوزوا و میکروسپورودیا

### ۳-۴-۳- عوامل کنترل‌کننده بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز

از حدود ۵۰ سال قبل اثر کنترل‌کنندگی بسیاری از میکروب‌ها شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها بر عوامل بیماری‌زای اندام های هوایی و زمینی گیاهی مشخص شده است و در سال‌های اخیر صدها نوع فرمولاسیون با علامت‌های تجاری مختلف برای کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زای گیاهی مختلف در دنیا تولید شده است. روزبه‌روز هم بر این تعداد افزوده می‌شود.

از باکتری‌هایی که قدرت کنترل کنندگی عوامل بیماری‌زای گیاهی را دارند و به طور گسترده نیز استفاده می‌شوند می‌توان به Bacillus spp، Fluorescent pseudomonads، Streptomyces. اشاره نمود. مکانیسم عمل آنها از طریق رقابت برای غذا، تولید آنتی بیوتیک، تولید سیدروفور و القای مقاومت در گیاه از طریق محرک های رشد می‌باشد.

مهمترین عوامل کنترل کننده مورد استفاده در کنترل بیولوژیک بیماری‌ها، قارچ‌ها می‌باشند و فرمولاسیون‌های متعددی از آنها در بازار جهانی موجود می‌باشد. اهمیت قارچ‌ها در کنترل عوامل بیماری‌زا به دلیل کوتاه بودن دوره رشد و سریع بودن رشد آنها و از طرفی اختصاصیت آنها در کنترل بیماری‌ها می‌باشد.

از قارچ‌های مهم مورد استفاده می‌توان به "Trichoderma spp, Ampelomyces quisqualis, Coniothyrium minitans, Fusarium oxysporum" اشاره نمود که مهمترین آنها شش گونه Trichoderma می‌باشد و فرمولاسیون‌های متعددی از آن در بازار موجود می‌باشد.

## واژه‌نامه

- **آغازگر (Primer):** الیگونوکلئوتید تک‌رشته‌ای کوتاهی که هرگاه از طریق جفت کردن بازهایش به مولکول تک‌رشته‌ای الگو بچسبد به عنوان نقطه شروعی برای ساخته شدن رشته مکمل توسط DNA پلی‌مراز عمل می‌کند.
- **آگارز (Agarose):** آگارز یک پلیمر پلی ساکارید به صورت پودری سفید رنگ است که معمولاً از جلبک دریایی استخراج می شود. آگارز یکی از دو ماده اصلی تشکیل دهنده آگار است و از تخلیص آگار حاصل می شود.
- **آلژینات کلسیم (Calcium alginate):** نمک کلسیم اسید آلژینیک است که به عنوان تثبیت‌کننده و قوام‌دهنده از آن استفاده می‌شود. از واکنش آلژینات سدیم محلول با یون کلسیم، برای تشکیل ژل استفاده می¬شود.
- **آمیلاز(amylase):** آمیلاز آنزیمی است که نقش مهمی در هضم کربوهیدراتها دارد و باعث تجزیه زنجیره‌های پلی ساکارید مانند نشاسته به اجزای کوچکتر و دی ساکاریدهایی مانند مالتوز می‌شود.
- **آنتی اکسیدان (Antioxidant):** آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که باعث محافظت در برابر آسیب سلولی ناشی از مولکول‌هایی به نام رادیکال‌های آزاد می‌شوند.
- **آنتی بادی پلی کلونال (antibodies Polyclonal):** این آنتی بادی‌ها توسط کلون های متعددی از لنفوسیت های B تولید و به اپی توپ های گوناگون متصل می گردند. آنتی بادی های پلی کلونال از جهات مختلف از جمله از نظر ایزوتیپ، ایدیوتیپ، ویژگی و میل پیوندی (افینیتی) ناهمگن هستند.
- **آنتی بادي منوکلونال (Monoclonal antibodies ):** اگر يك كلون لنفوسيتی را كه از يك سلول مادر تكثير شده است جدا شود، آنتی بادیهای تولید شده توسط این سلول ها فقط يك اپيتوپ معين را در ملكول آنتی ژن شناسايی خواهند كرد. به اين نوع آنتی باديها اصطلاحاً آنتی باديهای منوكلونال گفته می شود.
- **آنتی سنس RNA (Anti-sense RNA):** مولکول RNA ای که مکمل معکوس یک mRNA طبیعی است و می‌توان از آن برای جلوگیری از ترجمه mRNA موردنظر در یک سلول ترانسفورم شده استفاده کرد.

## واژه‌نامه

- **آندوسیتوز(Endocytosis):** به بـردن مواد خـــارجی اعـــم از جامد یا مایع از طـــریق غشای یاخـــته به درون آن، درون‌بَری یا اندوسیتوز می‌گویند. درون‌بری فرایندی فعال و نیازمند انرژی است.
- **آنزیم‌های محدود کننده (Restriction enzymes):** اندونوکلئازهایی هســـتند که مـــولکول‌های DNA را تنـــها در تـــوالی‌های نوکلئوتیدی خاص می‌برند.
- **اپیستازي (Epistasis):** اپیستازی نمونه ای از تاثیر متقابل ژن است که درآن يك ژن بر روی فنوتیـــپ ژن غیرآللی دیگر تاثیر می‌گذارد. هر ژنی که اثر ژن غیرآلل دیگررا بپوشاند، نسبت به آن ژن اپی ستاتيك (epistatic) می باشد و ژنی که پوشانده می شود را هیپوستاتيك (hypostatic) می نامند.
- **اتوتروفت (Autotroph):** اتوتروف‌ها جاندارانی (تمام گیاهان و برخی اشکـال باکتری‌ها) هســـتند که با استـفاده از انرژی خورشید در طی فرآیند فتوسنتز، قادر به تولید غذای خود هستند و در زنجیره‌ی غذایی به عنوان تولید کننده ها شناخته می‌شوند.
- **اسپروفیت (Sporophyte):** اسپوروفیت به نســـلی از چرخه‌ی زندگی گیاهان گفـــته می‌شـــود که هـاگ (اسپور) تولید می‌کنند. اسپوروفیت‌ها بر خلاف گامتوفیت‌ها دیپلوئید هستند.
- **استرول (Sterol):** استرول‌ها (استروئید الکل) زیرگـــروهی از مولکول های ارگانیک هستند. کلسترول شناخته ترین نوع استرول هاست و یک پیش ماده ضروری برای ویتامین های محلول در چربی و هورمون های استروئیدی است.
- **اسکوالن (Squalene):** اسکوالن یک ایزوپرنوئید ۳۰ کـــربنه‌ی چـربی است و در مقـادیر فراوان درروغن کبد کوسـه یافت می شود. این ماده یک پیش ساز کلیدی در بیوسنتز کلسترول است.
- **اس ان پی (SNP، single-nucleotide polymorphism):** چند شکلی تک نوکلئوتیدی تفاوت در یک نوکلئـوتید نسبت به موقعیت مشابه آن در توالی DNA است.

## واژه‌نامه

- **الکتروپوریشن (Electroporation):** روشی برای افزایش جذب DNA (پلاسمید) توسط سلول از طریق اعمال ولتاژ بالا که موجب ایجاد سوراخ‌های ریز موقت در غشاء سلول می‌شود.
- **الکتروفورز (Electrophoresis):** تکنیکی است جهت جداسازی مولکول‌ها بر اساس نسبت بار به جرم آنها
- **انتقال ساودرن (Southern blot):** روشی برای انتقال نوارهای DNA از ژل آگارز به غشای نایلونی یا نیتروسلولزی
- **انتقال وسترن (Western blot):** روشی برای انتقال نوارهای پروتئینی از ژل آگارز به غشای پایه
- **باززائي (Regeneration) :** به تولید گیاه از پروتوپلاست، سلول‌های منفرد و یا از یک بافت گیاهی که دارای خاصیت پرتوانی است، باززایی می گویند. گیاه باززا شده کاملاً مشابه گیاهی است که سلول‌های آن در باززایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند.
- **بیوراکتور(Bioreactor):** راکتور زیستی می تواند هر گونه دستگاه مهندسی شده یا ساخته شده یا سیستمی باشد که یک محیط فعال از نظر زیستی را حمایت می کند. در یک مورد، یک بیوراکتور محیطی است که در آن یک فرآیند شیمیایی انجام می شود که ارگانیسم ها یا مواد فعال از نظر بیوشیمیایی را که از این ارگانیسم ها منشاء گرفته اند، در بر می گیرد. این فرآیند می تواند هوازی یا غیر هوازی باشد.
- **بیوسورفاکتانت (Biosurfactants):** بیوسورفکتانت ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم هاست که دارای دو بخش هیدوفوب (آب گریز) و هیدروفیل (آب دوست) هستند و کشش سطحی و بین سطحی بین مایعات را کاهش می‌دهند و با تشکیل میکرواملسیون، هیدروکربن‌های نامحلول را در خود حل کنند.
- **آبشویی زیستی یا بیولیچینگ (Bioleaching ):** فرآیندي است که در آن به کمک باکتري ها فلزاتي مانند مس، طلا و روي از سنگ معدن هاي با عیار پایین استخراج مي شود. این روش در مقایسه با استخراج فلزات با حرارت یا به صورت شیمیایی مطمئن ترین روش است. باکتری های خاصی که در این روش استفاده می شود، قادربه خوردن محتوای فلز از سنگ معدن هستند.
- **پروب هیبریداسیون (Hybridization probe):** مولکول اسید نوکلئیک نشان داری که می‌توان از آن برای شناسایی مولکول‌های مکمل یا همولوگ از طریق ایجاد هیبرید پایدار میان جفت بازها استفاده کرد.
- **پروتئاز (Protease):** آنزیمهایی هستند که باعث تجزیه پروتئین‌ها می‌شوند.
- **پروتئین نوترکیب (Recombinant protein):** پلی پپتیدی که به عنوان محصول بیان یک ژن کلون شده در یک سلول نوترکیب تولید می‌شود.

## واژه‌نامه

- **پلاسمید (Plasmid):** قطعه DNA حلقوی که مستقل از کروموزوم میزبان است و اغلب در باکتری‌ها و گاه در دیگر انواع سلول‌ها مشاهده می‌شود.
- **پلي مورفیسم یا چندریختی (Polymorphism):** هنگامی که دو یا چند فنوتیپ که آشکارا با هم تفاوت دارند در جمعیت یک گونهٔ زیستی وجود داشته باشد.
- **پلیوتروپي (Pleitropy):** برخی از ژن‌ها روی چند خصلت متفاوت تاثیر دارند و از این لحاظ سهم آنها با ظهور چندین فنوتیپ تظاهر می‌کند. این خاصیت ژن‌ها را اصطلاحا پلیوتروپی می نامند.
- **ترپن (Terpene):** روغن‌های اسانسی، عمدتا متشکل از لیپیدهای ساده ای هستند که ترپن نامیده می‌شوند. ترپنها، مولکولهای آلی نسبتا کوچکی هستند که تنوع ساختاری گسترده‌ای دارند. بعضی از آنها هیدروکربن هستند و برخی دیگر در ساختارشان اکسیژن هم دارند و ممکن است مولکولهای راست زنجیر و یا دارای یک یا چند حلقه باشند.
- **ترکیبات آروماتیك (aromatic compound):** ترکیبات آلی هستند که در ساختار خود دارای حلقه با پیوند دوگانه هستند. آروماتیک‌ها، دسته وسیعی از ترکیبات را تشکیل میدهند که شامل بنزن و مشتقات آن می‌باشد. واژه آروماتیک به معنی خوشبو است.
- **ترکیبات آلیفاتیك (Aliphatic compound):** ترکیباتی که شامل کربن و هیدروژن بوده و در آن حلقه‌ای وجود نداشته باشد و یا اگر حلقه ای وجود دارد آن حلقه آروماتیک نباشد، در این دسته جای می‌گیرند. در شیمی آلی به کلیه ترکیبات هیدروکربنی غیر آروماتیک، ترکیبات آلیفاتیک گویند.
- **تکثیر به روش پیوندزدن (Grafting):** یک روش تکثیر غیر جنسی گیاهان که در آن یک بافت از گیاهی جدا شده و بر روی گیاه دیگری رشد داده می‌شود. تقسیم معمولی سلول‌ها در محل اتصال باعث می‌شود که زخم‌های حاصله ترمیم و رشد و نمو بافت‌ها ادامه یافته و گیاه واحدی حاصل شود.
- **تکثیر به روش قلمه زدن (Cutting):** قلمه زدن عبارت است از رشد و نمو و تکامل بعضی از قسمتهای گیاهی قطع شده از پایه اصلی. یک قلمه می‌تواند قطعه‌ای از ساقه، ریشه و یا برگ باشد.
- **توالی یابی DNA sequencing (DNA):** مشخص کردن ترتیب نوکلئوتیدها در مولکول DNA.
- **توتی پوتنسی (Totipotency):** یعنی توانایی باززایی تمام اندام‌ها و ایجاد یک گیاه کامل از یک سلول مفرد موجود در یک بافت تمایز یافته و تخصصی.

## واژه‌نامه

- **جداکشت (Explant):** قطعه ابتدايي بافت قرار داده شده در کشت درون شیشه است. جدا کشت ها معمولا مرکب از بافت‌ها هستند که محتوي سلول هاي مريستمي يا نمو يافته به سلول‌هاي مريستمي هستند.
- **حامل (Vector):** مولکول DNA که می‌تواند در موجود زنده میزبان تکثیر یابد. برای کلون کردن ژن را وارد آن کرده و مولکول DNA نوترکیب را به دست می‌آورند.
- **دیپلوئید (diploid):** اندامگان یا یاخته‌ای که دارای دو گروه کروموزوم باشد.
- **رنین (Renin):** آنزیم رنین به عنوان مایه پنیر, برای تبدیل شیر به پنیر استفاده می‌شود به صورت طبیعی در شیردان نوزاد نشخوارکنندگان تولید می‌شود.
- **دی ان آ پلی مراز تک - DNA پلی مراز Taq (Taq DNA polymerase):** آنزیم DNA پلی مراز مـقاوم به حرارت که در PCR استفاده می‌شود.
- **زیست توده (Biomass):** بیومس یا زیســت توده یک منبع تجدید پذیر انرژی است که از مواد زیسـتی به دست می‌آید. به‌طورکلی زباله‌هايي که منشاء زیستی داشته باشند و از تکثیر سلولی پدید آمده باشند بیومس نامیده می شوند.
- **ژرمپلاسم (Germplasm):** ژرم پلاســم به هــر نوع ماده گــیاهی که در تولیــد و اصــلاح نژاد به کـار می رود گفته می شود و شامل بذر، گیاه کامل و بافت های گیاهی است.
- **ژن درمانی (Gene therapy):** فرایند بالینی که از ژن یا دیگر توالی‌های DNA برای درمان بیماری استفاده می‌کنند.
- **ژنومیکس (Genomics):** علم مطالعه یک ژنوم بویژه توالی کامل آن.
- **سرآمیدها (Ceramides ):** سرآمید ها متعلق به لیپیدهای مومی هستند و از اسفنگوزین و اسیدهای چرب تشکیل شده است. و در مقادیر فراوان در غشای سلولی دیده می شوند.
- **ســلولاز (Cellulase):** آنزیمی است که ســلولز را تجزیه می کند. ســلولز یک پلی ساکارید خطی است. دستـگاه گوارش انسان قادر به هضم سلولز نیست و آن را بدون تغیــیر دفع می‌کند اما برخی جانوران مثل نشخوارکننده‌ها و موریانه‌ها به کمک میکروارگانیسم¬هایی که در دستگاه گوارش آن ها زندگی می‌کنند قادر به هضم سلولز هستند.

## واژه‌نامه

- **سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cell):** سلول‌های بنیادی حاصل از جنین انسان، موش و ...که برای ایجاد جانوران ترانس ژن، اهداف درمانی و ...به کار می‌رود.
- **سیتوژنتیك (Cytogenetic):** سیتوژنتیک علم مطالعه ساختمان کروموزوم هاست. در این علم کروموزوم‌ها با استفاده از تکنیک‌های باندینگ (نوارگذاری) و یا شیوه‌های سیتوژنتیک ملکولی مورد تحلیل و بررسی قرار می‌گیرند.
- **سیدروفو یا آهن‌بَرها (Siderophore):** سیدروفورها ترکیباتی کوچک ولی با میل ترکیبی بالا برای آهن (Fe+۳)هستند. این ترکیبات بخشی از یک سیستم چند جزئی بوده که کمپلکس سیدروفور- Fe+۳ را به شکل فعال از عرض غشا عبور داده و وارد سیتوپلاسم می‌کند. تولید این ترکیبات یکی از قدرتمندترین استراتژی‌های مورد استفاده باکتری‌های بی‌هوازی، قارچ‌ها و ریشه‌های گیاهان برای کسب آهن در شرایط محدودیت آن است.
- **فارمینگ (Pharming):** تغییرات ژنتیکی حیوانات اهلی به طوری که بتوانند پروتئین های دارویی نوترکیب را در شیرشان تولید کنند.
- **فلور روده (Gut flora):** فلور، میکروارگانیسم‌هایی هستند که نوعی هم‌زیستی و هم‌سُفرگی با بدن پیدا کرده‌اند و وجودشان بخشی از سازوکار طبیعی شده است. فلور روده انسان حاوی انواع مختلفی از باکتریها است. بسیاری از این باکتری‌ها برای گوارش بهینه غذا مفیدند علاوه بر آن، ویتامینها و آنتی بیوتیکهای مختلف را تولید می‌کنند که برای بدن مفید می‌باشد.
- **فلوسایتومتری (Flowcytometry):** فلوسایتومتری روشی دقیق که برای بررسی خصوصیات مختلف فیزیکی و شیمیایی سلول به کار می رود. در این روش سلول هایی که با ماده ی فلورسنت نشاندار شده اند به صورت معلق در مایع، از مقابل پرتوي باريكِي از نور ليزر عبور مي‌كنند. و امكان جمع‌آوري اطلاعات مربوط به چندين هزار سلول در هر ثانيه فراهم مي‌شود
- **کاراتنوئید (Carotenoid):** کاروتنوئیدها دسته‌ای از رنگدانه‌ها هستند که در جذب نور در گیاهان نقش بسیار مهمی دارند.از کاروتنوئیدهای مهم می‌توان به بتاکاروتن، آلفاکاروتن و لیکوپن و گزانتوفیل اشاره کرد. بتا کاروتن و آلفاکاروتن مسئول رنگ نارنجی هویج و لیکوپن مسئول رنگ قرمز گوجه فرنگی است.
- **کالوس (callus ):** کالوس یک بافت سازمان نیافته و در حال تقسیم می‌باشد که از سلول‌های تمایز نیافته‌ای تشکیل شده است. در مراحل بعدی، این سلول‌ها اختصاصی گردیده به طوری که به کالوس‌هایی تبدیل می‌شوند که از آنها تیپ‌های خاصی متمایز می‌شود.

## واژه‌نامه

- **گرین پلاستیک (Green Plastic):** گرین پلاستیک‌ها که گاهی پلاستیک های زیستی (Bioplastic) نیز نامیده می شود، پلاستیک زیست تخریب پذیر هستند و معمولا از منابع تجدید پذیر ساخته شده است. اغلب بر فرایند سازگاری با محیط زیست تمرکز می کند.
- **لیپاز (Lipase):** این آنزیم‌ها در صنعت نیز برای هیدرولیز چربی‌ها در مواد شوینده و مصارف دیگر مورد استفاده می‌شوند. نقش اختصاصی تبدیل تری‌گلیسرید به گلیسرول و اسید چرب را ایفا می‌کند.
- **مریستم (Meristem):** بافت های مریستمی از سلول هایی نابالغ و با قدرت تقسیم و تکثیر بالا تشکیل شده اند. رشد گیاهی حاصل از فعالیت مریستم ها در سراسر حیات موجود زنده امکان پذیر است. از نظر منشا سلول های بنیادی به دو گروه مریستم های اولیه که در انتهای ساقه های اصلی، شاخه ها، ریشه های اصلی و ریشه های جانبی قرار دارند و از فعالیت تقسیمی این مریستم ها پیکر اولیه گیاه ساخته می شود و مریستم های ثانویه یا پسین که در مرحله ی نمو اندامی در پیکر گیاه ظاهر می شوند. این مریستم ها به طور جانبی تشکیل می شوند. تقسیم می شوند.
- **مولکول DNA نوترکیب (Recombinant DNA molecule):** مولکول DNA ای که با متصل کردن قطعات DNA مختلف به یکدیگر به دست می‌آید.
- **مهندسی بافت (Tissue engineering):** جداسازی ومطالعه رشد سلول‌های بافت‌های پیوندی و اندام‌های فرد روی داربست‌های زیستی (معمولاً کلاژنی) برای تولید اندام دارای عملکرد و انتقال مجدد آن به فرد دهنده
- **مهندسی ژنتیک (Genetic engineering):** استفاده از روش‌های آزمایشگاهی برای ایجاد مولکول‌های DNA حاوی ژن یا ژن‌های جدید.
- **میکرواري یا ریز آرایه (Microarray):** بطور ساده ریز آرایه عبارت است از فناوری بررسی فعالیت ده ها، صدها و هزاران ژن و یا پروتئین در یک سطح کوچک ( یک لام میکروسکوپی و یا یک ریز ارایه در حد چند سانتی متر مربع) جهت مقایسه، مشابهت و یا بررسی تغییرات شامل، تغییر، کاهش ، افزایش و یا عدم تغییر در ساختار و فعالیت ژن ها و یا پروتئین های نمونه با نمونه های شاهد.
- **واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (Polymerase Chain Reaction: PCR):** روشی برای تکثیر آنزیمی نسخه‌های متعدد از توالی DNA هدف.
- **هاپلوئید (Haploid):** اندامگان یا یاخته ای است که دارای یک سری کروموزوم می‌باشد یعنی سری کروموزوم دیگری در آن یاخته نیست که با آن جفت باشد.

## واژه‌نامه

- **هتروتروف (Heterotroph):** جان دارانی که انرژی خود را از مولکول‌ها آلی که توسط اتوتروف‌ها ساخته شده‌اند، به دست می‌آورند به عنوان هتروتروف‌ها شناخته می‌شوند و به عنوان مصرف کننده‌ها در زنجیره‌ی غذایی عمل می‌کنند
- **هتروزیگوت(Heterozygote):** اگر دو الل کنترل کنندهٔ هر يك صفت در فردي يكسان نباشند، فرد را از نظر آن صفت، هتروزیگوت است.
- **هموزیگوت (Homozygote):** دو الل کنترل کنندهٔ هر يك صفت در فرد يكسان باشند، فرد از نظر آن صفت، هموزیگوت است. (اشكال متفاوت يك ژن، كه حالات مختلف يك صفت وراثتي را كنترل مي‌كنند، «الل» هاي آن ژن مي‌گويند )
- **هیبریداسیون اسید نوکلئیک (Nucleic acid hybridization):** ایجاد یک مولکول دو رشته‌ای در اثر جفت شدن بازهای پلی نوکلئوتیدهای مکمل
- **ایزوآنزیم (Isoenzyme):** ایزوآنزیم (ایزوزیم‌ها) آنزیم‌هایی هستند که در ترکیب اسیدهای آمینه تفاوت دارند اما واکنش یکسان شیمیایی را تسریع میکنند.

**منابعی جهت مطالعات بیشتر**


- بهروان، جواد. بیوتکنولوژی مولکولی. اصول و کاربرد DNA نوترکیب. (ترجمه). انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
- سید طباطبایی، بدرالدین ابراهیم و امیدی، منصور، کشت بافت و سلول گیاهی، انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۹۱
- شجاع الساداتی، سید عباس و اسداللهی محمدعلی ، بیوتکنولوژی صنعتی، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۹۰
- طباطبایی یزدی، مجتبی، زرینی، غلامرضا، سپهری زاده، ضرغام و قاسمیان، عبدالله. مقدمه‌ای بر کلون سازی ژن‌ها و آنالیز DNA. (ترجمه). انتشارات خانه زیست شناسی. ۱۳۹۳
- فارسی، محمد، ذوالعلی، جعفر و شهریاری، فرج الله، اصول بیوتکنولوژی گیاهی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۳۸٦
- فرامرزي، محمد علي، فروتن فر، حميد، شكيبايي، مجتبي. بيوتكنولوژي ريز جلبك ها. انتشارات دانشگاه علوم پزشكي و خدمات بهداشتي درماني تهران.۱۳۸۹
- مرتضوی سیدعلی، کریمی مهدی، کدخدایی رسول و رحیمی یزدی، سعید، بیوتکنولوژی میکروبیولوژی صنعتی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۳۹۳
- Alam Khan, Biotechnology in Medical Sciences. Firdos., (۲۰۱٤)
- Heribert, Warzecha & Oliver, Kayser. Pharmaceutical Biotechnology. (۲۰۱۲)