جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مهندسی ژنوم سلول‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه

رحمانی م[1]، دانشور م[2] و مختارزاده س[3]

1، 2 و 3: به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه باغبانی و دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، اهواز

چکیده

متابولیسم ثانویه گیاهان برای صفاتی از قبیل رنگ، طعم و مزه محصولات و مقاومت در برابر آفات و بیماری ها بسیار مهم است. علاوه بر این، این مسیر منبع بسیاری از ترکیبات شیمیایی مفید از قبیل داروها، رنگدانه‌ها و طعم‌دهنده‌هاست. قابلیت مهندسی تولید متابولیت‌های ثانویه سلول‌های گیاهی به منظور افزایش سنتز ترکیبات دارویی، کاهش و یا جلوگیری از تولید ترکیبات سمی و یا حتی تولید ترکیبات جدید از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با وجود اینکه امروزه مهندسی متابولیسم ثانویه گیاهان ممکن و شدنی است اما استفاده کارامد از این فناوری به دانش و درک مسیرهای بیوسنتزی درگیر در سنتز این متابولیت ها نیاز دارد. جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، راه‌کارهای مختلفی از قبیل دستورزی ژن‌های دخیل در مراحل محدود کننده مسیرهای بیوسنتزی، کاهش تعداد مسیرهای رقابتی سنتز فراورده، کاهش کاتابولیسم محصول و بیش‌بیان ژن‌های تنظیمی را می‌توان دنبال کرد. برای رسیدن به این هدف، نه تنها می‌توان ژن‌های موجود در داخل ژنوم گیاه را بیش‌بیان کرد بلکه می‌توان ژن‌هایی که منشاء میکروارگانیسمی دارند را نیز به کار گرفت. از رهیافت‌های دیگر این زمینه می‌توان به انتقال و بیان ژن‌های گیاهی در داخل میکروارگانیسم‌ها اشاره کرد که با استفاده از این روش می‌توان سوبستراها و پیش‌سازهای مضر و بی‌فایده را به ترکیبات شیمیایی مفید تبدیل کرد.

واژگان کلیدی: مهندسی متابولیت، متابولیسم ثانویه، سلول گیاهی

مقدمه

گیاهان قادرند دامنه وسیعی از ترکیبات شیمیایی که متابولیت های ثانویه نامیده می‌شوند تولید کنند. این ترکیبات در بقاء گیاهان در اکوسیستم نقش مهمی بازی می کنند. همچنین این ترکیبات در مقاومت گیاهان به آفات و بیماری‌ها، جذب حشرات گرده‌افشان، میان‌کنش با ریزسازواره‌های[1] همزیست و ..... دخیل هستند (3). اگرچه تاکنون حدود 1000 نوع متابولیت ثاونیه گیاهی کشف و شناخته شده است اما فقط درصد کمی از گونه های گیاهی جهت بررسی وجود متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. بر اساس اطلاعات NAPRALET برآورد می شود که حدود 15% از 25000 گونه گیاهی شناخته شده برای بررسی ترکیبات شیمیایی مورد مطالعه قرار گرفته است. علاوه بر اهمیت متابولیت‌های ثانویه برای خود گیاه، این ترکیبات به خاطر اینکه تعیین کننده کیفیت غذا (رنگ، طعم، مزه) و گیاهان زینتی (رنگ و بو) هستند. اخیراً اثرات دارویی متعددی از قبیل خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و پایین‌آورندگی کلسترول در بسیاری از متابولیت‌های ثانویه به خوبی ثابت شده است. علاوه بر این،

[1]Microorganisms

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بسیاری از متابولیت‌های ثانویه به صورت ترکیبات شیمیایی مفید از قبیل داروها، طعم‌دهنده‌ها، خوشبوکننده‌ها و حشره کش ها، از گیاهان استخراج و به صورت تجاری در دسترس هستند. به دلیل پایین بودن مقادیر این ترکیبات در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی، برخی از این ترکیبات بسیار گران هستند. اهمیت تجاری متابولیت‌های ثانویه در یک دهه اخیر، موجب شده است تا متابولیسم ثانویه و قابلیت های دستورزی مسیرهای بیوسنتزی تولید آنها با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک، مورد توجه قرار گیرد. در بسیاری از موارد، مسیرهای بیوسنتزی این ترکیبات به خوبی شناخته نشده و بشیتر به صورت تئوری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در این میان، فقط مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در سطح آنزیم‌ها و ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنها، به طور کامل در گیاهان شناسایی شده است.

کشت سلول گیاهان

به منظور تولید ترکیبات شیمیایی، استفاده از کشت سلول های گیاهی در مقیاس وسیع، کارامد و موثر است. اگرچه استفاده از سیستم کشت سلول در برخی از گیاهان به دلیل حساس بودن سلول‌ها به نیروهای برشی ممکن است چندان موفق نباشد اما در اکثر گیاهان سلول ها بدون هیچ مشکلی در مقیاس وسیع کشت و رشد داده می شوند. در استخراج متابولیت‌های ثانویه عامل اصلی محدود کننده در کشت سلول‌های گیاهی، کند بودن رشد و پایین بودن قابلیت تولید سلول‌هاست. از طرف دیگر هزینه تولید در کشت‌های معمولی سلول‌های گیاهی به دلیل پایین بودن تولید متابولیت از هر کیلوگرم کشت سلول، بالا بوده و به 430 دلار به ازای هر کیلوگرم کشت می رسد. در کنار اهمیت اقتصادی و صنعتی، کشت سلول های گیاهی سیستمی بسیار سودمند جهت مطالعه مسیر بیوسنتزی متابولیت های ثانویه در گیاهان می باشد. کشت سلولی سیستمی آسان و موثر برای مطالعه آزمایشگاهی الیسیتورها جهت بررسی و مطالعه جایگاههای تنظیمی مسیر بیوسنتزی، می‌باشد. برای مثال می توان به راحتی با تیمار تاثیر دهنده های مختلف، مسیر های انتقال پیام را در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دنبال و مطالعه کرد. در مهندسی متابولیت و استخراج ترکیبات شیمیایی از بافت و سلول های گیاهی، افزایش بیان ژن های دخیل در مسیرهای بیوسنتزی، افزایش غلظت متابولیت و یا کاهش تعداد ترکیبات ناخالص کننده آنها از اهداف اصلی می‌باشد.
در مهندسی متابولیک اهداف زیادی را می توان دنبال نمود اما از لحاظ تغذیه‌ای ممکن است بالا بردن سطوح متابولیت‌های ثانویه و یا تولید متابولیت‌های جدید سمیت ایجاد کرده و خطرات جدی را به دنبال داشته باشد. جهت تشخیص و ارزیابی وسیع این خطرات، بررسی کامل گیاه تراریخته و یا محصول آن ضروری است. با این وجود، تاکنون روش هایی که بتوان با آن متابولیت ثانویه را در یک گیاه به طور کامل بررسی کرد وجود ندارد. با استفاده از روش های کروماتوگرافی از قبیل گروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع با دقت بالا به عنوان پنجره‌ای می‌توان، ترکیباتی که از لحاظ خصوصیات فیزیکی تفاوت‌های بسیار کمی دارند را از هم جدا و تفکیک کرد.

رهیافت‌هایی برای مهندسی سلول‌های گیاهی

جهت دستیابی به یک تکنولوژی کارامد برای تولید متابولیت های ثانویه، قبل از مهندسی متابولیت، مطالعه کامل مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه ضروری است. باید بدانیم که کدامیک از مراحل بیوسنتزی محدود کننده است، اینکه آیا کاتابولیسم عامل مهم محدود کننده انباشتن متابولیت هست یا نه، رقابت برای ترکیب پیش‌ساز کجا

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

و تا چه حد وجود دارد، مسیر چگونه تنظیم می‌شود و اینکه نقش انتقال و تقسیم‌بندی متابولیت در انباشتگی و تولید متابولیت تا چه اندازه بارز است. با استفاده از رهیافت‌های بیوتکنولوژی و دستورزی ژن‌های دخیل در سنتز آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی، می‌توان مراحل مختلف بیوسنتز متابولیت را تغییر، افزایش و یا کاهش داد.

1- افزایش ترکیبات مطلوب

به منظور افزایش جریان متابولیت در یک مسیر بیوسنتزی، می توان واکنش های آنزیمی، مسیرهای رقابتی و ژن‌های تنظیمی را مورد مطالعه و بررسی قرار داد. با این وجود، در اغلب موارد مشاهده شده است که یکی از آنزیم های مسیر قابل القاء بوده و به عنوان سوئیچ خاموش/ روشن برای مسیر عمل می کند. برای مثال تولید دهیدروکسی بنزوئیک اسید در *C. roseus* توسط آنزیم قابل القاء ایزوشوریزمات سینتتاز کنترل می‌شود. در واقع بیان پایدار ژن کد کننده این آنزیم، تولید پایدار متابولیت نهایی مسیر را به دنبال خواهد داشت. علاوه بر این، باید از جزئیات شبکه متابولیک این ترکیب اطلاعات کافی داشت تا بتوان با تغییر جریان کربن سنتز را نیز تغییر و بهینه کرد.

عوامل زیادی از قبیل قابلیت دسترسی به کوفاکتورها، بازدارندگی فیدبکی، انتقال، قسمت بندی و pH بر کارایی مسیر سنتز تاثیر می گذارند. علاوه بر این، کوفاکتورها بر فعالیت و تمایل آنزیم نیز تاثیرگذارند. در مسیر بیوسنتز تریپتوفان مخمر نشان داده شده است که جهت به دست آوردن غلظت های بالایی از تریپتوفان، بایستی فعالیت 5 آنزیم شروع کننده از کوریزمات حداقل 20 برابر افزایش یابد. نتیجه این افزایش این است که تمامی آنزیم های موجود در موجود زنده در کنترل جریان و بیوسنتز فراورده نهایی شرکت دارند اما نقش هر کدام از آنزیم‌ها به تنهایی به طور صحیح قابل پیش‌بینی نیست.

2- مهندسی واکنش‌های آنزیمی مسیر بیوسنتزی

در مواردی که مهندسی مراحل جداگانه مسیر، جهت افزایش فعالیت آنزیم مد نظر باشد، بیش‌بیان ژن‌های داخلی و یا انتقال ژن های خارجی مناسب می تواند راهگشا باشد. آنزیم حاصل از ژن خارجی ممکن است ویژگی های مطلوبی از قبیل عدم بازدارندگی فیدبکی و تمایل بسیار بالا به سوبسترا داشته باشد، اما ژن کد کننده آنزیم نیز می تواند مهندسی شود. بیش‌بیان ژن چالکون ایزومراز[1] پتونیا در گوجه‌فرنگی موجب افزایش 73 برابری تولید فلاونوئید در میوه‌های این محصول می‌شود (13).

تیمار کارخانه سلول گیاهی از طریق دستورزی و همسانه‌سازی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی و سپس وارد کردن آن به همان گیاه و یا سایر گیاهان راهکاری موثر می باشد. ژن h6h دی‌اکسیژنازی را کد می کند که ابتدا اتصال گروه هیدروکسی را در موقعیت کربن شماره 6 باعث و سپس همین جایگاه توسط همان آنزیم اِپوکسیده خواهد شد. بنابراین مهندسی ژن رهیافتی عالی جهت پیدا کردن مرحله محدود کننده در یک مسیر بیوسنتزی است. در برخی موارد این رهیافت ممکن است به عنوان کلید موفقیت در اصلاح و بهبود قابلیت تولید کارخانه سلول گیاهی باشد. در مواردی که سطوح بالای متابولیت ثانویه برای سلول گیاهی سمی باشد، استفاده از پروموتورهای القاء پذیر گزینه‌ای جالب به شمار می‌آید. تراریزش سلول‌های تنباکو با امتزاج پروموتور القاء پذیر تتراسایکلین، ژن آنزیمی کد کننده کوریس‌مات پیروات لیاز *E.coli* و یک توالی پپتیدی که مقصد آن کلروپلاست است کشت سلولی را به وجود می‌آورد که در آن تولید هیدروکسی بنزوئیک اسید می‌تواند به طور قابل برگشتی افزایش یابد.

[1]Chalcon syntetase

3- کاهش دادن جریان متابولیت‌های ثانویه از طریق مسیرهای رقابتی

جریان متابولیت های ثانویه از طریق مسیرهای رقابتی می تواند با انتقال ژن آنتی‌سنس آنزیم رقابتی، در مکان خاصی از مسیر کاهش یابد. در واقع از این رهیافت مثالی وجود ندارد تا بتوان به آن اشاره کرد. اما سهولیت در بلوکه کردن یکی از مراحل مسیرهای متابولیکی در متابولیسم اولیه و ثانویه امکان‌پذیر و موفقیت‌آمیز است.

4- استفاده از ژن‌های تنظیمی

در مواردی که پیچیدگی مسیرهای بیوسنتزی و عدم موفقیت در بیش‌بیان تک‌ژن‌ها عامل محدود کننده باشد استفاده از ژن های تنظیمی که قادرند به صورت کلیدی برای کل مسیر و یا قسمتی از آن عمل کنند، خود می تواند موثر باشد. سهولت استفاده از ژن های تنظیمی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در مطالعات متعددی گزارش شده است که می توان به بیان ژن های گیاهی Myb و bHLH کد کننده فاکتورهای رونویسی اشاره کرد. بیان ساختاری این ژن‌ها در گیاه مادر و یا گونه گیاهی میزبان ژن‌های مذکور، مسیرهای بیوسنتزی فنیل پروپانوئید را تحت تاثیر قرار می دهد. برای مثال Lioyd و همکاران نشان دادند که تولید آنتوسیانین در آرابیدوپسیس و تنباکو می‌تواند توسط ژن‌های تنظیمی bHLH و Myb از سر گرفته شود.

ژن های تنظیمی از طریق بیش‌بیان خود، افق روشنی را فراروی مطالعات و تحقیقات بر روی تنظیم مسیرهای بیوسنتزی ترسیم خواهند کرد. با این وجود درصد بالایی از ژن های گیاهی فاکتورهای رونویسی را کد می کنند. برای مثال حدود 13% از ژن‌های آرابیدوپسیس ژن‌هایی هستند که در رونویسی و یا انتقال پیام دخیل هستند. بنابراین بیش‌بیان یک فاکتور رونویسی ساده ممکن است همیشه کافی نباشد چرا که اثر آن به ساختار ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی سلول تراریخته بستگی دارد.

5- کاهش کاتابولیسم

اگرچه تحقیقات زیادی بر روی کاتابولیسم متابولیت‌های ثانویه انجام گرفته است اما این پدیده به طور وسیع و دقیق مورد مطالعه قرار نگرفته است. در کشت سلول‌های گیاه *C. roseus* مشخص شده است که سرعت کاتابولیسم تقریباً معادل سرعت بیوسنتز متابولیت ثانویه است. با وجود اهمیت این راهکار، تاکنون آنزیمی شناخته نشده است که در کاتابولیسم متابولیت‌های ثانویه دخیل باشد اما شناسایی این دسته از آنزیم‌ها به جهت اینکه بتوان از این رهیافت در افزایش انباشتگی و غلظت متابولیت های مفید استفاده کرد ضروری بوده و از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است.

6- افزایش تعداد سلول‌های تولید کننده متابولیت‌های ثانویه

در گیاهان اغلب درصد پایینی از سلول ها به طور واقعی تولید کننده متابولیت های ثانویه هستند. معمولاً این دسته از سلول‌ها، سلول‌های تخصصی شده‌ای هستند که قادرند تولید بالایی از متابولیت‌های ثانویه داشته باشند. برای مثال در کشت سلول‌های *C. roseus* نشان داده شده است که تولید آنتوسیانین‌ها کاملاً به درصد سلول‌های تولید کننده بستگی دارد. تمام سلول‌های تولید کننده تقریباً دارای سطوح مشابهی از آنتوسیانین‌ها می‌باشند.

امکان افزایش تعداد سلول‌های تولید کننده متابولیت‌های ثانویه رهیافتی موثر و جالب جهت افزایش تولید متابولیت های ثانویه می‌باشد اما برای رسیدن به موفقیت در این زمینه به مطالعات بیشتر در رابطه با تنظیم فرایند تمایز بافت‌ها نیاز دارد.

7- تولید فراورده‌ها و پروتئین‌های جدید

تولید ترکیبات جدید را می توان به دو صورت تعریف کرد. یکی اینکه این فراورده برای گونه گیاهی مهندسی شده جدید باشد و یا اینکه به طور کلی این فراورده در علوم زیستی جدید و نو باشد. در میکروارگانیسم‌ها بر خلاف گیاهان استفاده از رهیافت‌های تولید کننده پروتئین‌ها و فراورده‌های نوترکیب به خوبی توسعه یافته است. متاسفانه گیاهان فاقد اپرون‌های بیانی در میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. وجود اپرون‌ها در میکروارگانیسم‌ها باعث شده است تا تمام ژن‌های دخیل در بیوسنتز یک فراورده، تحت کنترل یک اپرون واحد به صورت پشت‌سرهم دسته‌بندی شوند که این خود همسانه‌سازی آنها و امکان مهندسی مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌ها را آسان کرده است.

در حال حاضر تعداد اندکی از ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان شناسایی و یا کلون شده‌اند که این باعث شده تا امکان استفاده از بیوشیمی نوین در گیاهان محدود شود. با این وجود، جهت تولید ترکیبات و فراورده‌های جدید در گیاهان، استفاده از ژن‌های میکروبی می‌تواند رهیافت خوبی باشد. برای مثال Heide و همکاران از طریق بیش‌بیان ژن کد کننده آنزیم کروزیمات پیروات لیاز با استفاده از پروموتور CaMv 35s و یا پروموتور القاءپذیر تتراسایکلین و توالی پپتیدی انتقال پیام زیرواحد کوچک روبیسکو، هیدروکسی بنزوییک اسید را در کلروپلاست‌های تنباکو تولید کنند (37).

در بهبود ارزش تغذیه‌ای فراورده‌های غذایی، می‌توان به انتقال مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدها در برنج اشاره کرد. این موفقیت با انتقال ژن های باکتریایی فیتون دساتوراز و فیتون سنتتاز در ترکیب با لیکوپن سیکلاز تحت کنترل پروموتور گلوتلین برنج حاصل شده است. با تولید این فراورده در برنج، مشکل کمبود ویتامین A در بسیاری از جوامعی که برنج به عنوان ماده غذایی اصلی مصرف می‌شود برطرف می‌شود.

ایندول آلکالوئیدها گروهی از آلکالوئیدهای مهم دارویی می‌باشند. حدود 15 الکالوئید از 3000 الکالوئید شناخته شده خصوصیات دارویی فوق‌العاده باارزشی دارند. این آلکالوئیدها فقط در 4 خانواده گیاهی وجود دارند اما یکی از پیش‌سازهای مهم الکالوئیدهای دارویی در بسیاری از خانواده‌های گیاهی یافت می‌شوند. با انتقال ژن *tdc* که مسئول تولید تریپتامین می‌باشد و ژن str که پروتئین حاصل از آن مسئول اتصال تریپتامین به سکولوگانین می‌باشد منجر به تولید استریکتوسیدین شده که پیش‌ساز عمومی تمامی آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئید می‌باشد.

8- پایین آوردن میزان و غلظت ترکیبات در بافت‌ها

کاهش سطوح و غلظت ترکیبات نامطلوب از قبیل ترکیبات سمی و یا ترکیبات پایین آورنده ارزش تغذیه ای فراورده، از اهمیت بسیاری برخوردار است. این دسته از ترکیبات را می توان از طریق سرکوب Sence یا Antisence ژن در یکی از مراحل بیوسنتز، تغییر جریان و مسیر انتقال پیش ساز یک ترکیب نامطلوب به مسیر ترکیبات دیگر، افزایش کاتابولیسم فراورده ناخواسته و کاهش میزان آنزیم‌های مسیر بیوسنتز فراورده مذکور کاهش داد که در میان این موارد از رهیافت آنتی سنس جهت جلوگیری و قطع مرحله و یا مراحل خاصی از مسیر بیوسنتزی به طور وسیعی استفاده شده است. برای مثال از این راهکار برای سرکوب و کاهش بیان CHS در گیاهان زینتی از قبیل رز و داوودی به طور موفق استفاده شده است.

در صنعت کاغذ، برای کاهش میزان لیگنین چوب، درختان تراریخته دارای سطوح کاهش یافته‌ای از آنزیم‌های مراحل اولیه بیوسنتز فتنیل پروپانوئید از قبیل فنیل‌آلانین آمونیالیاز، سینامات 4- هیدروکسیلات و 4-کومارات و

کوانزیم A لیگاز تولید شده‌اند که گیاهان ترایخته در مقایسه با گیاهان شاهد از میزان کمتری لیگنین برخوردار بودند.

جهت افزایش کاتابولیسم فرآورده، در سطح mRNA و یا پروتئین می توان کاتابولیسم را افزایش داد. این می تواند از طریق استفاده از ریبوزایم‌ها و یا آنتی‌بادی‌های ضد آنزیم هدف تحقق یابد. با این وجود، تاکنون به استفاده از رهیافت‌های مختلف بلوکه کردن مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه از سرکوب مرحله و مراحلی از مسیر و یا استفاده از ژن‌های آنتی‌سنس جهت تنظیم انباشتگی متابولیت‌های ثانویه توجه نشده است.

1. ترکیبات گیاهی در ریزسازواره‌ها

پس از شناسایی ژن‌هایی که در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه دخیل‌اند می‌توان آنها را در ریزسازواره‌ها مطالعه، بیان و یا بیش‌بیان کرد. برای بیوسنتز این دسته از ترکیبات گیاهی در ریزسازواره‌ها، به وجود پیش‌سازها و سوبستراها در سلول‌های میزبان نیاز بوده و علاوه بر این، فراورده نهایی و واسطه‌های این مسیر بیوسنتزی نباید برای سلول‌های میکروبی سمی باشد. سمیت این ترکیبات در میکروب‌ها مانعی بزرگ در مهندسی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی در ریزسازواره‌ها می‌باشد. مهمتر از این، در استفاده از ریزسازواره‌ها در تولید متابولیت های ثانویه گیاهی، ایجاد هماهنگی بین مراحل مختلف آنزیمی در یک مسیر بیوسنتزی می باشد که در قسمت‌بندی گیاه نقش مهمی را بازی می کند. با این وجود بر خلاف مسیرهای بیوسنتزی طولانی و پیچیده، بیان مسیرهای کوتاه در ریزسازواره‌ها امکان‌پذیر می‌باشد.

2. سخن آخر (پایداری در تولید متابولیت‌ها)

یکی از جنبه‌های بسیار مهم گیاهان تراریخته و سلول‌های آنها پایداری در ژن هدف و بیان آن می‌باشد. در تراریزش گیاهان، خاموشی ژن پدیده‌ای مشکل‌ساز و شناخته شده می‌باشد. با بکارگیری روش‌های صحیح گزینش و استفاده از برنامه‌های تلاقی گیاهان تراریخته، می‌توان تا حدودی این مشکل را حل کرد. برای مثال، مشخص شده است که در کشت سلولی گیاه *C. roseus* بیش‌بیان ژن‌های *tds* و یا *str* از میزان حداکثر بیوسنتز آلکالوئیدها به تدریج کاسته می‌شود (38).

با این وجود، سنتز افزایش یافته متابولیت‌های ثانویه در یک سلول ممکن است در فرایند انتخاب برای سلول‌های سریع‌الرشد موجود در کشت سلول‌های گیاهی، به عنوان یک فاکتور منفی عمل کند.

منابع

1. Artsaenko O, Peisker M, Zurnieden U, Fiedler U,Weiler EW,Muntz K and Conrad U (1995) Expression of a single-chain FV antibody against abscisic acid creates a wilty phenotype in transgenic tobacco. Plant J 8: 745–750.
2. Artsaenko O, Weiler EW, Muntz K and Conrad U (1994) Construction and functional characterization of a single chain FV antibody-binding to the plant hormone abscicic acid. J Plant Physiol 144: 427–429.
3. Bate NJ, Orr J, Ni WT, Meromi A, Nadlerhassar T, Doerner PW, et al. (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia lyase levels and phenylpropnaoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate determining step in natural product synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 91: 7608–7612.

4. Berlin J, Ruegenhagen C, Dietze P et al. (1993) Increased production of serotonin by suspension and root cultures of Peganum harmala transformed with a tryptophan decarboxylase cDNA clone from Catharanthus roseus. Transgen Res 2: 336–344.
5. Burbulis IE and Winkel-Shirley B (1999) Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid bioynthetic pathway. Proc Natl Acad Sci USA 26: 12929–12935. Cane D (2000) Biosynthesis meets bioinformatics. Science 287: 818–819.
6. Canel C, Lopez-Cardoso MI, Whitmer S, van der Fits L, Pasquali G, van der Heijden R, et al. (1998) Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of Catharanthus roseus. Planta 205: 414–419.
7. Cascante M, F. Ortega F and Marti E (2000) New insights into our understanding of the regulation and organization of cell factories. TibTech 18: 181–182.
8. Chapell J (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. Annu Rev Plant Physiol Mol Biol 46: 521–547.
9. Chartrain M, Salmon PM, Robinson DK and Buckland BC (2000) Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals. Curr Opin Biotechnol 11: 209–214.
10. Colliver SP, Morris P and Robbins MP (1997) Differential modification of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis with an antisense chalcone synthase construct in transgenic Lotus corniculatus. Plant Mol Biol 35: 509–522.
11. Conrad U and Fiedler U (1994) Expression of engineered antibodies in plants cells. Plant Mol Biol 26: 1023–1030.
12. Contin A, van der Heijden R, Lefeber AWMand Verpoorte R (1998) The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a Catharanthus roseus cell culture. FEBS Lett 434: 413–416.
13. Cordell GA (1974) The biosynthesis of indole alkaloids. Lloydia 37: 219–298.
14. Cornish-Bowden A, Hofmeyr JHS and Cardenas ML (1995) Strategies for manipulating metabolic fluxes in bioetchnology. Bioorg Chem 23: 439–449.
15. Cunningham FX and Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 557–583.
16. Dagnino D, Schripsema J and Verpoorte R (1993) Comparison of terpenoid indole alkaloid production and degradation in two cell lines of Tabernaemontana divaricata. Plant Cell Rep 13: 95–98.
17. Dagnino D, Schripsema J and Verpoorte R (1994) Terpenoid indole alkaloid biotransformation of suspension cultures of Tabernaemontana divaricata. Phytochemistry 35: 671–676.
18. DellaPenna D (1999) Nutritional genomics: Manipulating plant micronutrients to improve human health. Science 285: 375–379.
19. Dixon RA (1999) Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. Curr Opin Biotechnol 10: 192–197.
20. Dordrecht. Hain R, Bieseler B, Kindl H, Schroder G and Stocker R (1990) Expression of a stilbene synthase gene in Nicotiana tabacum results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. Plant Mol Biol 15: 325–335.
21. Dos Santos R, Schripsema J and Verpoorte R (1994) Ajmalicine metabolism in Catharanthus roseus cell cultures. Phytochemistry 35: 677–681.
22. Estelle M and Chory J (1999) Signals and pathways: keeping track of what's going on. Curr Opin Plant Biol 2: 349–351.
23. Goddijn OJM, Pennings EJM, van der Helm P, Verpoorte R and Hoge JHC (1995) Overexpression of a tryptophan decarboxylase cDNA in Catharanthus roseus crown gall calli results in in340 creased tryptamine levels but not in increased terpenoid indole alkaloid production. Transgenic Res 4: 315–323.

24. Gollwitzer J, Lenz R, Hampp N and Zenk MH (1993) The transformation of neopine to codeinone in morphine biosynthesis proceeds non-enzymatically. Tetrahedron Lett 34: 5703–5706.
25. Grotewold E, Chamberlin M, Snook M, Siame B, Butler L, Swenson J, et al. (1998) Engineering secondary metabolism in maize cells ectopic expression of transcription factors. Plant Cell 10: 721–740.
26. Hallard D, van der Heijden R, Verpoorte R, Lopez-Cardoso I, Pasquali G, Memelink J and Hoge JHC (1997) Suspension cultured transgenic cells of Nicotiana tabacum expressing tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from Catharanthus roseus produce strictosidine upon feeding of secologanin. Plant Cell Rep 17: 50–54.
27. Hashimoto T and Yamada Y (1994) Alkaloid biogenesis: molecular aspects. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 45: 257–285.
28. Hashimoto T, Nakajima K, Ongena G et al. (1992) Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of Hyoscyamus niger. Plant Physiol 100: 836–845.
29. Hashimoto T, Yun D-J and Yamada Y (1993) Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. Phytochemistry 32: 713–718.
30. Holton TA and Cornish EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell 7: 1071–1083.
31. Kutchan TM (1995) Alkaloid biosynthesis: The basis for metabolic engineering of medicinal plants. Plant Cell 7: 1059–1070.
32. Leech MJ,May K, Hallard D, Verpoorte R, De Luca V and Christou P (1998) Expression of two consecutive genes of a secondary metabolic pathway in transgenic tobacco: molecular diversity influences levels of expression and product accumulation. Plant Mol Biol 38: 765–774.
33. Lloyd AM, Walbot V and Davis RW (1992) Arabidopsis and Nicotiana anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. Science 258: 1773–1775.
34. Rasmussen S and Dixon RA (1999) Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. Plant Cell 11: 1537–1552.
35. Romero RM, Roberts MF and Phillipson JD (1995) Anthranilate synthase in microorganisms and plants. Phytochemistry 39: 263 276.
36. Sommer S, Siebert M, Bechthold and Heide L (1998) Specific induction of secondary product formation in transgenic plant cell cultures using an iducible promoter. Plant Cell Rep 17: 891–896.
37. Verpoorte R (2000) Pharmacognsoy in the new millenium: leadfinding and biotechnology. J Pharm Pharmacol 52: 253–262.
38. Verpoorte R, van der Heijden R, ten Hoopen HJG and Memelink J (1999) Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. Biotechnol Lett 21: 467–479.
39. Whitelam GC and Cockburn W (1996) Antibody expression in transgenic plants. Trends Plant Sci 1: 268–272.
40. Yao K, De Luca V and Brisson N (1995) Creation of a metabolic sink for for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to Phytophthora infestans. Plant Cell 7: 1787–1799.
41. Ye XD, Al-Babili S, Kloti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P and Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science 287: 303–305.
42. Zenk MH (1991) chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cell cultures as a pot of gold. Phytochemistry 30: 3861– 3863.

Engineering the plant cell genome for secondary metabolites production

Rahmani M.[1], Daneshvar M.[2] and Mokhtarzadeh S.[3]

1: M.Sc. Student of Plant Biotechnology, 2: Department of Horticultural Science, 3: M.Sc. Student of Genetic and Animal Breeding, Natural Resources and Agricultural Sciences University of Ramin, Ahwaz, Iran.

Abstract

Plant secondary metabolism is very important for traits such as color and flavor of food, and resistance against pests and diseases. Moreover, it is the source of many chemical products such as drugs, flavors and fragrances. Possibility of engineering the secondary metabolite pathways of the plant cell factory in order to produce more of a fine chemical, produce less of a toxic compound, or even to make new compounds, is feasible nowadays, but it requires knowledge of the biosynthetic pathways involved. To increase secondary metabolite production different strategies can be followed, such as overcoming rate limiting steps, reducing flux through competitive pathways, reducing catabolism and overexpression of regulatory genes. For this purpose not only genes of plant origin can be overexpressed, but also microbial genes heve been used successfully. Overexpression of plant genes in microorganisms is another approach; which might be of interest for bioconversion of readily available precursors into valuable fine chemicals.

Key words: Metabolic engineering, plant secondary metabolism, plant cell