Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Optimization and Presentation of a Protocol for Protoplast Isolation, Regeneration and Gene Transfer in Potato

Esmat Ashaar Ghadim

PhD student in plant Biotechnology, Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azerbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail: N.Ashaarghadim@gmail.com

Maghsoud Pazhouhandeh

*Corresponding author. Associate Professor, Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail: Pazhouhandeh@gmail.com

Mohammad Ahmadabadi

Associate Professor, Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail: m.ahmadabadi@azaruniv.edu

Abstract

Objective

The unique characteristics of plant protoplasts have made them a powerful tool for researchers to study the genetic modification of plant cells. The most important prerequisite for the use of protoplasts is the ability to extract them easily and in large quantities, and to cultivate and regenerate them for cell colony formation and plant production. The most common method of extracting protoplasts from plant tissues is the enzymatic method. Concentration and composition of enzymes and isolation and culture steps are key factors in protoplast extraction. The aim of this study was to investigate the effect of these factors on protoplasts of *in vitro* potato (*Solanum tuberosum* L.) and to develop an efficient and suitable method for their extraction, transfection, callus formation and regeneration.

Materials and methods

For protoplast isolation from commercial and common Agria cultivar of potato, different treatments of Cellulase and Macerozyme enzymes concentration, incubation time in enzyme solution and isolation steps on leaf tissue, stem and aerial part of *in vitro* plantlets were investigated. The effects of different hormone concentration on culture and regeneration of protoplasts were studied. After protoplast isolation, the efficiency of transfection by PEG 4000

using pBin61-GFP plasmid was evaluated.

Results

The best results were obtained from leaf explants and the highest number of protoplasts (2×10^6 protoplasts per ml) were extracted from leaf mesophilic tissues after 16 hours' incubation in enzyme solution (1% Cellulase and 0.2% Macerozyme). The transfection efficiency of protoplasts by PEG with 40% concentration and duration of 30 minutes was 50%. The MS medium containing 5 mg/l NAA and 0.1 mg/l BAP was selected as the best culture medium for callus induction. In this hormonal treatment, 100% of callus induction from protoplasts was obtained after about one month. The best medium for plant regeneration and shooting from callus was the combination of 2 mg/l Zeatin with 0.1 mg/l GA_3 and 0.01 mg/l NAA with 86% efficiency.

Conclusions

Based on the results, the described protocol for protoplast extraction and gene transfer in this study provides necessary steps for genetic engineering, transformation and gene expression in the potato plant.

Keywords: Cellulose, Genetic Engineering, Macerozyme, Polyethylene glycol, Protoplast.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ashaar Ghadim E, Pazhouhandeh M, Ahmadabadi M (2022) Optimization and Presentation of a Protocol for Protoplast Isolation, Regeneration and Gene Transfer in Potato. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (3), 101-126.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (3), 101-126. DOI: 10.22103/jab.2022.18985.1384

Received: May 15, 2022. Received in revised form: June 28, 2022.

Accepted: June 29, 2022. Published online: August 10, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بهینه‌سازی و ارائه دستورالعمل استخراج و باززایی پروتوپلاست سیب‌زمینی و تراریختی آن

عصمت اشعار قدیم

دانشجوی دکتری رشته بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: N.Ashaarghadim@gmail.com

مقصود پژوهنده

*نویسنده مسئول: دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: Pazhouhandeh@gmail.com

محمد احمدآبادی

دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: m.ahmadabadi@azaruniv.edu

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۴/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۸

چکیده

هدف: ویژگی‌های منحصر بفرد پروتوپلاست‌های گیاهی، آن‌ها را به ابزاری قدرتمند برای محققین، جهت مطالعه تغییرات ژنتیکی سلولی تبدیل کرده است. مهمترین پیش‌نیاز استفاده از پروتوپلاست‌ها، توانایی استخراج ساده در مقادیر بالا، کشت و باززایی آن‌ها جهت تشکیل کلونی سلولی و تولید گیاه است. معمول‌ترین روش استخراج پروتوپلاست از بافت‌های گیاهی، روش آنزیمی است. غلظت و ترکیب آنزیم‌ها و مراحل جداسازی و کشت، از عوامل کلیدی استخراج پروتوپلاست می‌باشد. هدف این تحقیق، بررسی اثر فاکتورهای مذکور بر روی پروتوپلاست‌های گیاهان درون شیشه‌ای سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) و معرفی روشی کارا و مناسب برای استخراج، تراریختی و کالوس‌زایی/باززایی از این گیاه است.

مواد و روش‌ها: برای جدا سازی پروتوپلاست سیب‌زمینی رقم رایج تجاری آگریا، تیمارهای مختلف غلظت آنزیم‌های سلولاز و مسروزیم، مدت نگهداری در محلول آنزیمی و مراحل جداسازی بر روی بافت برگ، ساقه و بخش‌های هوایی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای و اثر غلظت هورمن‌های مختلف برکشت و باززایی پروتوپلاست مورد بررسی قرار گرفت. پس از جداسازی، کارآیی تراریختی پروتوپلاست‌ها به‌واسطه‌ی PEG 4000 با استفاده از ناقل pBin61-GFP ارزیابی شد.

نتایج: بهترین نتایج از ریزنمونه‌های برگی و بالاترین تعداد پروتوپلاست (۲×۱۰^{۶} پروتوپلاست بر میلی‌لیتر)، پس از ۱۶ ساعت نگهداری در محلول آنزیمی (حاوی ۱ درصد سلولاز و ۰/۲ درصد مسروزیم) از بافت‌های مزوفیل برگ حاصل شد. کارآیی

تراریختی پروتوپلاست‌ها به‌واسطه‌ی PEG با غلظت ۴۰ درصد و مدت زمان ۳۰ دقیقه ،۵۰ درصد بود. بهترین تیمار محیط کشت برای القای کالوس‌زایی، محیط MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP بدســـت آمد که در این تیمار هورمونی، ۱۰۰ درصد پروتوپلاست‌ها بعد از حدود یک ماه کالوس تشکیل دادند. بهترین تیمار باززایی از کالوس ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم برلیتر Zeatin با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 به‌همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA با راندمان ۸۶ درصد بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصل، دستورالعمل استخراج پروتوپلاست و انتقال ژن توصیف شده در این تحقیق برای مهندسی ژنتیک، انتقال و بیان ژن در گیاه سیب‌زمینی کارآیی لازم را دارد.

کلیدواژه‌ها: پروتوپلاست، پلی‌اتیلن گلیکول، سلولز، مسروزیم، مهندسی ژنتیک.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: اشعار قدیم عصمت، پژوهنده مقصود، احمدآبادی محمد (۱۴۰۱) بهینه‌سازی و ارائه دستورالعمل استخراج و باززایی پروتوپلاست سیب‌زمینی و تراریختی آن. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۳)، ۱۰۱-۱۲۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

پروتوپلاست، به سلول‌های حاصل از گیاه، باکتری، قارچ یا جلبک اطلاق می‌شود که دیواره‌ی سلولی آن‌ها توسط روش‌های مکانیکی یا آنزیمی حذف شده و غشا سیتوپلاسمی، خارجی‌ترین لایه‌ی این سلول‌ها محسوب می‌شود (Verma et al. 2008; Echeverri et al. 2019). پروتوپلاست‌ها، صرف نظر از روش جداسازی مکانیکی یا شیمیایی همیشه حاوی مقادیر قابل‌توجهی از ضایعات سلولی به شکل‌های مختلف از قبیل بافت‌های هضم نشده، عناصر آوندی، دیواره‌های سلولی، غشا، هسته، پلاست‌ها و اندامک‌های دیگر سلولی یا پروتوپلاست‌های آسیب دیده می‌باشند که دارای اثر منفی بر روی تقسیم سلولی پروتوپلاست‌های کامل زنده بوده و باید به‌سـرعت و بطور کامل حذف شـوند (Vasil et al. 1961; Castelblanque et al. 2010). خالص‌سـازی پروتوپلاست، حذف همه‌ی ضایعات سلولی برای به‌دست آوردن پروتوپلاست‌های سالم و کامل است (Selga 2017).

سلول‌های گیاهی، توسط یک دیواره‌ی سلولی نسبتا نازکی احاطه شده‌اند که معمولا از دیواره اولیه و ثانویه تشکیل می‌شوند. دیواره اولیه مخلوط پیچیده‌ای از پلی ساکاریدها شامل ۲۵ در صد سلولز، ۲۵ در صد همی سلولز و ۳۵ در صد پکتین، به‌همراه ۸-۱ درصد ساختار پروتئینی و پلی‌مرهای دیگر است. بااین‌حال این نسبت می‌تواند در گونه‌های مختلف گیاهی و سلولی بسیار متفاوت باشد (Cosgrove 1998). فیبرهای سلولزی در ماتریکس پکتین جای گرفته‌اند و سلول‌های مجاور نیز توسط تیغه میانی پکتینی،

به یکدیگر پیوسته هستند (Echeverri et al. 2019). دیواره ثانویه، بطور عمده حاوی سلولز بیشتری است (Cosgrove 1998). بنابراین دیواره‌ی سلولی به‌عنوان مانع اصلی در استخراج پروتوپلاست‌ها، محسوب می‌شود (Navrátilová 2004). اولین استخراج مکانیکی پروتوپلاست، از گیاه *Stratiotes aloides* L.، توسط Klerceker در سال ۱۸۹۲ (cited in Cocking 1960) صورت گرفت. در این روش، ابتدا سلول‌ها، پلاسمولیز شده و سپس دیواره‌های سلولی برای آزادسازی پروتوپلاست‌ها برش یافتند (Bajaj 1974). Cocking در سال ۱۹۶۰، از آنزیم‌های طبیعی تخریب دیواره سلولی که در میوه‌ها و در طی رسیدگی میوه تولید می‌شود، برای استخراج پروتوپلاست از ریشه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی استفاده کرد (Davey et al. 2005). اما در این دو روش، پروتوپلاست کمی استخراج شده و روش جداسازی زمان‌بر و سخت بود (Vasil & Vasil. 1961). پس از این‌که آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز بطور تجاری از قارچ *Trichoderma viride* و باکتری *Bacillus* sp. در دسترس قرار گرفتند، روش جدیدی برای استخراج پروتوپلاست معرفی شد (Navrátilová 2004). پکتیناز برای حل کردن تیغه‌ی میانی و در نتیجه تبدیل بافت‌ها به سلول‌های انفرادی کاربرد دارد و سلولاز به‌عنوان تجزیه‌کننده‌ی دیواره‌ی سلولی و آزادکننده‌ی پروتوپلاست‌ها عمل می‌کند (Navrátilová 2004). در حال حاضر، استخراج پروتوپلاست بطور معمول با استفاده از روش هضم آنزیمی صورت می‌گیرد. در طول این سال‌ها، پیشرفت چشمگیری در استخراج، کشت و باززایی گیاهان از پروتوپلاست، در گستره‌ی وسیعی از گونه‌ها گزارش شده است (Gamborg et al. 2013). استخراج پروتوپلاست از گونه‌ها و بافت‌های گیاهی مختلف مانند جلبک کلامیدوموناس (Baek et al. 2016)، اطلسی (Subburaj et al. 2016)، گندم (Liang et al. 2017)، ذرت (Svitashev et al. 2016)، سیب (Malnoy et al. 2016)، سویا (Kim et al. 2017) و چندین رقم سیب‌زمینی (Al-Maarri et al. 2014; Nadakuduti et al. 2018; Nicolia et al. 2015)، گزارش شده است.

سیب‌زمینی (2n=4x=48)، متعلق به خانواده‌ی بزرگ *Solanaceae*، از نظر ژنتیکی هتروزیگوت و پلی‌پلوئید است که پس از گندم، برنج و ذرت، مهمترین محصول غذایی جهان شناخته می شود (Hameed et al, 2018 ;Devaux et al. 2014). اگرچه روش‌های سنتی اصلاحی بیش از ۱۰۰ سال قبل روی سیب‌زمینی آغاز و باعث بهبود عملکرد این گیاه شده است، درعین‌حال، ماهیت پلی‌پلوئیدی آن مهمترین مانع به دست آوردن سریع رقم خالص هوموزیگوت با صفات بهبود یافته از طریق تلاقی و روش‌های اصلاح سنتی می‌باشد. (Muthoni et al. 2015). بنابراین برای ایجاد رقم‌های جدید با خصوصیات ژنتیکی برتر، استفاده از روش‌های نوین انتقال ژن منطقی و ضروری است (Khromov et al. 2018). گیاهان قابلیت باززایی از سلول‌ها و بافت‌های سوماتیک را دارا می‌باشند و گیاه کامل می‌تواند از یک پروتوپلاست واحد، از طریق اندام‌زایی و یا جنین‌زایی سوماتیکی باززا شود (Ikeuchi et al. 2016). بنابراین، پروتوپلاست‌ها مواد گیاهی بسیار ارزشمندی برای انتقال ژن و همچنین دورگ‌گیری سوماتیکی بوده (Al-Maarri et al. 2014)، و در مقایسه با روش‌های دیگر، کارآیی تراریختی بالاتری دارند (Baltes et al. 2017; Dlugosz et al. 2016; Jiang et al. 2013). چرا که دیواره سلول در پروتوپلاست‌ها بطور کامل حذف شده و زمینه را برای تغییر ژنتیکی مستقیم فراهم می‌آورد (Ling et al. 2009). موفقیت در سیستم کشت بافت

پروتوپلا ست، در درجه اول به ا ستخراج سطح بالایی از جمعیت پروتوپلا ست‌های انبوه، یکنواخت و با زنده‌مانی بالا وابسته ا ست. تاکنون چندین د ستورالعمل مختلف برای جدا سازی و خالص سازی پروتوپلا ست در گونه‌های مختلف گیاهی بهینه سازی و گزارش شده ا ست (Kang et al. 2020; Sun et al. 2019)، اما جزئیات این د ستورالعمل‌ها بایستی بر ا ساس گونه و حتی واریته‌ی مورد نظر بهینه‌سازی شود. بطوری‌که در بیشتر موارد، باید شرایط بهینه و فرآیند آنزیمی براساس ژنوتیپ/ نوع ریزنمونه، بطور تجربی تعیین شود. بنابراین، هدف این تحقیق، بهینه سازی ا ستخراج و کشت پروتوپلا ست‌های حا صل از بافت‌های ساقه و برگ گیاه سیب‌زمینی رقم رایج تجاری آگریا و برر سی انتقال ژن به‌وا سطه پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)[1]، برر سی تقسیم سلولی، تشکیل میکروکالوس، کالوس و باززایی تا ح صول گیاه کامل، به منظور بهره‌برداری بعدی از د ستورالعمل بهینه سازی شده در برنامه‌های انتقال ژن به این گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منبع استخراج پروتوپلاست و بررسی اثر تیمارهای موثر بر آن: بخش‌های مختلف گیاهی می‌توانند به‌عنوان مواد اولیه برای ا ستخراج پروتوپلا ست به‌کار گرفته شوند (Wang et al. 2005). در این تحقیق، از برگ و ساقه گیاه سیب‌زمینی رقم آگریا استفاده شد. ابتدا قطعات ۲–۱/۵ سانتی‌متری میانگره حاوی یک جوانه‌ی جانبی از گیاهان درون شیشه‌ای، در محیط پایه MS (Duchefa M0231) مایع و فاقد هورمون، حاوی ۲ درصد ساکارز، در اتاقک رشد، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، نور سفید فلور سنت و در دوره نوری ۱۶ ساعت رو شنایی و ۸ ساعت تاریکی تکثیر شدند تا مواد گیاهی کافی و یکنواخت برای جدا سازی پروتوپلاست تولید شود.

تاکنون چندین دستورالعمل مختلف برای استخراج پروتوپلا ست از گیاه سیب‌زمینی معرفی شده است، اما انتخاب بین آن‌ها و تفاوت‌های موجود در این روش‌ها ایجاب می‌کند که هر آزمایشگاه باتوجه به مواد و امکانات موجود و رقم مورد مطالعه، تیمارهای مختلفی را بررسی و روش را بهینه‌سازی کند. در این تحقیق، بهینه‌سازی جزئیات این دستورالعمل‌های متفاوت موجود روی واریته‌ی آگریا انجام گرفت. بنابراین، استخراج پروتوپلاست از بافت‌های مختلف گیاه مورد بررسی قرار گرفتند. نوع برش بافت‌ها، غلظت‌های مختلف آنزیم‌های سلولاز و مسروزیم[2]، مدت زمان شیکر و همچنین مدت زمان نگهداری در محلول آنزیمی، حضور ترکیباتی مانند NaCl در محلول شستشو، تیمارهای هورمونی برای کالوس‌زایی و همچنین باززایی از کالوس‌ها، از تیمارهای مورد برر سی بودند. تیمارهای مورد استفاده در جدول ۱ خلاصه شده است.

[1] Polyethylene glycol
[2] Macerozyme

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۱. خلاصه تیمارهای مورد بررسی برای استخراج پروتوپلاست از گیاه سیب‌زمینی

Table 1. The summary of treatments tested for the isolation of potato protoplasts

مواد گیاهی explant source	روش برش Cutting Method	غلظت آنزیم‌ها Enzyme Concentration	زمان هم‌زدن در محلول آنزیمی Shaking during incubation	زمان نگهداری در محلول آنزیمی Incubation time in enzymes	شستشو در مرحله خالص‌سازی Washing in purification step
برگ Leaves	نواری Slices cutting	بالا * (1-0.2)% High	10 minuets	16 h	Washing solution with NaCl and $CaCl_2$
بخش هوایی Stems and leaves	ساطوری Razor blade	متوسط (0.1- 0.03)% Moderate	1 h	18 h	Washing solution without NaCL and $CaCl_2$
ساقه Stems	Razor blade	پایین (0.03- 0.03)% Low	2 h	8 h	–

*به‌ترتیب از چپ درصد سلولاز R10 و مسروزیم R10 مورد استفاده

* The Cellulase R10 and Macerozyme R10 amount respectively

استخراج پروتوپلاست: در این تحقیق از گیاهان درون شیشه‌ای ۶-۴ هفته‌ای برای استخراج پروتوپلاست از بافت‌های فقط برگ، فقط ساقه و یا تمام اندام هوایی استفاده شده و روش‌های استخراج هر کدام در دو تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج و خالص‌سازی پروتوپلاست براساس روش اندرسون و همکاران در سال ۲۰۱۷ برای اعمال تیمارها صورت گرفت (Andersson et al. 2017). در این روش، حدود ۶۰-۵۰ برگ (حدود ۰/۵ گرم)، در ۲ میلی‌لیتر محیط ۱/۲MS و با استفاده از تیغ استریل، به صورت نواری به قطعات ۲-۱ میلی‌متری بریده شده، و یا به صورت جمعی برش ساطوری انجام گرفت و سپس در یک پتری‌دیش به محلول پلاسمولیز سوربیتول یا مانیتول ۰/۵ مولار (Duchefa M0803) انتقال یافتند. پس از ۳۰ دقیقه، محلول پلاسمولیز با محلول آنزیمی حاوی ۱ درصد سلولاز (Duchefa C8001 Cellulase R-10 from *Trichoderma viride*)، ۰/۲ درصد مسروزیم (Duchefa M8002 Macerozyme R-10 from *Rhizopus* sp.)، (و یا غلظت‌های پایین آنزیم‌ها مطابق جدول ۱) مانیتول و گلوکز ۰/۲ مولار با pH= ۵/۶ جایگزین شد. پتری‌دیش با فویل آلومینیومی پوشانده شده و به صورت شبانه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بدون شیکر نگهداری شد. روز بعد، پتری‌دیش به مدت ۱۰ دقیقه به صورت ملایم بهم‌زده شد (۲۰ rpm). محلول حاصل با استفاده از غربال سلولی ۷۰ میکرومتری در تیوب ۵۰ میلی‌لیتری، غربال گردید. به سوسپانسیون پروتوپلاست‌های غربال شده، محلول شستشو با ترکیب محیط ۱/۲MS حاوی NaCl ۰/۲۴ میلی‌مولار و کلرید کلسیم ۶ میلی‌مولار اضافه شده و سپس به‌مدت ۵ دقیقه در ۵۰ xg سانتریفیوژ شد. پلیت پروتوپلاست‌ها در ته تیوب تشکیل شد. محلول رویی شامل ضایعات، دیواره‌ها و سایر اندامک‌های سلولی یا پروتوپلاست‌های آسیب‌دیده بود که حذف شد. پلیت دوباره به‌آرامی در محلول شستشو سوسپانسیون شد و دو مرتبه با سانتریفیوژ ۵۰ xg شستشو تکرار گردید. به‌منظور جدا کردن

پروتوپلاست‌های سالم از بقیه ضایعات سلولی، خالص‌سازی نهایی با سانتریفیوژ در شیب غلظت ساکارز ۲۱ درصد انجام پذیرفت. پروتوپلاست‌ها ابتدا توسط یک پیپت پاستور، به‌آرامی بر روی سطح بالایی محلول ساکارز گسترده شدند و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰ xg سانتریفیوژ انجام گرفت. یک لایه در شیب غلظت بصورت یک باند ضخیم و تیره از پروتوپلاست‌ها تشکیل شد. با استفاده از پیپت پاستور این فاز برداشته شده و به یک فالکون انتقال یافت. در نهایت، پروتوپلاست‌ها در ۱ میلی‌لیتر از محلول شستشو رقیق شدند. حدود ۲۰-۱۰ میکرولیتر از این پروتوپلاست‌ها با استفاده از لام هموسایتومتر برای اندازه‌گیری تعداد پروتوپلاست زنده سالم در هر میلی‌لیتر استفاده شد. شمارش ۳ مرتبه تکرار شد.

تراریختی پروتوپلاست‌ها: در این تحقیق از ناقل pBin61-GFP حاوی ژن گزارشگر (GFP)[3] تحت پیشبر CaMV 35S برای بررسی کارآیی تراریختی پروتوپلاست‌های جداسازی شده به‌واسطه PEG 4000 (Duchefa P0804) استفاده شد. بدین‌منظور، پروتوپلاست‌ها تا حجم ۲×۱۰^{۶} پروتوپلاست در هر میلی‌لیتر، در بافر تراریختی حاوی ۱۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۰/۱ درصد MES[4]، به حالت تعلیق درآمدند. حدود ۱۰ میکرولیتر از پلاسمید pBin61-GFP به‌همراه ۱۰۰ میکرولیتر پروتوپلاست (حدود ۱۶۰۰۰۰ پروتوپلاست) و ۱۲۰ میکرولیتر از محلول ۲۰ یا ۴۰ درصد PEG 4000 برای انتقال ژن استفاده شد. نمونه‌ها در تیمارهای مختلف زمانی ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. با افزودن ۵ میلی‌لیتر محلول شستشو به هر تیوب و سانتریفیوژ با سرعت ۵۰ xg به‌مدت ۵ دقیقه، واکنش تراریختی متوقف شد.

کشت پروتوپلاست: به‌منظور بهینه‌سازی القای کالوس از ریزنمونه‌های برگی گیاه سیب‌زمینی رقم آگریا، از محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D[5]، Kin[6]، NAA[7] و BAP[8] (Duchefa) بر پایه نتایج تحقیقات قبلی (Fateri et al. 2017; Pazhouhandeh et al 2016) استفاده شد.

برای کالوس‌زایی، پروتوپلاست‌ها به‌آرامی در محیط کشت اولیه کالوس‌زایی ۱/۲MS فاقد NH_4NO_3، حاوی ساکارز ۲/۵ گرم بر لیتر، مانیتول ۰/۳ مولار، ۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به حالت سوسپانسیون درآمدند. به‌همان حجمِ محیط کشت، آلژینات[9] (Duchefa S1320) به هر نمونه اضافه شد تا حجم نهایی به نصف کاهش یابد (۸×۱۰^{۴} پروتوپلاست در میلی‌لیتر). مخلوط حاصل در دیسک‌هایی به ابعاد حدود ۲ سانتی‌متر، بر روی محیط کلسیم آگار ($CaCl_2$, Sorbitol, Agar) گسترده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس لنزهای آلژینات به پتری‌دیش‌های جدید حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از همان محیط انتقال یافتند. پتری‌دیش‌ها پارافیلم کشیده شده، با فویل آلومینیومی پوشیده شده و در دمای ۲۵

[3] Green Fluorescent Protein
[4] 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid
[5] 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid
[6] Kinetin
[7] Naphthalene Acetic Acid
[8] Benzyl AminoPurine
[9] Alginate solution

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای بررسی تقسیم سلولی و تشکیل میکروکالوس، پس از ۳ روز تاریکی، کشت‌ها به نور ۱۰۰۰ لوکس انتقال یافتند. در طول یک هفته اول، پروتوپلاست‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Olympus آنالیز شدند. به‌محض رویت میکروکالوس‌های پروتوپلاست با چشم غیرمسلح، در معرض نور کامل به محیط اصلی کالوس‌زایی ۱/۲MS، دارای مانیتول نیم مولار و ساکارز ۰/۱۷ درصد، ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP منتقل شدند. سپس کالوس‌ها برای بررسی باززایی به محیط‌های کشت جدید MS با تیمارهای هورمونی مختلف (NAA، TDZ[10]، Zeatin و GA_3) انتقال یافتند.

نتایج و بحث

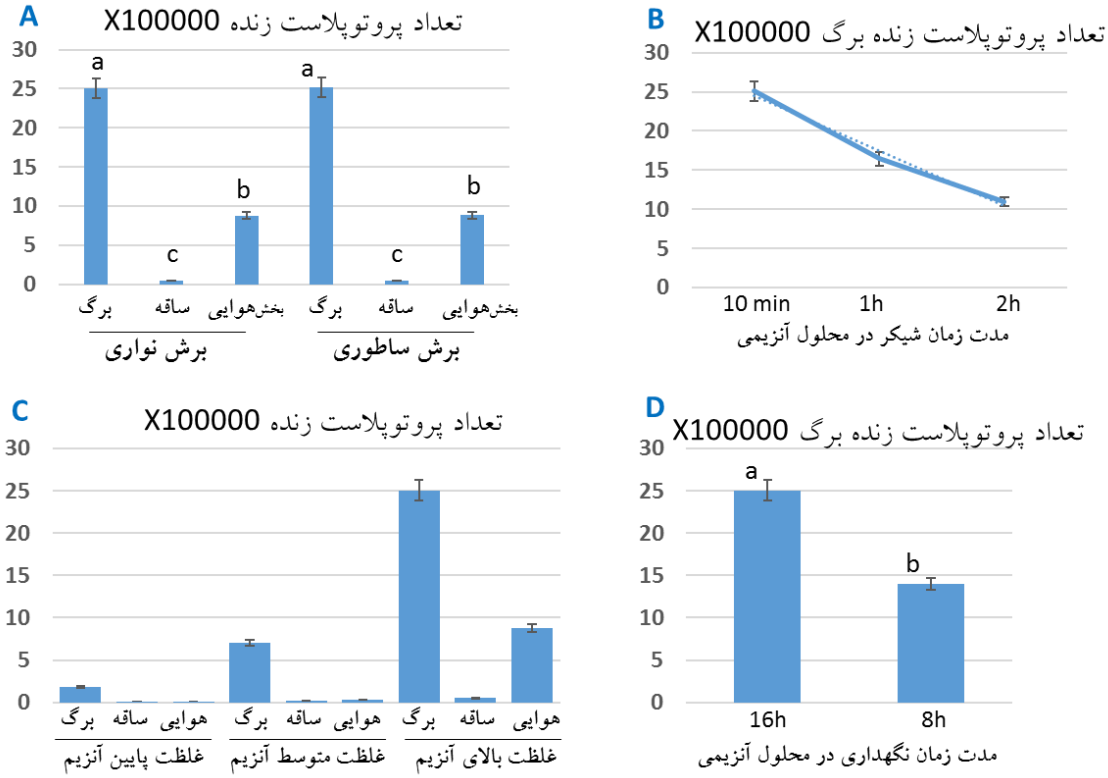
در این تحقیق، انواع بافت‌ها و نوع برش آن‌ها، اثر غلظت‌های مختلف آنزیمی، مدت زمان نگهداری در محلول آنزیمی و زمان شیکر با آنزیم‌ها و ترکیبات مورد استفاده در محلول شستشو، بر روی درصد زنده‌مانی پروتوپلاست‌های استخراج شده از بافت‌های برگ و ساقه گیاه سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت. هر یک از این تیمارها در دو تکرار انجام پذیرفت.

روش برش بافت‌ها: در تیمارهای مختلف، دو روش برش مورد بررسی قرار گرفت. در یک روش، برگ‌ها به صورت نواری برش یافتند. با توجه به‌این‌که برش با استفاده از تیغ و به صورت نوارهای بسیار نازک، کاری مشکل و زمان‌بر است و در استخراج پروتوپلاست، برش باید به سرعت صورت گیرد، بنابراین در روش‌های دیگر، ساطوری کردن بافت‌ها با برش در جهت‌های مختلف و به صورت دسته‌جمعی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بررسی‌های صورت گرفته قبل و بعد از بهم‌زدن تیمارها، هر چند روش ساطوری سریع‌تر بوده و بافت‌ها به میزان بیشتری برش یافتند، بااین‌حال، باعث آسیب بیشتر بافت‌ها شده و در نتیجه ترکیدگی سلول‌ها نیز افزایش یافته و در تعداد پروتوپلاست‌های سالم استخراج شده افزایش قابل‌توجهی مشاهده نشد (شکل ۱ A).

بهم‌زدن در طول تیمار آنزیمی: بهم‌زدن، یکی از روش‌هایی است که می‌تواند باعث نفوذ بیشتر آنزیم به بافت شده و به آزاد سازی پروتوپلاست‌ها از دیواره‌ی سلولی و بافت‌ها کمک کند، اما درعین‌حال می‌تواند مضر بوده و باعث بهم‌کوبیدن و افزایش میزان ترکیدگی پروتوپلاست‌های استخراج شده شود (Selga 2017). برای بررسی اثر فاکتور بهم زدن، یکی دیگر از تغییرات اعمال شده در این روش، افزایش مدت زمان شیکر محلول آنزیمی بود. براساس نتایج حاصل از این تیمارها، قبل و بعد از شیکر، افزایش مدت زمان شیکر کردن به ۱ و ۲ ساعت باعث آسیب پروتوپلاست‌ها و افزایش ترکیدگی آن‌ها تا حدود دو برابر گردید و بهترین مدت زمان همان ۱۰ دقیقه شیکر در محلول آنزیمی تعیین شد (شکل ۱ B).

[10] Thidiazuron

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل۱. مقایسه تیمارهای مختلف در جداسازی پروتوپلاست‌ها با شمارش تعداد پروتوپلاست‌های زنده و سالم. A) مقایسه تیمارهای نوع برش در سه بافت مورد بررسی، B) مقایسه مدت زمان شیکر در محلول آنزیمی در جداسازی از بافت برگ، C) مقایسه غلظت آنزیم‌ها در جداسازی از سه بافت، D) مقایسه مدت زمان نگهداری در محلول آنزیمی در جداسازی پروتوپلاست از بافت برگ

Figure 1. Comparison of different treatments in protoplast isolation by counting the intact protoplast. A) Comparison of cutting methods in three tissues, B) Comparison of shake time in enzyme solution from leaf tissue, C) Comparison of enzyme concentration in isolation from 3 tissues, D) Comparison of incubation time in enzyme solution in protoplasts isolation from leaf tissue

غلظت آنزیم‌ها: در بررسی میزان آنزیم‌ها، براساس سوابق تحقیقات قبلی (Prasertsongskun 2004; Echeverri et al. 2019). سه تیمار غلظت بالا (۱ درصد سلولاز و ۰/۲ درصد مسروزیم)، متوسط (۰/۱ درصد سلولاز و ۰/۰۳ درصد مسروزیم) و پایین (۰/۰۳ درصد سلولاز و ۰/۰۳ درصد مسروزیم) مورد استفاده و بررسی قرار گرفت. غلظت بالای آنزیم باعث افزایش قابل‌توجه پروتوپلاست‌های استخراجی شد (شکل ۱ C). به‌گونه‌ای که در دو تکرار، از نیم گرم برگ، بطور متوسط ۲×۱۰^{۶} پروتوپلاست در هر میلی‌لیتر استخراج شد. براساس نتایج Selga et al. (2017)، غلظت بالای آنزیم‌ها برای جداسازی پروتوپلاست‌ها مضر نیست، چرا که دیواره‌ی سلولی، تنها ترکیب سلولی است که توسط این آنزیم‌ها تخریب می شود (Selga 2017).

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

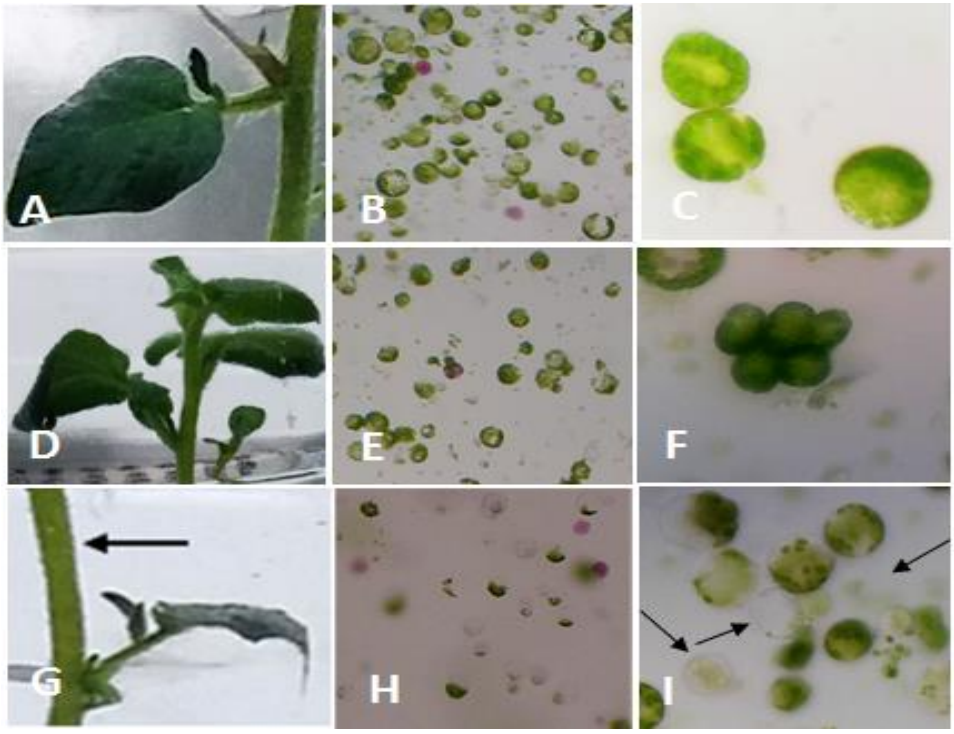
مدت زمان نگهداری در محلول آنزیمی: برای بررسی اثر زمان نگهداری در محلول آنزیمی، دو زمان مختلف نگهداری ۱۶ و ۸ ساعت در تیمارها مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده پروتوپلاست‌ها نشان داد که ۱۶ ساعت نگهداری در محلول آنزیمی مناسب‌تر است، اما افزایش مدت زمان نگهداری به ۱۸ ساعت در محلول آنزیمی اثر منفی داشته و باعث کاهش درصد پروتوپلاست‌های سالم شد. بخصوص با غلظت بالای آنزیم‌ها مدت زمان نگهداری حتی در ۱۶ ساعت باعث تخریب پروتوپلاست‌ها شد (شکل ۱ D).

بافت گیاهی مورد استفاده برای جدا سازی پروتوپلاست: در منابع بهترین بافت برای جداسازی پروتوپلاست، گیاهچه‌های جوان و برگ ذکر شده است (Potrykus & Shillito, 1986). مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق نیز گیاهچه‌های جوان درون شیشه‌ای بودند. بنابراین سه تیمار نوع بافت مورد استفاده (برگ، ساقه و قسمت هوایی و بالایی گیاهچه‌ها) برای جداسازی پروتوپلاست بررسی شد و نتایج نشان داد که از بافت برگ (با اختلاف معنی‌دار حدود ۲/۵ برابر)، پروتوپلاست‌هایی با تعداد بیشتر و اندازه بزرگ‌تر می‌توان بدست آورد (شکل ۱ A, C). در تیمارهایی که از بافت ساقه بدون برگ برای استخراج پروتوپلاست استفاده شد، براساس نتایج بررسی‌های میکروسکوپی، پروتوپلاست‌های استخراج شده از این بافت، نسبت به بافت برگی، اندازه‌ی کوچکتری داشته و حاوی پلاستیدهای کمتری بودند. محتوای این پروتوپلاست‌ها بسیار شفاف بوده و به‌همین دلیل، تشخیص آن‌ها از محیط اطراف مشکل بود (شکل ۲ I). به‌دلیل کوچکی و چگالی پایین پروتوپلاست‌ها و وجود تعداد زیادی از سلول‌های مرده در بافت آوندی ساقه، با وجود افزایش زمان تا ۱۵ دقیقه و سرعت سانتریفیوژ تا ۱۰۰ xg، پروتوپلاست‌ها در محلول شناور مانده و پلیت بسیار کمی تشکیل شد. از سوی دیگر، پایین بودن چگالی پروتوپلاست‌ها، باعث شد که خالص سازی نهایی توسط ساکارز نیز انجام نپذیرد و پروتوپلاست‌ها به جای تشکیل یک لایه در بین دو محلول، همچنان در تمام غلظت‌های شیب ساکارز شناور بمانند. این نتایج، با گزارش Mastuti و همکاران در سال ۲۰۱۸، مطابقت دارد (Mastuti & Rosyidah, 2018). براساس نتایج دیگر، خالص‌سازی چنین پروتوپلاست‌هایی با استفاده از شیب گرادیانت پرکول[11] امکان‌پذیر می‌باشد (Zanello et al. 1988). با تکرار استخراج از بافت ساقه توسط نسبت‌های آنزیمی با غلظت بالا نیز همین نتایج حاصل شد. بنابراین، ادامه بررسی‌ها روی پروتوپلاست‌های ساقه امکان‌پذیر نبود.

در تیمارهایی که از بخش هوایی گیاهان (مخلوط برگ، دمبرگ و ساقه) استفاده شد، درصد پروتوپلاست استخراجی کمتر از روش برگ بوده و کلنی‌های سلولی بزرگ‌تری مشاهده شدند (شکل ۲ F). در این روش، از نیم گرم بافت موردنظر، در دو تکرار، بطور متوسط $۰/۴ \times ۱۰^{۶}$ پروتوپلاست استخراج شد.

[11] Percoll

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

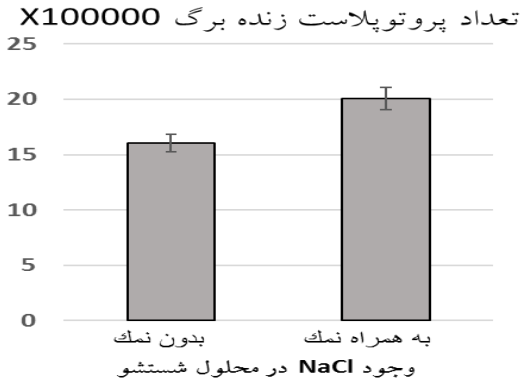


شکل ۲. بافت‌های مورد استفاده در تیمارهای مختلف و پروتوپلاست‌های استخراج شده. A) بافت برگی، B و C) پروتوپلاست‌های استخراج شده از بافت مزوفیل برگ. D) بافت مورد استفاده در تیمار بخش هوایی و بالایی گیاه، E) پروتوپلاست‌های استخراج شده از ترکیب بافت ساقه و برگ، F) کلنی‌های سلولی در محلول استخراجی، G) بافت مورد استفاده در تیمار ساقه، H) پروتوپلاست‌های استخراج شده از بافت ساقه، I) پروتوپلاست‌های شفاف و با چگالی پایین حاصل از بافت ساقه. بزرگ‌نمایی عکس‌های وسط ۱۰۰ برابر و بزرگ‌نمایی عکس‌های سمت راست ٤٠٠ برابر می‌باشد

Figure 2. The tissues used in different treatments for isolation of protoplasts. A) Leaf tissue B, C) Protoplasts extracted from leaf mesophylls, D) Used tissue is upper part of plant, E) Protoplasts extracted from leaves and stems, F) Cell colony in extracted solution, G) Used tissue used is stem, H) Protoplasts extracted from stems, I) Clear and low density protoplasts from stem tissues. Middle microscopic photos are X100 and right hand photos are X400 in scale

اثر نمک NaCl و $CaCl_2$ در محلول شستشو: کلرید سدیم یکی از ترکیباتی است که به‌عنوان تنظیم کننده‌ی فشار ا سمزی در طی ش ست شو و سانتریفیوژ عمل کرده و در نتیجه باعث افزایش زنده‌مانی پروتوپلا ست‌ها می شود. دامنه نمک مورد استفاده که باعث حفظ تمامیت غشا می‌شود بطور معمول بین ۱۰-۲ میلی‌مولار است (Binding et al. 1988). برای بررسی اثر این عامل در پایداری پروتوپلاست‌ها، طی مراحل استخراج، تیمار کلرید سدیم ۰/۲۴ میلی‌مولار در مراحل شستشو به محیط MS با نصـــف غلظت مواد اضـــافه یا حذف شـــد. این مقدار نمک NaCl به همراه نمک‌های مختلف موجود در محیط MS تقریبا میزان متو سط ۵ میلی‌مولار را برای پروتوپلا ست‌ها تامین می‌کند. برا ساس نتایج این برر سی، حذف این ماده می‌تواند از عوامل دخیل در

افزایش میزان ترکیدگی پروتوپلاستها با شد (شکل ۳) و بهتر ا ست برای شستشو از محیط کشت MS با نصف غلظت مواد به همراه ۰/۲۴ میلی‌مولار کلرید سدیم استفاده شود.



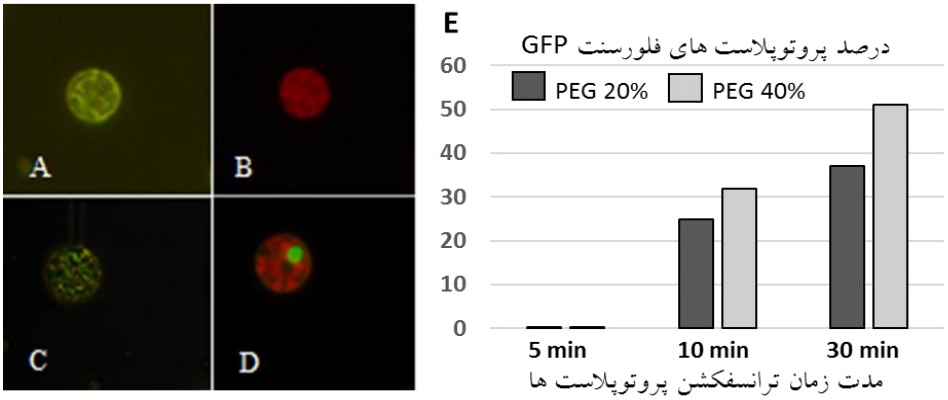
شکل۳. مقایسه تیمار وجود و فقدان نمک (۰/۲٤ میلی مولار کلرید سدیم) در مراحل شستشو در جداسازی پروتوپلاستها

Figure 3. Comparison of with or without NaCl treatment (0.24 mµ NaCl) in the washing processes in protoplast isolation

تراریختی پروتوپلاستها: در این تحقیق، به‌منظور بررسی کارآیی انتقال ژن در پروتوپلاستها، از پلاسمید pBin-61، برای بیان ژن گزارشگر GFP، و به‌عنوان ژن گزارشگر استفاده شد. به‌همین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر پروتوپلاست (حدود ۱۶۰۰۰۰ پروتوپلاست)، در بافر انتقال ژن، به حالت تعلیق درآمده و با ۱۰ میکرولیتر از پلاسمید به‌همراه PEG 4000 با غلظت ۲۰ و ۴۰ درصد، در تیمارهای زمانی ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. در طول یک هفته اول، میزان بیان و کارآیی ترانسفورم شدن پروتوپلاستها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. براساس نتایج بررسی‌ها، در تیمار زمانی ۵ دقیقه، هیچ نوع فلورسنتی در پروتوپلاستهای کشت شده مشاهده نشد. بهترین تیمار، تیمار زمانی ۳۰ دقیقه تعیین شد که حدود ۵۰ درصد پروتوپلاستها با PEG ۴۰ درصد ترانسفورم شده بودند (شکل ۴).

تعیین بهترین تیمار هورمونی برای کالوس‌زایی: به‌منظور بهینه‌سازی القای کالوس ابتدا از ریزنمونه‌های برگی گیاه سیب‌زمینی رقم آگریا، از ترکیبات و غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D، Kin، BAP و NAA براساس نتایج تحقیقات قبلی در سیب‌زمینی (Fateri Rezvani et al. 2016; Pazhouhandeh et al. 2017) ا ستفاده شد (جدول ۲). با توجه به این‌که کالوس‌زایی نیازمند مخلوطی از هورمون‌های اکسین و سیتوکنین هست بنابراین، نیاز به تست تاثیر تک به تک هورمون‌ها به تنهایی نبود. ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های در شرایط درون شیشه‌ای جدا شده، به محیط کشت پایه MS، حاوی مقادیر مختلفی از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین، در ۳ تکرار و ۶ ریزنمونه در هر تکرار منتقل شدند. ریزنمونه‌ها در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد نگهداری شدند. با توجه به این‌که مراحل اولیه تشکیل میکروکالوس در پروتوپلاستها در تاریکی صورت می‌گیرد، تیمار دوم در شرایط تاریکی اعمال شد. تمامی تیمارها پس از دو هفته در محیط

مشابه واکشت شدند. بعد از یک ماه، فراوانی القای کالوس‌ها تعیین شده و بهترین محیط، به‌عنوان غلظت مورد استفاده برای کشت پروتوپلاست‌ها تعیین شد.



شکل ٤. تصاویر میکروسکوپی از پروتوپلاست‌های شاهد و تراژن توسط GFP. A و B) پروتوپلاست‌های کنترل به‌ترتیب تحت نور سفید و فیلتر فلورسنت (اتوفلورسانس کلروپلاست‌ها)، C و D) پروتوپلاست‌های تراژن به‌ترتیب تحت نور سفید و فیلتر فلورسنت GFP، E) درصد پروتوپلاست‌های تراژن با غلظت‌های مختلف PEG و مدت زمان تراریختی. بزرگ‌نمایی میکروسکوپی X400

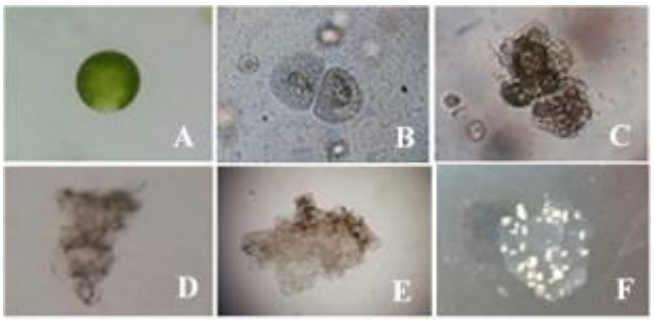
Figure 4. Microscopic image of control and GFP-transformed protoplasts. A, B) Control protoplasts under light and GFP fluorescence filtre (autofluorescence of chloroplasts) C, D) Transformed protoplasts under light and GFP fluorescence filtre respectively. E) Percentage of transformed protoplasts with PEG concentration and transfection time. Microscope magnification X400

جدول ٢- مقایسه اثر ترکیب و غلظت‌های مختلف هورمونی بر روی تشکیل کالوس از ریزنمونه‌های برگی گیاه سیب‌زمینی رقم آگریا

Table 2. Comparison of different hormone compositions and concentrations on callus formation from leaf explants of potato cv. Agria

وزن کالوس‌ها (گرم) Callus Weight (g)		درصد القای کالوس Callus indution %		هورمون‌های گیاهی مورد استفاده (میلی‌گرم بر لیتر) Plant hormones used			
Darkness تاریکی	Light روشنایی	Darkness تاریکی	Light روشنایی	NAA	BAP	Kin	2,4-D
0	0	0	0	محیط MS (کنترل) MS Medium (control)			
0.322	0	49.7	0	–	–	0.01	2
0.205	0	33.88	0	–	–	0.25	2
0.262	0	44.44	0	–	–	0.5	2
0.265	0.416	49.99	61.11	–	–	0.1	3
0	0.382	0	55.56	–	–	–	5
0	0.548	0	72.21	–	–	2	5
0.731	0	72.21	0	2	0.25	–	–
1.52	1.81	88.88	100	5	0.1	–	–

براســاس نتایج حاصــل از اعمال تیمارهای هورمونی مختلف، تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، در ایجاد توده کالوس در ریزنمونه‌های برگ، بهترین عملکرد را داشت. در این تیمار، اولین واکنش به تشکیل کالوس، پس از گذشت حدود یک هفته و افزایش حجم کالوس‌ها تقریبا از دو هفته بعد آغاز شد. در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، در تمامی ریزنمونه‌ها و در تاریکی، در حدود ۸۸ در صد از ریزنمونه‌ها، کالوس تشکیل شد. همان ترکیب هورمونی برای القای کالوس در پروتوپلاست‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفت. در کشت پروتوپلاست نیز، در تمام تیمارهای هورمونی مورد استفاده، اولین تقسیم سلولی پس از حدود ۶-۴ روز از کشت پروتوپلاست‌ها آغاز شد، اما تنها در تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، تقسیمات ادامه داشته و میکروکالوس‌ها تشکیل شدند. پس از حدود یک ماه، میکروکالوس‌ها با چشم غیرمسلح قابل مشــاهده بودند و پس از بازکشــت در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم NAA و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم BAP در لیتر، کالوس‌ها بعد از حدود دو ماه تشکیل شدند (شکل ۵). در بقیه تیمارها تقسیم سلولی در مرحله ۴-۲ سلولی متوقف شد. زمانی‌که از محیط فاقد هورمون به‌عنوان محیط کشت پروتوپلاست استفاده شد، هیچ تقسیم سلولی مشاهده نشد.



شکل ۵- A) پروتوپلاست مزوفیل برگ تازه استخراج شده، B) اولین تقسیم سلولی بعد از ٦ روز، C) کلنی‌های سلولی اولیه، D و E) میکروکالوس‌ها بعد از حدود ٦ هفته و F) میکروکالوس‌ها درون لنز آلژینات

Figure 5. A) Fresh isolated mesophyll Protoplast, B) First Cell division after 6 days, C) First cell colonies D, E) Microcalli after about 6 weeks and F) Microcallus inside the Alginate lens

تعیین بهترین تیمار هورمونی برای باززایی از کالوس: به‌منظور بهینه سازی القای جوانه‌زنی و باززایی از کالوس‌ها، کالوس‌های تولید شــده در ترکیب و غلظت‌های مختلف هورمون‌های Zeatin، Thidiazuron (TDZ)، GA_3 و NAA بر اساس نتایج تحقیقات قبلی در گیاه سیب‌زمینی (Fateri Rezvani et al. 2016; Pazhouhandeh et al. 2017) بازکشت شدند (جدول ۳). درصد باززایی از تعداد جوانه‌های ایجاد شده بر تعداد ۱۰۰ عدد کالوس کشت شده در هر ترکیب هورمونی محاسبه شد و نتایج نشان داد که بهترین تیمار باززایی از کالوس برای سیب‌زمینی رقم آگریا ترکیب هورمونی دو میلی‌گرم برلیتر Zeatin با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. Zeatin در جوانه‌زایی و باززایی ســیب‌زمینی از کالوس نقش مهمی را ایفا می‌کند.

جدول ۳- مقایسه اثر ترکیب و غلظت‌های مختلف هورمونی روی باززایی از کالوس در گیاه سیب‌زمینی رقم آگریا

Table 3. Comparison of different hormone compositions and concentrations on the regeneration of callus in potato cv. Agria

درصد باززایی از کالوس Callus regeneration %	Hormone (mg/l) هورمون (میلی‌گرم بر لیتر)			
	Zeatin	TDZ	GA_3	NAA
80[a]	2	–	0.2	–
86[a]	2	–	0.1	0.01
10[b]	–	0.03	0.03	0.02

با وجود این‌که در طول دهه‌های گذشته، ویژگی‌های منحصر بفرد پروتوپلاست‌های گیاهی، آن‌ها را به ابزار تحقیقاتی مهمی با هدف تغییر محتوای ژنتیکی سلول‌های گیاهی برای محققین بیولوژی سلولی تبدیل کرده است، تمام مراحل استخراج، خالص‌سازی، کشت و انتقال ژن، نیاز به بهینه‌سازی و ایجاد یک دستورالعمل کارا دارد. از لحاظ تئوری، پروتوپلاست‌ها سلول‌هایی توتی‌پتانت[۱۲] هستند و در نتیجه قابلیت تمایززدایی، بازگشت مجدد به چرخه‌ی سلولی، تقسیمات متوالی میتوزی و در نهایت تکثیر یا باززایی اندام‌های مختلف را دارا می‌باشند (Eeckhaut et al. 2013).

تاکنون چندین دستورالعمل مختلف برای جداسازی و خالص‌سازی پروتوپلاست در گونه‌های *Solanum* بهینه‌سازی و گزارش شده است (Cardi et al. 1990; Jones et al. 1989; Kikuta et al. 1986; Al-Maarri et al. 2014; Nadakuduti et al. 2018; Nicolia et al. 2015). اما علاوه بر سن و شرایط فیزیولوژیکی (Prasertsongskun 2004; Navrátilová et al. 2011) و سطح پلوئیدی منبع گیاهی (Roest & Gilissen 1993)، ژنوتیپ نیز از فاکتورهای بسیار موثر در بازدهی پروتوپلاست استخراجی می‌باشد (Davey et al. 2010). اثر ژنوتیپ بر روی استخراج، تقسیم و تشکیل کالوس و باززایی از پروتوپلاست‌های گیاه سیب‌زمینی، یک پدیده‌ی شناخته شده است (Cardi et al. 1990). منبع بافتی مورد استفاده برای استخراج نیز می‌تواند بر روی تعداد و کیفیت پروتوپلاست استخراجی تاثیرگذار باشد. تاکنون پروتوپلاست از بخش‌های مختلفی از گیاهان شامل برگ، دمبرگ، گلبرگ، ریشه، ساقه، میکرو سپور، دانه گرده و ... استخراج شده است (Fowke et al. 1985).

بنابراین در تلاش برای یافتن یک روش استخراج و خالص‌سازی کارآمد و درعین حال ساده و تکرارپذیر از گیاهان سیب‌زمینی رقم آگریا که به‌صورت درون شیشه‌ای رشد کرده‌اند، مطالعات مقایسه‌ای بین بافت‌های مختلف برگ، ساقه و بخش هوایی گیاهان صورت گرفت. همچنین انواع برش بافت‌ها، ترکیبات متفاوت غلظت آنزیمی، مدت زمان نگهداری در این محلول و شیکر، وجود

[12] Totipotent

نمک در محلول شستشو مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه به بحث درباره‌ی برخی از فاکتورهای موثر در استخراج پروتوپلاست که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند، پرداخته می‌شود.

سن گیاه: سن گیاه منبع، یکی از فاکتورهای کلیدی استخراج پروتوپلاست می‌باشد. استفاده از بافت‌های پیر، به‌دلیل داشتن دیواره‌ی ثانویه‌ی بزرگ‌تر، باعث کاهش تعداد پروتوپلا ست ا ستخراجی می شود (Guangyu et al. 1997). در نتیجه در صورت ا ستفاده از ک شت‌های قدیمی و بافت‌های پیر، میزان پروتوپلا ست ا ستخراجی کاهش می‌یابد. در مقابل زمانی که پروتوپلا ست‌ها از ک شت‌هایی که در مراحل اولیه‌ی فاز لگاریتمی چرخه‌ی ر شدی قرار دارند ا ستخراج شود، زنده‌مانی و تعداد پروتوپلا ست‌ها افزایش می‌یابد (Fowke & Constabel. 1985). در تحقیقات پیشین انجام گرفته بر روی گیاه سیب‌زمینی از قبیل Bokelmann et al. (1983) از گیاهان ۴-۳ هفته‌ای و در تحقیق حاضر، همانند Craig et al. (2005)، از گیاهان ۶-۴ هفته‌ای برای استخراج پروتوپلاست استفاده شد.

بافت گیاه: یکی از معمول‌ترین بافت‌های ا ستخراج پروتوپلا ست برای اکثر گونه‌های گیاهی، سلول‌های مزوفیل برگ عنوان شده ا ست. این بافت منبع منا سبی برای ا ستخراج سطح بالایی از سلول‌های نسبتا یکنواخت ا ست (Navrátilová 2004) که معمولا به سلول‌های تقسیم شونده باززا می‌شوند (Prasertsongskun 2004). برگ‌های جوان رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای، نسبت به بافت‌های برگی بالغ برای استخراج پروتوپلاست، اهمیت بیشتری دارند (Ren et al. 2020). تاکنون پروتوپلاست مزوفیل از گیاهان توتون، آرابیدوپسیس، ذرت، برنج، و گونه‌های دیگر مانند یونجه[۱۳] (Song et al. 1990)، چمن شلاقی[۱۴](Mazarei et al. 2008)، نخل روغنی آفریقایی[۱۵] (Masani et al. 2014)، درخت کائوچو[۱۶] (Zhang et al. 2016)، لوبیا[۱۷] (Nanjareddy et al. 2016) و مگنولیا[۱۸] (Shen et al. 2017) با موفقیت استخراج شده است. نتایج این بررسی نیز نشان داد که با استفاده از برگ درون شیشه‌ای گیاهان سیب‌زمینی، می‌توان درصد بالایی از پروتوپلاست‌های یک‌شکل، سالم را استخراج کرد.

پری‌پلا سمولیز: فقدان دیواره‌ی سلولی، پروتوپلا ست‌ها را بسیار شکننده و حساس به فشار ا سمزی می‌کند. برای کاهش آ سیب سیتوپلا سمی طی ا ستخراج، بافت‌ها اغلب قبل از تیمار آنزیمی، پری‌پلا سمولیز می شوند (Wiszniewska & Pindel 2010). پری‌پلاسمولیز در طی انقباض پروتوپلاست، مقدار جذب آنزیم توسط اندوسیتوز را کاهش می‌دهد. همچنین در طی جمع شدگی پروتوپلا ست‌ها، پلا سمود سماتاها بسته شده و بنابراین، احتمالا نشت محتوای سلولی کاهش می‌یابد (Fowke & Constabel 1985). پلاسمولیز سلول‌ها، باعث انقباض و در نتیجه پس‌رفت پلاسمالما از دیواره‌ی سلولی شده، و در نتیجه

13 *Medicago sativa*
14 *Panicum virgatum*
15 *Elaeis guineensis*
16 *Hevea brasiliensis*
17 *Phaseolus vulgaris*
18 Magnolia

پروتوپلاست‌های گرد در مرکز سلول تشکیل می‌شوند (Bajaj 1974). تیمار پلاسمولیز، اغلب شامل نگهداری به‌مدت چند دقیقه تا یک ساعت در محلول نمکی، شامل همان ماده اسمزی مورد استفاده در مخلوط آنزیمی، ولی فاقد آنزیم‌ها، می‌باشد (Davey et al. 2010). در تحقیقات پیشین بر روی گیاه سیب‌زمینی از مانیتول ۰/۵ مولار به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شده است (Puite et al. 1986; Al-Maarri et al. 2014). در این تحقیق، پس از برش برگ‌ها با استفاده از تیغ استریل، پلاسمولیز در محلول حاوی سوربیتول ۰/۵ مولار یا ۹ درصد به مدت ۳۰ دقیقه انجام پذیرفت.

غلظت و مدت زمان نگهداری در محلول آنزیمی: غلظت و نسبت آنزیم‌های مورد استفاده برای حجم بافت مورد نظر، یکی از فاکتورهای اصلی است که فعالیت آنزیمی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Prasertsongskun 2004; Echeverri et al. 2019). مدت زمان نگهداری در محلول آنزیمی، بسته به گیاه، بافت، دستورالعمل مورد استفاده و حتی ژنوتیپ بهینه‌سازی می‌شود. افزایش این مدت زمان، به‌دلیل ناپایداری غشای سلولی و غیراختصاصی عمل کردن محلول آنزیمی، باعث کاهش سطح پروتوپلاست استخراجی می شود (Silva et al. 2012). براساس نتایج تحقیقات، غلظت پایین آنزیم، در دمای پایین و pH بالا (۸–۵)، به‌همراه زمان کوتاه نگهداری، مناسب‌ترین شرایط فعالیت آنزیم را فراهم می‌کند. بااین‌حال این زمان می‌تواند بسته به گونه‌ی گیاهی از زمان کوتاه ۶–۲ ساعت، تا ۲۴–۱۶ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق متفاوت باشد (Navrátilová 2004). معمولا استخراج پروتوپلاست‌ها در دمای ۳۰–۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد، اما در برخی موارد، بخصوص در گونه‌های غلات، نگهداری در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد و سپس انتقال به دمای ۳۰ درجه به‌مدت کوتاه، بسیار مفید است (Vasil & Vasil. 1961).

در تحقیقات انجام گرفته بر روی گیاه سیب‌زمینی، توسط Shepard and Totten (1977) در ترکیب آنزیمی با غلظت‌های ۰/۵ درصد سلولاز، ۰/۱ درصد مسروزیم، ۴ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد با شیک ملایم، $۱۰^{۶}$ × ۳–۲ پروتوپلاست/ میلی‌لیتر، Kikuta et al. (1986)، ۱ درصد سلولاز، ۰/۰۳ مسروزیم، ۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با شیک ملایم، تعداد $۱۰^{۵}$ × ۳۶ پروتوپلاست/ میلی‌لیتر، Bokelmann et al. (1983)، ۱/۵ درصد سلولاز، ۰/۳ درصد مسروزیم به مدت ۴ ساعت در ۲۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد $۱۰^{۶}$– $۱۰^{۵}$ × ۵ پروتوپلاست/ میلی‌لیتر، Andersson et al. (2017)، ۱ درصد سلولاز، ۰/۲ مسروزیم، ۱۰ دقیقه شیک ملایم، تعداد $۱۰^{۶}$ × ۲/۹ – $۱۰^{۵}$ × ۷/۶ پروتوپلاست/ میلی‌لیتر از هر گرم بافت برگی گزارش شده است. در این تحقیق براساس روش اندرسون و همکاران (۲۰۱۷)، غلظت آنزیمی ۱ درصد سلولاز و ۰/۲ درصد مسروزیم، نگهداری به‌مدت ۱۶ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به‌همراه ۱۰ دقیقه شیکر ملایم، برای تخریب دیواره‌ی سلولی و آزادسازی پروتوپلاست‌ها از بافت‌های مزوفیل مناسب تشخیص داده شد و بالاترین سطح پروتوپلاست از نیم گرم بافت برگ تازه، جوان و سالم استخراج شد ($۱۰^{۶}$ × ۲ پروتوپلاست/میلی‌لیتر). در این روش، با افزایش غلظت آنزیم‌ها، مدت زمان نگهداری در محلول آنزیمی کاهش یافته و

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

در نتیجه پروتوپلاست‌های بی‌حفاظ از اثرات تخریبی این آنزیم‌ها محافظت می‌شوند. همچنین در این روش نیازی به شیکر طولانی مدت نبوده و از ترکیدگی و بهم کوبیده شدن پروتوپلاست‌های استخراجی جلوگیری می‌شود.

از سوی دیگر براساس نتایج حاصل، برش نواری باعث کاهش آسیب به بافت‌ها شده، همچنین افزودن کلرید سدیم ۰/۲۴ میلی‌مولار و کلرید کلسیم ۶ میلی‌مولار به محلول شستشو، باعث تنظیم فشار اسمزی، حفظ تمامیت غشای سیتوپلاسمی و در نتیجه جلوگیری از هم‌گسیختگی پروتوپلاست‌ها حین مراحل خالص‌سازی شده و باعث افزایش حدود ۲۰ درصدی پروتوپلاست‌های سالم استخراجی شد. مقدار کلرید سدیم مورد استفاده در محلول شستشوی توسط Bokelmann et al. (1983)، ۰/۳۲ میلی‌مولار و Al-Maarri et al. (2014)، ۰/۱۵ میلی‌مولار بوده است. همچنین در تحقیق انجام شده توسط Mastuti et al. (2018)، برای بررسی اثر کلرید کلسیم، پروتوپلاست‌ها دو بار در محلول شستشوی حاوی ۰/۶ مولار مانیتول، با یا بدون $CaCl_2$ ۱۰ میلی‌مولار شستشو شدند و بین این دو تیمار، تفاوت قابل‌توجهی بین تعداد پروتوپلاست‌های سالم و زنده مشاهده شد.

ترانسفورم پروتوپلاست‌ها: پروتوپلاست‌ها پتاسیل بالایی برای جذب ذراتی در ابعاد ماکرو و میکرو مانند DNA، ویروس، باکتری و حتی کلروپلاست و هسته دارند (Bajaj 1974). این قابلیت، پروتوپلاست‌ها را به ابزار مناسبی برای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک تبدیل کرده است. تراریختی بواسطه‌ی PEG، یکی از روش‌های معمول بیان موقت در پروتوپلاست‌ها می‌باشد (Cao et al. 2016; Collins 2016). مکانیسم این تراریختی شامل رسوب DNA در محلول PEG/ کاتیون دو ظرفیتی مانند Ca^{++} است که DNA را نیز از تخریب محافظت می‌کند. سپس DNA رسوب یافته، وارد پروتوپلاست می‌شود. فاکتورهای مختلفی مانند اندازه‌ی وکتور، مقدار DNA مورد استفاده، غلظت $MgCl_2$، وزن مولکولی و غلظت PEG، کارآیی تراریختی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Collins 2016). در تحقیقی که توسط Wang et al. (2021) انجام پذیرفته است، در تیمار ۳۰ میکرولیتر از پلاسمید به‌همراه PEG 4000 ۴۰ در صد و نگهداری به‌مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی، کارآیی تراریختی ۸۰/۱۹ در صد ذکر شده است. در این تحقیق بیشترین مقدار ترانسفورم پروتوپلاست‌ها، در تیمار ۴۰ درصد PEG 4000 به‌همراه ۱۰ میکرولیتر پلاسمید، به‌مدت ۳۰ دقیقه حاصل شد که حدود ۵۰ درصد پروتوپلاست‌ها ترانسفورم شده بودند. با افزایش میزان تراریختی، احتمال تولید کالوس‌هایی که ترکیبی از سلول‌های ترانسفورم شده و تیپ وحشی هستند، کاهش می‌یابد.

چگالی پروتوپلاست‌ها: چگالی بهینه‌ی پروتوپلاست‌ها، برای تشکیل دیواره‌ی سلولی، تقسیم پیوسته سلول‌های دختری و تشکیل میکروکالوس‌ها اهمیت بسیار زیادی داشته و دارای یک چگالی کشت بیشینه و کمینه برای رشد می‌باشد. بطور معمول چگالی بهینه کشت بین ۱×۱۰^{۶} – ۱×۱۰^{۴} پروتوپلاست در هر میلی‌لیتر از محیط کشت تعریف شده است. اگر چگالی بالاتر از این باشد، موادغذایی محیط کشت به‌سرعت تمام شده و در نتیجه تقسیم مداوم سلولی ادامه نمی‌یابد. سلول‌ها با آزادسازی فاکتورهای رشد شامل اسیدهای آمینه در محیط اطراف، تقسیم سلولی را در سلول‌های مجاور تحریک می‌کنند (Davey et al. 2005). از سوی دیگر، در چگالی بالا، امکان تجمع و تشکیل کلنی‌های سلولی وجود دارد (Silva Júnior et al. 2012). به‌همین ترتیب،

زمانی که چگالی کشت پایین‌تر از حد بهینه باشد نیز، تقسیم مداوم سلولی از دست می‌رود (Fowke & Constabel. 1985; Davey et al. 2005). در تحقیقات انجام شده توسط Jones et al. (1989)، تعداد $۲/۵ \times ۱۰^۴$ پروتوپلاست بر میلی‌لیتر، Anjum et al. (1998)، تعداد ۱×۱۰^۵، Cardi et al. (1990)، تعداد $۱-۲ \times ۱۰^۴$، Al-Maarri et al. (2014)، تعداد ۲×۱۰^۴، به‌عنوان چگالی بهینه‌ی کشت تعیین شده‌اند. براساس نتایج Jones et al. (1989)، در چگالی کمتر از ۱×۱۰^۴، کلنی تشکیل نشد. در این تحقیق براساس روش اندرسون و همکاران درسال ۲۰۱۷، تعداد نهایی ۸×۱۰^۴ پروتوپلاست/ میلی‌لیتر کشت شد.

در اکثر تحقیق‌های پیشین بر روی گیاه سیب‌زمینی، کشت پروتوپلاست‌ها در محیط مایع صورت گرفته است (Al-Maarri et al. 2014; Bokelmann et al. 1983; Kikuta et al. 1986, Jones et al. 1989). در این تحقیق براساس دستورالعمل اندرسون و همکاران (۲۰۱۷)، با افزودن آلژینات به هر نمونه حجم نهایی به نصف کاهش یافت و چگالی کشت نهایی به ۸×۱۰^۴ پروتوپلاست/ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط حاصل در دیسک‌هایی به ابعاد حدود ۲ سانتی‌متر، بر روی محیط کلسیم آگار گسترده شد و برای ژلاتینه شدن به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. این لنزها به پتری‌دیش‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت انتقال داده شدند.

شرایط خارجی کشت پروتوپلاست: در آغاز کشت، شدت نور بالا از رشد پروتوپلاست‌ها جلوگیری می‌کند. کشت غالبا قبل از تشکیل دیواره سلولی، به مدت چند روز (۱۰-۲ روز) در تاریکی یا نیمه تاریکی قرار داده می‌شوند. سپس به نور بین ۵۰۰۰-۱۰۰۰ لوکس انتقال می‌یابند. برخی گونه‌ها به‌صورت ژنتیکی به نور حساس هستند، درحالی‌که برخی مانند لگوم‌ها مقاوم می‌باشند. بسته به ژنوتیپ، کشت پروتوپلاست‌ها در دمای بین ۳۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد (Navrátilová 2004). در تحقیق صورت گرفته توسط Cardi et al. (1990) و Creissen (1984)، پروتوپلاست‌ها از همان ابتدا در نور کم و در دمای ۲۶-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درحالی‌که تحقیقات Al-Maarri et al. (2014)، Jones et al. (1989)، پروتوپلاست‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و Kikuta et al. (1986) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند. در این تحقیق نیز پس از کشت، پروتوپلاست‌ها به مدت ۳ روز در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۳ روز، برای تشکیل میکروکالوس، کشت‌ها به نور ۱۰۰۰ لوکس انتقال یافتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به تیمارهای مختلف انجام شده دستورالعمل زیر بصورت مرحله به مرحله معرفی می‌شود:

دستورالعمل نهایی برای استخراج، خالص‌سازی، ترانسفکشن، کشت، کالوس‌زایی و باززایی گیاه سیب‌زمینی رقم آگریا

۱- حدود ۶۰-۵۰ برگ (۰/۵ گرم)، در ۲ میلی‌لیتر محیط ۱/۲MS و با استفاده از تیغ استریل، به‌صورت نواری به قطعات ۲mm-۱ بریده شده و به محلول پلاسمولیز حاوی سوربیتول یا مانیتول ۰/۵ مولار انتقال یابد.

۲- پس از ۳۰ دقیقه، محلول پلاسمولیز با محلول آنزیمی حاوی ۱ درصد سلولاز ۰/۲ درصد مسروزیم، مانیتول ۰/۵ مولار و گلوکز ۰/۲ مولار با pH=۵/۶ جایگزین شود. پتری‌دیش با فویل آلومینیومی پوشانده شده و به‌صورت شبانه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بدون شیکر نگهداری شود و روز بعد، به مدت ۱۰ دقیقه به‌صورت ملایم بهم زده (۲۰ rpm) شود.

۳- محلول حاصل با استفاده از غربال سلولی ۷۰ میکرومتری در تیوب ۵۰ میلی‌لیتری، غربال شود. به سوسپانسیون پروتوپلاست‌های غربال شده، محلول شستشو با ترکیب محیط ۱/۲MS حاوی NaCl ۰/۲۴ میلی‌مولار و $CaCl_2$ ۶ میلی‌مولار اضافه شود و سپس به‌مدت ۵ دقیقه در ۵۰ xg سانتریفیوژ شود. محلول رویی حاوی ضایعات سلولی و پروتوپلاست‌های آسیب‌دیده حذف و پلیت دوباره به‌آرامی در محلول شستشو سوسپانسیون شود و دو مرتبه در ۵۰ xg شستشو تکرار شود.

۴- پروتوپلاست‌های استخراج شده، توسط یک پیپت پاستور، به‌آرامی بر روی سطح بالایی محلول ساکارز ۲۱ درصد گسترده شوند و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰ xg سانتریفیوژ انجام گیرد. یک لایه باند ضخیم و تیره از پروتوپلاست‌ها تشکیل خواهد شد. با استفاده از پیپت پاستور این فاز جدا شده و به یک فالکون جدید انتقال داده شود.

۵- پروتوپلاست‌ها در ۱ میلی‌لیتر از محلول شستشو سوسپانسیون شوند. ۱۰ میکرولیتر از این پروتوپلاست‌ها با استفاده از لام هموسایتومتر برای اندازه‌گیری چگالی استفاده شود (پروتوپلاست در هر میلی‌لیتر).

۶- برای ترانسفورم پروتوپلاست‌ها تا ۲×۱۰^{۶} پروتوپلاست در هر میلی‌لیتر، در بافر تراریختی تعلیق شوند. حدود ۱۰ میکرولیتر پلاسمید به‌همراه ۱۰۰ میکرولیتر پروتوپلاست (حدود ۱۶۰۰۰۰ پروتوپلاست) و ۱۲۰ میکرولیتر از محلول ۴۰ درصد PEG 4000 برای ترانسفورم استفاده شود. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شوند. با افزودن ۵ میلی‌لیتر محلول شستشو به هر تیوب و سانتریفیوژ در دور ۵۰ xg به‌مدت ۵ دقیقه، واکنش ترانسفورماسیون متوقف شود.

۷- پروتوپلاست‌ها به‌آرامی در محیط کشت اولیه کالوس‌زایی ۱/۲MS، حاوی ساکارز ۲/۵ گرم بر لیتر، مانیتول ۰/۳ مولار، ۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، سوسپانسیون شوند. به‌همان حجمِ محیط کشت، آلژینات به هر نمونه اضافه شود تا حجم نهایی به نصف کاهش یابد (۸×۱۰^{۴} پروتوپلاست/ میلی‌لیتر). مخلوط در دیسک‌هایی به ابعاد حدود ۲ سانتی‌متر، بر روی محیط کلسیم آگار گسترده شود و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و سپس لنزهای آلژینات به پتری‌دیش‌های جدید حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از همان محیط انتقال یابند. پتری‌دیش‌ها با پارافیلم و با فویل آلومینیومی پوشیده شده و به‌مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در تاریکی نگهداری شوند.

۸- پس از ۳ روز، کشت‌ها به نور ۱۰۰۰ لوکس انتقال یابند. به‌محض این‌که میکروکالوس‌های پروتوپلاست با چشم غیرمسلح قابل رویت شدند، به محیط کشت کالوس‌زایی، MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP منتقل شده و در معرض نور کامل قرار بگیرند.

۹- بعد از تشکیل کالوس‌های بزرگ محیط کشت برای القای باززایی به MS حاوی دو میلی‌گرم برلیتر Zeatin با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA3 به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA تغییر یابد تا جوانه‌ها ظاهر و جداگانه کشت شوند.

سپاسگزاری: نویسندگان از حمایت مالی و معنوی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و صندوق حمایت از پژوهشگران (شماره ۹۹۰۲۳۸۰۸) معاونت علمی فناوری ریاست جمهوری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

Al-Maarri K, Al-Qabbani N, Al-Biski F (2014) In vitro protoplast isolation and regeneration of Solanum tuberosum cv. Binella and Burren. J Agric Sci (Belihuloya) 10**,** 32-44.

Andersson M, Turesson H, Nicolia A et al. (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (Solanum tuberosum) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant cell Rep 36**,** 117-128.

Anjum MA (1998) Effect of protoplast source and media on growth and regenerability of protoplast-derived calluses of Solanum tuberosum L. Acta Physiol Plant 20**,** 129-133.

Baltes NJ, Gil-Humanes J, Voytas DF (2017) Genome engineering and agriculture: opportunities and challenges. Prog Mol Biol Transl Sci 149**,** 1-26.

Binding H, Zuba M, Rudnick J et al. (1988) Protoplast gel fusion. J Plant Physiol 133**,** 409-413.

Bajaj Y (1974) Potentials of protoplast culture work in agriculture. Euphytica 23**,** 633-649.

Baek K, Kim DH, Jeong J et al. (2016) DNA-free two-gene knockout in Chlamydomonas reinhardtii via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Sci Rep 6**,** 1-7.

Bokelmann G, Roest S (1983) Plant regeneration from protoplasts of potato (Solarium tuberosum cv. Bintje). Z Pflanzenphysiol 109**,** 259-265.

Cao Y, Li H, Pham AQ et al. (2016) An improved transient expression system using Arabidopsis protoplasts. Curr Protoc Plant Biol 1**,** 285-291.

Castelblanque L, García-Sogo B et al. (2010). Efficient Plant Regeneration from Protoplasts of Kalanchoe Blossfeldiana via Organogenesis. Plant Cel. Tiss. Organ. Cult. 100, 107–112.

Cardi T, Puite KJ, Ramulu KS (1990) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of Solanum commersonii Dun. Plant Sci 70**,** 215-221.

Cocking EC (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles Nature 187:962-963.

Collins AG (2016) Comparison of mesophyll protoplast isolation and transformation between Panicum virgatum and Panicum hallii.

Cosgrove DJ (1998) Cell walls: structure, biogenesis, and expansion. Plant Physiology" by Taiz Lincoln and Zeiger Eduardo, Sinauer Associates, Inc, Publishers**,** 409-443.

Craig W, Gargano D, Scotti N et al. (2005) Direct gene transfer in potato: a comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts. Plant Cell Rep 24**,** 603-611.

Creissen GP (1984) Protoplast regeneration and selection for toxin resistance in Solanum.

Davey MR, Anthony P, Power JB et al. (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. Biotechnol Adv 23**,** 131-171.

Davey MR, Anthony P, Patel D et al. (2010) Plant protoplasts: isolation, culture and plant regeneration. Plant cell culture essential methods Wiley-Blackwell, New York**,** 153-173.

Devaux A, Kromann P, Ortiz O (2014) Potatoes for sustainable global food security. Potato Res 57**,** 185-199.

Dlugosz EM, Lenaghan SC, Stewart Jr CN (2016) A robotic platform for high-throughput protoplast isolation and transformation. J Vis Exp**,** e54300.

Echeverri D, Romo J, Giraldo N et al. (2019) Microalgae protoplasts isolation and fusion for biotechnology research. Rev Colomb Biotecnol 21**,** 101-112.

Eeckhaut T, Lakshmanan PS, Deryckere D et al. (2013) Progress in plant protoplast research. Planta 238**,** 991-1003.

Fateri Rezvani S, Pazhouhandeh M, Shirzad A et al. (2016) Production of potato resistant plant to PVX using an RNA silencing mechanism. Genet Eng Biosaf J 5**,** 1-14.

Fowke LC, Constabel F (1985) Plant protoplasts. CRC Press Boca Raton.

Gamborg O, Phillips GC (2013) Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods. Springer Science & Business Media.

Guangyu C, Conner A, Christey M et al. (1997) Protoplast isolation from shoots of asparagus cultures. Int J Plant Sci 537-542,158.

Hameed A, Zaidi SS-e-A, Shakir S et al. (2018) Applications of new breeding technologies for potato improvement. Front Plant Sci 9**,** 925.

Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A et al. (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. Development 143**,** 1442-1451.

Jiang F, Zhu J, Liu H-L (2013) Protoplasts: a useful research system for plant cell biology, especially dedifferentiation. Protoplasma 250**,** 1231-1238.

Jones H, Karp A, Jones MG (1989) Isolation, culture, and regeneration of plants from potato protoplasts. Plant cell Rep 8**,** 307-311.

Kang HH, Naing AH, Kim CK (2020) Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived callus of Petunia hybrida cv. Mirage rose. Biology 9**,** 228.

Kikuta Y, Fujino K, Saito W et al. (1986) Protoplast culture of potato: An improved procedure for isolating viable protoplasts. Hokkaidō Daigaku Nōgakubu 62**,** 429-439.

Kim H, Kim S-T, Ryu J et al. (2017) CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. Nat Commun 8**,** 1-7.

Khromov A, Gushchin V, Timerbaev V et al. (2018) Guide RNA design for CRISPR/Cas9-mediated potato genome editing. Dokl Biochem Biophys. Springer. pp. 90-94.

Liang Z, Chen K, Li T et al. (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat Commun 8**,** 1-5.

Ling APK, Ong CPL, Tee CS et al. (2009) Establishment of protoplast isolation protocols of Orthosiphon staminues. Int J Agric Sustain 3**,** 587â.

Malnoy M, Viola R, Jung M-H et al. (2016) DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. Front Plant Sci 7**,** 1904.

Masani MYA, Noll GA, Parveez GKA et al. (2014) Efficient transformation of oil palm protoplasts by PEG-mediated transfection and DNA microinjection. PLoS One 9**,** e96831.

Mastuti R, Rosyidah M (2018) In vitro enzymatic isolation of protoplasts from tissues of the medicinal plant Physalis angulata L. In: AIP Conf Proc. AIP Publishing LLC. pp. 020002.

Mazarei M, Al-Ahmad H, Rudis MR et al. (2008) Protoplast isolation and transient gene expression in switchgrass, Panicum virgatum L. Wiley Online Library.

Muthoni J, Kabira J, Shimelis H et al. (2015) Tetrasomic inheritance in cultivated potato and implications in conventional breeding. Aust J Crop Sci 9**,** 185-190.

Nadakuduti SS, Buell CR, Voytas DF et al. (2018) Genome editing for crop improvement–applications in clonally propagated polyploids with a focus on potato (Solanum tuberosum L.). Front Plant Sci 9**,** 1607.

Nanjareddy K, Arthikala M-K, Blanco L et al. (2016) Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and improved Agrobacterium-mediated leaf disc infiltration of Phaseolus vulgaris: tools for rapid gene expression analysis. BMC Biotechnol 16**,** 1-14.

Navrátilová B (2004) Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae: A review. Hortic Sci 31**,** 140.

Navrátilová B ,Skálová D, Ondřej V et al. (2011) Biotechnological methods utilized in Cucumis research-A review. Hortic Sci 38**,** 150-158.

Nicolia A, Proux-Wéra E, Åhman I et al. (2015) Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. J Biotechnol 204**,** 17-24.

Pazhouhandeh M, Karvan G, Razavi A-S et al. (2017) A review on potato genetic engineering researches yet. Genet Eng Biosaf J 6**,** 175-188.

Potrykus I, Shillito RD (1986) Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. In: Methods Enzymol. Elsevier. pp. 549-578.

Prasertsongskun S (2004) Isolation and culture of suspension protoplasts of vetiver. Journal of Science and Technology 26**,** 411-416.

Puite K, Roest S, Pijnacker L (1986) Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid Solanum tuberosum and Solanum phureja. Plant Cell Rep 5**,** 262-265.

Ren R, Gao J, Lu C et al. (2020) Highly efficient protoplast isolation and transient expression system for functional characterization of flowering related genes in cymbidium orchids. Int J Mol Sci 21**,** 2264.

Roest S, Gilissen L (1993) Regeneration from protoplasts—a supplementary literature review. Acta botanica neerlandica 42**,** 1-23.

Selga L (2017) Optimization of protoplast methods suitable for transient CRISPR/Cas9 expression in Lepidium campestre.

Silva Júnior JMd, Paiva R, Campos ACAL et al. (2012) Protoplast production and isolation from Etlingera elatior. Acta Sci Agron 34**,** 45-50.

Shen Y, Meng D, McGrouther K et al. (2017) Efficient isolation of Magnolia protoplasts and the application to subcellular localization of MdeHSF1. Plant Methods 13**,** 1-10.

Shepard JF, Totten RE (1977) Mesophyll cell protoplasts of potato: isolation, proliferation, and plant regeneration. Plant Physiol 60**,** 313-316.

Song J, Sorensen EL, Liang GH (1990) Direct embryogenesis from single mesophyll protoplasts in alfalfa (Medicago sativa L.). Plant cell Rep 9**,** 21-25.

Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B et al. (2016) Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat Commun 7**,** 1-7.

Subburaj S, Chung SJ, Lee C et al. (2016) Site-directed mutagenesis in Petunia× hybrida protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. Plant cell Rep 35**,** 1535-1544.

Sun B, Yuan Q, Zheng H et al. (2019) An efficient and economical protocol for isolating, purifying and PEG-mediated transient gene expression of Chinese kale hypocotyl protoplasts. Plants 8**,** 385.

Verma N, Bansal M, Kumar V (2008) Protoplast fusion technology and its biotechnological applications. Chem Eng Trans 14**,** 113-120.

Vasil IK, Vasil V (1961) Isolation and culture of protoplasts. In: Int Rev Cytol .Elsevier. pp. 1-19.

Wang Q, Yu G, Chen Z et al. (2021) Optimization of protoplast isolation, transformation and its application in sugarcane (Saccharum spontaneum L). Crop J 9**,** 133-142.

Wang Y, Sonntag K, Rudloff E et al. (2005) Production of fertile transgenic Brassica napus by Agrobacterium-mediated transformation of protoplasts. Plant breed 124**,** 1-4.

Wiszniewska A, Pindel A (2010) Protoplast culture utilization in studies on legume crops. Acta Agric Scand B Soil Plant Sci 60**,** 389-399.

Zanello LP, Curvetto NR, Barrantes FJ (1988) Rapid method for isolation and purification of protoplasts from epidermal tissue ofVicia faba L. leaves. MIRCEN J Appl Microbiol Biotechnol 4**,** 275-283.

Zhang X, Wang L, He C et al. (2016) An efficient transient mesophyll protoplast system for investigation of the innate immunity responses in the rubber tree (Hevea brasiliensis). Plant Cell Tissue Organ Cult 126**,** 281-290.