مهندس مهتاب صمدی
کارشناس مجتمع تحقیقات کاربردی و تولید بذر
شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

کشت پروتوپلاست

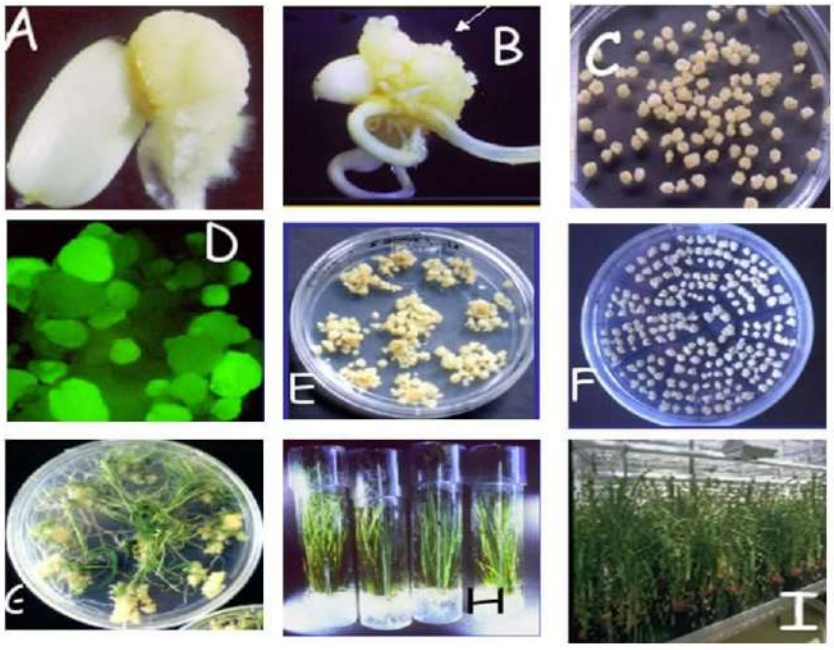
پروتوپلاست گیاهی به سلول هایی اطلاق می گردد که دیواره سلولی سفت و سخت آن ها بدون آسیب رساندن به غشای خارجی برداشته شده است. تحت شرایط اسمزی مناسب، پروتوپلاست کاملا کروی شکل می‌باشد. تلاش های اولیه برای جداسازی پروتوپلاست در اواخر قرن ۱۸ با استفاده از روش های مکانیکی شروع شد اما موفقیت محدودی داشت. استخراج آنزیم های سلولاز، macerase، پکتیناز از قارچ‌های مختلف در اواسط قرن ۱۹ فرصت جدیدی برای جداسازی پروتوپلاست از طریق هضم آنزیمی ارائه کرد. از پروتوپلاست در بسیاری از برنامه‌های کاربردی بیوتکنولوژی گیاهی و پژوهش‌های زیست شناسی مولکولی، نظیر هیبریداسیون سلول های سوماتیکی (cybridization)، تراریختگی، آزمون بیان ژن، فعل و انفعالات پروتئین- پروتئین و غربالگری برای مقاومت در برابر بیماری استفاده می‌گردد. همچنین برخی از مشکلات فیزیولوژیکی سلول‌ها نیز با استفاده از پروتوپلاست مورد مطالعه قرار می‌گیرد. مطالعات مشخص کرد که از امتزاج پروتوپلاست والدین مختلف می‌تواند ترکیبات جدید ژنتیکی حاصل کند، حتی زمانی که والدین از نظر جنسی ناسازگار باشند. بنابراین هیبریدهای منحصر به فرد که نمی‌توانند با تلاقی جنسی ایجاد شوند را می توان با امتزاج پروتوپلاست دو گونه مختلف ایجاد کرد.

سلول‌های مورد استفاده برای جداسازی پروتوپلاست ممکن است از منابع مختلف، مانند کالوس، کشت سوسپانسیون و بافت گیاه باشند. اگر از بافت گیاه استفاده شود، برگ های جوان منبع مناسبی از سلول‌ها است. زمانی که برگ استفاده می شود، لایه اپیدرمی سلول حذف شده، تا مزوفیل آن در معرض آنزیم حلال قرار گیرد و هضم دیواره سلولی صورت یابد. اگر لایه اپیدرمی به راحتی قابل حذف نباشد، برگ را بصورت نوار های باریک برش داده تا سطح تماس لایه مزوفیل حاصل شود. دیواره سلول‌ها معمولا توسط هضم آنزیمی حذف می‌شوند. آنزیم پکتیناز برای جدا کردن بافت به سلول های مجزا استفاده می شود. آنزیم های سلولاز و یا همی سلولاز برای هضم دیواره های سلول و خروج پروتوپلاست‌ها استفاده می‌شوند. جداسازی پروتوپلاست تکنیکی است که پروتکل آن باید برای هر گونه و بافت خاص بهینه گردد. برخی عوامل موثر در موفقیت جداسازی پروتوپلاست عبارتند از pH، پتانسیل اسمزی محلول های آنزیمی و ذخیره سازی، مدت زمان انکوباسیون، میزان دما و وجود یا عدم وجود سانتریفوژ می‌باشند.

اصطلاح هیبرید سوماتیک برای توصیف هیبریدهای جدید حاصل از ادغام پروتوپلاست سلول‌های سوماتیک از دو پدر و مادر مختلف ابداع شد. اولین گیاه هیبرید سوماتیک

در توتون توسط کارلسون و همکاران (۱۹۷۲) باززایی گردید. از آن زمان، گیاهان هیبرید سوماتیک از صدها ترکیب والدینی باززایی شده‌اند. هیبریداسیون سوماتیکی از طریق امتزاج پروتوپلاست به ابزار مهمی در بهبود گیاهان تبدیل شده، که برای محققان امکان ترکیب سلول‌های سوماتیک ارقام ، گونه‌ها، و یا جنس‌های مختلف، را فراهم کرده در نتیجه ترکیب ژنتیکی جدید از جمله هیبریدهای سوماتیکی آلوتتراپلوئید متقارن، هیبرید سوماتیک نامتقارن یا cybrids سوماتیک (هسته یکی از والدین و ژنوم میتوکندری یا ژنوم کلروپلاست از والد دیگر) حاصل می‌شود. این تکنیک می تواند گاهی اوقات با عبور از موانع تلاقی جنسی متعارف از جمله ناسازگاری جنسی، زمان ازدیاد طولانی، چند جنینی، عقیمی نر و ماده را اصلاح و انتقال ژن را تسهیل کند. از آنجا که پروتوپلاست (سلول برهنه) تنها توسط یک غشای سلولی احاطه شده است، می توان آن را به روش های مختلف با مزیت استفاده از تک سلول دستورزی کرد.

همچنین پروتوپلاست می تواند توسط آگروباکتریوم و یا با استفاده از روش جذب مستقیم DNA، با بهره گیری از تیمار پلی اتیلن گلیکول (PEG)، الکتروپوریشن و یا لیپوزوم تراریخته شود. جذب DNA به پروتوپلاست در حال حاضر یک روش معمول و مورد پذیرش محققین بیوتکنولوژی گیاهی برای معرفی و ارزیابی بیان کوتاه مدت (گذرا) و بلند مدت (پایدار) ژن در سلول و گیاه باززایی شده است.



منابع:

1. Roberta H, S. 1996. Plant Tissue Culture Techniques and Experiments (Third edition, 2013) Chpter 13: Protoplast Isolation and Fusion. Academic Press is an imprint of Elsevier. Pp. 147-154.

2. Trigiano, R. N. Gray, D. J. 2011. Plant tissue culture, Development, and Biotechnology. Chapter 26, Protoplasts—An Increasingly Valuable Tool in Plant Research. Taylor and Francis Group, LLC. Pp. 349-364.