مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۰، شماره ۲، پاییز وزمستان ۱۴۰۰
صفحه ۲۵۲-۲۳۷

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.2.10.2

DOR:20.1001.1.25885073.1400.10.2.10.2

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2
2022

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

پارامترهای فیزیکی و بیولوژیکی مؤثر در ایجاد گیاهان ترانسپلاستوم توتون به روش بمباران ذره‌ای توسط PDS-1000/He

Physical and Biologically Effective Parameters in Developing Transplastomic Tobacco Plants by Particle Bombardment Method using PDS-1000/He

مریم احساسات‌وطن[۱]، بهرام باغبان کهنه‌روز[۲*]، اشرف قلیزاده[۳]، حمیده افقی[۴]، داریوش شانه‌بندی[۵]

Maryam Ehsasatvatan[1], Bahram Baghban Kohnehrouz[2*], Ashraf Gholizadeh[3], Hamideh Ofoghi[4], Dariush Shanehbandi[5]

[۱] دانشجوی دکتری، [۲] دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
[۳] استاد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
[۴] دانشیار، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران
[۵] استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[1, 2] Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[3] Department of Animal Science, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Iran.
[4] Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
[5] Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email:
bahramrouz@tabrizu.ac.ir, bahramrouz@yahoo.com :

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸)

چکیده

بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در روش بمباران ذره‌ای برای انتقال DNA به کلروپلاست با کارایی بالا و بدون آسیب به بافت یک نیاز ضروری در ایجاد گیاهان ترانسپلاستوم می‌باشد. با توجه به تشابه نسبی موانع فیزیکی بر سر راه ورود ریزذرات به هسته و کلروپلاست معمولاً از ژن گزارشگر هسته‌ای *gus* استفاده می‌شود، ولی پارامترهای فیزیکی و بیولوژیکی درگیر در تراریختی پلاست‌ها بطور مستقیم گزارش نشده‌اند. در این تحقیق برای بهینه‌سازی انتقال ژن به کلروپلاست توتون پارامترهای نوع ریزذرات، غلظت DNA، فشار هلیوم شتاب‌دهنده، آرایش برگ، فاصله شلیک و مدت زمان پیش‌تیمار ریزنمونه‌ها قبل از بمباران بررسی شد. پس از انتقال ناقل کلروپلاستی به ریزنمونه‌های برگی، باززایی گیاهان ترانسپلاستوم در محیط گزینش حاوی mg/l ۵۰۰ اسپکتینومایسین انجام شد. بیشترین تعداد ترانسپلاستوم (۲/۵ گیاه به ازای هر بمباران) از واحد آزمایشی شلیک شده با ریزذرات تنگستن با قطر µm ۰/۷، مقدار µg DNA ۱، فشار هلیوم شتاب‌دهنده psi ۱۱۰۰، فاصله شلیک ٦ سانتی‌متر و دوره پیش‌تیمار ٢٤ ساعت حاصل شد، و این پارامترها به عنوان دستورالعمل کارآمد تراریختی کلروپلاستی معرفی می‌شود. گیاهان هموپلاسم پس از سه دوره باززایی در حضور آنتی‌بیوتیک‌های استرپتو/اسپکتینومایسین بدست آمدند. تأیید مولکولی درج کاست بیانی در محل دقیق ژنوم و تأیید هموپلاسمی با استفاده از آنالیز PCR و لکه‌گذاری سادرن انجام شد. گیاهچه‌های سبز و آلبینوی حاصل از جوانه‌زنی بذور تولید شده از تلاقی متقابل بین گیاهان توتون شاهد و ترانسپلاستوم، توارث مادری ژن‌های انتقالی به کلروپلاست را تائید کرد.

واژه‌های کلیدی

بمباران ذره‌ای،
ترانسپلاستوم،
تنگستن،
توتون،
کلروپلاست

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2, 2022

Abstract

Optimization of the effective parameters in the biolistic method for high-performance DNA transferring into the chloroplasts without tissue damage is a necessary requirement for developing transplastomic plants. Due to the relative similarity of the physical barriers at the entry of microcarriers into the nucleus and chloroplasts, the nuclear *gus* reporter gene is usually used, but the physical and biological parameters involved in plastid engineering have not been directly reported. In this study, to optimize gene transfer to tobacco chloroplasts, some parameters such as microcarrier type, DNA concentration, helium accelerating pressure, leaf arrangement and shooting distance, and pretreatment duration of explants before bombardment were investigated. After transferring the chloroplast's vector to explants, regeneration of transplastomic plants was performed in a selection medium containing 500 mg/l spectinomycin. The highest number of transplastomic plants (2.5 plants per bombardment) was obtained with Tungsten particles with a diameter of 0.7 μm, with 1 μg DNA/shooting, accelerating helium pressure 1100 psi, shooting distance of 6 cm and 24h pre-treatment period. Homoplasmic plants were obtained after three re-regeneration periods at the presence of both strepto/spectinomycin antibiotics. Molecular confirmation of the correct insertion of expression cassette at the targeted place of the genome and the confirmation of homoplasmy were performed using PCR analysis and southern blotting. Maternal inheritance of the transferred genes into the chloroplasts was confirmed by green and albino seedlings resulted from seed germination, product of reciprocal crosses between control and transplastomic tobacco plants.

Key words: Chloroplast, Particle bombardment, Tobacco, Transplastomic, Tungsten

مقدمه

مهندسی ژنوم کلروپلاستی بطور عمده به عنوان یک استراتژی ارزشمند برای بیان ژن‌های متنوع از منابع گوناگون و همچنین ژن‌های طراحی شده و کاملا ساختگی جهت تولید فرآورده‌های با ارزش اقتصادی بالا در حال انجام است. در این روش مکان درج ژن‌ها، به جای ژنوم هسته در ژنوم کلروپلاست بوده و مکان تجمع فرآورده ژنی نیز همجوار با ژنوم کلروپلاستی است. از جمله مهم‌ترین مزایای انتقال ژن به کلروپلاست می‌توان به توارث مادری ژن‌های پلاستیدی و در نتیجه عدم انتشار ژن انتقالی از طریق دانه گرده، سطح بالای بیان پروتئین نوترکیب به دلیل پلی‌پلوئید بودن سیستم ژنتیکی پلاستید و تعدد پلاستیدها در یک سلول گیاهی (۵۰ تا ۱۰۰ کلروپلاست در هر سلول فتوسنتز کننده) (Daniell et al., 2009)، بیان کارآمد چندین ژن در یک رخداد تراریختی، استفاده از یک پیشبر و خاتمه‌دهنده برای بیان چندین پلی‌پپتید حاصل از mRNAهای پلی‌سیسترونی و زیر واحدهای پروتئین‌های چند زیرواحدی و کمپلکس، بیان همزمان ژن‌های خوشه‌ای در یک اپرون به دلیل سیستم بیان ژن پروکاریوتی (Sugiura et al., 1998)، و همچنین عدم وجود اثرات موضعی ژن به دلیل درج هدفمند ژن در مکان مشخص از ژنوم پلاستید از طریق نوترکیبی همتای دوگانه اشاره کرد (Adem et al., 2017, Bock, 2014). از دیگر مزایای تراریختی پلاست‌ها نسبت به تراریختی هسته‌ای می‌توان عدم وجود خاموشی ژن (Fischer et al., 2004)، عدم وجود کامل اثرات پلیوتروپی به دلیل سازمان‌یابی اندامکی، و فقدان اثرات اپی‌ژنتیک را نام برد (Khan et al., 2005, Daniell, 2007). امروزه علیرغم ناتوانی پلاست‌ها در گلیکوزیلاسیون برخی از پروتئین‌های نوترکیب، پلاست‌های گیاهی به دلیل توانایی انجام دقیق تغییرات پس از ترجمه از جمله فسفریلاسیون، آمیداسیون، تاخوردگی صحیح، تشکیل پیوندهای دی‌سولفید و مونتاژ کمپلکس‌های پروتئینی چند زیرواحدی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب ارجح می‌باشند (Adem et al., 2017).

توتون به عنوان یک گیاه مدل به دلیل تولید زیست توده بالا و رشد نسبتاً سریع که مقیاس‌پذیری برای تولید صنعتی را فراهم می‌کند در کشاورزی مولکولی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

جمله آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها و مولکول‌های سیستم ایمنی مانند سایتوکاین‌ها، که بسیاری از آن‌ها در مراحل مختلف توسعه و حتی تجاری‌سازی هستند مورد توجه قرار گرفته است (Fischer et al., 2004). ژنوم پلاستیدی توتون (*Nicotiana tabacum*) به عنوان اولین گیاه عالی که تراریختی کلروپلاستی در آن به طور موفقیت‌آمیزی انجام شده است با اندازه نسبتاً کوچک ۱۵۵ kb رمز کننده ۱۱۲ ژن بوده (Bock, 2014)، و تا ۱۰۰۰۰ نسخه در هر سلول وجود دارد (Shinozaki et al., 1986, Shaver et al., 2006). بیشترین سطح تجمع پروتئین نوترکیب در گیاه، بطور باور نکردنی تا میزان ۷۰٪ پروتئین کل محلول (TSP) در تراریختی کلروپلاست گیاه توتون با ژن رمز کننده پروتئین آنتی‌بیوتیک گزارش شده است (Oey et al., 2009).

کارایی تراریختی کلروپلاست گیاهان بستگی به نوترکیبی DNA در داخل ژنوم پلاستید، گزینش سلول‌های ترانسپلاستوم و باززایی گیاه کامل هموپلاسم از سلول‌های ترانسپلاستوم دارد. امروزه، استراتژی‌های رایج برای درج تراژن‌ها در ژنوم کلروپلاست شامل تراریختی به واسطه پلی‌اتیلن گلیکول (O'Neill et al., 1993) و استفاده از تفنگ ژنی (Svab et al., 1990, Boynton et al., 1988) می‌باشد. با این‌حال روش‌های دیگری از جمله ریزتزریقی (Knoblauch et al., 1999) و یا تحریک پروتوپلاست با استفاده از ذرات شیشه برای تراریختی کلروپلاست (Kindle et al., 1991) استفاده می‌شود که کارایی کمتری دارند.

روش معمول در تراریختی کلروپلاست، روش بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی است که دارای مزیت منحصر به فرد مستقل بودن از جنس و گونه می‌باشد (Taylor and Fauquet, 2002). با این حال، مشکل اصلی مرتبط با این روش زمان مورد نیاز برای بهینه‌سازی تمام پارامترهای دخیل در انتقال DNA است. روش بمباران ذره‌ای بر انتقال مستقیم ماده ژنتیکی به سلول‌های گیاهی با بمباران ریزنمونه‌ها توسط ذرات طلا یا تنگستن پوشش داده شده با DNA با استفاده از گاز پرفشار هلیوم متکی است. کارایی تراریختی در این روش بستگی به پارامترهای فیزیکی مانند سرعت، اندازه و تعداد ذرات و همچنین مقدار DNA رسوب داده شده بر روی ذرات دارد (Sanford et al., 1993). مهمترین پارامترهای بیولوژیکی برای کارایی تراریختی بالا شامل نوع ریزنمونه و فشار اسمزی و همچنین مدت زمان پیش‌تیمار ریزنمونه قبل از بمباران است (Klein and Jones, 1999). با این حال، نکته بسیار مهم در بهینه‌سازی این پارامترها عدم آسیب کشنده به بافت در طی فرآیند بمباران است (Russell et al., 1992). میزان آسیب به بافت بستگی به آرایش و نوع ریزنمونه، چگالی ذرات و فشار شتاب دهنده دارد. پارامترهای بهینه شده با تاثیر بر میزان نفوذ و کمّیت DNA وارد شده به سلول‌ها/بافت‌های گیاهی می‌توانند به طور قابل‌توجهی درج ژن در ژنوم کلروپلاست را افزایش دهند. این امر به نوبه خود می‌تواند تعداد گیاهان ترانسپلاستوم باززایی شده از هر شلیک را افزایش دهد (Finer et al., 2000). با توجه به کاربرد روز افزون گیاه توتون به عنوان بیوراکتور گیاهی برای تولید فرآورده‌های با ارزش در کشور، هدف این تحقیق بررسی پارامترهای مؤثر بر انتقال ژن به کلروپلاست توتون به روش بمباران ذره‌ای برای دستیابی به دستورالعمل کاربردی می‌باشد تا بدون صرف هزینه‌های بالای بهینه‌سازی، تولید بالاترین تعداد گیاهان ترانسپلاستوم به ازای هر شلیک فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهچه‌های درون شیشه‌ای: برای تهیه گیاهچه‌های استریل جهت استفاده در تراریختی، از توتون *Nicotiana tabacum* رقم Perega R.2-234 استفاده شد. بذور بعد از شستشوی اولیه با آب جاری به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه، با اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه و محلول ۲۰٪ (v/v) سفید کننده تجاری (حاوی ۵٪ هیپوکلریت سدیم) همراه با یک یا دو قطره Tween 20 به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۵ بار شستشو با آب مقطر استریل هر کدام به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند. به منظور تسهیل جوانه‌زنی، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر استریل قرار داده شدند. سپس بذرهای استریل در محیط کشت MS ½ همراه با ویتامین‌های B5، ۱۰۰ mg/l میواینوزیتول، ۰/۷٪ آگار و ۳٪ ساکارز کشت شدند. تمام کشت‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط کنترل شده با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میزان نور ۱۶۰ $\mu Em^{-2}s^{-1}$ و

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

دمای ۲۴ ±۲ °C قرار داده شدند. در فرآیند تراریختی از ریزنمونه‌های برگی گیاهچه‌های ٦ تا ٨ هفته‌ای توتون استفاده شد.

پلاسمید مورد استفاده در بمباران ذره‌ای: در این تحقیق از پلاسمید کلروپلاستی pPRV111A (Zoubenko *et al.*, 1994) جهت تراریختی کلروپلاست توتون که شامل ژن شیمر آمینوگلیکوزید ۳′ آدنیلیل ترانسفراز (*aadA*) اعطا کننده مقاومت به اسپکتینومایسین/استرپتومایسین و توالی دو ناحیه *rps12* و *rrn16* است استفاده شد، که این دو ناحیه سبب انجام نوترکیبی همتای دوگانه و درج ژن *aadA* در بین ژن‌های *rps12* و *rrn16* کلروپلاست توتون می‌شود. ژن *aadA* در این ناقل تحت پیشبر و خاتمه دهنده *psbA* است (شکل ۱). پلاسمید مورد نظر پس از همسانه‌سازی در باکتری *E. coli* سویه DH5α به روش mini-prep و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید FAVARGEN (کشور تایوان) استخراج شد.

پیش‌تیمار و آماده‌سازی ریزنمونه‌های برگی جهت تراریختی: به منظور تراریختی کلروپلاست توتون، برگ‌های بالغ سبز تیره ۲۴ یا ٤٨ ساعت قبل و یا بلافاصله قبل از شلیک روی محیط RMOP (شامل نمک‌های پایه MS، ۱ mg/l تیامین، ۱ mg/l BAP و ۰/۱ mg/l NAA، ۳٪ ساکارز) (Sidorov et al., 1981)، به دو صورت سطح فوقانی یا سطح تحتانی چسبیده به محیط کشت قرار داده شدند. کشت‌ها تحت شرایط کنترل شده با تناوب نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی و دمای ۲۴ ±۲ °C قرار گرفتند.

آماده سازی ریز ذرات طلا و تنگستن و پوشش دهی آنها با پلاسمید pPRV111A: ریزذرات طلا (با قطر ۰/٦ µm) و تنگستن (با قطر ۰/ ۷ µm) طبق دستورالعمل بیوراد پس از ضدعفونی، با استفاده از کلرید کلسیم ۲/۵ M و اسپرمیدین ۰/۱ M با DNA پلاسمیدی pPRV111A (در مقادیر ۰/۵ و ۱ میکروگرم به ازای هر شلیک)، پوشش داده شده و تا زمان شلیک در اتانول خالص در دمای ۴ °C نگهداری شدند.

بمباران ریزنمونه‌های برگی آماده شده توتون: تمام فرآیند بمباران توسط دستگاه PDS-1000/He طبق دستوالعمل شرکت بیوراد تحت شرایط کاملا استریل و زیر هود لامینار انجام شد. در این عملیات پس از آماده‌سازی دستگاه و اجزای لازم و انجام تمام مراحل ضدعفونی، ابتدا ریز ذرات طلا یا تنگستن حامل پلاسمید بطور همگن در سطح تحتانی درشت پرتابه‌های مستقر در نگهدارنده ویژه، توزیع و پخش شدند. برای تعیین فشار هلیومی لازم برای عملیات بمباران، از دیسک‌های پاره شونده ۹۰۰، ۱۱۰۰ یا ۱۳۵۰ Psi استفاده شد. برای تعیین مؤثرترین فاصله ریز نمونه از توری متوقف کننده و قطر پوشش بمباران از فواصل ۳، ٦ و ۹ سانتی‌متر استفاده شد.

واکشت و نگه‌داری برگ‌های بمباران شده: برگ‌های بمباران شده به مدت ۳ روز جهت شروع بیان ژن گزینشگر در شرایط تاریکی و دمای ۲۴ ±۲ °C روی محیط RMOP نگهداری شدند. سپس برگ‌ها به قطعاتی با اندازه‌های ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متری تقسیم شده و روی محیط باززایی و گزینش (RMOP حاوی ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین) با تناوب نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ °C قرار گرفتند. واکشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت تازه هر دو هفته یکبار تا ظهور گیاهچه‌های مقاوم به اسپکتینومایسین در محیط کشت انتخابی انجام شد. به منظور دستیابی به هموپلاسمی، برگ گیاهچه‌های مقاوم رشد یافته در محیط گزینش به قطعات کوچک‌تر تقسیم شده و در محیط گزینش (RMOP حاوی ۵۰۰ mg/l استرپتومایسین و ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین) برای دور دوم باززایی قرار گرفتند. این عمل برای ۳ دوره انجام شد. ریشه‌دار کردن گیاهان ترانسپلاستوم حاصل از هر دوره باززایی (R1، R2 و R3) در محیط MS حاوی آنتی بیوتیک‌های گزینشی و بدون تنظیم کننده‌های رشد انجام شد.

سازگاری گیاهچه‌های ترانسپلاستوم: گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، جهت سازگاری به شرایط محیط طبیعی، به گلدان‌های حاوی پیت‌ماس: پرلیت (۳:۱) با شرایط رطوبت نسبی ۹٦٪ و دمای ۲ °C ±۲٤ منتقل شدند. به این منظور، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به آرامی از محیط کشت خارج شده و برای حذف باقی‌مانده محیط کشت با آب به خوبی شستشو شدند. سپس، گلدان‌ها در جعبه‌هایی با پوشش نایلونی شفاف قرار گرفتند. هر هفته آب‌دهی گیاهان برای تامین رطوبت مورد نیاز انجام گرفت. پس از رشد

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

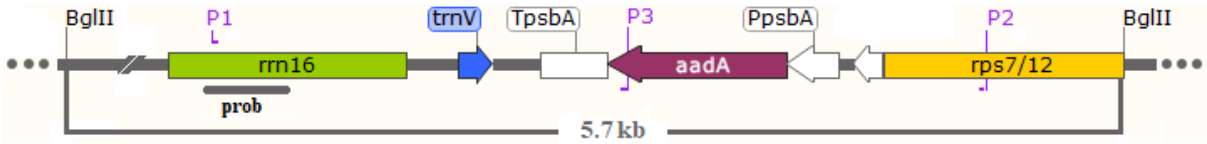
مناسب گیاهان، پوشش نایلونی تا حدی برداشته شد تا سازگاری تدریجی گیاهان به شرایط غیر استریل و طبیعی فراهم گردد. در نهایت گیاهان سازگار شده به شرایط محیط طبیعی منتقل شدند.

تأیید اولیه تراریختی با استفاده از PCR: به منظور تائید اولیه گیاهان ترانسپلاستوم، DNA کل از برگ گیاهان ترانسپلاستوم و گیاهان شاهد غیرتراریخته توتون به روش CTAB (Doyle and Doyle, 1987) استخراج شد. برای تائید درج کاست ژنی در ناحیه صحیح آن در ژنوم کلروپلاست (بین ژن‌های *rps7/12* و *16SrDNA*) آغازگر رفت (P1) از ژنوم کلروپلاست در بالادست و نزدیک به ناحیه نوترکیبی همتا و آغازگر برگشت (P3) از ژن *aadA* طراحی شد. برای تأیید درج یکپارچه کاست ژنی در گیاهان ترانسپلاستوم از آغازگرهای طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در نواحی جناحین ناحیه درج کاست ژنی (P1 و P2) استفاده شد. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است. این آغازگرها در نرم‌افزار Oligo نسخه ۷ طراحی شدند و توسط شرکت GenScript® سنتز گردیدند.

جدول ۱- آغازگرها برای تایید درج ژن و وضعیت هموپلاسمی

Table 1. primers for confirmation of gene integration and homoplasmy

آغازگر	توالی 5′-3′	دمای اتصال (°C)
P1	AACTAAACACGAGGGTTGC	۵۸
P2	AGTATTAGTTAGTGATCCCGAC	۵۸
P3	AAGAATTTGTCCACTACGTGA	۵۸



شکل ۱- نقشه فیزیکی ناحیه نوترکیبی پلاسمید pPRV111A، PpsbA: توالی راه‌انداز ژن *psbA*، *aadA*: توالی رمز کننده ژن مقاومت به اسپکتینومایسین/استرپتومایسین، TpsbA: توالی خاتمه دهنده ژن *psbA*، rrn16: توالی رمز کننده RNA ریبوزومی 16S پلاستیدی. P1، P2 و P3 مکان اتصال آغازگرهای مورد استفاده و prob جایگاه کاوشگر طراحی شده را نشان می‌دهند.

Fig 1. Physical map of recombination region of pPRV111A; PpsbA: promoter sequence of *psbA* gene, *aadA*: encoding sequence of spectino/streptomycin resistance gene, TpsbA: terminator sequence of *psbA* gene. rrn16: plastdial 16s rRNA encoding sequence, P1, P2, P: annealing sites of used primers, prob: site of designed prob.

تعیین وضعیت هموپلاسمی گیاهان ترانسپلاستوم با استفاده از لکه‌گذاری سادرن: به منظور تعیین وضعیت هموپلاسمی گیاهان ترانسپلاستوم توتون از روش لکه‌گذاری سادرن استفاده شد. در حدود ۲۵ میکروگرم DNA ژنومی با کیفیت بالا از برگ گیاهان ترانسپلاستوم و گیاهان تراریخت نشده توتون (به عنوان شاهد منفی) و همچنین پلاسمید pPRV111A (به عنوان شاهد مثبت) به وسیله آنزیم *Bgl*II (ThermoFisher) هضم شد. به منظور انتقال DNA روی غشا، نمونه‌های DNA هضم شده بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ بارگذاری شده و به وسیله الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ به مدت شش ساعت تفکیک شدند. کاوشگر نشاندار اختصاصی تراژن‌ها با استفاده از سیستم نشاندار کننده DIG از ناحیه 16SrDNA مطابق با دستورالعمل کیت PCR DIG probe synthesis kit (Roche) تهیه شد. دورگه‌سازی، مراحل شستشو و تشخیص سیگنال‌ها بر اساس دستورالعمل کیت DIG DNA Labeling and Detection (Roche، آلمان) در دستگاه هیبریداسیون انجام شد.

آزمون وراثت مادری: جهت آزمون وراثت مادری، گیاهان ترانسپلاستوم با گیاه شاهد بطور متقابل دورگ‌گیری شده و بذور حاصل از کپسول‌های دورگ از هر دو نوع والد به طور جداگانه برداشت و مورد استفاده قرار گرفتند. بذور حاصل از هر گرده‌افشانی به طور جداگانه ضدعفونی سطحی شده و در محیط گزینش شامل محیط پایه MS به همراه ویتامین‌های B5 و حاوی ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین کشت شدند. کشت‌ها تحت شرایط کنترل شده با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۴ ±۲ °C قرار گرفتند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

جدول ۲- پارامترهای بررسی شده برای بهینه‌سازی تراریختی کلروپلاستی توتون
Table 2. evaluated parameters for optimization of chloroplastic engineering in tobacco

پارامترها		شرایط آزمایش
فیزیکی	فاصله بافت هدف تا توری متوقف کننده (فاصله شلیک)	۳، ٦ و ۹ سانتی‌متر
	نوع ریزذرات	طلا با قطر µm ۰/٦ یا تنگستن با قطر µm ۰/۷
	فشار هلیوم شتاب‌دهنده	۹۰۰، ۱۱۰۰ و ۱۳۵۰ psi
بیولوژیکی	آرایش برگ	شلیک به روی برگ و پشت برگ
	مقدار DNA پلاسمیدی	۰/۵و ۱ میکروگرم
	مدت زمان پیش‌تیمار	۰، ۲٤ و ٤۸ ساعت

تجزیه و تحلیل آماری: پارامترهای بررسی شده در دستورالعمل تراریختی کلروپلاست توتون به همراه جزییات در جدول ۲ ارائه شده است. این پارامترها در دو آزمایش فاکتوریل سه عاملی در قالب طرح پایه‌ی بلوک‌های کامل تصادفی با ۲ تکرار ارزیابی و برای تجزیه داده‌ها به دلیل نرمال نبودن توزیع خطاها از روش بوت استرپینگ (Boot Strapping) استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی داری $P< ۰/۰۵$ انجام شد و داده‌ها به شکل میانگین ± انحراف استاندارد نشان داده شدند. تجزیه آماری داده‌ها و نمایش میانگین گروهبندی‌ها به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای IBM-SPSS 26.0 (IBM, USA) و MS Excel انجام شد.

نتایج و بحث

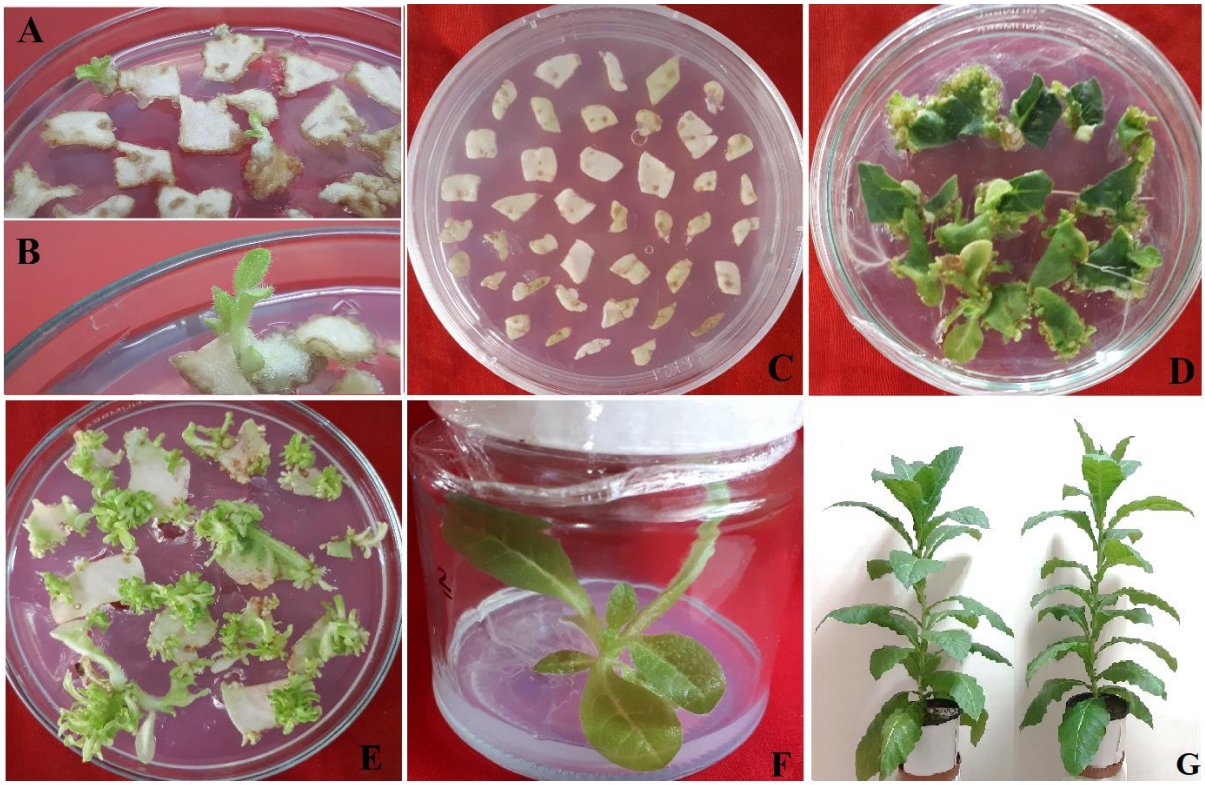
بازایی، گزینش و تولید گیاهان توتون ترانسپلاستوم بارور

جهت بازایی گیاهان ترانسپلاستوم، ریزنمونه‌های برگ ۳ روز بعد از شلیک به قطعات ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متری برش یافته و به محیط بازایی و گزینش (شامل محیط RMOP حاوی ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین) منتقل شدند. از تعداد ٤۸ شلیک انجام شده در دو آزمایش مستقل فاکتوریل سه عاملی پس از ۳ دوره گزینش پانزده روزه در مجموع ۲۵ تک گیاه ترانس‌پلاستوم احتمالی به دست آمد (شکل B و ۲A). مشاهدات فنوتیپی در تراریختی کلروپلاستی توتون بدین صورت بود که عموماً ریز نمونه‌های برگی شلیک شده و نشده در محیط گزینش در اثر آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین بتدریج اتیوله و در نهایت زرد متمایل به سفید شدند (شکل 2C)، در حالی‌که از برگ‌های شلیک نشده در محیط بدون آنتی‌بیوتیک بازایی انبوه مشاهده شد و همه مواد گیاهی به صورت سبز و شاداب باقی مانده و رشد کردند (شکل 2D)، که نشان دهنده تاثیر و کارایی اسپکتینومایسین به عنوان عامل انتخابی موفق درون کلروپلاستی در فرآیند گزینش نیمه‌کشندگی می‌باشد (Svab and Maliga, 1993). علت بروز مقاومت در سلول‌های ترانسپلاستوم اولیه تجمع آنزیم آمینوگلیکوزید آدنیلیل ترانسفراز (محصول ژن *aadA*) است. سطوح پایین این آنزیم (کمتر از ۱٪ پروتئین محلول کل سلول) برای زنده‌مانی و تکثیر سلولی و بازایی گیاهان ترانسپلاستوم در حضور غلظت ۵۰۰mg/l از دو نوع آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین و استرپتومایسین کافی است (Sinagawa-García et al., 2009). بر همین اساس، ژن *aadA* پرکاربردترین و موفق‌ترین ژن گزینش‌گر در تراریختی کلروپلاست گیاهان محسوب می‌گردد (Day and Goldschmidt-Clermont, 2011). این ژن باکتریایی منجر به گزینش موفق جلبک‌های ترانسپلاستوم (Goldschmidt-Clermont, 1991) همانند گیاهان عالی ترانسپلاستوم می‌شود (Svab and Maliga, 1993).

از آنجاییکه اثر منفی حضور استرپتومایسین در محیط گزینش علیه آغازش بازایی گزارش شده است (Bansal and Singh, 2014)، در این تحقیق از دو آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین و استرپتومایسین به صورت ترتیبی استفاده شد. به این صورت که، برای بازایی و گزینش اولیه، تنها از ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین استفاده گردید ولی در مراحل بعد و پس از دست‌یابی به گیاهان ترانسپلاستوم

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

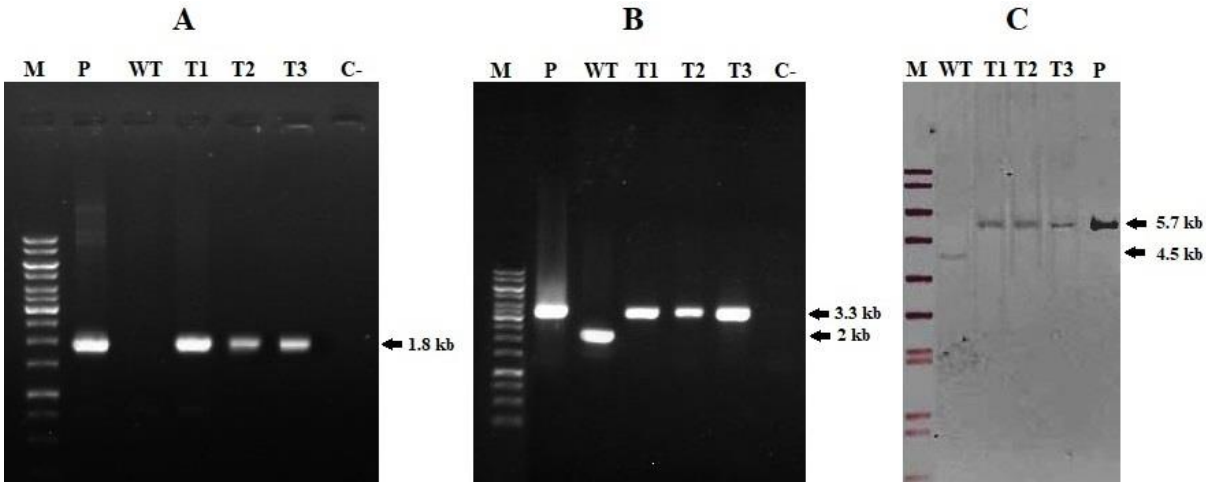
اولیه به منظور گریز از جهش‌های ریبوزومی محتمل که منجر به ایجاد مقاومت در برابر اسپکتینومایسین می‌شوند، برای ایجاد هموپلاسمی از فشار گزینشی همزمان هر دو آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین و استرپتومایسین (هر کدام در غلظت ۵۰۰ mg/l) استفاده شد. پس از اعمال ۳ دوره فشار گزینشی ممتد در محیط‌های واکشت، گیاهچه‌های ۱۰-۵ میلی‌متری از ریزنمونه‌های برگی جدا و به محیط جدید برای رشد بیشتر منتقل شدند (شکل ۲E). پس از رشد مطلوب و دو هفته بعد از انتقال به محیط ریشه‌زایی، گیاهچه‌های مقاوم به اسپکتینومایسین/استرپتومایسین ریشه‌های طبیعی تولید نمودند (شکل ۲F). سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به شرایط محیطی غیراستریل در مدت بیست روز با موفقیت انجام شد. گیاهان سازگار شده در کلیه مراحل رشد و نمو رویشی و زایشی در مقایسه با گیاهان شاهد غیر تراریخته، تغییرات مورفولوژیکی و فنوتیپی نشان ندادند (شکل ۲G). باززایی مستقیم با حداقل کال‌زایی از ریزنمونه‌های برگی در گیاه توتون بر خلاف روش‌های باززایی غیر مستقیم دارای مزایایی بسیاری از جمله تکثیر کلونی سریع با حداقل تغییرات ژنتیکی ناخواسته در کشت درون شیشه‌ای است (Stolarz et al., 1991, Pathi et al., 2013). این مزیت برای تکثیر انبوه گیاهان ترانسپلاستوم همزمان با ایجاد هموپلاسمی صد درصدی برای تولید انبوه بذور یکنواخت ژنتیکی لازم در پروژه‌های تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب حائز اهمیت است (Mondal et al., 2001).



شکل ۲- باززایی گیاهان ترانسپلاستوم توتون A، B) ظهور و رشد تک گیاهچه سبز و مقاوم در محیط RMOP حاوی ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین ۳۵ روز پس از شلیک، C) ریزنمونه برگی گیاه شاهد در محیط گزینش و زرد شدن آنها، D) باززایی گیاهچه‌های سبز از ریزنمونه برگی گیاه شاهد در محیط بدون آنتی‌بیوتیک، E) گیاهچه‌های مقاوم حاصل از دور سوم باززایی در محیط RMOP حاوی ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین، F) گیاه ترانسپلاستوم ریشه دار شده در محیط MS حاوی ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین ۳ ماه پس از شلیک، G) گیاهان ترانسپلاستوم سازگار شده به شرایط طبیعی.

Fig 2. Regeneration of transplastomic tobacco plants A, B) appearance and growth of the single green and resistant seedling on RMOP medium containing 500 mg/l spectinomycin 35 days after shooting, C) foliar explant of control plant on selection medium and yellowishing of them. D) regeneration of green shoots from foliar explant of control plant in antibiotic-free medium, E) resistant seedlings obtained from the third round of regeneration on RMOP medium containing 500 mg/l spectinomycin, F) rooted transplastomic plant in MS medium containing 500 mg/l spectinomycin 3 months after shooting, G) adapte transplastomic plants to natural conditions.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]



شکل ۳- آنالیزهای مولکولی گیاهان ترانسپلاستوم، A) تکثیر PCR با استفاده از آغازگر رفت از ژنوم کلروپلاست نزدیک به ناحیه درج کاست ژنی و آغازگر برگشت از ژن *aadA*، B) تکثیر PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در نواحی جناحین ناحیه درج کاست ژنی، C) آنالیز لکه‌گذاری سادرن، M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb DNA Ladder (Fermentas)، P: ناقل کلروپلاستی pPRV111A استفاده شده در تراریختی، WT: گیاهان توتون غیرتراریخته به عنوان شاهد، T1، T2 و T3: گیاهان ترانسپلاستوم، -C: واکنش بدون DNA به عنوان شاهد منفی.

Fig 4. Molecular analysis of transplastomic plants, A) PCR amplification using a forward primer from the chloroplast genome near the insertion site of the gene cassette and a reverse primer from the *aadA* gene, B) PCR amplification using primer pairs designed from the chloroplast genome near the insertion site of the gene cassette, C) southern blotting, M: 1 kb DNA Ladder (Fermentas) molecular weight marker, P: pPRV111A chloroplast vector used in transgenesis, WT: non-transgenic tobacco plants as control, T1, T2 and T3: Transplastomic plants, C-: DNA-free reaction as a negative control.

تأیید مولکولی درج کاست انتقالی در ژنوم کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم

اگرچه باززایی اولیه تک گیاهان ترانسپلاستوم پس از بمباران ذره‌ای و رشد گیاهچه‌های ترانسپلاستوم و باززایی مجدد آنها از ریزنمونه‌های گیاهان ترانسپلاستوم اولیه روی محیط گزینش اختصاصی کلروپلاستی (حاوی ۵۰۰ mg/l از هر کدام از اسپکتینومایسین و استرپتومایسین) می‌تواند تأیید اولیه عملکردی بر تراریختی آن‌ها باشد، ولی تأیید مولکولی درج کاست بیانی کلروپلاستی در ژنوم کلروپلاست و هموپلاسمی صددرصدی گیاهان ترانسپلاستوم به عنوان دو وجه اصلی در آنالیز مولکولی لازم و ضروری است. جهت تأیید مولکولی درج مکان صحیح و تعیین وضعیت هموپلاسمی، از آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از ژنوم و کاست انتقالی به ژنوم کلروپلاست (جدول ۱) استفاده گردید. آغازگرهای مورد استفاده طبق طراحی به عمل آمده در جایگاه صحیح ژنوم کلروپلاست توتون (آغازگر رفت) و ژن *aadA* داخل کاست ژنی (آغازگر برگشت) نشسته ومحصول PCR به طول ۱۸۰۳ bp را در تمام گیاهان ترانسپلاستوم تولید کردند، درحالیکه گیاهان شاهد قادر به تولید هیچ قطعه DNA با این جفت آغازگر نبودند (شکل ۳A). تأیید درج کاست ژنی در جایگاه مورد نظر در ژنوم کلروپلاست توتون منطبق بر کارکرد ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استرپتومایسین (ژن *aadA*) در گزینش گیاهان ترانسپلاستوم می‌باشد. اگرچه عدم تکثیر قطعه ۱۸۰۳ جفت بازی طبق گزارش‌های قبلی می‌تواند ناشی از فرار گیاهان غیر ترانسپلاستوم به دلیل جهش در ژن 16S rRNA باشد که منجر به سطح بالایی از مقاومت نسبت به اسپکتینومایسین می‌شود (Harris et al., 1994)، در این بررسی تکثیر قطعه مورد انتظار در همه گیاهان ترانسپلاستوم انجام یافته و موضوع جهش در 16srRNA منتفی است. جهت تأیید درج یکپارچه و کامل کاست بیانی در ژنوم کلروپلاست نیز از یک جفت آغازگر طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در نواحی نزدیک به ناحیه درج کاست ژنی استفاده و

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

معلوم گردید که در گیاهان ترانسپلاستوم یک قطعه DNA بطول ۳/۳ kb و هم اندازه با قطعه DNA تکثیر شده از ناقل پلاسمیدی مورد استفاده در تراریختی به عنوان شاهد مثبت تکثیر شد، در صورتیکه در گیاه شاهد و غیر تراریخته تنها قطعه یک DNA با اندازه ۲ kb تولید گردید (شکل ۳B).

تأیید وضعیت هموپلاسمی در گیاهان ترانسپلاستوم

برای تأیید دقیق مولکولی درج کاست بیانی و آگاهی کامل از وضعیت هموپلاسمی گیاهان ترانسپلاستوم از روش لکه‌گذاری سادرن استفاده شد. با استفاده از کاوشگر تهیه شده از ناحیه 16SrDNA ژنوم کلروپلاست توتون و DNA کل سلولی هضم شده با *Bgl*II یک قطعه با اندازه ۵/۷ kb در گیاهان ترانسپلاستوم و هم اندازه با قطعه حاصل در پلاسمید مورد استفاده در تراریختی به عنوان شاهد مثبت ایجاد شد، در صورتیکه درگیاهان شاهد و غیر ترانسپلاستوم قطعه ٤/٥ kb مشاهده شد (شکل ۳C). از آنجائیکه در این تحقیق از آنتی بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استرپتومایسین به طور همزمان استفاده شده است هیچ‌گونه گیاه مقاوم کاذب در بین گیاهان ترانسپلاستوم مشاهده نشد.

پارامترهای دخیل در تولید گیاهان ترانسپلاستوم توتون

اثر عوامل کلیدی و مؤثر در تولید گیاهان ترانسپلاستوم توتون با دو آزمایش فاکتوریل سه عاملی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی بررسی و نتایج تجزیه واریانس مربوطه در جداول ۳ و ٤ ارائه شده است. با توجه به ماهیت همسان ژنتیکی تمام گیاهان ترانسپلاستوم برخلاف گیاهان تراریخته هسته‌ای که تنوع در تعداد نسخه و جایگاه درج تراژن در ژنوم نشان می‌دهند، از سوی دیگر به دلیل مدیریت هزینه‌های مواد مصرفی تفنگ ژنی، احتمال بسیار پایین خطای مکانیکی دستگاه، پرتاب همزمان میلیون‌ها ذره در هر بمباران به هر نمونه و تقسیم هر نمونه شلیک شده به بیش از ۵۰ ریزنمونه (به اندازه در حدود cm^2 ۰/۳)، شلیک برای هر یک از پارامترهای ترکیبی دو بار اجرا شد، به طوریکه برای بررسی سه عامل در هر آزمایش فاکتوریل از ٢٤ شلیک استفاده گردید. تعداد گیاهان ترانسپلاستوم حاصل از هر شلیک پس از طی سه دوره گزینش از مجموع پتری‌های واکشت شده از هر شلیک محاسبه و برای تجزیه آماری مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به عدم تولید گیاه ترانسپلاتوم در تعداد قابل توجهی از تیمارهای اعمال شده و تولید موفق و کارآمد گیاه ترانسپلاستوم در تعدادی معینی از ترکیب‌های تیماری آزمون نرمال بودن داده‌های حاصل معنی‌دار شده و با توجه به نرمال نبودن توزیع خطاها از روش بوت استرپینگ (Bootstrapping) استفاده شد (Abney, 2002).

اثر غلظت DNA، نوع ریز ذره و دوره پیش تیماری

غلظت و کیفیت DNA پلاسمیدی یکی از عوامل مهم و در ارتباط با اندازه و نوع ریزذره در تراریختی به روش بمباران ذره‌ای می‌باشد. با توجه به اینکه کیفیت DNA استخراجی به کیت استخراج DNA مربوط بوده و برای کل آزمایش از یک نوع DNA استفاده شده است، تنها غلظت DNA پلاسمیدی و اثر متقابل آن با فاکتورهای دیگر بررسی گردید. بر اساس اطلاعات متریک روی مولکول DNA (طول DNA ۱۰ جفت بازی معادل ۳٤ آنگستروم) طول فیزیکی یک پلاسمید ده کیلوبازی معادل ۳/٤ میکرون می‌باشد، بزرگی شکل حلقوی یا سوپرکویل هر پلاسمید می‌تواند با اندازه ریزذرات ۰/٦ و ۰/۷ میکرونی تقریباً برابری نموده و بر همین اساس حداقل می‌توان تناسب تقریبی یک به یک برای DNA پلاسمیدی و ریزذرات پرتاب شونده را در نظر گرفت. با این حال، اتصال بیش از یک پلاسمید به هر ریزذره پرتاب شونده محتمل بوده ولی با پرتاب هر ذره حداقل یک پلاسمید یا مولکول DNA مورد نظر در سلول یا بافت هدف شلیک و رهاسازی می‌گردد. بر همین اساس پوشش موفق مولکول‌های DNA روی ریزذرات مهم بوده و راندمان این عملیات مقدار بالقوه DNA انتقال یافته به مکان هدف را تعیین می‌کند. استفاده از غلظت‌های بالاتر DNA منجر به تجمع و تشکیل توده از ریزذرات پوشش داده شده می‌شود و به هنگام بمباران نمونه برگی با ایجاد آسیب سلولی منجر به کاهش کارایی تراریختی می‌گردد (Dhir et al., 2010).

در این بررسی با توجه به دستورالعمل شرکت بیوراد در استفاده از غلظت معین ذرات که در راستای به حداقل رساندن آسیب قابل ترمیم برای بافت‌های برگی ارائه شده است، غلظت DNA در دو سطح نیم و یک میکروگرم بازای هر شلیک برای پوشش دادن ذرات تنگستن ۰/۷ میکرونی و طلای ۰/٦ میکرونی در تراریختی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

کلروپلاست توتون استفاده شد (Kikkert, 1993). ذرات تنگستن و طلای پوشش یافته با فشار هلیوم ۱۱۰۰ psi در فاصله شلیک ٦ سانتی‌متری روی سطح تحتانی برگ‌های پیش تیمار شده روی محیط RMOP در سه دوره پیش‌تیماری صفر، ٢٤ و ٤٨ ساعته در خلاء نسبی منفی ٢٦ اینچ جیوه بمباران شدند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس و معنی‌داری آزمون F برای فاکتورهای دو سطحی (جدول ۳)، بهترین نوع ریز ذره تنگستن ۰/۷ میکرونی (شکل ٤A) و بهترین غلظت DNA پلاسمیدی یک میکروگرم بازای هر شلیک معرفی شدند (شکل ٤B). دوره ٢٤ و ٤٨ ساعته پیش تیماری نیز طبق مقایسات میانگین حاصل از روش بوت استرپینگ از بین سه سطح بررسی شده بهترین مدت زمان تورژسانس سلولی برای دریافت ذرات شلیک شده معرفی گردید و شلیک به نمونه‌های بدون دوره پیش تیمار در گروه پایین‌تری قرار گرفت (شکل ٤C).

سهولت عبور موفق و کارآمد ذرات پرتاب شده از دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی، سسیتوپلاسم و غشاهای مضاعف کلروپلاستی تابع تورژسانس کامل سلولی بوده که در دوره پیش تیمار ایجاد می‌شود. بعلاوه درج DNA انتقالی به ژنوم کلروپلاست از طریق نوترکیبی ژنتیکی نیز به فعال بودن تقسیم سلولی و اندامکی مربوط بوده و بر همین اساس تحریک به فعالیت تقسیم سلولی و اندامکی شانس تراریختی را افزایش می‌دهد. طبق گزارش Taha و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Zuraida و همکاران در ۲۰۱۰، با قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی مواد مغذی و تنظیم‌کننده‌های رشد در دوره پیش تیمار ، سلول‌ها برای تقسیم فعال تحریک می‌شوند (Taha et al., 2009, Zuraida et al., 2010). از مجموع اثرات متقابل تنها اثر دو جانبه غلظت DNA پلاسمیدی با نوع ریزذره معنی‌دار بوده و طبق مقایسه میانگین سطوح ترکیبی این دو عامل به روش بوت استرپینگ، ذرات تنگستن پوشش یافته با یک میکروگرم DNA پلاسمیدی بهترین ترکیب برای استفاده در تراریختی کلروپلاستی معرفی گردید (شکل ٤D).

در این بررسی که با رعایت غلظت توصیه شده ریزذرات توسط شرکت بیوراد انجام گرفت، تنگستن ۰/۷ میکرونی بهتر از ریزذرات طلا ۰/٦ میکرونی عمل کردند. این دو نوع ریزذره بطور معمول در انتقال ژن به وسیله تفنگ ژنی معرفی شده و در تحقیقات متعدد مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اندازه و شکل ذرات بسته به خواص فیزیکی و فیزیولوژیکی جسم مورد هدف برای بمباران می‌توانند کارایی تراریختی را تحت تاثیر قرار دهند. ذرات تنگستن عموماً به دلیل سطح نامنظم به‌هنگام نگهداری بلند مدت تحت شرایط فیزیکی اکسیداتیو مستعد اتصال به همدیگر و توده‌ای شدن هستند، در حالی‌که ذرات طلا با سطوح صاف و شکل کروی و خنثی بودن از نظر شیمیایی چه به‌هنگام نگهداری و چه در طول فرآیند پوشش دادن DNA مجزا از هم باقی می‌مانند. در این بررسی ذرات طلا ۰/٦ میکرونی به دلیل احتمال پایین تشکیل توده و همچسبی (Luo et al., 2019) و ذرات تنگستن ۰/۷ میکرونی به دلیل کارایی بالا در در استقرار کارآمد DNA پلاسمیدی (Rasco-Gaunt et al., 1999) مورد استفاده قرار گرفتند.

اثر فشار هلیوم شتاب دهنده، آرایش برگی و فاصله شلیک

میزان خلاء اطاقک شلیک و نیروی محرکه گاز هلیوم، دو عامل اساسی در سرعت و نفوذ موفق ریزذرات به بافت هدف محسوب می‌شوند. فشار خلاء اتاقک برای دستگاه PDS-1000/He به کمک پمپ تخلیه برای منفی ۲۸–۲٦ اینچ جیوه تنظیم می‌شود (Hagio, 1998). فشار هلیوم شتاب دهنده نیز با استفاده از دیسک‌های استاندارد پاره‌شونده تنظیم و اعمال می‌گردد. طبق پیشنهاد Sanford و همکاران (۱۹۹۳) فشار تقریبی ۱۰۰۰ psi برای اغلب کاربردهای بیولوژیک مناسب بوده ولی با افزایش فشار هلیوم آسیب به بافت هدف به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Sanford et al., 1993). در این تحقیق تاثیر دو فشار هلیوم شتاب‌دهنده ۱۱۰۰ psi و ۱۳۵۰ psi بر کارایی تراریختی کلروپلاست توتون بررسی و نتایج حاصل از تجزیه آماری نشان داد که بیشترین تعداد گیاهان تراریخته از فشار شتاب دهنده ۱۱۰۰ psi بدست می‌آید (شکل ٥A).

اثر آرایش برگی یا نحوه قراردادن برگ روی محیط پیش تیمار و بمباران سطح فوقانی یا تحتانی برگ توتون بررسی و اختلاف بسیار معنی‌داری برای این فاکتور بدست آمد (جدول ٤، شکل

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

۵B). چنانچه با مشاهده مستقیم و با چشم غیر مسلح نیز دیده می‌شود حجم و پراکنش کرک‌های سطحی در دو سطح فوقانی و تحتانی برگ توتون بسیار متفاوت می‌باشد (شکل ٦). همین موضوع می‌تواند منجر به برتری شلیک به سطح تحتانی برگ در مقایسه با سطح فوقانی شود. علاوه بر اینکه سطح تحتانی برگ فاقد کرک‌های انبوه مشاهده شده در سطحی فوقانی است، نفوذ و تخریب کرک‌های سطح فوقانی برگ به هنگام تماس با سطح محیط کشت منجر به انتقال سریع مواد هورمونی به سلول‌های برگی می‌گردد. فاصله بین بافت هدف تا توری متوقف کننده در تعیین سطح پوشش فیزیکی بمباران و میزان نفوذ ذرات در عمق بافت‌ها مؤثر است. مطالعه اثر این پارامتر در تراریختی کلروپلاستی همانند تراریختی هسته‌ای که از موانع فیزیکی مشابهی از لحاظ تعدد غشاهای سرراهی برخوردارند از لحاظ انتشار یکنواخت ریزذرات حامل DNA روی بافت هدف بدون آسیب کشنده سلولی بسیار مهم است. به طور معمول، با افزایش فاصله و کاهش سرعت ریزذرات، امکان نفوذ ذرات به سلول‌ها کاهش می‌یابد. در این تحقیق سه فاصله ۳، ٦ و ۹ سانتی‌متری بافت هدف از توری متوقف کننده بررسی شد. تجزیه نتایج این مطالعه به روش بوت استرپینگ از طریق آزمون دانکن نشان داد که فاصله ٦ سانتی‌متری تفاوت معنی‌داری نسبت به دوفاصله ۳ و ۹ سانتی‌متری دارد (جدول ٤) و بهترین نتایج تراریختی کلروپلاست مربوط به این فاصله می‌باشد (شکل 5C). این نتایج در موافقت با گزارشات متعدد قبلی هست (Wang, 2016, Rasco-Gaunt et al., 1999).

از بین برهمکنش‌های احتمالی بین فاکتورهای بررسی شده تنها اثر متقابل آرایش برگی و فشار هلیوم معنی‌دار شد (جدول ٤). مقایسه میانگین سطوح ترکیبی این اثر متقابل به روش دانکن نشان می‌دهد بهترین ترکیب دو فاکتور مربوط به شلیک به سطح تحتانی در فشار هلیوم شتاب‌دهنده ۱۱۰۰ psi می‌باشد (شکل 5D).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات غلظت DNA، نوع ریزذرات و مدت زمان پیش‌تیمار در تولید گیاهان ترانسپلاستوم توتون.

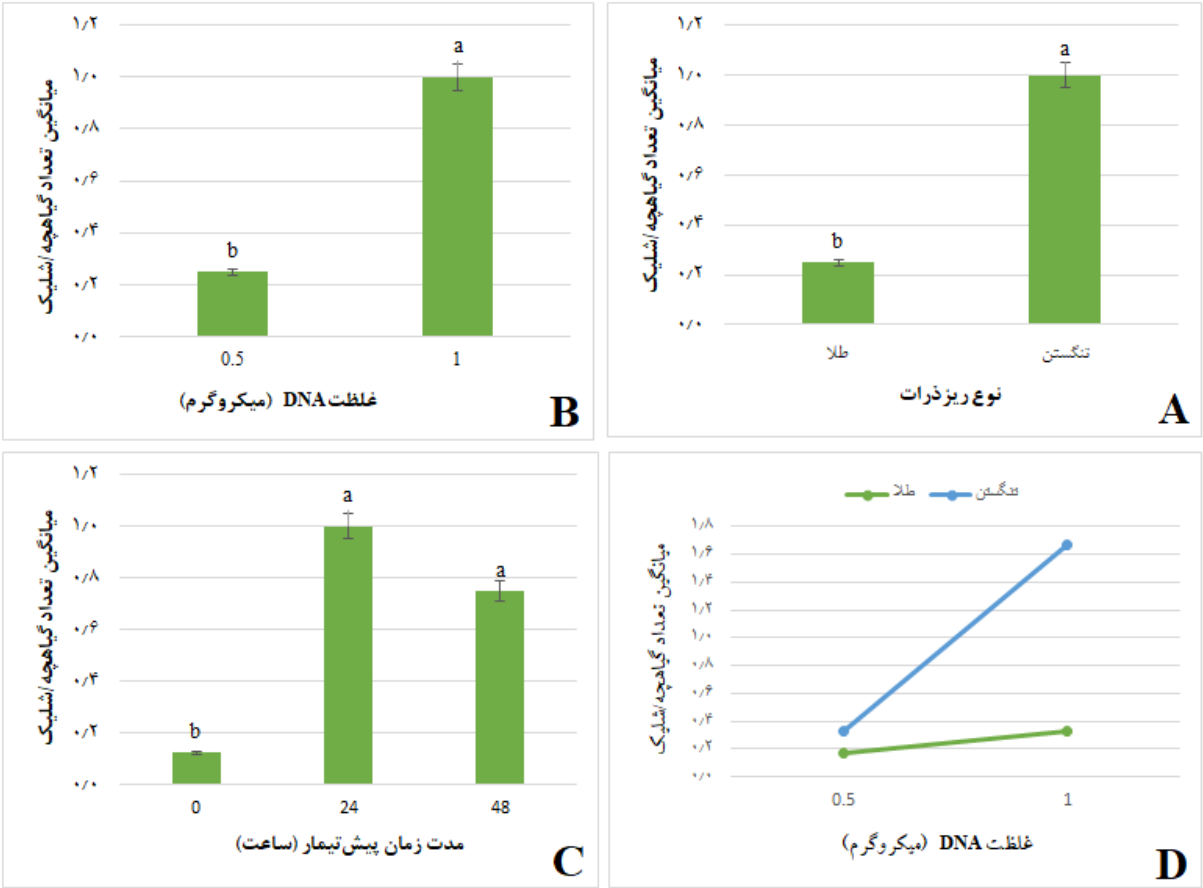
Table 3. Analysis of variance for DNA concentration, particles type and pretreatment time in developing tobacco transplastomic plants.

منابع تغییرات (SV)	df	میانگین مربعات	F
تکرار	۱	۹/۳۷۵	۳۲/۱٤۳
غلظت DNA	۱	۳/۳۷۵**	۱۱/۵۷۱
نوع ریزذرات	۱	۳/۳۷۵**	۱۱/۵۷۱
مدت زمان پیش‌تیمار	۲	۱/٦۲۵*	۵/۵۷۱
غلظت DNA × نوع ریزذرات	۱	۲/۰٤۲*	۷/۰۰۰
غلظت DNA × مدت زمان پیش‌تیمار	۲	ns ۰/۳۷۵	۱/۲۸٦
نوع ریزذرات × مدت زمان پیش‌تیمار	۲	ns ۰/۳۷۵	۱/۲۸٦
غلظت DNA × نوع ریزذرات × مدت زمان پیش‌تیمار	۲	ns ۰/۲۹۲	۱/۰۰۰
خطای آزمایش (E)	۱۲	۰/۲۹۲	
کل	۲٤		

ns،*، ** به ترتیب غیرمعنی دار، معنی دار در سطح ۵درصد و معنی دار در سطح ۱درصد

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]



شکل ٤- مقایسه میانگین تعداد گیاهچه به ازای هر شلیک با استفاده از A) دو نوع ریزذره مختلف، B) غلظت‌های متفاوت DNA و C) در زمان‌های مختلف پیش‌تیمار. D) مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزذرات و غلظت‌های متفاوت DNA بر میزان باززایی به ازای هر شلیک. ستون‌ها، SE ± میانگین صفت را نشان می‌دهند. اعداد دارای حروف غیرمشترک از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار (P< ٪٥) می باشند.

Fig 5. Mean compression of transplastomic seedling number per shot using different A) particle type B) DNA concentrations, C) pre-treatment period. D) Mean compression of interaction between particle type and DNA concentrations. Column indicate means ± SE. Treatment with different letters have a statistically significant difference (P< 5%).

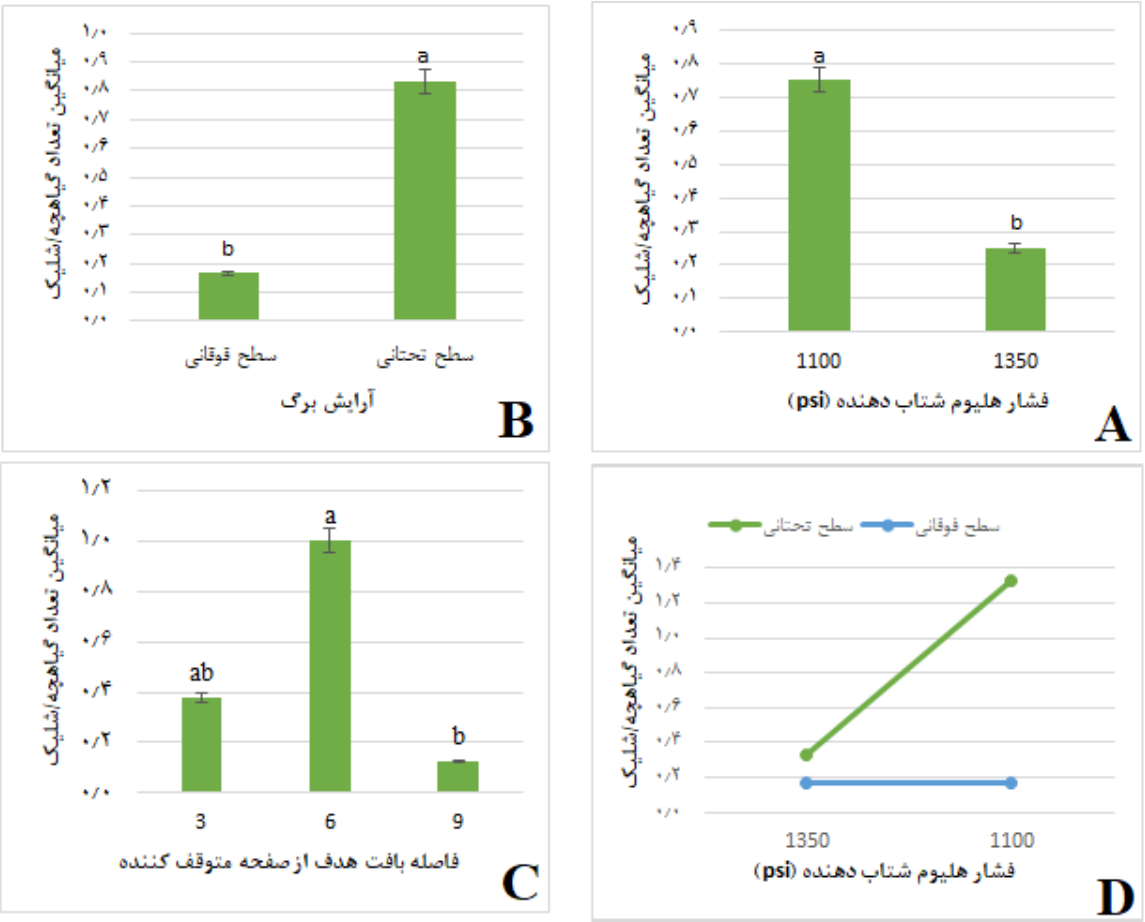
جدول ٤- تجزیه واریانس اثر متقابل فشار هلیوم شتاب‌دهنده، آرایش برگ و فاصله شلیک در تولید گیاهان ترانسپلاستوم توتون

Table 4. Analysis of variance for accelerating helium pressure, leaf arrangement and shooting distance in developing tobacco transplastomic plants.

منابع تغییرات (SV)	df	میانگین مربعات	F
تکرار	١	٦/٠٠٠	٢٤/٠٠٠
فشار هلیوم شتاب‌دهنده	١	١/٥٠٠*	٦/٠٠٠
آرایش برگ	١	٢/٦٦٧**	١٠/٦٦٧
فاصله شلیک	٢	١/٦٢٥*	٦/٥٠٠
فشار هلیوم شتاب‌دهنده × آرایش برگ	١	١/٥٠٠*	٦/٠٠٠
فشار هلیوم شتاب‌دهنده × فاصله شلیک	٢	٠/٣٧٥ ns	١/٥٠٠
آرایش برگ × فاصله شلیک	٢	٠/٢٩٢ ns	١/١٦٧
فشار هلیوم شتاب‌دهنده × آرایش برگ × فاصله شلیک	٢	٠/٣٧٥ ns	١/٥٠٠
خطای آزمایش (E)	١٢	٠/٢٥٠	
کل	٢٤		

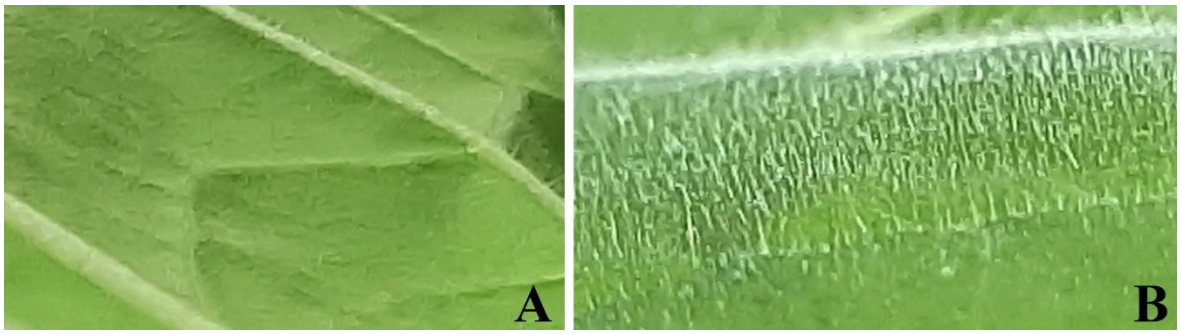
*، ** به ترتیب غیرمعنی دار، معنی دار در سطح ٥درصد و معنی دار در سطح ١درصدns

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]



شکل ۵- مقایسه میانگین تعداد گیاهچه ترانسپلاستوم به ازای هر شلیک با استفاده از A) فشار هلیوم شتاب‌دهنده متفاوت، B) شلیک به سطح فوقانی یا تحتانی برگ و C) فواصل مختلف شلیک. D) مقایسه میانگین اثر متقابل فشار هلیوم شتاب‌دهنده و آرایش برگ بر میزان باززایی به ازای هر شلیک. ستون‌ها، SE ± میانگین صفت را نشان می‌دهند. تیمارهای دارای حروف غیرمشترک از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار (P< ٪۵) می باشند.

Fig 6. Mean compression of transplastomic seedling number per shot using different A) accelerating helium pressure B) shooting on upper or lower surface, C) shooting distance. D) Mean compression of interaction between accelerating helium pressure and leaf arrangement. Column indicate means ± SE. Treatment with different letters have a statistically significant difference (P< 5%).



شکل ٦- تصویر بزرگنمایی شده از سطح A) تحتانی و B) فوقانی برگ توتون

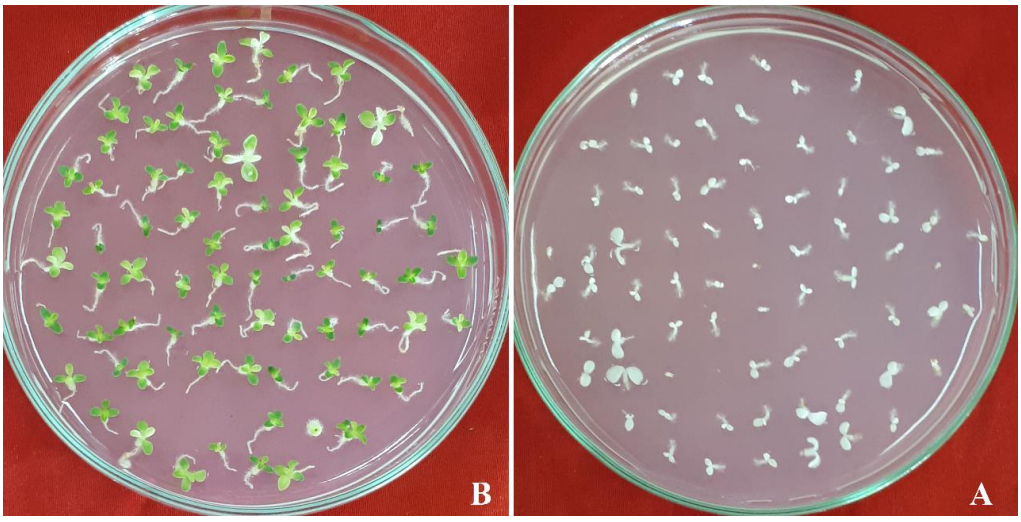
Fig 7. Magnified images of the B) lower surface and B) upper surface of tobacco leaves

تأیید آزمون وراثت مادری

با توجه با رعایت مقررات ایمنی زیستی مرتبط با تولید فرآورده‌های نوترکیب در فناوری تراریختی و حسن گیاه توتون در توارث مادری ژن‌های سیتوپلاسمی عملاً امکان فرار ژن‌های محصور شده کلروپلاستی منتفی بوده و در این بررسی نیز توارث مادری ژن‌های انتقالی به ژنوم کلروپلاست از طریق نرعقیمی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

گل‌های والد ماده و گرده افشانی با گل‌های نر مابین دو گیاهان ترانسپلاستوم با گیاه شاهد از طریق تلاقی‌های متقابل بررسی گردید. بذور حاصل از تلاقی گیاهان پس از ضدعفونی سطحی در محیط MS حاوی ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین کشت شدند (شکل ۷). چنانچه در شکل ۷ مشاهده می‌گردد گیاهچه‌های حاصل از تلاقی والد ماده ترانسپلاستوم با والد گرده‌افشان نر شاهد سبز تیره بودند، در حالیکه گیاهچه‌های حاصل از تلاقی متقابل این گیاهان یعنی تلاقی بین والد ماده شاهد با والد گرده‌افشان ترانسپلاستوم صد درصد سفید یا آلبینو بودند. این موضوع مجدداً عدم فرار ژن‌های کلروپلاستی از والد ترانسپلاستوم را اثبات می‌کند. هرگونه ظهور گیاهچه سبز حاصل از تلاقی دوم نشان دهنده حضور کلروپلاست در دانه گرده بوده و می‌توانست وراثت مادری ژن‌های انتقالی را زیر سوال ببرد.



شکل ۷– A) جوانه‌زنی بذور حاصل از تلاقی گیاه شاهد غیرتراریخته به عنوان والد مادری با گیاه ترانسپلاستوم و B) گیاه ترانسپلاستوم به عنوان والد مادری با گیاه شاهد غیرتراریخته در حضور ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین.

Fig 7. A) Germination of seeds resulted from the crossing of a maternal non-transgenic plant with a paternal transplastomic plant and B) maternal transplastomic plant with a paternal non-transgenic control plant in the presence of 500 mg/l spectinomycin.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق با توجه به هزینه‌های بالای بمباران کلروپلاستی جهت تولید گیاه ترانسپلاستوم توتون که فعلا به عنوان یکی از گیاهان مهم اقتصادی برای تولید فرآورده‌های نوترکیب مطرح است، فاکتورهای متغیر بررسی و دستورالعمل لازم برای استفاده در انتقال ژن به کلروپلاست توتون به روش بمباران ذره‌ای ایجاد شد. نتایج این تحقیق نشان داد که پارامترهای بهینه برای بیان ژن در برگ توتون شامل ریزذرات تنگستن با قطر ۰/۷ µm، DNA ۱ µg به‌ازای هر شلیک، فشار شتاب‌دهنده ۱۱۰۰ psi و فاصله شلیک ٦ سانتی‌متری از بافت هدف بود که با بمباران بخش تحتانی برگ‌های پیش‌تیمار شده روی محیط RMOP به مدت ٢٤ ساعت به دست آمد.

رشد پایدار گیاهچه‌های ترانسپلاستوم و باززایی پیوسته آنها از ریزنمونه‌های برگی گیاهان ترانسپلاستوم در محیط گزینش حاوی ۵۰۰ mg/l از هر کدام از اسپکتینومایسین و استرپتومایسین در محدوده زمانی کوتاه این امکان را فراهم می‌آورد تا مقادیر مورد نیاز از بذور تجاری ترانسپلاستوم را برای استفاده‌های ضروری تولید نمود. عملاً مدت زمان رسیدن به تولید انبوه بذور در گیاهان تراریخته هسته‌ای مستلزم گذر از چرخه‌های زندگی متعدد و تثبیت هموزیگوسیتی بوده ولی در تراریختی پلاستیدی گیاه توتون و بخاطر پاسخ مطلوب باززایی پیوسته و انبوه می‌توان به اندازه مورد نیاز بذر گیاه ترانسپلاستوم تولید و برای کشت تجاری گلخانه‌ای استفاده نمود. این موضوع در تامین نیازهای ضروری مثل تولید و تأمین سریع هر گونه فرآورده بیولوژیک مثل واکسن در شرایط ویژه از محاسن فناوری ترانسپلاستوم محسوب می‌گردد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

دستیابی به تعداد بیشتر گیاه تراریخته به‌ازای هر بمباران در پروژه‌های انتقال ژن از جوانب متفاوت دارای اهمیت است. بطور عمده در تراریختی هسته‌ای تعدد رویداد تراریختی برای انتخاب کارآمدترین گیاه تراریخته مطرح است، درحالیکه در تراریختی کلروپلاستی کلیه ترانسپلاستوم‌های حاصل بخاطر هدف‌گیری و درج دقیق کاست‌های ژنی در ژنوم کلروپلاست دقیقاً مشابه هم بوده و صرفاً محققین بخاطر اخذ سریع نتیجه، صرفه‌جویی در مواد مصرفی در فرآیند بمباران ذره‌ای و کاهش حجم گزینش، به ویژه همگام کار با کاست‌های بزرگ ژنی در جستجو و استفاده از پارامترهای بهینه شده هستند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه مصوب دانشگاه تبریز و بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی با شماره ۹۹۰۱٤۷۲٤ مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران است که بدینوسیله از حمایت مادی و معنوی صندوق حمایت از پژوهشگران تشکر و قدردانی می‌شود. از جناب آقای دکتر محمد مقدم واحد (دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی) به خاطر یاری در آنالیز آماری به روش بوت استرپینگ و جناب آقای دکتر رضا درویش‌زاده (دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی) به خاطر فراهم آوردن بذر توتون (رقم perega) سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Abney S. 2002. Bootstrapping. In: Proceedings of the 40th annual meeting of the Association for Computational Linguistics, 360-367.

Adem M, Beyene D, Feyissa T. 2017. Recent achievements obtained by chloroplast transformation. Plant Methods 13(1):30.

Bansal KC, Singh AK. 2014. Plastid transformation in eggplant. In: Maliga P (Ed.) Chloroplast Biotechnology: Methods and Protocols, Springer, Berlin, 305-316.

Bock R. 2014. Genetic engineering of the chloroplast: novel tools and new applications. Current Opinion in Biotechnology 26:7-13.

Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, et al. 1988. Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles. Science 240(4858):1534-1538.

Daniell H. 2007. Transgene containment by maternal inheritance: effective or elusive? Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 104(17):6879-6880.

Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ. 2009. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. Trends in Plant Science 14(12):669-679.

Day A, Goldschmidt-Clermont M. 2011. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. Plant Biotechnology Journal 9(5):540-553.

Dhir S, Knowles K, Pagan CL, Mann J. 2010. Optimization and transformation of *Arundo donax* L. using particle bombardment .African Journal of Biotechnology 9(39):6460-6469.

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.

Finer J, Finer K, Ponappa T. 2000. Particle bombardment mediated transformation. In: Hammond J (Ed.) Plant Biotechnology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 59-80.

Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. Current Opinion in Plant Biology 7(2):152-158.

Goldschmidt-Clermont M. 1991. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of Chlamydomonas. Nucleic Acids Research 19(15):4083-4089.

Hagio T. 1998. Optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation. Japan Agricultural Research Quarterly 32:239-248.

Harris EH, Boynton JE, Gillham NW. 1994. Chloroplast ribosomes and protein synthesis. Microbiological Reviews 58(4):700-714.

Khan MS, Khalid AM, Malik KA. 2005. Intein-mediated protein trans-splicing and transgene containment in plastids. Trends in Biotechnology 23(5):217-220.

Kikkert JR. 1993. The biolistic® PDS-1000/He device. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33(3):221-226.

Kindle KL, Richards KL, Stern DB. 1991. Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in Chlamydomonas reinhardtii. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 88(5):1721-1725.

Klein TM, Jones TJ. 1999. Methods of genetic transformation: the gene gun. In: Vasil IK (Ed.) Molecular improvement of cereal crops: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 21-42.

Knoblauch M, Hibberd JM, Gray JC, van Bel AJ. 1999. A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. Nature Biotechnology 17(9):906-909.

Luo Y, Wang F, Mu X, Kang Z, Gao H, Wang X. 2019. Optimization of transient expression of GUS after DNA delivery into wheat calli and leaves. Journal of Biotech Research 10:50-58.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]

Mondal T, Bhattacharya A, Ahuja P, Chand P. 2001. Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Reports 20(8):712-720.

Oey M, Lohse M, Scharff LB, Kreikemeyer B, Bock R. 2009. Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 106(16):6579-6584.

O'Neill C, Horvath GV, Horvath E, Dix PJ, Medgyesy P. 1993. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. The Plant Journal 3(5):729-738.

Pathi KM, Tula S, Tuteja N. 2013. High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient Agrobacterium-mediated genetic transformation of tobacco. Plant Signaling & Behavior 8(6):24354.

Rasco-Gaunt S, Riley A, Barcelo P, Lazzeri P. 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. Plant Cell Reports 19(2):118-27.

Russell JA, Roy MK, Sanford JC. 1992. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. Plant Physiology 98(3):1050-1056.

Sanford J, Smith F, Russell J. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods in Enzymology 217:483-509.

Shaver JM, Oldenburg DJ, Bendich AJ. 2006. Changes in chloroplast DNA during development in tobacco, Medicago truncatula, pea, and maize. Planta 224(1):72-82.

Shinozaki K ,Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, et al. 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. The EMBO Journal 5(9):2043-2049.

Sidorov V, Menczel L, Maliga P. 1981. Isoleucine-requiring Nicotiana plant deficient in threonine deaminase. Nature 294:87-88.

Sinagawa-García SR, Tungsuchat-Huang T, Paredes-López O, Maliga P. 2009. Next generation synthetic vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. Plant Molecular Biology 70(5):487-498.

Stolarz A, Macewicz J, Lörz H. 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of Nicotiana tabacum L. Journal of Plant Physiology 137(3):347-357.

Sugiura M, Hirose T, Sugita M. 1998. Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. Annual Review of Genetics 32(1):437-459.

Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. 1990. Stable transformation of plastids in higher plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 87(21):8526-8530.

Svab Z, Maliga P. 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. Proceedings, USA of the National Academy of Sciences 90(3):913-917.

Taha A, Wagiran A, Ghazali H, Huyop F, Parveez G. 2009. Optimization and transformation of garden balsam, Impatiens balsamina, mediated by microprojectile bombardment. Biotechnology 8(1):1-12.

Taylor NJ, Fauquet CM. 2002. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. DNA and Cell Biology 21(12):963-977.

Wang ES. 2016. Construction and molecular characterisation of an improved chloroplast transformation vector system as a versatile delivery and expression platform for in-vitro propagated Nicotiana benthamiana [dissertation]. University of Nottingham pp: 341.

Zuraida A, Rahiniza K, MR NH, Roowi S, Zamri Z, Subramaniam S. 2010. Factors affecting delivery and transient expression of gusA gene in Malaysian indica rice MR 219 callus via biolistic gun system. African Journal of Biotechnology 9(51):8810-8818.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.18.0]