Archive of SID

Crop Biotech.
Summer (2018) 22: 65-79.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره بیست‌ودوم، تابستان ۱۳۹۷ (۷۹-۶۵)

مقاله علمی- مروری

بیان‌گذرای ژن در گیاهان و کاربردهای آن در کشاورزی مولکولی و شناسایی عملکرد ژن‌ها

کتایون زمانی*
استادیار پژوهشی، بخش مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۵/۲۳)

Transient gene expression in plants and its application in molecular farming and functional genomics

Katayoun Zamani*
Assistant Professor, Department of Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education, and Extension Organization, Karaj, Iran
(Received: Dec. 30, 2017 - Accepted: Aug. 14, 2018)

چکیده

تراریختی گذرای گیاهان روشی مفید و در برخی موارد جایگزینی مناسب برای تراریختی پایدار به ویژه در غلات، گیاهان درختی و گیاهانی است که باززایی و یا تراریختی آنها با مشکل مواجه است. در این روش در زمانی کوتاه تعداد زیادی از نسخه‌های تراژن وارد سلول گیاهی شده، رونویسی و ترجمه می‌شوند و چون توالی DNA در ژنوم میزبان وارد نمی‌شود، بیان ژن تحت تاثیر محل درج و تغییرات اپی‌ژنتیکی قرار نمی‌گیرد. تراریختی گذرا روشی مفید و کارآمد در مطالعات بررسی عملکرد ژن‌ها مانند بیش بیان ژن، خاموش کردن ژن، شبکه بیانی ژن‌ها، تعیین محل استقرار پروتئین، بررسی پروموتر، شناسایی مسیرهای بیوسنتزی و ... است. همچنین استفاده از این روش در صنایع بیوتکنولوژی همچون تولید پروتئین‌های نوترکیب (پلنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها و ترکیبات دارویی) رشد فزاینده‌ای داشته است. انتقال ژن در گیاهان با روش‌های مختلفی انجام می‌شود که در بسیاری از موارد این روش‌ها با هم همپوشانی داشته و از تلفیق آنها برای بیان‌گذرا استفاده می‌شود. در مقاله حاضر انواع روش‌های انتقال و بیان‌گذرای ژن، مزایا و معایب آنها و آخرین پیشرفت‌ها در ارتباط با بیان‌گذرا در گیاهان مدل و زراعی مطرح شده است. همچنین قابلیت‌ها و محدودیت‌های این روش‌ها در تحقیقات و صنعت مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: بیان‌گذرا، عملکرد ژن، تراریختی، agroinfiltration، پروتئین نوترکیب.

Abstract

Transient expression is widely used as an alternative method for stable transformation of plants, especially cereals, trees and recalcitrants. In this method, multiple copies of transgene are introduced in to the plant cell and then are transcribed and translated. As introduced gene is not integrated in the genome, its expression is not affected by epigenetic factors and the location of insertion. Transient expression is a convenient method for functional analysis of genes including overexpression, silencing, gene expression networks, protein localization, promoter analysis, identification of biosynthesis pathways and so on. Additionally, this method is applied in biotechnological industries like production of recombinant proteins. Transient transformation is performed by different methods, however, many of them have overlap. So, a combination of these methods can be used for transient expression. In this review, various transient transformation techniques, their advantages and disadvantages, latest progress regarding transient expression in model and crop plants and potential and limitations regarding the application of transient expression technique in science and industry will be discussed.

Keywords: transient expression, gene function, transformation, agroinfiltration, recombinant protein.

* نویسنده مسئول: کتایون زمانی
E-mail: k.zamani@abrii.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

حدود ۶۰ سال پیش با شناسایی ساختار مولکولی رشته‌های DNA و کشف اطلاعات ژنتیکی موجود در آن، عصر زیست‌شناسی مولکولی آغاز و ابزارهای لازم برای دستورزی اسیدهای نوکلئیک ایجاد شد و تحولی اساسی در تولید محصولات و صفات جدید با بیان ژن‌ها یا تغییر بیان آنها پدید آمد. از دیدگاه تئوری، گیاهان با کمک ابزارهای مولکولی قادر به تولید هر پروتئینی خواهند بود چنانچه ژن مورد نظر را دریافت کرده باشند. بنابراین نخستین مرحله برای تولید محصول و یا ایجاد صفتی جدید، انتقال ژن مناسب به گیاه است (Canto, 2016). دو راهکار اصلی برای انتقال و بیان توالی‌های خارجی در گیاهان استفاده می‌شود: درج توالی‌های خارجی در ژنوم و بیان موقت ژن بدون درج در ژنوم میزبان. هر دو روش دارای مزایا و کاستی‌هایی هستند ولی معمولا مکمل یکدیگرند. تراریختی پایدار، بررسی بیان دائم ژن در گیاه کامل را امکان پذیر می‌سازد و در گیاهانی که قابلیت باززایی و تراریختی خوبی دارند به عنوان روشی مفید و کارآمد به اثبات رسیده است. انتقال پایدار ژن برای بسیاری از جنبه‌های نوین علوم گیاهی لازم بوده و استفاده از آن برای اصلاح گیاهان رو به افزایش است. لیکن علیرغم پیشرفت‌های بسیار در علوم زیستی، باززایی و تراریختی پایدار و تولید گیاهان کامل تراریخت همچنان با مشکل مواجه بوده و فرآیندی تصادفی و زمان‌بر است که برای بررسی‌ها و تحقیقات گسترده نامناسب می‌باشد (Jelly *et al*., 2014).

از سوی دیگر روش‌های جدید توالی‌یابی و رمزگشایی از ژنوم گونه‌های مختلف گیاهی، انبوهی از داده‌های ژنومی و ژن‌هایی با عملکرد ناشناخته را در آنها فراهم نموده است. عملکرد یک ژن حاصل فعالیت بیوشیمیایی محصول پروتئینی آن، پایداری و تخریب آن، محل استقرار در سلول، حرکت در گیاه (سلول)، برهمکنش با پروتئین‌های دیگر و نحوه فعالیت پروموتر آن در زمان و بافت خاص است. ابزارهای بیوانفورماتیکی، عملکرد بخش زیادی از این ژن‌های ناشناخته را پیش‌بینی نموده‌اند؛ لیکن این پیش‌بینی‌ها باید در گیاه تایید شوند که لازمه آن انتقال ژن به گیاه در سیستم‌های همولوگ و هترولوگ است (Li *et al*., 2009; Martin *et al*., 2009; Ueki *et al*., 2009). همچنین بررسی فعالیت یک ژن در شرایط فیزیولوژیک گیاه با حفظ یکپارچگی و سلامت بافت و سلول و به حداقل رسانیدن اثر تراریختی و محیط کشت، نتایج بهتر و دقیق‌تری حاصل خواهد شد (Marion *et al*., 2008).

تراریختی موقت گیاهان به‌عنوان روشی مکمل در کنار تراریختی پایدار به ویژه در غلات، گیاهان چوبی و درختی و recalcitrant در سال‌های اخیر استفاده شده است (Nanjareddy *et al*., 2016; Liang *et al*., 2017; Jelly *et al*., 2014; Fister *et al*., 2016). در حقیقت در زمانی کوتاه تعداد زیادی از نسخه‌های تراژن وارد سلول گیاهی شده، رونویسی و ترجمه می‌شوند و چون توالی DNA در ژنوم میزبان وارد نمی‌شود بیان ژن تحت تأثیر محل درج و تغییرات اپی‌ژنتیکی قرار نمی‌گیرد و بیان تراژن حتی بیش از ۱۰۰۰ برابر نسبت به تراریختی پایدار می‌تواند افزایش یابد (Janssen and Gardner 1990; Fischer *et al*., 1999; Bond *et al*., 2016). بیان و عملکرد ژن می‌تواند در یک گیاه کاملا رشد یافته بررسی شود. اهمیت این مساله حذف آثار منفی بیان ژن هدف بر مراحل مختلف رشد و نموی گیاه است (Fischer *et al*., 1999).

در سال‌های اخیر، روش‌های اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک توسعه چشمگیری داشته و وارد مرحله ویرایش ژن یا ژنوم شده است. ویرایش ژن، تغییر و اصلاح دقیق توالی ژن است که با ایجاد یک شکست در توالی دورشته‌ای DNA توسط نوکلئازهایی (sequence-specific nucleases-

www.SID.ir

Archive of SID

SSNs) که توالی معینی را شناسایی می‌کنند و سپس ترمیم DNA توسط سیستم‌های ترمیمی سلول میزبان صورت می‌گیرد. اخیرا بیان این نوکلئازها از طریق ناقل‌های ویروسی انجام می‌شود که رویکردی امیدبخش برای انتقال ژن و اصلاح گیاهان در زمان کوتاهتر و بدون درج در ژنوم است (Chujo *et al.*, 2017; Gil-Humanes *et al.*, 2017).

در این مقاله انواع روش‌های انتقال و بیان‌گذرای ژن، مزایا و معایب آنها و آخرین پیشرفت‌ها در ارتباط با بیان موقت در گیاهان مدل و زراعی مطرح خواهد شد. همچنین قابلیت‌ها و محدودیت‌های این روش‌ها در تحقیقات و صنعت مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

روش‌های انتقال و بیان‌گذرای ژن

به طور کلی انتقال و بیان‌گذرای ژن در گیاهان را می‌توان به چهار روش کلی استفاده از بمباران ژنی، استفاده از ویروس‌های گیاهی، استفاده از پروتوپلاست و استفاده از اگروباکتری تقسیم نمود. در بسیاری از موارد این روش‌ها با هم همپوشانی داشته و از تلفیق آنها برای بیان‌گذرا استفاده می‌شود. میزان بیان و کارآیی تراریختی در روش‌های فوق با هم متفاوت است.

بیان‌گذرا با استفاده از روش بمباران ژنی

در بمباران ژنی از شکل‌های مختلف اسیدهای نوکلئیک شامل توالی ژنی تحت کنترل پروموتر یوکاریوتی و خاتمه‌دهنده مناسب درون پلاسمید یا به شکل یک DNA خطی مانند محصول PCR و یا حتی از RNA، برای انتقال به بافت‌های مختلف گیاهی مانند کالوس، سلول‌های مزوفیل، تریکوم، اپیدرم برگ و ... استفاده می‌شود. ذرات طلا یا تنگستن با قطر ۱ تا ۲ میکرومتر را با اسیدنوکلئیک مورد نظر پوشانده و با فشار بالا به بافت مورد نظر شلیک می‌کنند. ذرات فلزی و فشار حاصل از شلیک به ورود اسیدنوکلئیک به درون بافت کمک می‌نماید. این ذرات باعث درجاتی از آسیب‌های مکانیکی به بافت هدف شده و تنها برخی از سلول‌ها قادر به بیان‌گذرای ژن خواهند بود. مزیت اصلی این روش به سایر روش‌ها، فرایند انتقال مکانیکی بدون نیاز به یک حامل سازگار زیستی همانند باکتری یا ویروس است و برای داشتن حداکثر کارآیی تنها شرایط بمباران مانند فشار گاز، اندازه ذره فلزی، فاصله بافت از محل شلیک و ... باید بهینه‌سازی شود. این روش تنها به گیاهان مدل محدود نمی شود و قابلیت استفاده در گیاهان recalcitrant و گیاهان زراعی مانند گندم، ذرت، پنبه و ... را دارد. همچنین این روش قابلیت انتقال همزمان چند ژن را دارد. انتقال چندین ژن به طور همزمان در بررسی آنزیم‌هایی که در مسیرهای متابولیکی درگیر هستند اهمیت پیدا می کند (Gao and Nielsen, 2013). از معایب این روش علاوه بر موارد اشاره شده مانند آسیب مکانیکی و تعداد کم سلول‌های دریافت کننده ژن می‌توان به هزینه بالا و محدود بودن سلول‌ها و بافت‌هایی که ژن را دریافت می کنند و ... اشاره نمود (Canto, 2016).

بیان‌گذرا با استفاده از ویروس‌های گیاهی

استفاده از ناقل‌های ویروسی به منظور بیان‌گذرای ژن در گیاهان، وسیله‌ای مفید برای تولید انبوه پروتئین‌های مهم صنعتی از جمله آنتی بادی‌ها و آنتی‌ژن‌هاست. این فناوری از سیستم همانندسازی و تکثیر سریع ویروس برای تولید پروتئین بهره‌برداری می‌نماید. ویروس‌های گیاهی تنوع بسیاری داشته و دارای ویژگی‌هایی هستند که آن‌ها را از ویروس‌های جانوری متمایز می‌سازد. اغلب ویروس‌های گیاهی دارای اندازه کوچک و فشرده هستند و ژنوم آنها در محدوده‌ای از ۳kb تا ۷kb قرار دارد. نتیجه این فشردگی، همپوشانی ژن‌های ویروسی با یکدیگر و

www.SID.ir

Archive of SID

وجود قالب‌های خواندنی باز متفاوت[1] در یک توالی واحد است. بسیاری از پروتئین‌های ویروسی دارای چندین عملکرد مختلف و مهم در چرخه بیماریزایی ویروس هستند که این امر توسعه ناقل‌های ویروسی را برای آنکه بتوانند همزمان به عنوان یک ناقل بیانی و یک ویروس عمل کنند با چالش مواجه می‌سازد (Canto, 2016). با این وجود ناقل‌های ویروسی به سرعت تکامل یافته و به دو نوع ناقل‌های کامل و ناقل‌های بازسازی شده[2] تقسیم می‌شوند. در ناقل‌های کامل، ژنوم ویروسی به گونه‌ای مهندسی شده است که علاوه بر کلیه ژن‌های ویروسی، ژن هدف را نیز بیان می‌نماید. ژن هدف تحت کنترل نسخه‌ای از پروموتر درونی ویروس، به ژنوم ویروس اضافه شده و یا به یک ژن ویروسی مانند ژن پوشش پروتئینی متصل و یک فیوژن پروتئین ایجاد می‌نماید. ناقلهای کامل ویروسی دارای محدودیت‌هایی هستند که از مهمترین آنها می‌توان به اندازه توالی ژن هدف اشاره نمود. بین اندازه توالی هدف و پایداری ناقل ویروسی رابطه‌ای منفی مشاهده شده است. توالی‌های بزرگتر از kb ۱ معمولاً بیان نمی‌شوند و ناقل حاصل ناپایدار بوده و مانع از تجمع اجزای ویروس به صورت یک ویروس کامل می شود. همچنین با افزایش در اندازه ژنوم ویروسی حرکت سلول به سلول آن از طریق پلاسمودسماتا با مشکل مواجه می‌شود. در چنین حالتی ناقل ویروسی قادر به گسترش و آلوده‌سازی سایر بخش‌های گیاه و تولید پروتئین در آن‌ها نخواهد بود (Gleba *et al*., 2007; Baltes *et al*., 2014; Mortimer *et al*., 2015).

برخی ویروس‌های گیاهی دامنه میزبانی وسیعی دارند و به سادگی با تلقیح مکانیکی قابل انتقال بوده و از گیاهی به گیاه دیگر منتشر می‌شوند، بنابراین ممکن است بخش وسیعی از گیاهان زراعی را آلوده نمایند. این فرآیند همچنین می‌تواند در مقیاس وسیع در مزرعه با پاشیدن مخلوطی از ذرات ویروسی و یک ماده ساینده مانند کاربوراندوم[3] بر روی گیاهان انجام شود. بسته به کارآیی ناقل و توانایی حرکت آن در گیاه، دو تا سه هفته برای آلوده شدن بافت‌های گیاهی زمان لازم است. در مراحل بعد عصاره گیاهان آلوده می‌تواند دوباره برای تلقیح تعداد زیادی از گیاهان مورد استفاده قرار گیرد (Fischer *et al*., 1999; Mortimer *et al*., 2015).

در مواردی که اندازه توالی ژن هدف بزرگ است از ناقل‌های ویروسی بازسازی شده استفاده می‌شود. در ناقلهای بازسازی شده فقط عناصر ویروسی لازم برای همانندسازی و بیان ژن هدف، حفظ شده و سایر اجزای ویروسی حذف شده‌اند. این ناقل‌ها با استفاده از تکنیک‌های وابسته به اگروباکتریوم وارد گیاه می‌شوند. توسعه ناقل‌های ویروسی بازسازی شده برای بیان‌گذرا موجب پیشرفت‌های سریع در تولید محصولاتی شده است که آماده تجاری‌سازی هستند (Mortimer *et al*., 2015).

ویروس‌های گیاهی دارای ژنوم DNA یا RNA هستند که هر یک می‌توانند تک‌رشته‌ای یا دورشته‌ای باشند. بیش از ۸۰٪ ویروس‌های گیاهی دارای ژنوم RNA هستند. ژنوم حداقل ۸ جنس متعلق به RNA ویروس‌های گیاهی شامل tobamoviruses، tombusviruses، bromoviruses، potexviruses، comoviruses، benyviruses، potyviruses و cucomoviruses برای استفاده به عنوان ناقل اصلاح شده است (Mortimer *et al*., 2015). به منظور ساخت ناقل از RNA ژنومی ویروس‌ها، ابتدا cDNA تهیه و در ناقل‌های بیانی همسانه‌سازی می‌شود. سپس ژنوم ویروسی همسانه‌سازی شده می‌تواند با استفاده از

1. Open reading Frame; ORF
2. Deconstructed vectors
3. Carborundum

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های استاندارد مربوط به DNA، دستورزی ژنتیکی شود (Dawson *et al*., 2013). حداقل ۱۲ عضو خانواده DNA ویروسی geminiviridae نیز برای ایجاد ناقل‌های ویروسی استفاده شده است (Mortimer *et al*., 2015). ویژگی‌های معینی geminiviruseها را به ناقل‌های مناسب برای مهندسی ژنتیک تبدیل نموده است. به عنوان مثال اعضای این خانواده گسترش بسیاری داشته و توانایی آلوده‌سازی طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی شامل انواع گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای را دارند که آن‌ها را به عنوان ناقل‌های مناسبی برای چندین میزبان مختلف بدل ساخته است. این ویروس‌ها برای آغاز همانندسازی در سلول میزبان تنها به پروتئین Rep نیاز دارند، بنابراین ژن هدف می‌تواند در مناطق بین ژنی تحت کنترل پروموتر طبیعی ویروس و یا یک پروموتر دائمی یا القایی خارجی بیان شود. این ویروس‌ها از طریق همانندسازی وابسته به نوترکیبی هومولوگ[1] و یا همانندسازی به روش حلقه چرخان[2]، قابلیت تکثیر در میزبان را دارند و بدین ترتیب سلول‌های میزبان را وارد مرحله S چرخه سلولی می‌نمایند که چنانچه با SSNها[3] و توالی مکمل هدف استفاده شوند برای نوترکیبی هومولوگ مناسب هستند و از آنجا که به مقدار زیادی درون سلول میزبان تکثیر می‌شوند همراه خود نسخه‌های بسیاری از توالی هدف را نیز تکثیر می‌نمایند (Zaidi and Mansoor, 2017).

بیان‌گذرا با استفاده از پروتوپلاست

در دهه گذشته استفاده از پروتوپلاست‌های گیاهی حیاتی دوباره یافته است. بیان‌گذرا در پروتوپلاست کارآیی بالایی داشته و تکنیکی ساده محسوب می‌شود که به ابزارهای خاص نیازی نداشته و مستقل از جنس و گونه گیاهی بوده و نتایج خوبی طی چند ساعت یا چند روز تولید می‌نماید. بدین ترتیب مطالعات بررسی عملکرد ژن از تعداد معدودی از گیاهان مدل به سایر گیاهان زراعی و غیر مدل گسترش یافته است. از آنجا که جداسازی پروتوپلاست از هر گونه گیاهی، بافت و اندام امکان‌پذیر است و با توجه به اینکه پروتوپلاست‌ها تقریباً کلیه ویژگی‌ها و هویت سلولی و تمایزی سلول‌هایی را که از آن نشات گرفته‌اند، حفظ می‌نمایند، این روش برای طراحی آزمایش‌های مطالعه عملکرد ژن اهمیت بیشتری پیدا کرده و از این رو به روشی کلیدی برای تحقیق و پژوهش در گیاهان غیر مدل تبدیل شده است (Duarte *et al*., 2016).

اخیراً جداسازی پروتوپلاست و انتقال ژن به آن برای بسیاری از گونه‌های گیاهی شامل ذرت (*Zea mays*)، هویج (*Daucus carota*)، صنوبر (*Populus euphratica*)، انگور (*Vitis vinifera*)، نخل روغنی (*Elaeis guineensis*)، کاهو (*Lactuca sativa*)، خردل (*Brassica juncea*)، کاساوا (*Manihot esculenta* Crantz)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، چمن ترکه (*Panicum virgatum*)، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*)، گیلاس (*Prunus avium*)، گندم، خانواده ماگنولیا، نارنگی (*Citrus reticulata* Blanco)، تلخه (*Lolium perenne*)، چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) و ... توسعه یافته و یا بهینه سازی شده است (Burris *et al*., 2016; Wu *et al*., 2017; Nanjareddy *et al*., 2016; Andersson *et al*., 2017; Yao *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2016; Huo *et al*., 2017; Shen *et al*., 2017; Xu *et al*., 2017; Yu *et al*., 2017; Ruslan *et al*., 2017). بیان‌گذرا در پروتوپلاست‌ها به ابزاری مفید در پژوهش‌های مربوط به مسیرهای پیام‌رسانی، تعیین محل استقرار پروتئین در سلول، تنظیم

1. Homologous recombination
2. Rolling circle replication
3. sequence-specific nucleases

www.SID.ir

Archive of SID

رونویسی و بیان ژن، بررسی پایداری و تخریب mRNA، برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین، بررسی فعالیت پروتئین‌های نوترکیب، پایداری و تجزیه پروتئین، مطالعه عملکرد و عناصر پروموتری، فعال‌سازی یا غیرفعال نمودن پروموتر توسط یک یا چند عامل رونویسی، تنش‌ها و یا تیمارهای هورمونی تبدیل شده است. با پیدایش فنآوری‌های ویرایش ژنوم و خاموشی ژن، به دلیل سادگی، سرعت، انعطاف‌پذیری و کارآیی غربالگری، توالی‌های متعدد هدف مانند RNA دورشته‌ای، siRNA، miRNA و gRNA به صورت گذرا در پروتوپلاست‌ها بررسی می‌شوند، پیش از آن که گیاهان تراریخته پایدار تولید شوند (Burris *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2014; Hayashi *et al.*, 2016; Stracke *et al*, 2016; Kudo *et al.*, 2017).

به منظور انتقال DNA پلاسمیدی نوترکیب به پروتوپلاست روش‌های مختلفی به کار می‌رود که می‌توان به پلی‌اتیلن‌گلیکول، الکتروپوریشن و میکروواینجکشن اشاره نمود. لیکن استفاده از روش پلی‌اتیلن‌گلیکول گسترش بیشتری دارد (Wu *et al.*, 2017).

بیان‌گذرا بااستفاده از اگروباکتری Agroinfiltration

اگروباکتریوم یکی از چند باکتری شناخته شده‌ای است که قابلیت انتقال DNA به سلول گیاهی را داراست. انتقال T-DNA با دخالت مجموعه‌ای از ژن‌های باکتریایی و تشکیل یک ساختار کانال مانند انجام می‌شود. سال‌هاست که از T-DNA فاقد ژن‌های طبیعی بیماریزا برای تراریختی گیاهان به صورت پایدار و گذرا استفاده می‌شود و به عنوان یک روش قدرتمند و موفق در تحقیقات زیستی به کار گرفته می‌شود (Tsuda *et al.*, 2012; Canto, 2016).

انتقال ژن به روش Agroinfiltration به دو صورت انجام می شود: در روش اول با استفاده از سرنگ بدون سوزن، سوسپانسیون اگروباکتری حاوی ژن هدف به سطح پشتی برگ وارد می‌شود. محیط حاوی اگروباکتری وارد فضای بین سلولی برگ می‌شود. تغییر رنگ برگ از سبز روشن به سبز تیره و حالت شیشه‌ای نشانگر موفقیت نفوذ مخلوط حاوی باکتری به درون برگ است. همچنین بخشی از باکتری‌ها از طریق روزنه‌ها وارد بافت مزوفیل شده و نسخه‌هایی از T-DNA نیز از اگروباکتری وارد سلول‌های پارانشیمی می‌شوند. این روش برای گونه‌های متعدد گیاهی با موفقیت استفاده شده است. با استفاده از سرنگ می‌توان نواحی مختلف یک برگ را با چند سازه همزمان تراریخت نمود و بدین ترتیب چندین آزمایش بر روی یک برگ واحد قابل انجام است. در روش دیگر، Agroinfiltration با استفاده از خلأ انجام می‌شود. در این روش برگ‌های گیاه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شده و در یک اتاقک خلأ قرار می گیرند. با ایجاد فشار منفی هوای موجود در فضاهای بین سلولی برگ خارج می‌شود. سپس با رها شدن خلأ این فضاها توسط محیط حاوی باکتری پر می‌شوند (Chen *et al.*, 2013; Bond *et al.*, 2016).

شواهد غیرمستقیم نشان می‌دهند که بیان‌گذرا از T-DNAهایی انجام می‌شود که هنوز در ژنوم میزبان درج نشده اند. برای هر محصول پروتئینی که از یک T-DNA بیان می‌شود منحنی بیان و تجمع پروتئین متفاوت است، با این وجود در اغلب موارد بیشترین میزان بیان ۴-۲ روز پس ازتلقیح است که به سرعت بعد از ۶-۵ روز محو می‌شود. برخلاف بیان‌گذرا، بیانی که ۱۴-۱۰ روز پس از تلقیح مشاهده می‌شود بیان دائم و ناشی از درج ژن در ژنوم است و قابلیت توارث به نسل‌های بعد را دارد. این دوره‌های زمانی برای هر محصول ژنی و هر گیاه بایستی به طور تجربی تعیین و تأیید شود. میزان بیان به عواملی همچون شدت پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان برای خاموش نمودن تراژن بستگی دارد که بر پایداری نسخه‌های mRNA رونویسی شده از T-DNA اثر می‌گذارد. در تأیید این مدعا بیان ساپرسورهای

www.SID.ir

Archive of SID

ویروسی طی آلودگی با اگروباکتری موجب افزایش چشمگیر میزان بیان از T-DNA و طول دوره زمانی آن می‌شوند. پایداری ذاتی پروتئین، چرخه تولید و تخریب آن در محیط سلولی و نحوه تخریب آن از مسیر اتوفاژی یا پروتئوزوم‌ها نیز بر میزان ذخیره پروتئین در سلول موثر است. ذخیره پروتئین ۲۴ ساعت پس از تلقیح معمولاً بسیار کم و غیرقابل تشخیص است که البته این امر در همه موارد صادق نیست (Lacroix and Citovsky, 2013;Canto, 2016).

قابلیت تولید پروتئین در مقیاس وسیع و کم هزینه بودن ابزارهای اولیه از ویژگی‌هایی است که روش Agroinfiltration را به روشی مناسب جهت کاربرد در صنایع دارویی تبدیل نموده است. به منظور تولید اقتصادی یک پروتئین بایستی شرایط پیش از تولید محصول پروتئینی و پس از تولید و فرآوری آن که بر دو شاخص ۱) مقدار پروتئین نوترکیب در واحد زیست توده (g/g) و ۲) میزان تولید پروتئین نوترکیب در واحد سطح–زمان (هفته یا ماه/g/m) مؤثر است، به خوبی بررسی شود. کنترل شرایط محیطی در مراحل پیش از تلقیح برای تولید حداکثری پروتئین نوترکیب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این شرایط شامل تراکم گیاهان کشت شده، کیفیت نور، فراهم بودن مواد غذایی لازم برای رشد گیاه است که بر شکل گیاه و میزان زیست توده مؤثر بوده که این ویژگی‌ها نیز به نوبه خود بر میزان تولید پروتئین نوترکیب اثر می‌گذارند. از دیگر عوامل مؤثر بر محتوای پروتئین در واحد وزن برداشت شده، نسبت وزن برگ به وزن ساقه در زمان تلقیح است. چنانچه گیاه با اگروباکتری دارای ناقل ویروسی تلقیح شود ساقه‌ها نسبت به برگ، پروتئین کمتری تولید می‌نمایند؛ بنابراین در مواردی که کل اندام هوایی گیاه برداشت می‌شود افزایش نسبت برگ به ساقه برای تولید محتوای پروتئینی بیشتر مفید خواهد بود. دو عامل کیفیت نور و شدت آن و همچنین تراکم کمتر گیاهان کشت شده به طور غیر مستقیم و با افزایش نسبت برگ به ساقه بر تولید پروتئین نوترکیب مؤثر می‌باشد (Fujiuchi *et al.*, 2016).

شرایط محیطی پس از تلقیح مانند دما، شدت نور و رطوبت از عواملی هستند که اثر زیادی بر میزان تولید پروتئین نوترکیب در گیاه دارند. بیشترین میزان تولید پروتئین در دمای بین ۱۵ تا ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده شده است؛ اگرچه نوع پروتئین تولیدی و گونه گیاهی نیز برآن مؤثر خواهد بود. محتوای پروتئینی با $^{\circ}C$ ۵ تغییر دما بالاتر یا پایینتر از دمای مطلوب، به شدت کاهش می‌یابد. وابستگی دمایی احتمالاً به کارآیی انتقال T-DNA از باکتری و پاسخ به تنش گیاه مربوط می‌شود. دمای بهینه برای انتقال T-DNA از اگروباکتری به سلول گیاهی بین ۱۸ تا ۲۳ درجه سلسیوس گزارش شده است و در دمای $^{\circ}C$ ۳۰ انتقالی انجام نمی‌شود و باکتری پلاسمید خود را از دست می‌دهد (Fujiuchi *et al.*, 2016).

شدت نور نیز برای هر آزمایش بایستی جداگانه ارزیابی شود. اثر نور بر تولید پروتئین در برخی موارد مثبت و در برخی دیگر بی اثر گزارش شده است (Fujiuchi *et al.*, 2016). از دیگر عوامل مؤثر بر کارآیی بیان‌گذرای پروتئین، رطوبت است. تحقیقات نشان داده است که کنترل میزان رطوبت پس از تلقیح برای بیان‌گذرا در برگ‌های جدا شده از گیاه *N. benthamiana* مهم است. وقتی برگ‌های جدا شده از گیاه برای تلقیح و بیان‌گذرا استفاده می‌شوند بایستی پس از تلقیح با سوسپانسیون اگروباکتری به مدت چند ساعت در رطوبت پایین نگهداری شوند تا آب اضافی موجود در فضای بین سلولی حذف شود. سپس به منظور جلوگیری از پژمردگی برگ‌ها تا زمان استفاده در رطوبت نسبی بالا قرار داده شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که حذف آب اضافی مربوط به سوسپانسیون باکتری بلافاصله پس از تلقیح موجب افزایش تولید پروتئین می‌شود (Fujiuchi *et al.*, 2016).

استفاده از برگ برای بیان‌گذرا و بررسی ژن‌هایی که بیان ویژه بافتی دارند می‌تواند محدود کننده باشد. از این رو اخیراً از بافت ریشه برای بیان‌گذرای یک ژن ناقل

www.SID.ir

Archive of SID

آمونیوم (*BcAMT1;3*) در کلم چینی با موفقیت استفاده شده است (Zhong *et al.*, 2016). همچنین بیان‌گذرای ژن‌های گزارشگر در دانه‌رست‌های کامل گیاه آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی، توتون و گیاهان تک‌لپه‌ای برنج و چمن‌ترکه به طور موفق انجام شده است (Marion *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

کاربردهای بیان موقت در تحقیقات

منابع اطلاعاتی موجود در زمینه توالی کامل ژنوم گونه‌های متعدد، زیست شناسان را با چالش‌های بیشماری روبروساخته است. یکی از رایج‌ترین روش‌های مربوط به مطالعات عملکرد ژن براساس خاموشی ژن به کمک فناوری RNAi (RNA interference) یا VIGS (virus induced gene silencing) می باشد. مزیت بارز این روش‌ها تکثیر پیام خاموشی به ترتیب از طریق siRNAs (small interfering RNAs) یا ذرات ویروسی نوترکیب است که از سلول‌هایی که ژن را دریافت نموده‌اند به سراسر گیاه منتشر شده و از سویی کارآیی تراریختی گذرا را نیز به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد.

به عنوان مثال از VIGS برای بررسی عملکرد دو ژن درگیر در ساخت سلولز، همی‌سلولز و لیگنین در زمان تشکیل دیواره ثانویه استفاده شده است. در ساقه گیاهانی که این دو ژن خاموش شدند گزیلم بیشتری تشکیل شد ولیکن دیواره‌های سلولی نسبت به گیاهان کنترل نازک‌تر بودند (Pandey *et al.*, 2016). در درختان سیب نیز نقش دو ایزوفرم squalene synthase در مسیرهای متابولیکی و بیوسنتزی فیتواسترول و تری‌ترپن با استفاده از VIGS تعیین و برعملکرد فیتواسترول‌ها در نمو برگ و حفظ تمامیت کلروپلاست‌ها تاکید شده است (Gallón *et al.*, 2017). از این روش‌ها همچنین برای شناسایی ژن‌ها و مسیرهای پیام رسانی مربوط به ایجاد مقاومت در گیاهان استفاده شده است. خاموش نمودن ژن *StMKK6* به عنوان یک کیناز مربوط به مسیر پیام‌رسانی، سبب تسریع در پراکنش و گسترش ویروس در سرتاسر گیاه سیب زمینی شده است (Dobnik *et al.*, 2016).

از دیگر روش‌های بررسی عملکرد ژن‌ها، بیش بیان ژن است. Fister و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از روش agroinfilteration یک ژن کیتیناز را در مراحل مختلف رشد برگ در ۸ ژنوتیپ مختلف بیش‌بیان نمودند و پس از آلوده نمودن با *Phytophthora tropicalis* کاهش زیست توده بیماریزا و اندازه بافت آسیب دیده و آلوده برگ را مشاهده نمودند (Fister *et al.*, 2016). با بیش بیان سه ژن *GmNRPs*، *GmNAC81* و *VPE* از گیاه سویا به روش گذرا در گیاه *N. benthamiana* نقش آن‌ها در مسیر پیام رسانی مرگ سلولی تعیین شده است (Reis *et al.*, 2016).

از بیان‌گذرا برای شناسایی مسیرهای بیوسنتزی نیز استفاده شده است. نخستین بار متابولیسم avenicin با استفاده از بیان‌گذرای یک ژن serine carboxypeptidase-like (SCPL) acyltransferase از گیاه جو دوسر در *N. Benthamiana* بررسی شد (Mugford *et al.*, 2009). بعدها با استفاده از انتقال گذرا و ترکیبی از بیان همزمان دو یا سه ژن anthranilate N-methyltransferase (MT1)، UGT74H5 glucosyltransferase و SCPL-1، نقش محصولات آنزیمی این سه ژن در ساخت و انتقال گروه N-methyl anthraniloyl acyl به اسکلت تری‌ترپن‌ها مشخص شد (Mugford *et al.*, 2013). همچنین عملکرد دو سزکویی‌ترپن‌سنتاز به نام‌های amorpha-3, 11-diene synthase (ADS) و epi-cedrol synthase (ECS) از گیاه *Artemisia annua* که در مسیر بیوسنتزی آرتمیسینین دخالت دارند با استفاده از بیان‌گذرا بررسی شد (Kanagarajan *et al.*, 2012). عملکرد چهار ژن مربوط به مسیرهای بیوسنتزی کارتنوئیدها نیز با بیش‌بیان‌گذرای آنها در گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

توتون بررسی شده است (Leonelli *et al.*, 2016).

محل استقرار بسیاری از پروتئین‌ها در سلول یک ویژگی کلیدی است که دامنه عملکرد احتمالی یک پروتئین را تعریف می‌کند. اغلب فرآیندهای سلولی به لحاظ مکانی به مناطقی معین در سلول محدود می‌شوند. سازوکارهای بسیار دقیقی وجود دارد که انتقال پروتئین‌ها یا کمپلکس‌های پروتئینی را به مناطق تعیین شده و اغلب در زمانی معین تضمین می‌کند. موقعیت اغلب پروتئین‌ها به‌طور تجربی تعیین نشده و پایگاه‌های اطلاعاتی معمولاً با اطلاعات پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزارها پر شده‌اند (Koroleva *et al.*, 2005). تاکنون دو روش در مقیاس وسیع برای بررسی محل استقرار پروتئین‌ها در سلول در گیاه آرابیدوپسیس استفاده شده است.

در روش اول از کشت سلولی آرابیدوپسیس و آگروباکتریوم (Koroleva *et al.*, 2005) و در روش دوم از دانه‌رست‌های آرابیدوپسیس و Agroinfiltration استفاده شده است (Marion *et al.*, 2008). از برگ‌های گیاه توتون نیز با استفاده از تزریق اگروباکتری دارای سازه مورد نظر برای تعیین محل استقرار پروتئین استفاده شده است (Dhandapani *et al.*, 2017). بمباران ژنی سلول‌های بشره پیاز نیز به دلیل بزرگی اندازه سلول‌ها روش مناسبی برای تعیین محل استقرار پروتئین است. اسیدفسفاتازهای ارغوانی آنزیم‌های متالوفسفواسترازی هستند که پیش بینی‌ها نشان می‌دهند که اغلب آنها وارد مسیر ترشحی می‌شوند.

بیان‌گذرای دو ژن از اعضای این خانواده در اتصال با GFP نشان داد که ژن *AtPAP18* محل استقرار دوگانه دارد. این پروتئین در ۲۴ ساعت اول در دیواره سلولی و پس از گذشت ۷۲ ساعت در واکوئل مشاهده می‌شود (Zamani *et al.*, 2012). پروتئین AtPAP9 دارای یک ناحیه عبورکننده از غشا در بخش انتهای کربوکسیلی است و آنالیزهای بیوانفورماتیکی، بیانگر استقرار انتهای آمینی پروتئین در خارج از سلول است. بیان‌گذرای این ژن در اتصال با GFP محل استقرار پروتئین را در ناحیه دیواره سلولی و غشای پلاسمایی نشان داد. به منظور تعیین محل دقیق استقرار AtPAP9، بشره‌های پیاز پلاسمولیز شدند تا غشای پلاسمایی از دیواره سلولی جدا شود. بررسی‌ها در این شرایط نشان داد، در حالی‌که در همه سلول‌ها، غشای پلاسمایی چین‌خورده و از دیواره سلولی فاصله گرفته است در سلول‌های درخشان بیان‌کننده ژن GFP متصل به *AtPAP9*، این پدیده مشاهده نمی‌شود که نشانگر نقش پروتئین PAP9 در اتصال غشای پلاسمایی و دیواره سلولی به یکدیگر است. این نتیجه، عملکرد دامین فیبرونکتین موجود در پروتئین و موتیف‌های مربوط به اتصال اینتگرین را به خوبی نشان داد (Zamani *et al.*, 2014).

از بیان‌گذرا برای بررسی عملکرد پروموترها و همچنین فاکتورهای رونویسی نیز استفاده شده است. توالی‌یابی RNA در مقیاس وسیع برای بررسی ترانسکریپتوم استفاده می‌شود. بیان‌گذرای یک فاکتور رونویسی در ترکیب با توالی‌یابی RNA، موجب شناسایی شبکه‌های بیان ژن‌ها و عملکرد آنها در مدت کوتاهی شده است. این روش Infltration-RNAseq نامیده شده است. با بیان‌گذرای یک فاکتور رونویسی MYB (*MtLAP1*) در برگ‌های گیاه *Medicago truncatula*، نقش آن در تنظیم مسیر بیوسنتز آنتوسیانین اطلاعات خوبی در مورد ژن‌های رمزکننده، فعال‌کننده‌ها، رپرسورها و آنزیم‌های مسیر به دست آمده است (Bond *et al.*, 2016).

کاربردهای بیان موقت در صنعت

در سال‌های اخیر گیاهان به عنوان جایگزینی برای کشت سلولی پستانداران، حشرات و باکتری‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی و صنعتی مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند. تولید پروتئین‌های

www.SID.ir

Archive of SID

نوترکیب در گیاهان را کشاورزی مولکولی[1] می‌نامند که به دو روش تراریختی پایدار (هسته یا پلاستید) و یا تراریختی گذرا انجام می‌شود. بیان‌گذرا می‌تواند از طریق ناقل‌های ویروسی یا ناقل‌های دوتایی باکتریایی انجام شود که به قابلیت بیان ویروسی و یا سیستم اگروباکتری برای انتقال ژن وابسته است. در ماه می ۲۰۱۲ نخستین پروتئین دارویی تولید شده در گیاه تاییدیه‌های لازم را برای استفاده در انسان به دست آورد.

این آنزیم برای درمان بیماری Gaucher در چندین آزمایش بالینی با موفقیت به کار رفته است. گیاهان مزایای متعددی نسبت به سایر روش‌های موجود برای تولید پروتئین دارند (جدول۱) که از آن جمله می‌توان به هزینه‌های بسیار کمتر تولید نسبت به کشت سلولی پستاندران اشاره نمود.

گیاهان بر سایر سیستم‌ها در تولید انبوه سبقت گرفته و افزایش تولید در سطحی با مقیاس مزرعه نیازی به امکانات ویژه یا بیوراکتورها ندارد. برخلاف سلول‌های باکتریایی، گیاهان قادر به تولید پروتئین‌های بزرگ دارویی هستند که به اصلاحات پس از ترجمه مانند گلیکوزیله شدن و تجمع زیرواحدهای متفاوت نیاز دارند. سلول‌های گیاهی دارای سیستم‌های غشایی یوکاریوتی درون سلولی شبیه سلول‌های پستانداران هستند که امکان اصلاحات ذکر شده را فراهم می‌سازد.

به علاوه سیستم‌های بیان گیاهی با کاهش خطر انتقال عوامل بیماریزای انسانی یا حیوانی از میزبان تولیدکننده پروتئین به مصرف‌کننده، از سلامت بیشتری برخوردار بوده و مورد پذیرش عموم قرار گرفته‌اند. بیش از ۵۰٪ پروتئین‌های انسانی گلیکوزیله هستند و یک سوم داروهای تایید شده را گلیکوپروتئین‌ها تشکیل می‌دهند بنابراین، پیشرفت‌های اخیر در مهندسی گلیکوزیلاسیون و طراحی ناقل‌های مناسب که تولید مواد زیستی با گلیکوزیلاسیون صحیح را امکان‌پذیر نموده موجب افزایش کارآیی و سرعت بی‌سابقه برای جلوگیری و کنترل[2] بیماری‌های همه‌گیر شده است (Chen *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2015).

واکسن‌ها و آنتی‌بادی‌های بسیاری با استفاده از بیان‌گذرا در گیاهان تولید شده‌اند که بخشی از آنها به بازار عرضه شده‌اند (جدول ۲). یک مثال جالب در این زمینه تولید داروی ZMapp در گیاه *N. benthamiana* برای درمان بیماری ابولا است. به هنگام شیوع این بیماری در غرب آفریقا در سال ۲۰۱۴، این دارو به طور آزمایشی بر روی هفت بیمار با موفقیت آزمایش شد و در اوایل سال ۲۰۱۵ تاییدیه‌های لازم را از FDA به عنوان یک داروی جدید دریافت نمود و آزمایشات بالینی در لیبریا امکان‌پذیر شد (Loh *et al.*, 2017).

تولید غذای کافی برای جمعیت روبه رشد جهان نیازمند اصلاح گیاهان و معرفی ارقام جدیدی است که توانایی سازگاری با تغییرات اقلیمی را داشته باشند. لازمه ایجاد ارقام جدید نیز وجود اطلاعات کافی در مورد عملکرد ژن‌ها برای اصلاح و تغییر در ژن‌های گیاهان زراعی است. روش‌های جدید رمزگشایی ژنوم، انبوهی از داده‌های ژنومی مربوط به گونه‌های زراعی و وحشی با عملکرد ناشناخته را پدید آورده‌اند که بر مطالعات تعیین عملکرد ژن‌ها پیشی گرفته‌اند.

امکان انتقال یک یا چند ژن به یک سلول گیاهی با استفاده از تراریختی گذرا و مطالعه برهمکنش آنها در یک بازه زمانی کوتاه موجب سرعت بخشیدن به تحقیقات مربوط به عملکرد ژن‌ها شده و چشم‌انداز روشنی را پیش روی محققان و اصلاح‌گران قرار داده است.

1. Molecular farming
2. Binary vectors

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. مقایسه میزبان‌های بیانی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب (Yao *et al*., 2015)

موارد مقایسه شده	گیاهان تراریخته	کشت سلولی گیاهان	باکتری ها	مخمر	کشت سلولی پستانداران	جانوران تراریخته
هزینه کل	خیلی کم	متوسط	کم	متوسط	زیاد	زیاد
قابلیت تولید انبوه	خیلی زیاد	زیاد	زیاد	زیاد	خیلی کم	کم
مقیاس تولید	جهانی	محدود	محدود	محدود	محدود	محدود
میزان محصول پروتئینی	زیاد	زیاد	متوسط	زیاد	متوسط–زیاد	زیاد
صحت تاخوردگی پروتئین	زیاد	زیاد	کم	متوسط	زیاد	زیاد
گلیکوزیله شدن	تفاوت جزئی	تفاوت جزئی	ندارد	نادرست	درست	درست
کیفیت محصول	زیاد	زیاد	کم	متوسط	زیاد	زیاد
احتمال و خطر آلودگی	کم	کم	اندوتوکسین	کم	ویروس، پریون، DNA سرطانزا	ویروس، پریون، DNA سرطانزا
سلامت و ایمنی محصول	بالا	بالا–قابل تحمل	کم	نامعلوم	متوسط	بالا
هزینه ذخیره سازی	ارزان	متوسط	متوسط	متوسط	گران	گران

جدول ۲. مثال‌هایی از داروهایی که با استفاده از بیان‌گذرا به مرحله تولید رسیده‌اند (Yao *et al*., 2015)

Company	Host	Lead Product	Expression Technology	Advantage
Mapp Biopharmaceutical/ LeafBiol, USA	Tobacco leaves	ZMapp™ for Ebola crisis	MagnICON Transient expression	Speed
Icon Genetics, München, Germany	*Nicotiana benthamiana* leaves	Vaccine for non-Hodgkin's Lymphoma	MagnICON Transient expression	MagnICON Transient expression
Kentucky BioProcessing, Owensboro, KY, USA	*Nicotiana benthamiana* leaves	Contract service Geneware	Transient expression	Speed
Fraunhofer CMB/iBio, Newark, DE, USA	*Nicotiana benthamiana* leaves	Influenza vaccine	Transient expression	Speed

همچنین با استفاده از بیان‌گذرا برای تولید انبوه پروتئین‌های دارویی با هزینه کمتر، در زمان کوتاهتر و بدون نگرانی از وجود آلودگی به عوامل بیماریزا از یک سو و تولید سریع واکسن‌ها در زمان شیوع بیماری‌ها و کنترل بیماری‌های همه‌گیر در زمان مناسب از سوی دیگر پیش‌بینی می‌شود که این روش در آینده با استقبال بیشتری از سوی محققان و همچنین تولیدکنندگان دارویی و صنایع روبرو شود.

REFERENCES

Andersson M, Turesson H, Nicolia A, Fält AS, Samuelsson M, Hofvander P (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant. Cell. Rep. 36(1):117-28.

Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF (2014) DNA replicons for plant genome engineering. Plant. Cell. 26(1): 151-63.

Bond DM, Albert NW, Lee RH, Gillard GB, Brown CM, Hellens RP, Macknight RC (2016) Infiltration-RNAseq: transcriptome profiling of Agrobacterium-mediated infiltration of transcription factors to discover gene function and expression networks in plants. Plant methods. 12(1):41.

Burris KP, Dlugosz EM, Collins AG,

www.SID.ir

Archive of SID

Stewart CN, Lenaghan SC (2016) Development of a rapid, low-cost protoplast transfection system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.). Plant. Cell. Rep. 35(3):693-704.

Canto T (2016) Transient Expression Systems in Plants: Potentialities and Constraints." *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*. Springer International Publishing, 287-301.

Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Leuzinger K, Dent M (2013) Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins. Adv. Tech. Biol. Med.1(1).

Chujo T, Yoshikawa M, Ariga H, Endo M, Toki S, Ishibashi K (2017) A removable virus vector suitable for plant genome editing. Plant. J. 91(3):558-561.

Dawson WO, Folimonova SY (2013) Virus-based transient expression vectors for woody crops: a new frontier for vector design and use. Annu. Rev. Phytopathol. 51:321-37.

Dhandapani S, Jin J, Sridhar V, Sarojam R, Chua NH, Jang IC (2017) Integrated metabolome and transcriptome analysis of *Magnolia champaca* identifies biosynthetic pathways for floral volatile organic compounds. BMC genomics. 18(1):463.

Dobnik D, Lazar A, Stare T, Gruden K, Vleeshouwers VG, Žel J (2016) *Solanum venturii*, a suitable model system for virus-induced gene silencing studies in potato reveals St MKK6 as an important player in plant immunity. Plant methods. 12(1):29.

Duarte P, Ribeiro D, Carqueijeiro I, Bettencourt S, Sottomayor M (2016) Protoplast transformation as a plant-transferable transient expression system. Biotechnology of Plant Secondary Metabolism: Meth. Protoc. 137-48.

Fischer R, Vaquero-Martin C, Sack M, Drossard J, Emans N, Commandeur U (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. Biotechnol. Appl. Biochem. 30(2):113-6.

Fister AS, Shi Z, Zhang Y, Helliwell EE, Maximova SN, Guiltinan MJ (2016) Protocol: transient expression system for functional genomics in the tropical tree *Theobroma cacao* L. Plant methods.12(1):19.

Fujiuchi N, Matoba N, Matsuda R (2016) Environment control to improve recombinant protein yields in plants based on *Agrobacterium*-mediated transient gene expression. Front. Bioeng. Biotechnol. 4.

Gallón SM, Elejalde-Palmett C, Daudu D, Liesecke F, Jullien F, Papon N, de Bernonville TD, Courdavault V, Lanoue A, Oudin A, Glévarec G (2017) Virus-induced gene silencing of the two squalene synthase isoforms of apple tree (Malus× domestica L.) negatively impacts phytosterol biosynthesis, plastid pigmentation and leaf growth. Planta. 27:1-6.

Gao C, Nielsen KK (2013) Comparison between *Agrobacterium*-mediated and direct gene transfer using the gene gun. Biolistic DNA Delivery: Meth. Protoc. 3-16.

Gil-Humanes J, Wang Y, Liang Z, Shan Q, Ozuna CV, Sánchez-León S, Baltes NJ, Starker C, Barro F, Gao C, Voytas DF (2017) High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. Plant. J. 89(6):1251-62.

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. Curr. Opin. Biotechnol.18(2):134-41.

Hayashi S, Wakasa Y, Ozawa K, Takaiwa F (2016) Characterization of IRE1 ribonuclease-mediated mRNA decay in plants using transient expression analyses in rice protoplasts. New. Phytol. 210(4):1259-68.

Huo A, Chen Z, Wang P, Yang L, Wang

www.SID.ir

Archive of SID

G, Wang D, Liao S, Cheng T, Chen J, Shi J (2017) Establishment of transient gene expression systems in protoplasts from Liriodendron hybrid mesophyll cells. PloS One. 12(3): e0172475.

Janssen BJ, Gardner RC (1990) Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with Agrobacterium. Plant Mol. Boil. 14(1):61-72.

Jelly NS, Valat L, Walter B, Maillot P (2014) Transient expression assays in grapevine: a step towards genetic improvement. Plant biotechnol. J. 12(9):1231-45.

Kanagarajan S, Muthusamy S, Gliszczyńska A, Lundgren A, Brodelius PE (2012) Functional expression and characterization of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua* L. using transient expression system in *Nicotiana benthamiana*. Plant. Cell. Rep. 31(7):1309-19.

Koroleva OA, Tomlinson ML, Leader D, Shaw P, Doonan JH (2005) High-throughput protein localization in Arabidopsis using Agrobacterium-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. Plant. J. 41(1):162-74.

Kudo M, Kidokoro S, Yoshida T, Mizoi J, Todaka D, Fernie AR, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2017) Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants. Plant. Biotechnol. J. 15(4):458-71.

Lacroix B, Citovsky V (2013) The roles of bacterial and host plant factors in Agrobacterium-mediated genetic transformation. Int. J. Dev. Biol. 57(6-7-8):467-81.

Leonelli L, Erickson E, Lyska D, Niyogi KK (2016) Transient expression in *Nicotiana benthamiana* for rapid functional analysis of genes involved in non-photochemical quenching and carotenoid biosynthesis. Plant. J. 88(3):375-86.

Li JF, Park E, von Arnim AG, Nebenführ A (2009) The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. Plant Methods. 5(1):6.

Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat. Commun. 8.

Loh HS, Green BJ, Yusibov V (2017) Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases. Cur. Opin. Virol. 31; 26:81-9.

Marion J, Bach L, Bellec Y, Meyer C, Gissot L, Faure JD (2008) Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. Plant J. 56(1):169-79.

Martin K, Kopperud K, Chakrabarty R, Banerjee R, Brooks R, Goodin MM (2009) Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. Plant J. 59(1):150-62.

Mortimer CL, Dugdale B, Dale JL (2015) Updates in inducible transgene expression using viral vectors: from transient to stable expression. Cur. Opin. Biotechnol. 32:85-92.

Mugford ST, Louveau T, Melton R, Qi X, Bakht S, Hill L, Tsurushima T, Honkanen S, Rosser SJ, Lomonossoff GP, Osbourn A (2013) Modularity of plant metabolic gene clusters: a trio of linked genes that are collectively required for acylation of triterpenes in oat. Plant. Cell. 25(3):1078-92.

Mugford ST, Qi X, Bakht S, Hill L, Wegel E, Hughes RK, Papadopoulou K,

www.SID.ir

Archive of SID

Melton R, Philo M, Sainsbury F, Lomonossoff GP (2009) A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. Plant. Cell. 21(8):2473-84.

Nanjareddy K, Arthikala MK, Blanco L, Arellano ES, Lara M (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):53.

Pandey SK, Nookaraju A, Fujino T, Pattathil S, Joshi CP (2016) Virus-induced gene silencing (VIGS)-mediated functional characterization of two genes involved in lignocellulosic secondary cell wall formation. Plant. Cell. Rep. 35(11):2353-67.

Reis PA, Carpinetti PA, Freitas PP, Santos EG, Camargos LF, Oliveira IH, Silva JC, Carvalho HH, Dal-Bianco M, Soares-Ramos JR, Fontes EP (2016) Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. BMC Plant. Boil. 16(1):156.

Ruslan SA, Dolhaji NH, Awal A, Osman M, Aziz M, Noor MR (2017) Protoplast Isolation from *Hibiscus sabdariffa* L. Adv. Sci. Lett. 23(2):1333-6.

Shen J, Fu J, Ma J, Wang X, Gao C, Zhuang C, Wan J, Jiang L (2014) Isolation, culture, and transient transformation of plant protoplasts. Curr. Protoc. Cell. Biol. 3:2-8.

Shen Y, Meng D, McGrouther K, Zhang J, Cheng L (2017) Efficient isolation of Magnolia protoplasts and the application to subcellular localization of MdeHSF1. Plant. Methods. 13(1):44.

Stracke R, Thiedig K, Kuhlmann M, Weisshaar B (2016) Analyzing synthetic promoters using arabidopsis protoplasts. Plant Synthetic Promoters: Meth. Protoc. 67-81.

Tsuda K, Qi Y, Nguyen LV, Bethke G, Tsuda Y, Glazebrook J, Katagiri F (2012) An efficient Agrobacterium-mediated transient transformation of Arabidopsis. Plant J. 69(4):713-9.

Ueki S, Lacroix B, Krichevsky A, Lazarowitz SG, Citovsky V (2009) Functional transient genetic transformation of Arabidopsis leaves by biolistic bombardment. Nat. Protoc. 4(1):71.

Wu JZ, Liu Q, Geng XS, Li KM, Luo LJ, Liu JP (2017) Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). BMC Biotechnol. 17(1):29.

Xu X, Xu X, Zhou Y, Zeng S, Kong W (2017) Identification of protoplast-isolation responsive microRNAs in *Citrus reticulata* Blanco by high-throughput sequencing. PloS one.12(8): e0183524.

Yao J, Weng Y, Dickey A, Wang KY (2015) Plants as factories for human pharmaceuticals: applications and challenges. Int. J. Mol. Sci. 16(12):28549-65.

Yao L, Liao X, Gan Z, Peng X, Wang P, Li S, Li T (2016) Protoplast isolation and development of a transient expression system for sweet cherry (*Prunus avium* L.). Sci. Hort. 209:14-21.

Yu G, Cheng Q, Xie Z, Xu B, Huang B, Zhao B (2017) An efficient protocol for perennial ryegrass mesophyll protoplast isolation and transformation, and its application on interaction study between LpNOL and LpNYC1. Plant methods. 5;13(1):46.

Zaidi SS, Mansoor S (2017) Viral Vectors for Plant Genome Engineering. Front. Plant. Sci. 8.

Zamani K, Lohrasebi T, Sabet MS, Malboobi MA, Mousavi A (2014)

www.SID.ir

Archive of SID

Expression pattern and subcellular localization of Arabidopsis purple acid phosphatase AtPAP9. Gene. Expr. Patterns. 14(1):9-18.

Zamani K, Sabet M, Lohrasebi T, Mousavi A, Malboobi M (2012) Improved phosphate metabolism and biomass production by overexpression of AtPAP18 in tobacco. Biologia. 67(4):713-20.

Zhang Y, Liang Z, Zong Y, Wang Y, Liu J, Chen K, Qiu JL, Gao C (2016) Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. Nat. Commun. 7:12617.

Zhong L, Zhang Y, Liu H, Sun G, Chen R, Song S (2016) Agrobacterium-mediated transient expression via root absorption in flowering Chinese cabbage. SpringerPlus. 5(1):1825.

www.SID.ir