ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲
صفحه ۲۸۲-۲۷۳

اگروواینفیلتریشن روشی مناسب برای آزمون‌های سریع ارزیابی سیستم‌های تظاهر ژن در لوبیا

Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating gene expression systems in common bean

زهرا مظفری*[۱]، ندا میرآخورلی[۲]، بهروزشیران[۳]، محمود خدامباشی[۴]

۱،۲،۳و۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیاران گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

Mozafari Z*[1], Mirakhorli N[2], Shiran B[3], Khodambashi M[4]

1,2,3,4. MSc Student, Assistant Professor and Associate Professors, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Mozafarizahra71@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۰- تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹)

چکیده

بیان موقت ژن‌ها اغلب به منظور ارزیابی بیان سازه‌ها و یا تست فعالیت یک پروتئین نوترکیب پیش از در نظر گرفتن اهداف بلند مدت برای گیاهان تراریخته به کار می‌رود. بیان موقت به واسطه اگروباکتریوم (اگروواینفیلتریشن) ابزاری با ارزش برای مطالعه بیان ژن خارجی، بررسی عملکرد سیستم‌های بیانی و راه‌اندازها و تولید پروتئین‌های با ارزش در گیاهان می‌باشد. با نفوذ سلول‌های اگروباکتریوم حامل سازه‌های ژن هدف به داخل برگ‌های سالم لوبیا که هنوز به گیاه مادر متصل هستند، بیان موقت طی سه روز و بدون نیاز به وسایل گران قیمت و یا روش‌های پیچیده انجام می‌شود و پروتئین مورد نظر را تولید می‌کند. در این مطالعه سه سیستم مختلف بیان ژن شامل ترکیباتی از عناصر مختلف تنظیم کننده بیان ژن از طریق تزریق سوسپانسیون اگروباکتریوم، حامل ترکیبات پلاسمیدی سیستم‌های مورد نظر، به داخل برگ‌های گیاه لوبیا انتقال داده شد. بعد از سه روز میزان پروتئین محلول در برگ اندازه‌گیری شده، آزمون مقایسه میانگین‌ها انجام شد. این تحقیق به منظور ارزیابی سیستم‌های بیانی پیشنهادی در گیاه لوبیا با استفاده از تکنیک اگروواینفیلتریشن برای انتخاب بهترین سیستم جهت انتقال ژن نوترکیب به گیاه لوبیا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید پروتئین از بین سه سیستم بیانی که سبب ترشح پروتئین در منطقه آپوپلاست، سیتوپلاسم و شبکه آندوپلاسمی می‌شوند مربوط به سیستمی است که سبب انتقال و تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی شده است. همچنین کارایی تراریختی با استفاده از این روش، ۵۰-۲۴ درصد محاسبه شد.

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم،
بیان موقت،
ژن،
سیستم تظاهر ژن،
لوبیا

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تولید گیاهان تراریخته با اهداف مختلفی مانند بهبود عملکرد و کیفیت، ایجاد مقاومت به آفات و بیماری‌ها و غیره صورت می‌گیرد. از مشکلات تولید گیاهان تراریخته عدم بیان مناسب ژن در گیاه است که بستگی به سیستم‌های بیان آن دارد. از آنجا که یک ژن می‌تواند در سیستم‌های گوناگونی بیان شود، بنابراین تعیین سیستمی با بیشترین بازده تولید پروتئین امری ضروری است. جهت توسعه سیستمی با کارایی بالا در بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته به عناصر تنظیم کننده بیان ژن نیاز است که علاوه بر کنترل رونویسی و ترجمه، جایگاه ساخت پروتئین نوترکیب در سلول نیز کنترل شود. استراتژی‌های کنترل بیان ژن و ترجمه پروتئین در گیاهان نقش مهمی را در تعیین عملکرد کلی پروتئین‌های نوترکیب ایفا می‌کنند اما در عین حال تاکید زیادی بر روی مباحثی مانند ایمنی زیستی و صحت فرآورده وجود دارد از این رو برای دستیابی به عملکرد بالا، تمامی مراحل بیان ژن، از جمله رونویسی، پایداری mRNA، فرآوری mRNA، سنتز پروتئین، تغییرات پروتئین، تجمع پروتئین و پایداری پروتئین باید بهینه‌سازی شوند. از آنجا که سازه‌های بیانی به صورت ساختارهای شیمری هستند که در آن‌ها ژن تراریخته می‌تواند به وسیله عناصر تنظیمی مختلفی کنترل شود، انتخاب صحیح این عناصر تنظیمی از مباحث مهم در تولید گیاهان تراریخته می‌باشد. مهمترین جنبه طراحی یک سازه بیانی، راه‌انداز مورد استفاده برای تحریک بیان ژن تراریخته است. در گیاهان دولپه‌ای، راه‌انداز 35S ویروس موزاییک گل کلم (CaMV) از آنجا که قوی و عمومی بوده و بیان زیاد ژن تراریخته را در اندام‌های مربوطه تحریک می‌نماید، رایج‌ترین انتخاب است. عامل مهم دیگر در بیان بالای ژن، سیگنال قوی پلی‌آدنیلاسیون می‌باشد که جهت پایداری نسخه‌های رونویسی شده با راه‌انداز CaMV 35S و خاتمه‌دهنده ژن *NOS*، مناسب می‌باشد (Sunil Kumar et al. 2003; Fischer et al. 2004). یکی دیگر از ملاحظات مهم برای بهبود عملکرد پروتئین، هدایت نمودن پروتئین‌ها به داخل اجزای سلولی مناسب است، از این رو پپتیدهای راهنمای متعددی برای هدایت پروتئین‌ها به سمت مسیر ترشحی مورد نظر، استفاده می‌شود.

از آنجا که انتقال ژن و باززایی بیشتر گیاهان عالی پرزحمت، زمان‌بر و گران قیمت است (Trieu et al. 2000) همچنین سطح بیان ژن در گیاهان تراریخته از یک گیاه به گیاه دیگر تفاوت دارد و اغلب پدیده خاموشی ژن به علت اثر مکانی ژن انتقال داده شده در گیاهان تراریخته اتفاق می‌افتد (Wroblewski et al. 2005)، آزمون‌های موقت به عنوان یک چاره مناسب در تجزیه تراریختی پایدار به کار می‌رود و امکان بررسی بیان و عملکرد برخی از ژن‌ها را طی چند روز فراهم می‌نماید. از جمله این آزمون‌ها روش بیان موقت به واسطه اگروباکتریوم است که اگروانفیلتریشن نامیده می‌شود و سوسپانسیون اگروباکتریوم به داخل برگ‌های متصل به گیاه تزریق می‌شود. این روش به عنوان یک ابزار با ارزش در مطالعه جنبه‌های مختلف بیولوژی مولکولی گیاه، شامل بیان ژن خارجی (Kapila et al. 1997)، خاموشی ژن (Voinnet et al. 2003)، ویژگی راه‌اندازهای گیاهی و عوامل رونویسی (Liu et al. 2003)، اثر متقابل ژن برای ژن بین ژن‌های مقاومت میزبان و بیماری‌زای پاتوژن (Scofield et al. 1996)، واکنش فوق حساسیت (Palanichelvam et al. 2000) و بیان موقت آنتی‌بادی‌ها (Vaquero et al. 1999) مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیان موقت به واسطه اگروباکتریوم در مقایسه با دیگر سیستم‌های ارزیابی بیان در گیاهان تراریخت دارای چندین مزیت است، از جمله این که بر عکس ناقل‌های ویروسی به وسیله پروتئین‌های کوچک محدود نمی‌شود، ساده و سریع است، نیاز به روش‌های پیچیده و تجهیزات گران قیمت ندارد. مقدار بیان موقت یک ژن برای آنالیز پروتئین و RNA همچنین برای تولید پروتئین در مقیاس کم کافی می‌باشد (Vaquero et al. 1999).

آزمون‌های بیان موقت به واسطه اگروباکتریوم در گیاهان مختلف از جمله کاهو، گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس انجام شده و عوامل موثر در افزایش کارایی آزمون‌های موقت در این گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است (Wroblewski et al. 2005). در این تحقیق به منظور انتخاب بهترین سیستم تظاهر ژن جهت بالا بردن سطح تولید پروتئین نوترکیب در گیاه لوبیا، ژن گزارشگر *LicBM2* (این گزارشگر بر اساس ژن تولید کننده آنزیم متحمل به حرارت لیگیناز (β -1,3 -1,4-glucanase) باکتری گرمادوست *Clostridium thermocellum* به‌دست آمده است، که پیوندهای

Archive of SID
www.SID.ir

مجاور β-1,3 و β-1,4 را در پلی‌گلوکان‌ها تجزیه می‌کند. در اثر تجزیه مواد پلی‌ساکاریدی مثل لیگنان، قندهای ساده احیا شونده آزاد می‌شوند، که میزان آن‌ها را می‌توان به طور کمی و کیفی اندازه‌گیری و مشخص نمود (Komakhin et al. 2005) تحت سه سیستم تظاهر مختلف از طریق اگروواینفیلتریشن (Agroinfiltration) به برگ‌های گیاه لوبیا منتقل می‌شود. در این سه سیستم ژن *LicBM2* داخل ناقل pBISN1-IN (Abdeeva et al. 2008) تحت کنترل عناصر تنظیم کننده متفاوت قرار دارد. این سه سیستم باعث تجمع پروتئین در مناطق مختلف می‌شوند. اولین سیستم به دلیل داشتن توالی KDEL (Munro et al. 1987) و توالی رهبر LeB4 (Baumlein et al. 1986) به دست آمده از گیاه لوبیا باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود همچنین در سیستم دیگر به دلیل وجود توالی رهبری که از گیاه هویج گرفته شده است (Abdeev et al. 2003) پروتئین به آپوپلاست ترشح می‌شود و اما در سیستم سوم از هیچ توالی رهبری استفاده نشده، لذا پروتئین در سیتوزول باقی می‌ماند. با بررسی عملکرد این سیستم‌ها در گیاه می‌توان بهترین سیستم را جهت انتقال ژن نوترکیب به گیاه به منظور تولید گیاهان تراریخته انتخاب کرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت

در این مطالعه از گیاه لوبیا قرمز ناز استفاده شد. بذر لوبیا قرمز ناز بعد از ضد عفونی اولیه توسط قارچ کش، داخل گلدان‌ها در شرایط گلخانه کشت شد و سه تا چهار هفته بعد از کاشت که برگ‌های لوبیا کاملاً گسترده شد، گلدان‌ها به آزمایشگاه منتقل گردید. برگ‌های مورد استفاده طوری انتخاب شد که تمام برگ‌ها از نظر اندازه و سن و مکان قرار گرفتن در گیاه مشابه باشند.

باکتری‌ها و ترکیبات پلاسمیدی مورد استفاده

باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 جهت انتقال ژن هدف به گیاه لوبیا به روش اگروواینفیلتریشن استفاده شد.

در ترکیبات پلاسمیدی مورد استفاده ژن گزارشگر *LicBM2* داخل ناقل pBISN1–IN (GenBank: EU886197) تحت کنترل عناصر تنظیم کننده متفاوت قرار دارد و سه ترکیب پلاسمیدی (دستواره) مختلف را به وجود می‌آورد (شکل ۱).

این سه ترکیب پلاسمیدی باعث تجمع پروتئین در مناطق مختلف می‌شوند. ترکیب پلاسمیدی شماره یک به دلیل داشتن توالی KDEL و توالی رهبر LeB4 گرفته شده از گیاه لوبیا باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود همچنین در ترکیب پلاسمیدی شماره دو به دلیل وجود توالی رهبری که از گیاه هویج گرفته شده است، پروتئین به آپوپلاست ترشح می‌شود و در ترکیب پلاسمیدی شماره ۳ از هیچ توالی رهبری استفاده نشده، لذا پروتئین در سیتوزول باقی می‌ماند.

برای تهیه سلول‌های تراریخته اگروباکتریوم از روش الکتروپوریشن (Weigel et al. 2002) با کمی تغییر استفاده شد. جهت تهیه سلول‌های مستعد باکتری یک میلی‌لیتر از کشت شبانه اگروباکتریوم داخل یک ارلن، حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر LB مایع (Bactotrypton ۱۰ g/l، yeast extract ۵ g/l، NaCl ۷ g/l) ریخته شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور شیکردار قرار گرفت و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه هم زده شد تا زمانی که OD_{600}=1 بدست آمد (تقریباً ۴ ساعت). سپس کشت باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در یخ قرار گرفت. و داخل ۴ فالکون ۵۰ میلی‌لیتری استریل توزیع شد و به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد محلول رویی خالی شد و بعد از اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل سرد به هر فالکون، رسوب ته فالکون به آرامی با آب مخلوط شد و سپس حجم هر فالکون به ۴۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این مراحل دو بار تکرار شد. در نهایت ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول ۱۰ درصد استریل و سرد به هر فالکون اضافه شد و به آرامی در رسوب ته فالکون حل شد و درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل توزیع و پس از انجماد سریع در ازت مایع، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای ترانسفورماسیون باکتری، یک میکرولیتر از DNA پلاسمید داخل میکروتیوب سلول مستعد ریخته شد و با هم مخلوط شد. در مرحله بعد مخلوط با پیپت کشیده شد و داخل کووت الکتروپوریشن سرد منتقل شد و کووت در دستگاه الکتروپوریشن (Multiporatoreppendorf) با ولتاژ ۲/۴ کیلو ولت و زمان ۵

Archive of SID
www.SID.ir

ترکیب پلاسمیدی۱- ناقل LB-Pnos-nptII-nos-35S CaMV-LeB4-*LicBM2*-KDEL-polyA-RB

LB	Pnos	*npt*II	nos	P35s	LeB4	*LicBM2*	KDEL	PA	RB

ترکیب پلاسمیدی۲- ناقل LB-Pnos-nptII-nos-35S CaMV-leader-*LicBM2*-polyA-RB

LB	Pnos	*npt*II	nos	P35s	LS	*LicBM2*	PA	RB

ترکیب پلاسمیدی۳- ناقل LB-Pnos-nptII-nos-35S CaMV-*LicBM2*-polyA-RB

LB	Pnos	*npt*II	nos	P35s	*LicBM2*	PA	RB

شکل۱- شکل شماتیک ناحیه T-DNA در سه ترکیب پلاسمیدی. LB) حاشیه سمت چپ؛ Pnos) راه‌انداز nos؛ *npt*II: ژن مقاومت به کانامایسین؛ nos) خاتمه‌دهنده P35s،nos) راه‌انداز 35S ویروس موزاییک گل کلم (CaMV 35S)؛ LeB4) پپتید رهبر گیاه لوبیا برای شبکه آندوپلاسمی؛ KDEL) توالی چهار پپتیدی هدایتگر پروتئین به شبکه آندوپلاسمی؛ LS) توالی کد کننده پپتید رهبر هویج؛ PA) سیگنال پلی‌آدنیلاسیون؛ RB) حاشیه سمت راست (Abdeev et al. 2003).

میکروثانیه قرار گرفت. سپس محتوی کووت توسط پیپت پاستور خارج گردید و به میکروتیوب سلول مستعد انتقال داده شد. یک میلی‌لیتر LB مایع به میکروتیوب اضافه شد و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار داده شد. بعد از سانتریفیوژ مختصر رسوب ته میکروتیوب در ۱۰۰ میکرولیتر محلول حل و توسط لوپ بر روی سطح محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰mg/l) و ریفامپیسین (۱۰۰mg/l) پخش شد و محیط‌های کشت به صورت وارونه به مدت ۴-۳ روز درون انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۴-۳ روز کلونی‌های تراریخت بر روی محیط کشت تشکیل شد.

تایید کلونی‌های نوترکیب

تایید کلونی‌های نوترکیب به روش PCR با سیکل حرارتی ۹۴، ۶۵ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و از آغازگرهای ژن *LicBM2* برای تکثیر استفاده شد. اندازه باند مورد انتظار ۷۰۰ جفت باز می‌باشد.

اگروباکتریوم

در این روش سوسپانسیونی از اگروباکتریوم تهیه شد و از روزنه‌های پشت برگ توسط سرنگ بدون سوزن، صرفاً با ایجاد فشار و انتشار سلول‌های اگروباکتریوم از طریق مایع میان بافتی، به درون برگ تزریق شد (Wroblewski et al. 2005). برای تهیه سوسپانسیون اگروباکتریوم، کشت شبانه اگروباکتریوم تراریخت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ mg/l) و ریفامپیسین (۱۰۰mg/l) به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه انجام شد. کشت شبانه بعد از توزیع در میکروتیوب، سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری در محلول Infiltration medium (Lee et al.2008) حاوی ۱۰۰ میکرو مولار استوسیرینگون و آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰mg/l) و ریفامپیسین (۱۰۰mg/l) حل شد و به مدت ۶-۵ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد مجدداً کشت شد. سپس سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل در محلول Induction medium (Lee et al. 2008) حاوی ۲۰۰ میکرو مولار استوسیرینگون حل شد تا OD_{600}=۰/۴ به دست آمد (Lee et al. 2008). و در نهایت به برگ ۴ هفته‌ای گیاه لوبیا (متصل به بوته) تزریق شد (شکل۲). گلدان‌ها، بعد از تزریق به اتاقک کشت با دمای دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

شکل۲- تزریق سوسپانسیون اگروباکتریوم به وسیله سرنگ بدون سوزن و صرفاً با ایجاد فشار به ناحیه پشت برگ و پخش شدن سوسپانسیون اگروباکتریوم داخل آب میان‌بافتی در گیاه لوبیا

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج پروتئین

گلدان‌ها پس از سه روز به آزمایشگاه منتقل شدند، برگ‌های تزریق شده از گیاه جدا شد و ناحیه تزریق شده برگ برای استخراج پروتئین مورد استفاده قرار گرفت (Fido et al. 2004). به این صورت که ۲۵۰ میکرولیتر بافر استخراج mMTris-HCl ۱۵۰ با pH= ۸ داخل۰/۲۳ گرم مواد گیاهی پودر شده ریخته شد و ورتکس شد (میزان بافر استخراج ۱/۲ حجم مواد گیاهی می‌باشد). نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت سپس به مدت ۲۰ دقیقه داخل سانتریفیوژ یخچال‌دار با g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول روی رسوب که حاوی شیره گیاه است به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد و در نهایت میکروتیوب‌های حاوی شیره گیاه به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

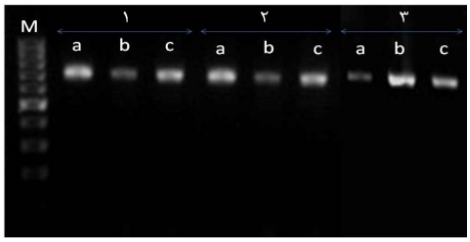
ارزیابی پروتئین

به منظور ارزیابی کمیت پروتئین کل از روش Bradford (1976) استفاده شد. همچنین متداول‌ترین شیوه در مقایسه کیفی پروتئین‌ها، مطالعه نوارهای الکتروفورزی به شمار می‌رود. جهت انجام مقایسه‌های کیفی بر روی نوارهای الکتروفورزی پروتئین‌های محلول برگی از تکنیک SDS-PAGE به روش لیملی (Laemmli 1970) استفاده شد.

به منظور بررسی میزان دقیق تظاهر ژن *LicBM2* میزان پروتئین فعال به روش کاهش گلوکز (Miller 1959) اندازه‌گیری شد. آنزیم لیگیناز محصول ژن *licBM2* خاصیت آنزیمی دارد که با استفاده از آن می‌توان سطح بیان ژن را تخمین زد و مقدار پروتئین را اندازه‌گیری کرد.

نتایج و بحث

بر اساس اندازه محصول واکنش PCR و حضور یا عدم حضور باند،کلونی‌های نوترکیب اگروباکتریوم شناسایی شد. برای تایید کلونی‌های نوترکیب از آغازگرهای ژن *LicBM2* استفاده شد و برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد. وجود باند ۷۰۰ جفت بازی در ژل، تایید کننده حضور ژن *LicBM2* و تایید حضور پلاسمید نوترکیب در اگروباکتریوم می‌باشد (شکل۳).



شکل۳- تایید کلونی‌های نوترکیب در باکتری *Agrobacterium tumefaciense* ستون M) مارکر ۱kb؛ ستون ۱) پلاسمید شماره ۱ (کلونی‌های a، b و c)؛ ستون ۲) پلاسمید شماره۲ (کلونی‌های a، b و c)؛ ستون۳) پلاسمید شماره ۳ (کلونی‌های a، b و c)

تزریق سوسپانسیون‌های اگروباکتریوم به داخل اندام‌های گیاه (اگروانفیلتریشن) روشی بسیار سریع و موثر است که نیاز به تجهیزات گران قیمت ندارد. بنابراین چندین پروتکل برای گونه‌های گیاهی مختلف در طی ۱۵ سال اخیر منتشر شده که فاکتورهای موثر بر فرآیند آلودگی با اگروباکتریوم و بنابراین کارایی بیان موقت تحقیق و بررسی شده است Kapila et al. 1997; Wroblewski et al. 2005; Zottini et al. 2008; Santos-Rosa et al. 2008) یکی از عوامل موثر در کارایی اگروانفیلتریشن کیفیت مواد گیاهی استفاده شده می‌باشد. ما در این مطالعه از اولین برگ‌های کاملاً گسترش یافته لوبیا (۴-۳ هفته‌ای) استفاده کردیم و برگ‌های مشابه از نظر سن و اندازه و مکان قرار گرفتن در گیاه را انتخاب نمودیم. انتخاب نمونه‌ها بر اساس مطالعات قبلی انجام شده در این زمینه انجام گرفت. به طوری که مطالعه انجام شده توسط Santos-Rosa et al. (2008) نشان داد که بهترین و بالاترین سطح بیان موقت وقتی که از اولین برگ‌های کاملاً گسترش یافته استفاده شود به دست می‌آید. همچنین Bhaskar et al. (2009) برگ‌های سیب‌زمینی را در مراحل رشدی مختلف گیاه آزمون کردند و دریافتند وقتی که از برگچه‌های انتهایی ۶-۵ هفته‌ای گیاه سیب‌زمینی استفاده شود تزریق موثرتر است. آن‌ها ملاحظه کردند که برگ‌های جوان برای تزریق راحت‌تر هستند اما کارایی تزریق زمانی که از برگ‌های ۴-۳ هفته‌ای گیاه استفاده شود پایین می‌آید.

عامل موثر دیگر در کارایی اگروانفیلتریشن چگالی سوسپانسیون اگروباکتریوم می‌باشد. در این مطالعه از سوسپانسیون سلولی با OD_{600}=۰/۴ استفاده شد. طبق مطالعات et al. (2005)

Archive of SID
www.SID.ir

Wroblewski سوسپانسیون سلولی با چگالی کمتر از OD_{600}=۰/۱ باعث ایجاد سطح تراریختی پایین می‌شود همچنین چگالی سلولی بالای OD_{600}=۱ باعث زردی بافت و یا پژمرده شدن آن می‌شود و در صورتی که چگالی سلولی OD_{600}=۰/۳ یا کمتر باشد سطح بیان موقت پایینی بدست می‌آید.

عامل دیگر موثر در کارایی اگروباکتریوم دمای نگهداری گیاهان بعد از تزریق می‌باشد. ما در این مطالعه گیاهان را بعد از تزریق در اتاقک کشت در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری کردیم. دما به عنوان یک عامل موثر برای انتقال ژن توسط اگروباکتریوم به گیاه می‌باشد و تنظیم انتقال T-DNA از طریق ژن‌های *vir* وابسته به دما می‌باشد (Dillen et al. 2005). در مطالعه‌ای که در گیاه رز صورت گرفت (Yasmin et al. 2010) به منظور بررسی اثر دما در کارایی اگروباکتریوم، گلبرگ‌های رز بعد از تزریق در دماهای ۲۵،۲۲،۱۹و ۲۸ قرار گرفتند و بعد از ۴ روز سطح بیان موقت ارزیابی شد و بالاترین سطح بیان ژن GUS در ۲۲ درجه سانتی‌گراد بدست آمد.

عامل دیگر دخیل در کارایی اگروباکتریوم استفاده از ترکیبات فنولی مثل استوسیرینگون می‌باشد. استوسیرینگون القاکننده اپرون *vir* اگروباکتریوم تومفاسینس می‌باشد (Hiei et al. 1994). اهمیت استوسیرینگون به خاطر توانایی آن در القای ژن‌های بیماری‌زایی اگروباکتریوم می‌باشد که برای انتقال T-DNA لازم است (McCullen et al. 2006). در این تحقیق کارایی اگروباکتریوم در انتقال ترکیبات پلاسمیدی ۱، ۲ و ۳ با حضور استوسیرینگون به وسیله شمارش تعدادی از نمونه‌ها که پروتئین فعال داشته‌اند به نسبت کل نمونه ها به ترتیب: ۲۳، ۳۲ و ۴۸ درصد محاسبه شد. قبلاً در مطالعه‌ای که به این ترتیب انجام گرفت کارایی تراریختی در حضور استوسیرینگون ۶۳- ۵۵ درصد بدست آمد (Sheikholeslam et al. 1987).

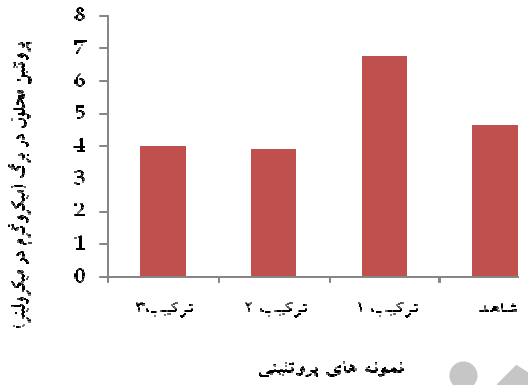
ارزیابی پروتئین

پروتئین کل محلول در گیاه که از انتقال سه ترکیب مختلف پلاسمیدی به سلول‌های گیاه بدست آمده بود به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. میزان پروتئین اندازه گیری شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳۰ تکرار برای هر تیمار از طریق نرم افزار SAS انجام گرفت (جدول۱). آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را بین ترکیب پلاسمیدی یک با دو ترکیب پلاسمیدی دیگر و نمونه‌های شاهد نشان داد (شکل۴).

جدول۱- جدول تجزیه واریانس میزان پروتئین کل محلول در برگ (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۵۳/۲۳**
خطا	۱۱۶	۰/۲۷

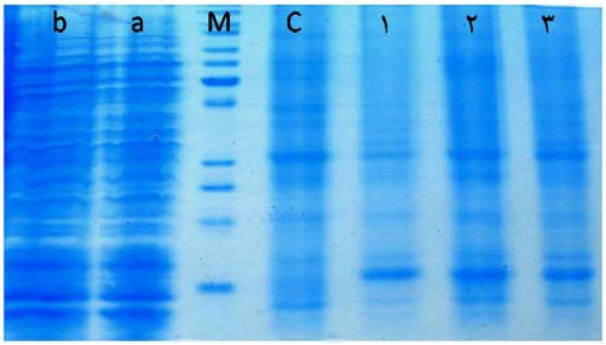
** اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد



شکل۴- نمودار مقایسه میانگین پروتئین محلول در برگ، شاهد) میزان پروتئین در برگ‌های تزریق نشده؛ ترکیب پلاسمیدی۱) میزان پروتئین در برگ‌های تزریق شده توسط ترکیب پلاسمیدی شماره ۱؛ ترکیب پلاسمیدی۲) میزان پروتئین در برگ‌های تزریق شده توسط ترکیب پلاسمیدی شماره ۲؛ ترکیب پلاسمیدی۳) میزان پروتئین در برگ‌های تزریق شده توسط ترکیب پلاسمیدی شماره ۳

برای ارزیابی کیفی پروتئین از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید در حضور دترجنت یونی سدیم دودوسیل سولفات یا لوریل سولفات (SDS) که یکی از کارآمدترین روش‌ها برای تعیین وزن ملکولی پروتئین‌ها می‌باشد استفاده شد. نمونه‌های پروتئینی استخراج شده از برگ‌های تراریخته و پروتئین اگروباکتریوم همراه با یک نمونه پروتئین برگی که تزریق اگروباکتریوم در آن انجام نشده به عنوان شاهد روی ژل اکریل آمید ۱۵ درصد داخل چاهک‌ها ریخته شد (شکل ۵).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۵- ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد. ستون M) مارکر ۲۰۰- ۱۰ کیلو دالتون ؛ ستون C) نمونه پروتئین گیاهی بدون تزریق (شاهد)؛ ستون ۱) نمونه پروتئین گیاهی مربوط به پلاسمید شماره۱؛ ستون ۲) نمونه پروتئین گیاهی مربوط به پلاسمید شماره۲؛ ستون ۳) نمونه پروتئین گیاهی مربوط به پلاسمید شماره۳؛ ستون a) نمونه پروتئین اگروباکتریوم ترانسفورم شده با پلاسمید شماره۱؛ ستون b) نمونه پروتئین اگروباکتریوم غیر ترانسفورم شده.

وجود باند پروتئینی حدود ۱۶ کیلو دالتون نشان دهنده پروتئین نوترکیب می‌باشد به دلیل اینکه این باند در نمونه شاهد و نمونه پروتئین مربوط به اگروباکتریوم مشاهده نشده است.

طبق نتایج به دست آمده در این تحقیق ژن تحت کنترل عناصر تنظیم کننده‌ای که باعث انتقال و تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود (ترکیب پلاسمیدی شماره ۱) بیشترین میزان پروتئین را تولید کرده است. زیرا شبکه آندوپلاسمی (ER) محیطی اکسید کننده است (Oxidizing) که میزان پروتئازها درآن پایین می‌باشد و بنابراین پروتئین‌های نوترکیب هضم نمی‌شوند که این امر موجب تجمع بیشتر پروتئین نوترکیب می‌گردد. در این تحقیق توالی اسیدآمینه‌ای KDEL در انتهای C پروتئین نوترکیب باعث می‌شود تا پروتئین درشبکه آندوپلاسمی باقی بماند.

در مطالعه‌ای که از توالی KDEL و سیگنال پپتید LeB4 برای انتقال و نگهداری پروتئین‌های نوترکیب scFv در شبکه آندوپلاسمی استفاده شد، ۱۰-۸ برابر بیان بالاتری نسبت به زمانی که از این توالی‌ها استفاده نشد به دست آمد (Fiedler et al.1997). همچنین Schouten et al. (1997) نیز بیان کردند که اضافه کردن پپتید KDEL باعث افزایش سطح بیان قطعات scFv می‌شود. ایشان ماکزیمم سطح بیان را نیز اندازه گیری کردند که ۰/۲ درصد کل پروتئین محلول بود، در حالیکه قطعات بدون KDEL هیچ تجمعی در سیتوزول نشان ندادند.

میزان پروتئین کل در ترکیبات پلاسمیدی دوم و سوم با هم اختلاف معنی‌داری نشان ندادند زیرا مدت زمانی که جهت بیان سیستم تظاهری در اختیار بود ۷۲ ساعت می‌باشد که این زمان برای ایجاد اختلاف بین این دو سیستم کافی نبوده است. و امکان دارد در بیان دائم که مدت زمان فعالیت سیستم‌ها بیشتر است، اختلاف آن‌ها بروز کند. آزمایشات هدف‌گیری به صورت مقایسه ایمونوگلوبولین‌های با اندازه کامل و قطعات Fv تک زنجیره‌ای توسط (Zimmermann et al. 1998) نیز نشان داد که مسیر ترشحی نسبت به ذخیره سیتوزولی برای بسته‌بندی پروتئین‌ها مناسب‌تر بوده و برای ذخیره پروتئین در سطح بالا مزایای بیشتری دارد. از آنجا که پروتئین‌های نوترکیب عموماً در سیتوزول ناپایدار هستند بنابراین وقتی که با استفاده از سیگنال پپتید به سمت مسیر ترشحی هدفمند شوند، عملکرد آن‌ها در گیاهان افزایش پیدا می‌کند (Conrad et al. 1998)

در این مطالعه با استفاده از این نمونه‌های پروتئینی آزمون کاهش گلوکز انجام گرفت و از آنجا که طی مراحل آزمایش اثر گلوکز خود گیاه صفر شده بود لذا گلوکز تولیدی در اثر فعالیت *LicBM2* بوجود می‌آمد اما در تیمار شاهد همان‌طور که انتظار می‌رفت هیچ گلوکزی تولید نشد. بنابراین این تیمار و همچنین تکرارهایی از سه تیمار دیگر که فاقد گلوکز بود از آنالیز حذف شد. لذا تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل با سه تیمار به کمک نرم افزار SAS انجام گرفت (جدول۲). آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را بین ترکیب پلاسمیدی یک با دو ترکیب پلاسمیدی دیگر نشان داد (شکل۶). نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان گلوکز که در واقع میزان بیان ژن گزارشگر را اندازه‌گیری می‌کند نشان داد که سیستم بیانی که باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود بیشترین میزان گلوکز و در نتیجه بالاترین میزان بیان ژن گزارشگر را دارد. بین سیستم تظاهری که باعث ترشح پروتئین به آپوپلاست شده است و سیستمی که باعث باقی ماندن پروتئین در سیتوزول شده است اختلاف معنی‌داری از نظر میزان گلوکز مشاهده نشد که دلیل این امر، مدت زمان کوتاه تظاهر ژن در این تکنیک (۷۲ ساعت)

Archive of SID

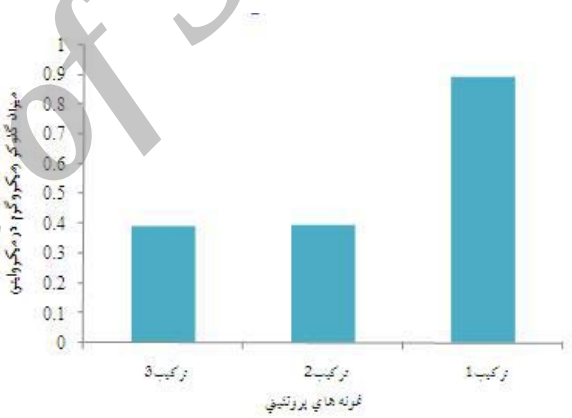
www.SID.ir

می‌باشد زیرا زمان کافی جهت مشخص شدن اختلاف بین این دو سیستم وجود نداشته است. بنابراین میزان پروتئین نوترکیب در ترکیب پلاسمیدی شماره یک که باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود بیشترین مقدار است که دلیل آن عدم وجود پروتئازها در شبکه آندوپلاسمی است که باعث می‌شود پروتئین هضم نشود.

جدول۲- جدول تجزیه واریانس میزان گلوکز محلول در برگ (میکروگرم در میکرولیتر)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۲	۰/۶۸۶**
خطا	۲۹	۰/۰۰۳

** اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد



شکل۶- نمودار مقایسه میانگین میزان گلوکز، ترکیب۱) میزان گلوکز در برگ‌های تزریق شده توسط ترکیب پلاسمیدی شماره ۱؛ ترکیب۲) میزان گلوکز در برگ‌های تزریق شده توسط ترکیب پلاسمیدی شماره ۲؛ ترکیب۳) میزان گلوکز در برگ‌های تزریق شده توسط ترکیب پلاسمیدی شماره ۳

ضرائب همبستگی بین میزان پروتئین محلول و میزان گلوکز در سه ترکیب پلاسمیدی مورد مطالعه به روش پیرسون و در سطح یک درصد با استفاده از نرم افزار SAS اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بین میزان پروتئین محلول در برگ و میزان گلوکز که نماینده میزان پروتئین نوترکیب می‌باشد همبستگی مثبت و بسیار بالایی (۰/۹۷**) وجود دارد. نتایج حاصل از همبستگی بین میزان پروتئین کل و میزان گلوکز در سه سیستم تظاهری پیشنهادی نشان دهنده این است که با افزایش میزان پروتئین کل میزان گلوکز، که ناشی از بیان ژن گزارشگر می‌باشد افزایش می‌یابد. از این رو می‌توان صرفاً با اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول به فعالیت بهتر سیستم پی برد که در وقت و هزینه صرفه‌جویی می‌شود. با روش بیان موقت می‌توان توانایی سیستم بیان ژن را قبل از انتقال دائم به گیاه مورد ارزیابی قرار داد، زیرا تولید گیاه تراریخته با تظاهر دائم مستلزم صرف وقت و هزینه است. به این ترتیب با تعیین بهترین سیستم و حذف سیستم‌هایی که کارایی کمتری دارند می‌توان در وقت و هزینه صرفه‌جویی کرد. همچنین از این روش می‌توان جهت تولید سریع پروتئین‌های با ارزش استفاده کرد.

تکنیک استفاده شده در این مطالعه (اگروایانفیلتریشن) در مقایسه با دیگر سیستم‌های تعیین بیان تراریخت، دارای چندین مزیت می‌باشد. از جمله اینکه برخلاف ناقل‌های ویروسی با محدودیت در اندازه ژن منتقل شده مواجه نیست (Porta et al. 1996)، انجام آن ساده‌تر از بمباران ذره و تراریختی پروتوپلاست می‌باشد. سریع است و برخلاف تراریختی پایدار اجازه می‌دهد ژن‌ها آنالیز شوند و اثر زیان آوری روی رشد و نمو نداشته باشند. مقدار بافت بیان شده به صورت موقت برای انجام آنالیز پروتئین و RNA کافی است و پتانسیل استفاده برای تولید پروتئین در مقیاس آزمایشگاهی را دارد (Vaquero et al. 1999). همچنین به وسیله این روش می‌توان برخی از پروتئین‌ها را بدون نیاز به باززایی گیاهان تراریخت خصوصاً در گونه‌های گیاهی که به سختی باززایی می‌شوند، تولید کرد (Horn et al. 1999; et al.1999 Fischer). این روش ارزان است و به تجهیزات گران قیمت نیاز ندارد. در سال‌های اخیر این روش جهت بررسی عملکرد عوامل تنظیم کننده فعالیت ژن در ایران نیز مورد استفاده قرار گرفته است. با استفاده از روش اگروایانفیلتریشن عملکرد بخش هسته‌ای پیشبر E8 که یک پیشبر اختصاصی میوه در گوجه فرنگی است با پیشبر *CaMV35S* مقایسه شد (Ahmadi et al. 2012). استفاده از این روش در گندم نیز مورد بررسی قرار گرفت که OD_{600}=۰/٦ بهترین غلظت باکتری تشخیص داده شد (Irani et al. 2012). همچنین در این مطالعه از سیستم‌های بیانی استفاده شد که عناصر مختلفی را داشتند و امکان مقایسه اثر این عناصر بر میزان بیان ژن

Archive of SID
www.SID.ir

وجود داشت. از آنجا که در این پلاسمیدها و سیستم‌های تظاهر امکان جایگزینی عناصر تنظیمی مختلف و مقایسه و بررسی آن‌ها وجود دارد، می‌توان بهترین عناصر تنظیمی بیان ژن را جهت دستیابی به بالاترین میزان تولید پروتئین نوترکیب در گیاه را شناسایی نمود.

طبق این تحقیق جهت انتقال ژن‌های نوترکیب می‌توان از ترکیب پلاسمیدی شماره یک استفاده کرد. همچنین طبق تحقیقات مختلف میزان بیان موقت بیانگر بیان دائم می‌باشد (Wroblewski et al. 2005; Zottini et al.2008). از این رو جهت تولید لوبیای تراریخته با ژن‌های مختلف جهت تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های بیولوژیک و محیطی می‌توان از این ترکیب پلاسمیدی استفاده نمود.

از آنجا که مهمترین مباحث و نگرانی‌های ایمنی زیستی در مورد گیاهان تراریخته استفاده از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد، محققین اخیراً به دنبال شناسایی و استفاده از ژن‌های مارکری می‌باشند که در فرآیندهای متابولیکی گیاه نقش دارند. در این مطالعه ژن مارکر *LicBM2* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد بیان موقت ژن مارکر *LicBM2* در داخل سلول‌های گیاه لوبیا با موفقیت انجام شد لذا استفاده از ژن مارکر *LicBM2* می‌تواند روش جدیدی برای بررسی میزان بیان ژن‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته باشد. مزیت اصلی استفاده از ژن مارکر *LicBM2* ایمنی زیستی، دقت و حساسیت بالا، سادگی کار و قابل اطمینان بودن آن می‌باشد.

منابع

Abdeev RM, Goldenkova IV, Musiychuk KA, Piruzian ES (2003) Expression of a thermostable bacterial cellulase in transgenic tobacco plants. Russian Journal of Genetics 39:300-305.

Abdeeva I, Mokryakova M, Mirakhorli N, Piruzian E (2008) The development of vector systems for expression of defensin gene from *Helianthus annus* in plants. XX International of genetics "Genetics-Understanding living systems" Berlin.

Ahmadi N, Rahnama H, Kazemi Tabar SK (2012) Cloning of tomato *E8* promoter and its analysis in transient assays using Agro-infilteration System. Journal of Agricultural Biotechnology 3:1-14. (in farsi).

Baumlein H, Wobus U, Pustell J, Kafatos FC (1986) The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. Nucleic acids research 14:2707-2720.

Bhaskar PB, Venkateshwaran M, Wu L, Ane JM, Jiang J (2009) *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing: a rapid tool for functional gene assay in potato. PloS one 4:1-8.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.

Conrad U, Fiedler U (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. Plant Molecular Biology 38:101-109.

Dillen W, Clercq J, Kapila J, Zambre M, Montagu M, Angenon G (1997) The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciense* mediated gene transfer to plants. Plant Journal 12:1459-1463.

Fido RJ, Mills ENC, Rigby NM, Shewry PR (2004) Protein extraction from plant tissues. Methods in Molecular Biology-Clifton Then Totowa 244:21-28.

Fiedler U, Phillips J, Artsaenko O, Conrad U (1997) Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. Immunotechnology 3:205-216.

Fischer R, Schillberg S (2004) Molecular Farming, plant made pharmaceuticals and technical proteins, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, 114 p.

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

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryzasativa L.*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant Journal 6:271-282.

Horn ME, Woodard SL, Howard JA (2004) Plant molecular farming: systems and products. Plant Cell Reports 22:711-720.

Irani Z, Sanjarian F, Haghnazari A (2012) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient gene expression by agroinfiltration in wheat. The 12th Iranian Genetics Congress, May 22-24,Tehran PP. 1-6. (in farsi)

Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Science 122:101-108.

Komakhin RA, Abdeeva IA, Salehi Dzhuzani GR, Goldenkova IV, Zhuchenko AA (2005) Thermostable lichenase as a translational reporter. Russian Journal of Genetics 41:23-31.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Lee MW, Yang Y (2006) Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. Methods in Molecular Biology-Clifton Then Totowa 323:225-229.

Archive of SID
www.SID.ir

Liu ZZ, Wang JL, Huang X, Xu WH, Liu ZM, Fang RX (2003) The promoter of a rice glycine-rich protein gene,Osgrp-2, confers vascular-specific expression in transgenicplants. Planta 216: 824-833.

McCullen CA, Binns AN (2006) Agrobacterium tumefaciens and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. Annual review of cell and developmental biology 22:101-127.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of rediucing sugar. Analytical Chemistry 31:420-428.

Munro S, Pelham HRB (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell 48:899-907.

Palanichelvam K, Cole AB, Shabababi M, Schoelz JE (2000) Agroinfiltration of Cauliflower mosaic virus gene VIelicits hypersensitive response in Nicotiana species. Molecular Plant Microbe Interactions 13: 1275-1279.

Porta C, Spall VE, Lin T, Johnson JE, Lomonossoff GP (1996) The development of cowpea mosaic virus as a potential source of novel vaccines. Intervirology 39:79-84.

Santos-Rosa M, Poutaraud A, Merdinoglu D, Mestre P (2008) Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration. Plant Cell Reports 27:1053-1063.

Schouten A, Roosien J, de Boer JM, Wilmink A, Rosso MN, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Bakker J, Schots A (1997) Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol1. FEBS Letters 415:235-241.

Scofield SR, Tobias CM, Rathjen JP, Chang JH, Lavelle DT,Michelmore RM (1996) Molecular basis of gene-forgene specificity in bacterial speck disease of tomato. Science 274: 2063-2065.

Sheikholeslam SN, Weeks DP (1987) Acetosyringone promotes high efficiency transformation of Arabidopsis thaliana explants by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology 8:291-298.

Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Prasad KS, Bapat VA(2003) Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. Protein Expression and Purification 32: 7-10

Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK, Blaylock LA, Shin H, Chiou TJ, Katagi H, Dewbre GR (2000) Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. Plant Journal 22:531-541.

Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences 96:11128-11133.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. Plant Journal 33:949-956.

Weigel D, Glazebrook J (2002) Arabidopsis: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Pr.

Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R (2005) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. Plant Biotechnology Journal 3:259-273.

Yasmin A, Debener T (2010) Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102:245-250.

Zimmermann S, Schillberg S, Liao YC, Fisher R (1998) Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in shape *Nicotiana tabacum*. Molecular Breeding 4:369-379.

Zottini M, Barizza E, Costa A, Formentin E, Ruberti C, Carimi F, Lo Schiavo F (2008) Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. Plant Cell Reports 27:845-853.

Archive of SID

www.SID.ir