

## **Optimization of transient gene expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)**

**Masomeh Nasiri Mogadam** 

PhD student of Plant Biotechnology, Department of Plant production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. E-mail address: Msnr88827@yahoo.com

**Asad Maroufi** 

\*Corresponding author. Associate Professor of Agricultural Biotechnology, Department of Plant production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. E-mail address: a.maroufi@uok.ac.ir

**Yousef Sharafi**

Assistant Professor Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (ARREO), Maragheh, Iran. E-mail address: yousefsharafi13660227@gmail.com

**Mokhtar Jalali Javaran** 

Professor of Molecular Genetics and Genetics Engineering, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail address: M\_jalali@modares.ac.ir

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

The aim of this study is to optimize tomato as a suitable plant system for transient gene transformation for the production of pharmaceutical and industrial compounds.

#### **Materials and methods**

In order to investigate transient gene expression, three concentrations of *Agrobacterium* in OD<sub>600</sub> (0.4, 0.6 and 0.8), three times after inoculation (4, 7 and 10 days) and two conditions with the presence of *p19* gene and without *p19* were selected as factors affecting the gene expression. The vectors used in this research *pXK2FS7* and *pCAMBIA1304* contained *GFP* and *P19* genes, respectively. For transient *GFP* transformation, leaves of seedlings were inoculated using agroinfiltration method. In this way, different concentrations of *Agrobacterium* containing *pXK2FS7* vector and *P19* vector were mixed together and the expression of *GFP* gene was

investigated. All the leaves of tomato plants at the appropriate stage were injected by insulin syringe without needle on the lower surface of the leaf. In order to confirm the transfection of the *GFP* and its expression, RNA extraction, cDNA synthesis and the analysis of expression by Real-Time PCR were performed and the expression of the GFP protein with a fluorescence microscope was finally detected.

### Results

The results showed that the concentration of *Agrobacteria*, the number of days after inoculation, and the expression of the *p19* had significant effects on the *GFP* expression. The expression of *p19* as a suppressor of gene silencing mechanism led to higher *GFP* expression in comparison with the absence of *p19*. Additionally, it was found that dilution of 0.6OD<sub>600</sub> *Agrobacterium* was the most suitable concentration for high expression of *GFP* agroinfiltration. Furthermore, the highest level of *GFP* expression was obtained 7 days after leaf inoculation. The best combination for maximum *GFP* expression at transcript level obtained at 0.6 OD<sub>600</sub>, 7 days after inoculation and expression of *p19*.

### Conclusions

The results of this research can be used in preliminary studies or optimization of recombinant protein production in tomato leaves.

**Keywords:** Agroinfiltration, *GFP*, recombinant proteins, *p19*

**Paper Type:** Research Paper.

Citation: Nasiri Mogadam M, Maroufi A, Sharafi Y, Jalali Javaran M, (2023) Optimization of transient gene expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (4), 1-22.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 15 (4), 1-22.

DOI: 10.22103/jab.2023.21468.1483

Received: July 11, 2023.

Received in revised form: September 08, 2023.

Accepted: September 09, 2023.

Published online: December 30, 2023.



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


© the authors

## بهینه‌سازی بیان موقت ژن در گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*)

معصومه نصیری مقدم 

دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. ایمیل:

Msnr88827@yahoo.com

اسعد معروفی 


\*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه:

a.maroufi@uok.ac.ir

یوسف شرفی

استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات کشاورزی دیم، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (ARREO)، مراغه، ایران. رایانامه:

yousefsharafi13660227@gmail.com

مختار جلالی جواران 

استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه:

M\_jalali@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸

### چکیده

**هدف:** هدف از این تحقیق بهره‌گیری از گیاه گوجه فرنگی رقم کال‌جی به عنوان یک گیاه مدل برای انتقال موقت جهت تولید ترکیبات دارویی و صنعتی است.

**مواد و روش‌ها:** به منظور بررسی انتقال موقت ژن، سه غلظت آگرو باکتریوم در OD<sub>600</sub> (۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸)، سه زمان پس از تلقیح (۴، ۷ و ۱۰ روز) و دو حالت با حضور ژن *pI9* و بدون *pI9* به عنوان فاکتورهای مؤثر بر بیان موقت ژن انتخاب شدند. ناقلین مورد استفاده در این تحقیق *pXK2FS7* و *pCAMBIA1304* به ترتیب حاوی ژن‌های *GFP* و *P19* بودند. برای انتقال موقت ژن *GFP*، برگ گیاهچه‌های ۶ برگی با استفاده از روش آگرواینفیلتریشن تلقیح شدند. بدین صورت که غلظت‌های مختلف از آگروباکتریوم حاوی ناقل *pXK2FS7* و ناقل *P19* با یکدیگر مخلوط شدند و بیان ژن *GFP* بررسی گردید. همه برگ‌های گیاهان

گوجه فرنگی در مرحله مناسب رشدی توسط سرنگ انسولین بدون سوزن در سطح زیرین برگ تزریق شدند. به منظور تایید تراریختی و انتقال ژن استخراج RNA، ساخت cDNA و میزان بیان ژن GFP با استفاده از روش Realtime PCR انجام شد و نهایتاً مشاهده بیان پروتئین GFP با میکروسکوپ فلورئوسانس صورت گرفت.

**نتایج:** نتایج نشان داد که غلظت باکتری، تعداد روزهای پس از تلقیح و بیان ژن *p19* (پروتئین سرکوب‌کننده خاموشی ژن) بر بیان ژن GFP اثرات معنی‌داری دارند. به طوری که حضور ژن *p19* به عنوان سرکوبگر سیستم خاموشی ژن در مقایسه با عدم حضور در همه حالات باعث بیان بیشتر ژن GFP گردید. همچنین مشخص شد که رقت  $OD_{600} 0/6$  آگروباکتریوم مناسب‌ترین غلظت برای آگرواینفیلتریشن GFP است. به علاوه در ۷ روز پس از تلقیح، بالاترین میزان رونویسی ژن GFP بدست آمد. بهترین ترکیب به منظور حصول حداکثر میزان رونویسی ژن GFP، حضور ژن *p19*، غلظت  $OD_{600} 0/6$  آگروباکتریوم و جمع آوری نمونه‌های برگ ۷ روز بعد از تلقیح می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در مطالعات مقدماتی و یا بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های نوترکیب در برگ‌های گوجه فرنگی مورد استفاده قرار گیرد.

**کلید واژه:** آگرواینفیلتریشن، پروتئین نوترکیب GFP، *p19*

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** نصیری مقدم معصومه، معروفی اسعد، شرفی یوسف، جلالی جواران مختار (۱۴۰۲) بهینه‌سازی بیان موقت ژن در گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۴)، ۱-۲۲.

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



© the authors

#### مقدمه

امروزه تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب در صنایع آزیمی، کشاورزی و دارویی با تکیه بر مهندسی پروتئین و مهندسی ژنتیک در حال گسترش می‌باشد به طوری که محصولات تولید شده در این صنایع، بخش مهمی از نیازهای جوامع بشری را برطرف می‌کنند. پروتئین‌های دارویی با خواص درمانی، یکی از بزرگترین کلاس محصولات تولیدی در صنایع داروهای زیستی می‌باشند. رشد تقاضا برای پروتئین‌های نوترکیب با خاصیت درمانی، منجر به توسعه تکنولوژی‌هایی برای تولید با کیفیت بالا آنها شده است. پروتئین نوترکیب که با دستوری ژنتیکی و تغییرات DNA در موجودات مختلف به دست می‌آید، موجب تحول عظیمی در تنوع فرآورده‌های دارویی شده است به طوری که امروزه مصرف فرآورده‌های نوترکیب دارویی در کنار داروهای شیمیایی سهمی از بازار

مصرف را به خود اختصاص داده است و این روند همچنان ادامه دارد. حقیقت این است که در دهه‌های گذشته، پروتئین‌های درمانی تولید شده از سیستم‌های بیانی، چشم انداز پیشگیری و درمان بیماری‌های انسان را تغییر داده است. پروتئین‌های نوترکیب دارویی، دارای عملکرد بسیار اختصاصی بوده و بنابراین بر روی سایر فرآیندهای بیولوژیک، اثر سوئی نمی‌گذراند (Cheng et al. 2019). همچنین چون ماهیت این مولکول‌ها از خود بدن می‌باشند، بنابراین سازگاری بیشتر و بهتری با سیستم بیولوژیک بدن دارند و از این نظر عوارض جانبی کمتری دارند. این گروه از داروها برای بسیاری از بیماری‌ها، نظیر اختلالات ژنتیکی، سرطان و فشار خون استفاده می‌شوند که تاکنون درمان مؤثرتری برای آنها وجود نداشت. امروزه از این پروتئین‌ها در زمینه‌های مختلف به طور وسیع استفاده می‌شود، اما تولید آن‌ها از منابع طبیعی مشکل و هزینه‌بر می‌باشد (Shanmugaraj et al. 2020). سیستم‌های فرمانتاسیون یا تخمیر باکتریایی و سلول پستانداران در مقیاس بزرگ دارای هزینه‌های بالاتری هستند، بنابراین در کاربرد این سیستم‌ها محدودیت‌هایی وجود دارد. با توجه به مشکلات مطرح شده، کشف و توسعه سیستم‌های بیان جدید برای تولید پروتئین‌های نوترکیب امری ضروری می‌باشد که بر این اساس سیستم‌های بیانی گیاهان برای تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب ابداع و توسعه داده شده‌اند. زراعت مولکولی امکان استفاده از گیاهان تراریخته را به‌عنوان منبعی بی‌نظیر برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی فراهم می‌کند. تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان دارای مزیت‌های بسیاری از جمله؛ بی‌خطر بودن فرآورده‌های حاصل به دلیل عدم وجود عوامل بیماری‌زای مشترک با انسان، پردازش پس از ترجمه پروتئین‌های نوترکیب، به هم پیوستگی درست آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌های چند زنجیره‌ای و تولید فراوان و اقتصادی پروتئین‌های نوترکیب می‌باشند. به طور کلی روش‌های دستوری ژنتیکی گیاهان شامل تراریخته‌سازی پایدار هسته‌ای و پلاستییدی و تراریختی موقت می‌باشد. تا به امروز، تراریختی هسته‌ای پایدار به عنوان رایج‌ترین روش در تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است (Imani & Kogel 2020). از مشکلات گیاهان تراریخته که ژن به هسته آن‌ها منتقل شده است، می‌توان به زمان طولانی لازم برای رسیدن از مرحله ژن به محصول پروتئین مورد نظر، اشاره کرد. مشکل دیگر، نگرانی‌های ایمنی زیستی می‌باشد که شامل خطرات ناشی از فرار ژن و خطر انتشار ژن منتقل شده از طریق تلاقی با گیاهان غیر هدف است (Wani & Aftab 2022). علاوه بر این، سطح بیان ژن در گیاهان تراریخته از یک گیاه به گیاه دیگر متفاوت است و بیشتر اوقات پدیده خاموشی ژن به علت اثر مکانی ژن انتقال‌یافته در گیاهان تراریخته اتفاق می‌افتد (Kusnadi et al. 1997). انتقال ژن به ژنوم کلروپلاست در مقایسه با انتقال ژن به ژنوم هسته‌ای دارای مزایایی از قبیل تعداد نسخه و سطح بیان بیشتر می‌باشد. اما در اینجا نیز دو مشکل عمده وجود دارد اول، گلیکوزیله شدن در این پروتئین‌ها اتفاق نمی‌افتد و دوم اینکه نگرانی‌های مربوط به ایمنی زیستی در مورد انتقال ژن به کلروپلاست نیز صدق می‌کند (Bogorad 2000). گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) یکی از مهمترین گیاهان مدل جهت مهندسی ژنتیک و اصلاح در بین گیاهان دولپه‌ای است (Wing et al. 1994) که این مسئله با ژنوم کوچک این گیاه مرتبط بوده (Rick & Yoder 1988) و نقشه ژنتیکی این گیاه مشخص شده است (Tanksley et al. 1992). مک کورمیک و همکاران (McCormick et al. 1986) اولین مورد تراریختی گوجه فرنگی را گزارش کردند و بهترین روش انتقال ژن به گوجه فرنگی تا به حال با استفاده از آگروباکتریوم گزارش شده است.

کاربرد گوجه فرنگی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب، مستلزم بهینه‌سازی روش تراریختی آن است. با این حال روش تراریختی گوجه فرنگی هنوز یک روش معمول و قابل تکرار برای همه ارقام آن نیست (Hiei et al. 1997). فقدان روش تراریختی و بازایی با کارایی بالا مهمترین مانع در کاربرد فناوری انتقال ژن در ارقام اقتصادی گوجه فرنگی می‌باشد. امروزه با توجه به مراحل طولانی بررسی عملکرد گیاهان تراریخت پایدار، بیان موقت جایگزین مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب به حساب می‌آید. بیان موقت ژن‌های خارجی در بافت‌های گیاهی روشی ارزشمند و مؤثر برای تحلیل و بررسی عملکرد ژن در مدت زمان کوتاه در بیوتکنولوژی گیاهی است. از روش بیان موقت اغلب اوقات برای تأیید تراریختی و امکان تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود (Wood et al. 1986). در این روش، پروتئین در سطح بالا و مدت زمان کوتاه تولید می‌شود (Pogue et al. 2010). این روش سریع، انعطاف‌پذیر، ساده، بدون نیاز به کشت بافت و تمایز سلول‌های تراریخته قابل اجرا بوده و همچنین تحت تأثیر شرایط محیط طبیعی نیست و می‌توان گیاهان تراریخت را در شرایط گلخانه و شرایط کنترل شده رشد داد (Pröls et al. 1988; Töpfer et al. 1988). از جمله روش‌های بیان موقت ژن، اگرواینفیلتریشن است که انتقال موقت ژن به وسیله اگروباکتریوم است. در این روش، سوسپانسیون اگروباکتریوم به داخل برگ‌های گیاه تزریق می‌شود. این روش به‌عنوان یک ابزار ارزشمند در مطالعه جنبه‌های مختلف بیولوژی مولکولی شامل بیان ژن خارجی در گیاه، خاموشی ژن، خصوصیات راه‌اندازهای گیاهی و فاکتورهای رونویسی و... مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kaur et al. 2021; Nosaki et al. 2021). بیان موقت در چندین گونه گیاهی به کار گرفته شده است ولی از بین همه این گونه‌های گیاهی، بیشترین گزارش‌ها برای گیاه توتون *Nicotiana benthamiana* است. این تکنیک در یونجه، کاهو، گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس نیز به کار رفته است (van den Burg et al. 2008; Kaur et al. 2021). در ایران نیز تحقیقات ارزشمندی در زمینه انتقال موقت ژن انجام گرفته که بیشتر گزارش‌ها مربوط به انتقال موقت ژن *tPA* به گیاه توتون، بیان موقت *tPA* و ارزیابی اثر سیستم خاموشی ژن *P19* بر میزان پروتئین تولید شده (Amiri et al. 2016) و همچنین اثر سیستم خاموشی *P19* بر میزان رونویسی ژن *tPA* و میزان پروتئین *tPA* (tissue Plasminogen Activator) تولید شده در گیاه توتون اشاره کرد (Sharafi et al. 2020). بنابراین، از این روش می‌توان برای تراریختی موقت طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی دولپه‌ای استفاده نمود. عوامل محدودکننده زیادی تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS) از جمله عواملی است که در برگ‌های گیاهان تلقیح شده با اگروباکتریوم گزارش شده است (Vaucheret et al. 2020; de Felippes et al. 2001). فرآیند PTGS در گیاهان به عنوان سیستم ایمنی غیراختصاصی سرکوب کننده ویروس‌ها و به عنوان یک روش دفاعی عمل می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد حداقل سه مسیر خاموشی ژن در گیاهان وجود دارد. هر سه مسیر خاموشی RNA دارای منشأ یکسان در جانوران، قارچ‌ها و گیاهان است (Tang et al. 2008) که در این میان هر سه مسیر خاموشی RNA در گیاهان وجود دارد (Kalantidis et al. 2008; Eamens et al. 2008; Baulcombe 2004). در سیستم بیان موقت به منظور فائق آمدن بر مشکل خاموشی ژن پس از رونویسی، بیان پروتئین خارجی می‌تواند در حضور سیستم سرکوب

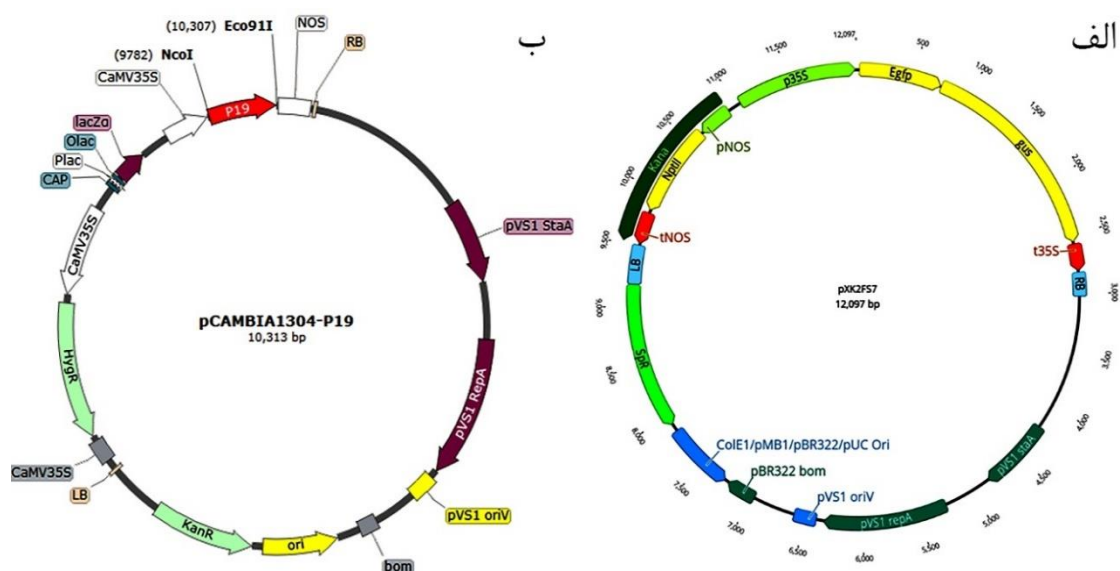
کننده خاموشی ژن افزایش یابد. از این رو شناسایی سرکوب کننده‌های خاموشی ژن پس از رونویسی، بسیار حائز اهمیت است. بسیاری از ویروس‌های گیاهی به گونه‌ای پروتئین‌ها را تغییر می‌دهند که بتوانند سیستم خاموشی گیاه را سرکوب کنند. ژن پروتئین P19 که از ویروس کوتولگی بوته گوجه فرنگی جداسازی شده است، به عنوان ژن مؤثر در سرکوبی سیستم خاموشی ژن شناخته شده است. پروتئین P19 یک پروتئین چندمنظوره است که به عنوان یک دیمر فعال هم در سیتوزول و هم در هسته قرار دارد و قادر است به مولکول‌های siRNA و miRNA متصل شود (Voinnet et al. 2004). از آنجایی که سطح siRNA مشتق شده از ویروس گیاهی در پاسخ به آلودگی افزایش می‌یابد، پروتئین P19 میزان siRNA دو رشته‌ای آزاد را از طریق اتصال غیراختصاصی کاهش می‌دهد و از این طریق پاسخ خاموشی را با ایجاد تداخل در اتصال siRNA به مجموعه RISC سرکوب می‌کند (Berry et al. 2009). بیان ژن و ترجمه پروتئین در گیاهان نقش مهمی در تعیین عملکرد پروتئین‌های نوترکیب ایفا می‌کنند. برای دستیابی به عملکرد بالای تولید یک پروتئین هترولوگ، تمامی مراحل از جمله رونویسی mRNA و پایداری آن، سنتز پروتئین، تغییرات پروتئین و تجمع پروتئین باید بهینه‌سازی شوند. به همین منظور توسعه یک روش انتقال ژن کارآمد برای گونه‌ها به مقدار زیادی به بهینه کردن عوامل مؤثر بر بیان ژن بستگی دارد. از جمله این عوامل می‌توان به نوع پلاسمید، سویه اگروباکتریوم، رقم گیاهی، مدت زمان تلقیح، ژن‌های سرکوبگر سیستم خاموشی ژن و عوامل محیطی اشاره کرد. با بررسی و بهینه‌سازی این عوامل احتمال دارد کارایی تولید پروتئین نوترکیب در گونه‌های مورد علاقه افزایش یابد. هدف اصلی از انجام این تحقیق، به دست آوردن شرایط بهینه انتقال موقت ژن به گوجه فرنگی به منظور تولید حداکثری پروتئین نوترکیب GFP بود.

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** در این تحقیق از گیاه گوجه فرنگی رقم کال جی (KAL G) جهت بیان موقت ژن GFP استفاده شد. به منظور کشت بذره‌های گوجه فرنگی، محیطی با مخلوط پیت‌ماس و پرلیت (نسبت ۱:۲) فراهم شد. سپس بذور در داخل لیوان به صورت سطحی کشت شدند و با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  در گلخانه پرورش داده شدند. پس از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها، آنها به گلدان (مخلوط پیت‌ماس و پرلیت (نسبت ۱:۲)) انتقال یافتند و تحت شرایط فوق‌الذکر در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان پرورش داده شدند. پس از ۴ هفته، گیاهان از نظر تولید اندام رویشی به‌ویژه برگ به حدی رسیدند که قابل تزریق بودند.

**سازه های ژنی:** وکتور بیانی مورد استفاده *pXK2FS7* بود که ژن *GFP* در ناحیه T-DNA آن قرار داشت (شکل ۱-الف). این ناقل با اندازه ۱۲ kb در ناحیه T-DNA دارای ژن مقاومت به کانامایسین *nptII* جهت بیان در گیاه و توالی پایان رونویسی NOS و همچنین ژن‌های بتاگلوکورنیداز (*GUS*) و پروتئین فلورسنت سبز (*GFP*) با پیش‌بر 35S CaMV بود. همچنین از ناقل *pCAMBIA1304-P19* جهت بررسی اثر P19 استفاده گردید. ناقل بیانی *pCAMBIA1304* به طول kb ۱۲/۵ دارای ژن مقاومت به کانامایسین *nptII* جهت بیان در باکتری و برای گزینش کلنی‌های باکتریایی و ژن مقاومت به

هیگرومایسین جهت ایجاد مقاومت در گیاه، پیش‌بر CaMV 35S و پایان رونویسی NOS، ژن *p19* در جلوی پیش‌بر CaMV 35S ناحیه آغاز همانندسازی ناقل (Ori) pBR322، سیگنال پلی‌آدنیله شدن (pA35S CaMV)، ناحیه اتصال پیش‌برن (CAP)، پیش‌بر اپرون لاکتوز (Plac)، اپرون لاکتوز (Olac) و همچنین جایگاه‌های برش آنزیمی است (شکل ۱-ب).



شکل ۱. الف: سازه حاوی ژن *GFP* و ب: سازه حاوی ژن *P19*

Figure 1. A) Construct contains the *GFP* gene. B) Construct contains the *P19* gene

تکثیر ناقلین حاوی سازه‌های ژنی در باکتری *E. coli* سویه *DH5α*: ناقلین *pXK2FS7* حاوی ژن *GFP* و

*pCambia1304-P19* حاوی ژن *P19* به منظور تکثیر و اطمینان از صحت وجود آنها، با استفاده از روش انجماد و ذوب (Holsters, De Waele, Depicker, Messens, Van Montagu & Schell 1978) سویه *E. coli* به باکتری *DH5α* انتقال یافتند و روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب کشت داده شدند. برای تأیید تکثیر سازه‌های ژنی مورد نظر از روش Colony PCR استفاده شد.

تراریختگی و تأیید حضور سازه ژنی در اگروباکتریوم: انتقال و کتورهای *pXK2FS7* و *pCambia1304* به

ترتیب حاوی ژن‌های *GFP* و *P19* به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 با روش ذوب و انجماد (Holsters, De Waele, Depicker, Messens, Van Montagu & Schell 1978) صورت گرفت. سلول‌های تراریخت در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین (۵۰ mg/ml)، استرپتومایسین (۵۰ mg/ml) و جنتامایسین (۲۵ mg/ml) برای ناقل *pXK2FS7* و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ mg/ml)، ریفامپیسین (۱۰۰ mg/ml) و هیگرومایسین (۴۰ mg/ml) برای ناقل *pCambia1304* در دمای ۲۸ °C کشت و پس از ۲۴ ساعت رشد کلونی‌ها بررسی شد. تأیید تراریختی اگروباکتریوم با استفاده از Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی (GFPR و GPPF) بررسی شد (جدول ۱).



جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در PCR

Table 1. Primers used in PCR

Primers	آغازگرها	%GC	طول آغازگر (باز)	طول قطعه تکثیر (جفت باز)
			Primer Length (bp)	amplified fragment length (bp)
GFPF	TCGTGACCACCCTGACCTAC	60%	20	300
GFPR	ACCTTGATGCCGTTCTTCTGC	55%	20	
GAPDHF	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	54%	22	108
GAPDHR	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	54%	22	

انتقال موقت به روش اگرواینفیلتراسیون در گیاه گوجه فرنگی: اگروباکتریوم‌های حاوی ناقل‌های *pXK2FS7* در

محیط کشت مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین، استرپتومایسین، جنتامایسین و ناقل *pCAMBIA1304* در محیط کشت محتوی کانامایسین، ریفامپیسین، هیگرومایسین در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۸ ساعت کشت شدند. سپس کشت‌ها با سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب  $5000\text{ g}$  رسوب داده شدند. سپس در محیط تلقیح شامل (استوسرینگون  $(200\mu\text{M})$ )، بافر MES ( $10\text{ mM}$ )، گلوکز ( $0/5$  درصد) و  $\text{MgCl}_2$  ( $10\text{ mM}$ ) با سه میزان غلظت ( $0/4$ ،  $0/6$  و  $0/8$ ) رقیق شدند. فاکتورهای مورد مطالعه بر بیان ژن شامل اثر ژن (تلقیح به همراه *P19* و بدون *P19*)، زمان برداشت برگ ( $4$ ،  $7$  و  $10$  روز بعد از تلقیح با اگروباکتریوم) و سه غلظت اگروباکتریوم ( $0/4$ ،  $0/6$  و  $0/8$   $\text{OD}_{600}$ ) بود. از میان گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط مناسب در زمان ۴ هفته پس از جوانه زنی، گیاهانی که از نظر تیپ ظاهری و رشدی از بقیه بهتر بودند به عنوان مواد مناسب جهت آزمایش انتخاب گردیدند. برگ‌های گیاهان انتخاب شده در مرحله ۶ برگی توسط سرنگ انسولین بدون سوزن تزریق شدند. تزریق در سطح زیرین برگ‌ها انجام شد به نحوی که در تمام پهنک برگ تزریق صورت بگیرد و قسمتی بدون تزریق باقی نماند. بعد از تلقیح برگ‌ها، گیاهان در اتاق رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. نمونه‌برداری از برگ‌ها برای آنالیزهای بیان ژن *GFP* در سطح ترانسکریپت و بیان پروتئین *GFP* انجام شد و تا انجام آزمایش در  $-80^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند.

استخراج RNA کل از برگ گیاه گوجه فرنگی و ساخت cDNA: نمونه‌گیری برگی در روزهای مختلف پس از

تلقیح، بر اساس دستورالعمل کیت RNXplus (شرکت سیناژن)، RNA گیاه در شرایط عاری از RNase استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه نانودرآپ (EPOCH, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت پارس طوس طبق دستور العمل انجام شد. در ابتدا آلودگی احتمالی DNA با استفاده از آنزیم *DNaseI* (شرکت Fermentas) از RNA کل استخراج‌شده حذف گردید. سپس به هر کدام از نمونه‌ها  $0/5\text{ mM}$  Random Hexamer (جهت افزایش بازدهی ساخت cDNA) اضافه و نمونه‌ها به مدت  $10\text{ min}$  در دمای اتصال  $65^{\circ}\text{C}$  قرار

داده شدند. اجزای واکنش ساخت cDNA، شامل بافر RT (5 X)، آنزیم RT ( $10 \mu\text{L}^{-1}$ ) و dNTP ( $10 \text{mM}$ ) به هر نمونه اضافه گردید و به ترتیب در زمان و دمای:  $10 \text{ min}$  در  $25^\circ\text{C}$ ،  $60 \text{ min}$  در  $47^\circ\text{C}$  و  $10 \text{ min}$  در  $70^\circ\text{C}$  قرار گرفتند.

#### واکنش Real Time PCR: جهت اندازه‌گیری بیان ژن GFP به روش qRT-PCR، واکنش‌های Real Time PCR

در دستگاه ترموسایکلر (ABI- USA) انجام شد. هر واکنش در حجم  $10 \mu\text{L}$  شامل  $1 \mu\text{l}$  SYBRGREEN،  $5 \mu\text{l}$  nuclease،  $3/25 \mu\text{l}$  free cDNA ( $0.75 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )، آغازگرها  $0.5 \mu\text{l}$  بود. از ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن رفرنس استفاده شد (Dheda, Huggett, Chang, Kim, Bustin, Johnson, Rook & Zumla 2005). پرایمرها (جدول ۱) و چرخه‌های دمایی PCR جهت انجام PCR در جدول ۲ آورده شده است. میزان بیان ژن *GFP* به کمک ژن *GAPDH* که به‌عنوان ژن مرجع انتخاب شده بود، نرمال‌سازی شد (Radonić, Thulke, Mackay, Landt, Siegert & Nitsche 2004). داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن برحسب سیکل آستانه (Ct)، سیکلی که شدت فلورسنت به خط آستانه می‌رسد، به دست آمد (Pfaffl 2001). مقدار بیان ژن با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  برای همه نمونه‌ها محاسبه شد (Livak & Schmittgen 2001). و نهایتاً داده‌های بیان ژن *GFP* مورد بحث و آنالیز قرار گرفتند. فاکتورهای مورد مطالعه شامل اثر ژن P19 (به همراه P19 و بدون P19)، زمان برداشت برگ (۴، ۷ و ۱۰ روز بعد از تلقیح با اگروباکتریوم) و سه غلظت اگروباکتریوم ( $0.4$ ،  $0.6$  و  $0.8 \text{ OD}_{600}$ ) بود. نمودار بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار Excell رسم شد (جدول ۲).

#### جدول ۲. چرخه‌های دمایی PCR برای انجام واکنش‌ها

Table 2. PCR temperature cycles

تعداد چرخه Cycle	زمان Time	دما (°C) Temperature	مرحله Step
1	min 5	94	Primary واسرشت‌سازی ابتدایی denaturation
35	s 30	94	denaturation واسرشت‌سازی
	s 30	58	Annealing اتصال
	s 30	72	Elongation طولیل‌سازی
1	min 7	72	Final elongation طولیل‌سازی نهایی

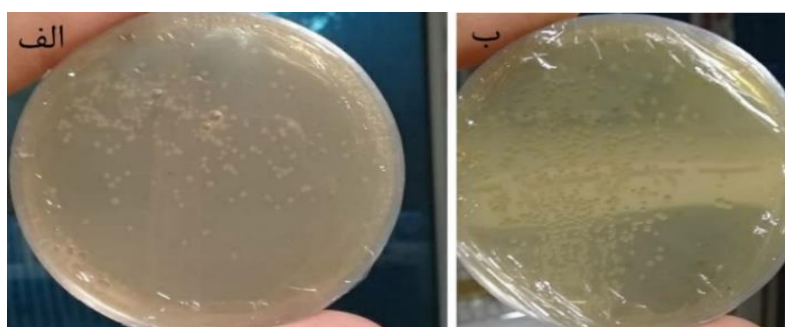
**مشاهده بیان پروتئین GFP:** نمونه برگگی از گیاهان تیمار شده (تراریخته احتمالی) و غیر تراریخته (شاهد) جمع آوری شدند. ریزنمونه‌های برگگی در زیر میکروسکوپ فلورسانس Olympus BX51 مجهز به فیلتر باند باریک ۴۶۰-۴۹۰ نانومتر در معرض نور فرابنفش در طول موج ۴۰۰ نانومتر قرار گرفتند. تصاویر با استفاده از یک دوربین دیجیتال متصل به کامپیوتر گرفته شد.

## نتایج و بحث

**تکثیر ناقلین *pXK2FS7* حاوی ژن *GFP* و *pCambia1304-P19* حاوی ژن *P19* به منظور تکثیر ناقلین حاوی ژن‌های *GFP* و *P19*، از باکتری *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  استفاده شد که در شکل ۲ نتایج حاصل از باکتری‌های تکثیر شده حاوی ناقلین نمایش داده شده است.**

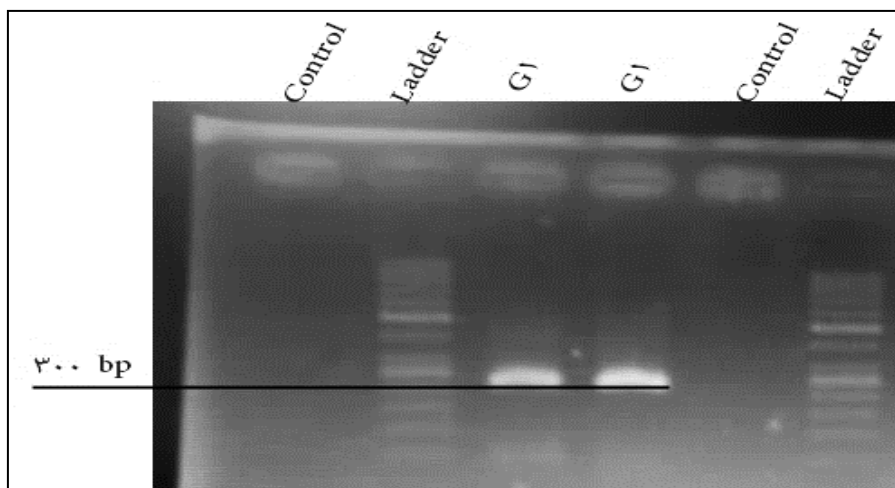
**تأیید سازه‌های ژنی ترانسفورم شده به آگروباکتریوم:** پس از انتقال پلاسمیدها به آگروباکتریوم، تأیید ترایخته بودن کلنی‌های ظاهر شده از طریق Colony PCR انجام گرفت. واکنش Colony PCR با استفاده از آغازگرهای GFP-F و GFP-R و باکتری‌های ترانسفورم شده برای انتقال وکتور و وجود آن انجام گرفت. نتایج حاصل برای بررسی انتقال وکتور *pXK2FS7* در شکل ۳ نشان داده شده است.

**استخراج RNA کل از برگ گیاه گوجه فرنگی و ساخت cDNA:** اولین قدم جهت اطمینان از بیان ژن *GFP*، استفاده از روش RT-PCR است که جهت انجام این مهم استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب صورت پذیرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز RNA استخراجی بر روی ژل آگارز ۱٪ و در شرایط عاری از RNase، مؤید کیفیت مطلوب RNA بود، به طوری که تفاوت باندی (۲۸ sRNA و ۱۸ sRNA) به خوبی مشخص است (شکل ۴).



شکل ۲. تکثیر ناقلین در باکتری *E. coli* سویه DH5 $\alpha$ . الف) باکتری *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  حاوی ناقل *pCambia1304-P19* (ب) باکتری *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  حاوی ناقل *pXK2FS7* رشد یافته روی محیط کشت LB جامد حاوی ریفامپیسین  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$

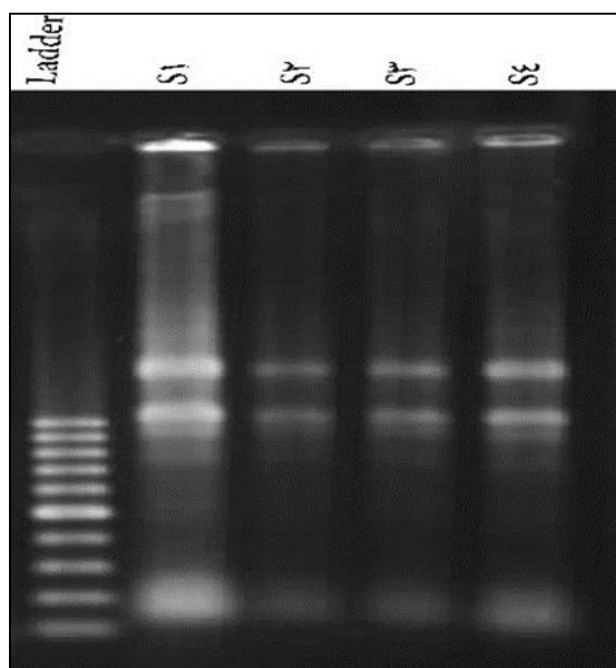
**Figure 2. Replication of vectors in *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . a) *E. coli* strain DH5 $\alpha$  containing *pCambia1304-P19* vector. b) *E. coli* strain DH5 $\alpha$  containing *pXK2FS7* vector Growth on solid LB medium containing 100  $\mu\text{g/ml}$  rifampicin**



شکل ۳. G1 باند حاصل از Colony PCR باکتری‌های تغییر یافته با پلاسمید حاوی ژن *GFP*، Control ها به

ترتیب آگروباکتریوم بدون سازه و بافت‌های تیمار نشده با آگروباکتریوم هستند، Ladder ۱۰۰ bp

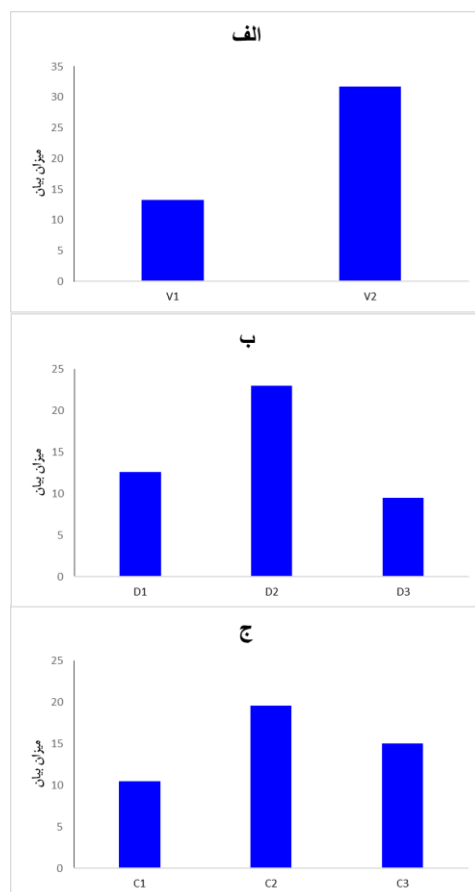
**Figure 3.** G1 obtained from Colony PCR of transformed bacteria with plasmid containing the *GFP* gene, controls, are agrobacterium without a construct and untreated tissue samples with agrobacterium. ladder 100 bp



شکل ۴. کیفیت RNA استخراج شده از نمونه‌های مختلف برگ گوجه فرنگی (S1-S4)، Ladder 100 bp

**Figure 4.** quality of RNA from different leaves is as follows: S1-S4 represent samples from different tomato leaves, Ladder 100bp

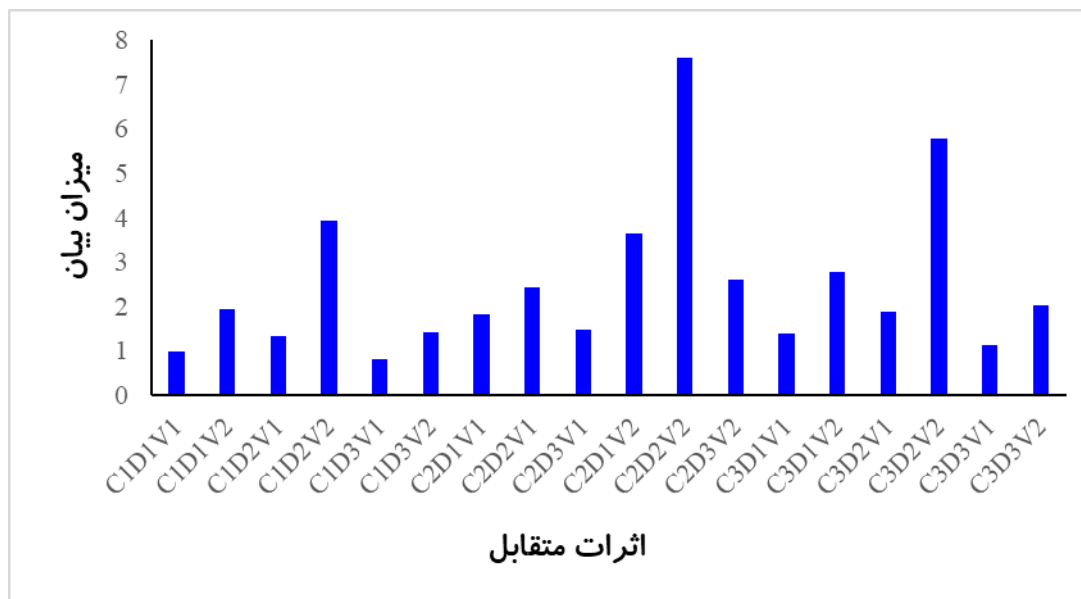
بررسی بیان موقت ژن *GFP* و تاثیر فاکتورهای مختلف بر بیان آن: ابتدا از میان گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط مناسب در هفته چهارم رشد پس از جوانه زنی، گیاهانی که از نظر تیپ ظاهری و رشدی از بقیه بهتر بودند به عنوان مواد مناسب برای آزمایش انتخاب گردیدند. داده‌های به دست آمده از واکنش PCR Real Time به صورت Ct از دستگاه استخراج شدند. نتایج کمی بیان ژن برای تیمارهای مختلف بر اساس روش دو به دو به توان منهای دلتا دلتا سی تی (روش لیواک) ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) (Livak method) محاسبه شد. تیمارهای مورد بررسی شامل حضور (V1) و عدم حضور پروتئین P19 (V2)، تعداد روز بعد از تلقیح آگروباکتریوم شامل ۴، ۷ و ۱۰ روز (به ترتیب D1، D2، D3) و غلظت آگروباکتریوم شامل سه غلظت ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ OD<sub>600</sub> (به ترتیب C1، C2، C3) بودند. نتایج نشان داد که اثر حضور پروتئین P19 بر بیان ژن کاملاً مشهود و معنی دار است (شکل ۵). اثر غلظت‌های آگروباکتریوم هم بر بیان ژن *GFP* تاثیر متفاوتی داشت و در غلظت ۰/۶ OD<sub>600</sub> بیشترین میزان بیان نسبت به غلظت‌های دیگر به دست آمد (شکل ۵). همچنین بیشترین میزان بیان ژن *GFP* پس از هفت روز (D2) از تلقیح مشاهده شد (شکل ۵). بین C1 و C3 و همچنین D1 و D3 اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در بررسی اثرات متقابل (ترکیب فاکتورها) بر بیان ژن چهار ترکیب تیماری (شامل C1D2V2، C2D2V2، C2D1V2 و C3D2V2) از ۱۸ ترکیب کل (شکل ۶)، نسبت به بقیه اثر معنی‌داری بر افزایش بیان ژن *GFP* داشتند. در تمام این ۴ ترکیب تیماری حضور سازه حاوی ژن *P19* تاثیرگذار بود (شکل ۶). در نهایت ترکیب تیماری C2D2V2 یعنی حضور *P19*، غلظت ۰/۶ باکتری و ۷ روز پس از تلقیح که بیشترین تأثیر را بر بیان ژن *GFP* داشتند و به عنوان بهترین اثر متقابل شناخته شد. این افزایش بیان ژن *GFP* کاملاً محسوس بود و ۷/۵ برابر نسبت به شاهد اثر افزایشی داشت (شکل ۶). به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد حضور و یا عدم حضور *P19*، غلظت باکتری و تعداد روز پس از تلقیح می‌توانند فاکتورهای مهمی بر بیان موقت ژن به روش آگرواینفیلتریشن باشند.



شکل ۵. تأثیر حضور (V2) و عدم حضور (V1) غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم (C1: غلظت ۰/۴، C2: غلظت ۰/۶، C3: غلظت ۰/۸) و روزهای پس از تلقیح بر میزان بیان ژن *GFP*

**Figure 5. effect of presence (V2) and absence (V1) of P19, different concentrations of agrobacterium (C1: 0.4, C2: 0.6, C3: 0.8) and days after inoculation on expression level of GFP**

**مشاهده بیان پروتئین GFP:GFP** یکی از ژن‌های گزارشگر معروف است که پروتئینی به نام پروتئین فلورسنت سبز را رمزگذاری می‌کند و همانطور که از نامش پیداست تابش سبز رنگی دارد. این پروتئین در صورت بیان در بافت‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسانس مجهز به فیلتر باند باریک ۴۶۰-۴۹۰ نانومتر در معرض نور فرابنفش در طول موج ۴۰۰ نانومتر می‌تواند نمایش داده شود. برای اطمینان از بیان ژن در سطح پروتئین برگ‌های تلقیح شده ژن به روش آگرواینفیلتریشن زیر نور فرابنفش در طول موج ۴۰۰ نانومتر ارزیابی و فلورسنس سبز در برگ‌های تراریخته به آسانی مشاهده شد، در حالی که هیچ نور فلورسنس سبزی در نمونه‌های شاهد (غیر تراریخت) مشاهده نشد (شکل ۷). این نتایج نشان داد که بیان ژن *GFP* به روش آگرواینفیلتریشن اتفاق می‌افتد و بنابراین نتایج بیان در سطح ترانسکریپت به روش ریل تایم را تایید می‌کند.

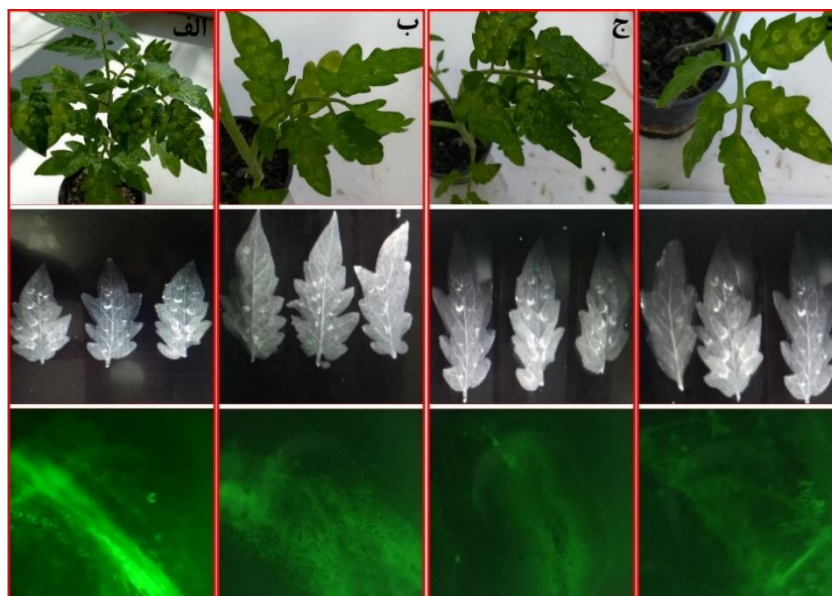


شکل ۶. مقایسه اثرات متقابل فاکتورها بر میزان بیان ژن *GFP*،  $D$  = تعداد روز پس از تلقیح،  $V$  = نوع سازه ژنی و  $C$ : غلظت  $OD_{600}$  آگروباکتریوم

Figure 6. Comparison interaction of different factor levels on *GFP* gene expression,  $D$ , days after inoculation,  $V$ , construct type, and  $C$ , agrobacterium concentration on  $OD_{600}$

### بحث

بر اساس مطالعات انجام شده خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS) بیان موقت ژن به کمک آگروباکتریوم را محدود می کند (Voinnet et al. 2003b). در عدم حضور ژن *P19* mRNA تراژن که به میزان زیادی بیان می شود، احتمالاً توسط سیستم خاموشی ژن در گیاه هدف مورد تخریب قرار می گیرد. پروتئین سرکوبگر *P19* میل زیادی برای اتصال به siRNA دو رشته ای دارد و به احتمال زیاد از الحاق آنها به مجموعه RISC جلوگیری می کند. پروتئین سرکوبگر *P19* از طریق پیوند قند-فسفات به siRNA متصل می شود و بنابراین ترکیب نوکلئوتیدی آن را تحت تأثیر قرار نمی دهد. همچنین مطالعات نشان داده است که در زمان اتصال پروتئین *P19* به siRNA یا miRNA دو رشته ای، *P19* به شکل دایمر در می آید که در قسمت انتهایی خود به انتهای siRNA یا miRNA دو رشته ای متصل می گردد (Alvarez et al. 2008).



شکل ۷. ستون الف) برگ گیاهچه گوجه فرنگی که تحت تیمار ترکیب (غلظت ۰/۶ + باکتری + روز ۷ تلقیح + سازه حاوی ژن *PI9*) قرار گرفته، برگ‌های تیمار شده در نور UV و اثر فلوروسانس بیان ژن *GFP*. ستون ب) برگ گیاهچه گوجه فرنگی که تحت تیمار ترکیب (غلظت ۰/۴ + باکتری + روز ۷ تلقیح + سازه حاوی ژن *PI9*) قرار گرفته، برگ‌های تیمار شده در نور UV و اثر فلوروسانس بیان ژن *GFP*. ستون ج) برگ گیاهچه گوجه فرنگی که تحت تیمار ترکیب (غلظت ۰/۶ + باکتری + روز ۴ تلقیح + سازه حاوی ژن *PI9*) قرار گرفته، برگ‌های تیمار شده در نور UV و اثر فلوروسانس بیان ژن *GFP*. ستون د) برگ گیاهچه گوجه فرنگی که تحت تیمار ترکیب (غلظت ۰/۸ + باکتری + روز ۷ تلقیح + سازه حاوی ژن *PI9*) قرار گرفته، برگ‌های تیمار شده در نور UV و اثر فلوروسانس بیان ژن *GFP*

**Figure 7. a) Tomato leaf treated with the combination treatment (bacterial concentration 0.6, day 7 inoculation, construct containing *PI9* gene), showing UV-treated leaves and the fluorescence expression of the *GFP* gene. b) Tomato leaf treated with the combination treatment (bacterial concentration 0.4, day 7 inoculation, construct containing *PI9* gene), showing UV-treated leaves and the fluorescence expression of the *GFP* gene. c) Tomato leaf treated with the combination treatment (bacterial concentration 0.6, day 4 inoculation, construct containing *PI9* gene), showing UV-treated leaves and the fluorescence expression of the *GFP* gene. d) Tomato leaf treated with the combination treatment (bacterial concentration 0.8, day 7 inoculation, construct containing *PI9* gene), showing UV-treated leaves and the fluorescence expression of the *GFP* gene**



مشخص شده است که پروتئین P19 مانع گسترش دوپلکس siRNA به عنوان سیگنال خاموشی می‌گردد (Dunoyer et al. 2004). بدین ترتیب P19 مانع از تشکیل ساختار دو رشته‌ای siRNA با mRNA ژن GFP شده و در نتیجه باعث جلوگیری از خاموشی آن می‌شود (Burgyán & Havelda 2011). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که در حضور پروتئین سرکوب‌کننده خاموشی P19، بیان پروتئین GFP افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد (Lindbo 2007a; Lindbo 2007b; Dhillon et al. 2009). در مطالعه دیگر، میزان بیان ژن GFP ناچیزی در شرایط عدم حضور پروتئین P19 گزارش شده است (Kontra et al. 2016). در تحقیقات متعددی گزارش شده است که P19 بیان پروتئین‌های نو ترکیب مختلفی از قبیل پروتئین‌های گزارشگر، آنتی‌بادی، پروتئین‌هایی با هدف تولید واکسن و پروتئین‌های دارویی را با مقادیر متفاوت ۵ تا ۱۰۰ برابر افزایش داده است (Moissiard & Voinnet 2004; Chiong et al. 2021). از سیستم سرکوب‌کننده پروتئینی P19 به صورت موفقیت‌آمیزی جهت سنجش بیان موقت ژن در جهت افزایش عملکرد تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گونه‌های مختلف از جمله افزایش ۵۰ برابری بیان ژن GFP در توتون (Voinnet et al. 2003a)، افزایش ۴ برابری بیان ژن *hEGF* در توتون (Thomas & Walmsley 2014)، افزایش ۳ برابری ژن *FI-V* در گوجه فرنگی (Alvarez et al. 2008)، افزایش ۲۵ درصدی بیان ژن GFP در گیاه توتون استفاده شده است، در حالی که در گیاه پروتئین P19 بیان ژن هدف بسیار ناچیز بوده است (Liu & Kearney 2010). محمدزاده و همکاران افزایش ۴-۵ برابری بیان ژن *HCVcp* با استفاده از سیستم P19 را گزارش کردند (Mohammadzadeh et al. 2014). امیری و همکاران با بررسی تأثیر پروتئین P19 بر افزایش بیان ژن *tPA* به این نتیجه رسیدند که بیان ژن *tPA* را تا دو برابر حالت عادی افزایش داد (Amiri et al. 2016). بیان موقت با استفاده از راه‌انداز 35S CaMV و ویروس موزائیک کلم گل در گیاه توتون، تولید پروتئین GFP را در حضور ژن سرکوب‌کننده خاموشی P19، ۱۰ تا ۲۵ برابر افزایش داد (Lindbo 2007a). با توجه به خاصیت ذاتی سرکوب‌کنندگی خاموشی توسط سیستم پروتئینی P19، می‌توان اظهار داشت که دلیل افزایش میزان رونویسی ژن GFP در این مطالعه نیز عملکرد سیستم سرکوب خاموشی ژن GFP می‌باشد. عامل دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت، تأثیر مقادیر غلظت باکتری آگروباکتریوم بر بیان موقت ژن بود. بر اساس نتایج بدست آمده غلظت ۰/۶ OD<sub>600</sub> بیشترین تأثیر (حدود ۶۰ درصد) را بر افزایش بیان GFP نسبت به شاهد از خود نشان داد. لی و همکاران نشان دادند که غلظت ۰/۶ آگروباکتریوم تأثیر ۹۶ درصدی بر بیان و انتقال ژن به گیاه سویا داشت (Li et al. 2017). همچنین گزارش شده است که اگرچه مقادیر بالای غلظت آگروباکتریوم تأثیر مثبتی بر بیان ژن دارد اما در تمام برگ‌های مورد تیمار باعث سوختگی شد (Li et al. 2017). در گزارشی دیگر بهترین نتایج در غلظت ۰/۶ OD<sub>600</sub> آگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاه سپیدار بدست آمد (Movahedi et al. 2014). بر اساس چندین مطالعه غلظت ۰/۶ OD<sub>600</sub> یک غلظت مناسب برای انتقال ژن است که با نتایج این تحقیق همسو است. سومین فاکتور مورد بررسی مدت زمان بعد از تلقیح بر بیان ژن در انتقال ژن به روش موقت بود که در چندین مطالعه اهمیت این موضوع بررسی شده است. در تحقیقی روی گیاه توتون (*N. benthamiana*)، سطح تجمع پروتئین GFP در بیان موقت توسط آگروباکتریوم به مرحله رشد و نمو وابستگی نشان داد (Sheludko et al. 2007). بدین صورت که

سطح بیان ژن هدف در مرحله رشد رویشی گیاه بیشتر از دیگر مراحل رشدی گیاه بود. همچنین در گیاه توتون گزارش شده است که مرحله رویشی (برگ‌های جوان) قبل از گلدهی مناسب‌ترین زمان برای تولید پروتئین نوترکیب است (Marillonnet et al. 2005; Sheludko et al. 2007). در مطالعه‌ای گزارش شده که بازدهی انتقال موقت ژن *GUS* به گل رز در مرحله دو از سه مرحله زمانی گلبرگ‌ها، حدود ۱۰ برابر بیشتر از مراحل ۱ و ۳ است (Yasmin & Debener 2010). در مطالعه حاضر برداشت برگ‌ها در چهار، هفت و ده روز پس از تزریق انجام شد و نتایج نشان داد که بیشترین میزان رونویسی ژن *GFP* در روز هفتم (مرحله رویشی) است و به نظر می‌رسد در این زمان و مرحله رشدی سرعت رونویسی و همچنین سرعت سنتز پروتئین‌ها مناسب است. از طرفی به احتمال فراوان سیستم سرکوب خاموشی ژن نیز در حال فعالیت است. بنا براین نتیجه این عوامل می‌تواند افزایش بیان ژن *GFP* را در پی داشته باشد.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه، بیشترین بیان نسبی ژن *GFP* در حضور ژن *P19*، ۷ روز پس از تلقیح گیاهان با اگروباکتریوم و در غلظت ۰/۶ و کمترین بیان نسبی ژن *GFP* در عدم حضور ژن *P19* و ۱۰ روز پس از تلقیح گیاهان با اگروباکتریوم در غلظت ۰/۴ حاصل شد (C1D3V1). نتایج نشان داد که حضور ژن *P19* به عنوان سرکوبگر خاموشی بر میزان بیان نسبی ژن *GFP* در همه شرایط تأثیرگذار است. اما مدت زمان پس از تلقیح و غلظت اگروباکتریوم هم بر میزان بیان ژن *GFP* تأثیر متفاوتی دارند. همچنین این مطالعه نشان داد که گیاه گوجه‌فرنگی می‌تواند به عنوان یک گیاه مدل برای انتقال موقت و بیان ژن‌های هدف به کار گرفته شود.

**سپاسگزاری:** از دانشگاه کردستان به خاطر حمایت مالی، حمایت معنوی و همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

## References

- Alvarez ML, Pinyerd HL, Topal E, Cardineau GA (2008) P19-dependent and P19-independent reversion of F1-V gene silencing in tomato. *Plant mol bio* 68, 61-79.
- Amiri M, Jalali Javaran M, Ehsani P, Haddad R (2016) Enhanced expression of tissue plasminogen activator via gene silencing suppressor strategy using P19 protein. *Agri Biotech J* 8, 1-18.
- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Berry B, Deddouche S, Kirschner D et al. (2009) Viral suppressors of RNA silencing hinder exogenous and endogenous small RNA pathways in *Drosophila*. *PLoS One* 4, e5866.

- Bogorad L (2000) Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends in biotech* 18, 257-263.
- Burgyán J, Havelda Z (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in plant sci* 16, 265-272.
- Cheng Y, He C, Wang M et al. (2019) Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal transduction and targeted therapy* 4, 62.
- Chiong KT, Cody WB, Scholthof HB (2021) RNA silencing suppressor-influenced performance of a virus vector delivering both guide RNA and Cas9 for CRISPR gene editing. *Scientific Rep* 11, 1-13.
- Dheda K, Huggett J, Chang J et al. (2005) The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical biochem* 344, 141-143.
- Dhillon T, Chiera JM, Lindbo JA, Finer JJ (2009) Quantitative evaluation of six different viral suppressors of silencing using image analysis of transient GFP expression. *Plant Cell Rep* 28, 639-647.
- Dunoyer P, Lecellier C-H, Parizotto EA et al. (2004) RETRACTED: Probing the MicroRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant Cell* 16, 1235-1250.
- Eamens A, Wang M-B, Smith NA, Waterhouse PM (2008) RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol* 147, 456-468.
- F de Felippes F, McHale M, Doran RL et al. (2020) The key role of terminators on the expression and post-transcriptional gene silencing of transgenes. *The Plant J* 104, 96-112.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant mol bio* 35, 205-218.
- Holsters M, De Waele D, Depicker A et al. (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol and General Gen* MGG 163, 181-187.
- Imani J, Kogel K-H (2020) Plant transformation techniques: *Agrobacterium*-and microparticle-mediated gene transfer in cereal plants. *Biolistic DNA Delivery in Plant*, 281-294.
- Kalantidis K, Schumacher HT, Alexiadis T, Helm JM (2008) RNA silencing movement in plants. *Biol Cell* 100, 13-26.

- Kaur M, Manchanda P, Kalia A et al. (2021) Agroinfiltration mediated scalable transient gene expression in genome edited crop plants. *Int J Mol Sci* 22, 10882
- Kontra L, Csorba T, Tavazza M et al. (2016) Distinct effects of p19 RNA silencing suppressor on small RNA mediated pathways in plants. *PLoS Path* 12, e1005935.
- Kusnadi AR, Nikolov ZL, Howard JA (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotech and bioengin* 56, 473-484.
- Li S, Cong Y, Liu Y et al. (2017) Optimization of Agrobacterium-mediated transformation in soybean. *Front in plant sci* 8, 246.
- Li X, Ma S, Shan N et al. (2017) A protocol for Agrobacterium-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) from cotyledon explants.
- Lindbo JA (2007a) High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnol* 7, 1-11.
- Lindbo JA (2007b) TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol* 145, 1232-1240.
- Liu Z, Kearney CM (2010) A tobamovirus expression vector for agroinfection of legumes and Nicotiana. *J biotech* 147, 151-159.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods* 25, 402-408.
- Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R et al. (2005) Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* 23, 718-723.
- McCormick S, Niedermeyer J, Fry J et al. (1986) Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using Agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell Rep* 5, 81-84.
- Mohammadzadeh S, Khabiri A, Roohvand F et al. (2014) Enhanced-transient expression of hepatitis C virus core protein in *Nicotiana tabacum*, a protein with potential clinical applications. *Hepatitis Monthly* 14.
- Moissiard G, Voinnet O (2004) Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol plant path* 5, 71-82.
- Movahedi A, Zhang J, Amirian R, Zhuge Q (2014) An efficient Agrobacterium-mediated transformation system for poplar. *Int J Mol Sci* 15, 10780-10793.

- Nosaki S, Hoshikawa K, Ezura H, Miura K (2021) Transient protein expression systems in plants and their applications. *Plant Biotech* 38, 297-304.
- Ow DW, Wood KV, DeLuca M et al. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234, 856-859.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45-e45.
- Pogue GP, Vojdani F, Palmer KE et al. (2010) Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant biotech j* 8, 638-654.
- Pröls M, Töpfer R, Schell J, Steinbiß H-H (1988) Transient gene expression in tobacco protoplasts: I. Time course of CAT appearance. *Plant Cell Rep* 7, 221-224.
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM et al. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem biophys res com* 313, 856-862.
- Rick CM, Yoder JI (1988) Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. *Ann rev genetics* 22, 281-300
- Shanmugaraj B, I. Bulaon CJ, Phoolcharoen W (2020) Plant molecular farming: A viable platform for recombinant biopharmaceutical production. *Plants* 9, 842.
- Sharafi Y, Jalali Javaran M, Sabet MS (2020) Effect of P19 gene expression on transcription rate and production of recombinant human tissue plasminogen (rtPA) in tobacco (*nicotiana benthiana*). *Agri Biotech J* 12, 103-128.
- Sheludko Y, Sindarovska Y, Gerasymenko I et al. (2007) Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotech and Bioengin* 96, 608-614.
- Tang G, Tang X, Mendu V et al. (2008) The art of microRNA: various strategies leading to gene silencing via an ancient pathway. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1779, 655-662.
- Tanksley S, Ganai M, Prince J et al. (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132, 1141-1160.
- Thomas DR, Walmsley AM (2014) Improved expression of recombinant plant-made hEGF. *Plant Cell Rep* 33, 1801-1814.

- Töpfer R, Pröls M, Schell J, Steinbiß H-H (1988) Transient gene expression in tobacco protoplasts: II. Comparison of the reporter gene systems for CAT, NPT II, and GUS. *Plant Cell Rep* 7, 225-228.
- van den Burg HA, Tsitsigiannis DI, Rowland O et al. (2008) The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defense responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. *The Plant Cell* 20, 697-719.
- Vaucheret H, Béclin C, Fagard M (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* 114, 3083-3091
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003a) Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The plant journal* 33, 949-956.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003b) Retraction: an enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*.
- Wani KI, Aftab T (2022) Limitations, Biosafety, Ethics, Regulatory Issues in Molecular Farming in Plants. In: *Plant Mol Farm*. Springer. pp. 61-74.
- Wing RA, Zhang H-B, Tanksley SD (1994) Map-based cloning in crop plants. Tomato as a model system: I. Genetic and physical mapping of jointless. *Mol General Genetics MGG* 242, 681-688
- Yasmin A, Debener T (2010) Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. *Plant Cell, Tissue Organ Cult (PCTOC)* 102, 245-250.
- Zamore PD (2004) Plant RNAi: How a Viral Silencing Suppressor Inactivates siRNA. *Current Biol* 14, R198-R200.