تهیه سازه اختصاصی بذر حاوی قطعات OMEGA و SAR به‌منظور افزایش بیان ژن در بذر گیاه

Preparation of a Seed Specific Construct Containing Sequences OMEGA and SAR in Order to Increasing Gene Expression in Plant Seed

مهسا مکانیک[۱*]، خدیجه باقری[۲]، بهرام ملکی‌زنجانی[۳] و مسعود توحیدفر[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۲/۲۱

چکیده

پایین‌بودن سطح بیان ژن‌ها، از مهم‌ترین فاکتورهای محدودکننده تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان می‌باشد. انتخاب بافت مناسب گیاه جهت بیان و نیز بهبود تظاهر قطعه ژنی از جمله راه‌های افزایش بیان ژن در گیاه می‌باشند. در این پژوهش با طراحی و تهیه سازه اختصاصی بذر به‌همراه قطعات افزاینده بیان ژن؛ OMEGA(Tobacco Mosaic Virus 5' –leader) و SAR (Scaffold Attachment Region) سعی شده است تا ضمن بیان اختصاصی ژن موردنظر در بذر گیاه، بیان آن نیز افزایش یابد. توالی OMEGA مورد استفاده، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده ترجمه عمل می‌کند و کارآیی ترجمه را بالا می‌برد و توالی SAR با مکانیزم‌های مختلف می‌تواند از خاموشی ژن منتقل‌شده جلوگیری کند. در ابتدا با طراحی آغازگرهای اختصاصی و انجام واکنش PCR قطعه OMEGA به ابتدای ژن *GUS* متصل شد. قطعه‌ی SAR (pS206-1) نیز از ژنوم گیاه توتون جداسازی گردید. سپس دو قطعه با استفاده از روش SOEingPCR به هم متصل شدند به‌نحوی‌که توالی OMEGA در بالادست ژن *GUS* و توالی SAR در پایین‌دست آن قرار گرفت. صحت قطعه حاصله (Ω-*GUS*-pS206-1) با استفاده از هضم آنزیمی و توالی‌یابی مورد تأیید قرار گرفت. سپس ساب‌کلونینگ در ناقل گیاهی pBI121 حاوی پیش‌برنده اختصاصی بذر انجام شد.

واژه‌های کلیدی: سازه اختصاصی بذر، SOEingPCR, SAR, OMEGA، افزاینده بیان

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان، زنجان
۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان
۴. استادیار بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، کرج
*: نویسنده مسوول Email: mahsamekanik@yahoo.com

مقدمه

در حال حاضر گیاهان، مناسب‌ترین میزبان‌ها جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب ایمن و فعال به‌شمار می‌روند. بیان بالا و استخراج کارآمد پروتئین نوترکیب، دو فاکتور اصلی در تعیین گیاهان تراریخته به‌عنوان بیورآکتورهای طبیعی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در کاربردهای دارویی و صنعتی هستند *لیلاواتی* و همکاران (Leelavathi *et al*., 2003). تولید پروتئین‌های نوترکیب باارزش بالا در بذرهای تراریخته یک جایگزین جذاب و از لحاظ اقتصادی امکان‌پذیر برای سیستم های سنتی مبتنی بر پایه سلول‌های باکتریایی و جانوری می-باشد. یکی از نکاتی که باعث توجه به تولید پروتئین‌های نوترکیب در بذور شده است، تجمع پایدار پروتئین نوترکیب در یک غلظت نسبتاً بالا و در یک بیوماس فشرده است که برای کار استخراج و پروسه‌های واپسین نیز مفید است *دروگن بروک* و همکاران (Droogenbroeck *et al*., 2007). از طرف دیگر محسن‌پور و همکاران (۱۳۸۶) بیان موفقیت‌آمیز تراژن در گیاه را نیازمند آماده‌کردن ساختار مناسب ژن قبل از انتقال به گیاه می‌دانند. در این پژوهش، از توالی امگا (Ω) که طبق گزارش *مندلز* (Mandeles, 1968) توالی افزایش‌دهنده بیان ۶۸ نوکلئوتیدی از RNA ویروس موزائیک توتون است، به‌عنوان افزاینده‌ی ترجمه استفاده گردید. امگا میزان ترجمه را هم در پروکاریوت‌ها و هم در یوکاریوت‌ها افزایش می‌دهد *گالیه و والبوت* (Gallie and Walbot, 1992). *گالیه* و همکاران (1991) معتقدند توالی امگا به‌طور اختصاصی به‌عنوان یک تنظیم‌کننده ترجمه عمل می‌کند. یکی دیگر از مشکلات انتقال ژن، عدم-وجود قابلیت پیشگویی بیان تراژن و ناپایداری آن درنسل‌های متوالی است. در همین راستا محققین به‌دنبال قطعاتی از DNA هستند که بتوانند در سازه‌ی تراژن قرار داده و اطمینان از بیان تراژن را افزایش دهند. نواحی متصل‌شونده به ماتریکس/ داربست هسته (Scaffold/Matrix Attachment Regions) که به‌اختصار MAR یا SAR خوانده می‌شوند یکی از توالی‌های مطرح شده برای پذیرفتن این نقش هستند *آلن* و همکاران (Allen *et al*., 2000). یکی از ویژگی‌هایی که به SARها نسبت داده شده، توانایی آن‌ها در افزایش و پایداری بیان تراژن از طریق کاهش و یا حذف برخی از اشکال خاموشی ژن است *تامپسون* و همکاران (Thompson *et al*., 2006). قابلیت این توالی‌ها در افزایش سطوح بیان تراژن یا کاهش تنوع بین تراریخته‌ها (در گیاهان و جانوران) هنگامی‌که در مجاورت یک سازه تراژن واقع شوند، ثابت شده است *زو* و همکاران (Xue *et al*., 2005). با توجه به این موارد در این تحقیق از یک قطعه SAR به‌نام pS206-1 که در ژنوم گیاه توتون حضور دارد، به‌عنوان یک افزاینده‌ی بیان ژن استفاده شد و بدین‌ترتیب سازه‌ی موردنظر با قرارگرفتن قطعه‌ی امگا در بالادست ژن گزارشگر *GUS* و قطعه‌ی pS206-1 در پایین دست ژن *GUS*، طراحی و تهیه شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و پلاسمیدهای مورد استفاده:

در این تحقیق از باکتری *E. coli* سویه TOP10F´ (مقاوم به تتراسایکلین)، پلاسمید دوگانه pBI121 تحت پیشبر NAPIN و حاوی ژن مقاومت به کانامایسین به‌عنوان نشانگر انتخابی، ناقل همسانه‌سازی pTZ57R/T حاوی ژن مقاومت به آمپی-سیلین (تهیه شده از شرکت Fermentase) استفاده شد.

طراحی آغازگرها: برای تکثیر ژن GUS به‌همراه قطعه‌ی امگا و همچنین جداسازی قطعه pS206-1 از ژنوم توتون، از آغازگرهای اختصاصی مجزا (جدول ۱) استفاده شد. آغازگر شماره ۱ از سمت '۵ شامل جایگاه آنزیم برشی *Xba*I، توالی امگا، کد آغاز ترجمه و ۱۳ نوکلئوتید ابتدایی ژن *GUS* است. آغازگر شماره ۲ از سمت '۵ شامل ۲۰ نوکلئوتید ابتدایی pS206-1 (درحالت مکمل)، کد پایان ترجمه (در حالت مکمل) و ۱۸نوکلئوتید انتهایی *GUS* (در حالت مکمل) می‌باشد. آغازگر شماره ۳ از سمت '۵ شامل ۱۸نوکلئوتید انتهایی*GUS*، کد پایان و ۲۰ نوکلئوتید ابتدایی pS206-1 است. آغازگر شماره ۴ از سمت '۵ شامل جایگاه آنزیم برشی *Sac*I و انتهای توالی pS206-1 (در حالت مکمل) می‌باشد.

جدول ۱: توالی آغازگرها

Table 1: Primers sequence

1) **F: 5'** AT**TCTAGA** GTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAAACAACAAACAACAACAAACAACAA ATGTTACGTCCTGTAG-3'

2) **R:** 5' CTATAATAATAGCTGGATCT**TTA**CTGTTTACCTCCCTGCTG-3'

3) F: **5'** CAGCAGGGAGGTAAACAGTAAAGATCCAGCTATTATTATAG-3'

4) **R: 5'** T**GAGCTC**GAGCTTCTATTGCTTGCTTAATAAAACTACTAATTATAAG-3'

اتصال قطعه‌ی امگا به ابتدای ژن گزارشگر *GUS*

به‌منظور قرار دادن قطعه‌ی امگا در ابتدای ژن *GUS*، در هنگام طراحی آغازگرها توالی این افزاینده (۵۵ نوکلئوتید) در ابتدای آغازگر مستقیم طراحی شده برای ژن *GUS* (شماره ۱) قرار گرفت. بدین‌ترتیب واکنش PCR برای اتصال امگا به *GUS* با استفاده از آغازگرهای شماره‌ی ۱ و ۲ انجام شد. مواد واکنش مطابق با PCR استاندارد و برای ۲۵ سیکل واکنش، دمای اتصال آغازگرها ۵۸°C و زمان یک دقیقه در نظر گرفته شد.

جداسازی و تکثیر قطعه‌ی pS206-1

از برگ‌های گیاهچه‌های توتون (در مرحله‌ی ۴-۳ برگی) که در محیط MS (1962) رشد کرده بودند، استخراج DNA ژنومی به‌روش *دلاپورتا* (1983) تغییر یافته، انجام شد. سپس قطعه‌ی pS206-1 با استفاده از آغازگرهای شماره ۳ و ۴، از ژنوم توتون جداسازی و تکثیر گردید. مواد واکنش PCR به استثناء $MgCl_2$ (۲/۷۵mM) مطابق با PCR استاندارد در نظر گرفته شد. چرخه‌های دمایی همانند PCR اول انجام شد، با این تفاوت که دمای اتصال آغازگرها در این واکنش، ۵۵/۷°C می‌باشد. به‌منظور استفاده از محصولات PCR در مراحل بعدی، خالص‌سازی آنها از روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از کیت استخراج از ژل (شرکت Qiagene) و مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد.

SOEing PCR

برای انجام واکنش SOEing PCR، ابتدا مقادیر مناسبی از محصولات خالص‌سازی شده‌ی دو PCR اول و دوم (با در نظر گرفتن طول و غلظت محصول) به‌صورت مخلوط، تحت تیمار با آنزیم Taq polymerase (بدون استفاده از آغازگرها) قرار گرفتند؛ سپس با افزودن آغازگرهای شماره ۱ و ۴، قطعه‌ی نهایی (Ω-*GUS*-pS206-1) تکثیر شد. مراحل و شرایط انجام این واکنش در جدول ۲ آورده شده‌است.

جدول ۲: شرایط انجام واکنش SOEing PCR

Table 2: SOEing PCRconditions

مواد واکنش Reaction materials			شرایط چرخه دمایی Thermal cycler conditions		
اجزاء Component	غلظت در واکنش Concentration inreaction		مرحله Step	دما Temp	زمان Time
PCR buffer	1X		Initial denaturation	95°C	2 ´
dNTP	0/2 mM		denaturation	95°C	1 ´
$MgCl_2$	1/5 mM	X5	Annealing (overlapping parts)	58°C	1 ´
Enzyme	1U		Extension (overlapping parts)	72°C	1´:10 ”
First PCR product	3 µl		Final Extension	72°C	2´
Second PCR product	1/5 µl		Addprimers	Pause	
H_2O (D.W)	Up to volume		Initial denaturation of completed template	95°C	2´
Total volume	25 µl		denaturation	95°C	1´
Primer no.1	10 pM	25X	Annealing	57°C	1´
			Extension	72°C	1´:30 ”
Primer no.4	10 pM		Final Extension	72°C	20 ´
Templet					

تهیه قطعه نهایی در ناقل‌های همسانه‌سازی و بیانی

به‌منظور تکثیر و نگهداری قطعه‌ی نهایی (Ω-*GUS*-pS206-1) و تعیین ترادف و نیز تسهیل کلونینگ آن در ناقل pBI121، ابتدا این قطعه مطابق با پروتوکلکیت در ناقل pTZ57R/T کلون شد. ناقل pTZ57R/T حاوی قطعه‌ی موردنظر، جهت توالی‌یابی به شرکت MACROGEN کشور کره ارسال شد.

برای انتقال قطعه‌ی Ω-*GUS*-pS206-1 به ناقل بیانی pBI121 ابتدا هر دو ناقل pTZ57R/T (حاوی قطعه موردنظر) و pBI121 با آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I برش داده شد و پس از

خالص‌سازی قطعه‌ی Ω-*GUS*-pS206-1 و پلاسمید pBI121 فاقد *gus* اولیه از ژل آگاروز ۱٪، با توجه به غلظت باندهای مشاهده شده، واکنش اتصال بین آن‌ها انجام گرفت و پلاسمید نوترکیب pBI121-N-Ω-*GUS*-S به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه TOP10F' انتقال داده شد. به‌منظور اطمینان از کلون‌شدن قطعه‌ی موردنظر، PCR بر روی کلونی‌های رشد کرده در محیط‌کشت حاوی تتراسایکلین و کانامایسین انجام شد و جهت اطمینان از صحت طول قطعه‌ی کلون‌شده، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Sac*I انجام شد.

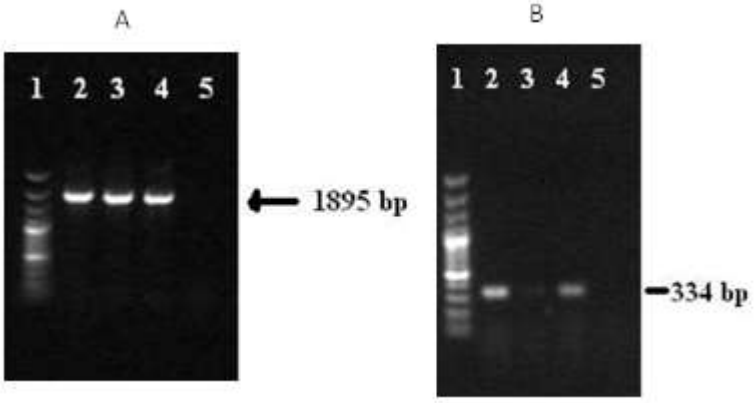
نتایج و بحث

اتصال قطعه‌ی Ω به ابتدای ژن گزارش‌گر *GUS*

محصول این واکنش، قطعه‌ای به‌طول ۱۸۹۵ جفت‌باز است که از سمت '۵ شامل جایگاه برشی آنزیم *Xba*I، قطعه‌ی Ω، ژن *GUS* و ۲۰ نوکلئوتید ابتدایی قطعه‌ی pS206-1 می‌باشد (شکل ۱A). تعبیه‌کردن ۲۰ نوکلئوتید ابتدایی pS206-1 (در حالت مکمل) در سمت '۵ پرایمر معکوس سری اول منجر به قرار گرفتن این ۲۰ نوکلئوتید در انتهای ژن *GUS* می‌شود. هدف از این کار ایجاد همپوشانی لازم (به‌طول ۴۱ نوکلئوتید) بین محصولات PCR اول و دوم بود که در مرحله‌ی SOEing PCR به‌عنوان الگو استفاده شدند.

تکثیر قطعه‌ی pS206-1

قطعه‌ی pS206-1 با استفاده از پرایمرهای مستقیم و معکوس سری ب، از ژنوم توتون جداسازی و تکثیر گردید. محصول این واکنش قطعه‌ای به‌طول ۳۳۴bp است، که به‌ترتیب از سمت '۵ شامل ۲۱ نوکلئوتید انتهایی ژن *GUS*، قطعه‌ی pS206-1 به طول ۳۰۶bp و جایگاه برشی آنزیم *Sac*I می‌باشد (شکل ۱B). در زمان طراحی پرایمرها، ۲۱ نوکلئوتید انتهایی ژن *GUS* در ابتدای پرایمر مستقیم سری دوم قرار گرفت تا بدین‌ترتیب همپوشانی لازم بین محصولات PCR اول و دوم در هنگام SOEing PCR برقرار شود.



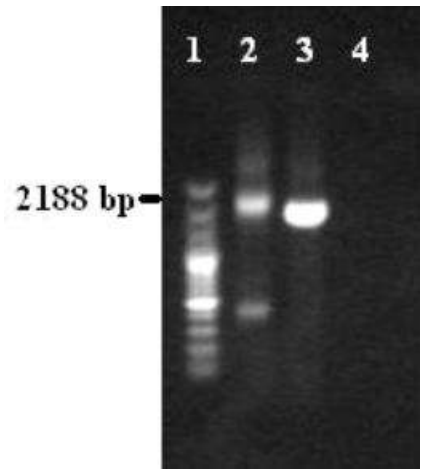
شکل ۱: تکثیر قطعات Ω-*GUS* (A) و pS206-1 (B) توسط PCR: A و B) ۱- نشانگر bp ۱۰۰، ۴-۲- قطعات تکثیریافته ۵-کنترل منفی
Fig. 1: PCR amplification of Ω- *GUS*and pS 206-1 fragments: A and B) Lane 1, 100bp DNA marker; lane 2- 4- amplicons; Lane5, negative control

اتصال قطعه‌ی pS206-1 به انتهای ژن *GUS* توسط SOEingPCR و تهیه قطعه Ω-*GUS*-pS206-1

با توجه به اینکه محصولات PCRهای اول و دوم در انتهای '۳ خود با یکدیگر همپوشانی داشتند، هریک به‌عنوان پرایمر برای رشته‌ی دیگر عمل کرده و بدین‌ترتیب قطعه‌ی موردنظر به‌صورت کامل و دو رشته‌ای تولید شد. در مرحله‌ی بعدی واکنش و پس از افزودن آغازگرهای خارجی (آغازگرهای ۱و۴)، قطعه‌ی موردنظر به‌عنوان الگوی این آغازگرها قرار گرفت و بدین‌ترتیب قطعه نهایی با طول ۲۱۸۸ جفت‌باز، در حجم بالا تکثیر شد (شکل ۲).

تأیید کلونینگ در پلاسمید pTZ57R/T

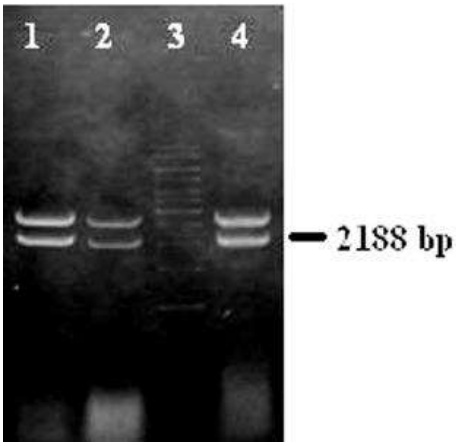
انتخاب اولیه کلونی‌های سفید در محیط حاوی X-Gal و IPTG صورت گرفت و کلونی PCR بر روی آنها انجام شد. کلونی‌هایی که محصول PCR آنها قطعه‌ای به‌اندازه ۲۱۸۸ جفت‌باز بود، به‌عنوان کلونی‌های حاوی قطعه‌ی موردنظر انتخاب شدند و واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I انجام شد. با خروج قطعه‌ای به‌طول ۲۱۸۸ جفت‌باز، صحت انجام کلونینگ مورد تأیید نهایی قرار گرفت (شکل ۳).



شکل ۲: تکثیر قطعه Ω-*GUS*-pS206-1 ، متصل شده توسط SOEing PCR

۱) نشانگر ۱۰۰bp؛ ۲) محصول SOEing PCR (۲۱۸۸bp)؛ ۳) محصولPCR اول (Ω-*GUS* =۱۸۹۵bp)؛ ۴) کنترل منفی

Fig. 2: PCR amplification of Ω-*GUS*-PS206-1 fusion by SOEing PCR: Lane 1, 100bp DNA marker; lane 2, SOEing PCR product; lane 3, *GUS*PCR product; lane 4, negative Control



شکل ۳: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-Ω-*GUS*-S به‌منظور تأیید صحت قطعه درج‌شده

۱،۲،۴) پلاسمیدهای نوترکیب هضم شده با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I؛ ۳) نشانگر ۱kb

Fig. 3: Double digestion of recombinant pTZ57R/T-Ω-*GUS*-S plasmid to confirm correct insert. lane 1,2,4, Recombinant plasmids were digested with *Sac*I and *Xba*I enzymes; 3) 1kb marker

تأیید صحت توالی قطعه‌ی موردنظر توسط تعیین توالی

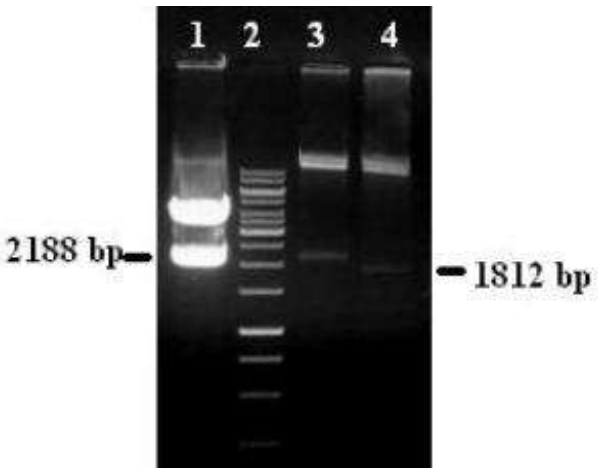
به‌منظور اطمینان از صحت توالی قطعه‌ی موردنظر، پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-Ω-*GUS*-S برای توالی‌یابی ارسال شد. نتیجه‌ی توالی‌یابی، با توالی‌های موردنظر در بانک اطلاعاتی منطبق بوده و صحت توالی قطعه‌ی موردنظر را تأیید کرد.

نتایج حاصل از ساب‌کلونینگ در ناقل دوگانه‌ی pBI121

سازه تهیه شده، به سلول‌های مستعد *E. coli* منتقل شده و در نتیجه‌ی انجام کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۱ و ۴ بر روی کلونی‌های رشد کرده در محیط تتراسایکلین و کانامایسین، قطعاتی به‌طول ۲۱۸۸ جفت‌باز تولید شد که تأییدکننده‌ی کلون‌شدن قطعه‌ی موردنظر در همه‌ی کلونی‌های به‌دست آمده بود.

تأیید نهایی سازه‌ی ساخته‌شده

به‌منظور تأیید نهایی سازه‌ی موردنظر، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Sac*I به‌طور همزمان بر روی پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T-Ω-*GUS*-S و pBI121-N-Ω-*GUS*-S و پلاسمید pBI121 اولیه (فاقد قطعه‌ی موردنظر) انجام شد. با آزادشدن قطعه‌ی ۱۸۱۲جفت‌باز از پلاسمید pBI121 اولیه و قطعه‌ی ۲۱۸۸جفت‌باز از پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T-Ω-*GUS*-S و pBI121-N-Ω-*GUS*-S، سازه‌ی ساخته شده مورد تأیید نهایی قرار گرفت. (شکل ۴) و سازه نهایی مطابق با شکل ۵ ساخته شد.

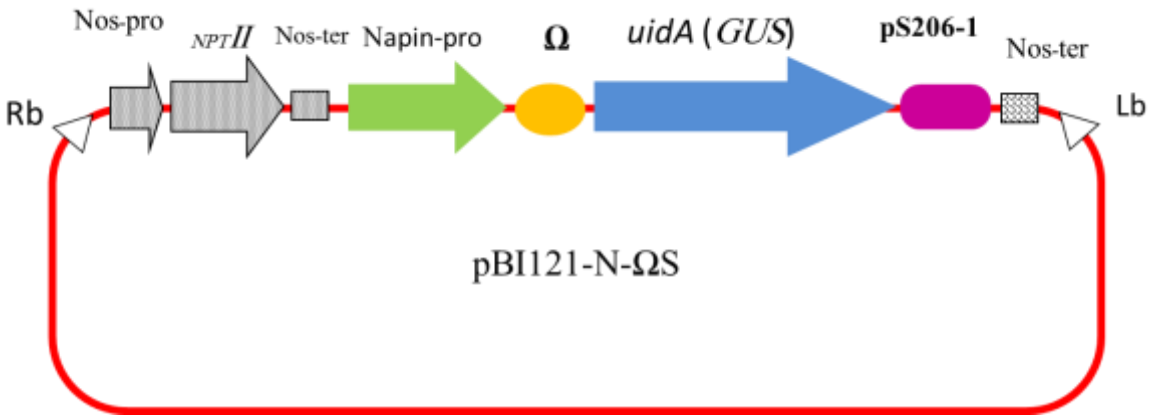


شکل ۴: هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T-Ω-*GUS*-S و pBI121-N-Ω-*GUS*-S با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I

۱) پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-Ω-*GUS*-S هضم‌شده، ۲) نشانگر ۱kb، ۳) پلاسمید نوترکیب pBI121-N-Ω-*GUS*-S هضم‌شده، ۴) پلاسمید کنترل pBI121 هضم شده

Fig. 4: Double digestion of recombinant pTZ57R/T-Ω-*GUS*-S and pBI121-N-Ω-*GUS*-S plasmid by *Xba*I and *Sac*I enzymes

Lane 1) digested recombinant pTZ57R/T-Ω-*GUS*-S plasmid; lane 2) 1kb DNA marker; lane 3) digested recombinant pBI121-N-Ω-*GUS*-S plasmid; Lane 4) digested control pBI121 plasmid



شکل ۵: نمایش ماتیک‌پلاسمید نوترکیب pBI121-N-Ω-*GUS*-S

Fig. 5: Schematic view of recombinant pBI121-N-Ω-*GUS*-S plasmid

در این تحقیق از تکنیک SOEing PCR جهت اتصال قطعه‌ی pS206-1 به انتهای ژن *GUS* استفاده شد. از آنجا که در اکثر آزمایشات همسانه‌سازی، محدودیت استفاده از آنزیم‌های برشی مطرح می‌باشد با استفاده از این تکنیک، قطعات ژنی موردنظر بدون‌استفاده از آنزیم‌های برشی کنار هم قرار می‌گیرند، همچنین این مزیت را دارد که مراحل همسانه‌سازی در آزمایشات مهندسی ژنتیک کاهش می‌یابد.

لازم به‌ذکر است پیش‌برنده اختصاصی بذر که در این تحقیق به‌کار برده شد NAPIN می‌باشد که از ژن BcNA1 کلزا جداسازی شده است و در سطح بالایی در بذور در حال رشد کلزا بیان می‌شود. این پروموتر توانایی بیان اختصاصی در بذر را در سیستم‌های بیگانه نیز دارد و بنابراین در بسیاری از آزمایشات مهندسی ژنتیک با هدف بیان ژن خارجی به‌خصوص آنهایی که در تولید اسید چرب یا TAG در بذرهای در حال رشد دخالت دارند، به‌کار رفته است *سوارنالاتا* و همکاران (Swarnalatha *et al*., 2010). مهم‌ترین مزیت تولید پروتئین در بذر خصوصاً دانه‌های روغنی، کاهش پیچیدگی‌های تخلیص پروتئین است *بوته* و همکاران (Boothe *et al*., 1997). باقری و همکاران (۱۳۸۹) بیان ژن اینترفرون گاما تحت پیش‌برنده NAPIN را در گیاه کلزا گزارش کردند. لازم به‌ذکر است، بافت بذری در زمان رسیدن خشک شده و فعالیت هیدرولیتیکی پایینی خواهد داشت، در نتیجه محیط بسیار پایداری برای

پروتئین‌ها به‌وجود می‌آید. در بعضی موارد گزارش شده است که پروتئین نوترکیب تولید شده در بذر بعد از ۲ سال (در دمای اتاق) پایدار و فعال بوده است. به‌واسطه‌ی این پایداری، ذخیره‌سازی بذور راحت بوده و می‌توان مراحل تولید را از مراحل بعدی جدا کرد که موجب کاهش هزینه‌ها می‌شود *تویمن* و همکاران (Twyman *et al.*, 2003).

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.