علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۵، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۳ (ص ۳۹۸-۳۸۹)

افزایش ارتفاع و سطح برگ گیاهان تراریخت توتون بیان‌کنندهٔ ژن *AtEXPA18* آرابیدوپسیس تالیانا

میثم ملک‌پور[۱] و علیرضا عباسی[۲*]
۱ و ۲. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۷/۲۰)

چکیده

اکپنسین‌ها گروهی از پروتئین‌های دیوارهٔ سلولی‌اند که به‌واسطهٔ تغییرات pH، موجب بسط دیوارهٔ سلولی می‌شوند. این پروتئین‌ها از طریق سست کردن پیوندهای هیدروژنی بین میکروفیبریل‌های سلولز و پلیمر ماتریکس موجب تغییر شکل دیواره و رشد می‌شوند. در این تحقیق، یک ژن اختصاصی ریشه از گیاه آرابیدوپسیس به نام *AtEXPA18* که به‌طور مستقیم در شکل‌گیری ریشه‌های مویین مؤثر است، همچنین نقش آن در دیگر بخش‌های گیاهی ثابت شده است، جداسازی و تحت کنترل پیشبرندهٔ CaMV 35S و خاتمه‌دهندهٔ NOS درون ناقل بیان گیاهی pBI121 همسانه‌سازی و در نهایت به آگروباکتری منتقل شد. سپس این ژن طی روش تراریختی برگی توتون، به این گیاه انتقال یافت. گیاهان حاصل از باززایی روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین گزینش شدند. گیاهان به‌دست‌آمده از این طریق در نهایت به گلخانه انتقال یافتند و پس از رشد کافی مورد آنالیز مولکولی و مورفولوژیکی قرار گرفتند. برای اثبات تراریختی گیاهان در سطح ژنوم، استخراج دی‌ان‌ای صورت گرفت و ژن *AtEXPA18* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. همچنین پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، نتایج آزمون RT-PCR، رونویسی تراژن را در گیاهان تراریخت تأیید کرد. بررسی‌های مورفولوژیکی گیاهان تراریخت نشان داد که این گیاهان نسبت به گیاهان غیرتراریخت دارای اندام‌های بزرگ‌تر و حجیم‌تری هستند. برای مثال صفاتی همچون ارتفاع بوته و سطح برگ‌ها، در توتون‌های تراریخت نسبت به گیاهان شاهد، برتری معنی‌داری داشتند. نتایج به‌دست‌آمده به‌همراه سایر نتایج، نقش ژن مذکور را در بسط و توسعهٔ سلولی نشان می‌دهند و آن را به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ رشد عمومی، برای به‌دست آوردن گیاهان تراریخته با اندام بزرگ‌تر توصیه می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: **اکسپنسین، اگروباکتریوم تومفشینس، بسط دیوارهٔ سلولی، تراریختی.**

مقدمه

اندازه و شکل اندام‌های گیاهی، صفات بسیار مهمی‌اند که به‌شدت تحت کنترل ژنتیکی هستند. اندازهٔ نهایی اندام‌های گیاهی از طریق دو عامل اندازه و تعداد سلول‌ها تعیین می‌شود، بنابراین امکان تغییر اندازهٔ اندام توسط دست‌ورزی تقسیم و توسعهٔ سلولی، وجود دارد. افزایش حجم سلول، اغلب به‌سبب جذب آب توسط واکوئل مرکزی رخ می‌دهد، اما به‌دلیل سختی و استحکام دیوارهٔ سلولی، بزرگ شدن سلول تنها زمانی اتفاق می‌افتد که اتصالات میکروفیبریل سلولز نرم و شکسته شود. بنابراین سلول گیاهی برای طویل شدن یا بلوغ، به تغییر انتخابی دیوارهٔ سلولی نیاز دارد. عواملی که در تغییر دیوارهٔ سلول‌های گیاهی نقش دارند شامل اجزای مختلف دیوارهٔ سلولی مانند اکسپنسین‌ها،

* تلفن: ۰۹۱۲۴۱۲۸۷۰۹
E-mail: rezabbasi@ut.ac.ir

اندوگلوکانازها، زایلوگلوکان اندوترانس گلیکوزیلاز و رادیکال‌های هیدروکسیل است (Cosgrove, 1999). اکپنسین‌ها گروهی از پروتئین‌های دیوارهٔ سلولی‌اند که به‌واسطهٔ تغییرات pH، موجب بسط دیوارهٔ سلولی می‌شوند و اولین بار در سال ۱۹۹۲ از دیوارهٔ سلولی هیپوکوتیل گیاه خیار جداسازی شدند (McQueen-Mason *et al*., 1992). این پروتئین‌ها سپس در گونه‌های گیاهی دیگر نیز شناسایی شدند (Rose *et al*., 2000; Powell *et al*., 2003; Wang *et al*., 2006).

چهار خانواده از ژن‌های اکسپنسین شناسایی شده‌اند که شامل α-Expansins (*EXPA*)، β-Expansins (*EXPB*) و Expansin-like A (*EXPLA*) و Expansin-likeB (*EXPLB*) هستند (Choi *et al*., 2006).

اکپنسین‌ها در گیاهان توسط چندین ژن کد می‌شوند. برای مثال ژنوم آرابیدوپسیس دارای ۳۶ ژن اکسپنسین است؛ ۲۶ ژن برای EXPA، ۶ ژن برای EXPB، ۳ ژن برای EXPLA و ۱ ژن برای EXPLB. در مقایسه با آرابیدوپسیس، ژنوم برنج دارای ۵۸ ژن اکسپنسین شامل ۳۴ ژن EXPA، ۱۹ ژن EXPB، ۴ ژن EXPLA و ۱ ژن EXPLB است (Sampedro & Cosgrove, 2005).

در حال حاضر با گذشت بیست سال از کشف این پروتئین‌ها بی‌تردید اکسپنسین‌ها نه‌تنها در تنظیم بسط سلولی، بلکه در تنظیم چندین فرایند مورفوژنتیکی و ساختاری دخیل‌اند، از جمله در رشد ریشه و برگ (Wu *et al*., 2001; Shin *et al*., 2005)، افزایش طول میانگره (Choi *et al*., 2003)، توسعهٔ برگ (Fleming *et al*., 1997; Pien *et al*., 2001) و توسعهٔ گل (Zenoni *et al*., 2004) تأثیر می‌گذارند. تشدید بیان ژن *AtEXPA10*، در آرابیدوپسیس تالیانا با افزایش طول دمبرگ و سطح برگ همراه شده است، همچنین گیاهان تراریخت حامل کپی آنتی-سنس همان ژن، برگ‌های کوچکی را ایجاد کرده‌اند (Cho & Cosgrove, 2000).

دانشمندان در پژوهشی یک ژن *TaEXPB23* را از کلوئوپتیل گندم استخراج، و به‌منظور نشان دادن نقش آن در رشد و توسعهٔ سلول، به گیاه توتون انتقال دادند و مشاهده کردند که این ژن موجب تسریع رشد برگ‌ها و میانگره‌ها در اوایل رشد شده و همچنین در تنظیم رشد کلی گیاه مؤثر واقع می‌شود (Xing *et al*., 2009).

مشخص شده است که بیان دو ژن اکسپنسین به نام‌های *AtEXP7* و *AtEXP18* به‌طور مؤثری با تولید ریشه‌های مویین مرتبط است (Cho & Cosgrove, 2002; Won *et al*., 2009). در راستای گسترش اندام ریشه و افزایش توانایی گیاه برای جذب آب بیشتر و همچنین افزایش سطوح بخش‌های هوایی گیاهان توتون، شامل ساقه و برگ‌ها، در این پژوهش انتقال و بیان فراوان ژن *AtEXPA18* تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35S مدنظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ساخت سازهٔ ژنی pBI:*EXPA18*

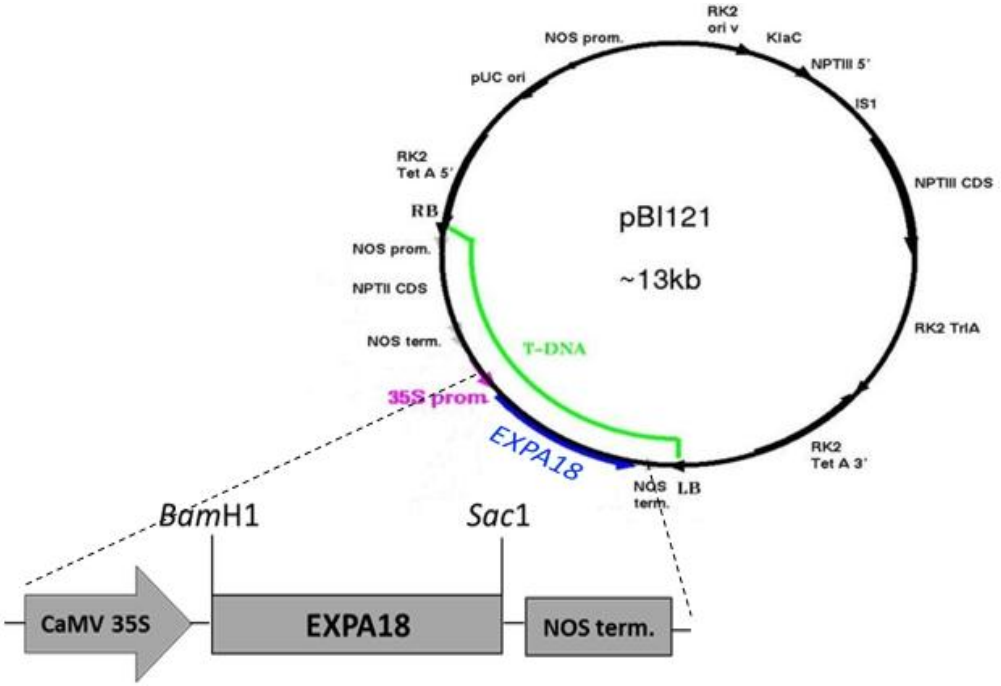
در این تحقیق ژن *AtEXPA18*، از دی‌ان‌ای استخراج‌شدهٔ گیاه آرابیدوپسیس تالیانا جدا و به درون ناقل pGEM-T وارد شد. این ناقل نیز به‌همراه ژن مورد نظر ابتدا به باکتری *Eschrichia coli* DH5α مستعدشده منتقل شد و پس از تکثیر ناقل، ژن مورد نظر از آن جدا و به درون ناقل بیانی pBI121 (Clonetech) همسانه‌سازی شد (Shahnejat Bushehri *et al*., 2010) (شکل ۱).

پس از ساخت سازهٔ ژنی و تأیید آن، این سازه به سلول‌های مستعد *Agrobacterium tumefasciens* LBA4404 منتقل شد و کلونی‌های رشدکرده در محیط LB (Merck) انتخابی (حاوی کانامایسین و ریفامپسین) برای تلقیح برگ‌های توتون استفاده شدند.

برای تأیید نهایی حضور سازهٔ ژنی در آگروباکتری، از کلونی‌های رشدکرده بر روی محیط LB انتخابی به‌منظور انجام کلونی PCR، نمونه‌گیری شد و با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده (جدول ۱) و توسط آنزیم *Taq*[1] پلیمراز (شرکت سیناژن) ژن هدف تکثیر و قطعات متناسب با اندازهٔ آن بر روی ژل آگارز مشاهده شد.

آغازگرهای مناسب برای تکثیر ژن *EXPA18* بر اساس ابتدا و انتهای CDS[2] این ژن طراحی شده بودند که هنگام تکثیر ژن، طولی برابر با ۱۲۲۸ bp (مطابق با طول ناحیهٔ کدکنندهٔ *AtEXP18*) را بر روی ژل نشان می‌دادند (شکل ۲).

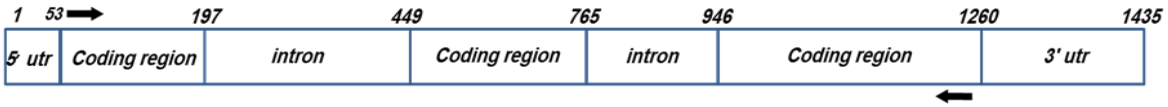
1. Taq (Thermus aquaticus) DNA Polymerase
2. Coding DNA Sequence



شکل ۱. نقشهٔ شماتیک سازهٔ ژنی *pBI:EXPA18* . برای ساخت این سازه هضم دوگانهٔ ناقل pBI121 با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I انجام گرفت. سپس ژن *EXPA18* توسط آنزیم T4 DNA لیگاز به درون ناقل pBI121 کلون شد. ناقل دوگانهٔ pBI121 دارای نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین و تحت کنترل پیشبر CaMV 35S است که موجب بیان ژن در سلول‌های موجودات پرسلولی می‌شود. این پلاسمید دارای مناطق مرزی چپ و راست موجود در پلاسمید Ti است که در انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به سلول‌های گیاهی نقش دارند.

جدول ۱. مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن *EXPA18*. محل شناسایی آنزیم‌های برشی مشخص شده است.

آغازگر	توالی آغازگر
AtEXP FW	5'-GGATCCCAGAGTAAAAATGGATCAAAATTT- 3'
AtEXP RV	5'- GAGCTCTTAGTTAAAATTAGCCTTGCTCTG - 3'



شکل ۲. شمای مربوط به ساختار ژن *EXPA18* و محل اتصال آغازگرها بر روی این ژن

تراریختی توتون از طریق اگروباکتریوم

در این پژوهش از بذرهای گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.)، رقم تجاری سامسون (*Samsun*) برای کشت، و از برگ‌های آن برای تلقیح توسط باکتری استفاده شد. ابتدا بذرهای توتون در الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی شده و سپس توسط هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به‌مدت ده دقیقه استریله شدند و پس از پنج بار شست‌وشو با آب مقطر استریل، در محیط کشت MS[1] (pH 5.8) کاشته شدند. پس از چهاربرگی شدن گیاهان، نمونه‌گیری از برگ آنها صورت گرفت و همزمان اگروباکتری در محیط کشت LB مایع انتخابی با کانامایسین و ریفامپسین، درون فالکون ۵۰،

1. Murashige and Skoog

به‌مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد رشد داده شد، سپس به‌مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا رسوب باکتری جدا شود. سپس محیط تلقیح (که همان MS مایع بود) به رسوب باکتری اضافه شد و دوباره به‌مدت ۴-۶ ساعت در انکوباتور گذاشته شد تا OD_{600} نهایی باکتری به ۱/۸-۲ برسد. همچنین برای افزایش توان آلوده‌سازی باکتری‌ها مقداری استوسرینگون به محیط تلقیح اضافه شد. نمونه‌های برگی توسط اسکالپل زخمی شده و به‌مدت یک تا دو دقیقه درون محیط تلقیح حاوی باکتری غوطه‌ور شدند. به‌منظور ارتباط بیشتر باکتری با سلول‌های برگی، برگ‌های تلقیح‌شده در محیط هم‌کشت MS به‌مدت سه تا پنج روز در اتاقک تاریکی قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به محیط کشت انتخابی MS حاوی کانامایسین - با غلظت ۲۵ µg/ml - به‌منظور گزینش تراریخت‌ها و سفوتاکسیم - با غلظت ۴۰۰ µg/ml – برای جلوگیری از رشد باکتری، منتقل شده و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰ درصد و دورهٔ نوری شانزده ساعت روشنایی، هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از حدود چهار هفته سلول‌ها شروع به رشد کردند. گیاهچه‌های احتمالاً تراریخت سبز باقی‌مانده در محیط انتخابی اولیه، به محیط انتخابی ثانویه با غلظت کانامایسین ۵۰µg/ml انتقال یافتند تا گیاهان غیرتراریخت فرارکرده از محیط انتخابی اول، در این مرحله حذف شوند. پس از رشد کافی گیاهان در این محیط، آنها به خاک منتقل شده و پس از سازگاری با محیط، ابتدا به فیتوترون و سپس به گلخانه انتقال داده شدند.

بررسی گیاهان تراریخت

گیاهچه‌ها در گلخانه تحت شرایط آبیاری مناسب قرار گرفتند و پس از رشد کافی، نمونه‌های برگی برای استخراج دی ان ای گرفته شده و به فریزر ۸۰- انتقال یافت و به‌منظور اثبات تراریختی گیاهان، استخراج دی‌ان‌ای از آنها به روش CTAB انجام گرفت. ژن *AtEXPA18* با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده و از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد. برای تأیید بیان تراژن در گیاهان تراریخت، RNA کل با روش bioZOL^{TM} استخراج شد. سپس RNA استخراجی با DNase تیمار شد و cDNA توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس (شرکت فرمنتاز) ساخته شد و پس از اندازه‌گیری غلظت cDNA به‌دست‌آمده با نانودراپ و تهیهٔ محلول‌های پایهٔ ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر، برای اثبات حضور رونوشت ژن *AtEXPA18* در لاین‌های تراریخت توتون از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژن استفاده شد. شرایط واکنش همانند واکنش‌های استاندارد PCR قبلی بود، با این تفاوت که به‌جای DNA ژنومی از cDNA به‌عنوان الگو استفاده شد. در نهایت، صفات مورفولوژیکی شامل طول ساقه، با متر و سطح برگ‌ها، به‌وسیلهٔ دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ[1] اندازه‌گیری شدند.

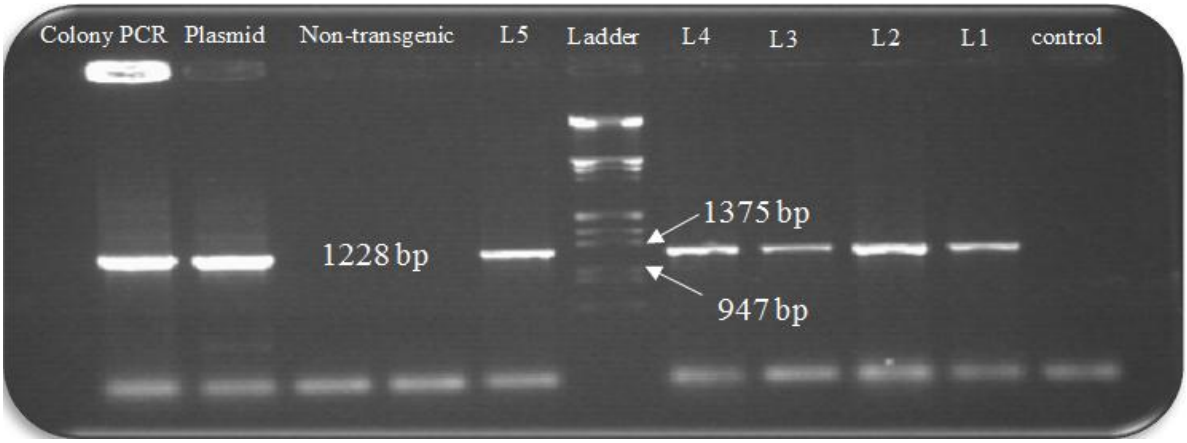
نتایج و بحث

ژن *AtEXPA18* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و به‌کمک PCR تکثیر شد و محصولات حاصله روی ژل آگارز الکتروفورز شد.

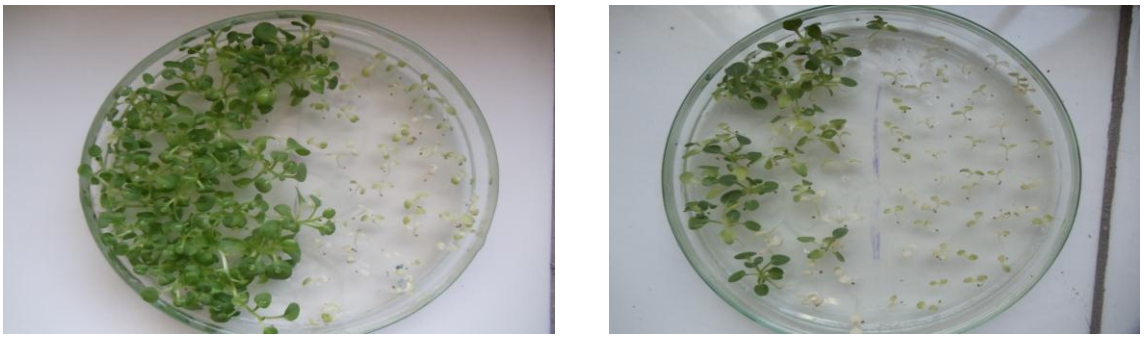
با توجه به شکل ۳، در چاهک اول از سمت راست محصول PCR دی‌ان‌ای استخراج‌شده از گیاه شاهد (به‌عنوان کنترل منفی) بارگذاری شد و همان‌طورکه انتظار می‌رفت، هیچ قطعه‌ای مشاهده نشد. چاهک‌های ۲ تا ۵ و ۷ تا ۹ حاوی DNA تکثیرشدهٔ گیاهان مورد آزمون هستند. چاهک ۶ نیز نشانگر وزن مولکولی را داراست که حاوی DNA لاندای هضم‌شده با آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III است. همچنین پلاسمید استخراج‌شده از اگروباکتری و کلونی باکتری (به‌عنوان کنترل‌های مثبت) به‌ترتیب در چاهک‌های ۹ و ۱۰ بارگذاری شدند. در نهایت، قطعات DNA ایجادشده مطالعه شدند. با توجه به اندازهٔ قطعات تکثیرشده در نمونه‌های دی‌ان‌ای استخراج‌شده، پنج لاین تراریخت (L1-L5) که قطعه‌ای هم‌ردیف با قطعهٔ حاصل از کنترل مثبت و در حدود ۱۲۲۸ bp(طول CDS ژن *AtEXP18*) را نشان دادند، مشخص شدند (شکل۳).

به این ترتیب تراریختی پنج لاین از گیاهان توتون تأیید شد و آنالیزهای بعدی بر روی این گیاهان صورت گرفت.

1. Leaf Area Meter



شکل ۳. قطعات حاصل از تکثیر دی ان ای توتون با آغازگرهای ویژهٔ ژن *AtEXPA18* بر روی ژل آگارز ۱ درصد
L5-L1: گیاهان تراریخت مثبت / Plasmid: نمونه پلاسمید اگروباکتری حاوی ژن مورد نظر (کنترل مثبت) / Colony PCR: کلونی اگروباکتری‌دار سازهٔ ژنی مورد نظر / Ladder: نشانگر وزن مولکولی λ /EcoRI+HindIII (Qiagen)



شکل ۴. بذور گیاهان تراریخت به‌دلیل دارا بودن ژن مقاومت به کانامایسین، می‌توانند در محیط کشت حاوی این آنتی‌بیوتیک رشد کنند (سمت چپ پتری‌دیش‌ها) ولی گیاهان غیرتراریخت پس از جوانه زدن در این محیط، زرد می‌شوند و از بین می‌روند (سمت راست پتری‌دیش‌ها).

به‌منظور تأیید نتایج PCR و همچنین اثبات انتقال ژن به نسل بعدی (T1)، بذرهای گیاهان تراریخت و شاهد جداگانه برداشت شده و پس از ضدعفونی، در محیط کشت MS حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ µg/ml) در داخل پتری‌دیش کشت شدند. چون گیاهان تراریخت حاوی ژن مورد نظر، ژن مقاومت به کانامایسین را نیز دریافت کرده‌اند، باید در محیط کانامایسین‌دار قادر به رشد باشند، ولی گیاهان غیرتراریخت توانایی رشد در این محیط را نخواهند داشت و پس از جوانه زدن زرد خواهند شد. به این ترتیب هر پنج لاینی که تراریختی‌شان با PCR تأیید شده بود، بر خلاف گیاهان شاهد، و با نسبت ۳:۱ در این محیط کشت به‌خوبی رشد کردند و سبز ماندند (شکل۴).

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات RT-PCR نیز تراریختی لاین‌های مورد نظر و رونویسی تراژن در این لاین‌ها را تأیید کرد (شکل ۵). با توجه به این شکل، لاین‌های تراریخت، قطعه‌ای هم‌ردیف با باند ۷۸۹ جفت بازی بر روی ژل آگارز ایجاد کردند، درحالی‌که در گیاه شاهد باندی دیده نشد تا بدین صورت رونویسی تراژن در لاین‌های تراریخت به اثبات برسد.

بررسی‌های مورفولوژیکی گیاهان تراریخت نشان داد که این گیاهان نسبت به گیاهان غیرتراریخت اندام‌های بزرگ‌تر و حجیم‌تری دارند. گیاهان تراریخت پس از ۲۱ هفته رشد در محیط گلخانه برتری خود را نسبت به گیاهان شاهد از نظر ارتفاع بوته نشان دادند (شکل ۶)، به‌طوری‌که ارتفاع ساقهٔ این گیاهان در پایان رشد به ۱۴۵ سانتی‌متر نیز رسید، درحالی‌که اندازهٔ بلندترین گیاه شاهد در حدود ۹۵ سانتی‌متر شد (شکل ۸). نتایج به‌دست‌آمده که از طریق آماری مورد تجزیه قرار گرفت، نشان داد که ارتفاع

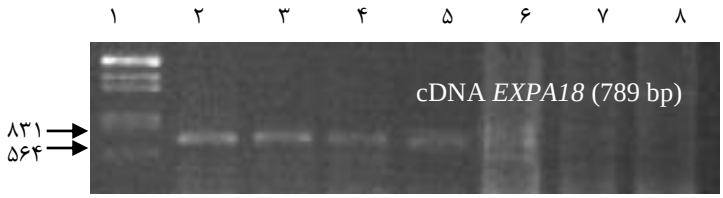
لاین‌های تراریخت نسبت به گیاهان شاهد غیرتراریخت، برتری معنی‌داری در سطح ۵ درصد دارند (جدول ۲).

جدول ۲. جدول تجزیهٔ واریانس برای صفات اندازه‌گیری‌شدهٔ لاین‌های تراریخت و شاهد در نسل اول

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	
		ارتفاع بوته	سطح برگ
لاین‌ها	۱	۱۸۵۶/۵۳۳*	۳۷۳۱۲/۱۳۳**
خطا	۶	۳۰۱/۹۱۱	۲۵۳۶/۶۴۴
ضریب تغییرات (٪)		۲۰/۶۲	۲۷/۷۳

*، ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیرمعنی‌دار.

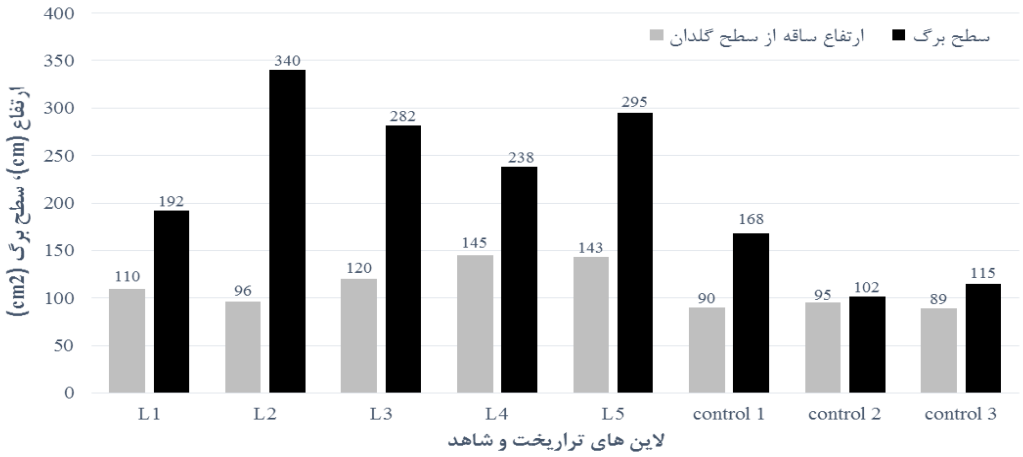
این اختلاف مشاهده‌شده در گیاهان تراریخت و شاهد، با توجه به شرایط رشدی یکسان نمونه‌ها، احتمالاً دلیلی بر بیان صحیح ژن مورد نظر و عملکرد آن در محل دیوارهٔ سلولی به‌عنوان بسط‌دهندهٔ اندازهٔ سلول است. البته اثبات این ادعا نیازمند آزمایش‌ها و آنالیزهای مربوط به بیان ژن است که در مراحل بعدی پژوهش به اجرا گذاشته خواهند شد. در بررسی دیگر، پنج لاینی که تراریختی آنها از طریق پی‌سی‌آر اثبات شده بود، سطوح برگی بزرگ‌تری را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند، به‌طوری‌که افزایش سه‌برابری در برخی برگ‌های گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد (شکل۷) که این اختلاف بین لاین‌های تراریخت و شاهد، در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). همچنین در انتهای رشد و رسیدگی کامل این لاین‌ها سطح برگی خود را تا حد زیادی حفظ کردند (شکل ۸).



شکل ۵. نتیجهٔ آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *AtEXPA18* بر روی ژل آگارز ۱ درصد
۱) Ladder: نشانگر وزن مولکولی EcoRI+HindIII/ λ (Qiagen)، ۶-۲) لاین‌های تراریخت، ۷) گیاه شاهد، ۸) کنترل منفی که در آن از آب به‌جای cDNA استفاده شده است.

شکل ۶. ارتفاع گیاهان تراریخت در مقایسه با غیرتراریخت‌ها پس از ۲۱ هفته رشد در گلخانه

شکل ۷. سطوح برگی لاین‌های تراریخت (بالا)، در مقایسه با شاهد (پایین)



شکل ۸. ارتفاع و سطح برگ گیاهان تراریخت (L1-L5) در مقایسه با گیاهان شاهد (control 1,2,3)

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، گیاهان توتون تراریخت با ژن *AtEXPA18* به‌دست آمد که دارای اندام‌های بزرگ‌تر در مقایسه با شاهد بودند. درحالی‌که تشدید بیان برخی از ژن‌های اکسپنسین در موارد نادر موجب تشکیل اندام‌های کوچک شده است (Gao *et al*., 2010). نتایج این تحقیق با نتایج بسیاری از پژوهش‌های دیگر همخوانی دارد، تشدید بیان این ژن‌ها بر رشد اندام‌های گیاهی تأثیر مثبت داشته است (Cho & Cosgrove, 2000; Choi *et al*., 2003).

رشد ساقه

ساقهٔ بلند این گیاهان احتمالاً به‌سبب فعالیت بیشتر ژن اکسپنسین در سلول‌های نابالغ و جوان میانگره ساقه است که با بسط بیشتر این سلول‌ها افزایش ارتفاع را موجب شده است. در نتایجی مشابه محققان سوئدی گیاه صنوبر (*Populus tremula* L.) تراریخت با ژن *PttEXPA1* را که دارای ساقه‌های بلند و برگ‌های بزرگ بود، تولید کردند و نشان دادند که فعالیت این ژن بیشتر در کامبیوم و میانگره‌های طویل اغلب ناشی از سلول‌های بزرگ (نه تعداد سلول بیشتر) بوده است. به‌نظر می‌رسد فعالیت اکسپنسین‌ها عمدتاً در سلول‌های جوان و تمایزنیافته اتفاق می‌افتد و با بسط بیشتر این سلول‌ها موجب حجیم شدن آنها، و در نهایت افزایش طول کلی ساقه می‌شود (Mitsumune *et al*., 2008).

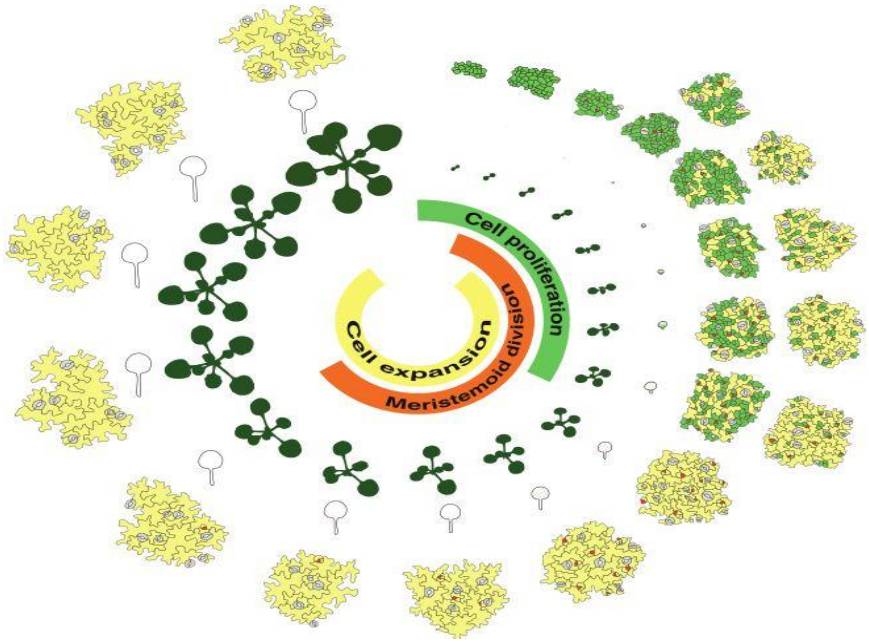
رشد برگ

تشریح شبکهٔ ژنتیکی که شکل و اندازهٔ برگ را موجب می‌شوند نه تنها از این نظر اهمیت دارد که گیاهان به‌عنوان مهم‌ترین منبع انرژی هستند، بلکه برای درک کنترل اندازهٔ سلول در موجودات پرسلولی اهمیت دارند. آغازنده‌های برگی از کنار مریستم رأسی ساقه (SAM)[1] ظاهر می‌شوند. طبق شکل ۹، عواملی که موجب تبدیل این آغازندهٔ برگی به برگ بالغ می‌شوند شامل دو فرایندی‌اند که اشتراکاتی دارند: تقسیم سلولی و توسعهٔ سلولی دو رخداد مهمی‌اند که عامل اصلی تشکیل یک اندام گیاهی به‌شمار می‌روند (Gonzalez *et al*., 2012).

در طی اولین مرحله، تکثیر سلولی در سراسر پرایموردیا رخ می‌دهد و سلول‌های جدید تولید می‌کند که اندازهٔ آنها نسبتاً ثابت و کوچک باقی می‌ماند. اندازهٔ نهایی برگ تا حدی می‌تواند از طریق تکثیر سلولی با تغییر تعداد سلول‌هایی که در ایجاد برگ شرکت می‌کنند، تعیین شود. پیشرفت در طی مراحل مختلف چرخهٔ سلولی نیازمند تنظیمات موقتی فعالیت پروتئین‌های درگیر در همانندسازی DNA و میتوز است. بعد از فاز اول، تقسیم سلولی در برگ در حال رشد متوقف می‌شود و برگ‌ها رشد اضافی خود را در اثر بسط و گسترش ناشی از بزرگ شدن سلول، به‌واسطهٔ نرم شدن دیوارهٔ سلولی و سنتز جدید ترکیبات دیوارهٔ سلولی به‌دست می‌آورند و در این میان اکسپنسین‌ها شناخته‌شده‌ترین عوامل در بسط دیوارهٔ سلولی‌اند

1. Shoot apical meristem

(Cosgrove, 2005). آزمایش‌های مختلف نشان داده‌اند که پروتئین‌های اکسپنسین می‌توانند گسترش زودرس پرایموردیای برگی اولیه را القا کنند و متعاقب آن الگوی آرایش برگی را نیز تغییر دهند (Cosgrove, 2000).



شکل ۹. مراحل مختلف رشد و نمو آرابیدوپسیس در سطح سلولی، روزت و برگ (Gonzalez *et al*., 2012)

همان‌طور که در نتایج این مقاله نیز تأثیر ژن *AtEXPA18* بر افزایش اندازهٔ اندام‌های رویشی گیاهان تراریخت توتون، به‌خصوص برگ‌ها نشان داده شد، این پروتئین با فعالیت سست‌کنندگی خود شبکه‌های پلیمری (نگهدارندهٔ میکروفیبریل‌های سلولزی) را هیدرولیز می‌کند و بسط و گسترش سلول را ناشی می‌شود و در نهایت تمایز سلولی و اندازهٔ نهایی برگ شکل می‌گیرد (Cosgrove, 2005).

هورمون‌های گیاهی و اکسپنسین‌ها

ارتباط ژن‌های اکسپنسین و هورمون‌های گیاهی هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده است، ولی آزمایش‌های زیادی وجود همبستگی مثبت بین این ژن‌ها و هورمون‌هایی همچون اکسین، جیبرلین، سیتوکینین، آبسیزیک‌اسید و اتیلن را تأیید کرده‌اند. این فیتوهورمون‌ها از طریق تنظیم میزان بیان ژن‌های اکسپنسین در میزان فعالیت آنها دخالت می‌کنند. اخیراً در یکی از این آزمایش‌ها Wang *et al*. (2012) ارتباط بین هورمون‌های گیاهی (IAA و ABA) و ژن‌های اکسپنسین را در گندم و تحت شرایط تنش خشکی آزمایش کردند و به این نتیجه رسیدند که افزایش ABA طی تنش اسمزی از یک طرف موجب افزایش بیان ژن اکسپنسین و متعاقباً افزایش فعالیت آنها می‌شود و از طرفی با افزایش pH دیواره (با کاهش فعالیت کانال H^+-ATPase) مانعی بر سر راه فعالیت اکسپنسین‌ها ایجاد می‌کند. ولی بر خلاف ABA، اکسین فعالیت اکسپنسین‌ها را از طریق کاهش PH دیواره افزایش می‌دهد. علاوه بر این اکسین به‌عنوان عامل افزایش طول سلول، بیان برخی از ژن‌های اکسپنسین را افزایش می‌دهد، ولی بر خلاف اکسین، اتیلن بیان این ژن‌ها را کاهش می‌دهد (Cosgrove, 2000). هورمون جیبرلین نیز بیان *exp* ها را افزایش می‌دهد. بخش عمده‌ای از افزایش طول (القاشده توسط GA) میانگره‌ها در برنج deepwater ناشی از افزایش بیان و فعالیت اکسپنسین‌ها بوده است (Lee *et al*., 2001).

Dowries & Crowell (1998) با افزودن سیتوکینین به محیط کشت سویا، افزایش ۲۰-۶۰ برابری در میزان رونوشت یک پروتئین بتااکسپنسین به نام Ciml[1] را مشاهده کردند که نقش این فیتوهورمون دخیل در تقسیم سلولی را در تنظیم بیان اکسپنسین‌ها نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان

1. Phyllotaxy
2. Cytokinin-induced message

گفت با تشدید بیان اکسپنسین‌ها در گیاهان مختلف و افزایش تعداد نسخه‌های آنها در ژنوم گیاه، احتمالاً میزان بیان و در نتیجه مقدار تولید این پروتئین‌ها تحت تأثیر فیتوهورمون‌ها بیش از پیش خواهد بود و رشد را تسریع خواهد کرد. در نهایت نتایج به‌دست‌آمده این اجازه را به ما می‌دهد تا ژن *AtEXPA18* را به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ رشد عمومی، برای به‌دست آوردن گیاهان تراریخته با اندام بزرگ‌تر پیشنهاد کنیم که این گیاهان درشت‌اندام در کشاورزی، جنگلداری و همچنین برای اهداف زینتی می‌توانند مورد استفادهٔ اقتصادی قرار گیرند.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از امکانات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام پذیرفت، ازاین‌رو از تمامی مدیران و کارکنان این گروه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Cho, H. T. & Cosgrove, D. J. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14, 3237-3253.
2. Cho, H.T. & Cosgrove, D.J. (2004). Expansins as agents in hormone action. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Davies, P.J., Ed., Dordrecht: Kluwer, 262-281.
3. Cho, H.T. & Cosgrove, D. J. (2000). Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 97, 9783-9788.
4. Choi, D., Cho, H. T. & Lee, Y. (2006). Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiol Plant*, 126, 511-518.
5. Choi, D., Lee, Y., Cho, H. T. & Kende, H. (2003). Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. *Plant Cell*, 15, 1386-1398.
6. Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell wall by expansins. *Nature*, 407, 321-326.
7. Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. Nat. Rev. *Mol. Cell Biol*., 6, 850-861.
8. Cosgrove, D.J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. Annu. Rev. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 50, 391-417.
9. Dowries, B. P. & Crowell, D. N. (1998). Cytokinin regulates the expression of a soybean β-expansin gene by a post-transcriptional mechanism. *Plant Mol Biol*, 37, 437-444.
10. Gao, X., Liu, K. & Lu, Y.T. (2010). Specific roles of atexpa1 in plant growth and stress adaptation. *Russ. J. Plant Physiol*, 57, 241-246.
11. Gonzalez, N., Vanhaeren, H. & Inze, D. (2012). Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in Plant Science*, 17, 332-340.
12. Gray Mitsumune, M., Blomquist, K., mcqueen Mason, S., Teeri, T. T., Sundberg, B. & Mellerowicz, E. J. (2008). Ectopic expression of a wood_abundant expansin pttexpa1 promotes cell expansion in primary and secondary tissues in aspen. *Plant Biotechnol*, 6, 62-72.
13. Kuluev, B.R., Knyazev, A.B., Lebedev, Ya.P. & Chemeris, A.V. (2012). Morphological and physiological characteristics of transgenic tobacco plants expressing expansin genes: atexp10 from Arabidopsis and pnexpa1 from Poplar. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59 (1), 97-104.
14. Lee, Y., Choi, D. & Kende, H. (2001). Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol*, 4, 527-532.
15. Li, F., Xing, S., Guo, Q., Zhao, M., Zhang, J., Wang, G. & Wang, W. (2011). Drought tolerance through over-expression of the expansin gene taexpb23 in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 168, 960-966.
16. Mcqueen-Mason, S. J. & Cosgrove, D. J. (2000). Disruption of hydrogen-bonding between plant-cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91, 6574-6578.
17. Mcqueen-Mason, S., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*, 4, 1425-1433.
18. Rose, J. K. C., Cosgrove, D. J., Albersheim, P., Darvill, A. G. & Bennett, A. B. (2000). Detection of expansin proteins and activity during tomato ontogeny. *Plant Physiology*, 123, 1583.
19. Sampedro, J. & Cosgrove, D. J. (2005). Protein family review: expansins. *Genome biology*, 6, 242-250.
20. Shahnejat bushehri, S. (2010). Overexpression of *AtEXPA18* in Arabidopsis Thaliana. MSc. dissertation, University of Tehran, College of Agriculture & Natural Resources, Department of Agronomy and Plant Breeding. (In Farsi)
21. Wang, W., Scali, M., Vignali, R., Milanesi, C., Petersen, A., Sari-Gorla, M. & Cresi, M. (2004). Male-sterile mutation alters Zea m1 (beta-expansin1) accumulation in a maize mutant. *Plant Reprod*, 17, 41-47.
22. Wu, Y., Meeley, R.B. & Cosgrove, D.J. (2001). Analysis and expression of the α-expansin and β-expansin gene families in maize. *Plant Physiol*, 126, 222-232.

23. Wu, Y., Thorne, E.T., Sharp, R.E. & Cosgrove, D.J. (2001). Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials. *Plant Physiol*, 14, 3237-3253.
24. Xing, S. C., Li, F., Guo, Q. F., Liu, D. R., Zhao, X. X. & Wang, W. (2009). The involvement of an expansin genetaexpb23 from wheat in regulating plant cell growth. *Biologia Plantarum*, 53 (3), 429-434.
25. Zenoni, S., Reale, L., Tornielli, G. B., Lanfaloni, L., Porceddu, A., Ferrarini, A., Moretti, C., Zamboni, A., Speghini, A., Ferranti, F. & Pezzotti, M. (2004). Downregulation of the Petunia hybrida α-expansin gene phexp1reduces the amount of crystalline cellulose in cell wall and leads to phenotypic changes in petal limbs. *Plant Cell*, 16, 295-308.
26. Zhao, M. R., Han, Y., Feng, Y., Li, F. & Wang, W. (2012). Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. *Plant Cell Rep*, 31, 671-685.