

افزایش پایداری غشای یاخته‌ای در گیاه توتون با انتقال ژن *AtEXPB2*

مریم چاله‌کائی^۱، علیرضا عباسی^{۲*}، صدیقه یوسفی^۳ و داوود داداشی^۴

۱. دانشجویان دوره کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۲. دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۲۷)

چکیده

پروتئین‌های اکسپن‌سین از جمله اجزای دیوارهٔ یاخته‌ای هستند که به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی رشد و توسعهٔ یاخته‌ای در طول رشد و نمو گیاهان شناخته می‌شوند. فعالیت اکسپن‌سین‌ها وابسته به pH است. در این بررسی گیاهان تراریخت شده با ژن *AtEXPB2* از نظر برخی صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ آزمایش شدند. گیاهان مورد بررسی شامل رگه (لاین)های تراریخت L3، L4 و L9 به همراه گیاه شاهد بوده‌اند. پس از کشت بذر در محیط کشت انتخابی MS گیاهچه‌های تراریخت در خاک کشت و به گلخانه منتقل شدند. گیاهان تراریخت از نظر فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده (آنتی‌اکسیدانی) کاتالاز، گلوتاتیون پروکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز عملکرد بهتری را نسبت به شاهد نشان دادند. همچنین رگه‌های تراریخت از نظر میزان رنگدانه‌های نورساختی (فتوستنتزی) و پرولین نیز بر گیاه شاهد برتری داشتند. در گیاه شاهد میزان نشت یونی و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشایی بیشتر از رگه‌های تراریخت بود. نتایج بیان نسی ژن *AtEXPB2* بیان این ژن را در گیاهان تراریخت ثابت کرده است. به‌صورت کلی گیاهان تراریخت در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده که بسیاری از آنها مرتبط با تحمل گیاه در شرایط تنشی هستند، عملکرد بهتری از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: اکسپن‌سین، بسط دیوارهٔ یاخته‌ای، بیان ژن، رگه‌های تراریخت، *AtEXPB2*.

Study Increased cell membrane stability in tobacco plants by transferring *AtEXPB2* gene

Maryam Chalekai¹, Alireza Abbasi^{2*}, Sedigheh Yousefi³ and Davood Dadashi⁴

1 and 3. M. Sc. Students of Agricultural Biotechnology, department of Agronomy and Plant breeding, Agricultural College, University of Tehran, Karaj

2. Associate professor, department of Agronomy and Plant breeding, Agricultural College, University of Tehran, Karaj

4. M. Sc. in Agricultural Biotechnology, department of Agronomy and Plant breeding, Agricultural College, University of Tehran, Karaj

(Received: ebruary 1, 2016 - Accepted: September 17, 2016)

ABSTRACT

Expansin protein is a component of the cell wall generally accepted to be the key regulator of cell wall extension during plant growth. Expansins loosen the cell wall in a pH-dependent manner. In this study transgenic *AtEXPB2* plants were investigated in and subsequently some of their physiological, biochemical and molecular traits were measured at 2014-2015. Plant materials were transgenic lines; L3, 14, 19 and wide type plant as control. Seeds of three transgenic lines and control were cultured in selective MS and MS medium, respectively. Then transgenic seedlings were grown in greenhouse. Transgenic plants had better antioxidant enzymatic activity of catalase, glutathione peroxidase and polyphenol oxidase as well as higher photosynthetic pigments and proline content. Control plant had higher membrane phospholipid peroxidation and electrolyte leakage. Result of relative expression of *AtEXPB2* revealed that this transformed gene was being expressed in transgenic lines. Generally transgenic lines had better performance in comparison to wild type plant at most of traits that are related to stress conditions.

Keywords: *AtEXPB2*, Expansin, Cell wall extension, Gene expression, Transgenic lines,

* Corresponding author E-mail: rezabbasi@ut.ac.ir

مقدمه

دیواره یاخته‌ای نقش عمده‌ای در بسیاری از جنبه‌های رشدی و تکاملی گیاهان ایفا می‌کند، به‌ویژه نقش آن در رشد و توسعه یاخته‌ای موجب جلب توجه بسیاری از محققان شده است (McQueen-Mason & Rochange, 1999). دیواره یاخته‌ای باید به حدی مستحکم باشد تا بتواند نیروی مکانیکی ناشی از فشار یاخته‌ای را تحمل کند و درعین حال اجازه رشد و طولیل شدن غیرقابل برگشت را به یاخته بدهد (Marga et al., 2005). دیواره یاخته‌ای از راه ترکیب‌های ساختاری خود این توانایی را فراهم می‌آورد. رشد و تمایز یاخته‌های گیاهی به تغییرپذیری پیوسته دیواره یاخته‌ای یاخته‌ها مربوط می‌شود. اسیدی شدن دیواره یاخته‌ای معتبرترین علت توسعه‌پذیری سریع یاخته‌ها است. اسیدیته (pH) دیواره به‌طور معمول از طریق فعالیت پمپ H^+ -ATPase غشای یاخته‌ای که وظیفه انتقال پروتون‌ها را به دیواره یاخته‌ای بر عهده دارد، تعیین می‌شود. pH معمول دیواره یاخته‌ای حدود ۵/۵ است و در برخی شرایط به کمتر از ۴/۵ نیز می‌رسد (Rayle & Cleland, 1992). اصلی‌ترین گام‌ها برای توضیح این سازوکار کشف اکسپنسیون‌ها در سال ۱۹۹۲ بوده است، پروتئین‌هایی که طولیل و اسیدی شدن دیواره یاخته‌ای را وساطت می‌کنند (McQueen-Mason et al., 1992). اکسپنسیون‌ها پروتئین‌های سست‌کننده دیواره یاخته‌ای هستند که در فعالیت‌های مربوط به رشد و نمو یاخته‌ای مشارکت می‌کنند (Sampedro & Cosgrove, 2005). اکسپنسیون‌ها متعلق به یک خانواده بزرگ ژنی هستند که این ابرخانواده خود شامل چهار خانواده ژنی EXPB, EXPA, EXLA و EXLB است (Kende et al., 2004). فعالیت اکسپنسیون‌ها اغلب مربوط به یاخته‌های در حال رشد است (Lee et al., 2001). این ارتباط با انجام آزمایش‌هایی که در آن‌ها بیان ژن‌های اکسپنسیون در گیاهان تراریخت، دست ورزی شده‌اند، به اثبات رسیده است. در اغلب حالت‌ها، خاموشی ژن‌های اکسپنسیون منجر به جلوگیری از رشد می‌شود، درحالی‌که افزایش بیان آن‌ها باعث رشد سریع‌تر یا غیرعادی می‌شود (Choe & Cosgrove, 2010; Choi et al., 2003; Lee et al., 2003; Pien et al., 2001).

ساخت سازه pBI121:AtEXPB2 توسط Sinjali et al. (2013) انجام شد و این سازه توسط Dadashi (2013) به گیاه توتون منتقل شد. تأثیر کسپنسیون‌ها روی برخی از صفات گیاهان که بسیاری از آن‌ها در تحمل به تنش دخیل‌اند، تأیید شده است (Li et al., 2011, Sun et al., 2011). هدف از این آزمایش بررسی تأثیر ژن AtEXPB2 روی گیاهان توتون تراریخت شده با ژن AtEXPB2 از نظر برخی صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشدی

در این تحقیق از بذر گیاه توتون رقم تجاری سامسون استفاده شد. بذرهای گیاه غیر تراریخت به‌عنوان شاهد و سه رگه (لاین) تراریخت شده با ژن AtEXPB2 (Dadashi, 2013) کشت شدند. رگه‌های تراریخت مورد آزمایش شامل L3, L4 و L9 بودند. گیاهان نسل سوم تراریخت (T₃) استفاده شدند. تأیید تراریختی گیاهان در مرحله آغازین با استفاده از محیط کشت انتخابی انجام شد. بدین‌صورت که در آغاز بذر گیاهان تراریخت شده توسط Dadashi, 2013 و شاهد ضدعفونی و پس از آن در محیط کشت MS انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم کانامایسین کشت شدند. گیاهانی که سازه انتقالی داشته، توانستند کانامایسین محیط را تحمل کرده ولی گیاهان غیرتراریخت پس از دوبرگی شدن از بین رفتند. پس از گذشت یک ماه که گیاهان تراریخت در مرحله شش برگی بودند، به گلدان‌های کوچک حاوی پیت‌ماس و پرلیت در اتاقک رشد (دمای ۲۳ ± ۲ °C، ۶۰٪ رطوبت و ۱۶ ساعت روشنایی) و پس از چهار هفته به گلدان‌های بزرگ‌تر حاوی نسبت‌های یکسان خاک + ماسه + کود حیوانی و کوکوپیت به گلخانه گروه زراعت پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (دمای ۲۵ ± ۲ °C و ۱۶ ساعت روشنایی) منتقل شدند. برای هر تیمار آزمایشی هشت تکرار در نظر گرفته شد. همچنین به‌منظور تأیید تراریختی گیاهان از گیاهان نمونه‌گیری انجام شد. تراریختی رگه‌ها با استفاده از PCR تکثیرکننده بخشی از توالی ژن انتقالی، تأیید شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیشرو

(Chaparzadeh *et al.*, 2004). میزان پرولین تجمع یافته در گیاه با استفاده از طیفسنج نوری (اسپکتروفومتر) در طول موج ۵۲۰ نانومتر و با توجه به منحنی استاندارد به دست آمده از غلظت‌های مختلف پرولین محاسبه شد (Bates, *et al.*, 1973).

تهیه بافر استخراج و استخراج پروتئین کل

برای تهیه بافر در آغاز محلول ۰/۱ مولار تریس آماده شد و pH آن به ۷/۸ رسانده شد و ۲۰ میلی‌لیتر گلیسرول به آن اضافه شد. استخراج پروتئین کل شامل، آنزیم‌های پاداکسنده (آنتی‌اکسیدانت) و سنجش آن‌ها صورت گرفت. میزان پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش Bradford (1976) اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی

فعالیت آنزیم‌ها در دمای ۲۵ °C و با استفاده از دستگاه طیفسنج نوری اندازه‌گیری شدند. محلول‌های استفاده شده برای سنجش کاتالاز شامل ۳۰۰۰ μl بافر فسفات ۵۰ mM، ۱۰ μl H₂O₂ ۳۰ درصد و ۱۰۰ μl عصاره آنزیم بود. فعالیت آنزیم در طول موج ۲۴۰ nm خوانده و به صورت جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Pereira *et al.*, 2002). مواد لازم برای سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز شامل ۳۰۰۰ μl بافر فسفات ۵۰ mM، ۱۰ μl H₂O₂ ۳۰ درصد، ۳ μl محلول گایاکول ۲۰۰ mM و ۱۰۰ μl عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم در طول موج ۴۷۰ nm ثبت شد و بر پایه میزان جذب ترکیب نارنجی رنگ تتراگایاکول در دقیقه در میلی‌گرم غلظت پروتئین محاسبه شد (Chance & Maehly, 1955). نوع و میزان مواد لازم برای سنجش آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز شامل ۵۰ μl از پیروگالول ۱۰۰ mM، ۱۰۰ μl از بافر فسفات و ۱۰۰ μl عصاره آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم برحسب مقادیر اکسید شده پیروگالول در طول موج ۴۲۰ nm محاسبه و به صورت جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Kar & Mishra, 1976). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از راه اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید (NBT) در طول موج ۵۶۰ nm سنجیده شد. ۹۲۵ μl محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ mM، EDTA ۰/۱ mM، متیونین ۱۳ mM، ۷۵ μM

(-3'5'-CTAACTCCTTCGCGGTTTTGG) و پسر (ACACGTCGAGCTTCCACAC-3'5') انجام شد.

اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

محتوای آب نسبی

قطعه‌هایی از برگ به صورت تازه با استفاده از پنج جداسازی شدند. وزن برگ تازه محاسبه و نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر و در دمای اتاق رشد قرار داده شدند و آنگاه وزن آماس آن‌ها اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد قطعه‌های برگ در دمای ۷۰ °C به مدت ۲۴ ساعت خشک و وزن برگ‌های خشک اندازه‌گیری شد. محتوای آب نسبی برگ با استفاده از رابطه $100 \times (\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس}) / (\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس})$ (Schonfeld *et al.*, 1988).

نشت یونی (تراوایی غشا)

به منظور اندازه‌گیری نشت یونی، قطعه‌های برگ پنج شدند. قطعه‌های برگ درون ظرف‌های محتوای آب دیونیزه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ °C قرار داده شدند و میزان ضریب هدایت الکتریکی اول (EC₁) با استفاده از دستگاه هدایت الکتریکی سنج (EC) متر اندازه‌گیری شد. پس از قرار دادن نمونه‌ها در حمام بن ماری (۱۰۰ °C) به مدت ۳۰ دقیقه، ضریب هدایت الکترولیتی دوم (EC₂) اندازه‌گیری شد. نشت یونی (EL) با استفاده از رابطه $EL = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$ محاسبه شد (Lutts *et al.*, 1996).

سبزینه و کاروتنوئید

نمونه‌های برگ پودر شده، با استون ۸۶ درصد عصاره‌گیری شدند. سپس جذب نوری عصاره به دست آمده در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده و با استفاده از رابطه‌های مربوطه میزان سبزینه (کلروفیل) a، b و کاروتنوئید محاسبه شد (Arnon *et al.*, 1949).

پراکسیداسیون چربی‌های غشایی (مالون دی‌آلدهید)

و پرولین

میزان پراکسیداسیون چربی (لیپید)ها با تعیین میزان مالون‌دی‌آلدهید برگ‌ها با آزمون TBA و با استفاده از ضریب تصحیح $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ صورت گرفت

استفاده شد. نمونه‌ها بر پایه دستورکار شرکت سازنده کیت آماده‌سازی شدند. آغازگر (پرایمر)های مورد استفاده در جدول زیر آورده شده است (جدول ۱). برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. در این آزمایش بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Pfaffl, 2001). به این صورت که هر تیمار با گیاهان شاهد مقایسه شد. برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار REST استفاده شد (Pfaffl *et al.*, 2002).

NBT و $15 \mu\text{l}$ ریبولوپلاوین 0.12 mM و $50 \mu\text{l}$ عصاره آنزیم استخراج شده بود (Giannopolitis & Ries, 1977). استخراج RNA، ساخت cDNA و انجام روش qRT-PCR استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج Trizol و بر پایه دستورکار شرکت سازنده انجام شد. برای ساخت cDNA از روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد. برای انجام آزمایش qRT-PCR دستگاه iQ5 شرکت بایورد و کیت Eva Green 5X HOT FIREPol دارای رنگ فلورسنت

جدول ۱. توالی و ویژگی‌های آغازگرهای ژن اختصاصی و خانه‌دار

Table 1. Sequence and properties of specific and housekeeping gene primers

Gene	Protein	Sequence (5'-3')
<i>AtEXPB2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Expansin B2	F: CTAACTCCTTCGCGGTTTTGG R: ACACGTCGAGCTTCCACAC
<i>ACT</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> Actin	F: GCCACACTGTCCCAATTTATG R: CCTTCACATCCCTCACGATTC

با توجه به روش‌های معمول تراریختی که امروزه استفاده می‌شود، درج شمار خاصی از ژن در جایگاه مشخصی از ژنگان (ژنوم) گیاهان عالی، امکان‌پذیر نیست. بنابراین رگه‌های تراریخته شده گیاهی ممکن است از نظر شمار و آرایش و جایگاه قرارگیری ژن انتقالی با هم تفاوت داشته باشند (Schubert *et al.*, 2004). همچنین بر پایه تحقیقات تفاوتی که در میزان بیان گیاهان تراریخته شده با یک سازه مشاهده می‌شود، به جایگاه قرارگیری ژن انتقالی آن مربوط می‌شود (Day *et al.*, 1991; Peach and Velten, 2000). شمارش گیاهان تراریخت و تفرق آن‌ها در محیط کشت انتخابی حاوی پادزی (آنتی‌بیوتیک) می‌تواند ما را از شمار نسخه ژن انتقالی تا حدودی مطلع کند. در این آزمایش شمارش گیاهچه‌های تراریخت و تفرق یافته، نسبت ۱:۳ را نشان داد. در نتیجه به احتمال تنها یک نسخه از ژن در ژنگان هر رگه درج شده است. در واقع تفاوت در جایگاه قرارگیری ژن‌ها دلیل اصلی اختلاف میان رگه‌ها است. به بیان دیگر این ژن می‌تواند در جایگاهی قرار گیرد که در بالادست آن عامل‌های کاهنده بیان و افزایش‌دهنده‌ها و حتی پیش‌برنده‌های ژن‌های دیگری باشد و این ژن انتقالی تحت تأثیر این عامل‌ها، بیان آن تغییر کند و در رگه‌ها بروز متفاوتی داشته باشد. برخی از اکسپن‌سین‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی دخیل هستند. گروهی از محققان نیز بر این باورند که بیان اکسپن‌سین‌ها با تأثیر روی رشد و بسط یاخته‌ای، سبب ایجاد رفتار

تجزیه داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از آزمایش به کمک نرم‌افزارهای SAS 9.2 گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون LSD و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی مولکولی

تأیید تراریختی گیاهان توتون و بررسی بیان نسبی

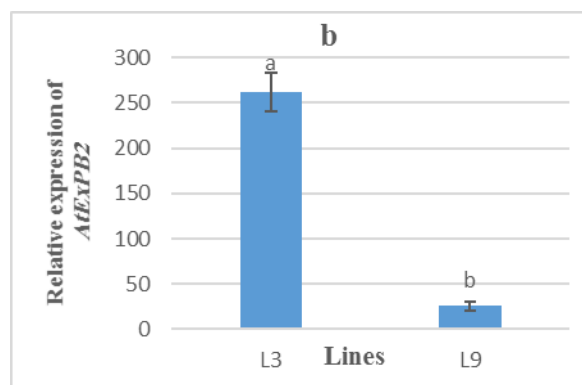
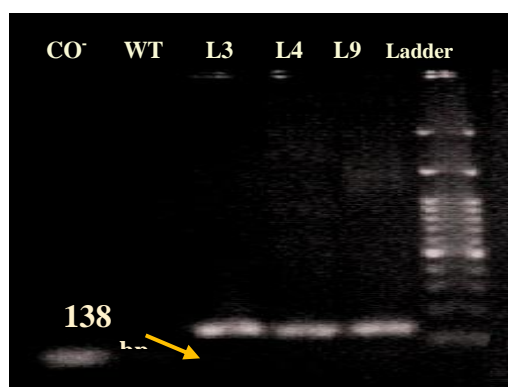
AtEXPB2 ژن

به جهت تأیید حضور ژن *AtEXPB2* در گیاهان توتون از این گیاهان استخراج DNA انجام گرفت و با استفاده از دو

آغازگر اختصاصی ژن انتقالی PCR انجام شد و محصولات آن روی ژل آگارز الکتروفورز مشاهده شد. محصولات آغازگر قطعه تکثیری ۱۳۸ جفت بازی در سمت چپ ژل دارد (شکل ۱- a). به منظور بررسی بیان ژن *AtEXPB2* دو رگه L3 و L9 که نتایج بهتری را در آزمایش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نشان دادند، استفاده شدند. نتایج بیان نسبی ژن در دو رگه نشان داده، در گیاهان ژن انتقالی بیان می‌شود. بیان این ژن در رگه L3 به میزان ۲۶۰ برابر و در رگه L9 به میزان ۲۵ برابر گیاه شاهد بود (شکل ۱- b).

نسبت به شاهد می‌تواند تأثیر سودمندی بر رشد یاخته‌ای در شرایط تنش‌ی داشته باشد. میزان بیان ژن انتقالی اکسپنسنین در این دو رگه در مقایسه با یکدیگر متفاوت بوده است. تفاوت در بیان ژن انتقالی را می‌توان در برخی از صفات اندازه‌گیری شده مشاهده کرد. در واقع این تفاوت به پایه ژنتیکی این دو رگه ترا ریخت مربوط می‌شود که از آن جمله می‌توان به تأثیر جایگاه قرارگیری ژن انتقالی اشاره کرد.

سازگارکننده در گیاهان تحت تنش می‌شود. تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از بیان ژن تأثیر تنش شوری در افزایش بیان ژن *TaEXPB23* را اثبات کرد، تشدید بیان این ژن در گیاه توتون سبب تحمل به تنش شوری می‌شود که این فرایند از طریق توانایی نگهداری آب و کاهش پتانسیل اسمزی صورت می‌گیرد (Yang Han *et al.*, 2012). تنش‌های محیطی موجب کاهش رشد یاخته‌ها می‌شود، افزایش بیان ژن اکسپنسنین انتقالی در گیاهان ترا ریخت



شکل ۱. تأیید گیاهان ترا ریخت و بررسی بیان نسبی *AtEXPB2* (a) تأیید رگه‌های مورد آزمایش با استفاده از آغازگر اختصاصی طراحی شده برای ژن *AtEXPB2* انجام گرفت. آغازگر قطعه‌های ۱۳۸ جفت بازی را تکثیر کرد. Ladder مورد استفاده قطعه‌های ۱۰۰ bp داشته است. (b) میزان بیان نسبی ژن *AtEXPB2*.

Figure 1. Confirmation of transgenic plants and relative expression of *AtEXPB2*. (A) Confirmation of transgenic lines were done by specific primers for *AtEXPB2* gene. Primer amplified 138 bp fragments. Ladder that was used had 100 bp fragments. (B) Relative expression of *AtEXPB2* gene.

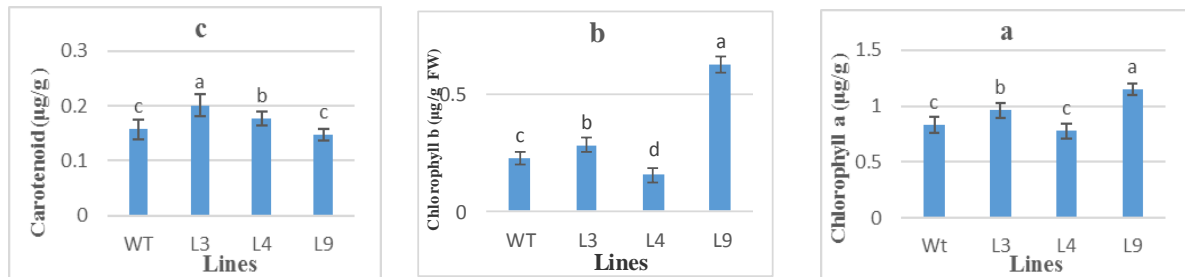
گیاهان علف تال (آرابیدوپسیس) ترا ریخت شده با ژن *RhEXPA4* در شرایط تنش شوری و عادی (نرمال) میزان سبزینه بیشتری از گیاهان شاهد داشتند (Lu *et al.*, 2013). همچنین گیاهان علف تال جهش یافته (موتانت) *atexpb2* در شرایط تنش اکسایشی (اکسیداتیو) میزان سبزینه کمتری از گیاهان شاهد داشتند. گیاهان توتون ترا ریخت *TaEXPB23* در شرایط تنش اکسایشی میزان بالاتری از سبزینه را نسبت به گیاهان غیر ترا ریخت در خود نگهداری کرده‌اند (Han *et al.*, 2015). از آنجایی که توالی اسید آمینه‌ای پروتئین *AtEXPB2* ۴۲ درصد با توالی اسید آمینه‌ای *TaEXPB23* همانندی دارد، می‌توان عملکرد یکسانی را از این دو پروتئین انتظار داشت. رگه‌های ترا ریخت توتون مورد آزمایش افزون بر اکسپنسنین درونی خود، اکسپنسنین‌های ژن *AtEXPB2* را نیز دریافت کرده‌اند،

محتوای سبزینه و کاروتنوئید

رگه‌های ترا ریخت L3 و L9 میزان سبزینه a و b بیشتری از گیاه شاهد داشتند اما میزان سبزینه a در رگه L4 همانند و سبزینه b کمتر از شاهد بوده است (شکل ۲- a و b). میزان کاروتنوئید در رگه‌های L3 و L4 بیشتر از رگه شاهد بوده است ولی میزان کاروتنوئید در رگه L9 همانند شاهد بوده است (شکل ۲- c). به طور کلی رگه‌های ترا ریخت میزان رنگ‌دانه‌های نورساختی (فتوسنتزی) بیشتری داشتند. میزان سبزینه برگ به عنوان شاخصی برای بیان قدرت و توانایی نورساخت گیاهان است (Jiang *et al.*, 2007). کاروتنوئیدها به عنوان سرکوب‌کننده‌های اکسیژن‌های تکی شناخته می‌شوند بنابراین میزان آن در یک رقم (واریته)، نشان‌دهنده تحمل آن رقم است (Sairam *et al.*, 2002).

از جمله کلروپلاست‌های حاوی رنگدانه‌های نورساختی است. در نتیجه تکثیر یاخته‌ها، تراکم یاخته‌ای در واحد حجم افزایش یافته و میزان سبزینه در گیاهان تراریخت بیشتر می‌شود.

بنابراین می‌توانیم بگوییم که میزان اکسپنشن در این گیاهان بیشتر از شاهد است. بدین ترتیب رشد و تقسیم یاخته‌ای در رگه‌های تراریخت بیشتر از گیاه شاهد است. رشد و تقسیم یاخته‌ها همراه با تکثیر اندامک‌های یاخته‌ای



شکل ۲. میزان رنگدانه‌های نورساختی در گیاهان. (a) سبزینه a (b) سبزینه b (c) کاروتنوئید گیاهان مورد بررسی شامل شاهد، رگه تراریخت L3، L4 و L9 بوده‌اند.

Figure 2. Measure of photosynthetic pigments in plants. (a) Chlorophyll a (b) Chlorophyll b (c) Carotenoid Studied plants were consist of control ,L3, L4 and L9.

از آنجایی که گیاهان تراریخت مورد آزمایش با ژن *AtEXPB2* تراریخت شده بودند، می‌توان گفت که پروتئین‌های کدکننده این ژن تا حدودی سبب انعطاف‌پذیرتر شدن دیواره یاخته‌ای می‌شوند که رشد بیشتر دیواره یاخته‌ای را در پی دارد.

همچنین بیان این ژن در یاخته‌های ریشه موجب افزایش میزان ریشه‌های موپین گشته است. در نتیجه این گیاهان توانایی بیشتری در جذب آب دارند. بنابراین گیاهان تراریخت آب بیشتری جذب کرده و محتوای آب نسبی خود را نسبت به گیاه غیرتراریخت افزایش می‌دهند. انتظار می‌رود این گیاهان تراریخت در شرایط تنش‌های محدودکننده رطوبت همانند تنش خشکی و شوری میزان محتوای آب نسبی خود را نسبت به شاهد در میزان بالاتری حفظ کنند. نتایج اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید نشان داد، میزان پراکسیداسیون غشای گیاه شاهد بیشتر از رگه‌های تراریخت بوده است. میزان مالون دی‌آلدهید رگه‌های L4 و L3 نیز کمتر از رگه L9 بوده است (شکل ۳- b). نتایج آزمایش‌های نشت یونی نیز نتایج آزمایش‌های مربوط به مالون دی‌آلدهید را تأیید می‌کند، بدین‌صورت که رگه شاهد میزان پراکسیداسیون چربی‌های آن بیشتر بوده است و در نتیجه میزان نشت یونی نیز در آن بیشتر از دیگر گیاهان بوده است. میزان نشت یونی رگه L9 کمی از دو رگه L4 و L3 بیشتر بوده است اما این اختلاف معنی‌دار

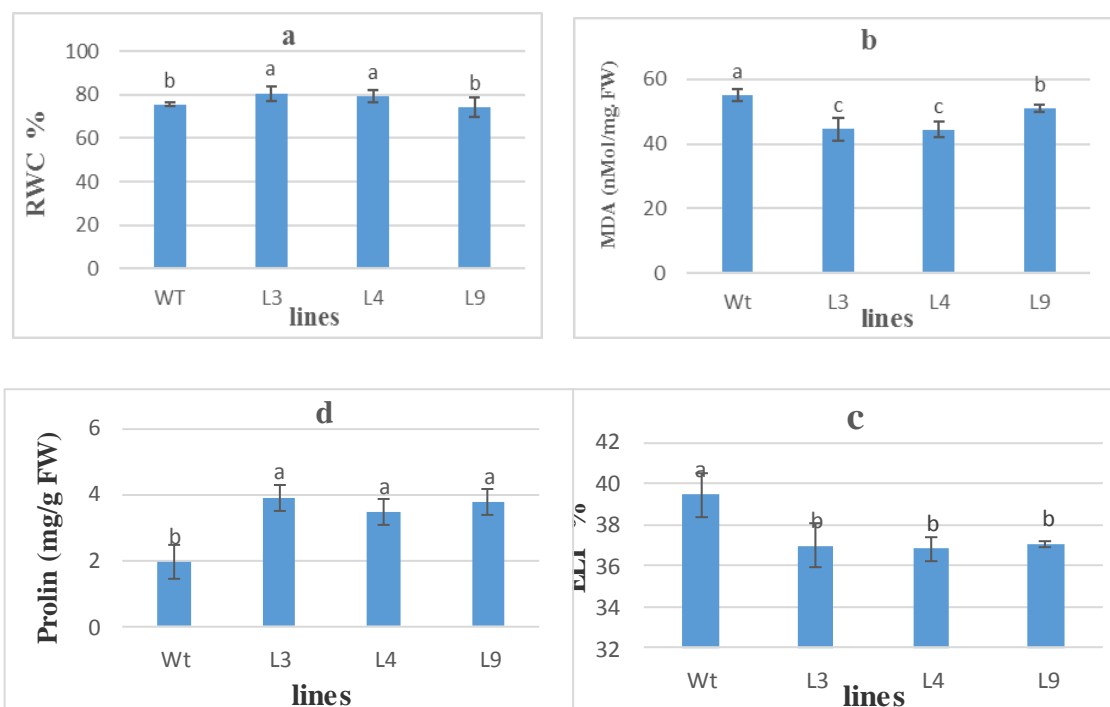
محتوای آب نسبی، نشت یونی، مالون دی‌آلدهید و پرولین

نتایج نشان داد، در شرایط نرمال رگه‌های L3 و L4 توانسته‌اند محتوای آب نسبی بیشتری از رگه شاهد داشته باشند (شکل ۳- a) اما در رگه L9 تفاوتی با گیاه شاهد مشاهده نشده است.

گزارش شده است که گیاهان متحمل به تنش خشکی با جذب آب از پروتوپلاست، آب بیشتری را در خود نگه می‌دارند، بنابراین RWC بالاتری دارند (Silva et al., 2007). گیاهان توتون تراریخت *P10::TaEXPB23* در شرایط تنش خشکی میزان محتوای آب نسبی بالاتری نسبت به گیاهان شاهد داشتند (Li et al., 2015). گیاهان توتون تراریخت *TaEXPB23* دارای راه‌انداز RD29A (القاشونده در شرایط تنش) در مقایسه با گیاهان شاهد در شرایط تنش خشکی محتوای آب نسبی بالاتری داشتند (Li et al., 2013). گیاهان علف تال تراریخت شده با ژن *RhEXPA4* در شرایط تنش خشکی به‌طور شایان توجهی میزان RWC بالاتری نسبت به گیاهان شاهد داشتند (Lu et al., 2013). سرعت رشد یاخته‌ای به عامل‌های مختلفی از جمله انعطاف‌پذیری یاخته‌ای و در شرایط آماس (تورژانس) به میزان فشار آستانه بستگی دارد. انعطاف‌پذیری و فشار آستانه دو ویژگی مهم دیواره یاخته‌ای به شمار می‌آیند (Pessaraki, 1999).

به‌عنوان رقم‌های متحمل به تنش شوری به شمار می‌آیند. در واقع میزان آسیب‌های غشایی به‌صورت غیرمستقیم با اندازه‌گیری نشت یونی در رقم‌ها محاسبه می‌شود (Sudhakar *et al.*, 2001). همچنین تجمع مالون‌دی‌آلدهید شاخص خوبی از شدت آسیب‌های یاخته‌ای است (Gechev *et al.*, 2002).

نشسته الکترولیتی (شکل ۳- c). نشت الکترولیتی به‌عنوان فراسنجه‌ای (پارامتری) برای شناسایی رقم‌های زراعی متحمل به تنش در بسیاری از گیاهان زراعی پیشنهاد شده است (Stevanovic *et al.*, 1997). کمتر بودن میزان نشت الکترولیتی به معنی انسجام بیشتر غشای یاخته‌ای در شرایط تنش است و رقم‌های دارای نشت یونی کمتر



شکل ۳. میزان برخی از صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده. (a) محتوای آب نسبی (b) مالون‌دی‌آلدهید (c) نشت یونی (d) پرولین گیاهان مورد بررسی شامل شاهد، رگه‌های تراریخت L3، L4 و L9 بوده‌اند.

Figure 3- Measure of some physiologic traits. (a) relative water content (b) Malondialdehyde (c) Electolyte leakage Index (d) Proline. Studied plants were consist of control , L3, L4 and L9.

افزایش یافته و تحمل به تنش بیشتر از گیاهان شاهد بود. میزان نشت الکترولیتی در گیاهان تراریخت کمتر از گیاهان شاهد بود (Li *et al.*, 2013). همچنین بررسی روی گیاهان علف تال تراریخت‌شده با ژن *RhEXPA4* نشان داد، در شرایط تنش شوری و خشکی، میزان MDA در گیاهان تراریخت کمتر از گیاهان شاهد غیرتراریخت بوده است (Lu *et al.*, 2013). همچنین در شرایط تنش اکسایشی میزان MDA در گیاهان توتون افزایش بیان شده با ژن *TaEXPB23*، کمتر از گیاهان شاهد بود (Han *et al.*, 2015). افزایش بیان اکسپنسیون‌ها می‌تواند سبب

اکسپنسیون‌ها پروتئین‌های دیواره یاخته‌ای هستند و موجب القای توسعه دیواره یاخته‌ای در شرایط درون شیشه‌ای و همچنین توسعه یاخته‌ها در شرایط برون شیشه‌ای می‌شوند (Sampedro & Cosgrove, 2005). در مقابل تنش‌هایی همانند تنش خشکی و شوری سبب افزایش سختی دیواره یاخته‌ای شده و سرانجام موجب آسیب به دیواره یاخته‌ای می‌شود (Le Gall *et al.*, 2015). نتایج آزمایش‌ها روی گیاهان توتون تراریخت‌شده *TaEXPB23* با راه‌انداز القاشونده در شرایط تنشی نشان داد، در گیاهان تراریخت دیواره یاخته‌ای انعطاف‌پذیری

آنزیم‌های پاداکسنده

نتایج بررسی آنزیم‌های پاداکسندگی در گیاه نشان می‌دهد که میزان آنزیم کاتالاز در رگه‌های تراریخت بیشتر از شاهد بوده است و رگه L4 بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را از خود نشان داده است و L9 در مرتبه بعدی قرار گرفته است (شکل ۴-۴a). نتایج فعالیت آنزیم گلوکاتایون پروکسیداز نیز نشان می‌دهد، رگه‌های تراریخت بهتر از شاهد عمل کرده‌اند بدین صورت که رگه L3 دارای بیشترین فعالیت آنزیمی و رگه L4 و L9 در جایگاه بعدی قرار گرفته‌اند (شکل ۴-۴b). در رابطه با آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز رگه‌های تراریخت عملکرد بهتری از رگه شاهد داشتند. در رگه L4 بیشترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده شده است و رگه‌های تراریخت L3 و L9 از نظر فعالیت آنزیمی پس از رگه L4 قرار گرفته‌اند (شکل ۴-۴c). میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در رگه‌های تراریخت بیشتر از گیاه شاهد بوده است (شکل ۴-۴d).

بر پایه نتایج بررسی‌های انجام‌شده، گیاهان دارای فعالیت پاداکسندگی بالا تحمل بیشتری در برابر تنش‌های اکسایشی از خود نشان می‌دهند (Boo & Jung, 1999). تجمع القاشده ROS تحت تأثیر تنش‌های متنوع محیطی باعث فعالیت ترکیبی آنزیم‌های پاداکسندگی گوناگون می‌شود. (Dat et al, 1998). آنزیم SOD رادیکال آزاد اکسیژن را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کند که نخستین واکنش در سمیت زدایی ROSها است. در گام بعدی، پراکسید هیدروژن تولیدشده توسط آنزیم کاتالاز و چندین پراکسیداز دیگر حذف می‌شود (DaCosta & Huang, 2007). بر پایه گزارش نتایج برخی بررسی‌ها، کاهش فعالیت آنزیم CAT به تجمع بالای پراکسید هیدروژن مربوط است (Du & Klessig, 1997). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز یک صفت سازگارکننده است و آنزیم با کاهش سطح سمیت هیدروژن پراکسید تولیدشونده در سوخت‌وساز (متابولیسم) یاخته‌ای موجب چیرگی بر اثرگذاری‌های زیانبار تنش می‌شود (Rasheed & Mukherji, 1991).

در توتون‌های تراریخت P10::TaEXPB23 در شرایط تنش خشکی و همچنین شرایط بدون تنش، میزان فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون پروکسیداز و کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز نسبت به گیاهان شاهد فعالیت بیشتری داشتند

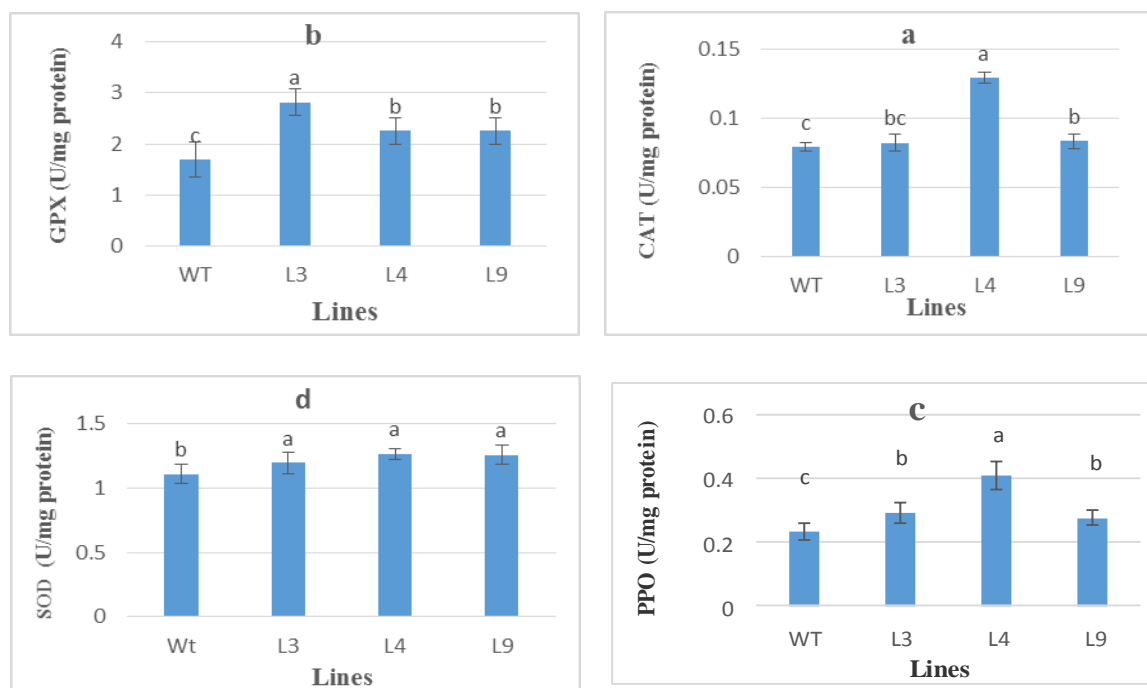
انعطاف‌پذیری بیشتر دیواره یاخته‌ای شده و در نتیجه از آسیب‌های ناشی از تنش بر ساختمان دیواره یاخته‌ای جلوگیری کند (Li et al., 2011). بنابراین می‌توان گفت که در رگه‌های تراریخت به دلیل افزایش انعطاف‌پذیری دیواره یاخته‌ای، از آسیب به دیواره یاخته‌ای کاسته شده است و در نتیجه نشت یونی و پراکسیداسیون غشای یاخته‌ای در مقایسه با گیاه غیر تراریخت کاهش یافته است.

نتایج آزمایش‌های اندازه‌گیری پرولین نشان می‌دهد، در رگه‌های تراریخت میزان پرولین بیشتر از گیاه شاهد بود (شکل ۳-۴d). تجمع پرولین در شرایط تنش در بسیاری از گونه‌های گیاهی با تحمل به تنش همبستگی دارد بدین صورت که در گیاهان متحمل تجمع آن بالاتر از گیاهان حساس است. نقش پرولین در فرایندهای رشدونموی نیازمند به انرژی مانند تولید سازی لوله‌گرده و نواحی تولید شونده ریشه ذرت در شرایط تنش ثابت شده است (Trovalo et al., 2008). همچنین همبستگی مثبتی میان پرولین و تولید سازی یاخته‌ای موجود است و این ارتباط را می‌توان با پروتئین‌سازی مرتبط دانست. زیرا پروتئین‌های اجزای ساختاری دیواره یاخته‌ای بر اساس منابع پرولین موجود، می‌توانند نقشی کلیدی در بسط و تقسیم یاخته‌ای ایفا کنند (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000).

بنابراین افزایش میزان پرولین می‌تواند روی ساخت (سنتز) این گونه پروتئین‌ها اثر بگذارد و در نتیجه موجب حفظ فرایندهای فیزیولوژیکی مرتبط با تولید سازی یاخته‌ای از جمله بذردهی و رشد لوله‌گرده شود (Nanjo et al., 1999). بنابراین تجمع پرولین در رگه‌های تراریخت مورد آزمایش می‌تواند به دلیل دیواره یاخته‌ای قابل انعطاف‌تر (به دلیل حضور اکسپنسنین‌های انتقالی) باشد از آنجایی که گیاهان تراریخت مورد بررسی افزون بر اکسپنسنین درونی خود اکسپنسنین انتقالی نیز دارند، پس می‌توانند رشد و بسط یاخته‌ای بهتری را از خود نشان دهند. پرولین تجمع یافته می‌تواند روی تولید سازی یاخته‌ها و ساخت پروتئین‌های ساختاری اثر بگذارد. انتظار می‌رود که در این حالت یاخته‌ها ساختار خود را بهتر حفظ کنند و گیاه بهتر می‌تواند شرایط تنشی را تحمل کند و همچنین پس از تنش بازیابی مناسب‌تر و سریع‌تری خواهند داشت.

رگه‌های تراریخت نسبت به شاهد کاهش یافته است. به بیان دیگر به نظر می‌رسد که رگه‌های تراریخت میزان H_2O_2 و یون سوپراکسید کمتری از گیاهان شاهد دارند و بنابراین افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد مشاهده شده است.

(Li et al., 2015). پس می‌توان گفت که رگه‌های تراریخت از نظر آنزیمی در مقایسه با گیاه شاهد بهتر عمل کرده‌اند. به احتمال افزایش انعطاف‌پذیری دیواره یاخته‌ای به دلیل حضور اکسپنسنین انتقالی سبب کاهش آسیب به غشای یاخته‌ای شده و در نتیجه اثرگذاری‌های سوء آن، در



شکل ۴. میزان آنزیم‌های پاداکسنده در گیاهان. (a) کاتالاز (b) گلووتاتیون پروکسیداز (c) پلی‌فنل اکسیداز (d) سوپراکسید دیسموتاز گیاهان مورد بررسی شامل شاهد، رگه‌های تراریخت L3، L4 و L9 بوده‌اند.

Figure 4. Measure of antioxidant enzymes in plants. (a) Catalase (b) Glutathione peroxidase (c) Polyphenol oxidase (d) Superoxide dismutase. Studied plants were consist of control, L3, L4 and L9.

نشان داده است. از آنجایی که صفات مورد بررسی در این تحقیق در شرایط تنشی بسیار اهمیت دارد و گیاهان تراریخت شده از نظر بیشتر این صفات نسبت به گیاه شاهد برتری داشته‌اند بنابراین به نظر می‌رسد که این گیاهان در شرایط تنش نیز می‌توانند برتری خود را حفظ کنند. زیرا در شرایط تنش رشد و توسعه یاخته‌ای محدود شده و گیاهان تراریخت به دلیل داشتن اکسپنسنین خارجی می‌توانند رشد و توسعه بیشتری نسبت به گیاه شاهد داشته باشند.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی گیاهان تراریخت شده با ژن *AtEXPB2* برتری این گیاهان را از نظر برخی صفات اندازه‌گیری شده، نسبت به گیاه غیرتراریخت ثابت کرده است. گیاهان تراریخت محتوای آب نسبی، رنگدانه‌های نورساختی، پرولین، فعالیت‌های آنزیم‌های پاداکسنده بالاتری از گیاهان شاهد داشته‌اند. میزان نشت الکترولیتی و مالون دی‌آلدهید در رگه شاهد بیشتر از تراریخت بود که نشان‌دهنده افزایش پایداری غشای یاخته‌ای در رگه‌های تراریخت است. بررسی بیان ژن *AtEXPB2* بیان این ژن را در گیاهان تراریخت

REFERENCES

1. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15.

2. Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
3. Boo, Y. C. & Jung, J. (1999). Water Deficit—Induced Oxidative Stress and Antioxidative Defenses in Rice Plants. *Journal of Plant Physiology*, 155(2), 255-261.
4. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
5. Chance, B. & Mahely, A. C. (1955). Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764-775.
6. Chaparzadeh, N., D'Amico, M. L., Khavari-Nejad, R. A., Izzo, R. & Navari-Izzo, F. (2004). Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(9), 695-701.
7. Choe, H. T. & Cosgrove, D. J. (2010). Expansins as agents in hormone action. In *Plant Hormones* (pp. 262-281). Springer Netherlands.
8. Choi, D., Lee, Y., Cho, H. T. & Kende, H. (2003). Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. *The Plant Cell*, 15(6), 1386-1398.
9. Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407, 321-326.
10. DaCosta, M. & Huang, B. (2007). Changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation for bentgrass species in response to drought stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(3), 319-326.
11. Dadashi, D. (2013). Transfer of *AtEXPB2* gene into *Nicotiana tabacum*. M.S. Thesis. Faculty of Agronomy and Plant Breeding Tehran University. Iran.
12. Dat, J. F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H. & Scott, I. M. (1998). Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 116(4), 1351-1357.
13. Day, C. D., Lee, E., Kobayashi, J., Holappa, L. D., Albert, H. & Ow, D. W. (2000). Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes & development*, 14(22), 2869-2880.
14. Du, H., & Klessig, D. F. (1997). Identification of a soluble, high-affinity salicylic acid-binding protein in tobacco. *Plant Physiology*, 113(4), 1319-1327.
15. Gechev, T. S., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., & Minkov, I. (2002). Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(4), 708-714.
16. Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2), 309-314.
17. Han, Y., Chen, Y., Yin, S., Zhang, M. & Wang, W. (2015). Over-expression of *TaEXPB23*, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, 173, 62-71.
18. Jiang, H. M., Yang, J. C. & Zhang, J. F. (2007). Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress. *Environmental Pollution*, 147(3), 750-756.
19. Kar, M. & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant physiology*, 57(2), 315-319.
20. Kende, H., Bradford, K., Brummell, D., Cho, H. T., Cosgrove, D., Fleming, A. & Voesenek, L. (2004). Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Molecular Biology*, 55(3), 311-314.
21. Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4(1), 112-166.
22. Lee, D. K., Ahn, J. H., Song, S. K., Do Choi, Y. & Lee, J. S. (2003). Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiology*, 131(3), 985-997.
23. Lee, Y., Choi, D., & Kende, H. (2001). Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(6), 527-532.
24. Li, F., Han, Y., Feng, Y., Xing, S., Zhao, M., Chen, Y. & Wang, W. (2013). Expression of wheat expansin driven by the RD29 promoter in tobacco confers water-stress tolerance without impacting growth and development. *Journal of Biotechnology*, 163(3), 281-291.
25. Li, F., Xing, S., Guo, Q., Zhao, M., Zhang, J., Gao, Q. & Wang, W. (2011). Drought tolerance through over-expression of the expansin gene *TaEXPB23* in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 168(9), 960-966.
26. Lü, P., Kang, M., Jiang, X., Dai, F., Gao, J. & Zhang, C. (2013). *RhEXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to Arabidopsis. *Planta*, 237(6), 1547-1559.
27. Lutts, S., Kinet, J. M. & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398.

28. Majewska-Sawka, A. & Nothnagel, E. A. (2000). The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology*, 122(1), 3-10.
29. Marga, F., Grandbois, M., Cosgrove, D. J. & Baskin, T. I. (2005). Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *The Plant Journal*, 43(2), 181-190.
30. McQueen-Mason, S. J. & Rochage, F. (1999). Expansins in plant growth and development: an update on an emerging topic. *Plant Biology*, 1(1), 19-25.
31. McQueen-Mason, S., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 4(11), 1425-1433.
32. Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshihara, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H. & Shinozaki, K. (1999). Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 18(2), 185-193.
33. Peach, C. & Velten, J. (1991). Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant molecular biology*, 17(1), 49-60.
34. Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G., Lea, P. J. & Azevedo, R. A. (2002). Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant and Soil*, 239(1), 123-132.
35. Pessarakli, M., & Szabolcs, I. (1999). Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. *Handbook of plant and crop stress*, 2.
36. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45-45.
37. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 36-36.
38. Pien, S., Wyrzykowska, J., McQueen-Mason, S., Smart, C. & Fleming, A. (2001). Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11812-11817.
39. Rasheed, P. & Mukherji, S. (1991). Changes in catalase and ascorbic acid oxidase activities in response to lead nitrate treatments in mungbean. *Indian Journal of Plant Physiology* (India).
40. Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant physiology*, 99(4), 1271-1274.
41. Sairam, R. K., Rao, K. V. & Srivastava, G. C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163(5), 1037-1046.
42. Sampedro, J. & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6(12), 242.
43. Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carver, B. F. & Mornhinweg, D. W. (1988). Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*, 28(3), 526-531.
44. Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S. & Schmidt, R. (2004). Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *The Plant Cell*, 16(10), 2561-2572.
45. Silva, M. D. A., Jifon, J. L., Da Silva, J. A. & Sharma, V. (2007). Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(3), 193-201.
46. Sinjali, B., Abbasi, A. R., Talei, A. R., Sarvestani, A., Dadashi, D. (2013). pBI:AtEXPB Construction and transformation to *Arabidopsis thaliana*. *Iranian Journal of Crop Science*, 22(2), 191-197. (In Farsi)
47. Stevanović, B., Šinžar, J. & Glišić, O. (1997). Electrolyte leakage differences between poikilohydrous and homoiohydrous species of Gesneriaceae. *Biologia Plantarum*, 40(2), 299-303.
48. Sudhakar, C., Lakshmi, A. & Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161(3), 613-619.
49. Sun, T., Zhang, Y. & Chai, T. (2011). Cloning, characterization, and expression of the *BjEXPA1* gene and its promoter region from *Brassica juncea* L. *Plant Growth Regulation*, 64(1), 39-51.
50. Trovato, M., Mattioli, R. & Costantino, P. (2008). Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei*, 19(4), 325-346.
51. Yang Han, Y., xiu Li, A., Li, F., rong Zhao, M. & Wang, W. (2012). Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, *TaEXPB23*, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54, 49-58.