Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 50, No 1, Spring 2018 (47-57)
DOI: 10.22059/ijfcs.2018.141913.654034

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۸ (ص۵۷-۴۷)

# 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 و۳. دانشجویان دوره کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

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

۴. 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 تراریخت‌شده 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 پاداکسندهٔ (آنتی‌اکسیدانی) کاتالاز، گلوتاتیون پروکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز عملکرد بهتری را نسبت به شاهد نشان دادند. همچنین رگه‌های تراریخت از نظر میزان رنگدانه‌های نورساختی (فتوسنتزی) 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 نسبی ژن *AtEXPB2*، بیان این ژن را در گیاهان تراریخت ثابت کرده است. به‌صورت کلی گیاهان تراریخت در بیشتر صفات اندازه‌گیری‌شده 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 Chalekaei[1], Alireza Abbasi[2*], Sedigheh Yousefi[3] and Davood Dadashi[4]**

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, l4, l9 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

دیوارهٔ یاخته‌ای نقش عمده‌ای در بسیاری از جنبه‌های رشدی و تکاملی گیاهان ایفا می‌کند، به‌ویژه نقش آن در رشد و توسعهٔ یاخته‌ای موجب جلب توجه بسیاری از محققان شده است (McQueen-Mason & Rochange, 1999). دیوارهٔ یاخته‌ای باید به حدی مستحکم باشد تا بتواند نیروی مکانیکی ناشی از فشار یاخته‌ای را تحمل کند و درعین‌حال اجازهٔ رشد و طویل شدن غیرقابل‌برگشت را به یاخته بدهد (Marga *et al*., 2005). دیوارهٔ یاخته‌ای از راه ترکیب‌های ساختاری خود این توانایی را فراهم می‌آورد. رشد و تمایز یاخته‌های گیاهی به تغییرپذیری پیوستهٔ دیوارهٔ یاخته‌ای یاخته‌ها مربوط می‌شود. اسیدی شدن دیوارهٔ یاخته‌ای معتبرترین علت توسعه‌پذیری سریع یاخته‌ها است. اسیدیتهٔ (pH) دیواره به‌طورمعمول از طریق فعالیت پمپ $H^+$-ATPase غشای یاخته‌ای که وظیفهٔ انتقال پروتون‌ها را به دیوارهٔ یاخته‌ای بر عهده دارد، تعیین می‌شود. pH معمول دیوارهٔ 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 اکسپنسین‌ها در سال۱۹۹۲ بوده است، پروتئین‌هایی که طویل و اسیدی شدن دیوارهٔ یاخته‌ای را وساطت می‌کنند (McQueen-Mason *et al*., 1992). ا

اکسپنسین‌ها پروتئین‌های سست‌کنندهٔ دیوارهٔ یاخته‌ای هستند که در فعالیت‌های مربوط به رشد و نمو یاخته‌ای مشارکت می‌کنند (Sampedro & Cosgrove, 2005). اکپنسین‌ها متعلق به یک خانوادهٔ بزرگ ژنی هستند که این ابرخانواده خود شامل چهار خانوادهٔ ژنی EXPA، EXPB، EXLAو EXLB است (Kende *et al*., 2004).

فعالیت اکسپنسین‌ها اغلب مربوط به یاخته‌های در حال رشد است (Lee *et al*., 2001). این ارتباط با انجام آزمایش‌هایی که در آن‌ها بیان ژن‌های اکسپنسین در گیاهان تراریخت، دست ورزی شده‌اند، به اثبات رسیده است. در اغلب حالت‌ها، خاموشی ژن‌های اکسپنسین منجر به جلوگیری از رشد می‌شود، درحالی‌که افزایش بیان آن‌ها باعث رشد سریع‌تر یا غیرعادی می‌شود (Choe & Cosgrove, 2010Choi *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 کسپنسین‌ها روی برخی از صفات گیاهان که بسیاری از آن‌ها در تحمل به تنش دخیل‌اند، تائید شده است (Li *et al*., 2011, Sun *et al*., 2011). هدف از این آزمایش بررسی تأثیر ژن *AtEXPB2*، روی گیاهان توتون تراریخت‌شده 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 رگهٔ (لاین) تراریخت‌شده با ژن *AtEXPB2* (Dadashi, 2013) کشت شدند. رگه‌های تراریخت مورد آزمایش شامل L3، L4 و L9 بودند. گیاهان نسل سوم تراریخت ($T_3$) استفاده شدند. تائید تراریختی گیاهان در مرحلهٔ آغازین با استفاده از محیط کشت انتخابی انجام شد. بدین‌صورت که در آغاز بذر گیاهان تراریخت‌شده توسط Dadashi, 2013 و شاهد ضدعفونی و پس از آن در محیط کشت MS انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم کانامایسین کشت شدند. گیاهانی که سازهٔ 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 مرحلهٔ شش برگی بودند، به گلدان‌های کوچک حاوی پیت‌ماس و پرلیت در اتاقک رشد (دمای ۲۳ ±۲ ℃، ۶۰٪ رطوبت و ۱۶ساعت روشنایی) و پس از چهار هفته به گلدان‌های بزرگ‌تر حاوی نسبت‌های یکسان خاک+ ماسه+ کود حیوانی و کوکوپیت به گلخانهٔ گروه زراعت پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (دمای ۲۵ ±۲ ℃ و ۱۶ساعت 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 تکثیرکنندهٔ بخشی از توالی ژن انتقالی، تأیید شد. واکنش PCRبا استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیشرو