

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

مریم چاله‌کائی<sup>۱</sup>، علیرضا عباسی<sup>۲\*</sup>، صدیقه یوسفی<sup>۳</sup> و داوودداداشی<sup>۴</sup>

۱ و ۳. 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 دیواره یاخته‌ای هستند که به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی رشد و توسعه یاخته‌ای در طول رشد و نمو گیاهان شناخته می‌شوند. فعالیت اکسپنسین‌ها وابسته به pH است. در این بررسی گیاهان تاریخ‌خواسته با ژن *AtEXPB2* از نظر برخی صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیابی و مولکولی در سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴ آزمایش شدند. گیاهان مورد بررسی شامل رگه (لاین)‌های تاریخ‌خواست L3، L4 و L9 به همراه گیاه شاهد بوده‌اند. پس از کشت بذر در محیط کشت انتخابی MS گیاه‌چه‌های تاریخ‌خواست در خاک کشت و به گلخانه منتقل شدند. گیاهان تاریخ‌خواست از نظر فعالیت آنزیم‌های پاداکسیدن (آنتی‌اکسیدانی) کاتالاز، گلوتاتیون پروکسیداز، پلی‌فلن اکسیداز عملکرد بهتری را نسبت به شاهد نشان دادند. همچنین رگه‌های تاریخ‌خواست از نظر میزان رنگدانه‌های نورساختی (فتوستزی) و پرولین نیز بر گیاه شاهد برتری داشتند. در گیاه شاهد میزان نشت یونی و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشایی بیشتر از رگه‌های تاریخ‌خواست بود. نتایج بیان این ژن را در گیاهان تاریخ‌خواست ثابت کرده است. به صورت کلی گیاهان تاریخ‌خواست در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده که بسیاری از آن‌ها مرتبط با تحمل گیاه در شرایط تنفسی هستند، عملکرد بهتری از خود نشان دادند.

**واژه‌های کلیدی:** اکسپنسین، بسط دیواره یاخته‌ای، بیان ژن، رگه‌های تاریخ‌خواست، *AtEXPB2*

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

**Maryam Chalekaei<sup>1</sup>, Alireza Abbasi<sup>2\*</sup>, Sedigheh Yousefi<sup>3</sup> and Davood Dadashi<sup>4</sup>**

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: February 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 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

### Sinjali *et al.* pBI121:*AtEXPB2* توسط

(2013) انجام شد و این سازه توسط Dadashi (2013) به گیاه توتون منتقل شد. تأثیر کسپینسین‌ها 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* (2011) روی گیاهان توتون تاریخت‌شده 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 تاریخت به عنوان شاهد و *AtEXPB2* سه رگه (لاین) تاریخت‌شده با ژن *AtEXPB2* (Dadashi, 2013) کشت شدند. رگههای تاریخت مورد آزمایش شامل L3, L4 و L9 بودند. گیاهان نسل سوم تاریخت (T<sub>3</sub>) استفاده شدند. تأثیر تاریختی گیاهان در مرحله آغازین با استفاده از محیط کشت انتخابی انجام شد. بدین صورت که در آغاز بذر گیاهان تاریخت‌شده توسط داداشی، 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 غیرتاریخت پس از دوبارگی شدن از بین رفتند. پس از گذشت یک ماه که گیاهان تاریخت در مرحله شش برگی بودند، به گلدان‌های کوچک حاوی پیت‌ماس و پرلیت در اتفاق رشد (دماي ۲۳ ± ۲°C، ۱۶ ساعت رطبوبت و ۱۶ ساعت روشنايي) و پس از چهار هفته به گلدان‌های بزرگ‌تر حاوی نسبت‌های يكسان خاك+ ماسه+ كود حيواني و كوكوييت به گلخانه گروه زراعت پرديس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (دماي ۲۵ ± ۲°C و ۱۶ ساعت روشنايي) منتقل شدند. برای هر تیمار آزمایشی هشت تکرار در نظر گرفته شد. همچنین به منظور تأیید تاریختی گیاهان از گیاهان نمونه‌گیری انجام شد. تاریختی رگه‌ها با استفاده از PCR تکثیرکننده بخشی از توالی ژن انتقالی، تأیید شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیشرو

## 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 McQueen-Mason & Rochange, (1999). دیواره یاخته‌ای باید به حدی مستحکم باشد تا بتواند نیروی مکانیکی ناشی از فشار یاخته‌ای را تحمل کند و در عین حال اجازه رشد و طویل 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. اسیدیتۀ (pH) دیواره به طور معمول از طریق فعالیت پمپ H<sup>+</sup>-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 Rayle & Cleland, 1992 برخی شرایط به کمتر از ۴/۵ نیز می‌رسد (). اصلی‌ترین گام‌ها برای توضیح این سازوکار کشف اکسپینسین‌ها در سال ۱۹۹۲ بوده است، پروتئین‌هایی که طویل و اسیدی شدن دیواره یاخته‌ای را وساطت می‌کنند (McQueen-Mason *et al.*, 1992).

اکسپینسین‌ها پروتئین‌های سستکننده دیواره یاخته‌ای هستند که در فعالیت‌های مربوط به رشد و نمو یاخته‌ای مشارکت می‌کنند (Sampedro & Cosgrove, 2005). اکسپینسین‌ها متعلق به یک خانواده بزرگ ژنی هستند که این ابرخانواده خود شامل چهار خانواده ژنی EXPA، EXPB و EXLA است (Kende *et al.*, 2004).

فعالیت اکسپینسین‌ها اغلب مربوط به یاخته‌های در حال رشد است (Lee *et al.*, 2001). این ارتباط با انجام آزمایش‌هایی که در آن‌ها بیان ژن‌های اکسپینسین در گیاهان تاریخت، دست ورزی شده‌اند، به اثبات رسیده است. در اغلب حالت‌ها، خاموشی ژن‌های اکسپینسین منجر به جلوگیری از رشد می‌شود، در حالی که افزایش بیان آن‌ها باعث رشد سریع‌تر یا غیرعادی می‌شود (Choe & Cosgrove, 2010; Choi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Pien *et al.*, 2001;

(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 ۱/۰ مولار تریس آماده شد و pH آن به ۷/۸ رسانده شد و ۲۰ میلی‌لیتر گلیسیرون به آن اضافه شد. استخراج پروتئین کل شامل، آنزیم‌های پاداکسند (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 ۱ml ۳۰۰۰ mM بافر فسفات ۵۰ mM، ۱ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۱۰۰۰ درصد و ۱ml ۱۰۰۰ 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 ۱ml ۳۰۰۰ بافر فسفات mM، ۵۰ µl ۱۰µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۳۰۰۰ درصد، ۱ml ۳ محلول گایاکول ۲۰۰ mM و ۱ml ۱۰۰۰ nm ثبت عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم در طول موج ۴۷۰ nm جذب در پایه میزان جذب ترکیب نارنجی‌رنگ تتراگایاکول شد و در دقیقه در میلی‌گرم غلظت پروتئین محاسبه شد (Chance & Maehly, 1955). نوع و میزان مواد لازم برای سنجش آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز شامل ۱ml ۵۰۰ از پیروگالول ۱۰۰ mM، ۱ml ۳۰۰۰ از بافر فسفات و ۱ml ۱۰۰۰ عصاره آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب مقادیر اکسیدشده پیروگالول در طول موج ۴۲۰ nm محاسبه و به صورت جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Kar & Mishra, 1976). فعالیت آنزیم سوپراکسید دی‌سی‌موتاز از راه اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبیوترازوکسیلیوم کلراید (NBT) در طول موج ۵۶۰ nm سنجیده شد. ۱ml ۹۲۵ محلول واکنش شامل بافر فسفات ۷۵ µM، ۵۰ mM EDTA، ۰/۱ mM متیونین، ۱۳ mM ضریب تصحیح ۱۵۵ cm<sup>-۱</sup> mM

(CTAACTCCTCGCGTTTGG-3'5'-) و پسرو (ACACGTCGAGCTTCCACAC-3'5'-) انجام شد.

## اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی محتوای آب نسبی

قطعه‌هایی از برگ به صورت تازه با استفاده از پانچ جداسازی شدند. وزن برگ تازه محاسبه و نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر و در دمای اتفاق رشد قرار داده شدند و آنگاه وزن آماس آن‌ها اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد قطعه‌های برگی در دمای ۷۰°C به مدت ۲۴ ساعت خشک و وزن برگ‌های خشک اندازه‌گیری شد. محتوای آب نسبی برگ با استفاده از رابطه  $[(وزن خشک - وزن Schonfeld *et al.*, 1988)$  آماس)/(وزن خشک - وزن ترا]

## نشست یونی (تراوایی غشا)

به‌منظور اندازه‌گیری نشت یونی، قطعه‌های برگی پانچ شدند. قطعه‌های برگی درون ظرف‌های محتوای آب دیونیزه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C قرار داده شدند و میزان ضریب هدایت الکتریکی اول (EC<sub>1</sub>) با استفاده از دستگاه هدایت الکتریکی سنج (EC) متر اندازه‌گیری شد. پس از قرار دادن نمونه‌ها در حمام بن ماری (100°C) به مدت ۳۰ دقیقه، ضریب هدایت الکترولیتی دوم (EC<sub>2</sub>) 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 برگی پودرشده، با استون ۸۶ درصد عصاره‌گیری شدند. سپس جذب نوری عصاره به دست آمده در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ nm 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 دی آلدهید) و پرولین

میزان پراکسیداسیون چربی (لیپید)‌ها با تعیین میزان مالون دی‌آلدهید برگ‌ها با آزمون TBA و با استفاده از ضریب تصحیح ۱۵۵ cm<sup>-۱</sup> mM

استفاده شد. نمونه‌ها بر پایه دستور کار شرکت سازنده کیت آماده سازی 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 (et al., 2002).

NBT و  $1\mu\text{M}$  ریبوفلاوین  $0.1\mu\text{M}$  و  $50\text{ }\mu\text{l}$  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 دستور کار شرکت سازنده انجام شد. برای ساخت cDNA از روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد. برای انجام آزمایش qRT-PCR iQ5 دستگاه شرکت بایورد و کیت Eva Green ۵X HOT FIREPol فلورسنت رنگ دارای ۵X

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')
AtEXPB2	<i>Arabidopsis thaliana</i> Expansin B2	F: CTAACCTCCTCGCGGTTTGG R: ACACGTGAGCTTCCACAC
ACT	<i>Nicotiana tabacum</i> Actin	F: GCCACACTGTCCAATTATG R: CCTTCACATCCCTCACGATTTC

با توجه به روش‌های معمول تاریختی که امروزه استفاده می‌شود، درج شمار خاصی از ژن در جایگاه مشخصی از ژنگان (زنوم) گیاهان عالی، امکان‌پذیر نیست. بنابراین رگه‌های تاریخته 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 تاریخته شده با یک سازه مشاهده می‌شود، به جایگاه قرارگیری ژن انتقالی آن مربوط می‌شود (Peach and Velten, 1991; Day et al., 2000). شمارش گیاهان تاریخت 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 تاریخت 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. درواقع تفاوت در جایگاه قرارگیری ژن‌ها دلیل اصلی اختلاف میان رگه‌ها است. بهبیان 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

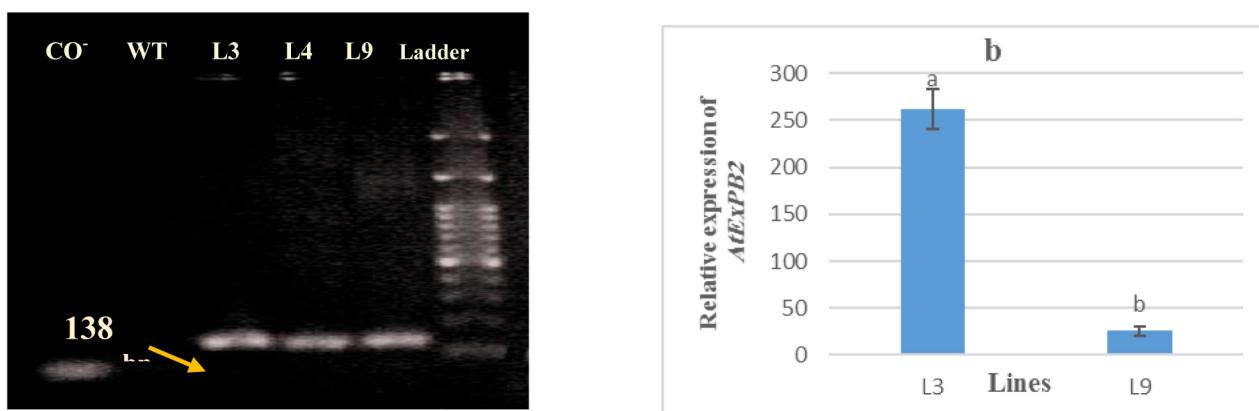
تأثیر تاریختی گیاهان توتون و بررسی بیان نسبی ژن AtEXPB2

به جهت تأثیر 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 الکتروفوروز مشاهده شد. محصولات آغازگر قطعه تکثیری ۱۳۸ جفت بازی در سمت چپ ژل دارد (شکل ۱-a). به منظور بررسی بیان ژن L9 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 تنفسی داشته باشد. میزان بیان ژن انتقالی اکسپنسین 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 تاریخت مربوط می‌شود که از آن جمله می‌توان به تأثیر جایگاه قرارگیری ژن انتقالی اشاره کرد.

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



شکل ۱. تأیید گیاهان تاریخت 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. 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.

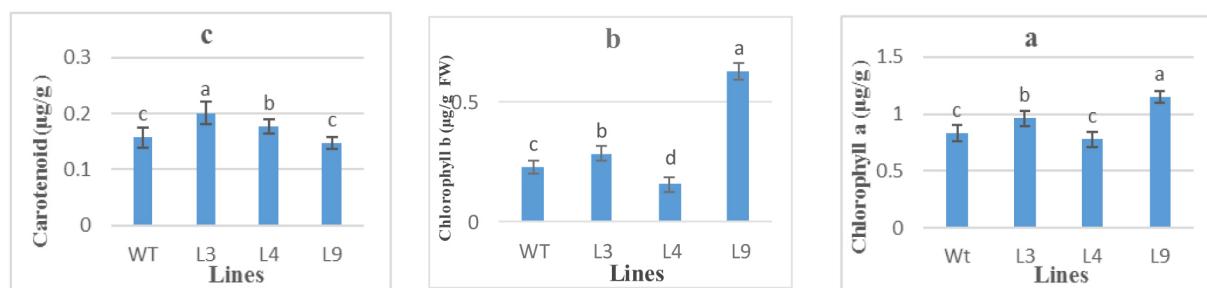
گیاهان علف تال (آرابیدوپسیس) تاریخت شده با ژن *RhEXPA4* در شرایط تنفس شوری و عادی (نرمال) میزان سبزینه بیشتری از گیاهان شاهد داشتند (Lu *et al.*, 2013). همچنین گیاهان علف تال جهش‌یافته (موتانت) *atexpb2* در شرایط تنفس اکسایشی (اکسیداتیو) میزان سبزینه کمتری از گیاهان شاهد داشتند. گیاهان توتون تاریخت *TaEXPB23* در شرایط تنفس اکسایشی میزان بالاتری از سبزینه را نسبت به گیاهان غیرتاریخت در خود نگهداری کردند (Han *et al.*, 2015). از آنجایی که توالی اسید‌آمینه‌ای پروتئین *AtEXPB2* ۴۲ درصد با توالی اسید‌آمینه‌ای *TaEXPB23* همانندی دارد، می‌توان عملکرد یکسانی را از این دو پروتئین انتظار داشت. رگه‌های تاریخت توتون مورد آزمایش افزون بر اکسپنسین درونی خود، اکسپنسین‌های ژن *AtEXPB2* را نیز دریافت کردند.

### محتوای سبزینه و کاروتونوئید

رگه‌های تاریخت 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 ۲-۲ و b). میزان کاروتونوئید در رگه‌های L3 و L4 بیشتر از رگه شاهد بوده است ولی میزان کاروتونوئید در رگه L9 همانند شاهد بوده است (شکل ۲-۳). به طور کلی رگه‌های تاریخت میزان رنگدانه‌های نورساختی (فتوسنتری) بیشتری داشتند. میزان سبزینه برگ به عنوان شاخصی برای بیان قدرت و توانایی نورساخت گیاهان است (Jiang *et al.*, 2007). کاروتونوئیدها 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 تاریخت بیشتر می‌شود.

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



شکل ۲. میزان رنگدانه‌های نورساختی در گیاهان. a) سبزینه b) کلروپلاست گیاهان مورد بررسی شامل شاهد، رگه تاریخت L3 و L4 بوده‌اند. 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 تاریخت مورد آزمایش با ژن *AtEXPB2* تاریخت‌شده 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 موبین گشته است. درنتیجه این گیاهان توانایی بیشتری در جذب آب دارند. بنابراین گیاهان تاریخت آب بیشتری جذب کرده و محتوای آب نسبی خود را نسبت به گیاه غیرتاریخت افزایش می‌دهند. انتظار می‌رود این گیاهان تاریخت در شرایط تنفس‌های محدود کننده رطوبت همانند تنفس خشکی و شوری میزان محتوای آب نسبی خود را نسبت به شاهد در میزان بالاتری حفظ کنند. نتایج اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید شان داد، میزان پراکسیداسیون غشای گیاه شاهد بیشتر از رگه‌های تاریخت بوده است. میزان مالون دی‌آلدهید رگه‌های L4 و L3 نیز کمتر از رگه L9 بوده است (شکل ۳-۳b). نتایج آزمایش‌های نشت یونی نیز نتایج آزمایش‌های مربوط به مالون دی‌آلدهید را تأیید می‌کند، بدین صورت 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

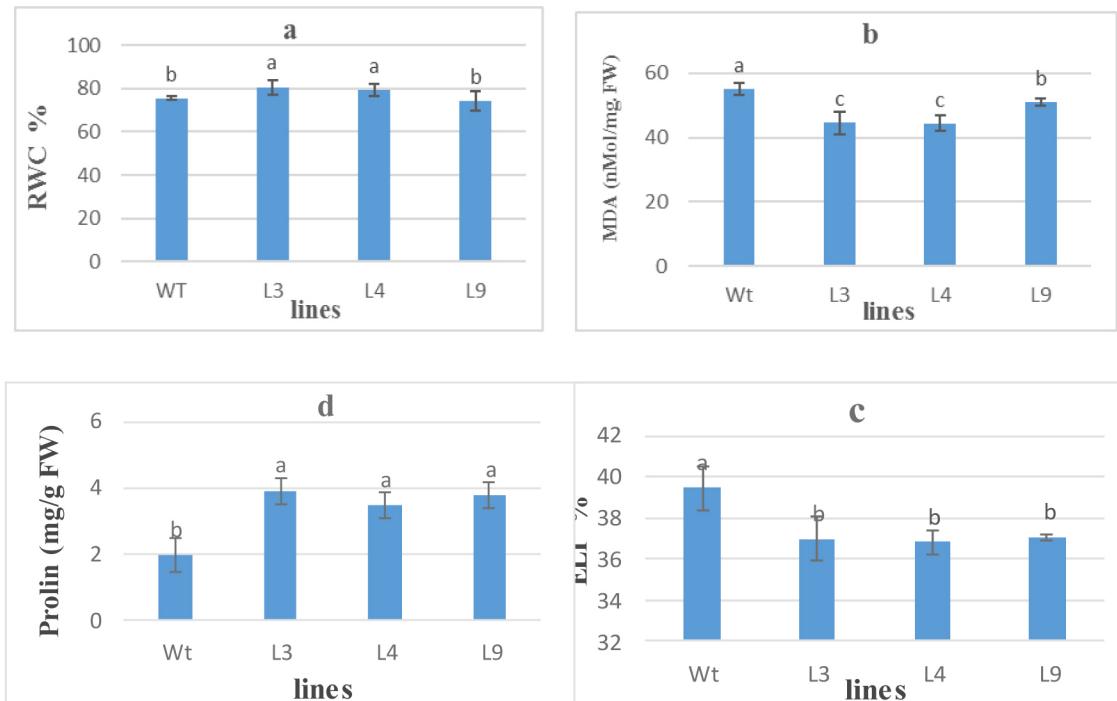
### محتوای آب نسبی، نشت یونی، مالون دی‌آلدهید و پرولین

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

گزارش شده است که گیاهان متتحمل به تنفس خشکی با جذب آب از پروتوبلاست، آب بیشتری را در خود نگه می‌دارند، بنابراین RWC بالاتری دارند (Silva et al., 2007). گیاهان توتون تاریخت P10::*TaEXPB23* در شرایط تنفس خشکی میزان محتوای آب نسبی بالاتری نسبت به گیاهان شاهد داشتند (Li et al., 2015). گیاهان توتون *TaEXPB23* دارای راهانداز RD29A (القا RD29A) در شرایط تنفس خشکی محتوای آب نسبی بالاتری داشتند (Li et al., 2013). گیاهان علف تال تاریخت‌شده با *RhEXPA4* در شرایط تنفس خشکی به طور زن تاریخت P10::*TaEXPB23* در شرایط تنفس خشکی 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 (تورژسانس) به میزان فشار آستانه بستگی دارد. انعطاف‌پذیری و فشار آستانه دو ویژگی مهم دیواره یاخته‌ای به شمار می‌آیند (Pessarakli, 1999).

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

نشده است (شکل ۳-۲). نشت الکتروولیتی به عنوان 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 الکتروولیتی 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) مالون دی‌آلدهید (c) نشت یونی (d) پرولین گیاهان مورد بررسی شامل شاهد، رگه‌های تاریخت L3، L4 و L9 بوده‌اند.

Figure 3- Measure of some physiologic traits. (a) relative water content (b) Malondialdehyde (c) Electrolyte leakage Indext (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 الکتروولیتی در گیاهان تاریخت کمتر از گیاهان شاهد بود (Li *et al.*, 2013). همچنین بررسی روی گیاهان علف تال تاریخت شده با ژن *RhEXP4* نشان داد، در شرایط تنش شوری و خشکی، میزان MDA در گیاهان تاریخت کمتر از گیاهان شاهد غیرتاریخت بوده است (Lu *et al.*, 2013). همچنین در شرایط تنش اکسایشی میزان MDA در گیاهان توتون افزایش بیان داده شده با ژن *TaEXPB23* (Han *et al.*, 2015)، کمتر از گیاهان شاهد بود (TaEXPB23). افزایش بیان اکسپنسین‌ها می‌تواند سبب

اکسپنسین‌ها 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 دیوتیخاره یاخته‌ای شده و سرانجام موجب آسیب به دیواره یاخته‌ای می‌شود (Le Gall *et al.*, 2015). نتایج آزمایش‌ها روی گیاهان توتون تاریخت شده با راهانداز القاشونده در شرایط تنشی نشان داد، در گیاهان تاریخت دیواره یاخته‌ای انعطاف‌پذیری

### آنزیم‌های پاداکسنده

نتایج بررسی آنزیم‌های پاداکسندگی در گیاه نشان می‌دهد که میزان آنزیم کاتالاز در رگه‌های تاریخت 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-a). نتایج فعالیت آنزیم گلوتاتیون پروکسیداز نیز نشان می‌دهد، رگه‌های تاریخت 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-b). در رابطه با آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز رگه‌های تاریخت عملکرد بهتری از رگه شاهد داشتند. در رگه L4 بیشترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده شده است و رگه‌های تاریخت اند (شکل ۴-c). میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دی‌سیموتاژ نیز در رگه‌های تاریخت بیشتر از گیاه شاهد بوده است (شکل ۴-d).

بر پایه نتایج بررسی‌های انجام شده، گیاهان دارای فعالیت پاداکسندگی بالا تحمل بیشتری در برابر تنفس‌های اکسایشی از خود نشان می‌دهند (Boo & Jung, 1999). تجمع القاشه ROS تحت تأثیر تنفس‌های متنوع محیطی باعث فعالیت ترکیبی آنزیم‌های پاداکسندگی گوناگون می‌شود. آنزیم SOD (Dat *et al.*, 1998) آزاد اکسیژن را به پراکسیدهیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کند که نخستین واکنش در سمیت زدایی ROS‌ها است. در گام بعدی، پراکسیدهیدروژن تولیدشده توسط آنزیم کاتالاز و DaCosta & چندین پراکسیداز دیگر حذف می‌شود (Huang, 2007). بر پایه گزارش نتایج برخی بررسی‌ها، کاهش فعالیت آنزیم CAT به تجمع بالای پراکسیدهیدروژن 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 Rasheed (Mukherji, 1991).

در توتون‌های تاریخت P10::TaEXPB23 در شرایط تنفس خشکی و همچنین شرایط بدون تنفس، میزان فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پروکسیداز و کاتالاز و سوپراکسید دی‌سیموتاژ نسبت به گیاهان شاهد فعالیت بیشتری داشتند

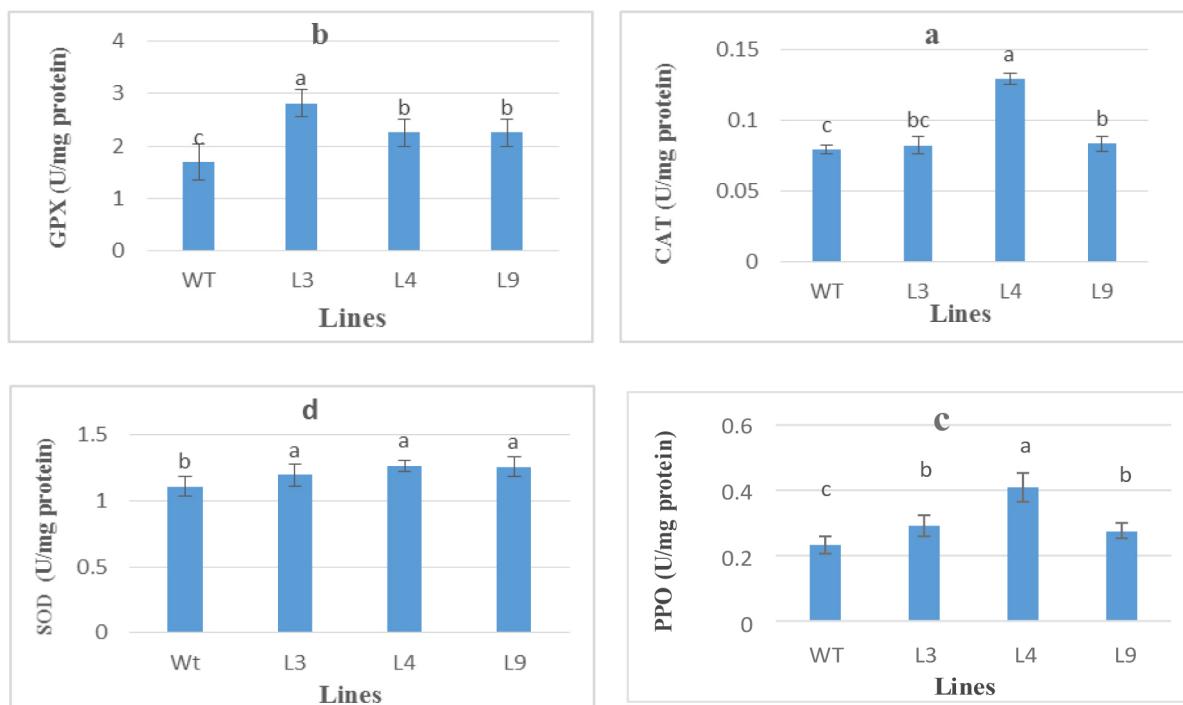
انعطاف‌پذیری بیشتر دیواره یاخته‌ای شده و در نتیجه از آسیب‌های ناشی از تنفس بر ساختمان دیواره یاخته‌ای جلوگیری کند (Li *et al.*, 2011). بنابراین می‌توان گفت که در رگه‌های تاریخت به دلیل افزایش انعطاف‌پذیری دیواره یاخته‌ای، از آسیب به دیواره یاخته‌ای کاسته شده است و در نتیجه نشت یونی و پراکسیداسیون غشای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

نتایج آزمایش‌های اندازه‌گیری پرولین نشان می‌دهد، در رگه‌های تاریخت میزان پرولین بیشتر از گیاه شاهد بود (شکل ۳-d). تجمع پرولین در شرایط تنفس در بسیاری از گونه‌های گیاهی با تحمل به تنفس همبستگی دارد بدین صورت که در گیاهان متتحمل تجمع آن بالاتر از گیاهان حساس است. نقش پرولین در فرایندهای رشد و نیازمندی طولی شونده ریشه ذرت در شرایط تنفس ثابت شده است (Trovato *et al.*, 2008). همچنین همبستگی مثبتی میان پرولین و طولی‌سازی 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 (سنتر) این گونه پروتئین‌ها اثر بگذارد و در نتیجه موجب حفظ فرایندهای فیزیولوژیکی مرتبط با طولی‌سازی یاخته‌ای از جمله بذردهی و رشد لوله گرده شود (Nanjo *et al.*, 1999). بنابراین تجمع پرولین در رگه‌های تاریخت مورد آزمایش می‌تواند به دلیل حضور اکسپنسین‌های انتقالی) باشد قابل انعطاف‌تر (به دلیل حضور اکسپنسین‌های انتقالی) باشد از آنجایی که گیاهان تاریخت مورد بررسی افزون بر اکسپنسین درونی خود اکسپنسین‌های انتقالی نیز دارند، پس می‌توانند رشد و بسط یاخته‌ای بهتری را از خود نشان دهند. پرولین تجمع یافته می‌تواند روی طولی‌سازی 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 تنفسی را تحمل کند و همچنین پس از تنفس بازیابی مناسب‌تر و سریع‌تری خواهد داشت.

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

(Li et al., 2015) از نظر آنژیمی در مقایسه با گیاه شاهد بهتر عمل کردند. به احتمال افزایش انعطاف‌پذیری دیواره یاخته‌ای به دلیل حضور اکسپنسین انقالی سبب کاهاش آسیب به غشای یاخته‌ای شده و در نتیجه اثرگذاری‌های سوء آن، در



شکل ۴. میزان آنزیم‌های پاداکسنده در گیاهان. (a) کاتالاز (b) گلوتاتیون پروکسیداز (c) پلیفنل اکسیداز (d) سوپراکسید دیسموتاز گیاهان مورد بررسی شامل شاهد، رگه‌های تراویخت 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 تنفسی بسیار اهمیت دارد و گیاهان تراویخت شده از نظر بیشتر این صفات نسبت به گیاه شاهد برتری داشته‌اند بنابراین به نظر می‌رسد که این گیاهان در شرایط تنفس نیز می‌توانند برتری خود را حفظ کنند. زیرا در شرایط تنفس رشد و توسعه یاخته‌ای محدود شده و گیاهان تراویخت به دلیل داشتن اکسپنسین خارجی می‌توانند رشد و توسعه بیشتری نسبت به گیاه شاهد داشته باشند.

### نتیجه‌گیری کلی

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

### 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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., Dukiandjieva, 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 CMSL*, 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. & Rochange, 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., Yoshioka, 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<sup>©</sup>) 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., Šinzčar, 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 *BjEXPB1* 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., xiuh 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.