مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۹ (ص۱۱-۱)

Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 51, No 1, Spring 2020 (1-11)
DOI: 10.22059/IJFCS.2020.201601.654013

بررسی تأثیر ژن AtEXPA18 آرابیدوپسیس بر صفات ریشه و بذر لاین های تراریخته توتون

صدیقه یوسفی[۱] ، علیرضا عباسی*[۲]، مریم چاله‌کائی[۱]، میثم ملک پور[۱]

۱و۲. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات،
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۷)

چکیده

اکسپنسین¬ها پروتئین¬های غیر¬آنزیمی موجود در دیواره سلولی می¬باشند که عامل اصلی برای طویل شدن سلول محسوب می-شوند. انعطاف پذیری دیواره سلول گیاهی به واسطه اسیدی شدن و فعال شدن اکسپنسین¬ها تنظیم می¬گردد. در این تحقیق تأثیر انتقال ژن **AtEXPA18** بر ریشه و بذر لاین¬های توتون تراریخته بررسی شد.¬ برای اثبات تراریختگی گیاهان پس از استخراج **RNA**، **cDNA** ساخته شد و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژن برای **AtEXPA18** آزمایش **PCR** صورت گرفت. بذور در محیط کشت انتخابی **MS** حاوی کانامایسین کشت شدند. گیاهچه¬های تراریخته در محیط کشت حاوی کانامایسین به خوبی رشد کردند ولی گیاهچه¬های غیر¬تراریخته سفید شدند و از بین رفتند. سپس گروهی از این گیاهان تراریخته به گلخانه و گروهی به منظور بررسی صفات مورفولوژیک ریشه به گلدان‌های حاوی محلول غذایی هوگلند منتقل‌شدند. بررسی¬های گلخانه¬ای نشان داد گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان غیرتراریخته در صفت¬هایی از جمله وزن بذر، وزن کپسول و وزن صد دانه بهتر عمل کردند. گیاهان تراریخته رشد کرده در هوگلند نسبت به گیاهان غیرتراریخته در صفت¬های وزن¬تر و خشک اندام هوایی و ریشه، و ارتفاع ریشه بهتر بودند. به صورت کلی لاین تراریخته **L4** بهترین عملکرد را در بین لاین¬های تراریخته از خود نشان داد.

واژه های کلیدی: اکسپنسین، بسط دیواره سلولی، توتون، گیاهان تراریخته، AtEXPA18 .

Evaluation of the effect of AtEXPA18 *Arabidopsis* gene on root and seed traits of tobacco transgenic lines

Sedigheh Yousefi [1], Alireza Abbasi*[2], Maryam Chalekaei [2], Meysam Malekpour [1]

1,2. MSc. Student of Agricultural Biotechnology and Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran

(Received: January 5, 2016 - Accepted: September 17, 2016)

ABSTRACT

Expansins are non-enzymatic proteins in the cell wall, which are the main factor for cell elongation.The flexibility of the plant cell wall is regulated by acidification and activation of expansins. In this study, the effects of transferred AtEXPA18 gene on transgenic tobacco plants were investigated. To confirm the transgenic plant, RNA was extracted from the plant leaf sample and then cDNA was synthesized. After that PCR was done via a specific primer of the AtEXPA18 gene. Seeds were cultured in selective MS medium containing kanamycin. Transgenic seedlings tolerate medium which contains kanamycin and Non-transgenic seedlings got white and died. Subsequently, some of these seedlings were grown in the greenhouse and others were grown in Hoagland nutrient solution for evaluating root morphology. Greenhouse studies showed that the transgenic plants were better than non-transgenic plants in some traits such as seed weight, capsule weight, and 100 seed weight. Transgenic plants grown in Hoagland were better than non-transgenic plants in some other traits like shoot and root dry weight, and root length. Consequently, L4 transgenic line had the best performance among transgenic lines.

Keywords: Cell wall extension, expansin, tobacco, transgenic plant, AtEXPA18

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

مقدمه

بسیاری از گیاهان بوسیله بذر تکثیر پیدا می‌کنند. رشد و توسعه بذر به ژنتیک و مواد مغذی که از والدین به آن منتقل می‌شود بستگی دارد. بر اساس مطالعات ژنتیک عوامل مادری و غیر مادری در تنظیم اندازه بذر دخالت دارند و ارتباط بین بافت مادری و تخم می‌تواند هماهنگ کننده اندازه بذر باشد (**Garcia *et al*., 2005**). اطراف سلول‌های گیاهی بوسیله دیواره سلولی احاطه شده است. دیواره سلولی از عناصر مهمی چون پلی-ساکاریدها، پروتئین‌ها (**Carpita & Gibeaut, 1993**) و ترکیبات فنلی و سایر مواد تشکیل شده است و تعیین اندازه و شکل سلول گیاهی توسط دیواره تنظیم می‌شود (**Varner & Lin, 1989**). دیواره سلولی دارای عملکردهای پشتیبانی ساختاری، تعیین شکل سلول، حفاظت در برابر عوامل بیماری زا (پاتوژن ها) و سایر مهاجم‌های موجود در محیط زیست، ذخیره سازی و رها کردن سیگنال‌های مولکولی، ذخیره کردن کربوهیدرات‌ها، یون‌ها و مواد دیگر است (**Cosgrove, 1999**). برای طویل شدن و به بلوغ رسیدن، سلول گیاهی به صورت انتخابی تغییراتی را در اجزای دیواره شامل: اکسپنسین‌ها، اندوگلوکان‌ها، زایلوگلوکان، رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌کند (**Cosgrove, 1999, 2000a**). اکسپنسین‌ها شامل خانواده چند ژنی بزرگی از پروتئین‌های سست کننده دیواره سلولی هستند. بر اساس آنالیز توالی‌های اکسپنسین چهار خانواده حفاظت شده تکاملی اکسپنسین‌ها در همه گیاهان روی زمین وجود دارند، این چهار خانواده شامل: آلفا اکسپنسین **(EXPA)**، بتا اکسپنسین **(EXPB)**، شبه آلفا اکسپنسین و شبه بتا اکسپنسین می‌باشند (**Choi *et al*., 2006**). اکسپنسین-ها جزء عوامل اولیه مختل شدن پیوندهای دیواره و تضعیف پیوندهای غیرکووالانسی مانند پیوندهای هیدروژنی در لایه سلولز- همی سلولز و در نتیجه افزایش سطح دیواره سلولی هستند، این پروتئین‌ها مسئول تنظیم اندازه سلول‌های گیاهی هستند که در دیواره سلولی وجود دارند. و وابسته به تغییرات **pH** می-باشند (**McQueen-Mason & Cosgrove, 1994**). به عنوان نمونه اکسپنسین **A** در دیواره‌های سلولی میان گره‌های برنج با **pH** اسیدی فعال شده و سبب افزایش رشد دیواره سلولی می‌شود (**Cho & Kende, 1997**). اکسپنسین‌ها به عنوان عامل اصلی برای افزایش طول دیواره سلولی درنظرگرفته می‌شوند و سایر عوامل به عنوان عامل کمکی برای اکسپنسین‌ها محسوب می-شوند (**Vissenberg *et al*., 2000**). اکسپنسین‌ها به عنوان خانواده‌هایی چند ژنی در آرابیدوپسیس، برنج، خیار و گوجه فرنگی شناسایی شده‌اند (**Cosgrove, 1999**). اکسپنسین‌ها در طول رسیدگی و حتی بعد از توقف رشد در نرم کردن بافت میوه (**Brummell *et al*., 1999**)، در ریزش برگ‌ها[1] (**Cho & Cosgrove, 2000**)، در ساخته شدن لوله گرده (**Pezzotti *et al*., 2002**)، تشکیل ریشه موئین (**Cho & Cosgrove, 2002**)، تمایز آوند چوبی (**Milioni *et al*., 2001**)، همزیستی و آلودگی پاتوژن (**Fudali *et al*.,2008**) نقش ایفا می‌کنند. دو ژن ***AtEXPA18*** و ***AtEXPA7*** بطور اختصاصی در سلول‌های ریشه موئین ***Arabidopsis thaliana*** بیان شدند (**Cho & Cosgrove,2002**). با توجه به حضور فیتوهورمون‌های اکسین، جیبرلین، اتیلن، سیتوکینین و اسید آبسیزیک بیان ژن‌های اکسپنسین در سلول‌ها تنظیم می‌شود. آنالیز ناحیه پروموتوری اکسپنسین‌های برنج نشان می‌دهد که آبسیزیک اسید، اکسین، جیبرلین(**GA**) و اتیلن عناصر پاسخگو[2] و فعال هستند (**Lee *et al*., 2001**) . ژن ***AtEXPA18*** در توتون باعث افزایش سطح برگ و طول ساقه و در نتیجه افزایش کلروفیل و فتوسنتز در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان غیرتراریخته گردید، این افزایش رشد به دلیل خاصیت سست شدن دیواره سلولی و افزایش توسعه دیواره سلولی توسط اکسپنسین‌ها در نظر گرفته شده است (**Malek pour *et al*., 2013**). در تحقیق حاضر تأثیر ژن اکسپنسین ***AtEXPA18*** روی طول ریشه، وزن خشک و تر ریشه و اندام هوایی، اندازه کپسول، تعداد کپسول، وزن بذر و تعداد بذر در کپسول

[1] **abscission**

[2] **responsive elements**

در گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

تراریختگی توتون با سازه pBI121:*AtEXPA18*

قطعه ژن ***AtEXPA18*** از **DNA** استخراج شده گیاه ***Arabidopsis thaliana*** جدا و به درون ناقل **pGEM-T** وارد گردید. این ناقل به همراه ژن مورد نظر ابتدا به باکتری ***Escherichia coli*** **DH5a** مستعدشده منتقل و سپس قطعه ژنی تحت پیش برنده ***CaMV 35s*** و خاتمه‌دهنده ***NOS***به درون ناقل بیانی **pBI121 (Clonetech)** همسانه‌سازی گردید. سازه ساخته شده به سلول‌های مستعد آگروباکتریوم سویه **LBA4404** منتقل گردید **(Shahnejat Bushehri *et al.*, 2010; Malk por *et al.*, 2013)**. کلونی‌های رشد کرده در محیط **LB** انتخابی (حاوی کانامایسین و ریفامپسین) برای تلقیح برگ‌های توتون استفاده گردید. انتقال ژن با روش آگروایفکشن (**Ohta *et al.*, 1990**) به گیاه توتون (***Nicotiana tabacum***) انجام شد.

بررسی گیاهان تراریخته

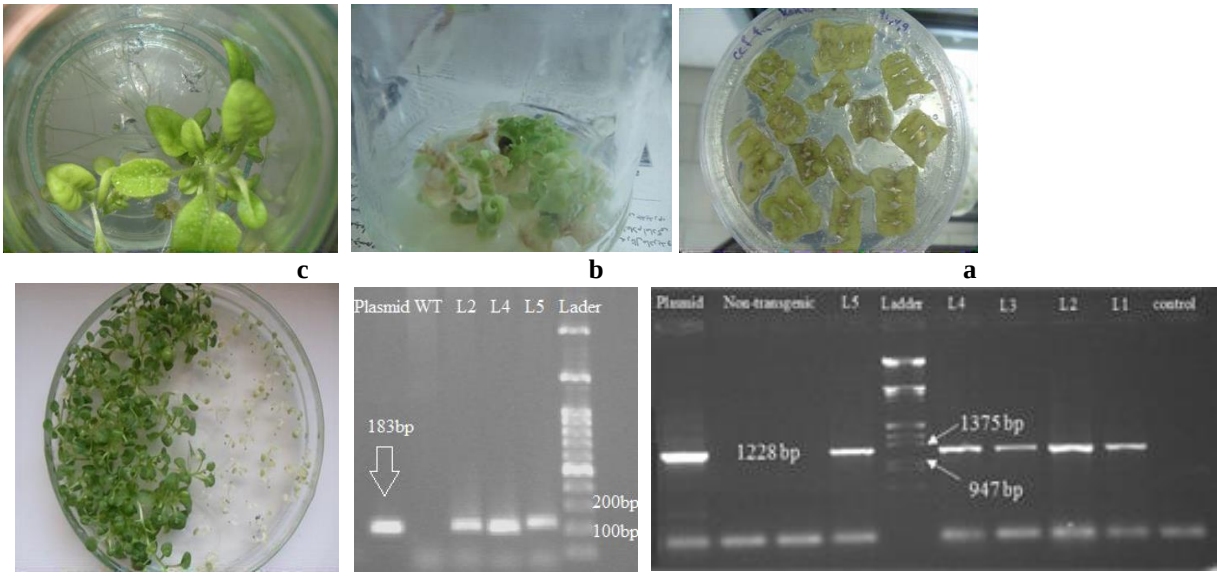
به منظور جداسازی بذرهای تراریخته شده با سازه **pBI121:*AtEXPA18*** از بذرهای غیرتراریخته، بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت حاوی کانامایسین کشت شدند. بذرها ابتدا با آب دو بار تقطیر شده، شستشه شده و سپس بعد از قرارگیری به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ ، مجدداً دو تا سه بار با آب دو بارتقطیر شده شستشو شدند. در مرحله بعد به منظور ضدعفونی سطحی، بذرها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۵٪ قرار گرفتند و درآخر ۴ تا ۵ باربوسیله آب دو بارتقطیر شده شستشو داده شدند. پتری دیش‌های حاوی بذرها به منظور رشد بهینه به اتاق کشت (دمای ۲± ℃ ۲۳، ۶۰٪ رطوبت و ۱۶ساعت روشنایی) منتقل شدند. از بین گیاهان غیرتراریخته و تراریخته که به مرحله چهار برگی رسیدند تعدادی به گلدان‌های پلاستیکی کوچک (۲۰۰ گرمی) حاوی کوکوپیت و پرلیت منتقل شدند و بعد از رشد مناسب، گیاهان به گلدان‌های بزرگتر (دو کیلوگرمی) حاوی ترکیبات خاک: ماسه بادی: کوکوپیت و پرلیت با نسبت های ۱:۲:۲:۲ منتقل شدند و گلدان‌ها به محیط گلخانه (دمای ۲± ℃ ۲۵ و ۱۶ساعت روشنایی) منتقل و تا انتهای مرحله زایشی نگهداری‌شدند. صفات تعداد کپسول، وزن کپسول و بذرهای داخل کپسول و وزن صد دانه بررسی شدند. گیاهان در این مرحله در قالب طرح کاملاً تصادفی با هشت تکرار مورد مطالعه قرارگرفتند.

تعدادی دیگر از گیاهچه‌ها برای بررسی مناسب‌تر خصوصیات ریشه به محلول غذایی هوگلند (بدون هوادهی) منتقل شدند و در شرایط اتاقک رشد (دمای ۲± ℃ ۲۳، ۶۰٪ رطوبت و ۱۶ساعت روشنایی) به‌منظور بررسی بهتر ریشه نگهداری شدند. طی آزمایش همه روزه مقداری از حجم محلول از پای گیاهان کاهش و به همان میزان محلول تازه هوگلند اضافه می‌شد. در این بخش صفات ارتفاع ریشه، وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، وزن‌تر ریشه، وزن خشک ریشه، نسبت ریشه به اندام هوایی تر و نسبت ریشه به اندام هوایی خشک مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان در این مرحله در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد مطالعه قرارگرفتند.

نتایج و بحث

انتقال ژن و تأیید تراریختگی لاین‌های انتخابی

بعد از رشد گیاهچه‌های توتون در محیط کشت، انتقال ژن به قطعات برگی تهیه شده به روش آگروایفکشن انجام گرفت و بعد از دو روز قرار گرفتن در محیط همکشت به محیط انتخابی جدید منتقل شدند (شکل ۱-**a**). سپس بازا شدن ریز نمونه‌های گیاهی در محیط کشت **MS** انتخابی حاوی کانامایسین (برای گزینش گیاه تراریخته احتمالی) و سفوتاکسیم (کاهش رشد باکتری در محیط کشت) صورت گرفت. براساس (شکل ۱-**b**) باززایی سلول‌ها به این صورت بود که سلول‌ها از قسمت‌های زخم خورده برگ‌ها رشد کردند. گیاهچه‌های بازا شده به محیط انتخابی داخل لیوان انتقال پیدا کردند و برای گلخانه انتخاب شدند. بر اساس (شکل۱- **c**) گیاهچه‌های بازا شده تراریخته سبز باقی ماندند و رشد کرده و توانستند تولید ریشه و ساقه



شکل۱- **انتقال سازه ژنی به برگ‌های توتون بوسیله آگروباکتریوم و بررسی تراریختگی‌لاین‌های انتخابی**. **a-** برگ‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم در محیط انتخابی با کانامایسین و سفوتاکسیم، **b-** باززایی سلول‌های تراریخته احتمالی در محیط‌کشت **MS** ، **c-** گیاهان تراریخته احتمالی رشد کرده در محیط انتخابی، **d-** قطعات حاصل از تکثیر **DNA** توتون با آغازگرهای ویژه آن روی ژل آگارز یک درصد(گیاهان غیرتراریخته **(control)**، **L1-L5**: گیاهان تراریخته مثبت، **Plasmid:** نمونه پلاسمید اگروباکتری حاوی پلاسمید***AtEXPA18*** **::pBI121** (کنترل مثبت)، **Ladder:**نشانگر وزن مولکولی **λ/EcoRI +HindIII**)، **e**- قطعات حاصل از تکثیر **cDNA** توتون با آغازگرهای ویژه آن روی ژل آگارز یک و نیم درصد. **f-** بذور گیاهان تراریخته ***AtEXPA18*** **::35S** و گیاهان غیرتراریخته در محیط کشت **MS** انتخابی حاوی آنتی بیوتیک.

Fig.1- transformation gene construct into tobacco leaves by *Agrobacterium* and evaluation of selected lines. a- incubated leaves with *Agrobacterium* on the selective medium containing kanamycin and cefotaxime., b- Regeneration of putative transgenic cells on MS medium, c- Putative transgenic plants grown on selective MS medium, d- fragments of tobacco DNA amplification by specific primers on 1 percent agarose gel.(non-transgenic plants (control), L1-L5: Positive transgenic plants, Plasmid: Samples of the *agrobacterium* plasmids containing plasmid pBI121:: *AtEXPA18* (Positive control), Ladder: Molecular weight markers λ/EcoRI +HindIII (Qiagen).), e-fragments of tobacco cDNA amplification by specific primers on 1.5 percent agarose gel, .f- Seeds of transgenic plants 35S:: *AtEXPA18* and non- transgenic plants in selective MS medium containing antibiotic.

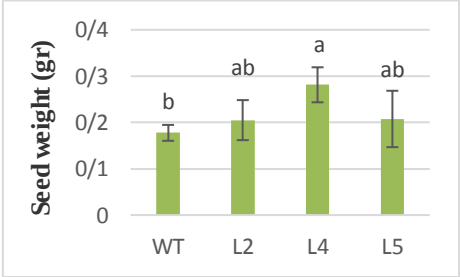
قوی کنند. به منظور اثبات تراریختگی گیاهان، استخراج**aseDNA** آنها به روش **CTAB** انجام گرفت. سپس ژن ***AtEXPA18*** با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و به کمک تکنیک **PCR** تکثیر شد. مرحله اول **PCR**، واسرشت سازی ۹۴درجه و به مدت ۳ ساعت، مرحله دوم اتصال در ۶۰ درجه و به مدت ۱ ساعت و مرحله تکثیر در دما ۷۲ درجه و به مدت ۲ ساعت به طول انجامید. محصول **PCR** هر کدام از نمونه‌های گیاهی در چاهک‌های مشخصی بر روی ژل آگارز، الکتروفورز شد و پس از آن، ژل توسط دستگاه ژل داک[۳] و زیر نور فرابنفش مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به (شکل ۱-**d**) در چاهک اول از سمت راست نمونه گیاه غیرتراریخته (به عنوان کنترل منفی) بارگیری شد و همانطور که انتظار می‌رفت هیچ باندی نشان نداد. چاهکهای ۲ الی ۵ و ۷ الی ۹ حاوی **DNA** تکثیر شده گیاهان مورد آزمون می‌باشند. چاهک۶ نیز نشانگر وزن مولکولی را داراست که حاوی دی‌ان‌ای(**DNA**) لاندای هضم شده با آنزیم‌های ***EcoRI*** و ***HindI*** می‌باشد. همچنین پلاسمید استخراج شده از آگروباکتریوم (به عنوان کنترل مثبت) در چاهک ۹ بارگذاری شد. در نهایت، باندهای **DNA** ایجاد شده زیر نور فرابنفش مشاهده و عکسبرداری شد. در نتیجه با توجه به اندازه

[۳] **Gel documentation**

قطعات تکثیر شده در نمونه‌های **DNA** استخراج شده، پنج لاین تراریخته**(L1-L5)** که باندی هم ردیف با باند حاصل از کنترل مثبت و در حدود ۱۲۲۸ جفت باز (طول **CDS**ژن ***AtEXPA18***) را نشان دادند، مشخص شدند به این ترتیب تراریختگی پنج لاین از گیاهان توتون در سطح ژنوم تأیید شد و لاین‌های تراریخته **L2**، **L4** و **L5** برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. برای اثبات بیشتر تراریختگی **cDNA** ساخته شد و از لاین های تراریخته و گیاهان غیرتراریخته نمونه‌گیری انجام شد و با استفاده از دو پرایمر اختصاصی، **PCR** انجام شد و محصولات پرایمر در لاین‌های تراریخته **L2,L4,L5** و پلاسمید به عنوان کنترل مثبت دارای قطعه تکثیری ۱۸۳ جفت باز مشخص شدند و در گیاهان غیرتراریخته باندی مشاهده نشد (شکل۱- **e**). به منظور تأیید نتایج **PCR** و اثبات انتقال ژن به نسل بعدی بذرهای گیاهان تراریخته و غیرتراریخته در گلخانه جمع‌آوری و پس از ضدعفونی در محیط کشت انتخابی (حاوی کانامایسین) کشت شدند. بذور گیاهان تراریخته به دلیل دارا بودن ژن مقاومت به کانامایسین می‌توانند در محیط‌کشت حاوی این آنتی‌بیوتیک رشد کنند که پس از چهار برگی شدن به رشدشان ادامه دادند اما گیاهان غیرتراریخته و تفرق‌یافته زردشده (یا سفید شده) و از بین‌رفتند. در این مرحله تعداد بذور جوانه زده و سبز مانده شمارش شد و نسبت جوانه زنی (برای تعیین تعداد درج ژن در ژنوم توتون) محاسبه شد و نسبت ۳:۱ مشاهده شد (شکل۱-**f**).

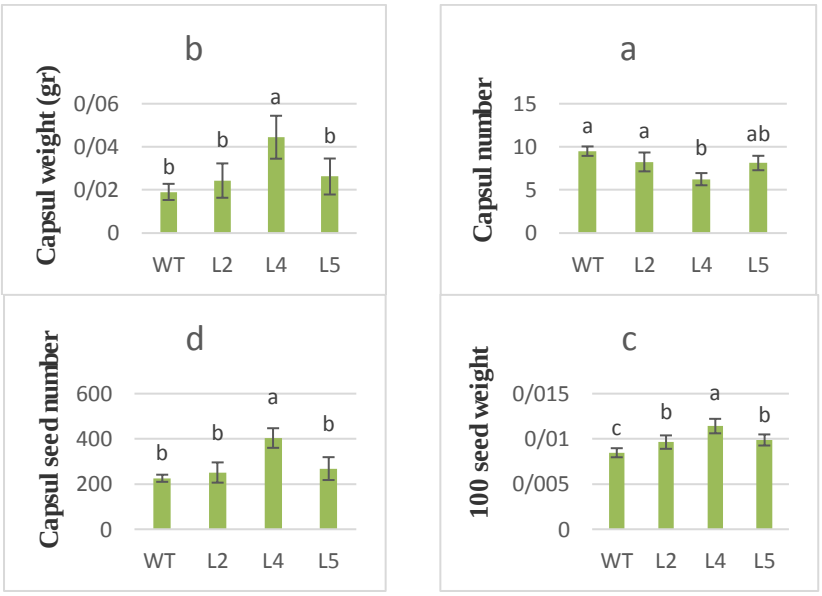
- بررسی مورفولوژیک گیاهان کشت شده در گلخانه

بعد از رشد مناسب گیاهان غیرتراریخته و تراریخته در گلخانه به منظور بررسی عملکرد گیاهان، صفاتی مورد سنجش قرار گرفت، در ابتدا وزن بذر داخل کپسول اندازه‌گیری شد و مشخص شد که لاین تراریخته **L4** دارای بیشترین وزن بذر نسبت به گیاهان غیرتراریخته بوده است و گیاهان غیرتراریخته دارای وزن بذر کمتری بودند. بیشترین اثر ژن در لاین **L4** دیده شد و این اثر به میزان کمی هم در لاین **L5** و **L2** مشاهده شد (شکل۲). افزایش وزن بذر می تواند ناشی از دو عامل افزایش در اندازه بذر (افزایش تقسیم سلول ها و یا افزایش اندازه سلول‌های بذر) و یا افزایش تعداد بذر داخل کپسول و یا به دلیل هر دو عامل ایجاد شده باشد. برای بررسی این دو فرضیه و رسیدن به جواب مناسب اندازه گیری صفات دیگری چون وزن کپسول، تعداد کپسول پر، تعداد بذر در کپسول و وزن صد دانه انجام شد.



شکل۲- مقایسه صفت وزن کل بذر در گیاهان غیرتراریخته**(WT)** و گیاهان تراریخته **(L2, L4, L5)** در شرایط گلخانه

Fig. 2- Comparision of seed weight in the non-transgenic plants (WT) and transgenic plants (L2, L4, L5) in greenhouse conditions



شکل ۳- مقایسه صفات مورفولوژیک مرتبط با اندام زایشی گیاهان غیرتراریخته(**WT**) و گیاهان تراریخته **L2, L4,** **L5**) در شرایط گلخانه

a) تعداد کپسول **b**) وزن کپسول **c**) وزن صد دانه **d**) تعداد بذر در کپسول

Fig. 3- Comparison of morphological traits related to reproductive organs of non-transgenic plants (WT) and transgenic plants (L2, L4, L5) in greenhouse conditions
a) Capsule number b) Capsule weight c) 100 seed weight d) Capsule seed number

مشخص شد بیشترین تعداد کپسول پر برای گیاهان غیرتراریخته و کمترین تعداد کپسول پر برای گیاهان لاین **L4** بوده است (شکل۳-**a**)، لاین‌های تراریخته **L2** و **L5** که دارای وزن بذر کمتر از لاین تراریخته **L4** بوده‌اند دارای تعداد کپسول پر بیشتری بوده‌اند. ولی گیاهان غیرتراریخته با وجود دارا بودن وزن بذر کمتر دارای تعداد کپسول پر بیشتری بوده است. بنابراین می-توان نتیجه گرفت که ژن هیچ اثری روی افزایش تعداد کپسول پر نداشته است. بنابراین، در این لاین‌ها یا تعداد بذر داخل کپسول بیشتر است و یا اندازه بذر از بذر سایر لاین ها بزرگتر است. برای مشخص شدن موضوع، وزن کپسول و تعداد بذر در کپسول با استفاده از فرمول‌های زیر بررسی شدند.

تعداد کپسول پر / وزن کل بذر = وزن کپسول

وزن صد دانه / ۱۰۰ × وزن کپسول = تعداد بذر در کپسول

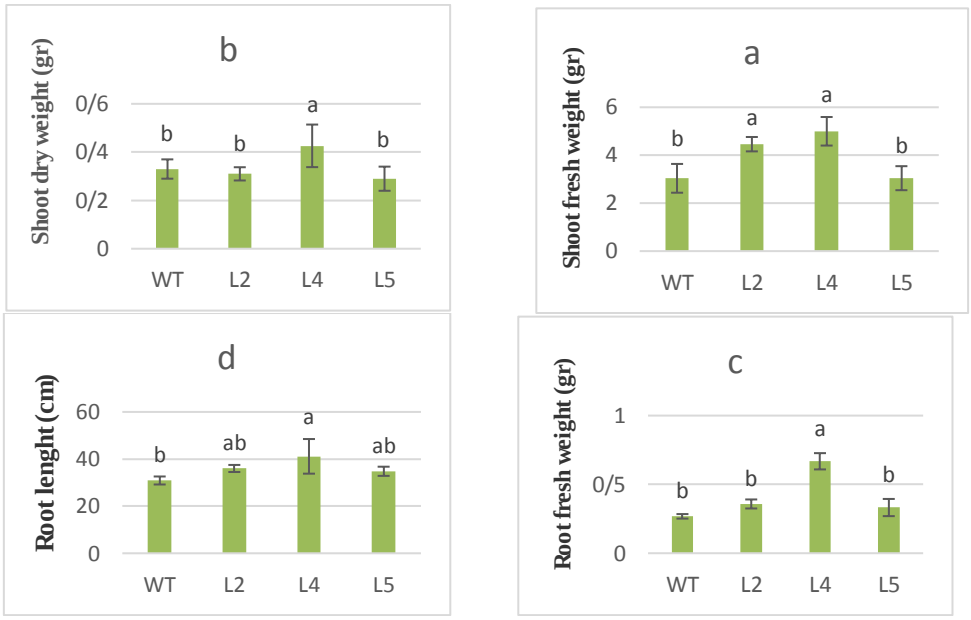
بیشترین میزان وزن کپسول مربوط به لاین تراریخته **L4** بود و کمترین میزان وزن کپسول برای گیاهان غیرتراریخته بوده است، وزن کپسولی لاین‌های تراریخته **L2** و **L5** نیز از گیاهان غیرتراریخته بیشتر بود (شکل۳- **b**). همانطورکه در (شکل۳- **c**) مشخص است، وزن صد دانه گیاهان غیرتراریخته کمترین مقدار و وزن صد دانه لاین تراریخته **L4** بیشترین مقدار و دو لاین **L2** و **L5** حد وسط این دو بوده و با یکدیگر نیزتفاوت معنی‌داری داشتند. در نهایت تعداد بذر در کپسول مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که بیشترین تعداد بذر در کپسول در لاین **L4** و کمترین تعداد بذر در کپسول در گیاهان غیرتراریخته بود (شکل۳-**d**). با بررسی‌ها مشخص شد که وزن کپسول **L5** بیشتر از کپسول گیاهان غیرتراریخته می‌باشد بنابراین یکی از دلایل این افزایش وزن می‌تواند افزایش تعداد بذر لاین **L5** نسبت به گیاهان غیرتراریخته باشد. با این بررسی‌ها مشخص شد که وزن کل بذر، وزن کپسول و وزن صد دانه در لاین **L4** و بعد از آن در لاین **L5** بیشتر از بقیه لاین ها بوده است که این افزایش می‌تواند نتیجه افزایش در اندازه بذر باشد و افزایش اندازه بذر یا با افزایش اندازه

سلول‌ها و یا با افزایش تعداد سلول‌ها و یا هر دو ممکن است رخ داده باشد. آزمایشات زیادی وجود یک همبستگی مثبت بین ژن‌های اکسپنسین و هورمون-هایی چون اکسین، جیبرلین، سیتوکینین، آبسیزیک اسید و اتیلن را تأیید کرده‌اند. این فیتوهورمون‌ها با تنظیم میزان بیان ژن‌های اکسپنسین فعالیت آنها را تنظیم می‌کنند. بر اساس اطلاعات موجود، هورمون‌های اکسین و جیبرلین‌ها به‌عنوان تنظیم کننده‌های تقسیم و بسط سلولی شناخته می‌شوند **(Davies, 2010)**. هورمون اکسین از طریق کاهش **pH** دیواره سلولی فعالیت اکسپنسین‌ها را افزایش می‌دهد و به عنوان عامل افزایش طول سلول بیان برخی از ژن‌های اکسپنسین را افزایش می‌دهد **(Cosgrove, 2000b)**. بنابراین هورمون‌های اکسین و جیبرلین با افزایش تقسیمات سلولی و همچنین تأثیر مثبت بر اکسپنسین‌ها و شل شدن پیوندهای موجود در دیواره سلولی سبب افزایش تقسیمات سلولی و افزایش اندازه سلول می‌شوند. هورمون های اکسین و جیبرلین نقش مهمی در شروع گلدهی و بذردهی پس از لقاح، دارند (**Ruan *et al.*, 2012**). این دو هورمون در بذرهای نخود فرنگی موجب القای رشد (طولی و وزن تر) پریکارب و درنهایت افزایش رشد اندام زایشی می‌شوند (**Ozga & Reinecke, 1999**) بنابراین افزایش فعالیت هورمون‌های اکسین و جیبرلین سبب افزایش اندازه بذر شده و در نتیجه سبب افزایش وزن صد دانه و وزن کپسول می‌شوند، فعالیت بیشتر این دو هورمون سبب افزایش وزن صد دانه و وزن کپسول در لاین **L4** نسبت به گیاهان غیرتراریخته شده است. درگیاه گوجه فرنگی تیمار اکسین موجب افزایش تعداد سلول‌های پریکارب و جیبرلین سبب کاهش تعداد سلول‌های پریکارب ولی افزایش اندازه آن‌ها شده است. براساس تحقیق دیگری مشخص شده‌است که جیبرلین‌ها و علاوه بر آن اکسین‌ها نیاز بذر را از نظر حفظ تقسیم و توسعه سلولی خصوصاً در اوایل نمو دانه تأمین می‌کنند و این دو هورمون برای دستیابی به رشد سلولی مناسب تا رشد کامل اندام زایشی مورد نیاز هستند (**Ozga *et al.*, 2002**).

- بررسی گیاهان رشد یافته در محلول غذایی هوگلند

بعد از حدود ۴ هفته رشد مناسب گیاهان در محیط مایع هوگلند، قبل از مرحله گلدهی و در زمان هفت تا هشت برگی بودن، وزن تر اندام هوایی و وزن تر ریشه توسط ترازو حساس و اندازه طول ریشه بوسیله یک خط کش مناسب اندازه گیری شد، سپس اندام هوایی و ریشه گیاهان درون پاکت‌های مناسب قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت درون آون ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته، بعد از این مدت بلافاصله وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه اندازه گیری شدند.

بعد از اندازه گیری وزن تر اندام هوایی لاین های تراریخته و شاهد، مشخص شد که وزن تر اندام هوایی لاین **L4** به طور معنی‌داری از بقیه لاین ها بیشتر است ، لاین **L2** نیز نسبت به لاین های **L5** و **WT** برتر بود (شکل۴-**a**). وزن خشک اندام هوایی لاین **L4** نسبت به سه لاین دیگر به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل۴- **b**). وزن تر ریشه لاین **L4** نیز نسبت به بقیه لاین ها بیشتر بود. لاین های تراریخته **L2** و**L5** نیز وزن تر ریشه بیشتری نسبت به شاهد داشتند. می‌توان افزایش وزن تر ریشه لاین های تراریخته را به دلیل بلندتر بودن ریشه نسبت به شاهد و همچنین تولید ریشه های موئین به دلیل عملکرد ژن اکسپنسین در نظر گرفت (شکل۴- **c**). در وزن خشک ریشه لاین ها تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند.



شکل۴- صفات اندازه‌گیری شده مرتبط با اندام هوایی و ریشه گیاهان غیرتراریخته**(WT)** و گیاهان تراریخته شده ***AtEXPA18*** در محیط غذایی هوگلند

a) وزن تر اندام هوایی **b)** وزن خشک اندام هوایی **c)** وزن تر ریشه **d)** ارتفاع ریشه

Fig. 4- studied traits related to the shoot and root of non-transgenic plants (WT) and transgenic *AtEXPA18* plants in Hoagland nutrient solution
a) Shoot fresh weight b) Shoot dry weight c) Root fresh weight d) Root length

بعد از اندازه‌گیری ارتفاع ریشه مشخص شد که طول ریشه لاین **L4** بیشتر از سه لاین دیگر است و ارتفاع ریشه دو لاین دیگر تراریخته **L2** و **L5** بیشتر از گیاهان غیرتراریخته می باشد (شکل ۴- **d**).

ریشه برای بدست آوردن آب و غذا شکل می‌گیرد (**Schiefelbein *et al.*, 1997**). سیستم ریشه به عنوان یک سیستم برای توسعه شناسایی شده است. ریشه یک اندام ساده است و از تعداد کمی سلول تمایز یافته تشکیل شده است (**Aeschbacher *et al.*, 1994**). رشد گیاه در نتیجه تقسیم شدن و بزرگ شدن سلول‌ها و همراه با افزایش سطح دیواره سلولی اتفاق می افتد **(Cosgrove, 1993)**. اهمیت دیواره سلولی در رشد و توسعه گیاهان نشان می‌دهد که رشد و گسترش آنها تحت مقرراتی منظم کنترل می‌شود. برخی از موارد سبب تضعیف پیوندهای دیواره سلولی می‌شوند. و برخی از موارد هم سبب افزایش سختی پیوندهای دیواره سلولی می‌شوند **(Cosgrove, 2000b)**. در اغلب بذرها یا دانه‌ها گسترش ریشه چه از طریق ساختارهای اطراف جنین صورت می گیرد که این امر خاتمه جوانه‌زنی و آغازی برای رشد نهال است (**Bewley, 1997a**). در دانه جنین در میان آندوسپرم سخت و محکم تعبیه شده است و در آندوسپرم بخش کوچکی به نام کلاه آندوسپرم وجود دارد که محل شروع تقسیمات سلولی برای تولید ساقه چه است. در ابتدا برای این قسمت محدودیت تقسیم و رشد وجود دارد زیرا ابتدا باید ریشه چه جوانه زده و رشد کند **(Groot *et al.*, 1988)**. تضعیف کلاه آندوسپرم با هیدرولیز دیواره سلولی در ارتباط است **(Watkins *et al.*, 1985)**. آنزیم **endo-β-mannanase** برای کنترل روند تضعیف پیوندهای دیواره سلولی در نظرگرفته شده است و افزایش فعالیت این آنزیم سبب ظهور ریشه چه می‌شود **(Nonogaki & Morohashi, 1996; Nonogaki *et al.*, 2000)**. آنزیم **endo-β-mannanase** برای جوانه زنی ضروری است ولی قطعاً کافی نیست. علاوه بر آنزیم **endo-β-mannanase**، آنزیم‌های دیگری شامل: مانوزیداز، گالاکتوزیداز، سلولاز، پکتین متیل استراز، پلی گالاکتوروناز، آرابینوزیداز، زایلوگلوکان اندوترانس گلیکوزیلاز، β-۱و۳- گلوکاناز و کیتیناز در طول جوانه

زنی بذر گوجه فرنگی بیان می‌شوند **(Groot *et al.*, 1988)**. آنزیم‌های هیدرولاز به تنهایی قادر به تضعیف دیواره سلولی و ظهور ریشه چه نیستند و قطعاً وجود فاکتورهای دیگری ضروری است **(Bewley, 1997b; Toorop *et al.*, 2000)**. پروتئین‌های اکسپنسین یکی از فاکتورهای لازم برای تضعیف دیواره و جوانه زنی محسوب می‌شوند. آنزیم β-گلوکورونیداز بیان ژن اکسپنسین را در زمان جوانه زدن بذر در کلاهک ریشه و مناطقی از ریشه که تفکیک سلول‌ها صورت می گیرد سبب می شود **(Cosgrove, 1998)**. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در گیاهان تراریخته به دلیل داشتن ژن اکسپنسین خود گیاه و همچنین ژن اکسپنسین انتقالی فعالیت این آنزیم ها افزایش پیدا کرده و در نتیجه رشد ریشه و همچنین تشکیل ریشه‌های موئین می‌تواند افزایش پیدا کند. قابلیت انعطاف پذیری سلول گیاهی به واسطه اسیدی شدن دیواره و فعال شدن بیان پروتئین‌های غیرآنزیمی ویژه ای به نام اکسپنسین‌ها تنظیم می‌گردد. اکسپنسین‌ها اساساً به عنوان عامل اصلی برای طویل شدن سلول محسوب می شوند، درحالیکه دیگر مواد نیز می‌توانند ساختار دیواره سلولی را تغییر دهند و با عامل اصلی یعنی اکسپنسین‌ها برای بسط دیواره همکاری کنند. در تعریفی دیگر، اکسپنسین‌ها پروتئین‌های دیواره سلولی هستند که در کل گیاهان روی زمین وجود دارند و توسعه دیواره وابسته به **pH** یا به عبارتی رشد اسیدی را القا می‌کنند. این پروتئین‌ها از طریق سست کردن پیوندهای هیدروژنی بین میکروفیبریل‌های سلولز و پلیمر ماتریکس باعث تغییر شکل تدریجی دیواره می‌شوند و در نتیجه دیواره شل شده و سلول‌ها کشیده می‌شوند **(McQueen-Mason & Cosgrove 1994, Cosgrove 1999)**. اکسپنسین‌ها پروتئین‌های سست-کننده دیواره سلولی و عناصر مهمی در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان هستند **(Cho & Cosgrove 2002)**. این پروتئین‌ها به عنوان عامل اصلی برای افزایش طول دیواره سلولی درنظرگرفته می‌شوند و سایر عوامل به عنوان عامل کمکی برای اکسپنسین‌ها محسوب می‌شوند **(Vissenberg *et al.*, 2000)**. در مطالعه دیگری مشخص شد که ریشه‌های ذرت در شرایط کم آبی به دلیل افزایش فعالیت اکسپنسین‌ها و در نتیجه افزایش توسعه‌پذیری دیواره سلولی و افزایش اندازه سلول قادر به ادامه رشد هستند (**Wu *et al.*, 2001**). در هیپوکوتیل (ساقه) خیار تعدادی از اکسپنسین‌ها مسئول رشد سلول‌ها می‌باشند **(McQueen-Mason, 1995)**. در برنج‌های کشت شده در مناطقی که آب‌های زیر زمینی در عمق وجود دارند، افزایش بیان ژن اکسپنسین ارتباط مستقیمی با افزایش رشد میان گره ریشه‌ها دارد **(Lee & Kende, 2001, 2002)**. در شرایط آزمایشگاهی مشخص شد که اکسپنسین‌ها در رشد سلول‌های هیپوکوتیل ***Arabidopsis thaliana***، و ایجاد ریشه موئین خیار نقش دارند **(Moore *et al.*, 1995)**. نتایج نشان داد، بیان اکسپنسین‌ها سبب تشکیل ریشه موئین در آرابیدوپسیس شده است. **(Cho & Cosgrove, 2002)** همچنین افزایش بیان ژن اکسپنسین **A** سبب افزایش طول ریشه برنج **(Shin *et al.*, 2005)**، ذرت **(Kam *et al.*, 2005)** و سویا **(Lee *et al.*, 2003)** می‌شود. نتایج حاصل از آنالیز لاین‌های تراریخته توتون با سازه ***pBI121:AtEXPA18*** مشخص نمود که لاین **L4** در اندازه‌گیری‌های گلخانه و محلول غذایی هوگلند نسبت به تمام لاین‌های دیگر بهترین عملکرد را داشته است و می‌توان نتیجه گرفت که افزایش بیان ژن اکسپنسین در سلول‌ها صورت گرفته که سبب تضعیف پیوندهای هیدروژنی دیواره‌های سلولی شده و اندازه سلول‌ها افزایش پیدا کرده و در نتیجه طول ریشه لاین‌های **L4** نیز افزایش پیدا کرده است. در نتیجه با افزایش طول ریشه میزان وزن تر ریشه نیز به دلیل بزرگ تر شدن سلول‌ها افزایش می‌یابد و میزان وزن خشک ریشه نیز به دلیل طول بیشتر ریشه از سایر لاین‌ها بیشتر است. افزایش اندازه سلول‌ها در اندام‌های هوایی نیز دیده شده است و در نتیجه مشاهده شده است که لاین **L4** نیز به دلیل بزرگ شدن سلول‌ها و جذب آب بیشتر، دارای بیشترین وزن تر و وزن خشک اندام هوایی نسبت به سایر لاین‌ها می‌باشد.

References:

1. **Aeschbacher, R. A., Schiefelbein, J. W., & Benfey, P. N. (1994). The genetic and molecular basis of root development. *Annual Review of Plant Biology*, *45*(1), 25-45.**
2. **Bewley, J. D. (1997a). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, *9*(7), 1055.**
3. **Bewley, J. D. (1997b). Breaking down the walls—a role for endo-β-mannanase in release from seed dormancy? *Trends in Plant Science*, 2(12), 464-469.**
4. **Brummell, D. A., Harpster, M. H., Civello, P. M., Palys, J. M., Bennett, A. B., & Dunsmuir, P. (1999). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell*, 11(11), 2203-2216.**
5. **Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.**
6. **Cho, H. T., & Cosgrove, D. J. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(12), 3237-3253.**
7. **Cho, H. T., & Kende, H. (1997). Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *The Plant Cell*, 9(9), 1661-1671.**
8. **Choi, D., Cho, H. T., & Lee, Y. (2006). Expansins: Expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum*, 126(4), 511-518.**
9. **Cosgrove, D. J. (1993). Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance.*International Journal of Plant Sciences*, 10-21.**
10. **Cosgrove, D. J. (1998). Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology*, 118(2), 333-339.**
11. **Cosgrove, D. J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 391-417.**
12. **Cosgrove, D. J. (2000a). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1), 109-124.**
13. **Cosgrove, D. J. (2000b). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*,407(6802), 321-326**
14. **Davies, P. J. (2010). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In *Plant Hormones* (pp. 1-15). Springer Netherlands.**
15. **Dunsmuir, P. (1999). Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Molecular Biology*, 39(1), 161-169.**
16. **Fudali, S., Janakowski, S., Sobczak, M., Griesser, M., Grundler, F. M., & Golinowski, W. (2008). Two tomato α-expansins show distinct spatial and temporal expression patterns during development of nematode-induced syncytia. *Physiologia Plantarum*, 132(3), 370-383.**
17. **Garcia, D., Gerald, J. N. F., & Berger, F. (2005). MateRNAl control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(1), 52-60.**
18. **Groot, S. P., Kieliszewska-Rokicka, B., Vermeer, E., & Karssen, C. M. (1988). Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*, 174(4), 500-504.**
19. **Kam, M. J., Yun, H. S., Kaufman, P. B., & Chang, S. C. (2005). Two expansins, EXP1 and EXPB2, are correlated with the growth and development of maize roots. *Journal of Plant Biology*, *48*(3), 304-310.**
20. **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.**
21. **Lee, Y., Choi, D., & Kende, H. (2001). Expansins: Ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology*, *4*(6), 527-532.**
22. **Malekpour M., & Abbasi, A. R., (2013). Height and leaf increase of transgenic tobacco *AtEXPA18 plant Iranian Journal of Crop Science*, 45(3), 389-398. (In Persian)**
23. **McQueen-Mason, S. J. (1995). Expansins and cell wall expansion. *Journal of Experimental Botany*, 46(11), 1639-1650.**
24. **McQueen-Mason, S., & Cosgrove, D. J. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(14), 6574-6578.**
25. **Milioni, D., Sado, P. E., Stacey, N. J., Domingo, C., Roberts, K., & McCann, M. C. (2001). Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia mesophyll* cell system. In *Plant Cell Walls* (pp. 221-238). Springer Netherlands.**

26. **Moore, R. C., Flecker, D., & Cosgrove, D. J. (1995). Expansin action on cells with tip growth and diffuse growth. *Journal of Cellular* Biochemistry Supplement. 21A., 457. (Abstract J5–312).**
27. **Nonogaki, H., & Morohashi, Y. (1996). An endo-[beta]-mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiology*, 110(2), 555-559.**
28. **Nonogaki, H., Gee, O. H., & Bradford, K. J. (2000). A germination-specific endo-β-mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiology*, 123(4), 1235-1246.**
29. **Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., & Nakamura, K. (1990). Construction and expression in tobacco of a β-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant and Cell Physiology*, 31(6), 805-813.**
30. **Ozga, J. A., & Reinecke, D. M. (1999). Interaction of 4-chloroindole-3-acetic acid and gibberellins in early pea fruit development. *Plant Growth Regulation*, 27(1), 33-38.**
31. **Ozga, J. A., van Huizen, R., & Reinecke, D. M. (2002). Hormone and seed-specific regulation of pea fruit growth. *Plant Physiology*, 128(4), 1379-1389.**
32. **Pezzotti, M., Feron, R., & Mariani, C. (2002). Pollination modulates expression of the PPAL gene, a pistil-specific β-expansin. *Plant Molecular Biology*, 49(2), 187-197.**
33. **Ruan, Y. L., Patrick, J. W., Bouzayen, M., Osorio, S., & Fernie, A. R. (2012). Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science*, *17*(11), 656-665.**
34. **Sánchez, R. A., Sunell, L., Labavitch, J. M., & Bonner, B. A. (1990). Changes in the endosperm cell walls of two Datura species before radicle protrusion.*Plant Physiology*, 93(1), 89-97.**
35. **Schiefelbein, J. W., Masucci, J. D., & Wang, H. (1997). Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *The Plant Cell*, 9(7), 1089.**
36. **Shahnejat Bushehri, S., Abbasi, A. R., Alizadeh, H. (2012). Overexpression of AtEXPA18 in Arabidopsis thaliana. *Modern Genetics*, 7(4), 363-370. (In Farsi)**
37. **Shin, J. H., Jeong, D. H., Park, M. C., & An, G. (2005). Characterization and transcriptional expression of the α-Expansin gene family in rice. *Molecules and Cells*, 20(2), 210-218.**
38. **Toorop, P. E., van Aelst, A. C., & Hilhorst, H. W. (2000). The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. *Journal of Experimental Botany*, *51*(349), 1371-1379.**
39. **Varner, J. E., & Lin, L. S. (1989). *Plant Cell Wall Architecture*. *Cell*, *56*(2), 231-239.**
40. **Vissenberg, K., Martinez-Vilchez, I. M., Verbelen, J. P., Miller, J. G., & Fry, S. C. (2000). In vivo colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of Arabidopsis roots. *The Plant Cell*, 12(7), 1229-1237.**
41. **Watkins, J. T., Cantliffe, D. J., Huber, D. J., & Nell, T. A. (1985). Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *110*(1), 61-65.**
42. **Whitney, S. E., Gidley, M. J., & McQueen-Mason, S. J. (2000). Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *The Plant Journal*, 22 (4), 327-334.**
43. **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 Physiology*, *126*(4), 1471-1479.**
44. **YIM, K. (2000). Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In *Seed Biology: Advances and Applications: Proceedings of the Sixth International Workshop on Seeds, Mérida, México, 1999* (p. 231). CABI.**