مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۴، شماره ۳، ۱۳۹۲ (۳۷۷-۳۷۱)

انتقال سازه pBI121:*AtEXPA1* به گیاه توتون(*Nicotiana tabacum*)

میلاوه شیرازی[۱]، علیرضا عباسی[۲]، علیرضا طالعی[۳] و رحیم سروستانی[۱*]
۱، دانشجویان کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۲ و ۳، استادیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۵ - تاریخ تصویب: ۹۲/۴/۱۸)

چکیده

اکسپنسین ها یک نوع پروتئین سست کننده دیواره سلولی هستند که قادرند انبساط دیواره سلولی را در روش های وابسته به pH بدون هیدرولیز اجزای اصلی ساختار دیواره سلولی، واسطه کنند. ژن *AtEXPA1* آرابیدوپسیس بطور اختصاصی در سلول های روزنه بیان شده و رفتار روزنه ای را کنترل می کند. هدف از این مطالعه انتقال ژن *AtEXPA1* آرابیدوپسیس به گیاه توتون و بررسی اثر آن روی فنوتیپ گیاهان بدست آمده بود. از روش تراریختی به واسطه *آگروباکتریوم* برای انتقال سازه pBI121:*AtEXPA1* به توتون استفاده شد. فعال بودن تراژن با روش RT-PCR و آغازگر های اختصاصی تایید شد. نتایج نشان داد که سلول های روزنه گیاهان تراریخت بدست آمده تحت تاثیر نور و متعاقب آن اسیدی شدن سلول های روزنه دچار یک گسترش برگشت ناپذیر شده، که در نتیجه آن در دمای بالا آب گیاه از دست رفته و پژمرده می شود. این نتایج نشان می دهد که *AtEXPA1* یک ژن مرتبط با رفتار روزنه ای است و ممکن است در شرایط محیطی مختلف در تنظیم آب سلولی دخیل باشد.

واژه های کلیدی: **اکسپنسین، انتقال ژن، *AtEXPA1*، محتوای نسبی آب گیاه، رفتار روزنه ای**

مقدمه

پروتئین های اکسپنسین متعلق به یک ابر خانواده ژنی هستند و در سراسر قلمرو گیاهی یافت می شوند (Li et al., 2002) این پروتئین ها به دو خانواده آلفا(α) و بتا (β) تقسیم شده اند (Cosgrove, 2000a).

اکسپنسین ها یک نوع پروتئنین سست کننده دیواره سلولی هستند که قادرند انبساط دیواره سلولی را در روش های وابسته به pH بدون هیدرولیز اجزای اصلی ساختار دیواره سلولی واسطه کنند (Durachko & Cosgrove, 2009). اکسپنسین ها به عنوان بازیگران اصلی سست شدن دیواره سلولی مورد توجه قرار گرفته اند و توانایی آنها در بازگرداندن انبساط طولانی مدت دیواره سلولی منجر به شناسایی آنها شد (McQueen-Mason et al., 1992). مکانیسم عمل اکسپنسین ها شامل تخریب پیوند های هیدروژنی بین اتصالات عرضی گلیکان‌های دیواره سلولی و میکروفیبریل های سلولزی است (McQueen-Mason & Cosgrove, 2000). این پروتئین ها اولین بار از جوانه های خیار و متعاقبا از سایر بافت های گیاه استخراج شدند که وزن مولکولی آنها در حدود ۲۶۰۰۰ دالتون است (McQueen-Mason et al., 1992).

هر روز بر تعداد توالی های ژنی قابل دسترس این خانواده افزوده می شود. از زمان گزارش اولین توالی اکسپنسین تاکنون، مطالعات زیادی پیرامون نقش های این خانواده بزرگ پروتئینی در رشد، نمو و توسعه سلولی گیاهان مختلف از جمله همبستگی بیان ژن های اکسپنسین با رشد میانگره ها در برنج آب عمیق (Deep Water؛ Lee & Kende, 2001; 2002)، همبستگی بیان ژن های *AtEXPA7* و *AtEXPA18* آرابیدوپسیس با تشکیل ریشه های مویین(Cho & Cosgrove, 2004)، نقش آنها در توسعه و نرم شدن میوه ها به هنگام رسیدگی در گیاهان

* نویسنده مسئول: رحیم سروستانی تلفن: ۰۹۳۷۵۶۰۰۳۳۱ E-mail: sarvestanir@ut.ac.ir

مختلف (Reidy et al., 2001; Hiwasa et al., 2003; Kalamaki et al., 2003 a & b; Kitagawa et al., 2005)، افزایش بیان ژن های آلفا-اکسپنسین در ذرت تحت تنش خشکی(Sabirzhanova et al., 2005)، و بیان بسیار بالای ژن *GmEXP1* در مناطق دارای رشد سریع مانند نوک رشه و ساقه (Lee et al., 2003) منتشر شده است.

به دلیل معلوم بودن توالی ژنومی آرابیدوپسیس، تاکنون ژن های اکسپنسین زیادی از آن جداسازی و نقش آنها بررسی شده است. گزارش شد که ژن *AtEXPA4* در رشد و نمو، ژن های *AtEXPA7* و *AtEXPA18* در تولید ریشه های مویین، ژن *AtEXPA5* در تنظیم فاکتور رشد BZR1 و ژن *AtEXPA10* در ریزش برگ ها مشارکت دارند(Zhang et al., 2011).

ژن اکسپنسین A1 آرابیدوپسیس(*AtEXPA1*) یکی دیگر از ژن های این خانواده؛ بطور اختصاصی در سلول های روزنه برگ های بالغ بیان می شود (Cosgrove, 2000b). این ژن دارای طول قطعه رمز کننده ۷۵۳ bp است که ۲۵۱ اسید آمینه را با وزن مولکولی ۲۶/۵ kD رمز می کند. اخیرا، ژن *AtEXPA1* در آرابیدوپسیس تشدید بیان شده و نشان داده که می تواند سرعت باز شدن روزنه را افزایش دهد (Zhang et al., 2011).

یکی از فاکتور های مهم در تحمل تنش های گرمایی و خشکی در گیاهان، حفظ آب و کنترل وضعیت آبی گیاه از طریق رفتار روزنه ای است و با توجه به تاثیر خانواده پروتئینی اکسپنسین بر رشد و نمو گیاهان، ژن های این خانواده به عنوان ژن های دارای پتانسیل در ایجاد گیاهان بهتر و مقاومتر به این تنش ها مورد توجه اند. به همین دلایل هدف از این مطالعه جداسازی ژن *AtEXPA1* از آرابیدوپسیس و انتقال آن به گیاه توتون با واسطه اگروباکتریوم و سپس بررسی تاثیر آن بر روابط آبی و ویژگی های رشدی آن می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و آزمایشگاهی

در این مطالعه از گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) رقم کلمبیا جهت جداسازی و تکثیر ژن *AtEXPA1* و توتون (*Nicotiana tabacum*) رقم سامسونگ جهت انتقال ژن به آن استفاده شد. باکتری های مورد استفاده شامل *E.coli* سویه DH5α و *آگروباکتریوم تومفاشینس* سویه LBA4404 به عنوان میزبان های حدواسط بودند. از پلاسمید pGEMT شرکت پرومگا (دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین)، و ناقل دوگانه pBI121 که دارای ژن *gus*، مقاومت به کانامایسین و پروموتر CaMV35S می باشد برای انتقال ژن *AtEXPA1* به توتون استفاده شد. استخراج DNA ژنومی به روش CTAB و استخراج RNA از گیاه آرابیدوپسیس و گیاهان توتون تراریخت احتمالی با کیت استخراج Biozol و ساخت رشته مکمل نیز با کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز انجام شد.

ساخت سازه pBI121:*AtEXPA1* و انتقال آن

برای تکثیر ژن *AtEXPA1* از cDNA گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* دو آغازگر اختصاصی پیشرو (5'- **GGATCC**ATGGCTCTTGTCACCTTCTTG- 3' : AtEXPB2-F) و پسرو (5'- **GAGCTCC**TAACGTAGCTGCGCACCTG - 3' : AtEXPB2-R) با استفاده از توالی این ژن طراحی گردید و به منظور کلون کردن قطعه مورد نظر در ناقل گیاهی pBI121 توالی آنزیم برشی *Bam*HI در آغازگر پیشرو و *Sac*I در آغازگر پسرو اضافه شد.

یک جفت آغازگر اختصاصی پیشرو (NptII-F : 5'-GGCTATTCGGCTATGACTGG- 3') و پسرو (NptII-R : 5'-GGATACTTTCTCGGCAGGAG-3') نیز از توالی ژن مقاومت به کانامایسین ناقل pBI121 برای تایید گیاهان تراریخت مورد استفاده قرار گرفت. ژن *AtEXPA1* با واکنش زنجیره پلی مراز و آغازگرهای اختصاصی از cDNA آرابیدوپسیس بوسیله کیت تکثیر شرکت فرمنتاز(C.N: EP0571) و آنزیم *Pfu* تکثیر شد. لازم به ذکر است که قطعه تکثیر شده با این آنزیم فاقد نوکلوتید انتهایی A می باشد و بنابراین برای همسانه سازی آن در ناقل pGEMT نیاز به اضافه نمودن نوکلوتید A به انتهای قطعات بود که پس از جداسازی قطعه تکثیر شده از روی ژل به روش glassmilk (Sambrook & Rusell, 2001) به انتهای قطعات بازیابی شده نوکلوتید A اضافه شد. برای همسانه سازی ژن در ناقل pBI121، پلاسمید حاوی ژن *AtEXPA1* و

ناقلpBI121 توسط آنزیم های برشی *BamH*I و *Sac*I برش زده و واکنش اتصال قطعات انجام شد.

استخراج پلاسمید، واکنش هضم با آنزیم های برشی ذکر شده، تهیه سلول های مستعد، تراریخته کردن باکتری ها با استفاده از روش حرارتی و واکنش اتصال مطابق دستورالعمل های سمبروک و راسل (Sambrook and Rusell, 2001) انجام شد. از محیط LB برای رشد باکتری ها استفاده شد و تراریخته کردن اگروباکتریوم به روش انجماد و ذوب انجام گرفت (Walker, 2006). از روش هضم آنزیمی برای تایید پلاسمید های نوترکیبpBI121 و از کلنی PCR برای تایید کلنی های نوترکیب آگروباکتریوم استفاده شد. از آنتی بیوتیک های آمپیسیلین و کانامایسین برای غربال سلول های گیرنده پلاسمید های مربوطه استفاده شد. به منظور انتقال سازه pBI121:*AtEXPA1* (شکل ۱ج.) به گیاهان توتون، ریز نمونه های گیاهی پس از تلقیح با آگروباکتریوم حامل سازه ژنی به مدت دو الی پنج روز به محیط هم کشت منتقل شدند (شکل۲الف.). سپس، به منظور باززایی مستقیم ریزنمونه های آلوده شده با آگروباکتری، به محیط کشت انتخابی القاء نوساقه منتقل شده(شکل ۲ب.)، و پس از آن به منظور واکشت آنها به محیط انتخابی ساقه زایی منتقل شدند. پس از رشد گیاهچه ها در محیط ساقه زایی و رسیدن به رشد رویشی مناسب، نمونه ها به محیط ریشه زایی منتقل(شکل ۲ج.) و سرانجام به گلدان منتقل(شکل۲د.) شدند و مورد بررسی های بعدی قرار گرفتند. یادداشت های فنوتیپی در مراحل مختلف باززایی و رشدی گیاه و آنالیز بیان ژن انتقالی با استفاده از cDNA برگ ها انجام شد. ترکیبات بکار رفته در محیط کشت های مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ترکیبات بکار رفته در محیط کشت های مورد استفاده در این تحقیق

نوع محیط	ترکیب محیط کشت های مورد استفاده
هم کشت	محیط کشتMS - ۳۰ گرم در لیتر گلوکز - ۱۰۰ میلی گرم در لیتر میواینوزیتول - ۸-۶ گرم در لیتر آگار
محیط کشت القاء نوساقه	محیط کشت MS - ۳۰ گرم در لیتر ساکارز - ۱۰۰ میلی گرم در لیترمیواینوزیتول - ۸-۶ گرم در لیتر آگار - ۴/۵ میلی گرم در لیتر BAP - ۴۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم
محیط کشت ساقه زایی	محیط کشت MS - ۳۰ گرم در لیتر ساکارز - ۱۰۰ میلی گرم در لیترمیواینوزیتول - ۸-۶ گرم در لیتر آگار - ۴۰۰ میلی گرم در لیترسفوتاکسیم - ۵۰ میلی گرم در لیترکانامایسین
محیط کشت ریشه زایی	محیط کشت MS ½ - ۱۰ گرم در لیتر ساکارز - ۱۰۰ میلی گرم در لیترمیواینوزیتول - ۸-۶ گرم در لیتر آگار - ۴۰۰ میلی گرم در لیترسفوتاکسیم

اندازه گیری RWC[1]

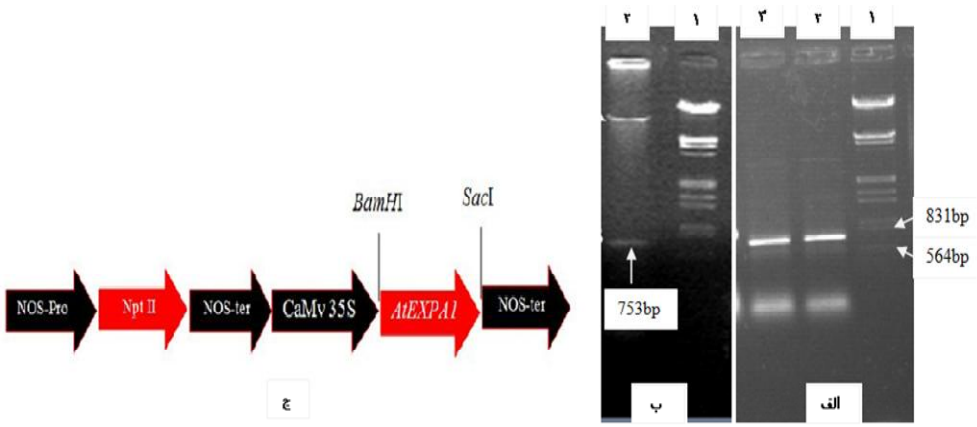
میزان محتوای نسبی آب گیاهان با قرار دادن نمونه های برگی در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر برای مدت زمان ۱۸-۱۶ ساعت در شرایط تاریک و سپس توزین نمونه ها (وزن اشباع) و خشک کردن برگ ها در آون ۷۰Ċ به مدت ۷۲ ساعت و اندازه گیری وزن خشک آنها مطابق رابطه زیر (Schonfeld et al., 1988) محاسبه شد:

RWC = [وزن تازه- وزن خشک / وزن اشباع - وزن خشک] × 100

نتایج و بحث

ژن *AtEXPA1* به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز و آغازگرهای اختصاصی آن با آنزیم *Pfu* از cDNA گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* تکثیر شد. نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز منجر به تکثیر قطعه ای ۷۵۳ جفت بازی شده که معادل با طول cDNA ژن *AtEXPA1* گیاه آرابیدوپسیس می باشد(شکل ۱ الف.). قطعه تکثیر یافته ابتدا در حامل واسطه pGEMT و سپس در ناقل دوگانه pBI121 کلون شد. جهت تایید سازه pBI121:*AtEXPA1* واکنش هضم، با آنزیم های برشی *Bam*HI و *Sac*I صورت گرفت که نتیجه آن در شکل ۱ب. آورده شده است. دارا بودن قطعه ۷۵۳ جفت بازی دلیل نوترکیب بودن کلون های های مورد نظر می باشد، و از آنها برای تراریختی گیاهان توتون استفاده شد.

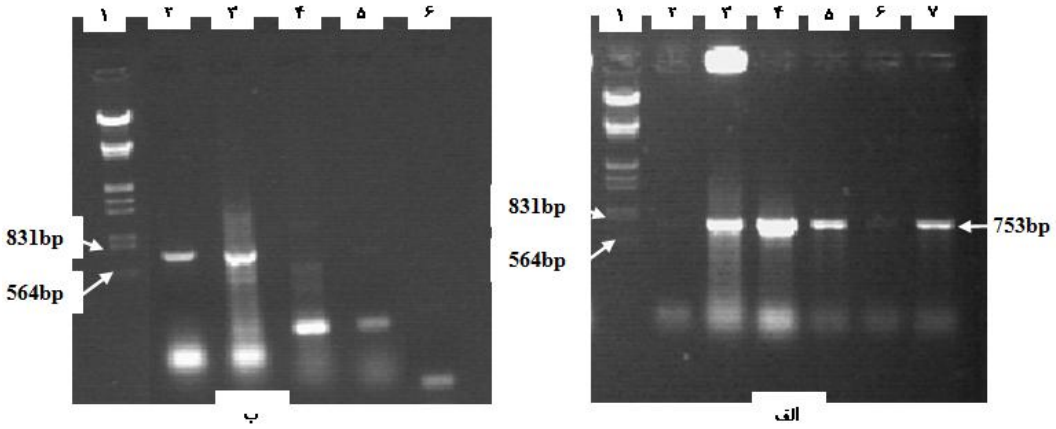
1. Relative Water Content



شکل ۱- الف، تکثیر cDNA ژن *AtEXPA1*چاهک ۱ سایزمارکر sm0191 شرکت فرمنتاز، چاهک ۲و ۳ نمونه های تکثیر شده . ب، هضم آنزیمی سازه pBI121:*AtEXPA1* ، چاهک ۱ سایز مارکر sm0191 شرکت فرمنتاز، چاهک ۲ سازه برش یافته و تولید قطعه ۷۵۳bp از آن. ج، شمای کلی از سازه ساخته شده pBI121:*AtEXPA1* .

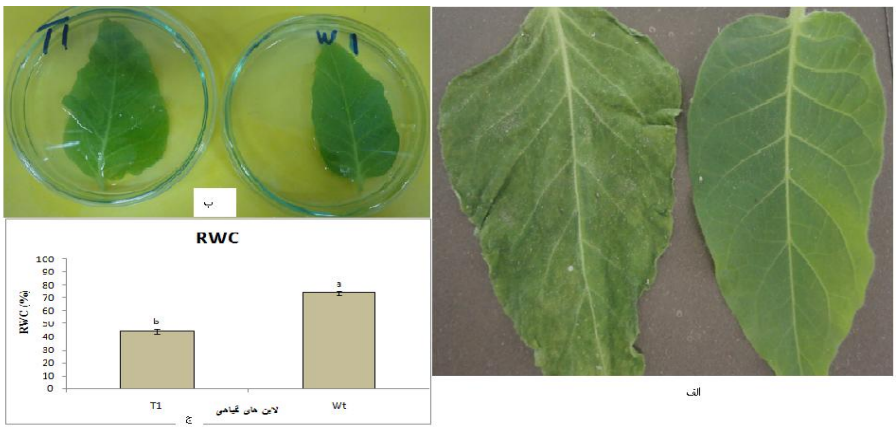
تایید نهایی کلون های باکتریایی که برای آلوده کردن گیاهان مورد استفاده قرار گرفته اند، و لاین های تراریخت احتمالی بدست آمده با آغازگر های اختصاصی به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز انجام و نتیجه آن در شکل ۳الف. آمده است. تایید حضور ژن *AtEXPA1* در گیاهان باززا شده در سطح رونویسی با آغازگر های اختصاصی ژن های *AtEXPA1* و *NptII* در واکنش RT-PCR مورد بررسی و حضور رونوشت های ژن انتقالی در cDNA لاین های تراریخته تایید شد (شکل ۳ب).

شکل ۲- مراحل انتقال ژن و باززایی مستقیم گیاهان توتون. الف، انتقال ریز نمونه ها به محیط هم کشت. ب، محیط انتخابی القای نوساقه حاوی کانامایسین. ج، انتقال گیاهچه های باززا شده به محیط ریشه زایی. د، انتقال گیاهان بدست آمده به گلدان.



شکل ۳- الف، تکثیر ژن *AtEXPA1* با آغازگر های اختصاصی، چاهک ۱= سایز مارکر smo191 شرکت فرمنتاز، ۲=کنترل منفی، ۳=کلون *E.coli*، ۴=کلون آگروباکتریوم، ۵، ۶ و۷= گیاهان تراریخت احتمالی ب، تکثیر ژن های *AtEXPA1* و*NptII* از cDNA گیاهان تراریخت با آغازگر های اختصاصی چاهک های ۱= سایز مارکر، ۲و ۳ ژن*AtEXPA1* و ۴و۵ ژن *NptII* و چاهک ۶: cDNA گیاه شاهد و آغازگر های اختصاصی ژن *AtEXPA1*

اکسپنسین ها در شرایط pH اسیدی فعالیت داشته و باعث توسعه دیواره سلولی می شوند. بنابراین به منظور بررسی تاثیر نور، یک لاین تراریخته همراه با لاین وحشی(گیاه شاهد) در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران در معرض نور شدید و دمای بالا (۴۰ درجه سانتی گراد) قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت و ایجاد پژمردگی، گیاهان دوباره در دمای عادی (۲۵ درجه سانتی گراد) و رطوبت نرمال قرار داده شدند. با وجود اینکه گیاهان وحشی کم کم شادابی خود را بدست آورده و به حالت عادی برگشتند اما تغییری در گیاهان تراریخته ایجاد نشد(شکل۴الف). برای همین منظور محتوای آب نسبی(RWC) برای هر دوگیاه در دو تکرار محاسبه و نتایج آن در شکل ۴ج. آورده شده است، نتایج نشان داد که RWC گیاهان تراریخته (۴۴/۲٪) به طور بسیار معنی داری($p>0.01$) از گیاهان وحشی (۷۳/۳۵٪) کمتر بود.



شکل ۴- الف، فنوتیپ گیاهان تراریخته(چپ) و شاهد(راست) بعد از رفع تنش. ب، برگ های تنش دیده گیاهان تراریخته(T_1) و شاهد(W_1) بعد از مرحله اشباع آبی . ج، نمودار مقدار محتوای نسبی آب گیاهان تراریخته و شاهد بعد از رفع تنش گرما.a وb حروف معنی داری را نشان می دهند.

به خوبی ثابت شده که خانواده بزرگ ژنی اکسپنسین دارای نقش های مختلفی در رشد و نمو بخش های متنوع گیاهی می باشند و نقش مهمی در تنظیم توسعه پذیری دیواره سلولی دارند

(Zenoni et al., 2004). علاوه بر این، در بسیاری از گونه ها و بافت های گیاهی شناسایی شده اند (Cho & Cosgrove, 2002). در آرابیدوپسیس ژن *AtEXPA1* در سلول های روزنه برگ های بالغ بیان شده و رفتار روزنه را کنترل می کند و بیان آن تحت کنترل پیش برنده CaMV35S باعث تسهیل باز و بسته شدن روزنه ها شد (Zhang et al., 2011).

اکسپنسین ها در راههای وابسته به pH عمل می کنند (McQueen-Mason et al, 1992)، و در اینجا دمای بالا و نور شدید موجب پژمردگی برگشت ناپذیر در گیاهان تراریخته شده است. نتایج آزمایش RWC نشان داد که محتوای آب گیاهان تراریخته که باید بوسیله روزنه کنترل شود به مقدار قابل توجهی پایین است. از طرف دیگر تحت شرایط pH اسیدی(pH=4.5)؛ که در آن پروتئین های اکسپنسین کاملا فعال هستند؛ نسبت به pH فیزیولوژیکی(pH=6.1)، روزنه های گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس با تشدید بیان *AtEXPA1*، بسیار سریعتر باز می شوند(Zhang et al., 2011). سرعت عمل اکسپنسین ها نسبت به دیگر آنزیم های هیدرولیز کننده دیواره سلولی بالاتر است(Sampedro and Cosgrove, 2005). بطور کلی این نتایج پیشنهاد می کند که احتمالا نور به عنوان یک محرک طبیعی، H^+-ATPas های غشای پلاسمایی سلول نگهبان را فعال کرده و موجب انتقال یون های H^+ به فضای خارج سلولی می شود و با تجمع H^+، دیواره سلولی اسیدی شده و فعالیت اکسپنسین ها (بطور خاص ژن *AtEXPA1*) را تحریک می کند(Wei et al, 2011)، و فعالیت اکسپنسین ها موجب تخریب پیوند های غیر کوولان بین میکروفیبریل های سلولزی و ماتریس گلوکان شده(McQueen-Mason & Cosgrove, 2000) و سر خوردن دیواره سلولی و در نهایت باز شدن سریع روزنه را موجب می شود که در نهایت یک باز شدن(گسترش) غیر قابل برگشت در روزنه ایجاد شده و موجب از دست رفتن آب گیاه می شود.

همچنین آنالیز مولکولی با Anti-*AtEXPA1* نشان داد که وجود این ژن برای آماس سلول های روزنه و باز و بسته شدن آنها ضروری است (Zhang et al., 2011). علاوه بر این، نتایج اندازه گیری RWC و نیز مشاهدات فنوتیپی (شکل ۴ب.) نشان می دهد که در مرحله اشباع، گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان وحشی آب بیشتری جذب کرده اند که احتمالا ناشی از توسعه بیشتر سلول های آنها در اثر فعالیت ژن *AtEXPA1* می باشد. این نتایج با نتایج تشدید بیان *AtEXPA1* در آرابیدوپسیس که در آن سرعت باز شدن روزنه که بوسیله نور تحرک می شود افزایش یافته بود(Zhang et al., 2011)، نیز مطابقت دارد.

نتیجه گیری

در اینجا، ژن*AtEXPA1*، که در تنظیم باز و بسته شدن روزنه دخالت دارد، تحت پیش برنده CaMV35S به گیاهان توتون منتقل گردید و آنالیز RT-PCR وجود رونوشت های این ژن را در cDNA گیاهان توتون تایید کرد. نتایج اولیه نشان داد که گیاهان بدست آمده تحت تاثیر نور و متعاقب آن اسیدی شدن سلول های روزنه دچار یک گسترش برگشت ناپذیر شده، که در نتیجه آن در دمای بالا آب گیاه از دست رفته و پژمرده می شود. این نتایج پیشنهاد می دهد که ژن *AtEXPA1* مرتبط با رفتار روزنه ای است. همچنین مطالعات آینده پیرامون بررسی الگوی بیان این ژن و تاثیرات مختلف آن بر روی فنوتیپ تحت تنش های مختلف زیستی و محیطی در بافت های مختلف بویژه سلول های روزنه نسل های بعدی گیاهان تراریخته بدست آمده، انجام خواهد شد.

REFERENCES

1. Cho, H. T. & Cosgrove, D. J. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, 14, 3237–3253.
2. Cho, H. T. & Cosgrove, D. J. (2004). Expansins as agents in hormone action. In: P. J. Davies (3th End) *Proceeding of Plant Hormones* (pp 262–281). Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands.
3. Cosgrove, D. J. (2000a). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407, 321–326.
4. Cosgrove, D. J. (2000b). Expansive growth of plant cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38,109-124.

5. Durachko, D. M. & Cosgrove, D.J. (2009). Measuring plant cell wall extension (Creep) induced by acidic pH and by alpha-expansin. *J Vis Exp*, 25.
6. Hiwasa, K. Rose, J. K .C. Nakano, R. Inaba, A. & Kubo, Y. (2003). Differential expression of seven α-expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Physiologia Plantarum*, 117, 564–572.
7. Kalamaki, M. S. Palys, J. M. Labavitch, J. M. Reid, D. S. & Brummell, D. A. (2003). Simultaneous transgenic suppression of *LePG* and *LeExp1* influences rheological properties of juice and concentrates from a processing tomato variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7456–7464.
8. Kalamaki, M. S. Powell, L. T. A. Struijs, K. Labavitch, J. M. Reid, D. S. & Bennett, A. B. (2003). Transgenic overexpression of expansin influences particle size distribution and improves viscosity of tomato juice and paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,51, 7465-7471.
9. Kitagawa, M. Ito, H. Shiina, N. Nakamura, N. Inakuma, T. Kasumi, .T Ishiguro, Y. Yabe, K. & Ito, Y. (2005). Characterization of tomato fruit ripening and analysis of gene expression in F1 hybrids of the ripening inhibitor (rin) mutant. *Physiologia Plantarum*, 123, 331–338.
10. Lee Y. & Kende H. (2002). Expression of α-expansin and expansin-like genes in deepwater rice. *Plant Physiology*, 130, 1396–1403.
11. Lee, D. K. Ahn,J. H. Song, S.K. Choi, Y. D. Lee, J. S. (2003). Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiology*, 131, 985–997.
12. Lee, Y. & Kende, H. (2001). Expression of b-expansins is correlated with internodal elongation in deepwater rice. *Plant Physiology*, 127, 645–654.
13. Li, Y. Darley, C. P. Ongaro, V. Fleming, A. Schipper, O. Baldauf, S. L. & McQueen-Mason , S. J. (2002). Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiology*, 128, 854-864.
14. McQueen-Mason, S. J. & Cosgrove, D. J. (2000). Disruption of hydrogenbonding between plant-cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 6574-6578.
15. McQueen-Mason, S. J. Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell-wall extension in plants. *Plant Cell*, 4, 1425-1433.
16. Reidy, B. McQueen-Mason, S. J. Nosberger, J. & Fleming, A. (2001). Differential expression of α- and β-expansin genes in the elongation leaf of *Festuca pratensis*. *Plant Molecular Biology*, 46, 491–504.
17. Sabirzhanova, I. B. Sabirzhanov, B. E. Chemeris, A. V. Veselov, D. S. & Kudoyarova, G. R. (2005). Fast changes in expression of expansin gene and leaf extensibility in osmotically stressed maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry*; 43, 419–422.
18. Sambrook, J. & Rusell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3th Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
19. Sampedro, J. & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6:242-250.
20. Schonfeld, M. A. Carver, B. F. & Mornhinweg, D. W. (1988). Water relations in winter wheat as drought resistance indicator. *Crop Science*. 28, 526-531.
21. Walker, J. M. (2006). *Agrobacterium Protocols*. Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208.
22. Wei, P.C Zhang, X.Q. Zhao, P. & Wang, X.C. (2011). Regulation of stomatal opening by the guard cell expansin AtEXPA1. *Plant Signaling & Behavior*. 6, 740–742.
23. Zenoni, S. Reale, L. Tornielli, G. B. Lanfaloni L. Porceddu, A. & Ferrarini, A. (2004). Down-regulation of the *Petunia hybrida* expansin gene *PhEXP1* reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs. *Plant Cell*, 16,295–308.
24. Zhang, X.Q. Wei, P. C. Xiong, Y. M. Yang, Y. Chen, J. & Wang, X. C. (2011). Overexpression of the *Arabidopsis* α-expansin gene AtEXPA1 accelerates stomatal opening by decreasing the volumetric elastic modulus. *Plant cell Reports*, 30,27–36.