Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 52, No 1, Spring 2021 (1-11)
DOI: 10.22059/ijfcs.2017.132493.653947

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۱، بهار ۱۴۰۰ (ص ۱۱-۱)

اثر ژن *AtEXPB2* بر روی برخی از صفات زایشی و رویشی گیاه تراریخت توتون تحت شرایط نرمال

مریم چاله‌کائی، علیرضا عباسی*، صدیقه یوسفی، داوود داداشی

گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۳۰- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۲)

چکیده

اسیدی‌شدن دیواره‌سلولی معتبرترین علت توسعه‌پذیری سریع سلول‌ها است. اکسپنسین‌ها نوعی پروتئین سست کننده دیواره سلولی هستند که به‌واسطه تغییرات pH، قادربه انبساط دیواره سلولی می‌باشند. در این تحقیق ژن *AtEXPB2* با استفاده از روش تراریختی برگی توتون، به این گیاه منتقل‌شد. گیاهان حاصل از باززایی روی محیط انتخابی (دارای کانامایسین) گزینش و به گلخانه منتقل‌شدند. برای اثبات تراریختی گیاهان، استخراج DNA انجام و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژن *AtEXPB2* آزمایش PCR انجام شد. سپس از گیاهان کشت‌شده در گلخانه بذرگیری شد و از سه لاین تراریخت در ادامه کار استفاده‌شد. این بذور در روی محیط کشت انتخابی حاوی کانامایسین کشت‌شدند و تنها گیاهچه‌های تراریخت قادر به ادامه رشد در این محیط بودند. سپس گروهی از این گیاهان تراریخت به گلخانه و گروهی به‌منظور بررسی صفات مورفولوژیکی ریشه به گلدان‌های حاوی محلول غذایی هوگلند منتقل‌شدند. بررسی‌ها نشان‌داد که در اکثر صفات موردمطالعه، گیاهان تراریخت دارای اندام‌های بزرگ‌تری هستند. برای نمونه افزایش تعداد کپسول، وزن‌کل بذرها، وزن‌تر ریشه و غیره مشاهده‌شد که نقش این ژن را به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد عمومی برای حصول گیاهان تراریخت با اندام بزرگ‌تر و همچنین متحمل به تنش‌هایی از قبیل شوری و خشکی پیشنهاد می‌کند

واژه‌های کلیدی: اکسپنسین، بسط دیواره سلولی، توتون، گیاهان تراریخت، *AtEXPB2*

Effect of foliar application of zinc, iron, and manganese on morphological, and phytochemical traits of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.)

Maryam Chalrkaei, Alireza Abbasi*, Sedigheh Yusefi, Davood Dadashi

Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran,

(Received: September 20, 2016 - Accepted: June 12, 2017)

ABSTRACT

Acidification of cell wall is the most valid cause of fast cell expansion. Expansins are a kind of wall loosening protein that can expand wall through pH changes. In this study *AtEXPB2* gene was transferred to tobacco plant. Regenerated plants were cultured in selective medium (contained kanamycin) then transgenic plants were selected and afterward transmitted to greenhouse. To confirm transgenic plant DNA was extracted from them and PCR was down via specific primer of *AtEXPB2*. Seed was collected from transgenic plants and seed of three transgenic lines were cultured in MS selective medium. Transgenic seedlings tolerate medium which contain kanamycin. Subsequently some of these seedlings were grown in greenhouse and others were grown in Hoagland nutrient solution for evaluating root morphology. The results indicated that transgenic lines had bigger organs in most of the measured traits. For example capsule number, total seed weight, root length, root fresh weight and so on were increased in transgenic lines in comparison to wild type plant. These results suggested a specific role for this gene as a common growth regulator that could be used to produce transgenic plants with larger organs as well as tolerant to stresses like drought and salinity.

Keywords: *AtEXPB2, cell wall extension, expansin, tobacco, transgenic plant*

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

مقدمه

در گیاهان دیواره سلولی یک ساختار مهم محسوب می‌شود که شکل سلول را تعیین می‌کند (Varner & Lin, 1989). یک سلول گیاهی معمولاً در طول نمو ۱۰۰الی ۱۰۰۰ برابر از خود افزایش حجم نشان‌می‌دهد. سلول‌های گیاهی با دیواره‌های سلولی دارای ترکیبات فیبری مستحکمی پوشش‌دار شده‌اند و توسعه سلولی به توانایی توسعه دیواره وابسته است. عواملی مانند نور، جاذبه و هورمون‌ها سبب رشد گیاه شده و این اثر عمدتاً بدلیل توسعه پذیری سلول‌ها است. البته برخی از محققین براین عقیده‌اند که رشد سلول گیاهی نهایتاً به‌دلیل توسعه پذیری دیواره سلولی است (McQueen-Mason & Rochange, 1999). آزمایشات اخیر نشان داده است که در pH طبیعی توسعه دیواره سلولی متوقف می‌شود، اما زمانی که pH دیواره کاهش می‌یابد، توسعه سریع‌تر اتفاق می‌افتد (Cosgrove, 2000) و این نوع از توسعه سلولی تنها زمانی صورت می‌گیرد که دیواره به وسیله اکسپنسین‌ها و یا سایر عوامل سست می‌گردد. در غیر این صورت میکروفیبریل‌های سلولوزی به وسیله پلی‌ساکاریدهای ماتریکس به‌صورت مستحکم قرار گرفته‌اند (Cosgrove, 2005).

اعضای خانواده *EXPA* و *EXPB* دارای فعالیت سست کننده‌گی دیواره سلولی هستند (McQueen-Mason *et al*., 1992). فعالیت اکسپنسین‌ها اغلب مربوط به سلول‌های در حال رشد است (lee *et al*., 2001). این ارتباط از طریق آزمایش‌هایی که در آن‌ها بیان ژن‌های اکسپنسین در گیاهان تراریخت دست‌ورزی شده‌اند، به اثبات رسیده است (Choi *et al*., 2003). بیان ژن *GmEXPA1* ریشه سویا در گیاه توتون موجب تسریع در رشد ریشه شده‌است. در مورد ریشه‌های جو آغاز تولید ریشه مویین با افزایش بیان *HvEXPB1* همراه بوده است (Kwasniewski & Szarejko, 2006).

در ذرت افزایش بیان اکسپنسین‌ها موجب بسط بیش‌تر دیواره سلولی ریشه مخصوصاً در نقاط رأسی ریشه شده است (Wu & Cosgrove, 2000). اکسپنسین‌ها می‌توانند به‌صورت کاملا متفاوتی به‌وسیله سیگنال‌های محیطی و هورمون‌ها تنظیم‌شوند (Lee *et al*., 2001). در تحقیقات Li *et al*., (2013) گیاهان توتون تشدید بیان‌شده با ژن اکسپنسین گندم *TaEXPB23* در شرایط نرمال رشدشان تغییرکرده بود به طوریکه دارای رشد سریع‌تر در مرحله گیاهچه‌ای، گلدهی و رسیدگی زودتر و کاهش ارتفاع در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت بودند. بنابراین به‌منظور بررسی اثر ژن *AtEXPB2* بر روی مورفولوژی گیاه این ژن از گیاه آرابیدوپسیس جداسازی و تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35s به گیاه توتون منتقل‌شد. سپس اندازه‌گیری صفات مورفولویک در دو شرایط (گلخانه و کشت در محلول هوگلند) به‌منظور بررسی اثر ژن انجام‌شد.

مواد و روش‌ها

تراریختی توتون از طریق اگروباکتری

ژن جداسازی شده *AtEXPB2* با استفاده از ناقل pGEM-T به باکتری *Escherichia Coli* DH5α منتقل شده است. سپس قطعه ژنی با استفاده از دو آنزیم برشی SacI و BamH1 برش داده شده‌اند و تحت پیشبرنده Camv 35s و خاتمه‌دهنده NOS به درون ناقل گیاهی PBI121 درج شده‌اند (Sinjali *et al*., 2013). سازه ساخته شده به سویه LBA4404 باکتری *Agrobacterium tumefasciens* منتقل‌شدند و باکتری‌های تلقیح شده با سازه موردنظر در محیط LB انتخابی (حاوی کاناماسین و ریفامپسین) کشت‌شدند و برای تلقیح برگ‌های توتون مورد استفاده قرارگرفتند. جهت تأیید حضور سازه‌ژنی در آگروباکتری، از کلونی‌های رشدکرده بر روی محیط LB انتخابی برای انجام PCR نمونه‌گیری انجام شد و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیشرو $(5' - GGATCCATGACAATTCTTGTCGTAGATCG - 3')$ و پسرو$(5' - GAGCTCTTAAAAGTTGACGTTGGATTTGTA - 3')$ طراحی شده بر اساس توالی ژن هدف تکثیر صورت گرفت و قطعات متناسب آن بر روی ژل آگارز مشاهده شد.

در این پژوهش از گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) رقم تجاری سامسون (*Samsun*) استفاده شد و انتقال ژن به روش آگروباکتریوم (Ohta *et al*., 1990) انجام شد. بعد از انتقال ژن، گیاهچه‌های تراریخت به محیط کشت باززایی منتقل شدند. پس از رشد کافی گیاهان به خاک و پس از سازگاری با محیط، ابتدا به اتاقک رشد و سپس به گلخانه منتقل‌شدند. سپس از این گیاهان استخراج DNA به روش

CTAB انجام گرفت و بذر لاین‌های تأیید شده به صورت جداگانه جمع‌آوری شد.

بررسی گیاهان تراریخت

جهت بررسی گیاهان تراریخت شده با سازه pBI121:*AtEXPB2* آزمایشاتی انجام شد. ابتدا بذور گیاهان تراریخت شده و شاهد در محیط کشت MS انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم کانامایسین کشت داده‌شدند. برای کشت بذور ابتدا از الکل ۷۰٪ به‌مدت یک دقیقه و سپس هیپوکلرید سدیم ۵٪ به‌مدت ده دقیقه برای ضد عفونی استفاده شد. سپس بذور با آب مقطر دوبار استریل شده شست و شو و در محیط کشت MS انتخابی کشت شدند.

گروهی به گلدان‌های کوچک (۲۰۰ گرمی) حاوی پیت‌ماس و پرلیت در اتاقک رشد (دمای°C ۲± ۲۳، ۶۰٪ رطوبت و ۱۶ساعت روشنایی) منتقل شدند. پس از چهار هفته و استقرار گیاهان، گیاهان به گلدان‌های بزرگ‌تر (دو کیلوگرمی) حاوی نسبت‌های مساوی خاک+ ماسه+ کودحیوانی و کوکوپیت به گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج (دمای°C ۲± ۲۵ و ۱۶ساعت روشنایی) منتقل و تا انتهای مرحله زایشی نگهداری‌شدند. صفات اندازه‌گیری در این مرحله از تحقیق شامل؛ ، تعداد کپسول، وزن کپسول، وزن‌کل بذرها، وزن صد دانه و تعداد دانه در کپسول بوده‌است. گیاهان در این مرحله در قالب طرح کاملاً تصادفی با هشت تکرار مورد مطالعه قرارگرفتند.

علاوه بر این گروهی به محلول غذایی هوگلند انتقال‌داده و در شرایط اتاقک رشد (دمای°C ۲± ۲۳، ۶۰٪ رطوبت و ۱۶ساعت روشنایی) به‌منظور بررسی بهتر ریشه نگهداری‌شدند. در طی آزمایش همه روزه مقداری از حجم محلول از پای گیاهان کاهش و به همان میزان محلول تازه هوگلند اضافه می‌شد. صفات مورد مطالعه در این بخش شامل 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، بوده‌است. گیاهان در این مرحله در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد مطالعه قرار-گرفتند.

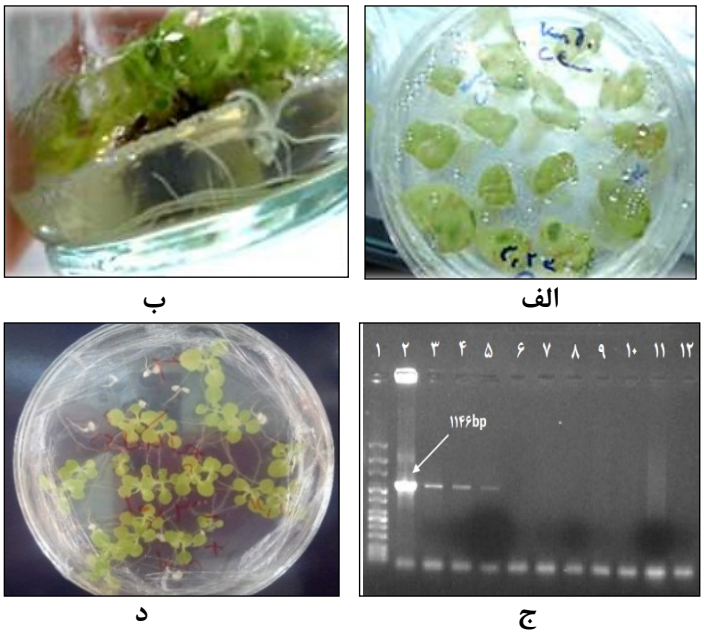
نتایج و بحث

انتقال ژن و تأیید تراریختی لاین‌های انتخابی

از گیاهچه‌های توتون رشد کرده در محیط کشت بافت قطعات برگی تهیه شد و با سوسپانسیون اگروباکتری حاوی ژن تلقیح شدند و به‌مدت دو روز در محیط همکشت و بعد از دو روز به محیط‌های انتخابی جدید منتقل شدند (شکل۱ الف). سپس سلول‌های ترایخت‌شده از ریزنمونه‌های توتون بعد از چند هفته در محیط کشت انتخابی، شروع به باززایی کردند، تمامی مراحل کشت MS پایه انجام شد (شکل ۱ ب) و در نهایت گیاهچه‌های دارای رشد مناسب به گلخانه منتقل شدند.

به‌جهت تایید نهایی ژن *AtEXPB2*، از گیاهان استخراج DNA انجام گرفت و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و با کمک روش PCR تکثیر انجام و محصولات آن روی ژل آگارز الکتروفورزشد. به‌طورکلی ۹ لاین توتون از محیط کشت انتخابی باززا و به گلخانه منتقل شد. با توجه به شکل ۱ (ج) باند ۱۱۴۶ جفت بازی که مطابق با طول *AtEXPB2* بود در ژل الکتروفورز مشاهده شد، از ۹ لاین بدست آمده لاین‌های ۳، ۴، و ۵ مثبت بودند و این مطابق با کنترل مثبت (چاهک ۲) باندی با طول مورد نظر و برابر با طول طول ژن *AtEXPB2* داشتند البته لاین ۹ احتمال تراریختی آن وجود داشت.

به‌منظور تأیید نتایج PCR و اثبات انتقال ژن به نسل بعدی بذرهای گیاهان تراریخت و غیر تراریخت در گلخانه جمع‌آوری و پس از ضدعفونی در محیط کشت انتخابی (حاوی کانامایسین) کشت شدند. پس از چهار برگی شدن گیاهان تراریخت توانستند در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک رشدکنند اما گیاهان غیرتراریخت و تفرق یافته زردشده و از بین‌رفتند (شکل۱ د).



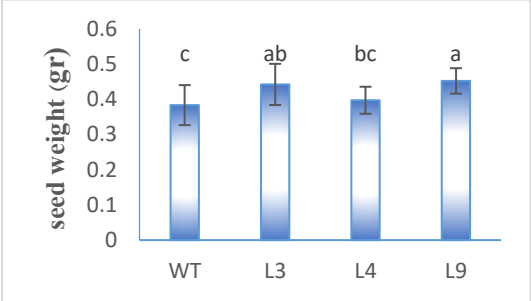
شکل ۱- انتقال ژن و بررسی تراریختی لاین‌های انتخابی. الف) ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده با اگروباکترویم حاوی سازه بعد از حدود یک هفته اکثر قسمت‌های ریز نمونه به‌دلیل وجود آنتی‌بوتیک در محیط کشت و عدم دریافت سازه ژنی متمایل به سفید می‌شوند ب) باززایی سلول‌های تراریخت در محیط کشت MS جهت انتقال به گلخانه ج) محصولات بدست آمده از PCR گیاهان شاهد و تراریخت شده احتمالی . چاهک ها: ۱) سایز مارکر ۲) کلنی PCR (کنترل مثبت) ۳-۵) لاین‌های تراریخت ۶، ۷، ۸، ۱۰) لاین‌های غیرتراریخت ۹) لاین احتمالاً تراریخت (به دلیل حضور اسمیری از باند مورد نظر) ۱۱) گیاه شاهد ۱۲) کنترل منفی د)کشت بذور گیاهان تراریخت در محیط کشت انتخابی که تنها گیاهان تراریخت قادر به رشد و زنده‌ماندن در محیط دارای آنتی‌بیوتیک بودند و گیاهان تفرق‌یافته و غیرتراریخت در مراحل اولیه رشد به رنگ سفید درآمدند.

Fig 1- Gene transformation and checking selected lines transgenicity. a) Most part of Leaf explants inoculated by agrobacterium contained vector get whitish after about one week due to the presence of antibiotic in the culture medium and lack of gene vector. b) Regeneration of transgenic cells in culture medium in order to greenhouse translocation. c) PCR products of wild type and probable transgenic plants. Wells: 1) size marker 2) PCR colony (positive control) 3-5) transgenic lines 6,7,8, 10) un transgenic lines 9) transgenic line probably (Due to the presence of smears from the desired band) 11) control plant 12) negative control d) Cultivation of transgenic seeds in selective media where only transgenic plants were able to grow and survive in the medium contained antibiotic and segregated and non-transgenic plants turned to white in early stages of growth.

بررسی های موفولوژیک گیاهان کشت شده در گلخانه

در میان لاین‌های مورد مطالعه بیش‌ترین وزن کل بذرها مربوط به لاین L9 و کم‌ترین آن مربوط به لاین غیر تراریخت بوده‌است (شکل۲). در واقع اثر ژن در مورد این صفت در تمامی لاین‌ها مشخص‌است. از آن‌جاییکه افزایش وزن کلی بذور می‌تواند ناشی از دو عامل افزایش اندازه و یا افزایش تعداد بذرها باشد، باید ابتدا عامل اصلی افزایش وزن‌کلی بذرها مشخص‌گردد. بنابراین صفات دیگری در ادامه مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا تعداد کپسول هر گیاه ثبت و صفات وزن کپسول، وزن صد دانه و تعداد دانه در کپسول بررسی‌گردید. بررسی صفت وزن صد دانه (شکل۳ ج) نشان داده‌است که در لاین L9 افزایش اندازه بذور سبب افزایش وزن کل بذور گیاه شده‌است. اما در مورد لاین L3 تفاوت وجود دارد زیرا با وجود افزایش وزن کل بذرها، وزن صد دانه آن کاهش یافته است پس می‌توان این گونه بیان کرد که در این لاین اندازه بذر نسبت به گیاه شاهد تغییری نکرده است و در واقع این افزایش تعداد بذور است که سرانجام منجر به افزایش وزن کل بذرها شده‌است. در رابطه با لاین L4 میزان بذر کلی نسبت به شاهد کمی افزایش داشته و وزن صد دانه آن مانند لاین L9 است که در این لاین هم همانند لاین L9، شاهد افزایش اندازه بذور بوده‌ایم. البته درمورد افزایش اندازه بذرها نیز

دو موضوع، افزایش تقسیم سلول‌ها و دیگری افزایش اندازه سلول‌ها را می‌توان مطرح‌کرد. با توجه به منابع موجود، هورمون‌های اکسین و جیبرلین‌ها به‌عنوان تنظیم کننده‌های تقسیم و بسط سلولی شناخته می‌شوند (Davies, 2010). همچنین این دو هورمون نقشی کلیدی در شروع گلدهی و بذر دهی پس از لقاح، ایفا می‌کنند (Ruan *et al*., 2012). نتایج مطالعه‌ای بر روی بذرهای نخود فرنگی حاکی از آن بود که اکسین و جیبرلین موجب القای رشد (طولی و وزن تر) پریکارب و درنهایت افزایش رشد اندام زایشی می‌شوند (Ozga & Reinecke, 1999). 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). درگیاه گوجه فرنگی تیمار اکسین موجب افزایش تعداد سلول‌های پریکارب و جیبرلین سبب کاهش تعداد سلول‌های پریکارب ولی افزایش اندازه آن‌ها شده‌است.



شکل۲- وزن بذرهای گیاهان تراریخت و شاهد کشت شده در گلخانه

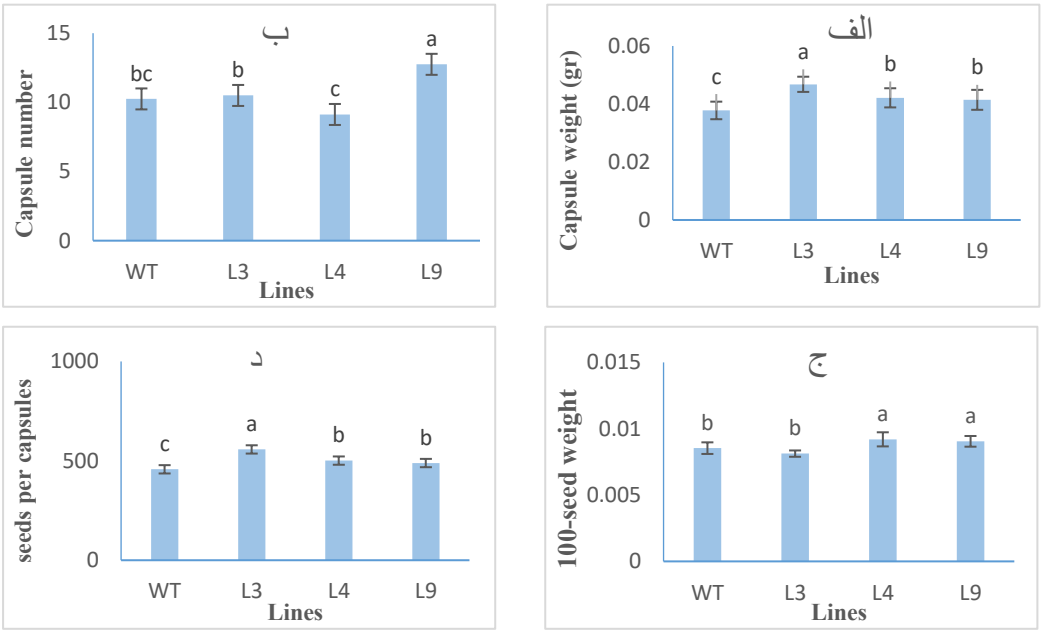
Fig 2- seed weight of transgenic and control plants cultivated in greenhouse

باتوجه به تحقیقات پیشین در این زمینه، تنظیم فعالیت اکسپنسین‌ها به‌وسیله هورمون‌های گیاهی گزارش شده‌است (Choe & Cosgrove, 2010). در این مورد پاسخ رشد اسیدی القا شده توسط اکسین به فعالیت اکسپنسین‌ها در سست‌کردن دیواره سلولی و طویل‌سازی سلول وابسته است (McQueen-Mason, *et al*., 1992). همچنین آغاز رشد سلولی با القای ژن *OsEXP4* به وسیله جیبرلین در برنج گزارش شده‌است (Cho and Kende, 1997). بیان ژن *LeEXP10* و *LeEXP8* در بذرهای گوجه فرنگی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان‌داد که mRNA ژن *LeEXP10* در آغاز نمو بذر در بیش‌ترین مقدار خود بوده‌است و بعد از آن نیز با مقدار کم حضور داشته است. حضور mRNA این ژن بیان می‌دارد که این رونشت در مراحل اولیه رشد و نمو بذر که در آن بسط و توسعه سریع جنین انجام می‌گیرد، رونوشت‌برداری شده‌است. در واقع این نتایج نشان‌دهنده نقش ژن *LeEXP10* در بسط سلول‌های در حال رشد می‌باشد در حالی که بیان ژن *LeEXP8* در مرحله آبنوشی و سپس جوانه زنی بذور است (Chen *et al*., 2001). پس درنتیجه اکسپنسین‌های متفاوت می‌توانند با سوبستراهای مشخصی از دیواره وارد واکنش شوند و یا اینکه مشترکاً با ایزوفرم‌های هیدرولازی مشخص و متنوعی عمل کنند. نتایج نشان‌دهنده افزایش وزن صد دانه در لاین‌های L4 و L9 است. در حالی که بین لاین L3 و گیاهان غیرتراریخت تفاوتی وجود ندارد (شکل۳ ج). همان‌طور که قبلاً هم بیان شد افزایش وزن صد دانه حاکی از افزایش اندازه و در نهایت سنگین‌تر شدن بذرها است. در واقع می‌توان نتیجه گرفت که ژن اکسپنسین در دانه بیان و در نتیجه موجب بسط دیواره و حجیم شدن آن شده‌است و یا اینکه افزایش تکثیر سلولی را در پی داشته‌است.

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که بیش‌ترین کپسول متعلق به گیاهان لاین L9 و کم‌ترین آن مربوط به گیاهان لاین L4 بوده‌است (شکل۳ الف). در مطالعه ای که توسط Wang *et al.*, (2011) بر روی گیاهان توتون افزایش بیان داده شده با ژن *ClEXPA1* و *ClEXPA2* انجام گرفته است، تغییرات مورفولوژیکی در اندام‌های زایشی مشاهده

شده‌است. این گیاهان تراریخت قدرت زایشی خود را حفظ کرده و تعداد برچه‌های مادگی و همچنین تعداد کپسول ها در برخی از لاین ها افزایش یافته بود. کاربرد سیتوکینین افزایش بیان دو ژن آلفا اکسپنسین را در پی داشته است (Wrobel & Yoder, 2001). براساس تحقیقات انجام شده مقدار بالایی از سیتوکینین در آندوسپرم در حال نمو گندمیان، نخودفرنگی، لوبیا و... موجود است. در نتیجه به‌نظر می‌رسد که این هورمون برای تقسیم فعال سلولی در مراحل اولیه پیدایش دانه نیاز است. تحقیقات زیادی اثر افزاینده سیتوکینین بر روی تشکیل غلاف را از طریق کاربرد سیتوکینین بر روی گل‌آذین گیاه نشان داده‌اند. نتایج نشان می‌دهد که سیتوکینین نقش مهمی در افزایش تعداد غلاف در گیاه سویا دارد (Nagel *et al.*, 2001). همچنین در مطالعاتی که بر روی نتاج نسل اول گیاهان تراریخت شده توتون با ژن *ipt* (ژن بیوسنتز کننده سیتوکینین) انجام شد نشان‌داده‌است که میزان سیتوکینین در کپسول آن‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیش‌تر از گیاهان شاهد بود. همچنین کپسول این گیاهان ۸۲٪ بیش‌تر از گیاهان شاهد بود که احتمالاً به‌دلیل افزایش شاخه‌دهی در گل آذین گیاه و تولید گل‌های بیش‌تری باشد (Roeckel *et al.*, 1997). از آنجاییکه هورمون‌ها بر روی بیان ژن‌های اکسپنسین اثر می‌گذارند احتمالاً افزایش تعداد کپسول در این گیاهان به‌دلیل فعالیت بیش‌تر و یا تولید بیش‌تر هورمون سیتوکینین و در نتیجه افزایش تعداد کپسول در گیاهان تراریخت است.

با توجه به مقایسه صفت وزن صد دانه، بیش‌ترین وزن صد دانه مربوط به لاین L3 و سپس لاین‌های L4 و L9 بوده‌است. کم‌ترین مقدار نیز برای گیاهان شاهد بوده‌است (شکل۳ ج). درواقع با وجود اینکه لاین L3 به نسبت دولاین تراریخت دیگر افزایش حجم و اندازه و همچنین وزن دانه ها را نداشته است، اما با استفاده از افزایش حجم و وزن کپسول که احتمالا ناشی از افزایش تعداد دانه ها بوده‌است (همانگونه که قبلاً هم به آن اشاره شده‌بود) سعی در حفظ وزن کل بذور کرده است. بالاترین تعداد دانه در هر کپسول مربوط به لاین L3 و سپس لاین‌های L4 و L9 و کم‌ترین آن مربوط به گیاهان غیرتراریخت بوده‌است (شکل۳ د). همانگونه که با استفاده از صفات قبلی استنتاج شده‌بود، افزایش وزن کپسول‌ها در این لاین ناشی از افزایش تعداد دانه در این لاین گیاهی است.

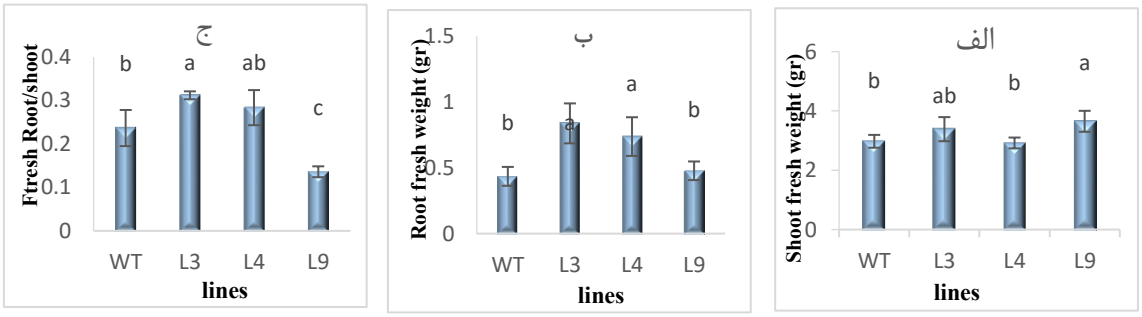


شکل ۳- مقایسه صفات موفولوژیک مرتبط با اندام زایشی گیاهان شاهد و گیاهان تراریخت (L9, L4, L3) در شرایط گلخانه الف) وزن کپسول ب) تعداد کپسول ج) وزن صد دانه د) تعداد دانه در کپسول

Fig 3- Comparison of morphologic traits related to reproductive organs of control and transgenic (L9, L4, L3) plants under greenhouse conditions. a) Capsule number b) Capsule weight c) 100-seed weight d) seeds per capsules

بررسی های موفولوژیک گیاهان پرورش داده شده در محلول غذایی هوگلند

لاین L9 و سپس L3 دارای بیش‌ترین وزن تر اندام هوایی نسبت به شاهد بوده‌اند اما در این صفت تفاوتی میان لاین L4 و گیاهان شاهد مشاهده نشده‌است (شکل ۴ الف). همانگونه که مشاهده می‌شود در مورد صفت وزن خشک اندام هوایی نیز لاین شاهد دارای بیش‌ترین وزن خشک و لاین تراریخت دارای L3 و L9 و سپس L4 به ترتیب دارای کم‌ترین وزن خشک بودند (شکل ۵ الف). با توجه به این دو صفت از آن‌جایی که لاین L9 دارای بیش‌ترین وزن تر و کم‌ترین وزن خشک است و پس از آن لاین L3 چنین رفتاری را به نمایش می‌گذارد می‌توان نتیجه گرفت که افزایش وزن تر نسبت به شاهد به‌دلیل افزایش اندازه سلول‌ها بوده‌است در این حالت سلول‌ها بسط بیش‌تری پیداکرده و دارای واکئول‌های بزرگ‌تری می‌شوند و توانایی حفظ و ذخیره آب در آن‌ها افزایش می‌یابد. در ابتدا بزرگ‌شدن اندازه سلول همراه با آزادسازی تنش دیواره است که طی آن سلول آب بیش‌تری جذب می‌کند (Cosgrove, 2005). ازآن‌جایی که اکپنسین‌ها سبب بسط سلولی حتی در سلول‌های جدا شده تحت شرایط اسیدی می‌شوند، بنابراین نقش توسعه دیواره سلولی و درنهایت افزایش اندازه سلولی را برای آن‌ها درنظرگرفته‌اند (McQueen-Mason & Cosgrove, 1994). همچنین باتوجه با سایر مطالعات، اکسپنسین‌ها به‌عنوان اولین عامل توسعه سلولی شناخته شده‌اند به‌طوری‌که افزودن اکسپنسین خارجی به سلول‌های در حال رشد، باعث القای رشد بیش‌تری در آن‌ها می‌شود (Link & Cosgrove, 1998). خاموش‌سازی ژن‌های اکسپنسین نیز کاهش رشد را در پی داشته است (Zenoni *et al.*, 2004). گیاهان تراریخت اطلسی تشدید بیان شده با ژن *PhEXPA1* دارای گل‌ها و گلبرگ‌های بزرگ‌تری نسبت به گیاهان شاهد بودند. بررسی‌ها نشان‌داد که افزایش بیان این ژن بر روی بسط سلولی تأثیر گذاشته است و درنهایت موجب افزایش اندازه سلول‌ها شده اما بر روی تقسیم سلولی و تعداد سلول‌ها اثری نداشته است (Zenoni *et al.*, 2011).



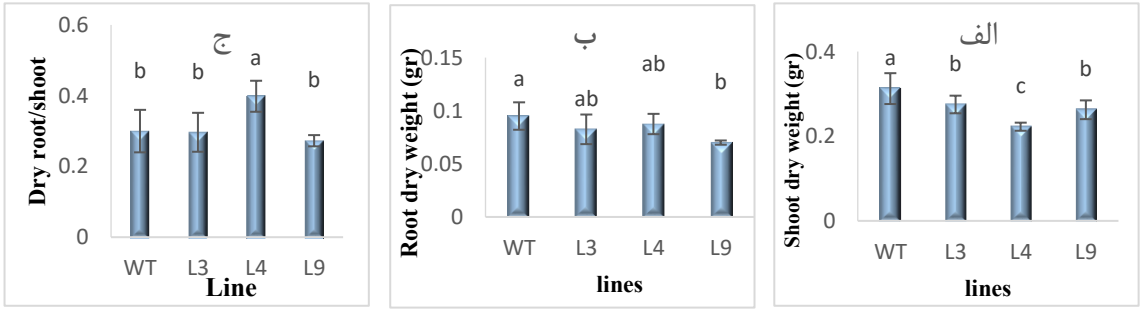
شکل ۴ - صفات اندازه‌گیری شده مرتبط با اندام تر گیاهان شاهد و تراریخت شده *AtEXPB2* در محیط غذایی هوگلند الف) وزن تر اندام هوایی ب) وزن تر ریشه ج) نسبت وزن تر ریشه/ اندام هوایی

Fig 4- morphologic traits related to wet organs of control and transgenic plants in Hoagland nutrition medium. a) Shoot wet weight b) Root wet weight c) Root wet weight /shoot wet weight ratio

لاین L3 و سپس L4 دارای بیش‌ترین وزن‌تر ریشه و لاین شاهد نیز دارای کم‌ترین وزن تر ریشه بود (شکل ۴ ب). لاین شاهد داری بیش‌ترین وزن خشک بود و کم‌ترین وزن خشک ریشه هم متعلق به لاین L9 بود (شکل ۵ ب). با بررسی این دو صفت در می‌یابیم با وجود اینکه وزن‌تر ریشه در گیاهان شاهد از دیگر لاین‌ها کم‌تر بود اما در وزن خشک بیش‌ترین مقدار را از خود نشان داد و در دو لاین L3 و L4 باوجود اینکه وزن تر بالاتری داشتند، اما وزن خشک آن‌ها از لاین شاهد کم‌تر بود. حتی در لاین L9 که وزن‌تر آن تاحدی مشابه وزن تر شاهد بود، در وزن خشک‌کاهش چشم‌گیری نسبت به شاهد داشت. بنابراین تمامی لاین‌های تراریخت مورد آزمایش توانستند بسط و توسعه سلولی را در سلول‌های ریشه‌ای خود داشته باشند به‌طوری که لاین L3 و L4 وزن تر بالا و خشک پایین‌تری نسبت به شاهد داشتند و لاین L9 وزن تر مشابه و خشک پایین‌تری نسبت به

گیاهان شاهد داشته‌است. در واقع این کاهش وزن خشک حاکی از بزرگ‌تر بودن سلول‌های ریشه‌ای در این گیاهان بود که در نتیجه جذب بیش‌تر آب در واکئول‌ها و بسط بیش‌تر دیواره‌سلولی در آن‌ها است. سلول‌های ریشه‌های در حال رشد و بزرگ شدن، جذب آب خود را از طریق پلاسمودسماتا و یا کانال‌های آکوپورین افزایش می‌دهند (Hukin *et al.*, 2002). در نهایت جذب در واکئول‌ها از طریق آکوپورین‌های تونوپلاست انجام می‌گیرد و اندازه سلول افزایش می‌یابد (Javot & Maurel, 2002).

در رابطه با وزن تر ریشه/ اندام هوایی تنها لاین L9 نسبت به گیاهان غیرتراریخت کاهش داشت و در لاین L3 افزایش این صفت نمایان شد اما در لاین L4 افزایش کمی نسبت به شاهد داشته است (شکل ۴ ج). همانطور که از قبل هم مشخص شده‌است به دلیل افزایش بافت تر و کاهش بافت خشک در اکثر صفات می‌توان بزرگ‌شدن اندازه سلول‌های گیاهان تراریخت را نتیجه‌گیری کرد. اما تنها در لاین L9 این صفت کاهش یافته‌است و همان‌گونه که قبلاً هم اشاره شد در این لاین افزایش ارتفاع ریشه مشاهده‌شد که تا حدی جایگزین افزایش وزن تر ریشه شده‌است. در واقع برای این صفت گیاهان دیگر افزایش وزن تر داشتند و این لاین افزایش ارتفاع داشته است و بنابراین نسبت وزن تر ریشه به اندام هوایی در آن کاهش یافته است. افزایش سیستم ریشه ای در گیاهان تراریخت موجب می‌شود که این گیاهان بتوانند تحت شرایط تنش خشکی آب بیش‌تری را جذب و در خود ذخیره‌کنند و در نهایت کم‌تر تحت تأثیر شرایط تنشی قرارگیرند. افزایش صفت نسبت وزن ریشه/ اندام هوایی یکی از صفات مطلوب گیاهان متحمل به خشکی است (Malamy., 2005). در مورد صفت وزن خشک ریشه/ اندام هوایی تنها در لاین L4 افزایش این صفت مشاهده شده و در لاین‌های تراریخت دیگر این صفت تفاوتی نداشته است. اما دو لاین L3 و L9 نسبت به گیاه شاهد کاهش نشان دادند (شکل ۵ ج). عدم افزایش این صفت در دو لاین از گیاهان تراریخت به‌دلیل کاهش وزن خشک و جذب آب بیش‌تر توسط سلول‌های تراریخت بوده‌است. گیاهان توتون تراریخت شده با ژن *TaEXPB23* تحت کنترل پیشبرنده اختصاصی ریشه سیستم ریشه‌ای بزرگ‌تری از گیاهان شاهد داشتند و نسبت وزن خشک ریشه/اندام هوایی درآن‌ها به‌میزان ۴۰ الی ۵۰ درصد افزایش یافته بود (Li *et al.*, 2015).

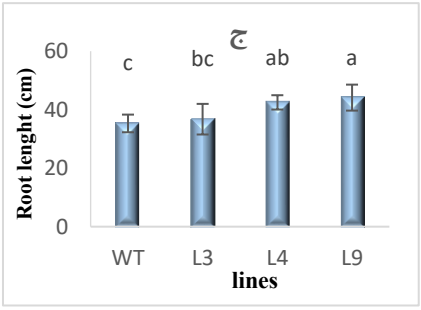


شکل ۵- صفات اندازه‌گیری شده مرتبط با اندام خشک گیاهان شاهد و تراریخت شده *AtEXPB2* در محیط غذایی هوگلند الف) وزن خشک اندام هوایی ب) وزن خشک ریشه ج) نسبت وزن خشک ریشه/ اندام هوایی

Fig 5- morphologic traits related to dry organs of control and transgenic plants in Hoagland nutrition medium. a) Shoot dry weight b) Root dry weight c) Root dry weight /shoot dry weight ratio

بیش‌ترین ارتفاع متعلق به لاین L9 و سپس L4 و L3 بود و کم‌ترین ارتفاع ریشه نیز در گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۶). با بررسی سه صفت اندازه‌گیری شده وزن تر و خشک ریشه و ارتفاع ریشه می‌توان به مورفولوژی ریشه این گیاهان پی‌برد. بدین صورت که لاین L9 دارای بیش‌ترین ارتفاع و کم‌ترین وزن تر و وزن خشک نسبت به شاهد است و بنابراین می‌توان استنباط کرد که در این لاین ساختمان ریشه تحت شرایط نرمال تغییر کرده است بدین صورت که ریشه تمایل به افزایش ارتفاع و بلندتر شدن داشته درحالی که وزن آن‌ها کاهش یافته به بیان دیگر احتمالاً قطر ریشه گیاهان کاهش یافته است و ریشه‌های فرعی نازک‌تری را تولید کرده است. بررسی بیان ژن

GmEXP1 در گیاه سویا مشخص کرده است که این ژن در نواحی رشد و طویل شدن ریشه سویا (نوک ریشه) ، بیان بالایی از خود نشان می‌دهد (Lee *et al.*, 2003). گیاهان توتون تراریخت شده با ژن *TaEXPB23* سیستم ریشه‌ای بزرگ‌تری از گیاهان شاهد داشتند (Li *et al.*, 2015). همچنین حضور اکسپنسین‌ها در تنظیم رشد در سلول‌های ریشه اثبات شده‌است. برای مثال *ZmEXPA*1، *ZmEXPA5*، *ZmEXPB2* و *ZmEXPB8* به صورت فعالی در ریشه های سطحی در حال رشد ذرت بیان می‌شدند (Wu *et al.*, 2001). در تحقیقات بر روی ریشه‌های سطحی در حال رشد برنج، این نواحی غنی از mRNAهای اکسپنسین بوده‌اند (Shin *et al.*, 2005).



شکل۶- طول ریشه گیاهان شاهد و تراریخت پرورش یافته در محیط غذایی هوگلند
Fig 6- root length of control and transgenic plants in Hoagland nutrition medium.

نتیجه‌گیری کلی

انتقال سازه pBI:*At.EXPB2* به گیاه توتون به صورت موفقیت آمیزی انجام شد. بررسی مولکولی گیاهان، تراریختی لاین ها را ثابت‌کرد. بررسی برخی از صفات زایشی و رویشی لاین‌های تراریخت L3، L4 و L9 تحت شرایط نرمال نشان داده‌است که در این گیاهان ژن انتقال داده شده بر روی صفات مورفولوژیک موردنظر اثرداشته است. نتایج کلی تأثیر اکسپنسین‌ها را بر روی بسط و تقسیم دیواره سلولی تأیید کرده است.

REFERENCES

1. Chen, F., Dahal, P. & Bradford, K. J. (2001). Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. *Plant Physiology*, 127, 928- 936.
2. Cho, H. T. & Kende, H. (1997). Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *The Plant Cell*, 9, 1661-1671.
3. Choe, H. T., & Cosgrove, D. J. (2010). Expansins as agents in hormone action. In *Plant Hormones* (pp. 262-281). Springer Netherlands.
4. 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, 1386-1398.
5. Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. Nature 407, 321-326.
6. Cosgrove, D. J. (2005).¬Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 850 - 861.
7. Davies, P. J. (2010). The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In *Plant Hormones* (pp. 1-15). Springer Netherlands.
8. Hukin, D., Doering-Saad, C., Thomas, C. & Pritchard, J. (2002). Sensitivity of cell hydraulic conductivity to mercury is coincident with symplasmic isolation and expression of plasmalemma aquaporin genes in growing maize roots. *Planta*, 215, 1047-1056.
9. Javot, H. & Maurel, C. (2002). The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, 90, 301-313.

10. Kwasniewski, M. & Szarejko, I. (2006). Molecular cloning and characterization of β-expansin gene related to root hair formation in barley. *Plant Physiology* 141, 1149-1158.
11. 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, 985-997.
12. Lee, Y., Choi, D. & Kende, H. (2001). Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 527-532.
13. Li, A. X., Han, Y. Y., Wang, X., Chen, Y. H., Zhao, M. R., Zhou, S. M. & Wang, W. (2015). Root-specific expression of wheat expansin gene TaEXPB23 enhances root growth and water stress tolerance in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, 110, 73-84.
14. 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, 281-291.
15. Link, B. M. & Cosgrove, D. J. (1998). Acid-growth response and α-expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco. *Plant Physiology*, 118, 907-916.
16. Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment*, 28, 67-77.
17. McQueen-Mason, S. J. & Rochange, F. (1999). Expansins in plant growth and development: an update on an emerging topic. *Plant Biology*, 1, 19-25.
18. 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, 6574-6578.
19. McQueen-Mason, S., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell Online* 4, 1425-1433.
20. Nagel, L., Brewster, R., Riedell, W. E. & Reese, R. N. (2001). Cytokinin regulation of flower and pod set in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). *Annals of Botany*, 88, 27-31.
21. 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, 805-813.
22. 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, 33-38.
23. Ozga, J. A. van Huizen, R., & Reinecke, D. M. (2002). Hormone and seed-specific regulation of pea fruit growth. *Plant Physiology*, 128, 1379-1389.
24. Roeckel, P., Oancia, T., & Drevet, J. (1997). Effects of seed-specific expression of a cytokinin biosynthetic gene on canola and tobacco phenotypes. *Transgenic Research*, 6(2), 133-141.
25. 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, 656-665.
26. 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, 210-218.
27. 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 Persian).
28. Varner, J. E. & Lin, L. S. (1989). Plant cell wall architecture. *Cell* 56, 231-239 .
29. Wang, G., Gao, Y., Wang, J., Yang, L., Song, R., Li, X. & Shi, J. (2011). Overexpression of two cambium-abundant Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) α-expansin genes ClEXPA1 and ClEXPA2 affect growth and development in transgenic tobacco and increase the amount of cellulose in stem cell walls. *Plant Biotechnology Journal*, 9(4), 486-502.
30. Wrobel, R. L. & Yoder, J. I. (2001). Differential RNA expression of α-expansin gene family members in the parasitic angiosperm *Triphysaria versicolor* (Scrophulariaceae). *Gene*, 266, 85- 93

31. Wu, Y. & Cosgrove, D. J. (2000). Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1543-1553.
32. 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, 1471-1479.
33. Zenoni, S., Fasoli, M., Tornielli, G. B., Dal Santo, S., Sanson, A. & Pezzotti, M. (2011). Overexpression of PhEXPA1 increases cell size, modifies cell wall polymer composition and affects the timing of axillary meristem development in Petunia hybrida. *New Phytologist*, 191, 662 – 667.
34. Zenoni, S., Reale, L., Tornielli, G. B., Lanfaloni, L., Porceddu, A., Ferrarini, A. & Pezzotti, M. (2004). Downregulation of the Petunia hybrida α-expansin gene PhEXP1 reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs. *The Plant Cell*, 16, 295-308.