مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۴، شماره ۲، ۱۳۹۲ (۱۹۷-۱۹۱)

ساخت و انتقال سازه ژنی pBI:*AtEXPB2* به آرابیدوپسیس تالیانا

بهنام سینجلی [۱]، علیرضا عباسی [۲]، علیرضا طالعی [۳]، رحیم سروستانی [۴*] و داوود داداشی [۵]
۱، ۴ و ۵ دانشجویان کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ۲، ۳، استاد و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت : ۹۱/۶/۱۲ – تاریخ تصویب: ۹۱/۱۲/۱)

چکیده

رشد گیاه در نتیجه تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول است. اکسپنسین ها پروتئین هایی هستند که به عنوان واسطه در بسط بلند مدت دیواره های سلولی عمل می کنند. اکسپنسین ها در سلول های گیاهی نقش های متنوعی را انجام می دهند. در این پژوهش ژن *AtEXPB2* در گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* تشدید بیان شد. برای این کار ابتدا ژن مذکور از ژنوم آرابیدوپسیس تکثیر و جدا گردید. سپس قطعه ۱۱۳۴ جفت بازی تکثیر شده در ناقل های حدواسط pGEMT و pBI121 کلون شد. انتقال ژن به روش غوطه وری گل آذین با واسطه آگروباکتریوم انجام شد. بذور حاصل در محیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شده و گیاهچه های سبز چهار برگی که نشانه متحمل بودن به آنتی بیوتیک کانامایسین و تراریخت بودن احتمالی گیاهان است به گلدان منتقل گردید. از واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تایید گیاهان تراریخت استفاده شد. آنالیز RT-PCR با پرایمر های اختصاصی ژن *AtEXPB2* قطعه ۸۲۲ جفت بازی را تکثیر نمود که فعال بودن آن را در سیستم گیاهی آرابیدوپسیس تایید کرد. نتایج حاصله نشان داده که امکان تشدید بیان ژن های خانواده اکسپنسین برای رسیدن به گیاهان متحمل به تنش خشکی وجود دارد.

واژه های کلیدی: **آرابیدوپسیس تالیانا، اکسپنسین، تنش خشکی، تشدید بیان، *AtEXPB2***

مقدمه

رشد گیاه در نتیجه تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول است و تنظیم توسعه سلول برای رشد و مورفولوژی گیاهی حیاتی است (Smith, 2003). اکسپنسین ها پروتئین هایی هستند که به عنوان واسطه در توسعه بلند مدت دیواره های سلولی مجزا عمل می کنند، و به دو گروه خانواده آلفا و بتا تقسیم می شوند (Cosgrove, 2000a). اگر چه توالی آمینواسیدی این دو خانواده ۲۵ درصد مشابه می باشد اما ساختار ثانویه پیش بینی شده برای آنها بیش از ۷۵ درصد یکسانی داشته و هر دو خانواده در دمین های حفظ شده مشترک می باشند (Cosgrove et al., 1997). اکسپنسین ها پروتئین هایی با وزن مولکولی حدود ۲۶۰۰۰ دالتون می باشند و اولین بار از جوانه های خیار و پس از آن از سایر بافت های گیاه استخراج شدند(McQueen-Mason et al., 1992). اکسپنسین ها در واکنش به تنش خشکی در گیاهچه های ذرت نیز شرکت دارند به طوری که ادامه رشد ریشه همراه با افزایش فعالیت اکسپنسین ها در مناطق در حال رشد می باشد(Wu et al., 1996). به نظر می رسد که مکانیسم عمل اکسپنسین ها شامل تخریب پیوندهای هیدروژنی بین اتصالات عرضی گلیکان های دیواره سلولی و میکروفیبریل های سلولزی است، اکسپنسین ها برخلاف زایلوگلوکان آندوترنس گلوکوزیلاز/ هیدرولاز ها(XTHs) و گلیکاناز ها بطور

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

مستقیم باعث تحریک انبساط دیواره می شوند(Cosgrove & Durachko, 1994). مطابق با مدل مکانیسم سست شدن اولیه و ثانویه دیواره، فاکتور های سست شدن اولیه مانند اکسپنسین ها مستقیما انبساط دیواره ناشی از فشار تورگر(Turgor) را تحریک می کنند درحالی که که فاکتور های ثانویه سست شدن دیواره مانند XTH ها در پاسخ به وقایع سست شدن اولیه، ساختار سلولی را تغییر می دهند(Cosgrove, 2000b). با روشن شدن اولین توالی اکسپنسین، ثابت شد که این پروتئین ها توسط یک خانواده قابل توجه چند ژنی کد می شوند(Li et al., 2002). تعداد رو به رشد گزارش ها، شواهد محکمی را مبنی بر تنوع بیشتر کارکرد های اکسپنسین نسبت به دیگر پروتئین های دیواره سلولی و فاکتور های شل کننده دیواره در رشد و نمو گیاهان فراهم کرده است(Choi et al., 2006). در برنج آب عمیق(Deep water) بیان ژن های اکسپنسین با رشد میانگره همبستگی نشان داده و این فرضیه را ثابت می کند که اکسپنسین ها در رشد گیاهان موثرند(Lee & Kende, 2001; 2002). آنها همچنین در رشد و توسعه ریشه نیز دخالت دارند و بیان دو ژن *AtEXPA7* و *AtEXPA18* در آرابیدوپسیس همبستگی زیادی با تشکیل ریشه های مویین نشان داد(Cho & Cosgrove, 2002). نقش اکسپنسین ها به عنوان واسطه عمل هورمون ها نیز اخیرا بررسی شده است(Cho & Cosgrove, 2004). علاوه بر نقش اکسپنسین ها در انبساط اندام ها، نقش احتمالی آنها در ریز اندام ها، انبساط و شل شدن میوه ها نیز مطالعه شده است(Reidy et al., 2001). ممکن است اکسپنسین ها در سست کردن دیواره سلول و بزرگ تر شدن میوه طی مراحل مختلف رشد نیز به عنوان واسطه عمل کنند (Hiwasa et al., 2003; Kitagawa et al., 2005). بنابراین خانواده ژنی اکسپنسین دارای عملکرد های وسیعی در رشد گیاهان می باشد. در دسترس بودن توالی کامل ژنوم آرابیدوپسیس کاوش آن را برای توالی های ژن های اکسپنسین فراهم کرده است در واقع ژنوم آرابیدوپسیس دارای ۳۸ قالب خواندنی باز (ORF) می باشد که پروتئین های شبه اکسپنسین را رمز می کنند(Li et al., 2002). در آرابیدوپسیس چندین ژن از خانواده اکسپنسین به طور وسیع مطالعه شده اند و از جمله آنها *AtEXPA7* و *AtEXPA18* می باشند که ارتباط نزدیکی با آغاز مویی شدن ریشه دارند(Cho & Cosgrove, 2002).

ژن *AtEXPB2* یکی از ژن های خانواده بتا اکسپنسین ها می باشد که بیشتر در ریشه و بافت های آن بیان می شود و موجب مقاومت به تنش های محیطی می گردد. گزارش شده که در سویا این ژن در تنش های محیطی مانند کمبود فسفر، آهن و آب نقش دارد(Guo et al., 2011). هدف از این مطالعه تشدید بیان ژن *AtEXPB2* در گیاه آرابیدوپسیس و بدست آوردن لاین های تراریخت فعال از نظر بیان این ژن در بافت های مختلف می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی، باکتری ها و ناقل ها

در این مطالعه از گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) رقم کلمبیا استفاده شد. از باکتری های *E.coli* سویه DH5α و *آگروباکتریوم تومفاسینس* سویه LBA4404 به عنوان میزبان های حدواسط استفاده گردید. از پلاسمید های pGEMT شرکت پرومگا (دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین)، و ناقل دوگانه pBI121 که دارای ژن gus، ژن مقاومت به کانامایسین و پروموتر CaMV35s می باشد برای تشدید بیان ژن *AtEXPB2* در آرابیدوپسیس استفاده شد.

ساخت سازه pBI121:*AtEXPB2*

برای تکثیر ژن *AtEXPB2* از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا دو آغازگر اختصاصی پیشرو (-5' **GGATCC**ATGACAATTCTTGTCGTAGATCG 3' - : *AtEXPB2*-F) و پسرو (-5' **GAGCTC**TTAAAAGTTGACGTTGGATTTGT 3' - A : *AtEXPB2*-R) با استفاده از توالی این ژن طراحی گردید و به منظور همسانه سازی قطعه مورد نظر در ناقل گیاهی pBI121 توالی آنزیم برشی *BamH*I در آغازگر پیشرو و *Sac*I در آغازگر پسرو اضافه گردید. یک جفت آغازگر اختصاصی پیشرو (-5' GGCTATTCGGCTATGACTGG- 3' : NptII-F) و پسرو (-5'-GGATACTTTCTCGGCAGGAG 3' : NptII-R) نیز از توالی ژن نئومایسین فسفو

ترانسفراز ناقل pBI121 برای تایید گیاهان تراریخت مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور جداسازی ژن *AtEXPB2* از آرابیدوبسیس، DNA ژنومی گیاه آرابیدوپسیس به روش CTAB استخراج و واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغاز گر های اختصاصی ژن *AtEXPB2* ، بوسیله کیت تکثیر شرکت فرمنتاز(C.N: EP0571) و آنزیم *Pfu* برای تکثیر ژن مورد نظر استفاده گردید. 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 گشت. برای همسانه سازی ژن در ناقل pBI121، ناقل حد واسط حاوی ژن *AtEXPB2* و ناقل pBI121 را 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 & 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 کلنی های نوترکیب pGEMT و pBI121 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.

انتقال سازه به گیاه آرابیدوپسیس

انتقال سازه به گیاه آرابیدوپسیس به روش غوطه وری (Floral dip) انجام گرفت(Desfeux et al., 2000). در این روش گل آذین به مدت ۴۰-۳۰ ثانیه در محلول تلقیح غوطه ور شد. و سپس گیاهان به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفته و این عمل بعد از یک هفته دوباره تکرار شد. بعد از رسیدن گلها بذر ها برداشت شده و پس از ضد عفونی بر روی محیط MS حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین پخش شدند و پس از نگهداری آنها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه به فیتوترون منتقل و پس از گذشت ۱۴ روز گیاهچه هایی که هنوز سبز بوده اند جهت آنالیز های بعدی به گلدان منتقل شدند. RNA گیاهان تراریخت احتمالی با کیت RNAx شرکت سیناژن استخراج شده و ساخت رشته مکمل نیز با کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز انجام شد.

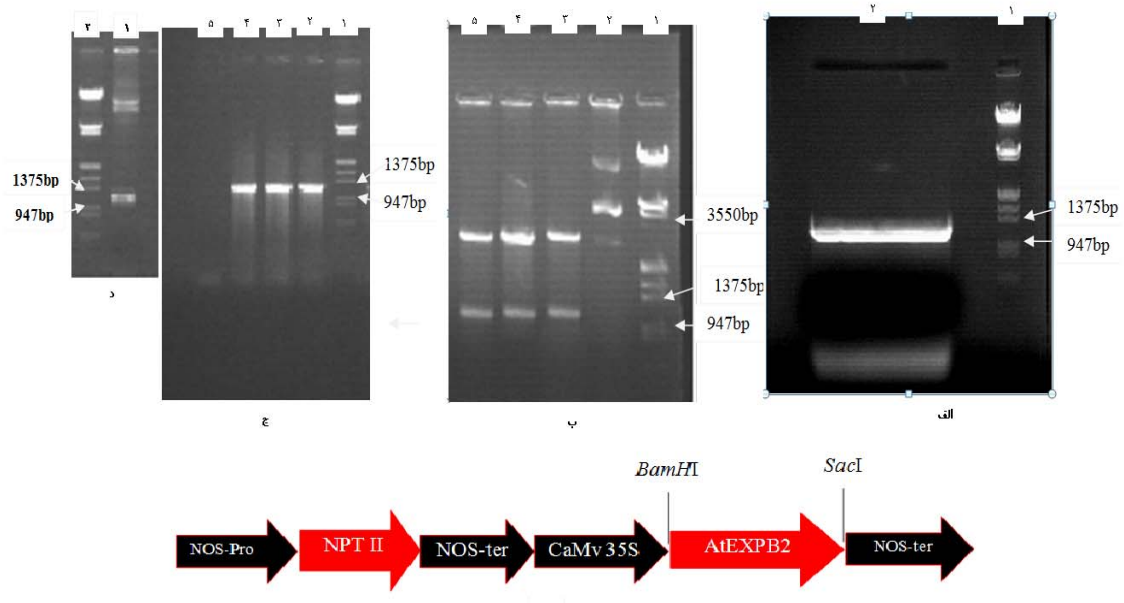
نتایج و بحث

ژن *AtEXPB2* به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز و آغازگرهای اختصاصی آن با آنزیم *Pfu* از DNA ژنومی استخراج شده از گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* تکثیر شد. همانگونه که در شکل ۱الف. نشان داده شده است نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز منجر به تکثیر قطعه ای ۱۱۴۶ جفت بازی شده که معادل با طول ژن *AtEXPB2* گیاه آرابیدوپسیس به علاوه سایت های برشی می باشد.

از آنجا که ناقل پایه pGEMT حامل ژن مقاومت به آمپی سیلین می باشد ناقل نوترکیب pGEMT حاوی قطعه *AtEXPB2* به باکتری *E.coli* با روش شوک حرارتی منتقل شده و روی محیط حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد. کلون های ظاهر شده بعد از ۲۴ ساعت روی محیط انتخابی احتمالا نوترکیب می باشند. کلون های نوترکیب در محیط مایع کشت داده شده و از آنها پلاسمید استخراج گردید. هضم پلاسمید های نوترکیب استخراج شده با آنزیم های برشی *BamH*I و *Sac*I انجام شده و قطعه ۱۱۴۶ bp که برابر طول ژن *AtEXPB2* و ۱۲ نوکلوتید توالی شناسایی دو آنزیم *BamH*I و *Sac*I بود جدا شد (شکل۱ ب.) از آنجا که ناقل pBI121 حاوی ژن gus می باشد همزمان ژن gus نیز از پلاسمید pBI121 با آنزیم های برشی *BamH*I و *Sac*I حذف شد. واکنش اتصال ژن *AtEXPB2* به ناقل گیاهی pBI121 با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase شرکت فرمنتاز انجام شده و سازه نوترکیب pBI121 به سلول های مستعد *E.coli* منتقل شد. جهت شناسایی کلون های نوترکیب حاوی ژن *AtEXPB2*، باکتری های رشد کرده در محیط انتخابی به روش کلنی PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانگونه که در شکل ۱ج نشان داده شده کلونی های حاوی قطعه

۱۱۴۶جفت بازی نوترکیب می باشند. جهت تایید نهایی سازه pBI121:*AtEXPB2* از باکتری های رشد کرده در محیط LB، پلاسمید استخراج گردیده و هضم آنزیمی صورت گرفت که در شکل ۱د. آورده شده است. دارا بودن قطعه ۱۱۴۶ جفت بازی دلیل نوترکیب بودن کلون های های مورد نظر می باشد و از آنها برای تراریختی در گیاه آرابیدوپسیس استفاده شد.

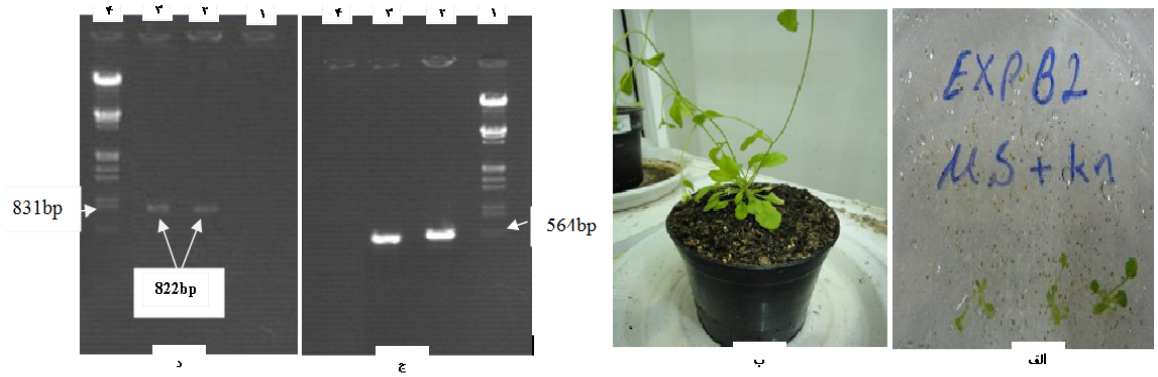
برای انتقال سازه pBI121:*AtEXPB2* به گیاه آرابیدوپسیس، روش غوطه وری گل آذین انتخاب شد. ناقل pBI121 حاوی توالی ژن مقاومت به کانامایسین بوده که به گیاه منتقل می شود بنابراین گیاهان تراریخت احتمالی در مرحله ۴ برگی سبز باقیمانده اما گیاهان غیر تراریخت سفید می شوند. گیاهچه های سبز حاصل از کشت بذور در محیط حاوی کانامایسین، به گلدان جدید انتقال (شکل۲ب.) و از آنها RNA استخراج و cDNA آنها ساخته شد. برای تایید تراریخت بودن گیاهان بدست آمده، واکنش PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن *AtEXPB2* و NptII (ژن مقاومت به کانامایسین) بر روی cDNA ساخته شده انجام گرفت.(شکل۲ ج. ود.)



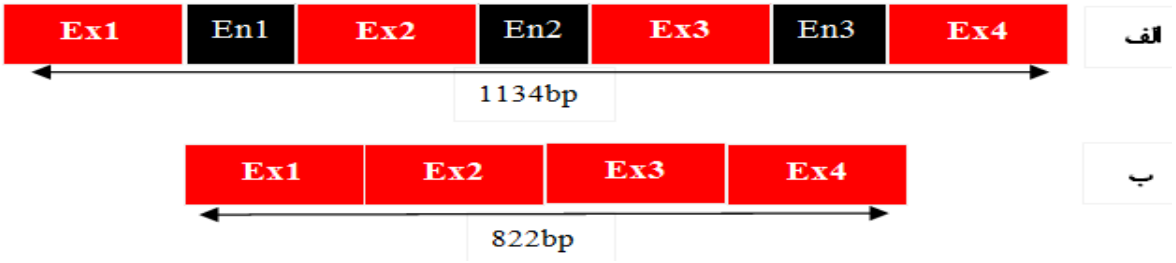
شکل ۱- الف: تکثیر ژن *AtEXPB2* از ژنوم گیاه *A. taliana* . چاهک ۱ نمونه تکثیر شده و چاهک ۲ سایز مارکر. ب:برش ناقل pGEMT حاوی ژن *AtEXPB2* ، سایز مارکر sm0191 شرکت فرمنتاز، چاهک ۲: پلاسمید برش نخورده و چاهک های ۳،۴ و ۵ به ترتیب کلون های۳، ۴ و ۵ . ج: کلنی PCR با پرایمر های اختصاصی ژن *AtEXPB2* ، چاهک ۱ سایز مارکر، چاهک های ۲،۳ و۴ به ترتیب کلون های۲، ۳ و ۴ چاهک ۵ کنترل منفی. د: برش آنزیمی سازه pBI+*AtEXPB2* با آنزیم های *BamHI* و *SacI*، چاهک ۱ سازه pBI121 برش خورده و چاهک ۲ سایز مارکر. و: سازه pBI:*AtEXPB2* .

انتخاب روش غوطه وری گل آذین برای انتقال ژن *AtEXPB2* موفقیت آمیز بوده و مزیت این روش نسبت به سایر روش های انتقال ژن این است که به کشت بافت و باززایی نیاز نداشته (Li et al., 2009) و از آنجایی که گیاه آرابیدوپسیس بذر زیادی تولید می کند کارایی انتقال نیز به مراتب بالاتر خواهد بود(Clough & Bent, 1998; Harrison et al., 2006). ژن *AtEXPB2* تحت پیش برنده 35S به گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* وارد شده بیان آن با RT-PCR نیز بررسی شد. از آنجا که بیان ژن *AtEXPB2* در آرابیدوپسیس پایین بوده امکان جداسازی آن از cDNA وجود نداشت بنابراین این ژن بطور مستقیم از DNA ژنومی جدا شد. مقایسه شکل ۱ الف با شکل ۲ د. نشان می دهد که ژن *AtEXPB2* جدا شده از آرابیدوپسیس پس از انتقال، رونویسی شده و ویرایش آن

بخوبی در سیستم آرابیدوپسیس انجام شده و واکنش RT-PCR روی cDNA مشخص کرده که mRNA بالغ آن با طول ۸۲۲bp در سلول های برگ ساخته می شود(شکل ۳).



شکل ۲- الف: کشت بذور حاصل گیاهان تلقیح شده بروی محیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین. ب: انتقال گیاچه های مقاوم به کانامایسین به گلدان ج: انجام PCR با پرایمر های اختصاصی ژن NptII، چاهک ۱ سایز مارکر، چاهک ۲و۳ لاین های تراریخت احتمالی و چاهک ۴ گیاه شاهد، د: تکثیر ژن *AtEXPB2* با پرایمر های اختصاصی از روی cDNA گیاهان تراریخت و شاهد، چاهک ۱گیاه شاهد، چاهک های ۲و۳ لاین های تراریخت و چاهک ۴ سایز مارکر.



شکل ۳- شمای کلی توالی نوکلوتیدی ژن *AtEXPB2* الف: توالی DNA ژن که دارای ۴ اگزون و ۳ اینترون و طول ۱۱۳۴ جفت باز است. ب: توالی mRNA ویرایش شده ژن *AtEXPB2*که دارای طول ۸۲۲ جفت بوده و اینترون های آن حذف شده و اگزون های آن به هم چسبیده است.

نتایج نشان داده که ژن منتقل شده در بافت های برگی فعال بوده و بیان می شود. اکسپنسین ها یک دسته از ژنهایی هستند که نقش پیشنهادی در توسعه سیستم ریشه برای آنان ارایه شده است(Cho & Cosgrove, 2002) و بنابراین می توان از آنها برای ایجاد گیاهان مقاوم به خشکی بهره جست چرا که افزایش طول و حجم ریشه از طریق ظهور ریشه های مویین می تواند به عنوان مکانیسمی برای جذب آب بیشتر در نظر گرفته شود زیرا ریشه ها غالبا در شرایط کم آبی که طویل شدن برگ و ساقه به طور کلی محدود می گردد، به رشد خود ادامه می دهند که این ویژگی به عنوان یک مکانیسم مهم سازگاری گیاه به شرایط محدودیت آبی در نظر گرفته می شود. اعتقاد بر این است که پروتئین های اکسپنسین نقش مهمی در تنظیم انبساط پذیری دیواره سلولی دارند(Zenoni et al., 2004). و تاکنون در بسیاری گونه ها و بافت های گیاهی شناسایی شده اند. همچنین نقش های متفاوتی برای آنها ذکر شده از جمله در پتانسیل پایین آب، با حفظ طویل شدن ریشه در برنج که یک پاسخ مهم برای کمک به از سرگیری تامین آب گیاهی است مرتبط اند(Yang et al., 2004). در ذرت پس از القای تنش با پلی اتیلن گلایکول افزایشی در بیان ژن های آلفا-اکسپنسین قبل از ازسرگیری رشد برگ ها مشاهده شد (Sabirzhanova et al., 2005). عملکرد اکسپنسین ها به انواع مختلفی از رشد سلول

های گیاهی و تمایز آنها ارتباط داده شد. در برنج نقش اکسپنسین ها در طویل شدن میان گره ها ثابت شده و تاثیر ژن آلفا- اکسپنسین *OsEXPA4* بر رشد و توسعه گیاه نشان داده است (Choi et al., 2003) و نقش آنها در نرم شدن گوجه فرنگی نیز مهم ذکر شد (Kalamaki et al., 2003a). در سویا بیان ژن *GmEXPB2* در ریشه به هنگام مواجهه با برخی از تنش های محیطی به ویژه تنش خشکی افزایش یافت و می توان از آن برای ایجاد گیاهان مقاوم به خشکی بهره جست (Guo et al., 2011). در گوجه فرنگی افزایش و کاهش بیان ژن *LeExp1* به ترتیب باعث نرمتر و سخت ترشدن میوه شد(kalamaki et al., 2003b). در اینجا نیز برای بررسی بیشتر نقش ژن *AtEXPB2* در گیاهان تراریخت، نسل های T1 و T2 از نظر خصوصیات مورفولوژیکی در شرایط تنش و نرمال آنالیز خواهند شد.

نتیجه گیری

ساخت سازه pBI:*AtEXPB2* و انتقال آن به گیاه آرابیدوپسیس بصورت موفقیت آمیز انجام شد. در این پژوهش سازه مورد نظر به روش غوطه وری گل آذین و با واسطه آگروباکتریوم به گیاه هدف منتقل شده و انجام واکنش RT-PCR ثابت کرد که ژن منتقل شده در گیاه میزبان رونویسی شده و فرایند ویرایش و تبدیل آن به mRNA بالغ بخوبی در گیاه آرابیدوپسیس انجام می گیرد، و با توجه به نقش اکپنسین ها در بافت های مختلف گیاهی، می توان از این راه به گیاهان متحمل به خشکی دست یافت.

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 Ed) Proceeding of *Plant Hormones* (pp 262–281). Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands.
3. Choi, D. Cho, H. T. & Lee, Y. (2006). Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum* ,126, 511–518.
4. Choi, D. Lee, Y. Cho, H. T. & Kende, H. (2003). Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. *Plant Cell* ,15, 1386–1398.
5. Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 166, 735–743.
6. Cosgrove D. J. & Durachko D. M. (1994). Autolysis and extension of isolated walls from growing cucumber hypocotyls. *Journal* of *Experimental Botany*, 45,1711-1719.
7. Cosgrove, D. J. (2000a) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*,407, 321–326
8. Cosgrove, D. J. (2000b) Expansive growth of plant cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 38,109-124.
9. Cosgrove, D. J. Bedinger, P. & Durachko, D. M. (1997). Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 94, 6559–6564.
10. Desfeux, C. Clough, S. J. Bent, A.F. (2000). Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiology*. 123; 895-904.
11. Guo, W. Zhao, J. Li, X. Qin, L. Yan, X. & Liao, H. (2011). A soybean b-expansin gene GmEXPB2 intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses. *The Plant Journal* , 66, 541–552.
12. Harrison, S. J. Mott, E. K., Parsley, K. Aspinall, S. Gray, J. C. & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, 6,2-19.
13. Hiwasa, K. Rose, J. K C. Nakano, R. Inaba, A. & Kubo, Y. (2003). Differential expression of seven a-expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Physiologia Plantarum*,117, 564–572.
14. Kalamaki, M. S. Palys, J. M. Labavitch, J. M. Reid, D. S. & Brummell, D. A. (2003a). 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.
15. Kalamaki, M. S. Powell, L. T. A. Struijs, K.,Labavitch, J. M. Reid, D. S. (2003b). 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.
16. 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 mutant. *Physiologia Plantarum*, 123, 331–338.

17. Lee, Y. & Kende, H. (2001). Expression of b-expansins is correlated with internodal elongation in deepwater rice. *Plant Physiology* ,127, 645–654.
18. Lee, Y. & Kende, H. (2002). Expression of a-expansin and expansin-like genes in deepwater rice. *Plant Physiology* ,130,1396–1403.
19. 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.
20. Li, J. Tan X. Zhu, F. & Guo, J. (2009). A Rapid and Simple Method for *Brassica Napus* Floral-Dip Transformation and Selection of Transgenic Plantlets. *International Journal of Biology* , 2, 1916-1921.
21. 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.
22. Reidy, B. McQueen-Mason, S. J. Nosberge, J. & Fleming, A. (2001) .Differential expression of a αand β-expansin genes in the elongation leaf of Festuca pratensis. *Plant Molecular Biology,* 46, 491–504.
23. 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.
24. Sambrook, J. & Rusell, D. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual* (3th Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
25. Smith, L. G. (2003). Cytoskeletal control of plant cell shape: getting the fine points. *Current Opinion* in *Plant Biology*,6, 63–73.
26. Walker, J. M. (2006). *Agrobacterium Protocols*. Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208.
27. Wu, Y. Sharp, R. E. Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1996). Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol,*111:765-772.
28. Yang, L. Zheng, B. Mao, C. Qi, X. Liu, F. & Wu, P. (2004). Analysis of transcripts that are differentially expressed in three sectors of the rice root system under water deficit. *Molecular Genetics and Genomics*, 272, 433–442.
29. Zenoni, S. Reale, L. Tornielli, G. B. Lanfaloni, L. Porceddu, A. &Ferrarini, A. (2004). Downregulation 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.