علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۴ (ص ۵۶۷-۵۵۹)

انتقال ژن *AtEXPB2* به گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) با هدف افزایش تحمل به تنش خشکی

داوود داداشی[1] و علیرضا عباسی[2*]
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه زراعت، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۱۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۲/۸)

چکیده

تقسیم و توسعهٔ یاخته‌ای دو فرایند اصلی در رشد گیاه به‌شمار می‌آیند. پروتئین‌های اکسپنسین در فرایند توسعهٔ یاخته‌ای نقش کلیدی دارند. این پروتئین‌ها با فعالیت غیرآنزیمی در بسیاری از فرایندهای رشد و نمو گیاهی نقش دارند. یکی از نقش‌های عنوان‌شده برای این پروتئین‌ها، تأثیر در افزایش تحمل گیاه به خشکی است. ژن *EXPB2* یکی از ژن‌های خانوادهٔ اکسپنسین است که بیشتر در بافت ریشه بیان می‌شود، هدف از این تحقیق انتقال ژن *EXPB2* علف تال یا گوشی موشی (*Arabidopsis thaliana*) به گیاه توتون است. انتقال سازهٔ ژنی *pBI; EXPB2*، با استفاده از آگروباکتریوم انجام شد. گزینش اولیهٔ گیاهان تراریخته (تراژن)، با کشت ریزنمونه‌های برگی تلقیح‌شده با آگروباکتریوم، در محیط کشت حاوی کانامایسین انجام شد. گیاهچه‌های متحمل به پادزیست (آنتی‌بیوتیک) کانامایسین، به خاک منتقل شدند. رگه (لاین)های تراریخته با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تأیید شدند. گیاهان تراریخته ریشه‌زایی خوبی نشان دادند که بیانگر اثر این ژن بر افزایش طول و تراکم ریشه بود. در نهایت گیاهان به‌دست‌آمده صفات نامطلوب از جمله ریزش غنچه‌های گل و ریزش برگ داشتند که به احتمال نشان‌دهندهٔ آن است که بیان این ژن در بخش‌های هوایی گیاه می‌تواند صفات نامطلوبی ایجاد کند.

واژه‌های کلیدی: اکسپنسین، انتقال ژن، تنش خشکی، توتون، *AtEXPB2*.

مقدمه

دیوارهٔ یاخته‌ای در گیاهان نقش محوری در ریخت‌زایی گیاه در پاسخ به پیام‌های محیطی دارد (Nishitani, 1997 و Cosgrove, 2000 (a)). شکل و اندازهٔ اندام‌های گیاهان مختلف، با تقسیم یاخته‌ای و سپس توسعهٔ یاخته‌ها کنترل می‌شود (Sánchez-Rodríguez *et al*., 2010). تمایز یاخته‌ای در نهایت وابسته به تنظیم ژن‌های خاص یاخته‌ای است (Won *et al*., 2010). اکسپنسین‌ها[1] پروتئین‌هایی‌اند که نقش کلیدی در تنظیم توسعهٔ دیوارهٔ یاخته‌ای و رشد گیاه دارند (Zhao *et al*., 2012; Li and Wang, 2012). این پروتئین‌ها فعالیت غیرآنزیمی داشته و به احتمال با شکستن پیوند هیدروژنی سبب شل شدن دیوارهٔ یاخته‌ای می‌شوند (Jung *et al*., 2010; Cosgrove, 2000(b); Anjanasree & Bansal, 2003). آنها همچنین می‌توانند توسعهٔ دیوارهٔ یاخته‌ای جداشده از یاخته را القا کنند (Son *et al*., 2012). اکسپنسین‌ها توسط یک خانوادهٔ بزرگ ژنی که شامل آلفا-اکسپنسین (*EXPA*)، بتا-اکسپنسین (*EXPB*)، شبه‌اکسپنسین آلفا (*EXLA*) و شبه‌اکسپنسین بتا

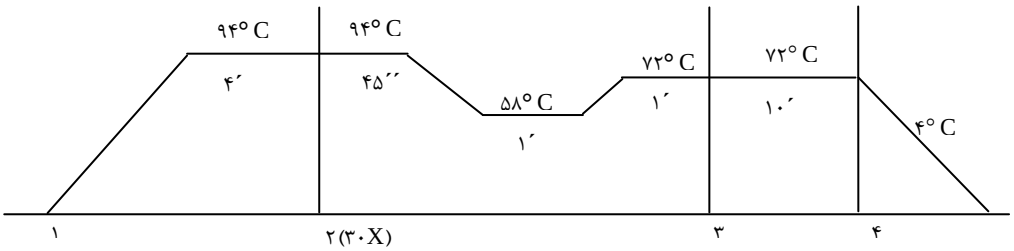
* تلفن: ۰۹۱۲۴۱۲۸۷۰۹
E-mail: rezabbasi@ut.ac.ir
1. Expansins

(*EXLB*) است، رمز می‌شوند (Sampedro & Cosgrove, 2005). گزارش شده است که تشدید بیان ژن *PhEXPA1* در گیاه *Petunia hybrida* باعث افزایش در اندازهٔ یاخته‌ها و ابعاد اندام‌ها می‌شود. افزون بر این گیاهان تراریخت (تراژن) با *35S:PhEXPA1* تغییر در ترکیب پلیمری دیوارهٔ یاخته‌ای و نمو زودهنگام مریستم جانبی در مقایسه با گیاهان ناریخت (غیرتراژن) داشتند (Dal Santo *et al*., 2011). همچنین بین تشکیل ریشه‌های مویین در گیاه جو (*Hordeum vulgare*) با ژن *HvEXPB1* همبستگی مشاهده شده است (Kwasniewski & Szarejko, 2006). در گیاه علف تال نیز نقش اکسپنسین‌ها در تشکیل ریشه‌های مویین گزارش شده است (Zhao *et al*., 2012). افزون بر نتایج مثبت، تشدید بیان اکسپنسین‌ها می‌تواند آثار منفی در گیاه را موجب شود، به‌عنوان مثال محققان اعلام کردند، تشدید بیان ژن *AtEXPA1* در دیوارهٔ یاخته‌های نگهبان روزنه در گیاه علف تال باعث تسریع در باز شدن روزنه‌ها در اثر القای نوری می‌شود (Zhang *et al*., 2011). در برخی از موارد نیز ممکن است صفات چندی در گیاه را تغییر دهند. به‌عنوان مثال بیان ژن‌های *EXPA1* و *EXPA2* از منشأ گیاه *Cunninghamia lanceolata* در گیاه توتون باعث تغییر چندین فنوتیپ[1] از جمله ارتفاع گیاه، قطر ساقه، شمار برگ و غلاف بذری می‌شود. همچنین دیواره‌های یاخته‌ای جداشده از گیاهان تراریخته ۳۰-۵۰درصد افزایش در میزان سلولز نسبت به گیاهان وحشی داشتند (Wang *et al*., 2011). اما یکی از مهم‌ترین کاربردهای اکسپنسین‌ها، نقش آنها در تنش‌های محیطی است. در شرایط تنش خشکی، رگه (لاین)های توتون تراریخته با ژن *TaEXPB23* هدررفت آبی کمتری نسبت به گیاهان ناتراریخته داشتند، همچنین بررسی برخی مشخصه (پارامتر)های فیزیولوژیکی در گیاهان تراریخته، نشان‌دهندهٔ تحمل بیشتر آنها در شرایط تنش خشکی بود (Li *et al*., 2011). تشدید بیان *TaEXPB23* در گیاه توتون سبب افزایش تحمل به تنش شوری شد (Li & Wang, 2012). همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که هورمون‌های گیاهی در بیان ژن‌های اکسپنسین نقش دارند (Son *et al*., 2012). در طول تنش خشکی، هورمون‌های گیاهی بیان ژن اکسپنسین و رشد گیاه را تنظیم می‌کنند. در یک آزمایش، رابطهٔ بین ژن‌های اکسپنسین و دو هورمون گیاهی اسید ایندول‌استیک (IAA) و اسید آبسیزیک (ABA) در رشد یاختهٔ گیاه گندم در شرایط تنش خشکی بررسی شد، این بررسی‌ها نشان داد که تنش اسمزی باعث افزایش تجمع ABA شده و ABA با کاهش فعالیت $H^{(+)}$-ATPase غشای پلاسمایی، باعث قلیایی شدن دیوارهٔ یاخته‌ای می‌شود که برای فعالیت اکسپنسین نامساعد است. استفاده از IAA در غلاف برگ‌های اولیه (کلئوپتیل)های جداشده، افزایش رشد غلاف برگ اولیه و همچنین افزایش فعالیت اکسپنسین را به دنبال داشت، به هر حال رابطهٔ بین اکسپنسین و هورمون‌های گیاهی هنوز به‌طور دقیق مشخص نیست (Zhao *et al*., 2012). همچنین تحقیقات نقش اکسپنسین در رسیدگی و نرم شدن میوه را نیز اثبات کرده است (Sabirzhanova *et al*., 2005). ژن *AtEXPB2* یکی از ژن‌های خانوادهٔ اکسپنسین است که بیشتر در بافت ریشه بیان می‌شود. تشدید بیان این ژن در سویا، باعث افزایش تقسیم و طویل شدن یاخته‌های ریشه شده و جذب فسفر در شرایط عادی و در شرایط کمبود آن را بهبود می‌بخشد و پیشنهاد شده که *EXPB2* یک ژن حیاتی در مهندسی نظام ریشه برای پاسخ به برخی تنش‌های غیرزیستی ازجمله کمبود آهن، آب و فسفر است (Guo *et al*., 2011). با وجود بررسی‌های گسترده در مورد اکسپنسین‌ها، منابع علمی عملکرد معینی برای آن عنوان نکرده‌اند و کارکرد این خانوادهٔ ژنی به‌طور دقیق مشخص نشده است. بنابراین برای استفادهٔ بهتر از این ژن‌ها در مهندسی گیاهان متحمل به تنش، نیاز به بررسی و شناسایی دقیق کارکرد آنها است. هدف از این پژوهش، انتقال ژن *AtEXPB2* به گیاه توتون و ایجاد گیاهان تراریخته به منظور بررسی عملکرد آن در تنش‌های محیطی در تحقیقات آینده است.

1. Phenotype

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ژن *EXPB2* با منشأ گیاه علف تال (*Arabidopsis thaliana*) به منظور انتقال به گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) استفاده شد. از باکتری‌های *E.coli* سویهٔ *DH5α* و آگروباکتریوم تومفاسینس سویهٔ *LBA4404* به عنوان میزبان‌های حدواسط استفاده شد. از پلاسمیدهای *pGEMT* شرکت پرومگا (دارای ژن مقاوم به آمپی‌سیلین)، و ناقل دوگانهٔ *pBI121* که ژن‌های *gus*، ژن مقاومت به کانامایسین و راه‌انداز *CaMV35S* دارد برای همسانه‌سازی و انتقال ژن *AtEXPB2* به توتون استفاده شد. به منظور تهیهٔ DNA ژنگانی (ژنومی)، از برگ‌های جوان و سبز گیاه توتون تراریختهٔ احتمالی و شاهد استفاده شد. DNA ژنگانی به روش CTAB استخراج شد (Murray & Thompson, 1980). چرخهٔ افزونش PCR نیز برابر نمودار زیر صورت گرفت:



ژن *EXPB2* با آنزیم high fidelity از ژنگان گیاه علف تال افزونش شد. به منظور قراردادن ژن *AtEXPB2* در ناقل *pBI121*، این ناقل با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I تیمار شده و ژن *gus* حذف شد و واکنش اتصال ژن *AtEXPB2* به این ناقل گیاهی با استفاده از آنزیم *T4 Ligase* شرکت فرمنتاز انجام گرفت.

برای افزونش *AtEXPB2* آغازگر اختصاصی پیشرو 5'-GGATCCATGACAATTCTTGTCGTAGATCG-3' و پسرو 5'-GAGCTCTTAAAAGTTGACGTTGGATTTGTA-3' با استفاده از توالی ژن طراحی شد و به منظور همسانه (کلون) کردن قطعهٔ مورد نظر در بردار (وکتور) گیاهی *pBI121*، توالی آنزیم برشی *Bam*HI در آغازگر پیشرو و *Sac*I در آغازگر پسرو اضافه شده بود.

تأیید سازه‌های نوترکیب *pGEMT* و*pBI121* با هضم آنزیمی انجام شد و از همسانهٔ PCR برای تأیید حضور سازهٔ نوترکیب در آگروباکتریوم استفاده شد. از محیط LB حاوی پادزیست (آنتی‌بیوتیک)های ریفامپیسین و کانامایسین برای غربال یاخته‌های حاوی پلاسمیدهای مربوطه استفاده شد. برای تراریختی اگروباکتریوم با سازهٔ *pBI1212*، روش استاندارد انجماد و ذوب و از $CaCl_2$ استفاده شد.

تراریخته کردن توتون با استفاده از اگروباکتریوم حاوی *pBI;EXPB2*

بذرهای سترون (استریل)شدهٔ گیاه توتون روی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) کشت داده شدند و برگ‌های تازهٔ گیاهان در حال رشد برای تراریخته کردن استفاده شد. تراریخته کردن گیاه با روش قطعه‌های برگی (Leaf disk) انجام شد (Gallois & Marinho, 1995). قطعه‌های برگی آماده‌شده با دروایهٔ (سوسپانسیون) اگروباکتریوم حاوی سازه به مدت ۳۰ ثانیه آلوده شد. قطعه‌های برگی سپس روی محیط هم‌کشت (فاقد هورمون) منتقل و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس و در شرایط تاریکی به مدت دو روز نگه‌داری شد. پس از گذشت دو روز، قطعه‌های برگی در محیط کشت MS (حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پادزیست کانامایسین+۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر پادزیست سفوتاکسیم) منتقل و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس و با یک دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی تا زمان باززایی نگه‌داری شدند و از آنجایی‌که باززایی و رشد ریزنمونه‌ها در محیط کشت بدون هورمون به خوبی انجام شد، بنابراین عمل زیرکشت[1] صورت نگرفت و گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین باززاشده و ریشه‌دار،

1. Subculture

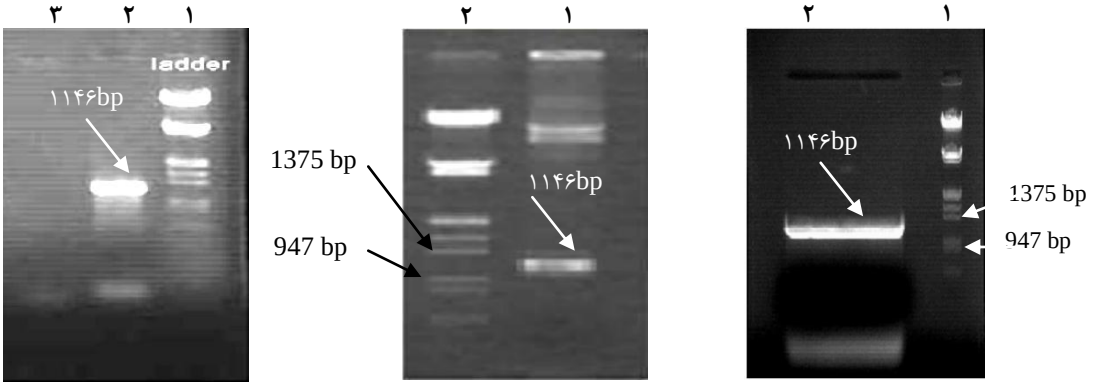
به گلدان‌های سترون‌شده حاوی پرلیت + کوکوپیت منتقل شدند و دو هفته در همان محیط نگهداری و بعد از سازگاری به گلخانه منتقل شدند.

نتایج و بحث

انتقال سازهٔ *pBI;EXPB2* به گیاه توتون

تأیید حضور قطعهٔ ۱۱۴۶ جفت بازی در سازه‌های ایجادشده با عمل هضم آنزیمی انجام شد (شکل۱. ب). سازه‌های مورد تأیید به اگروباکتریوم منتقل و با استفاده از روش همسانهٔ PCR تأیید شد. ژن *EXPB2* با اندازهٔ ۱۱۴۶ bpو برابر با ژن *EXPB2* افزونش‌شده از روی ژنگان گیاه *A. taliana* به‌دست آمد (۱. ج).

به‌طور معمول برای ریشه‌دار شدن بهتر ریزنمونه‌های توتون در محیط کشت از روش‌ها و محیط‌های اختصاصی استفاده می‌شود. برابر شکل ۲ در این آزمایش بدون استفاده از هیچ روش یا محیط اختصاصی گیاهچه‌های باززاشده ریشه‌های بلند و پرتراکم داشتند.



(ج) (ب) (الف)

شکل ۱. الف) افزونش ژن *EXPB2* از روی ژنگان گیاه علف تال. چاهک ۱سایز نشانگر sm0191 فرمنتاز و چاهک ۲ نمونهٔ افزونش‌شده، ب) برش آنزیمی سازهٔ pBI121 با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I، چاهک ۱سازهٔ pBI121 برش‌خورده و چاهک ۲ اندازهٔ نشانگر sm0191، ج) همسانهٔ PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *EXPB2*، چاهک ۱ اندازهٔ نشانگر sm0191 فرمنتاز، چاهک ۲ همسانهٔ اگروباکتریوم حاوی سازهٔ مورد نظر، چاهک ۳ کنترل منفی.

(ج) (ب) (الف)

شکل۲. الف) گیاهچهٔ شاهد باززاشده در محیط کشت، ب) مقایسهٔ گیاهچهٔ شاهد و گیاهچهٔ تراریخته، ج) گیاهچهٔ تراریخته

گیاهچه‌ها در محیط کشت MS ریشه‌زایی خیلی خوبی داشتند که با توجه به هدف‌های این تحقیق، قابل تأمل بود (شکل ۲. ج)، این پدیده ممکن است ناشی از تأثیر ژن *EXPB2* باشد و از چندین جنبه قابل بحث و بررسی است. منابع علمی وجود چنین تأثیری را برای ژن‌های اکسپنسین عنوان کرده‌اند. تأثیر

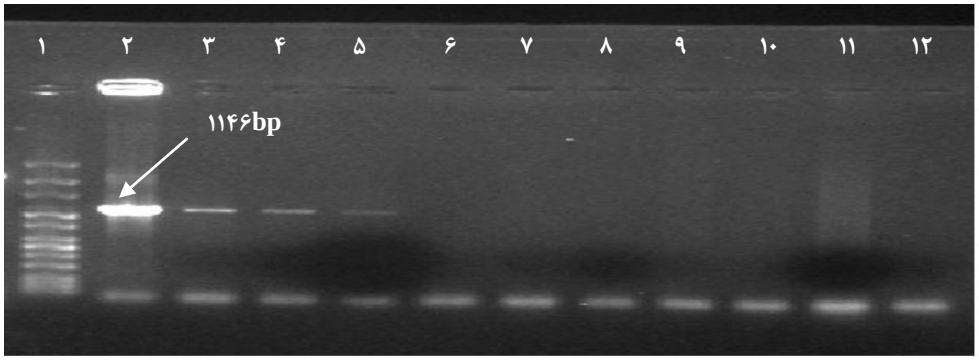
مستقیم اکسپنسین در توسعهٔ دیوارهٔ یاخته‌ای قابل بحث است، تشکیل و رشد ریشه در گیاهان شامل سه مرحلهٔ تقسیم و توسعهٔ یاخته‌ای و بلوغ آن است. دو مرحلهٔ توسعه و بلوغ یاخته‌ای تحت تأثیر تغییرات دیوارهٔ یاخته‌ای قرار دارد و چندین عامل در این تغییرات نقش دارند (Cosgrove, 1999)، یکی از اجزای دیوارهٔ یاخته‌ای، پروتئین‌های اکسپنسین هستند که عامل اصلی در توسعهٔ یاخته‌ای به‌شمار می‌آیند و بنابراین دیگر عامل‌های دخیل در توسعهٔ دیواره به این پروتئین‌ها در ایفای نقش کمک می‌کنند (Zhang & Hasenstein, 2000; Vissenberg *et al*., 2000). گزارش شده است که بیان ژن *EXP1* ریشهٔ اولیهٔ گیاه سویا در منطقهٔ طویل‌شدگی، به ویژه در یاخته‌های روپوستی (اپیدرمی) و لایه‌های یاخته‌ای زیرین رخ می‌دهد، اما بیان آن در منطقهٔ بلوغ یاخته‌ای ریشه‌های اولیه صورت نمی‌گیرد. همچنین میزان بیان آن در آغازهٔ ریشه‌های ثانویهٔ بالا گزارش شده است (Lee *et al*., 2003). بیان اختصاصی ژن‌های *EXPB2*، *EXPB8*، *EXP1* و *EXP5* در مناطق مختلف طویل‌شدگی ریشه اثبات شده است (Wu *et al*., 2001). گزارش شده است که بیان دو ژن *EXP7* و *EXP18* ارتباط و پیوستگی شدیدی با تشکیل ریشه‌های مویین در علف تال دارد (Lin & Cho, 2011; Cho & Cosgrove, 2002). تأثیر اکسپنسین‌ها در تنظیم طویل‌شدن ریشهٔ مویین در گیاه برنج نیز گزارش شده است (ZhiMing *et al*., 2011). این یافته‌ها وجود رابطهٔ بین تشکیل و توسعهٔ ریشه‌های اولیه و ثانویه با کارکرد ژن‌های اکسپنسین را نشان می‌دهد.

دومین جنبهٔ قابل بحث مربوط به عامل‌های هورمونی است. تنها تفاوت بین محیط MS ریشه‌زایی با محیط MS پایهٔ اختلاف در میزان و نسبت هورمون اکسین و سیتوکنین است. نسبت بیشتر اکسین به سیتوکنین در محیط ریشه‌زایی باعث ایجاد ریشه می‌شود. تأثیر اکسین در تشکیل ریشه در گیاه علف تال گزارش شده است (Sabatini *et al*., 1999). با توجه به این مسئله و وجود گزارش‌های چندی مبنی بر ارتباط بین تنظیم‌کننده‌های رشد و اکسپنسین‌ها می‌توان ارتباط بین این عامل‌ها را پیش‌بینی کرد. معروفترین این گزارش‌ها مربوط به رشد اسیدی دیوارهٔ یاخته‌ای القاشده توسط اکسین است، اکسین با فعال‌کردن پمپ‌های $H^{(+)}$-ATPase غشای پلاسمایی، باعث اسیدی شدن دیوارهٔ یاخته‌ای می‌شود که این شرایط اسیدی مناسب برای فعالیت پروتئین‌های اکسپنسین مستقر در دیوارهٔ یاخته‌ای است (Zhao *et al*., 2012). افزون بر آن استفاده از اکسین و اتیلن بیرون یاخته‌ای، بیان ژن‌های *AtEXP7* و *AtEXP18* را تحریک می‌کند و همان‌طور که گفته شد بیان این ژن‌ها به شدت با تشکیل ریشه‌های مویین مرتبط است (Cho & Cosgrove, 2002). با توجه به گزارش‌های علمی موجود می‌توان چنین پیشنهاد کرد که به احتمال بیان ژن *EXPB2* در گیاهچه‌های رشدیافتهٔ توتون در محیط کشت MS پایه، نیاز اکسین برای ریشه‌زایی را جبران کرده است. البته نباید به نقش سیتوکنین در این فرایند (ریشه‌زایی) بی‌توجه بود.

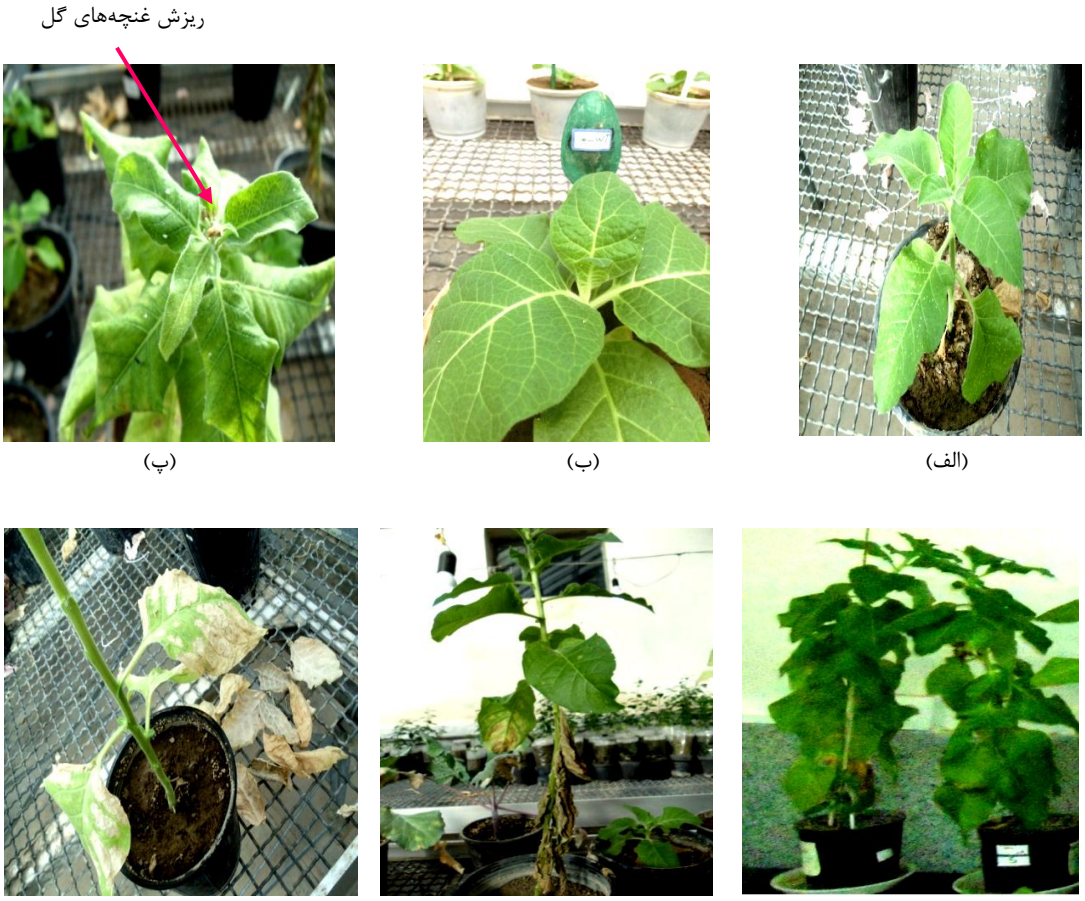
بررسی گیاهان تراریخته

در کل شمار نه رگهٔ گیاه توتون از ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط کشت گزینشی حاوی کانامایسین به‌دست آمد که با PCR ارزیابی شدند. آزمون PCR روی DNA ژنگانی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت و همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد باند ۱۱۴۶ جفت‌بازی که برابر با طول ژن *AtEXPB2* مشاهده شد. از نه گیاه به‌دست‌آمده، رگه‌های ۳، ۴ و ۵ ژن انتقال‌یافته را داشته و برابر با کنترل مثبت (شکل ۳- چاهک۲)، باندی با طول مورد نظر و برابر با طول ژن *AtEXPB2* داشتند.

پس از سازگاری گیاهان تراریخته و گیاهان شاهد در اتاقک کشت آزمایشگاه، به گلخانه منتقل شدند (شکل ۴. الف و ب). با وجود آبیاری منظم و شرایط رشدی مناسب برای گیاهان، بعضی از گیاهان صفات ریخت‌شناسی (مورفولوژیکی) غیرعادی داشتند. در مقایسه با گیاهان شاهد (شکل ۴. ج) صفاتی مانند ریزش غنچه‌های گل (شکل ۴. پ)، پیری و خشک‌شدگی غیرطبیعی برگ‌ها و ریزش آنها (شکل ۴. د، ه) در گیاهان تراریخته قابل رؤیت بود.



شکل ۳. افزونش *EXPB2* از روی ژنگان گیاهان توتون تراریخته: برابر با شکل، چاهک شمارهٔ ۱ مربوط به اندازهٔ نشانگر؛ چاهک شمارهٔ ۲ مربوط به همسانهٔ PCR (کنترل مثبت)؛ چاهک‌های شمارهٔ ۳، ۴ و ۵ مربوط به رگه‌های تراریختهٔ توتون؛ چاهک‌های شمارهٔ ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ مربوط به رگه‌های ناتراریختهٔ توتون؛ چاهک شمارهٔ ۱۱ مربوط به گیاه شاهد (رگهٔ وحشی توتون) و چاهک شمارهٔ ۱۲ مربوط به کنترل منفی (آب).



شکل ۴. گیاهان انتقال‌یافته به گلخانه، گیاه تراریخته (الف) و گیاه شاهد (ب) تازه منتقل‌شده به گلخانه، پ) ریزش غنچه‌های گل در مراحل آغازین گلدهی در گیاه تراریخته، ج) گیاهان شاهد رشدیافته، د) و ه) ریزش غیرطبیعی برگ‌های گیاهان تراریخته.

گزارش شده است که بیان ژن *EXP10* با ریزش غنچه‌های گل در گیاه علف تال مرتبط است، درصورتی‌که بیان این ژن‌ها در قاعدهٔ غنچه باعث افزایش ریزش غنچه‌ها می‌شود، اما بیان نشدن آن میزان ریزش غنچه‌ها را کاهش می‌دهد (Cho & Cosgrove, 2000)، با توجه به شکل ۴. پ، در این

تحقیق نیز ریزش غنچه‌های گل در گیاهان توتون مشاهده شد که می‌تواند ناشی از تأثیر ژن *EXPB2* منتقل شده همراه با بهم خوردن تعادل هورمونی باشد. میزان بالای اسید آبسیزیک باعث از بین رفتن آغازه‌های میوه[1] در گیاه کتان می‌شود (Davis & Addicott, 1972). اسید آبسیزیک تأثیر بسیار مهمی در تشکیل منطقهٔ ریزش در گیاهان دارد، به‌طوری‌که بازدارندگی این هورمون با استفاده از بازدارندهٔ اختصاصی آن (Fluridone) باعث کاهش میزان این هورمون و کاهش تشکیل منطقهٔ ریزش در گیاهان می‌شود (Aneja *et al*., 1999). از سویی، وجود ارتباط بین ژن‌های اکسپنسین و هورمون اسید آبسیزیک نیز اثبات شده است. گزارش شده است که افزایش بیان ژن‌های اکسپنسین باعث افزایش فعالیت اسید آبسیزیک می‌شود (Zhao *et al*., 2012). با توجه به این گزارش‌ها می‌توان چنین پیشنهاد کرد که وجود اکسپنسین بیش‌بیان‌شده در بافت‌های مختلف گیاه، از جمله مناطق بالقوهٔ ریزش، به احتمال کارکرد اسید آبسیزیک در فرایند ریزش را تسریع می‌کند. البته برای پی‌بردن به صحت این مسئله نیاز به آزمایش‌های چندی خواهد بود.

دومین صفت مشاهده‌شده مربوط به تغییر در ساختار ظاهری برگ‌های گیاهان توتون بود، به‌طوری‌که برگ‌های گیاهان تراریخته ریزش غیرطبیعی نشان دادند. تأثیر ژن‌های اکسپنسین در ساختار ظاهری برگ و تغییر شکل آن گزارش شده است (Pien *et al*., 2001). این ژن‌ها در تشکیل ساختارهای شبه‌برگی در روی ساقه نیز نقش دارند (Reinhardt *et al*., 1998). همچنین تراکم روزنه‌ای در برگ‌ها می‌تواند توسط بیش‌بیان ژن‌های اکسپنسین تغییر کند (Liu *et al*., 2012). گزارش شده است که بیش‌بیان[2] ژن *EXPA1* در علف تال باعث تسریع در باز شدن یاخته‌های نگهبان روزنه در اثر القای نوری می‌شود که این پدیده ناشی از تغییر ضریب کشسانی دیوارهٔ یاخته‌های نگهبان روزنه است (Zhang *et al*., 2011). همهٔ این تغییرات می‌تواند باعث تغییر در محتوای آبی برگ و خشک شدن غیرطبیعی آن شود. افزون بر آن، تغییر در میزان یا کارکرد هورمون‌ها نیز باعث ایجاد چنین صفتی شدند، زیرا هورمون‌های اکسین و اسید آبسیزیک در از دست رفتن آب برگ و پیری آن، نقش بسیار مهمی دارند و همبستگی این هورمون‌ها با ژن‌های اکسپنسین نیز بسیار گزارش شده است.

نتیجه‌گیری کلی

تنش‌های محیطی به ویژه خشکی اثرگذاری‌های چشمگیری بر رشد و نمو و در نهایت عملکرد گیاهان دارند (Wang *et al*., 2003; Cattivelli *et al*., 2008). سازگاری گیاهان برای رویارویی با تنش‌های محیطی وابسته به مجموعه‌ای از فرایندهای شبکه‌ای مولکولی درگیر در این زمینه است. بنابراین شناسایی و مهندسی ژن‌ها برای کنترل این سامانهٔ شبکه‌ای ضروری است (Vinocur & Altman, 2005)، ریشه‌های مویین نقش مهمی در تحمل گیاه به تنش خشکی دارند و پروتئین‌های اکسپنسین در تشکیل ریشه‌های اولیه و ثانویه دخالت دارند (Lee *et al*., 2003). بنابراین می‌توان گفت که ژن‌های اکسپنسین قابلیت شایان توجهی در رویارویی با تنش‌ها از جمله تنش خشکی دارند، اما همان‌طورکه اشاره شد کارکرد دقیق این ژن‌ها مشخص نشده است و برای استفادهٔ بهتر در کارهای اصلاحی نیاز به شناسایی کارکرد این ژن‌ها و روابط آن با دیگر آنزیم‌ها و هورمون‌ها احساس می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که نخست، امکان همسانه‌سازی و انتقال این ژن به گیاه مدل توتون وجود دارد و در ضمن گیاهان باززایی‌شده در محیط کشت گزینشی ریشه‌های قابل توجهی داشتند. این در حالی است که محیط کشت یادشده یک محیط عادی (نه محیط ریشه‌زایی) بود. بایستی توجه داشت که اصلی‌ترین اثر گزارش‌شده برای این ژن، تأثیر آن در فرایند تشکیل ریشه است که این صفت در این تحقیق مشاهده شد. در نهایت همان‌طوری‌که اشاره شد، تشدید بیان ژن‌های اکسپنسین ممکن است همراه با آثار منفی از جمله تسریع در باز شدن روزنه‌ها در اثر القای نوری در گیاهان باشد که می‌تواند باعث از دست رفتن آب و پژمردگی گیاه در شرایط نور زیاد

1. Young fruit
2. Overexpress

شود. در این پژوهش گیاهان باززاشده، از لحاظ ریخت‌شناختی چنین وضعیتی داشتند که ممکن است ناشی از اثر منفی ژن منتقل‌شده باشد. در مورد اثرگذاری‌های منفی این ژن بر اندام‌های هوایی می‌توان گفت که با توجه به این مسئله که خانوادهٔ ژنی اکسپنسین تنوع بالایی دارند این احتمال وجود دارد که هر کدام از این ژن‌ها کارکرد اختصاصی در بافت‌های مختلف گیاه دارند. همان‌طورکه در مورد ژن *EXPB2* نیز گفته شد این ژن بیشتر در ریشه بیان می‌شود و در ریخت‌زایی ریشه مؤثر است که درست بودن این مسئله در این تحقیق نیز اثبات شد. اما با توجه به این مسئله که انتقال این ژن در این پژوهش با استفاده از پیشبر[1] *CaMV35S* صورت گرفته، بنابراین بیان آن در دیگر بافت‌های گیاه از جمله برگ‌ها و غنچه‌های گیاه غیرعادی خواهد بود، این مسئله یکی از دلایل احتمالی در زمینهٔ تأثیرگذاری‌های سوء این ژن در اندام‌های هوایی می‌تواند باشد چرا که هیچ‌گونه اثر منفی در رابطه با ریشه‌زایی برای آن گزارش و مشاهده نشده است. بر این اساس انتقال این ژن با پیشبر اختصاصی ریشه، برتری ریشه‌زایی بدون وجود اثرگذاری‌های منفی خواهد داشت. اما در نهایت برای پی بردن به علت دقیق این یافته‌ها نیاز به بررسی شرایط مولکولی، فیزیولوژیکی و ریخت‌شناختی گیاهان تراریخته وجود دارد که بایستی در آزمایش‌های دیگری این کار صورت گیرد.

REFERENCES

1. Aneja, M., Gianfagna, T. & Ng, E. (1999). The roles of abscisic acid and ethylene in the abscission and senescence of cocoa flowers. *Plant Growth Regulation*, 27(3), 149-155.
2. Anjanasree, K. & Bansal, K. (2003). Isolation and characterization of ripening-related expansin cDNA from tomato. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 12, 31-35.
3. Cattivelli, L., Fulvia Rizza, Badeck, F.-W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A. & Stanca, A.M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, 105(1), 1-14.
4. Cho, H.-T. & Cosgrove, D.J. (2000). Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 97(17), 9783-9788.
5. 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.
6. Cosgrove, D.J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual review of plant biology*, 50(1), 391-417.
7. Cosgrove, D.J. (2000a). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1), 109-124.
8. Cosgrove, D.J. (2000b). Loosening of plant cell walls by *expansins*. *Nature*, 407(6802), 321-326.
9. Dal Santo, S., Fasoli, M., Cavallini, E., Tornielli, G. B., Pezzotti, M. & Zenoni, S. (2011). PhEXPA1, a Petunia hybrida expansin, is involved in cell wall metabolism and in plant architecture specification. *Plant Signaling & Behavior*, 6(12), 2031-2034.
10. Davis, L.A. & Addicott, F.T. (1972). Abscisic acid: correlations with abscission and with development in the cotton fruit. *Plant Physiology*, 49(4), 644-648.
11. Gallois, P. & Marinho, P. (1995). Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in *tobacco*. *Methods in Molecular Biology-Clifton then Totowa-*, 49, 39-48.
12. Guo, W., Zhao, J., Li, X., Qin, L., Yan, X. & Liao, H. (2011). A soybean *β-expansin* gene *GmEXPB2* intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses. *The Plant Journal*, 66(3), 541-552.
13. Jung, J., O'Donoghue, E.M., Dijkwel, P.P. & Brummell, D.A. (2010). Expression of multiple expansin genes is associated with cell expansion in potato organs. *Plant Science*, 179(1), 77-85.
14. Kwasniewski, M. & Szarejko, I. (2006). Molecular cloning and characterization of *β-Expansin* gene related to root hair formation in barley. *Plant Physiology*, 141(3), 1149-1158.
15. 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.

1. Promoter

16. Li, F. & Wang, W. (2012). Characterization of a wheat (*Triticum aestivum L.*) *expansin* gene, *TaEXPB23*, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54, 49-58.
17. Li, F., Xing, S., Guo, Q., Zhao, M., Zhang, J., Gao, Q., Wang, G. & Wang, W. (2011). Drought tolerance through over-expression of the expansin gene TaEXPB23 in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 168(9), 960-966.
18. Lin, C., Choi, H.-S. & Cho, H.-T. (2011). Root hair-specific *EXPANSIN A7* is required for root hair elongation in Arabidopsis. *Molecules and Cells*, 31(4), 393-397.
19. Liu, J., Zhang, F., Zhou, J., Chen, F., Wang, B. & Xie, X. (2012). Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 78(3), 289-300.
20. Murashige, T. & Skoog, F. (1980). A revised medium for rapid growth and bio assays with *tobacco* tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
21. Murray, M. & Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4326.
22. Nishitani, K. (1997). The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *International Review of Cytology*, 173, 157-206.
23. Pien, S., Wyrzykowska, J., McQueen-Mason, S., Smart, C. & Fleming, A. (2001). Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*, 98(20), 11812-11817.
24. Reinhardt, D., Wittwer, F., Mandel, T. & Kuhlemeier, C. (1998). Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *The Plant Cell*, 10(9), 1427-1437.
25. Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. & Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99(5), 463-472.
26. 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(4), 419-422.
27. Sampedro, J. & Cosgrove, D.J. (2005). The *expansin* superfamily. *Genome biology*, 6(12), 242.
28. Sánchez-Rodríguez, C., Rubio-Somoza, I., Sibout, R. & Persson, S. (2010). Phytohormones and the cell wall in Arabidopsis during seedling growth.*Trends in Plant Science*, 15(5), 291-301.
29. Son, S. H., Chang, S. C., Park, C. H. & Kim, S. K. (2012). Ethylene negatively regulates EXPA5 expression in Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum*, 144(3), 254-262.
30. Vinocur, B. & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 123-132.
31. 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.
32. 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.
33. Wang, W., Vinocur, B. & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
34. Won, S. K., Choi, S. B., Kumari, S., Cho, M., Lee, S. H. & Cho, H. T. (2010). Root hair-specific *EXPANSIN* B genes have been selected for Graminaceae root hairs. *Molecules and Cells*, 30(4), 369-376.
35. 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.
36. Zhao, M. R., Han, Y. Y., Feng, Y. N., Li, F. & Wang, W. (2012). Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. *Plant Cell Reports*, 31(4), 671-685.
37. Zhang, N. & Hasenstein, K.H. (2000). Distribution of *expansins* in graviresponding *maize* roots. *Plant and Cell Physiology*, 41(12), 1305-1312.
38. 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(1), 27-36.
39. ZhiMing, Y., Bo, K., XiaoWei, H., ShaoLei, L., YouHuang, B., WoNa, D., Ming, C., Hyung-Taeg, C. & Ping, W. (2011). Root hair-specific *expansins* modulate root hair elongation in rice. *The Plant Journal*, 66(5), 725-734.

Iranian Journal of Filed Crop Science, Vol. 46, No. 4, Winter 2016

Transfer of *EXPB2* gene to *Nicotina tabacum* for enhance drought tolerance

Davood Dadashi[1] and Alireza Abbasi[2*]
1, 2. Former M. Sc. Student and Associate Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Oct. 9, 2014 - Accepted: Apr. 28, 2015)

ABSTRACT

Cell expansion and cell division are two main processes in plant growth and development. Expansin proteins play a role key in cell expansion. These non-enzyme proteins involve in many growth and developmental processes. This protein affects drought tolerance. *AtEXPB2* gene belongs to these proteins family. *AtEXPB2* gene mainly expresses in the root tissue. In this study the *EXPB2* gene, that was isolated from *Arabidopsis taliana* DNA genomics, transferred to *Nicotina tabacum* plant. Gene transfer was performed by Agrobacterium-mediated technique. Explants were inoculated by Agrobacterium and then were planted on M.S medium contained antibiotic of kanamycin. Finally, the tolerant seedlings were transferred to pots. Polymerase chain reaction was used to confirm the transgenic plants. Good rooting of transgenic plants suggests that this gene was increased root length and density.The results suggest that the expression of these genes in the aerial parts of the plant can cause undesirable traits such as loss of flower buds and leaf loss.

Keywords: AtEXPB, drought stress, genes, expansin, tobacco.

* Corresponding author E-mail: rezabbasi@ut.ac.ir Tel: +98 912 4128709