ارزیابی انتقال چند ژنی یک پروتئین کیناز سرین/ترئونین به همراه ژنی از خانواده سیتوکینین اکسیداز/دِهیدروژناز و فاکتور رونویسی القا شونده در شرایط تنش از خانواده NAM-ATAF-CUC به برنج

لیلا پورهنگ[۱]، زهرا قربانزاده[۲]، مهربانو کاظمی الموتی[۳]، سید محمد موسوی‌پاکزاد[٤]، الهه معتمد[٥]، مونا ماپار[٦]، علی‌اکبر عبادی[۷]، کتایون زمانی اسدآبادی[۸]، محمدرضا غفاری[۹]، قاسم حسینی سالکده[۱۰]، بهزاد قره‌یاضی[۱۱]، مطهره محسن‌پور[۱۲]*

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه پژوهشی زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۲-دانشجوی دکتری، گروه پژوهشی زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳-دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه پژوهشی زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

٤- دانش آموخته کارشناسی، کارشناس گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۵- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

٦- پژوهشگر پسادکتری، گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۷- استادیار، بخش تحقیقاتاصلاح و تهیه بذر، موسسه تحقیقات برنج کشور (RRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

۸- استادیار، گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۹- استادیار، گروه پژوهشی زیست شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۱۰- استاد، پژوهشگاه، گروه پژوهشی زیست شناسی سامانه‌ها، بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۱۱- استاد، گروه پژوهشی زیست شناسی سامانه‌ها، بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

۱۲- استادیار، گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

*صندوق پستی ۳۱۳۵۹-۳۳۱۵۱، کرج، ایران
mthrhm@yahoo.com

دریافت: ۱٤۰۱/۰۲/۱۹ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۸/۱٤

چکیده

تولید گیاهان متحمل به خشکی به دلیل بحران کم آبی حائز اهمیت خواهد بود. اصلاح ساختار ریشه می‌تواند با بهبود استقرار در خاک و جذب بهتر آب و مواد غذایی موجب مقاومت به ورس و تحمل به خشکی شده و در نهایت منجر به افزایش عملکرد دانه و کیفیت مطلوب بذر شود. در این پژوهش سه ژن تاثیر گذار در بهبود ساختار ریشه، مقاومت به خشکی و افزایش جذب فسفر با ساخت سازه‌های ترکیبی دو و سه ژنی برای انتقال به گیاه برنج استفاده شدند. یک پروتئین کیناز سرین/ترئونین موثر در افزایش جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر (*PSTOL1*)، ژنی از خانواده سیتوکینین اکسیداز/دهیدروژناز (*OsCKX4*) و یکی از ژن‌های کدکننده فاکتور رونویسی القا شونده در شرایط تنش از خانواده NAM-ATAF-CUC (*OsNAC5*) برگرفته از ارقام وحشی برنج تحت نواحی تنظیمی جداگانه در ناحیه T-DNA ناقل دوگانه اگروباکتریومی قرار داده شدند. ژن *OsNAC5* تحت پیشبر مختص ریشه RCc3 و ژن *PSTOL1* تحت پیشبر یوبیکوئیتین همسانه سازی شدند. همچنین ژن *OsCKX4* یک بار تحت پیشبر یوبی‌کوئیتین و یک بار تحت پیشبر RCc3 همسانه سازی شد. دو سازه چند ژنی حاصل مو سوم به pUhrN5CkPstol و pUhrCkPstol برای انتقال ژن به برنج رقم هاشمی مورد استفاده قرار گرفتند. انتقال ژن به کالوس حاصل از بذر رسیده برنج انجام شد. گیاهان تراریخته احتمالی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تایید شدند. از تعداد ۱۰۷ گیاه باززاشده‌ای که حضور تراژن‌ها در آنها به اثبات رسید، در نهایت تعداد ۱٤ رخداد تراریخته ایجاد شد. مقایسه فنوتیپ ریشه‌ی گیاهان تراریخته در نسل T0 با گیاه شاهد تفاوت ظاهری قابل ملاحظه‌ای در ساختار ریشه نشان داد که نیاز به آنالیزهای تکمیلی دارد. تاکنون خالص‌سازی یکی از رخدادهای حاوی دو ژن *CKX4* و *PSTOL1* در نسل T2 انجام و به تایید نهایی رسیده است. امید است تولید برنج با بهبود ساختار ریشه منجر به تحمل خشکی، کاهش مصرف آب و عملکرد بهتر در شرایط تنش شود.

کلید واژگان: پروتئین کیناز سرین/ترئونین، سیتوکینین اکسیداز/دهیدروژناز، سازه چند ژنی، فاکتور رونویسی القا شونده، مهندسی ژنتیک برنج

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

۱-مقدمه

یکی از تاثیرگذارترین عوامل محدود کننده تولید برنج به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه همچون ایران، هندوستان، پاکستان و بنگلادش، تنش‌های غیر زیستی و مهمترین آنها کمبود منابع آبی و وجود تنش خشکی است. تحمل نسبت به تنش خشکی به‌عنوان یک صفت پیچیده شامل مجموعه‌ای از تغییرات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در سطح گیاه است[۱]. ریشه برنج سطحی و افشان بوده و حداکثر در عمق ۲۰ تا ۲۵ سانتی‌متری خاک نفوذ می‌کند که به همین دلیل مستعد متاثرشدن از تنش خشکی است. به‌طور کلی، یک سیستم عمیق‌تر، ضخیم‌تر، بلندتر و منشعب‌تر ریشه می‌تواند تحمل برنج را به تنش کم آبی افزایش دهد[۲]. یکی از مهمترین راهکارهای مقابله با بحران کمبود آب استفاده هرچه مفیدتر و کارآمدتر از آب است که تغییر ساختار ریشه با استفاده از مهندسی ژنتیک با افزایش طول، عمق، تعداد و ضخامت ریشه می‌تواند تحمل به کم آبی را در پی داشته باشد. کشت نشایی و غرقابی برنج که نیروی انسانی و آب بسیار زیادی را طلب می‌کند، دلیل اصلی بالا بودن هزینه تولید و افزایش واردات برنج در سال‌های اخیر بوده است. با توجه به بالا بودن سطح زیر کشت برنج، تحمل به خشکی در صورتی که موجب تغییر نوع کشت برنج از حالت غرقابی به خشکه کاری شود می‌تواند باعث کاهش مصرف آب شود. در صورتی‌که زشاکاری، کرت‌بندی و مصرف بالای آب در کشت برنج حذف شود، منجر به کاهش قابل توجهی در هزینه‌های تولید خواهد شد.

برای افزایش تحمل به خشکی در گیاه برنج، شناسایی ژن‌هایی که سبب بهبود ساختار ریشه می‌شوند اهمیت زیادی خواهد داشت. ژن‌های خانواده NAM-ATAF-CUC یا NAC یکی از بزرگترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی هستند که تا به امروز تنها در گیاهان یافت شده و تحت تنش شوری و خشکی بیان شده و باعث سازگاری به تنش می‌شوند[۳]. در برنج ۱۴۰ ژن *NAC* شناسایی شده و تحقیقات نشان داده‌اند که ۱۸ مورد آنها در شرایط استرس القاء می شوند که ژن *OsNAC5* یکی از این ژن‌ها است. ژن *OsNAC5* یک فاکتور رونویسی وابسته به ABA است و عملکرد آن می‌تواند مربوط به انتقال Fe، Zn و اسیدهای آمینه از بافت‌های سبز به دانه باشد[٤]. Wu و همکاران (۲۰۱٤) گزارش دادند که بیان در سطح زیاد *OsNAC5* قطر ریشهٔ برنج را افزایش داده و منجر به تحمل خشکی و افزایش عملکرد دانه در مزرعه می‌شود [۵]. نتیجه پژوهش‌های Redillas و همکاران (۲۰۱۲) و Jeong و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که بیان بالای دو ژن *OsNAC9* و *OsNAC5* قطر بافت آئرانشیم و استل ریشه در رقم Nipponbare را افزایش داده و ریشه‌های سبک و قطورتری تولید می‌کند. میزان محصول نهایی در این گیاهان در شرایط تنش خشکی بین ۷۰-۲۰ درصد در مقایسه با شاهد افزایش نشان داده است[۷و٦]. افزایش بیان ژن *OsNAC5* علاوه بر خشکی، تحمل به شوری و دمای پایین در گیاهان تراریخته را نیز افزایش می‌دهد[۸]. بیان بالای *OsNAC5* تحت کنترل پیشبرهای مختص ریشه در گیاه برنج، تحمل به خشکی و شوری را در طول مرحله رشد رویشی بهبود می‌دهد و مهم‌تر اینکه بیان بالای این ژن در ریشه به‌طور معنی‌داری تحمل به خشکی را در مرحله باردهی با افزایش عملکرد دانه نشان می‌دهد. افزایش بیان *OsNAC5* در برنج منجر به انباشت پرولین و قندهای محلول و همچنین مقدار کمتر مالون دی آلدهید MDA[1] و H2O2 می‌شود. این تغییرات متابولیکی گیاهان را از کاهش آب و آسیب اکسیداتیو در شرایط تنش محافظت می‌کنند. بنابراین، *OsNAC5* تحمل به تنش در برنج را بدون ایجاد نقایص در رشد بهبود می‌بخشد[۹و۸].

[1] Malondiahdehyde

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

سـیتوکینین[1] مسـئول رشـد و تمایز سـلول‌ها و اندام‌های گیاهی اسـت و همچنین در جذب عناصـر غذایی، پیری و پا سخ به ا سترس نیز موثر ا ست. سیتوکینین پس از انجام عملکرد خود، توسـط آنزیم‌های خاصـی مانند سـیتوکینین اکسیداز/دهیدروژنازها (*CKXs*) تجزیه و غیرفعال می شود که این یک فرایند برگشت‌ناپذیر است. ژن‌های *CKX* برای حفظ هموستاز سیتوکینین در طول رشدونمو گیاه ضروری هسـتند. بنابراین، تحقیقات گسـترده‌ای در مورد *CKX* ها انجام شده و همچنان ادامه دارد. در برنج ، تاکنون ۱۱ ژن *OsCKX*شناسایی شده است. اگرچه مشخص شده است که این ژن ها نقش مهمی در رشـــدونمو برنج بهویژه ریشه‌های گرهی دارند که اکثریت سیستم ریشه‌ای برنج را شـــامل می‌شـــوند، با این‌حال، بیشـــتر عملکردهای آنها ناشناخته مانده است. مکانیسم مولکولی تشکیل ریشه‌های گرهی ناشـناخته اسـت. بررسـی یک موتانت غالب برنج (*root enhancer1, ren1-D*) افزایش سیستم ریشه، افزایش تعداد ریشـه‌های گرهی و کاهش ارتفاع گیاه را نشـان داده ا ست. Gao و همکاران (۲۰۱۴) با انجام تجزیه تحلیل‌های ژنتیکی و مولکولی ثابت کردند که فنوتیپ مذکور در اثر فعال‌کردن ژنی از خانوادهٔ سیتوکینین اکسیداز/دهیدروژناز به نام *OsCKX4* ایجاد شـده اسـت [۱۰]. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که *OsCKX4* در سیگنالینگ سیتوکینین نقش دارد و اکسـین و سـیتوکینین بیان *OsCKX4* را در ریشـه تنظیم می‌کنند. برای کشـف عملکرد *OsCKX4* در ر شد ریشه‌های گرهی، از فناوری RNAi برای مهار کردن بیان *OsCKX4* در گیاهان نوع وحشـی اسـتفاده شـد و گیاهان تراریخته‌ی RNAi، به‌طور قابل توجهی ریشه تاجی کمتری داشـتند و رشـد اولیه ریشـه نیز در آنها مهار شـد. بررسـی‌های بیشـتر نشـان دادند این ژن نقش مهمی در تشکیل ریشه‌های گرهی بازی می‌کند. بیان بالای این ژن با پی شبر اخت صا صی در ری شه باعث افزایش طول، تعداد و وزن خشـک ریشـه‌های نودال در رقم Zhonghua 11 شد[۱۰].

فسفر به‌عنوان یک ماکرومولکول ضروری برای سلول‌های زنده، در تولید محصـولات کشـاورزی نقش مهمی دارد. خاک‌های ایران از نظر فسفر فقیر هستند. بررسی وضعیت حاصلخیزی خاک‌های کشاورزی در ۳۰ استان کشور نشان می‌دهد که میزان فسفر ۷۱/۸ درصد خاک‌های کشور کمتر از حد بحرانی اسـت[۱۱]. پیشـرفت‌های اخیر در زیسـت شناسی مولکولی، فرصتی را برای مهندسی گیاهان برای به حداکثر رساندن مکانیسم جذب فسفر در گیاه و به حداقل رساندن عوارض جانبی فسفر بر روی محیط زیست مانند تراوش فسـفر از زمین‌های کشـاورزی به دریاچه‌ها و رودخانه‌ها فراهم آورده اسـت[۱۲]. گروهی از برنج‌های منطقه‌ای در هند با خاک‌های مشکل‌دار و فقیر به‌عنوان یک منبع با ارزش ژن‌های مقاوم به کمبود عناصـر غذایی شناسایی شدند. واریته *Kasalath* متحمل به کمبود فسفر اسـت و راندمان جذب فسـفر بالاتری را نسـبت به سـایر انواع برنج‌ها از خاک‌های فقیر نشـان می‌دهد. این واریته می‌تواند به‌عنوان منبع با ارزشـی از ژن‌های افزایش جذب فسـفر اسـتفاده شـود[۱۳]. Wissuwa و همکاران (۲۰۰۲) جایگاه ژنی صـفت کمی تحمل به کمبود فسـفر به نام *Pup1* (*Phosphorus uptake 1*) را در واریته Kasalath شناسایی کردند و از طریق تلاقی به برنج جاپونیکا واریته Nipponbare منتقل کردند [۱۳]. لاین‌های ایزوژنیک حامل این QTL، عملکرد بیشـتر و معنی‌داری را نسـبت به گیاه والدینی حساس نشان دادند[۱۴]. توالی‌یابی این مکان در *Kasalath* یک توالی پیچیده شـامل ۹۰ کیلو باز غنی از ترانسپوزون حذف و اضافه (INDEL) را نشان داد که در ژنوم گیاه حسـاس وجود نداشـت[۱۵]. پس از آن Gamuyao و همکاران (۲۰۱۲) *PSTOL1* را در این مکان به‌عنوان ژن اصـلی که منجر به افزایش جذب فسـفر

[1] Cytokinin

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

می‌شود، شناسایی کردند[۱۶]. *PSTOL1* یک پروتئین کیناز سرین/ترئونین است و به‌طور مستقیم نمی‌تواند تنظیم بیان ژن را انجام دهد و از طریق فسفریله کردن فاکتورهای رونویسی به‌طور غیرمستقیم این کار را انجام می‌دهد. برای دستیابی به داده و اطلاعاتی نسبت به پاسخ‌های پایین دست *PSTOL1*، تجزیه‌وتحلیل Affymetrix gene-array بر روی گیاهان تراریخته IR64 حاوی *PSTOL1* و گیاه کنترل انجام شد. نتایج نشان داد ۲۳ ژن مرتبط با رشد ریشه و پاسخ به تنش، بیان متفاوتی داشتند و ۲۱ ژن از ۲۳ ژن با QTL های مرتبط با رشد ریشه و خشکی همپوشانی داشتند که نشان‌دهنده نقش مهم *PSTOL1* در توسعه ریشه و تحمل به تنش‌ها است؛ زیرا باعث افزایش جذب مواد مغذی از خاک می‌شود[۱۶]. به عبارت دیگر *PSTOL1* یک تنظیم کننده‌ی رشد ریشه در برنج است. همچنین، بیان بالای *PSTOL1* در گیاهان تراریخته عملکرد دانه را بیش از ۶۰ درصد درگیاهان تحت تنش فسفر پایین، افزایش داد. طی تحقیقات انجام شده مشخص شد که برای ایجاد گیاهان متحمل به کمبود فسفر، بیان *PSTOL1* بالاتر از یک آستانه‌ی خاص مورد نیاز است. همچنین، آنالیز جایگاه *PUP1*، حفاظت‌شدگی بالای *PSTOL1* را در ارقام متحمل به خشکی نشان دادند[۱۸و۱۷].

این پژوهش با هدف انتقال همزمان ژن‌های سه خانواده مختلف شامل *OsNAC5*، *OsCKX4* و *PSTOL1* به برنج برای تغییر ساختار ریشه، بهبود جذب عناصر غذایی، بهبود عملکرد و تحمل به خشکی انجام شده است.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱ ساخت سازه چند ژنی حاوی ژن‌های *OsNAC5*، *CKX4* و *PSTOL1*

طراحی سازه‌های ژنی با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI (Invitrogen) انجام شد. واکنش اتصال ابتدا در حامل‌های همسانه سازی تحت پیشبر مختص ریشه RCc3 در مورد ژن *OsNAC5* و همچنین تحت پیشبر یوبی‌کوئیتین در مورد ژن *PSTOL1* انجام شد و ژن *OsCKX4* یک بار تحت پیشبر یوبی‌کوئیتین و یک بار تحت پیشبر RCc3 همسانه سازی شد. سپس، در حامل دوگانه مختص انتقال ژن با واسطه اگروباکتریوم[1] حاوی ژن نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین[2] به‌صورت دوژنی (*CKX4* و *PSTOL1*) و سه ژنی (*OsNAC5*، *CKX4* و *PSTOL1*) قرار داده شدند. مخلوط اتصال به سلول‌های مستعد تهیه شده از *E. coli* سویهٔ XLI-Blue منتقل شد و روی محیط انتخابی LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسپکتینومایسین[3] و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استرپتومایسین رشد داده شد. اثبات تراریختی پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های حاصل، با استفاده از هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. کلیه مراحل همسانه‌سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل‌های Sambrook و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد[۱۹]. پلاسمید نوترکیب حاصل پس از تایید، به روش An و همکاران (۱۹۸۶) به اگروباکتریوم سویه EHA105 منتقل شد[۲۰]. جزئیات مراحل ساخت سازه مشابه گزارش‌های قبلی [۲۳-۲۱] انجام شده است.

۲-۲ انتقال ژن القای کالوس و تکثیر آن

بذر برنج رقم هاشمی تهیه شده از موسسه تحقیقات برنج (رشت) به دقت و بدون آسیب رساندن به پریکارپ پوست کنده شد. سپس، بذرها با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد حاوی یک قطره توین ۲۰ به مدت حدود ۳۰ تا ۴۵ دقیقه و با شیک‌کردن آرام ضدعفونی شدند. پس از حذف هیپوکلریت سدیم سه بار با آب استریل آب‌شویی شده و بذرها روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. در این مرحله بذرها به محیط جامد R-N6D [۲۴] منتقل و در دمای ۳۰ درجه و ۱۶ ساعت نور ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. در مواردی هنگام ایجاد بافت‌های تمایز زدایی

[1] Agrobacterium
[2] Hygromycin
[3] Spectinomycin

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

شــده کوچکی از اســکوتلوم بذر، این بذرها به محیط R-DKND [۲٤] منتقل می‌شــدند یا مســتقیما بذرها در محیط R-DKND قرار داده می‌شــدند. پس از حدود ســه هفته تا یک و نیم ماه کالوس‌های تردی که در حال تکثیر سریع بودند برای انتقال ژن استفاده شدند (شکل ۱).

۲-۳ تلقیح با اگروباکتریوم و هم‌کشتی

اگروباکتریوم حاوی پلاسمیدهای نوترکیب pUhrCkPstol و pUhrN5CkPstol، پس از رشد روی محیط حاوی آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و اسپکتینومایسین (به ترتیب ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و تایید با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای انتقال ژن استفاده شد. این باکتری از استوک گلیسرول حدود سه روز پیش از تلقیح، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی رشد داده شد. برای تلقیح، مقداری از باکتری با لوپ از محیط‌کشت برداشته شد و در محیط مایع R-N6AS یا R-DKNAS در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری سوسپانسیون شد و OD600nm حدود ۰/۳ تنظیم شد.

برای تلقیح با اگروباکتریوم، کالوس‌ها به‌طور مســتقیم در کشت سوسپانسیون اگروباکتریوم به مدت ۲ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از تلقیح، کالوس‌ها بین دو کاغذ فیلتر قرار داده شــدند و در پتری‌دیش حاوی محیط مایع R-N6AS یا R-DKNAS قرار گرفتند و به مدت ســه روز در ۲۵ درجه و تاریکی انکوبه شدند.

پس از ۳ روز هم‌کشـــتی، برای حـذف اگروبـاکتریوم، کالوس‌ها یک بار در آب اســتریل حاوی ســفوتاکســیم شستشو شدند و روی کاغذ صافی قرار گرفتند. سپس، کالوس‌ها به محیط R-N6Sel یا R-DKNSel حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومـایســین در دمـای ۳۰ درجـه سانتی‌گراد و فتوپرید ۱۶ ساعت روشنایی منتقل شدند و هر ده روز واکشت انجام شد. پس از دو دوره انتخاب به تدریج کالوس‌های مقاوم به هیگرومایسین در حال رشد و قابل تشخیص بود. در حالی‌که، کالوس‌های شاهد و تلقیح نشــده و کالوس‌هایی که ژن را دریافت نکرده بودند روی محیط انتخابی از بین رفتند. ســپس، کالوس‌های مقاوم به محیط باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شــده و در نهایت پس از ریشــه‌زایی به محیط یوشــیدا[1] و خاک منتقل شــد (شکل ۱).

جدول۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده در تایید مولکولی گیاهان تراریخته حاصل از انتقال سازه نوترکیب pUhrCkPstol و pUhrN5CKPstol و اندازه قطعه تکثیری مورد انتظار.

نوع آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر از 5' به 3'	اندازه قطعه تکثیری (جفت باز)
مختص سازه	P1: Hyg-F P2: NOS-F	AGCTGCGCCGATGGTTTCTACAA ATCGTTCAAACATTTGGC	1403
مختص سازه و ژن	P3: Pstol-F P4: NOS-R	GACCAGTTTTGTTGCCCCAC GACCGGCAACAGGATTCAATC	262
مختص ژن	P5: Ck-F P6: Ck-R	GCAGTCCCTCCTCGCCATC AGGGTGGAGGAGTTCTGCGGG	729
مختص ژن	P7: N5-F P8: N5-R	AACGGCTTCTGGAGGTAG CGACTACGGCTTCTACGA	357
داخلی ژنوم برنج	RG100-F RG100-R	GCTGGACGTGCCAAAGAGAG CGAACCACAGCCACAGCATG	952

[1] Yoshida

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

۲-٤ آنالیزهای مولکولی

گیاهانی که در کلیه مراحل باززایی در محیط انتخابی حاوی هیگرومایسین زنده مانده و رشد کردند، پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آغازگر اختصاصی مختص ژن و مختص سازه آنالیز شدند. توالی آغازگرهای مورد استفاده و اندازه قطعه مورد انتظار تکثیر در جدول ۱ نشان داده شده است.

تفکیک رخدادها و تعیین محل الحاق تراژن در ژنوم برنج با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس بهینه شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (در دست چاپ) انجام شد.

۳- نتایج

ساخت سازه چند ژنی دارای ژن‌های کاندید تغییردهنده ساختار ریشه، بهبود جذب عناصر غذایی و تحمل به خشکی

در این گزارش، ساخت دو سازه‌ی چند ژنی، یکی با دو ژن کاندید و دیگری با سه ژن کاندید ارایه شد. سازه‌ی چند ژنی موسوم به pUhrCkPstol دارای دو ژن *OsCKX4* و *PSTOL1* است که به‌ترتیب تحت پیشبر RCc3 (مختص بیان در ریشه) و یوبی‌کوئیتین قرار گرفته‌اند و سازه‌ی pUhrN5CkPstol علاوه بر دو ژن *OsCKX4* و *PSTOL1*، دارای ژن *OsNAC5* (بهینه‌سازی کدونی شده بر اساس نتایج قبلی [۲۵] نیز می‌باشد (شکل ۱-a). در این سازه برای ژن‌های *PSTOL1* و *CKC4* از پیشبر یوبی‌کوئیتین، و برای ژن *OsNAC5* از پیشبر RCc3 استفاده شد. دو پایانبر NOS و Tahsp17 در ساخت این سازه‌ها استفاده شد. قرار گرفتن کاست ژنی *OsCKX4* در کنار کاست ژنی *PSTOL1* و نیز قرار دادن این دو کاست ژنی در کنار کاست ژنی *OsNAC5* با هضم آنزیمی و واکنش زنجیره ای پلیمراز تایید شد. این کاست‌های ژنی در خلاف جهت کاست ژنی مقاومت به هیگرومایسین در ناحیه T-DNA سازه اگروباکتریومی قرار دارند (شکل ۱). دو سازه چند ژنی حاصل می‌توانند با استفاده از اگروباکتریوم برای تغییر ساختار ریشه، بهبود جذب عناصر غذایی و تحمل به خشکی در گیاهان به‌ویژه در تک لپه‌ای‌ها استفاده شوند.

۳-۱ تولید گیاهچه های تراریخته‌ی برنج رقم هاشمی

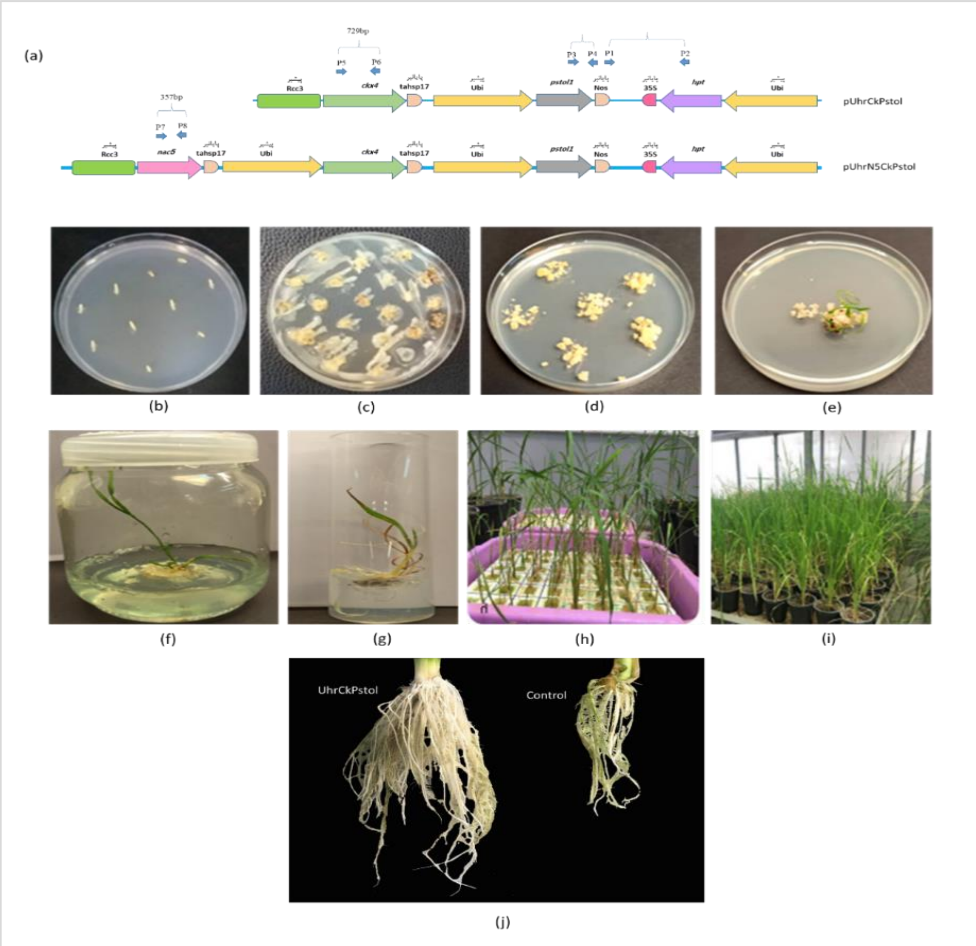
پس از تلقیح با اگروباکتریوم، کالوس‌هایی که به احتمال تراژن‌ها را دریافت کرده بودند در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین دوام آورده و شروع به رشد کردند. همچنین، کالوس‌های قرار گرفته به‌عنوان شاهد غیرتراریخته در کنار کالوس‌های تراریخته احتمالی از بین رفتند. به تدریج روند سبز شدن و باززایی کالوس‌های جنین‌زا آغاز و تولید گیاهچه کردند و سپس گیاهچه‌های مستقل در محیط ریشه زایی، ریشه‌دار شدند (شکل ۱). آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین در تمامی مراحل تا پیش از انتقال گیاهان به یوشیدا استفاده شد. انتقال گیاهچه های کامل به محلول یوشیدا انجام شد. پس از استقرار گیاهچه‌های باززا شده در محلول یوشیدا به مدت یک ماه، این گیاهان آمادگی انتقال به خاک را پیدا کردند و تحت شرایط کنترل شده در گلخانه تراریخته پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی تا مرحله بذرگیری و انجام آنالیزهای تکمیلی نگهداری شدند. تفاوت حجم ریشه گیاهان تراریخته احتمالی حاصل از سازه pUhrCkPstol در کنار گیاه شاهد غیر تراریخته هم سن و حاصل از مراحل کشت بافت، پیش از انتقال به گلدان قابل مشاهده بود (شکل ۱-j) که نیاز به آنالیزهای دقیق‌تر در تحقیقات آینده دارد.

۳-۲ تایید تراریختگی گیاهچه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه مختص ژن

تراریختی گیاهان حاصل از انتقال هر دو سازه نوترکیب در مرحله اول، مستقل از نوع ژن کاندیدِ منتقل شده و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده به‌صورت مختص سازه تایید شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

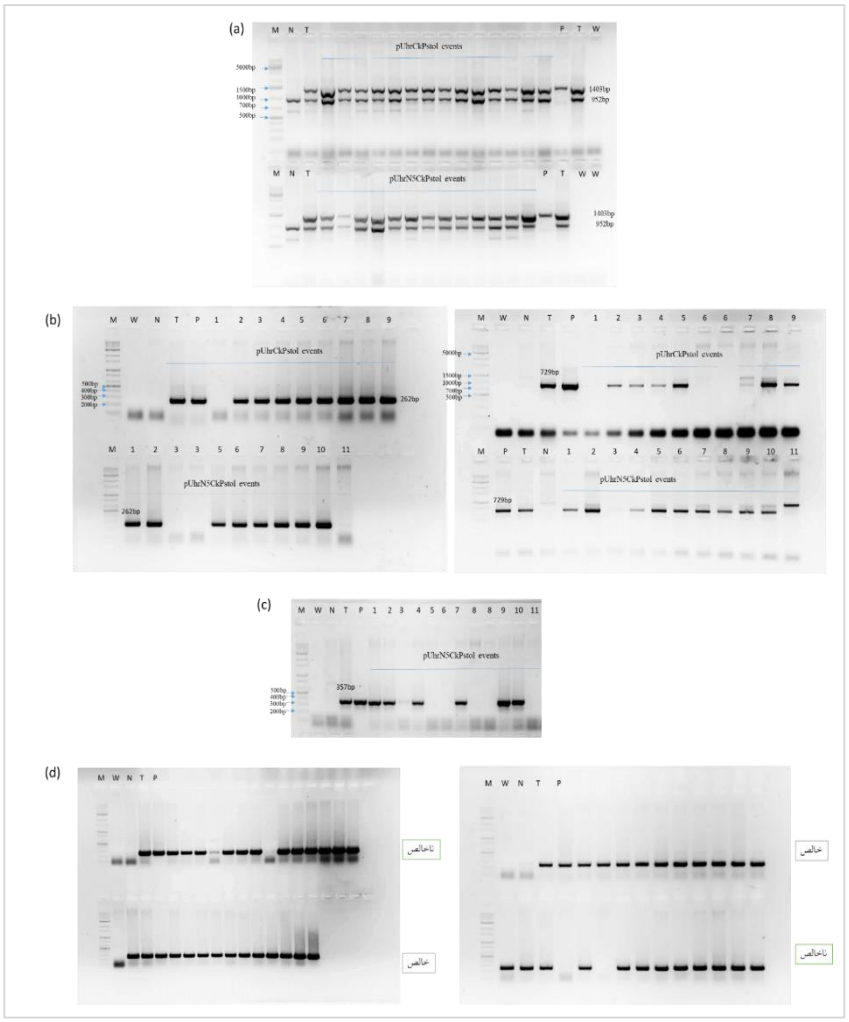


شکل ۱ نمای شماتیک ناحیه T-DNAی دو سازه نوترکیب pUhrCKPstol و pUhrN5CkPstol (a) و مراحل انتقال ژن به برنج تا انتقال به گلدان. بذر برنج روی محیط‌کشت پیش از تلقیح با باکتری (b)؛ تلقیح با اگروباکتریوم حاوی سازه نوترکیب (c)؛ کالوس‌زایی روی محیط انتخابی (d)؛ باززایی گیاهان تراریخته احتمالی (e)؛ انتقال به محیط ریشه‌زایی (f)؛ استقرار گیاه در محیط MS (g)؛ انتقال گیاه به محلول یوشیدا (h)؛ انتقال گیاه به گلدان (i)، فنوتیپ ظاهری یکی از رخدادهای سازه نوترکیب pUhrCKPstol پیش از انتقال به گلدان در کنار شاهد (j).

برای این کار آغازگرهای مختص سازه به گونه‌ای طراحی شدند که قسمتی از ژن نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین و خاتمه‌دهنده نوپالین سینتاز ژن مجاور را تکثیر کنند (شکل ۲-آغازگرهای P1 و P2). جزئیات طراحی قبلا گزارش شده است[۲۳]. این واکنش به‌صورت مولتی‌پلکس با ژن مرجع داخلی ژنوم برنج (RG100) انجام شد و گیاهان تراریخته احتمالی در غربال اولیه حضور دو باند مورد انتظار را نشان دادند (شکل ۳). استفاده از ردیابی چندگانه در تشخیص تراریختی سبب افزایش دقت و کاهش هزینه‌های ردیابی خواهد شد[۲۶]. سپس، حضور ژن‌های اصلی در رخدادهای حاصل با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اختصاصی ژن‌ها تایید شد (شکل ۲).

نتایج با ظهور باند ۲۶۲bp حضور ژن *PSTOL1* رادر رخدادهای تراریخته حاصل از هر دو سازه ژنی اثبات کرد. از آغازگرها به‌صورت مختص سازه برای این ردیابی استفاده شد (شکل ۲-آغازگرهای P3 و P4).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]



شکل ۲ آنالیز مولکولی گیاهان حاصل از انتقال دو سازه نوترکیب pUhrCkPstol و pUhrN5CkPstol. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با استفاده از آغازگرهای مختص سازه (hyg/nos) باند مورد انتظار 1403bp را در تعدادی از نمونه‌های برنج تراریخته احتمالی نسل T0 نشان دادند. نمونه‌ها باند حدود 950bp مربوط به قطعه ژنوم برنج (RG100) را نیز نشان دادند (a)؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای بررسی حضور ژن‌های *PSTOL1* (b–سمت چپ) و *OsCKX4* (b–سمت راست) در گیاهان تراریخته احتمالی حاصل از انتقال دو سازه نوترکیب pUhrCkPstol و pUhrN5CkPstol و بررسی حضور ژن *OsNAC5* در گیاهان تراریخته احتمالی حاصل از انتقال سازه نوترکیب pUhrN5CkPstol (c). شماره‌های ۲، ۳، ٤، ٥، ٨ و ٩ از رخدادهای حاصل از انتقال سازه نوترکیب pUhrCkPstol که حضور هر دو ژن *PSTOL1* و *OsCKX4* را نشان دادند به‌عنوان ٦ رخداد مثبت در نظر گرفته شدند و با کد Q1 تا Q6 نامگذاری شدند. همچنین شماره‌های ۱، ۲، ٥، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ به‌عنوان ۸ رخداد حاصل از انتقال سازه نوترکیب pUhrN5CkPstol با کد V1 تا V8 نامگذاری شدند. ژن *OsNAC5* در شماره‌های ٥، ٦ و ۸ ردیابی نشد و بقیه هر سه ژن را نشان دادند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای مختص سازه و تراژن *PSTOL1* برای آنالیز نسل در حال تفکیک T2 و تعیین رخدادهای خالص احتمالی (d).

M, Molecular weight marker (1Kb Plus- Thermo Scientific company); P, plasmid pUhrCkDro & pUhrN5CkPstol; T, Transgenic plant (positive control); N, non-transgenic plant; W, water control (no DNA); Others: rice event samples.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

همچنین، حضـور ژن *OsCKX4* با آغازگرهای مختص ژن و مشاهده باند ۷۲۹bp در رخدادهای حاصل تایید شد. به این ترتیب حضـور هر دو ژن در شـش رخداد حاصـل از گیاهان تراریخته منتج از سـازه pUrhCkPstol تایید شـد. شکل ۲ نشان می‌دهد نمونه‌های شماره ۲، ۳، ٤، ۵، ۸ و ۹ از رخداد های حاصـــل از انتقال ســـازه نوترکیب pUhrCkPstol حضـــور هر دو ژن *PSTOL1* و *OsCKX4* را نشان دادند. این شش رخداد به ترتیب با کد Q1 تا Q6 نامگذاری شدند (جدول ۲).

رخدادهای حاصـل از سـازه نوترکیب pUhrN5CkPstol علاوه بر ژن‌هـای *PSTOL1* و *OsCKX4* حضـــور ژن *OsNAC5* را نیز با اسـتفاده از آغازگرهای اختصـاصـی و مشاهده باند مورد انتظار ۳۵۷bp نشان دادند. در شکل ۲ نمونه‌های شـــماره ۱، ۲، ۵، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ به‌عنوان ۸ رخداد حاصل از انتقال سازه نوترکیب pUhrN5CkPstol در نظر گرفته شـــده‌اند. این رخدادها با کد V1 تا V8 نامگذاری شـــدند (جدول ۲). ژن *OsNAC5* در نمونه‌های شـــماره ۱، ۲، ۷، ۹ و ۱۰ ردیابی شـــد و بنابراین این پنج رخدادها حضور هر سه ژن را نشان دادند. شماره‌های ۵، ٦ و ۸ به‌عنوان رخدادهای دو ژنی و فاقد ژن *OsNAC5* درنظر گرفته شـــدند. همانطور که در جدول ۲ نشـــان داده شده است برخی از رخدادها دارای تکرار در مراحل کشت بافتی بودند. تکرارهای کشـــت بافتی که از یک قســـمت کالوس با چندین گیاه باززاشـــده ایجاد شـــده بودند پس از آنالیز مولکولی همگی به‌عنوان یک رخداد واحد دسته‌بندی شدند.

جدول ۲ رخدادهای احتمالی حاصل از سازه نوترکیب pUhrCkPstol و pUhrN5CkPstol. تراریخته بودن ٦ رخداد برای سازه‌ی pUhrCkPstol (Q1-Q6) و ۸ رخداد برای سازه‌ی pUhrN5CkPstol (V1-V8) تایید شد. خالص‌سازی یکی از رخدادها (Q6) در نسل T2 انجام شد. تعداد باززاشده نشان‌دهنده تکرارهای کشت بافتی است که از یک قسمت کالوس چندین گیاه باززاشده است، پس از آنالیز مولکولی این تکرارها، همگی به‌عنوان یک رخداد واحد دسته‌بندی شدند.

سازه	رخداد احتمالی	کد اولیه	تعداد باززاشده	نسل	خلوص احتمالی
PUhrCKPstol	رخداد ۱	Q-1	32	بذر T2	ناخالص
	رخداد ۲	Q-2	3	بذر T2	ناخالص
	رخداد ۳	Q-3	3	بذر T2	ناخالص
	رخداد ٤	Q-4	1	بذر T2	ناخالص
	رخداد ۵	Q-5	4	بذر T1	-
	رخداد ٦	Q-6	3	بذر T2	خالص
PUhrN5CKPstol	رخداد ۱	V-1	4	بذر T1	-
	رخداد ۲	V-2	15	بذر T1	-
	رخداد ۳	V-3	25	بذر T1	-
	رخداد ٤	V-4	6	گیاه T0	-
	رخداد ۵	V-5	3	گیاه T0	-
	رخداد ٦	V-6	3	گیاه T0	-
	رخداد ۷	V-7	2	گیاه T0	-
	رخداد ۸	V-8	3	گیاه T0	-

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

آنالیز نسل‌های در حال تفکیک T1 و T2 رخدادهای تراریخته حاصل با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از ردیابی ژن مشترک *PSTOL1* انجام و نتایج تعدادی از آنها در جدول ۲ خلاصه شده است. خالص‌سازی رخدادهای حاصل در حال انجام است. از هر رخداد، ۱۰ الی ۱۵ گیاه در نسل T1 آنالیز شدند. گیاهان منفی حذف و بذرگیری از مثبت‌ها انجام شد. از هر گیاه مثبت تایید شده در نسل T1، حدود ۲۰ گیاه در نسل T2 آنالیز شدند. در صورتی که همه‌ی گیاهان آنالیز شده در نسل T2 مثبت باشند، آن رخداد به‌عنوان خالص اولیه معرفی می‌شود. در صورت مشاهده ترکیبی از گیاهان مثبت و منفی در این نسل، آن گیاه ناخالص بوده و برای رسیدن به خلوص در این نسل (T2) نیاز به کشت بذور سایر گیاهان مثبت نسل T1 و آنالیز آنها در نسل T2 خواهد بود. روند خالص‌سازی برای رخدادهایی که به خلوص نرسیده‌اند ادامه خواهد داشت. تایید بیشتر خلوص نیز به آنالیز با تعداد بیشتر در نسل T3 نیاز خواهد داشت.

در این پژوهش ١٤ رخداد احتمالی برنج تراریخته از انتقال دو سازه نوترکیب حاصل شد. حدود ۹۳ درصد رخدادها بیش از یک تکرار کشت بافتی داشتند، به‌طوری که مجموع گیاهانی که شش رخداد حاصل از انتقال سازه نوترکیب pUhrCKPstol را دربرداشتند، ٤٦ گیاه و گیاهانی که هشت رخداد حاصل از انتقال سازه pUhrN5CKPstol را تشکیل می‌دادند ٦١ گیاه تعیین شدند. این گیاهان در آنالیزهای مولکولی، حضور ژن‌های منتقل شده را با PCRهای مختلف چندگانه، مختص سازه و مختص ژن نشان دادند. در این پژوهش به تغییر ظاهری فنوتیپ ریشه اکتفا شد ولی بررسی‌های دقیق‌تر فیزیولوژی، مولکولی و بیوشیمیایی گیاهان حاصل و به‌ویژه بررسی علمی ویژگی های ریشه و تغییرات آن نسبت به گیاهان شاهد در تحقیقات آینده مورد نیاز خواهد بود.

٤-بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، یک پروتئین کیناز سرین/ترئونین موثر در افزایش جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر (*PSTOL1*)، در کنار ژنی از خانواده سیتوکینین اکسیداز/دهیدروژناز (*OsCKX4*) به برنج رقم هاشمی منتقل شده است. تاکنون انتقال همزمان این دو ژن به برنج و یا سایر گیاهان گزارش نشده است. بر اساس گزارشات قبلی، در شرایط کمبود فسفر ژن *PSTOL1* نقش به سزایی در توسعه‌ی ریشه‌ی برنج و در نتیجه افزایش جذب فسفر داشته است[١٦]. همچنین، اهمیت ژن *OsCKX4* در تشکیل ریشه‌های گرهی و افزایش طول، تعداد و وزن خشک ریشه‌ها توسط Gao و همکاران (٢٠١٤) اثبات شده بود. بیان این ژن در پژوهش حاضر تحت پیشبر مختص ریشه در سازه pUhrCkPSTOL برای جلوگیری از اثرات ناخواسته بیان دائمی ژن *OsCKX4* بر محصول، مطلوب خواهد بود. با توجه به اینکه گیاهان حاصل از سازه pUhrN5CkPstol که ژن *OsCKX4* را تحت پیشبر دائمی در بر داشتند در بذردهی با تاخیر مواجه شدند، بنابراین استفاده از این ژن تحت پیشبر مختص بافت پیشنهاد می‌شود. همچنین، انتظار می‌رود حضور تراژن *OsNAC5* تحت پیشبر ریشه در رخدادهای مذکور، در شرایط نرمال و به‌ویژه تحت تنش خشکی سبب افزایش محصول نسبت به شاهد شود. این ژن که یک تنظیم‌کننده رونویسی است ریشه‌های طویل‌تر و افزایش در اندازه استل و کورتکس ریشه را به همراه خواهد داشت. علاوه بر این، بیان یکی از ژن‌های کدکننده فاکتور رونویسی القا شونده در شرایط تنش از خانواده NAM-ATAF-CUC (*OsNAC5*)، با افزایش قطر ریشه برنج، می‌تواند سبب افزایش مقاومت به خشکی و افزایش بازده محصول در مزرعه شود[٢٧]. بهینه‌سازی کدونی این ژن نیز بر اساس نتایج قبلی می‌تواند در بهبود عملکرد این ژن در شرایط استرس موثر باشد[٢٥و٢٨]. تاکنون انتقال همزمان این سه ژن که برگرفته از ارقام وحشی برنج

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

هستند، به برنج زراعی یا گیاهان دیگر گزارش نشده است. انتقال ژن های مفید از گونه های قابل تلاقی از طریق مهندسی ژنتیک به گیاه هدف که به سیس‌ژنسیس و اینتراژنسیس معروف است در برخی کشورها با قوانین کمتر سختگیرانه‌ای نسبت به گیاهان تراریخته مواجه هستند[۲۹]. تایید میزان تاثیر انتقال این ژن‌ها بر بهبود ساختار ریشه نیاز به آزمایشات مزرعه‌ای و بررسی دقیق فنوتیپ ریشه در مقایسه با شاهد در آزمایشات تکمیلی و به‌ویژه بررسی تحمل به خشکی خواهد داشت.

تولید و استفاده از سازه‌های چندژنی برای ایجاد گیاهان تراریخته در مراحل آزمایشگاهی در گیاهانی چون برنج، توتون، پنبه، گوجه فرنگی، گندم، سویا و جلبک در ایران انجام شده است[۳۰-۳۵]. ایرانیان در تولید برنج تراریخته پیشتاز بوده‌اند [۳۷و۳٦] . همچنین، انتقال ژن *DRO1* در کنار ژن‌های *OsNAC5* و *OsEXPA8* [۲۳] و نیز انتقال ژن *PSTOL1* و *OsDRO1* [۲۲] برای بهبود ساختار ریشه، تحمل به خشکی و بهبود جذب عناصر غذایی گیاه برنج و نیز انتقال دو ژن *OsCKX4* و *OsDRO1* [۳۸] در کشور تا مرحله گلخانه‌ای انجام شده است. در پژوهش حاضر چندین لاین تراریخته با انتقال همزمان ژن *PSTOL1* و ژن *OsCKX4* و نیز ژن *OsNAC5* به‌دست آمد که این ژن‌ها در تغییر ساختار ریشه نقش دارند. برای بهبود صفات مختلف در گیاهان انتقال همزمان چندین ژن دارای اهمیت است و روش موثری است که می‌تواند اصلاح صفات مورد نظر را تسهیل کرده و زمان رسیدن به هدف مورد نظر برای بهبود صفات گیاهان و اصلاح آنها را کاهش دهد. در گزارش Ye و همکاران (۲۰۰۰)، انتقال همزمان سه ژن دخیل در سنتز ویتامین آ به برنج منجر به افزایش ارزش غذایی آن و تولید این ویتامین در آندوسپرم برنج شد[۳۹]. همچنین، انتقال همزمان دو ژن دخیل در بهبود فرایند بیوسنتز لیگنین در درختان جنگلی موجب افزایش کارایی این سیستم در درختان شد [٤۰]. استفاده از روش های اصلاح سنتی در محصولات زراعی، به دلیل انتقال تعداد زیادی از ژن‌های نامطلوب به همراه ژن مورد نظر، ممکن است منجر به کاهش کیفیت محصول شود. علاوه بر این، این روش‌ها زمان‌بر و پر هزینه هستند. در پی انتقال سه ژن تغییر دهنده‌ی ساختار ریشه به رقم تجاری برنج هاشمی که مرغوبیت بالایی از نظر عطر و طعم دارد، انتظار بر این است که گیاهان تراریخته حاصل از نظر بازارپسندی، مانند همتای غیرتراریخته خود باشند. برای تایید این مساله، آزمایش‌های اینهمانی و بررسی صفات کیفی پس از خالص سازی انجام خواهد شد. بررسی‌های ایمنی زیستی تضمین بهره‌برداری از فواید قطعی بیوتکنولوژی مدرن و مدیریت آثار جانبی احتمالی کاربرد این فناوری را در پی داشته و استفاده از مزایای مهندسی ژنتیک در جهت امنیت غذایی را در پی دارد[٤۱].

سازه چند ژنی نوترکیب ساخته شده در این پژوهش را می‌توان با هدف تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی برای انتقال ژن به سایر گیاهان نیز مورد استفاده قرار داد. امید است با تولید برنج مهندسی شده با تغییر ساختار ریشه بتوان سبب بهبود تحمل به خشکی و افزایش عملکرد در این محصول مهم زراعی شده و در نهایت هزینه‌های کشت رایج برنج به صورت غرقابی را با صرفه جویی مصرف آب کاهش داد و گام اولیه‌ای برای توسعه کشت این محصول فراهم آورد.

سپاسگزاری

از ریاست محترم پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII) برای فراهم کردن هزینه و امکانات این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

۵- منابع

[1] Zhang, Q. Strategies for developing green super rice. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 16402–16409

[2] Gowda, V. R. P., Henry, A., Yamauchi, A., Shashidhar, H. E. & Serraj, R. (2011) Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *F. Crop. Res.* 122, 1–13

[3] Tran, L.-S. P., Nishiyama, R., Yamaguchi-

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

1216
[18] Chin, J. H. *et al.* (2010) Development and application of gene-based markers for the major rice QTL Phosphorus uptake 1. *Theor. Appl. Genet.* 120, 1073–1086
[19] Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* (Cold spring harbor laboratory press)
[20] An, G., Watson, B. D. & Chiang, C. C. (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato, and Arabidopsis thaliana using a binary Ti vector system. *Plant Physiol.* 81, 301–305
[21] Chamani, M. F. *et al.* (2017) Isolation and functional analysis of PSTOL1 from wild species of rice. *Gene Eng Biosafety J* 6 (1), 1-10
[22] Kazemi, M. *et al.* (2022) Rice genetic engineering using transformation of Deeper Rooting1 and Phosphorus-Starvation Tolerance1 genes. *Agric. Biotechnol. J.* 14, 1–20
[23] Zandi, M., Hosseini, R., Mohsenpour, M., Hosseini, S. G. & Ghareyazie, B. (2019) Transformation of DRO1, OsNAC5, OsEXPA8 genes in order to improve rice root architecture modification and improved drought tolerance in rice. *Gene Eng Biosafety* J 8 (1), 77-89
[24] Ozawa, K. (2012) A high-efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (Oryza sativa L.). in *Transgenic Plants* 51–57
[25] Chamani Mohasses, F., Solouki, M., Ghareyazie, B., Fahmideh, L. & Mohsenpour, M. (2020) Correlation between gene expression levels under drought stress and synonymous codon usage in rice plant by in-silico study. *PLoS One* 15, e0237334
[26] Kahak, S. *et al.* (2021) Providing a Fast and Multiple Method for Detection and Identification of Transgenic Maize Events. *MGJ* 16, 341–348
[27] Jeong, J. S. *et al.* (2013) OsNAC5 overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnol. J.* 11, 101–114
[28] Mohsenpour, M., Noormohammadi, Z., Irani, S. & Amirmozafari, N. (2019) Expression of an Environmentally Friendly Enzyme, Engineered Carbonic Anhydrase, in Escherichia coli. *Int. J. Environ. Res.* 13, 295–301
[29] Kahak, S., Ghareyazie, B., Samizadeh Lahiji, H. & Mohsenpour, M. (2021) Evaluation of Biosafety Aspects of Cisgenesis and Intragenesis in Comparison with Transgenesis. *gebsj* 10, 157–170
[30] Mohammadizadeh, N., Tohidfar, M. & Mohsenpour, M. (2010) Agrobacterium-Mediated Transformation of Wheat (Triticum Aestivum) Using Chitinase and Glucanase Genes. Agric Biotechnol J 2 (1), 81-98
[31] Raufi, A., Tohidfar, M., Soluki, M. & Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2010) Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM Crops* 1, 32–39
[4] Sperotto, R. A. *et al.* (2009) Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta* 230, 985–1002
[5] Wu, W. & Cheng, S. (2014) Root genetic research, an opportunity and challenge to rice improvement. *F. Crop. Res.* 165, 111–124
[6] Jeong, J. S. *et al.* (2013) OsNAC5 overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. 10, 101–114
[7] Redillas, M. C. F. R. *et al.* (2012) The overexpression of OsNAC9 alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 10, 792–805
[8] Takasaki, H. *et al.* (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol. Genet. Genomics* 284, 173–183
[9] Song, S.-Y., Chen, Y., Chen, J., Dai, X.-Y. & Zhang, W.-H. (2011) Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. *Planta* 234, 331–345
[10] Gao, S. *et al.* (2014) Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase4 integrates cytokinin and auxin signaling to control rice crown root formation. *Plant Physiol.* 165, 1035–1046
[11] Shahbazi, K. & Besharati, H. (2013) Overview of agricultural soil fertility status of Iran. *L. Manag. J.* 1, 1–15
[12] Miyasaka, S. C. & Habte, M. (2007) Plant mechanisms and mycorrhizal symbioses to increase phosphorus uptake efficiency. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32, 1101–1147
[13] Wissuwa, M., Wegner, J., Ae, N. & Yano, M. (2002) Substitution mapping of Pup1 : a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. 890–897
[14] Wissuwa, M. (2005) Combining a modelling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake. *Plant Soil* 269, 57–68
[15] Heuer, S. *et al.* (2009) Comparative sequence analyses of the major quantitative trait locus phosphorus uptake 1 (Pup1) reveal a complex genetic structure. *Plant Biotechnol. J.* 7, 456–471
[16] Gamuyao, R. *et al.* (2012) confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature* 488, 535–539
[17] Chin, J. H. *et al.* (2011) Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: Pup1 sequence to application. *Plant Physiol.* 156, 1202–

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

Mohsenpour, M. (2012) Isolation and Cloning of Two Genes from PR1 Family and Construction of Treble Plasmids Containing 3 Groups of Genes for Producing Transformed Plants Resistant to Fungal Diseases. *J. Agric. Biotechnol.* 3, 27–46

[32] Mohsenpour, M., Tohidfar, M., Jelodar, N. B. & Jouzani, G. S. (2015) Designing a new marker-free and tissue-specific platform for molecular farming applications. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 24, doi: 10.1007/s13562-014-0294-2

[33] Mohkami, A., Marashi, H., Shahriary Ahmadi, F., Tohidfar, M. & Mohsenpour, M. (2015) Evaluation of Agrobacterium-mediated Transformation of Chlamydomonas reinhardtii using a Synthetic amorpha-4, 11-diene Synthase Gene. *J. Cell Mol. Res.* 7, 53–58

[34] Mohsenpour, M. & Tohidfar, M. (2011) Genetic Engineering of Plant Nuclear Genome for Specific gene Expression in Chloroplast Using Design and Transformation of Hybrid Sigma Factor. *Crop Biotechnol.* 1, 35-48

[35] Saboori-Robat, E., Solouki, M., Habashi, A. A., Moshenpour, M. & Emamjomeh, A. (2019) Design and construction of two-genes construct consists of 11 kDa delta zein and EPSPS genes in order to transform soybean to improve the methionine content and induce resistance to glyphosate herbicide. *Crop Biotechnol.* 9, 69–77

[36] Ghareyazie, B. *et al.* (1997) Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA(b) gene. *Mol. Breed.* 3, 401–414

[37] Bennett, J., Cohen, M. B., Katiyar, S. K., Ghareyazie, B. & Khush, G. S. (1997) Enhancing insect resistance in rice through biotechnology. *Adv. insect Control role transgenic plants* 75–93

[38] Ghorbanzadeh, Z. *et al.* (2022) Identificatioan and investigation of DRO1 gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with OsCKX4 gene to improve root structure. *Crop Biotechnol.* 11, 49–62

[39] Ye, X. *et al.* (2000) Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science (80-.).* 287, 303–305

[40] Li, L. *et al.* (2003) Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4939–4944

[41] Mohsenpour, M., Kahak, S. & Ghareyazie, B. (2018) Genetic Engineering and Food Security. *Strateg. Res. J. Agric. Sci. Nat. Resour.* 3, 195–208

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

Multi-gene transformation evaluation of a serine/threonine protein kinase with a gene from the cytokinin oxidase/dehydrogenase family and a transcription factor induced under stress from the NAM-ATAF-CUC family to rice

Leila Pourhang[1], Zahra Ghorbanzadeh[2], Mehrbano Kazemi alamouti[3], Seyyed Mohammad Mousavi pakzad[4], Elahe Moatamed[5], Mona Mapar[6], Aliakbar Ebadi[7], Katayoun Zamani Asadabadi[8], Mohammad Reza Ghaffari[9], Ghasem Hosseini Salekdeh[10], Behzad Ghareyazie[11*], Motahhareh Mohsenpour[12*]

1. M.Sc, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
2. PhD Student, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
3. M.Sc, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
4. B.Sc, Department of Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
5. Department of Genetic Engineering and Biosafety, M.Sc, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
6. Postdoctoral Researcher, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
7. Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Rasht, Iran.
8. Assistant Professor, Department of Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. -
9. Assistant Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
10. Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
11. Professor, Department of Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
12. Assistant Professor, Department of Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

mthrhm@yahoo.com

Receipt: 2022/05/09 Accepted: 2022/11/05

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]

Abstract

Production of drought tolerant crop is an important strategy for avoiding water scarce crisis. Improvement of the root structure helps better establishment in the soil, more access to the nutrition and efficient water absorption. This results in lodging and drought resistance, leading to the higher yield and seed quality. In this study, three genes affecting root structure, drought tolerance and phosphorous absorbance are used in producing hybrid constructs used for the rice transformation. Three genes: a serine/threonine protein kinase (*PSTOL1*), a gene from the cytokinin oxidase/dehydrogenase family (*OsCKX4*) and a transcription factor induced under stress from the NAM-ATAF-CUC family (*OsNAC5*) isolated from the rice wild cultivars are cloned under separate regulatory elements in the T-DNA region of the *Agrobacterium* binary vector. *OsNAC5* gene was cloned under RCc3 root specific promoter and *PSTOL1* gene under ubiquitin promoter. Also, *OsCKX4* gene was cloned once under ubiquitin promoter and once under RCc3 promoter. Two hybrid multi-gene constructs named pUhrN5CkPstol and pUhrCkPstol harboring multiple genes are synthetized and used for the gene transformation into the Hashemi cultivar. Gene transfer was done to callus obtained from mature rice seeds. Transgenic plants were confirmed using PCR analysis. From the number of 107 regenerated plants in which the presence of transgenes was proved, 14 transgenic events were finally obtained. Root structure of the T0 plants showed drastic phenotypic difference in comparison to the non-transgenic ones. By now, one transgenic event harboring *CKX4* and *PSTOL1* is confirmed to have a homozygous line in T2 generation. It is hoped that genetic engineering of rice for enhanced root structure lead to drought tolerance, reduce water consumption and improve yield under stress conditions.

Keywords: Cytokinin oxidase/dehydrogenase, Multi-gene transformation, Rice genetic engineering, serine/threonine protein kinase, transcription factor induced under stress.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.9.5]