Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Rice genetic engineering using transformation of *Deeper Rooting1* and *Phosphorus-Starvation Tolerance1* genes

Mehrbano Kazemi alamouti
M.Sc, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. E-mail: kazemialamuti@gmail.com
Zahra Ghorbanzadeh
PhD Student, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. E-mail: ghorbanzadezahra@yahoo.com
Leila Pourhang
M.Sc, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. E-mail: leilapourhang95@yahoo.com
Seyyed Mohammad Mousavi pakzad
B.Sc, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. E-mail: sm.moosavi.pakzad@gmail.com
Elahe Moatamed
M.Sc, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. E-mail: elahe.moatamed@gmail.com
Mona Mapar
Postdoctoral Researcher, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. E-mail: mona.mapar@gmail.com
Aliakbar Ebadi
Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Rasht, Iran. E-mail: aliakbar.ebadi@gmail.com
Mohammad Reza Ghaffari
Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: ghaffari@abrii.ac.ir
Ghasem Hosseini Salekdeh
Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: h_salekdeh@abrii.ac.ir
Behzad Ghareyazie
*Corresponding author. Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: ghareyazie@yahoo.com
Motahhareh Mohsenpour
*Corresponding author. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: mthrhm@yahoo.com

Abstract
Objective
Root structure modification is associated with the efficient water uptake and the nutrient utilization. It also provides structural support for the anchoring in soil. Genetic engineering for the improvement of plant root structure may help to maintain higher yields under drought conditions. The aim of this study was to modify the root structure of rice in order to improve

drought tolerance and the efficiency of nutrient uptake. For this purpose, simultaneous transformation of *Deeper Rooting1* or *OsDRO1* gene, which is involved in the regulation of growth angle of the root in order to adapt to drought conditions, and *Phosphorus-Starvation Tolerance1* or *OsPSTOL1* gene, which is effective in increasing phosphorus uptake and improving root structure, were considered for rice root structure modification.

Materials and methods
The *OsDRO1* and *OsPSTOL1* genes derived from the wild rice cultivars were cloned together in a single construct under the control of the root specific and the ubiquitin promoters, respectively. The resulting construct, pUhrDroPstol is transformed into the *Agrobacterium tumefactions* strain EHA105 and used for the gene transformation into Hashemi cultivar. Putative transgenic plants, survived on 50 mg/L Hygromycin during tissue culture steps, are transplanted into the Yoshida solution and then into the pots until they set seeds. Construct specific and gene specific PCR analysis are used to confirm the transgenic plants.

Results
In this study, 12 putative transgenic rice events were obtained, of which 10 showed the presence of both *OsDRO1* and *OsPSTOL1* genes in the PCR analysis. Transgenic plants show stronger root structure compared to the non-transgenic ones. Molecular analysis in the T1 and T2 generations determined the homozygous events.

Conclusions
In this study, two candidate genes affecting root structure, nutrient uptake and drought tolerance were transferred to the Hashemi rice using genetic engineering. So far, simultaneous transfer of these two candidate genes have not been reported. Transgenic plants present better root system compared to the control plants. The mentioned construct can be used for the transformation of other crops to improve their root structure, nutrient uptake and their drought tolerance. It is hoped that the production of the transgenic rice with modified root structure and efficient phosphorus uptake increases its drought tolerance and reduce water consumption in rice cultivation.
Keywords: *Deeper Rooting1* gene, Multi-Gene construct transformation, *Phosphorus-Starvation Tolerance1* gene, Transgenic rice.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Kazemi alamouti M, Ghorbanzadeh Z, Pourhang L, Mousavi pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, Ebadi AA, Ghaffari MR, Hosseini Salekdeh Gh, Ghareyazie B and Mohsenpour M (2022) Rice genetic engineering using transformation of *Deeper Rooting1* and *Phosphorus-Starvation Tolerance1* genes. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 1-20.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (1), 1-20. DOI: 10.22103/jab.2021.17991.1331
Received: November 21, 2021. Accepted: December 20, 2021.
Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.
© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

مهندسی ژنتیک برنج با انتقال ژن‌های *Deeper Rooting1* و *Phosphorus-Starvation Tolerance1*

مهربانو کاظمی الموتی

دانش آموخته کارشناسی ارشد، کارشناس پژوهشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: kazemialamuti@gmail.com

زهرا قربانزاده

دانشجوی دکتری، همکار طرح، پژوهشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: ghorbanzadezahra@yahoo.com

لیلا پورهنگ

دانش آموخته کارشناسی ارشد، کارشناس پژوهشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: leilapourhang95@yahoo.com

سید محمد موسوی پاکزاد

دانش آموخته کارشناسی، کارشناس پژوهشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: sm.moosavi.pakzad@gmail.com

الهه معتمد

دانش آموخته کارشناسی ارشد، کارشناس پژوهشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: elahe.moatamed@gmail.com

مونا ماپار

پژوهشگر پسادکتری، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: mona.mapar@gmail.com

علی اکبر عبادی

استادیار، موسسه تحقیقات برنج کشور (RRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران. رایانامه: aliakbar.ebadi@gmail.com

محمدرضا غفاری

استادیار، پژوهشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: ghaffari@abrii.ac.ir

قاسم حسینی سالکده

استاد، پژوهشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: h_salekdeh@abrii.ac.ir

بهزاد قره یاضی

*نویسنده مسئول: استاد، پژوهشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: ghareyazie@yahoo.com

مطهره محسن پور

*نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: mthrhm@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۸

چکیده

هدف: اصلاح ساختار ریشه با جذب کارآمد آب و استفاده موثر از مواد مغذی مرتبط است و استقرار بهتر گیاه در خاک را فراهم می‌کند. مهندسی ژنتیک برای بهبود ساختار ریشه می‌تواند منجر به حفظ عملکرد بالاتر در شرایط خشکی شود. این پژوهش با هدف اصلاح ساختار ریشه برنج به منظور تحمل به خشکی و بهبود کارایی جذب عناصر غذایی انجام گرفت. برای این منظور انتقال همزمان ژن‌های *Deeper Rooting1* یا *DRO1* که در تنظیم زاویه رشد ریشه‌ها برای انطباق با شرایط خشکی نقش دارد و *Phosphorus-Starvation Tolerance1* یا *PSTOL1* که در افزایش جذب فسفر و بهبود ساختار ریشه موثر است، به گیاه برنج طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها: ژن‌های *DRO1* و *PSTOL1* برگرفته از ارقام وحشی برنج طی مراحلی به‌ترتیب تحت پیشبرنده مختص ریشه و پیشبرنده دائمی همسانه‌سازی و در ناحیه T-DNA حامل دوگانه اگروباکتریومی قرار داده شدند. سازه حاصل موسوم به pUhrDroPstol به اگروباکتریوم سویه EHA105 منتقل و برای انتقال ژن به برنج رقم هاشمی مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام مراحل انتقال ژن، گیاهان باززا شده حاصل در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیگرومایسین در مراحل مختلف

کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی زنده مانده و رشد کرده و به محلول یوشیدا و سپس به گلدان منتقل شدند. گیاهان تراریخته احتمالی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مختص سازه و مختص ژن مورد تایید قرار گرفتند و رخدادهای مستقل مشخص شدند.

نتایج: در این پژوهش ۱۲ رخداد احتمالی برنج تراریخته حاصل شد که ۱۰ رخداد در آنالیز PCR حضور هر دو ژن *OsDRO1* و *OsPSTOL1* را نشان دادند. مقایسه فنوتیپ ریشه با گیاه شاهد تفاوت ظاهری در ساختار ریشه نشان داد. گیاهان تراریخته حاصل در گلخانه تراریخته پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی بذرگیری شدند و خلوص آنها با آنالیز مولکولی در نسل‌های T1 و T2 مشخص شد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق دو ژن کاندید موثر در تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی با استفاده از مهندسی ژنتیک به برنج رقم هاشمی منتقل شد. تاکنون انتقال همزمان این دو ژن کاندید گزارش نشده است. گیاهان تراریخته حاصل سیستم ریشه‌ای بهتری را نسبت به گیاه شاهد نشان می‌دهند. سازه چند ژنی حاصل را می‌توان با هدف تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی و بهبود کارایی جذب فسفر برای انتقال ژن به سایر گیاهان نیز مورد استفاده قرار داد. امید است تولید برنج تراریخته با بهبود کارایی استفاده از عناصر غذایی و با تغییر ساختار ریشه بتواند تحمل به خشکی و عملکرد را در این محصول مهم زراعی افزایش و سبب کاهش مصرف آب در کشت برنج شود.

کلیدواژه ها: انتقال ژن با سازه چند ژنی، برنج تراریخته، ژن *Deeper Rooting1*، ژن *Phosphorus-Starvation Tolerance1*.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: کاظمی الموتی مهربانو ، قربانزاده زهرا ، پورهنگ لیلا ، موسوی‌پاکزاد سیدمحمد ، معتمد الهه ، ماپار مونا ، عبادی علی‌اکبر، غفاری محمدرضا ، حسینی سالکده قاسم ، قره یاضی بهزاد، محسن پور مطهره (۱۴۰۱) مهندسی ژنتیک برنج با انتقال ژن‌های *Deeper Rooting1* و *Phosphorus-Starvation Tolerance1*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۱)، ۱-۲۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

کمبود عناصر غذایی از عوامل غیرزیستی مهمی است که می‌تواند بر رشد گیاهان تاثیر بگذارد، نیتروژن و فسفر به‌ترتیب عوامل محدود کننده عملکرد محصولات هستند. حدود ۰/۲ درصد وزن خشک گیاه را فسفر تشکیل می‌دهد. گیاهان بدون وجود فسفر قادر به رشد نیستند. خاک‌های ایران از نظر فسفر و نیتروژن 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 فسفر و میزان پتاسیم ۲۱ درصد از خاک‌ها کمتر از حد بحرانی پتاسیم است (Shahbazi and Besharati 2013). فقر عناصر غذایی و فرسایش شدید خاک موجب بروز مشکلات عمده در عرصه کشاورزی شده است. از این رو مصرف کودهای شیمیایی در کشور با رشد تصاعدی همراه است. کودهای شیمیایی در کوتاه‌مدت، مواد مغذی مورد نیاز خاک را تأمین می‌کند ولی در بلندمدت موجب از بین رفتن کیفیت خاک، افت حاصلخیزی و در نتیجه فرسایش خاک می‌شود. بیش از ۸۰ درصد کل فسفر موجود در خاک غیر قابل تحرک است و به دلیل جذب توسط عناصر خاک، رسوب و تبدیل شدن به فرم آلی در خارج از منطقه رایزوسفر هستند (Schachtman 1998). در برخی نواحی جهان مانند آمریکای شمالی و اروپا کودهای فسفره به صورت آزادانه در زمین‌های کشاورزی استفاده می شوند. فقدان منابع محلی حاوی فسفر و هزینه‌های بالای واردات آن موجب عدم استفاده و یا استفاده کم کشاورزان از کودهای فسفره در کشورهای در حال توسعه شده است. (Sánchez and Salinas 1981). توانایی تحمل به کمبود فسفر و افزایش جذب آن به طور عمده تحت تاثیر تفاوت ژنوتیپی گونه‌های گیاهی است. مرفولوژی ریشه با نسبت بالاتر سطح به حجم برای جذب حداکثر فسفر بسیار مهم است. اضافه کردن فسفر به صورت کود تاثیر چندانی در افزایش جذب آن توسط گیاه ندارد. پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی، فرصتی را برای مهندسی گیاهان به‌منظور به حداکثر رساندن مکانیسم جذب فسفر در گیاه و به حداقل رساندن عوارض جانبی فسفر بر روی محیط زیست مانند تراوش فسفر از زمین‌های کشاورزی به دریاچه‌ها و رودخانه‌ها فراهم آورده است (Miyasaka and Habte 2007). گروهی از برنج‌های مربوط به منطقه‌ای در هند با خاک‌های مشکل دار و فقیر، به عنوان یک منبع با ارزش دارای ژن‌های مقاوم شناسایی شدند. واریته تیپ aus کاسالاس نسبت به سایر انواع برنج‌ها راندمان جذب فسفر بالاتری را از خاک‌های فقیر نشان داد. این نوع برنج‌ها می‌توانند به عنوان منبع با ارزشی از ژن‌های افزایش جذب فسفر مورد استفاده قرار بگیرند (Wissuwa et al. 2002). در سال ۱۹۹۸ جایگاه ژنی صفت کمی ژن مسئول ایجاد تحمل به کمبود فسفر *Pup1* (*Phosphorus uptake 1*) توسط Wissuwa در برنج واریته Kasalath شناسایی و از طریق تلاقی به برنج جاپونیکا واریته Nipponbare منتقل شد (Wissuwa et al. 2002). لاین‌های ایزوژنیک حامل این QTL، عملکرد بیشتر و معنی‌داری را نسبت به گیاه والدینی حساس نشان دادند (Wissuwa et al. 2002). توالی‌یابی این مکان در کاسالاس یک مکان پیچیده شامل ۹۰ کیلو باز غنی از ترانسپوزون حذف و اضافه (INDEL) را نشان داد که در ژنوم گیاه حساس وجود نداشت (Heuer et al. 2009). پس از آن *PSTOL1* در این مکان به عنوان ژن اصلی که منجر به افزایش جذب فسفر می‌شود، شناسایی شد

(Gamuyao et al. 2012). ژن *PSTOL1* یک پروتئین کیناز اسـت و تنظیم بیان ژن را از طریق فسـفریله کردن فاکتورهای رونویسی به‌طور غیر مستقیم انجام می‌دهد. به‌منظور اینکه بینشی نسبت به پاسخ‌های پایین دست *PSTOL1* به‌دست آید، آنالیز Affymetrix gene-array بر روی گیاهان تراریخته IR64 حاوی *PSTOL1* و گیاه کنترل انجام شد. نتایج نشان داد ۲۳ ژن که مرتبط با رشد ریشه و پاسخ به تنش بودند، بیان متفاوتی داشتند و۲۱ ژن از ۲۳ ژن با QTLهای مرتبط با رشد ریشه و خشکی همپوشانی داشتند که نشان‌دهنده نقش مهم *PSTOL1/PUP1* در طول توسعه ریشه و تحمل به تنش‌ها است (Gamuyao et al. 2012). همچنین آنالیز آغازگرهای مرتبط با جایگاه *PUP1*، حفاظت‌شـــدگی بالای *PSTOL1* را در ارقام متحمل به خشکی نشان دادند نشان دادند (Chin et al. 2010, 2011).

تغییر ساختار ریشه با استفاده از مهندسی ژنتیک برای افزایش طول، عمق، تعداد و ضخامت آن می‌تواند تحمل به کم آبی را در پی داشته باشد. ارقام مختلفی از برنج وجود دارند که دارای سیستم ریشه‌ای متفاوتی هستند (Uga et al. 2009). ارقام زراعی مانند IR64 که‌به‌طور وسیعی در آسیا کشت می‌شود دارای ریشه سطحی هستند، در حالی‌که رقم KP (Kinandang patong)، ریشه‌دهی عمیق را نشان داده است (Uga et al. 2011). ژن مسئول این صفت، *DRO1* (*DEEPER ROOTING1*) است (Uga et al. 2013). بیان بالای *DRO1* سبب تغییر زاویه رشد ریشه شده، منجر می‌شود که ریشه‌ها به سمت عمق خاک رشد کنند (Kondo et al. 2000). ریشه عمیق، صفتی پیچیده و ترکیبی از اثرات زاویه رشد ریشه، طول ریشه اولیه و ریشه‌های گرهی است (Araki et al. 2002). ژن *DRO1* رابطه‌ای عکس با اکسین دارد که در طویل شدن سلول‌ها در راس ریشه که سبب رشد نامتقارن ریشه و گره‌خوردگی انتهای ریشه در پاسخ به جاذبه زمین می شود، دخالت دارد (Araki et al. 2002). این ژن در شرایط خشکی نقش مناسبی در افزایش طول ریشه و افزایش جذب آب و مواد غذایی دارد. انتقال *DRO1* به یک رقم برنج با ریشه کم عمق، لاین حاصل را قادر ساخت تا از خشکی توسط افزایش عمق ریشه‌دهی خود اجتناب کند و این امر منجربه حفظ عملکرد بالا در شرایط تنش خشکی در مقایسه با رقم اولیه شاهد شد (Uga et al. 2011). در تحقیق مذکور، بیوماس و طول ریشه تغییر چندانی نداشت ولی میزان محصول نهایی (دانه‌های پر شده) در تنش خشکی متوسط و شدید حدود ۳۰ درصد افزایش نشان داد (Uga et al. 2015). مطالعات نشان دادند که ژن *DRO1* توانایی افزایش جذب نیتروژن را داشته و همچنین با تنظیم جریان سیتوکنین، نقش مهمی را در پر شدن دانه‌ها را در شرایط مزرعه ایفا می‌کند (Arai-Sanoh et al. 2014). هدف از این تحقیق انتقال ژن‌های *DRO1* و *PSTOL1* به گیاه برنج به‌منظور بهبود کارایی جذب عناصر غذایی به ویژه فسفر و نیز اصلاح ساختار ریشه و تحمل به خشکی است.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه چند ژنی حاوی ژن‌های *PSTOL1* و *DRO1*: طراحی سازه‌های ژنی با استفاده از نرم افزار Vector NTI (Invitrogen)(نسخه ۱۰) انجام شد. مراحل ساخت سازه در شکل ۱ نشان داده شده است. واکنش اتصال ابتدا در حامل همسانه سازی تحت پیشبرنده مختص ریشه RCc3 در مورد ژن *OsDRO1* و تحت پیشبرنده یوبیکوئیتین ذرت در مورد ژن *OsPSTOL1*انجام و سپس در حامل دوگانه انتقال ژن مختص اگروباکتریوم قرار داده شد. بدین ترتیب که پلاسمیدهای pGH-DRO1حاوی ژن *OsDRO1* و pGH-RCc3 حاوی پیشبرنده مختص ریشه (که قبلا توسط نویسنده مسئول و مجری پروژه در پژوهشگاه بیوتکنولوژی طراحی شده بود) به طور جداگانه با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sal*I هضم و قطعه ۷۶۸ جفت‌بازی *OsDRO1*تحت پیشبرنده RCc3 درون حامل pGH همسانه‌سازی شد. پلاسمید نوترکیب حاصل موسوم به pGH-Rcc3-DRO1با هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی صحت همسانه‌سازی قرار گرفت. سپس حامل نوترکیب pGH-RCc3-DRO1با استفاده از آنزیم‌های برشی *Kpn*I و *Xba*I هضم شده و قطعه حاوی کاست ژنی *OsDRO1* تحت پیشبرنده مختص ریشه به همراه خاتمه دهنده و پیشبرنده یوبی کوئیتین ذرت در مجموع با طول ۴۵۷۶ جفت‌باز از روی ژل آگارز خالص سازی شد. این کاست (Rcc3-DRO1-Tahsp-ubi) با استفاده از آنزیم‌های *Kpn*I و *Spe*I در کنار کاست ژنی *OsPSTOL1*قرار گرفت.

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 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 PCR انجام گرفت. کلیه مراحل همسانه سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل‌های سمبروک و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد (Sambrook et al. 1989). پلاسمید نوترکیب حاصل پس از تایید، به روش آن و همکاران (۱۹۸۶) به اگروباکتریوم سویه EHA105 منتقل شد (An et al. 1986).

انتقال ژن (القای کالوس و تکثیر آن): بذر برنج رقم هاشمی به دقت پوست کنده شد به‌طوری‌که از آسیب‌رساندن به پریکارپ جلوگیری شود. سپس ضدعفونی بذور با الکل ۷۰ در صد به‌مدت یک دقیقه و سپس هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ حاوی یک قطره توین ۲۰ (به عنوان سورفکتانت در محلول ضدعفونی که باعث افزایش مرطوب شدن سطح بذرها و خروج هوا شده و به منظور افزایش کارایی ضدعفونی به کار می‌رود) به‌مدت حدود ۳۰ تا ۴۵ دقیقه و با شیک‌کردن آرام انجام شد. پس از حذف هیپوکلریت سدیم سه بار با آب استریل آبشویی شده و بذرها روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. سپس بذرها به محیط جامد R-N6D (Ozawa 2012) منتقل و در دمای ۳۰ درجه و ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. در مواردی وقتی بافت‌های تمایز زدایی شده کوچکی از اسکوتلوم بذر حاصل می شد، این بذرها به محیط R-DKND (Ozawa 2012) منتقل

می‌شدند یا بذرها مستقیما در محیط R-DKND قرار داده می‌شدند. پس از حدود سه هفته تا یک و نیم ماه کالوس‌های تردی که در حال تکثیر سریع بودند برای انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفتند.

انتقال ژن (تلقیح با اگروباکتریوم و هم‌کشتی): اگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pUhDroPstol پس از رشد روی محیط حاوی آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و اسپکتینومایسین (به ترتیب ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر) و تایید با واکنش PCR برای انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری از استوک گلیسرول حدود سه روز قبل از تلقیح، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی رشد داده شد. برای تلقیح، مقداری از باکتری از محیط کشت با لوپ برداشته و در پنج میلی لیتر محیط مایع R-N6AS یا R-DKNAS در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری سوسپانسیون شد و OD_{600nm} بین ۰/۰۵ تا ۰/۲ تنظیم شد.

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

پس از سه روز هم‌کشتی کالوس‌ها یکبار در آب استریل حاوی سفوتاکسیم شستشو شدند تا اگروباکتریوم حذف شود و روی کاغذ صافی قرار گرفتند. سپس کالوس‌ها به محیط R-N6Sel یا R-DKNSel حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و فتوپرید ۱۶ ساعت روشنایی منتقل شدند و هر ده روز واکشت انجام گرفت. پس از دو دوره انتخاب به تدریج کالوس‌های مقاوم به هیگرومایسین در حال رشد و قابل تشخیص بوده، در حالی که کالوس‌های شاهد و تلقیح نشده و کالوس‌هایی که ژن را دریافت نکرده بودند روی محیط انتخابی از بین رفتند. سپس کالوس‌های مقاوم به محیط باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین منتقل شده و در نهایت پس از ریشه‌زایی در محیط R-MSHF حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین، انتقال به محیط یوشیدا و خاک انجام گرفت.

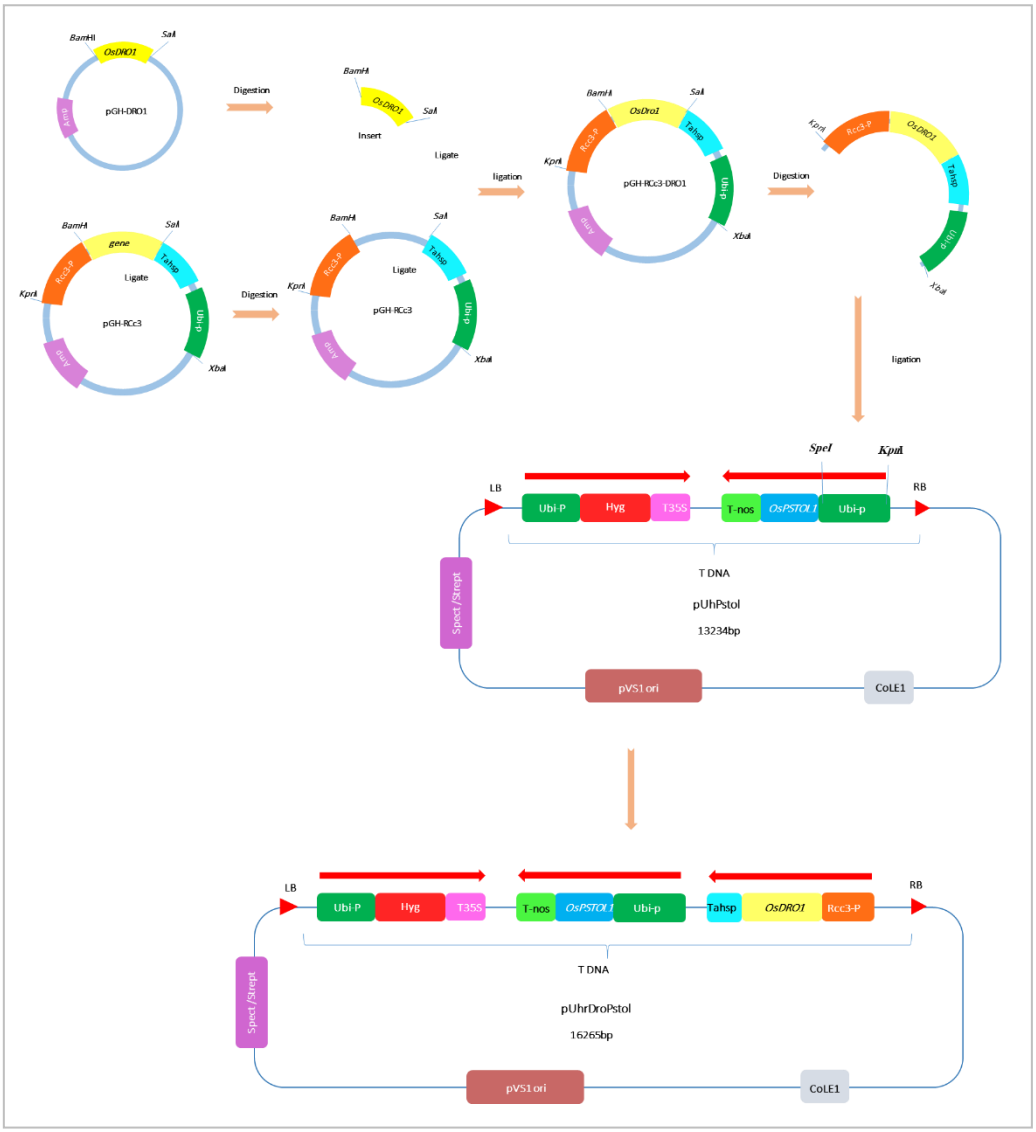
انتقال ژن (آنالیزهای مولکولی): گیاهانی که در کلیه مراحل باززایی در محیط انتخابی حاوی هیگرومایسین زنده مانده و رشد کردند پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای‌پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مختص ژن و ناحیه‌ای از ژنوم برنج (RG100) به عنوان ژن کنترل داخلی آنالیز شدند.

نتایج و بحث

ساخت سازه چند ژنی دارای ژن‌های کاندید تغییردهنده زاویه ی ریشه (*DRO1*) و افزایش بهره وری با استفاده از فسفر (*PSTOL1*):

مراحل همسانه سازی و قرارگیری کاست ژنی طراحی شده برای *OsDRO1* (بهینه سازی کدونی شده بر اساس نتایج قبلی (Chamani Mohasses et al. 2020) تحت پیشبرنده RCc3 و پایانبر Tahsp17 (از منشاء گندم) در کنار کاست ژنی *PSTOL1* (جداشده از برنج رقم کاسالاس (Chamani Mohasses et al. 2017) تحت پیشبرنده

یوبی‌کوئیتین و پایانبر NOS در ناحیه T-DNA سازه اگروباکتریومی در شکل ۱ نشان داده شده است. در ستی جهت قرارگیری این کاست‌های ژنی در سازه چندژنی حاصل موسوم به pUhrDroPstol با استفاده از هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تایید شد. این کاست‌های ژنی در خلاف جهت کاست ژنی مقاومت به هیگرومایسین قرار دارند (شکل ۱). سازه چند ژنی حاصل می‌تواند برای انتقال ژن در گیاهان به ویژه در تک لپه‌ای‌ها به‌منظور افزایش تحمل به کمبود فسفر، تغییر ساختار ریشه و مقاومت در برابر تنش خشکی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱. مراحل همسانه‌سازی و ساخت سازه نوترکیب pUhrDroPstol

Figure 1. The Schematic representation of construction of recombinant pUhrDroPstol vector

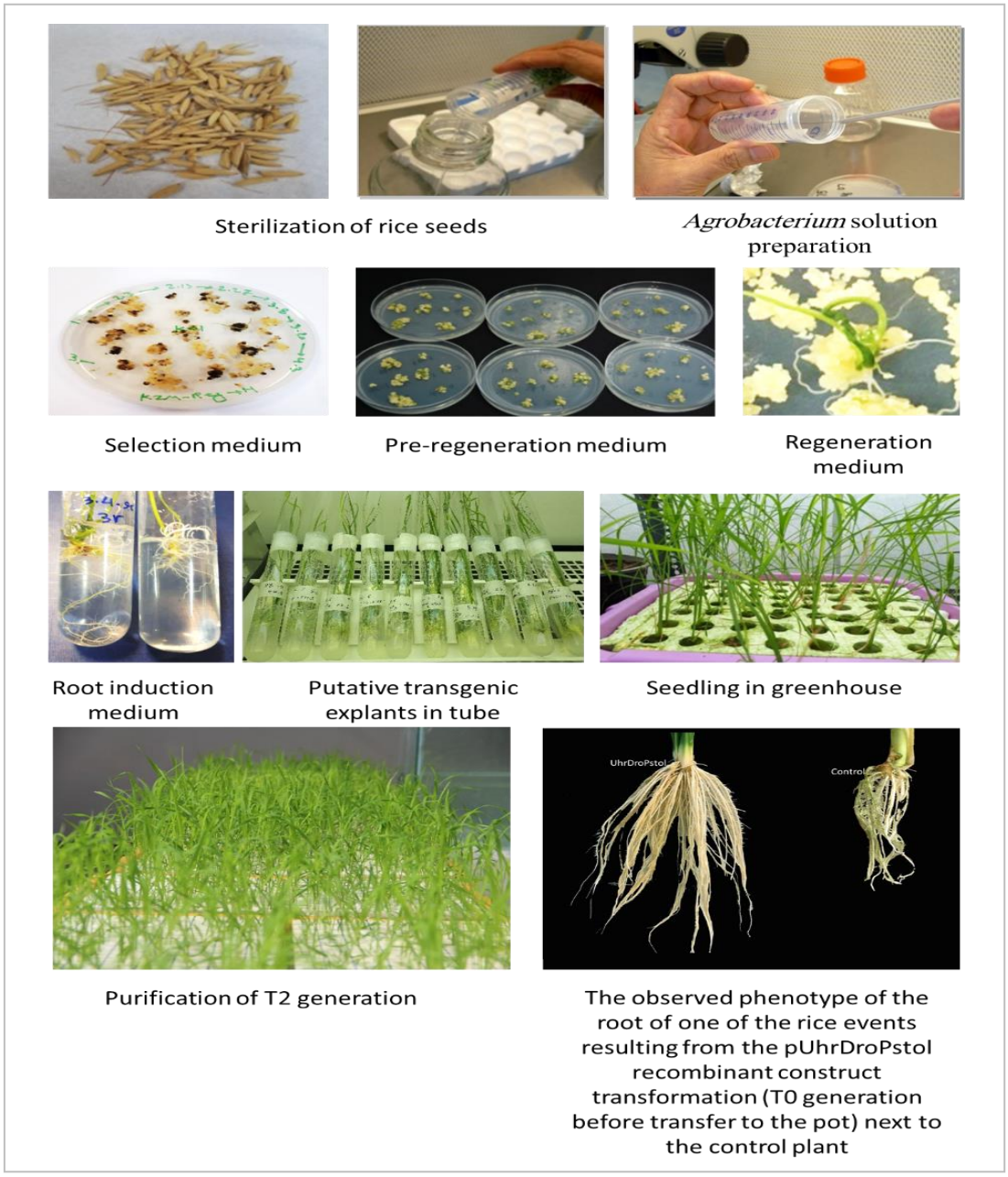
پلاسمیدهای pGH-DRO1 حاوی ژن OsDRO1 و pGH-RCc3 حاوی کاست دارای پیشبرنده مختص ریشه به طور جداگانه با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sal*I هضـــم و قطعه ۷۶۸ جفت‌بازی *OsDRO1* تحت پیشـــبرنده RCc3 درون حامل pGH همسانه‌سازی شد. حامل نوترکیب pGH-RCc3-Nac5 با استفاده از آنزیم‌های برشی *Kpn*I و *Xba*I هضم شده و قطعه حاوی کاســـت ژنی OsDRO1 (Rcc3-OsDRO1-Tahsp-ubi) در کنار کاســـت ژنی *OsPSTOL1* در پلاســـمید نوترکیب pUhPstol قرار گرفت و سازه نوترکیب pUhrDroPstol ساخته شد.

انتقال ژن و ایجاد گیاهچه‌های تراریخته‌ی احتمالی در محیط انتخابی: کالوس‌هایی که تراژن‌ها را دریافت کرده بودند در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین شروع به رشد کردند درحالی‌که کالوس‌های شاهد که در کنار کالوس‌های تراریخته احتمالی قرار داده شده بودند، از بین رفتند. کالوس‌های جنین‌زا به تدریج سبز شده و پس از باززایی و تمایز، گیاهچه تولید کردند. این گیاهچه‌ها در محیط ریشه‌زایی، ریشه‌دار شدند. مراحل انتقال ژن و باززایی در شکل ۲ نشان داده شده است. آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین در تمامی مراحل مورد استفاده قرار گرفت. سپس گیاهچه‌های کامل به محلول یوشیدا انتقال یافتند و به‌مدت یک ماه برای استقرار کامل در این محیط نگهداری شدند. در این مرحله ریشه‌ی گیاهان تراریخته‌ی احتمالی نسبت به گیاه شاهد غیرتراریخته هم سن و حاصل از مراحل کشت بافت تفاوت ظاهری قابل ملاحظه‌ای نشان داد (شکل ۲). این گیاهان سپس آمادگی انتقال به خاک را پیدا کرده و تحت شرایط کنترل شده در گلخانه تراریخته پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی تا مرحله بذرگیری نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تایید حضور ژن در نسل T0 تا تعیین خلوص رخدادها: آغازگرهای *DRO1* با نرم افزار Vector NTI (نسخه ۱۰) به صورتی طراحی شدند که بتوان با استفاده از آنها بین تراژن و ژن مشابه داخلی تمایز قائل شد (Zandi et al. 2019). ترکیب این جفت آغازگر در واکنش زنجیره‌ای‌پلیمراز چندگانه با ژن مرجع داخلی *RG100* و نیز آغازگرهای مختص سازه *PSTOL1* برای آنالیز نسل T0، T1 و T2 رخدادهای حاصل استفاده شد. (شکل ۳ a و b). گیاهان تراریخته‌ی احتمالی که هر ســـه باند مورد نظر مربوط به ژن های *DRO1*، *PSTOL1* و *RG100* را نشـــان دهند به عنوان تراریخته معرفی می شوند. پس از تایید تراریختگی نتاج هر رخداد در نسل T1، در صورتی که همه‌ی گیاهان آنالیز شده در نسل T2 تراریخته باشـــند، رخداد مورد نظر به عنوان رخداد خالص معرفی می‌شـــود. تاکنون یک رخداد خالص در نســـل T2 مربوط به سازه‌ی pUhrDroPstol معرفی شده است (جدول ۱). در صورت ناخالص بودن رخداد مورد بررسی در نسل T2، خالص‌سازی در نسل‌های بعدی انجام خواهد شد. خالص سازی سایر رخدادها در حال انجام است. مقایسه فنوتیپ و ساختار ریشه گیاه تراریخته با گیاه شـاهد هم سـن پس از مراحل کشـت بافت و قبل از انتقال به گلدان نشـان داد انتقال ژن‌های *OsDRO1* ، *OsPSTOL1* ریشه گیاه مورد بررسی را به صورت ظاهری تغییر داده است (شکل ۱) که نیاز به آنالیزهای دقیق‌تر دارد. واکنش پی سی‌آر برای

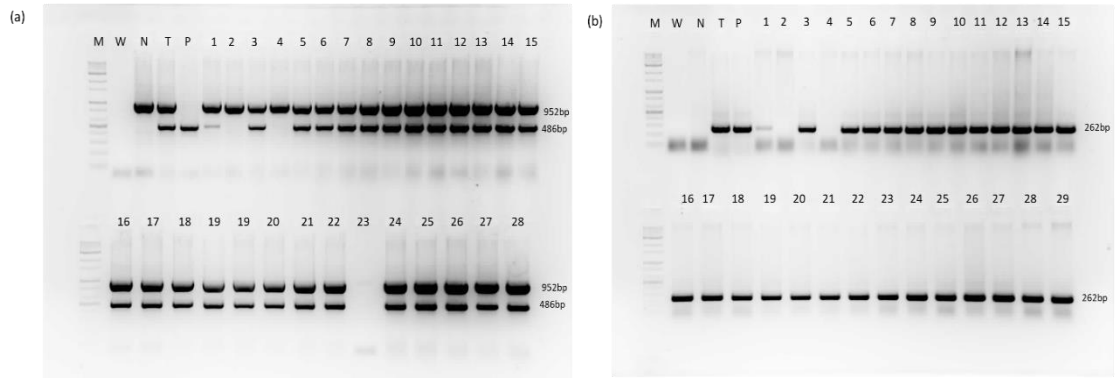
آنالیز نسل‌های در حال تفکیک T1 و T2 رخدادهای تراریخته حاصل انجام و نتایج تعدادی از آنها در جدول ۱ خلاصه شده است.

خالص‌سازی رخدادهای حاصل در حال انجام است.



شـــکل ۲. مراحل انتقال ژن به برنج و فنوتیپ ظاهری ریشـــه یکی از رخدادهای حاصـــل از انتقال ســـازه pUhrDroPstol در نسل T0 قبل از انتقال به گلدان در کنار گیاه شاهد

Figure 2. Stages of rice gene transformation and observed phenotype of the root of one of the rice events resulting from the pUhrDroPstol recombinant construct transformation (T0 generation before transfer to the pot) next to the control plant



شکل ۳. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با آغازگرهای مختص تراژن *DRO1* (باند مورد انتظار: bp ٤٨٦) و مرجع داخلی RG100 (باند مورد انتظار bp ٩٥٢) (a)؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای مختص تراژن *PSTOL1* (باند مورد انتظار: bp ٢٦٢) (b). M، نشـــانگر اندازه وزن ملکولی (1Kb Plus-Biofact company)؛ P، پلا سمید pUhrDropstol (کنترل مثبت)؛ T، گیاه تراریخته (حاوی ژن منفرد به د ست آمده از پروژه) به عنوان کنترل مثبت؛ N، گیاه شـــاهد غیرتراریخته به عنوان کنترل منفی؛ W، کنترل بدون الگو (آب)؛ سایر چاهک‌ها گیاهان تراریخته نسل T2

Figure 3. Multiplex polymerase chain reaction using *DROI* transgene-specific primers (expected band: 486 bp) and internal reference RG100 (expected band: 952 bp) (a); PCR using *PSTOL1* transgene-specific primers (expected band: 262 bp) (b). M, Molecular weight marker (1Kb Plus-Biofact company); P, plasmid pUhrDroPstol; T, Transgenic plant (positive control); N, non-transgenic plant; W, water control (no DNA); Others: rice event (T2) samples

در این پژوهش ۱۲ رخداد احتمالی برنج تراریخته حاصـل شـد که ۱۰ رخداد در آنالیز PCR حضـور هر دو ژن *OsDRO1* و *OsPSTOL1* را نشان دادند. همچنین آنالیز PCR نشان داد رخداد شماره ۷ تنها ژن *OsPSTOL1* را دریافت کرده و فاقد ژن *OsDRO1* است. رخداد شماره ۳ تنها حاوی ژن نشانگر انتخابی بوده و حضور ژن‌های اصلی در این گیاه ثابت نشد. ایرانیان در تولید برنج تراریخته در دنیا پیشـــتاز بوده‌اند (Bennett et al. 1997; Ghareyazie et al. 1997). در این پژوهش ژن‌های *OsPSTOL1* و *OsDRO1* به عنوان ژن‌های کاندید موثر در تغییر ســـاختار ریشـــه و تحمل به خشـــکی تحت نواحی تنظیمی جداگانه در یک سازه ژنی به گیاه برنج رقم هاشمی منتقل شدند که انتقال همزمان این دو ژن تاکنون گزارش نشده است. انتظار بر این است ژن *OsDRO1* زاویه رشد ریشه را تغییر داده و ریشه‌ها به سمت عمق خاک رشد کنند (Kondo et al. 2000; Uga et al. 2013).

جدول ۱. رخدادهای برنج تراریخته حاصل از سازه نوترکیب pUhrDroPstol و نتایج آنالیز تا نسل T2

Table 1. Transgenic rice events resulting of pUhrDroPstol construct transformation and analysis results until T2 generations

رخداد احتمالی Putative events	تعداد گیاهان باززاشده در نسل T0 The number of regenerated plants of T0 generation	تعداد گیاهان PCR مثبت The number of PCR positive plants	خلوص در نسل T2 Purity of T2 generation
Event 1	6	6 (DRO+/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion
Event 2	4	4 (DRO+/PSTOL+)	خالص pure line (homozygous for the insertion)
Event 3	1	۰	–
Event 4	4	4 (DRO+/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion
Event 5	6	6 (DRO+/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion
Event 6	6	6 (DRO+/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion
Event 7	6	6 (DRO-/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion
Event 8	5	5 (DRO+/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion
Event 9	3	3 (DRO+/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion
Event 10	1	1 (DRO+/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion
Event 11	3	3 (DRO+/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion
Event 12	5	5 (DRO+/PSTOL+)	ناخالص heterozygous for the insertion

ریشه عمیق‌تر و با زاویه بیشتر نسبت به سطح افق و اجتناب از خشکی با افزایش عمق ریشه‌زنی از موارد مورد انتظار بیان این ژن خواهد بود (Uga et al. 2013). انتظار بر این است که استفاده از اگروباکتریوم حاوی سازه نوترکیب ساخته شده در این تحقیق (pUhrDroPstol) در انتقال ژن به گیاهان مختلف بتواند با افزایش کارایی جذب فسفر سبب افزایش عملکرد شده و نیز با بهبود ساختار ریشه در افزایش تحمل به خشکی موثر باشد. انتقال همزمان چندین ژن برای بهبود صفات مختلف در گیاهان اهمیت ویژه‌ای داشته و به عنوان یک روش اصلاحی موثر به کار می رود. این روش می‌تواند زمان رسیدن به هدف مورد نظر برای اصلاح گیاهان را کاهش داده و بهبود صفت مورد نظر را تسهیل نماید. در گزارش Ye و همکاران که در سال ۲۰۰۰ انجام شده است، با انتقال همزمان سه ژن دخیل در سنتز ویتامین آ به برنج که منجر به تولید این ویتامین در آندوسپرم برنج شد، ارزش غذایی آن را افزایش دادند (Ye et al. 2000). انتقال همزمان دو ژن دخیل در بهبود فرایند بیوسنتز لیگنین در درختان جنگلی موجب افزایش کارایی این سیستم در درختان شد (Li et al. 2003).

استفاده از روش‌های اصلاح سنتی برای تغییر معماری ساختار ریشه، انتقال تعداد زیادی از ژن‌های نامطلوب را همراه با ژن مورد نظر به رقم زراعی در پی دارد و ممکن است با تاثیر بر عطر و طعم برنج، نتواند پاسخگوی ذائقه ایرانی باشد. استفاده از تلاقی برگشتی زمان‌بر بوده و برای تجمیع چندین ژن با مکانیسم‌های مختلف، کاری وقت گیر و پر هزینه است. طراحی، ساخت و انتقال سازه‌های چندژنی به گیاهان در پژوهش‌های پیشین نیز تا مراحل آزمایشگاهی در ایران انجام شده است (Mohsenpour et al. 2008, 2015; Mohammadizadeh et al. 2010; Raufi et al. 2012; Dolatabadi et al. 2014; Mohkami et al. 2015). در تحقیق حاضر دو ژن مختلف در مدت زمانی کوتاه به گیاه برنج رقم هاشمی که از نظر عطر و طعم مورد پسند ایرانیان است منتقل شد. رقم هاشمی از نظر عطر و طعم مورد پسند ایرانیان است. انتظار می‌رود گیاهان تراریخته حاصل از نظر سایر صفات از جمله صفات مربوط به پخت مانند همتای غیرتراریخته خود باشند. این ویژگی‌ها پس از خالص سازی، با استفاده از آزمایش‌های اینهمانی و بررسی صفات کیفی بذر مورد مطالعه قرار خواهند گرفت. امید است پژوهش حاضر گام اولیه موثری جهت تولید گیاهان متحمل به خشکی، کاهش مصرف آب در کشاورزی و بهبود عملکرد با جذب عناصر غذایی به ویژه فسفر در کشور باشد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق دو ژن کاندید موثر در تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی با استفاده از مهندسی ژنتیک به برنج رقم هاشمی منتقل شد. تاکنون انتقال همزمان این دو ژن کاندید ایجاد کننده بهبود ساختار ریشه و بهبود کارایی جذب فسفر گزارش نشده است. تغییر ساختار ریشه با بهبود صفات دخیل در جذب و ذخیره‌ی عناصر غذایی و همچنین تسهیل دسترسی به آب و مواد غذایی موجود در لایه‌های زیرین با ایجاد ریشه‌های عمیق، می‌تواند به طور موثری موجب افزایش عملکرد، بویژه در شرایط نامساعد محیطی شود. ژن *DRO1* با تغییر زاویه‌ی ریشه منجر به افزایش تعداد ریشه‌های عمیق در برنج می‌شود (Uga et al. 2013). عمیق‌بودن ریشه‌ها در سایر گونه‌های گیاهی نیز با دسترسی بهتر به مواد غذایی و در نتیجه عملکرد بالاتر همراه بوده است. همچنین با توجه به غیر متحرک بودن فسفر در خاک، پاسخ گیاهان به کمبود فسفر معمولا با گسترده‌تر شدن ریشه همراه

است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گیاهان دارای ریشه‌ی توسعه‌یافته جذب فسفر بالاتری را نشان خواهند داد. بر اساس گزارشات قبلی، ژن *PSTOL1* در شرایط کمبود فسفر نقش بسزایی در توسعه‌ی ریشه ی برنج و در نتیجه افزایش جذب فسفر ایفا می‌کند (Gamuyao et al. 2012). بررسی صفات ریشه، تحمل به خشکی و افزایش جذب فسفر برای لاین‌های حاصل از این پژوهش مورد نیاز خواهد بود. استفاده از روش‌های اصلاح سنتی برای تغییر ساختار ریشه با انتقال تعداد زیادی از ژن‌های نامطلوب به همراه ژن مورد نظر به رقم زراعی همراه ا ست و ممکن ا ست با تاثیر بر عطر و طعم برنج، نتواند پا سخگوی ذائقه ایرانی با شد. اصلاح گیاه با روش تلاقی برگشتی نیز زمان‌بر بوده و استفاده از این روش برای تجمیع چندین ژن با مکانیسم‌های مختلف، کاری وقت گیر و پر هزینه است. انتظار بر این است انتقال همزمان دو ژن *DRO1* و *PSTOL1* به رقم هاشمی بتواند با افزایش کارایی جذب فسفر سبب افزایش عملکرد شده و نیز با بهبود ساختار ریشه و رشد عمودی ریشه در افزایش تحمل به خشکی موثر باشد.

سپا سگزاری: از ریا ست محترم پژوه شگاه بیوتکنولوژی ک شاورزی (ABRII) برای فراهم کردن هزینه و امکانات این پژوهش سپاسگزاری می‌شود. از خانم مهندس فاطمه فرشاد که در بررسی منابع این پژوهش همکاری داشتند و سرکار خانم دکتر مهرناز انتصاری برای انتقال تجربه روش انتقال ژن به برنج قدردانی می‌شود.

منابع

چمنی محصص فاطمه، سلوکی محمود، قره یاضی بهزاد، فرشاد فاطمه، فهمیده لیلا، غفاری اکرم، محسن پور مطهره (۱۳۹۶) جداسازی و آنالیز عملکرد ژن افزایش جذب فسفر (*PSTOL1*) از گونه وحشی برنج. مجله علمی پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. ۶ (۱) ۱-۱۰.

رئوفی البرز، توحیدفر مسعود، سلوکی، محمود، محسن پور مطهره (۱۳۹۰) جداسازی و کلون کردن دو ژن از خانواده PR1 و ساخت پلاسمیدهای سه‌گانه حاوی سه گروه مختلف از ژن‌های *PR* ، به منظور تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌های قارچی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۳ (۲) ۲۷-۴۶.

زندی میلاد، ح سینی رامین، مح سن پور مطهره، ح سینی سالکده قا سم، قره یا ضی بهزاد (۱۳۹۸) انتقال ژن‌های *OsEXPA8*، *OsNAC5* و *DRO1* به برنج به منظور تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی. مجله علمی پژوهشی مهند سی ژنتیک و ایمنی زیستی. ۸ (۱) ۷۷-۸۹.

محسن پور مطهره، بابائیان جلودار نادعلی، توحیدفر مسعود، حبشی علی اکبر (۱۳۸۷) طراحی و ساخت چهار حامل پلاسمیدی نوترکیب مناسب برای انتقال ژن های کیتیناز، گلوکاناز و Bt به گیاهان. مجله علمی پژوهشی علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۵ (۴) ۶۹-۸۰.

محمدی زاده نگین، توحیدفر مسعود، محسن پور مطهره (۱۳۸۹) تراریزش گیاه گندم بواسطه اگروباکتریوم به منظور انتقال ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۲ (۱) ۸۱-۹۸.

References

An G, Watson BD, Chiang CC (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato, and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. Plant Physiol 81 (1), 301–305.

Arai-Sanoh Y, Takai T, Yoshinaga S, et al. (2014) Deep rooting conferred by DEEPER ROOTING 1 enhances rice yield in paddy fields. Sci Rep 4 (1), 1-6.

Araki H, Morita S, Tatsumi J, Iijima M (2002) Physiol-morphological analysis on axile root growth in upland rice. Plant Prod Sci 5 (4), 286-293.

Bennett J, Cohen MB, Katiyar SK, et al. (1997) Enhancing insect resistance in rice through biotechnology. Adv in Insect Control: The Role of Transgenic Plants 75–93.

Chamani Mohasses F, Solouki M, Ghareyazie B, et al. (2020) Correlation between gene expression levels under drought stress and synonymous codon usage in rice plant by in-silico study. PLoS One 15 (8), e0237334.

Chamani Mohasses F, Soluki M, Ghareyazie B, et al. (2017) Isolation and functional analysis of *PSTOL1* from wild species of rice. Gene Eng Biosafety J 6 (1), 1-10 (In Persian).

Chin JH, Gamuyao R, Dalid C, et al. (2011) Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: Pup1 sequence to application. Plant Physiol 156 (3), 1202-1216.

Chin JH, Lu X, Haefele SM, et al. (2010) Development and application of gene-based markers for the major rice QTL Phosphorus uptake 1. Theor Appl Genet 120 (6), 1073-1086.

Dolatabadi B, Ranjbar G, Tohidfar M, Dehestani A (2014) Genetic transformation of Tomato with three pathogenesis-related protein genes for increased resistance to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. J Plant Mol Breed 2 (1), 1–11.

Gamuyao R, Chin JH, Pariasca-tanaka J, et al. (2012) The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. Nature 488 (7412), 535–539.

Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, et al. (1997) Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA(b) gene. Mol Breed 3 (5), 401–414.

Heuer S, Lu X, Chin JH, 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 (5), 456–471.

Kondo M, Murty MVR, Aragones D V (2000) Characteristics of root growth and water uptake from soil in upland rice and maize under water stress. Soil Sci Plant Nutr 46 (3), 721–732.

Li L, Zhou Y, Cheng X, et al. (2003) Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees

through multigene cotransformation. Proc Natl Acad Sci 100 (8), 4939–4944.

Miyasaka SC, Habte M (2007) Plant mechanisms and mycorrhizal symbioses to increase phosphorus uptake efficiency. Commun Soil Sci Plant Anal 32 (7-8), 1101–1147.

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 (In Persian).

Mohkami A, Marashi H, Shahriary Ahmadi F, et al. (2015) Evaluation of Agrobacterium-mediated Transformation of Chlamydomonas reinhardtii using a Synthetic amorpha-4, 11-diene Synthase Gene. J Cell Mol Res 7 (1), 53–58.

Mohsenpour M, Babaeian Jeloudar NA, Tohidfar M, Habashi AA (2008) Design and construction of four recombinant plasmid vectors containing chitinase, glucanase and BT genes, suitable for plant transformation. J Agric Sci Natur Resour 15 (4), 69-80 (In Persian).

Mohsenpour M, Tohidfar M, Jelodar NB, Jouzani GS (2015) Designing a new marker-free and tissue-specific platform for molecular farming applications. J Plant Biochem Biotechnol 24 (4), 433-440.

Ozawa K (2012) A high-efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (Oryza sativa L.). In: Transgenic Plants. Springer, pp 51–57.

Raufi A, Tohidfar M, Soluki M, 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. Agric Biotechnol J 3 (2), 27–46 (In Persian).

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press.

Sánchez PA, Salinas JG (1981) Low-input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. Adv. Agron 34, 279-406.

Schachtman DP (1998) Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. PLANT Physiol 116 (2), 447–453.

Shahbazi K, Besharati H (2013) Overview of agricultural soil fertility status of Iran. L Manag J 1 (1), 1–15.

Uga Y, Ebana K, Abe J, et al. (2009) Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (Oryza sativa L.) with different genetic backgrounds. Breed Sci 59 (1), 87–93.

Uga Y, Kitomi Y, Yamamoto E, et al. (2015) A QTL for root growth angle on rice chromosome 7 is involved in the genetic pathway of DEEPER ROOTING 1. Rice 8 (1), 1-8.

Uga Y, Okuno K, Yano M (2011) Dro1, a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. J Exp Bot 62 (8), 2485–2494.

Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, et al. (2013) Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. Nat Genet 45 (9) 1097-1102.

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. Theor Appl Genet 105 (6-7) 890–897.

Ye X, Al-Babili S, Klöti A, et al. (2000) Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science 287 (5451), 303–305.

Zandi M, Hosseini R, Mohsenpour M, et al. (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 (In Persian).

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500