مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۸
صفحه ۸۹-۷۷

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

انتقال ژن‌های *OsEXPA8*، *OsNAC5* و *DRO1* به برنج به منظور تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی

Transformation of *DRO1, OsNAC5, OsEXPA8* genes in order to improve rice root architecture and drought tolerance in rice

میلاد زندی[۱]، رامین حسینی[۱]، مطهره محسن پور[۲*]، قاسم حسینی سالکده[۲*] و بهزاد قره یاضی[۲*]

Milad Zandi[1], Ramin Hosseini[1], Motahhareh Mohsenpour*[2], Ghasem Hosseini Salekdeh*[2] and Behzad Ghareyazie*[2]

۱- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی قزوین
۲- پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

1- Biotechnology Dept., Imam Khomeini International University,Gazvin, Iran
2- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

* نویسندگان مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mthrhm@yahoo.com, hsalekdeh@yahoo.com, ghareyazie@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۵)

چکیده

اصلاح ساختار ریشه می‌تواند با بهبود رشد، استقرار در خاک، جذب آب و مواد مغذی و بیوسنتز اسیدهای آمینه و هورمون‌ها به افزایش عملکرد دانه و کیفیت مطلوب بذر منجر شود. ساختار ریشه با جذب مواد مغذی، مقاومت به ورس و تحمل به خشکی، مرتبط است. با در نظر گرفتن بحران کم آبی در کشور، تولید گیاهان متحمل در برابر خشکی اهمیت دارد. در این پژوهش برای ایجاد گیاه برنج متحمل به خشکی، سه ژن تغییردهنده ساختار ریشه برنج که در افزایش طول، تعداد، قطر و زاویه رشد ریشه نقش دارند پس از ساخت یک سازه سه ژنی برای انتقال به گیاه برنج رقم هاشمی استفاده شدند. ژن‌های *OsEXPA8*، *OsNAC5* و *DRO1* برگرفته از ارقام وحشی برنج طی مراحلی تحت پیشبر مختص ریشه و پیشبر دائمی بر اساس ماهیت ژن کاندید همسانه‌سازی و در ناحیه T-DNA ناقل دوگانه اگروباکتریومی قرار داده شدند. سازه حاصل موسوم به pUhrN5ExDro به آگروباکتریوم سویه EHA105 منتقل و برای انتقال ژن به جنین‌های نارس برنج رقم هاشمی مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام مراحل انتقال ژن، گیاهان باززا شده حاصل از جنین‌های نارس که در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیگرومایسین در مراحل مختلف کالوس زایی، باززایی و ریشه‌زایی زنده مانده و رشد کرده بودند به محلول یوشیدا و سپس به گلدان منتقل شدند. گیاهان تراریخته حاصل توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مختص سازه و مختص ژن مورد تایید قرار گرفتند. محل الحاق تراژن با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس در کروموزوم ۱۰ برنج تعیین شد. مقایسه فنوتیپ ریشه با گیاه شاهد تفاوت ظاهری در ساختار ریشه نشان داد. سازه چند ژنی حاصل را می‌توان با هدف تغییر ساختار ریشه به منظور تحمل به خشکی برای انتقال ژن به سایر گیاهان نیز مورد استفاده قرار داد. امید است تولید برنج تراریخته با تغییر ساختار ریشه بتواند تحمل به خشکی را در این محصول مهم زراعی افزایش و سبب کاهش مصرف آب در کشت برنج شود.

واژه‌های کلیدی

برنج تراریخته،
تحمل به خشکی،
سازه چند ژنی،
مهندسی معماری ریشه

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

مقدمه

ریشه برنج سطحی و افشان بوده و حداکثر در عمق ۲۰ تا ۲۵ سانتی‌متری خاک نفوذ می‌کند که مستعد متاثرشدن از تنش خشکی به دلیل دارابودن ریشه سطحی در میان غلات است. به طورکلی یک سیستم عمیق‌تر، ضخیم‌تر، بلندتر و منشعب‌تر ریشه می‌تواند تحمل برنج را به تنش کم آبی افزایش دهد (Gowda *et al.*, 2011). یکی از مهمترین راهکارهای مقابله با بحران کمبود آب استفاده هرچه مفیدتر و کارآمدتر از آب آبیاری است که تغییر ساختار ریشه با استفاده از مهندسی ژنتیک، 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 که به طور 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).

برنج، گیاهی است که نسبت به دیگر گیاهان تحت آبیاری، بیشترین سطح زیر کشت را دارا است. 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. تحمل به خشکی از جمله صفات مهم زراعی است که باعث کاهش مصرف آب می‌شوند. اگر نشاکاری و کرت‌بندی و در نتیجه مصرف بالای آب در کشت برنج حذف شود، کاهش قابل توجهی در هزینه‌های تولید و مصرف آب ایجاد خواهد شد.

به منظور افزایش تحمل به خشکی در گیاه برنج، شناسایی ژن‌هایی که سبب رشد عمیق ریشه‌ها می‌شوند اهمیت زیادی خواهد داشت. یکی از ژن‌های شناسایی شده ژن *DRO1* (DEEPER ROOTING1) است (Uga *et al.*, 2013). بیان بالای *DRO1* سبب تغییر زاویه رشد ریشه شده و ریشه‌ها به سمت عمق خاک رشد می‌کنند (Kondo *et al.*, 2000). این ژن مسئول اختلاف رشد ریشه در ارقامی با ریشه‌های عمیق و سطحی است (Uga *et al.*, 2015). ریشه عمیق، صفتی پیچیده و ترکیبی از اثرات زاویه رشد ریشه، طول ریشه اولیه و ریشه‌های گرهی است (Araki *et al.*, 2002). پروتئین *DRO1* (DEEPER ROOTING1) رابطه‌ای عکس با اکسین دارد که در طویل شدن سلول‌ها در راس ریشه که سبب رشد نامتقارن ریشه و گره-خوردگی انتهای ریشه در پاسخ به جاذبه زمین می‌شود، دخالت دارد (Araki *et al.*, 2002). ژن *DRO1* 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). اوگا و همکاران در مطالعه خود با انتقال ژن *DRO1* از رقم مقاوم به خشکی *Kinandang patong* (KP) به رقم IR64 موفق شدند با ایجاد تغییر در زاویه ریشه، ریشه‌هایی عمیق‌تر و با زاویه بیشتر نسبت به سطح افق ایجاد کنند. 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). افزایش جذب آب و مواد غذایی یکی از صفاتی است که در اصلاح گیاهان به خصوص در گیاهان رشد یافته در مناطق گرمسیری از اهمیت زیادی برخوردار است (Wissuwa *et al.*, 2016). جهش در ژن *AtDRO1* در آرابیدوپسیس منجر به ریشه‌های جانبی افقی می‌شود (Guseman *et al.*, 2017). در گزارش Ashraf و همکاران (۲۰۱۹) آمده است از آنجایی که معماری ریشه یک صفت و هدفی مهم برای اصلاح گندم است، بنابراین استفاده از ژن‌های مشابه *DRO1* پتانسیل خوبی برای استفاده در اصلاح گیاهان برای افزایش بهره‌وری آنها و با استفاده از روش‌های نو مثل ویرایش ژنومی را دارند (Ashraf *et al.*, 2019). همچنین بیش بیان ژن *OsNAC5* (فاکتور رونویسی برنج دارای دامین NAM-ATAF-CUC (NAC)) تحمل به خشکی، شوری و دمای پایین در گیاهان تراریخته را افزایش می‌دهد

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

(Takasaki *et al.*, 2010). تاکاساکی و همکاران گزارشی با بیش بیان *OsNAC5* که یک عامل رونویسی است، عملکرد این ژن را در تحمل به خشکی هم با روش خاموشی ژن توسط آر.ان.ای ی مداخله‌گر (RNAi) و هم با استفاده از بیش بیان آن در آرابیدوپسیس و برنج تراریخته مورد بررسی قرار دادند. بیش بیان *OsNAC5* تحت کنترل پیشبرهای مختص ریشه در گیاه برنج، تحمل به خشکی و شوری را در طول مرحله رشد رویشی بهبود داد و مهم‌تر اینکه بیش بیان این ژن در ریشه به‌طور معنی‌داری تحمل به خشکی را در مرحله باردهی از طریق رشد ریشه‌های طویل با افزایش عملکرد دانه افزایش داد. ژن *OsNAC5* همراه با ABA نقش مهمی در حرکت دوباره Zn، Fe و آمینواسیدها از برگ به بذرها دارد (Sperotto *et al.*, 2009). بیش بیان *OsNAC5* در گیاهان برنج منجر به انباشت پرولین و قندهای محلول و همچنین مقدار کمترMDA (Malondiahdehyde) و H_2O_2 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 (Takasaki *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2011). علاوه بر این بیان *OsNac5*، با افزایش قطر ریشه برنج، سبب افزایش مقاومت به خشکی و افزایش بازده محصول در مزرعه می‌شود (Jeong *et al.*, 2013*a*). علاوه بر دو ژن مذکور، بیان *OsEXPA8* (Expansin-A8) که پروتئین اکسپنسین (پروتئین دیواره سلولی درگیر در تغییرات دیواره سلولی) را کُد می‌کند رشد برنج و ساختار آن را با سرعت بخشیدن به گسترش سلولی بهبود می‌دهد. با بیان *OsEXPA8* کشش و توسعه‌پذیری سلول‌ها به طور قابل توجهی افزایش یافته و در ترکیب دیواره سلولی تاثیر می‌گذارد و افزایش رشد ریشه‌های مویین را به همراه دارد (Cosgrove, 2005; Choi *et al.*, 2006). گزارشات نشان داده است که بیان بالای ژن *OsEXPA8* به طور اختصاصی در ریشه، سبب بهبود آرایش سیستم ریشه‌ای رقم Zhonghua11 می‌شود. افزایش در طول و تعداد ریشه‌های جانبی و تارهای کشنده نتیجه این بررسی بوده که به دلیل افزایش در مقدار پروتئین ایکپنسین رخ داده است. گزارشی از بررسی تحمل به خشکی پس از انتقال این ژن به گیاه وجود ندارد (Ma *et al.*, 2013). برهمکنش ژن‌های کنترل کننده صفات ریشه برای دستیابی به صفات برتر ریشه و ایجاد ریشه‌های عمیق و ضخیم و بهبود معماری ریشه در پاسخ به کمبود آب یا نیتروژن در ارقام برنج مورد نیاز است (Nada *et al.*, 2019). هدف از این تحقیق انتقال ژن‌های *DRO1*، *OsNAC5* و *OsEXPA8* به گیاه برنج به منظور اصلاح ساختار ریشه به منظور تحمل به خشکی است.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه چند ژنی حاوی ژن‌های *OsEXPA8*، *OsNac5* و *DRO1*

در این تحقیق که در بخش مهندسی ژنتیک و ایمنی‌زیستی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی انجام شد از سازه‌های تک ژنی حاوی ژن‌های تغییردهنده صفات ریشه و تحمل به خشکی که قبلا توسط مجری پروژه ساخته شده بود، برای ترکیب ژن‌ها و تهیه سازه چند ژنی استفاده شد. به طور خلاصه با به کارگیری آنزیم‌های برشی ایجادکننده انتهای سازگار کاست‌های ژنی در ناحیه T-DNAی پلاسمید اگروباکتریومی همسانه‌سازی شدند. طراحی سازه‌های ژنی با استفاده از نرم افزار Vector NTI (Invitrogen) انجام شد. واکنش اتصال قطعات مورد نظر ابتدا در حامل‌های همسانه‌سازی تحت پیشبر مختص ریشه RCc3 در مورد ژن *OsNAC5* و تحت پیشبر یوبی‌کوئیتین ذرت در مورد ژن های *DRO1* و *OsEXPA8* انجام و سپس در حامل دوگانه انتقال ژن مختص اگروباکتریوم قرار داده شد. بدین ترتیب که پلاسمیدهای pGH-*NAC5* حاوی ژن *OsNAC5* و pGH-RCc3 حاوی پیشبر مختص ریشه (که قبلا توسط مجری پروژه در پژوهشگاه بیوتکنولوژی طراحی شده بود) به طور جداگانه با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sal*I هضم و قطعه ۱۰۰۲ جفت‌بازی *OsNAC5* تحت پیشبر RCc3 درون حامل pGH همسانه‌سازی شد. پلاسمید نوترکیب حاصل موسوم به pGH-Rcc3-*Nac5* (pGHrN5) با هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی صحت همسانه‌سازی قرار گرفت. سپس حامل نوترکیب pGH-RCc3-*Nac5* با استفاده از آنزیم‌های برشی *Kpn*I و *Xba*I

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

هضم شده و قطعه حاوی کاست ژنی Os*Nac5* تحت پیشبر مختص ریشه به همراه خاتمه دهنده و پیشبر یوبی کوئیتین ذرت در مجموع با طول ٤٨١٠ جفت‌باز از روی ژل آگارز خالص سازی شد. این کاست (*Rcc3-Nac5-Tahsp-ubi*) با استفاده از آنزیم‌های *Kpn*I و*Spe*I در کنار کاست ژنی *Dro1* و *OsExpa8* قرار گرفت. لازم به ذکر است کاست های ژنی *DroI* و *OsExpa8* قبلا توسط مجری پروژه در سازه های منفرد موسوم به pUhDro و pUhEx طراحی و بهینه‌سازی کدونی شده و سپس در سازه‌ای دوژنی موسوم به pUhrExDro تحت پیشبرهای جداگانه قرار داده شده بودند.

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 زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت. کلیه مراحل همسانه‌سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل‌های سمبروک و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد (Sambrook *et al.*, 1989). پلاسمید نوترکیب سه ژنی حاصل موسوم به pUhrN5ExDro پس از تایید، به روش شوک حرارتی به اگروباکتریوم سویه EHA105 منتقل شد (An *et al.*, 1986).

انتقال ژن

انتقال ژن به برنج با استفاده از جنین نارس برنج به عنوان ریزنمونه بر اساس روش اسلامت-لودین و همکاران (٢٠١٤) انجام شد (Slamet-Loedin *et al.*, 2014). به طور خلاصه بذور برنج رقم هاشمی (دریافت شده از موسسه تحقیقات برنج کشور- رشت) در گلخانه نشا شدند. پس از ۲۱ تا ۳۰ روز نشاها به گلدان‌های مناسب منتقل شدند تا به مرحله جنین نارس برسند. خوشه‌های نارس برنج ۸ تا ۱۲ روز پس از گلدهی (اندازه جنین-های نارس ۱/۳ تا ۱/۸ میلی‌متری)، برداشت و بذور نارس، پوست‌کنده شد (جداسازی لما و پالئا). سپس بذور فاقد لما و پالئا با اتانول ۷۰ درصد و سپس با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد حاوی یک قطره توین ۲۰ استریل شدند. سپس جنین‌های نارس با استفاده از استریومیکروسکوپ جدا شدند.

دو تا سه روز قبل از انجام هم‌کشتی، اگروباکتریوم حاوی سازه نوترکیب pUhrN5ExDro بر روی محیط کشت LB همراه با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب (۷۵ میلی‌گرم در لیتر ریف‌آمپی‌سین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسپکتینومایسین) کشت خطی شد. یک ساعت قبل از انجام هم‌کشتیِ جنین‌های نارس با آگروباکتریوم، حدود یک لوپ پُر آگروباکتریوم از محیط LB برداشته و درون محیط تلقیح حاوی استوسیرینگون (فایل ضمیمه ۱-محیط تلقیح) سوسپانسیون شد. چگالی نوری (OD_{600nm}) باکتری روی ۰/۳ تنظیم شد. محلول تلقیح به مدت یک ساعت درون انکوباتور تاریک ۲۵ درجه قرار داده شد تا برای انتقال ژن آماده شود. جنین‌های نارس در حالی که سطح اسکوتلوم آنها بالاست روی محیط کشت همکشتی (فایل ضمیمه ۱-محیط هم‌کشتی) قرار داده شدند، سپس ۵ میکرولیتر از محلول آگروباکتریوم حاوی پلاسمید روی هر جنین نارس چکانیده شد. جنین‌های نارس تلقیح شده به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تاریک در محیط هم‌کشتی (فایل ضمیمه ۱-محیط هم‌کشتی) قرار گرفتند. پس از هم‌کشتی جنین های نارس روی کاغذ فیلتر استریل قرار داده شد و شاخه های ایجاد شده با اسکالپل حذف شدند. جنین‌های نارس را با قراردادن آنها بین دو لایه کاغذ فیلتر استریل به طور صحیح خشک شدند تا از رشد زیاد باکتری جلوگیری شود. این مرحله باید با دقت و بدون آسیب رساندن به جنین‌ها و سریع انجام شود.

سپس جنین‌ها برای رشد بهتر و تولید کالوس به محیط کشت استراحت (فایل ضمیمه ۱-محیط استراحت) منتقل شدند. در این حالت سطح اسکوتلوم آنها بالا قرار دارد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نور مداوم به مدت ۵ روز قرار داده شد. پس از رشد کالوس‌ها به اندازه مناسب در محیط استراحت، آنها به محیط کشت انتخابی حاوی هیگرومایسین B شرکت Duchefa (۵۰ میلی گرم در لیتر) منتقل شدند و در نور ممتد، دمای ۳۰ درجه و به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند (انتخاب اول)، سپس کالوس‌ها تقسیم شدند (هر کالوس را می‌توان به ٤ قسمت تقسیم کرد) و

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

روی محیط انتخابی تازه به مدت ۱۰ روز قرار گرفتند (انتخاب دوم). در انتخاب سوم کالوس های جنین زا از کالوس‌های سیاه جداسازی شده و ۱۰ روز دیگر در محیط انتخابی تازه واکشت شدند. کالوس‌های مقاوم جنین‌زا در محیط کشت انتخابی به محیط کشت پیش‌باززایی (فایل ضمیمه ۱-محیط پیش باززایی) منتقل و به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه و نور ممتد نگهداری شدند. کالوس‌های مناسب دارای نقاط سبز رنگ در محیط کشت پیش باززایی انتخاب و به محیط باززایی، ریشه‌زایی، یوشیدا و در نهایت خاک منتقل شدند.

آنالیزهای مولکولی

گیاهانی که در کلیه مراحل باززایی در محیط انتخابی حاوی هیگرومایسین زنده مانده و رشد کردند پس از استخراج دی‌ان‌ای ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده مختص سازه (قسمتی از ژن نشانگر هیگرومایسین و قسمتی از خاتمه دهنده nos مربوط به کاست ژنی *DRO1*)، مختص ژن (ژن *DRO1*، ژن *OSNAC5* و قسمتی از ژن *OsEXPA8* و پیشبر یوبی‌کوئیتین) و ناحیه‌ای از ژنوم برنج (RG100) به عنوان ژن کنترل داخلی آنالیز شدند.

تعیین تعداد نسخه‌های انتقال یافته گیاه تراریخته احتمالی با استفاده از تکنیک Real time-PCR به روش Yuan و همکاران (۲۰۰۷) به عنوان یک روش اولیه برای تخمین تعداد نسخه انجام شد. در این روش تخمین کپی‌شمار توسط مقایسه تراژن با یک ژن داخلی با تعداد نسخه مشخص انجام می‌شود. واکنش‌های Real time-PCR برای ژن داخلی KVM و قطعه NOS که در سازه سه ژنی دارای یک نسخه است انجام شد.

تعیین محل الحاق تراژن در ژنوم برنج با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس بهینه شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی انجام شد (توالی آغازگرها در جدول ۱). باند حاصل توالی‌یابی شد و تحت آنالیز بیوانفورماتیک برای تعیین دقیق محل الحاق قرار گرفت.

آنالیز فنوتیپی اولیه

به منظور مشاهده ساختار ریشه و مقایسه ظاهری با گیاه شاهد، گیاهان تراریخته نسل T0 در کنار گیاه شاهد غیرتراریخته هم سن و حاصل از مراحل کشت بافت به طور همزمان داخل Root Box قرار داده شدند و حدود یک ماه پس از انتقال، عکسبرداری انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مختص سازه، مختص ژن و طراحی شده برای تعیین محل الحاق تراژن‌ها.

Table 1- The sequences of designed primers for detection of transgenic plants including of construct specific, gene specific and transgene integration site recognition primers.

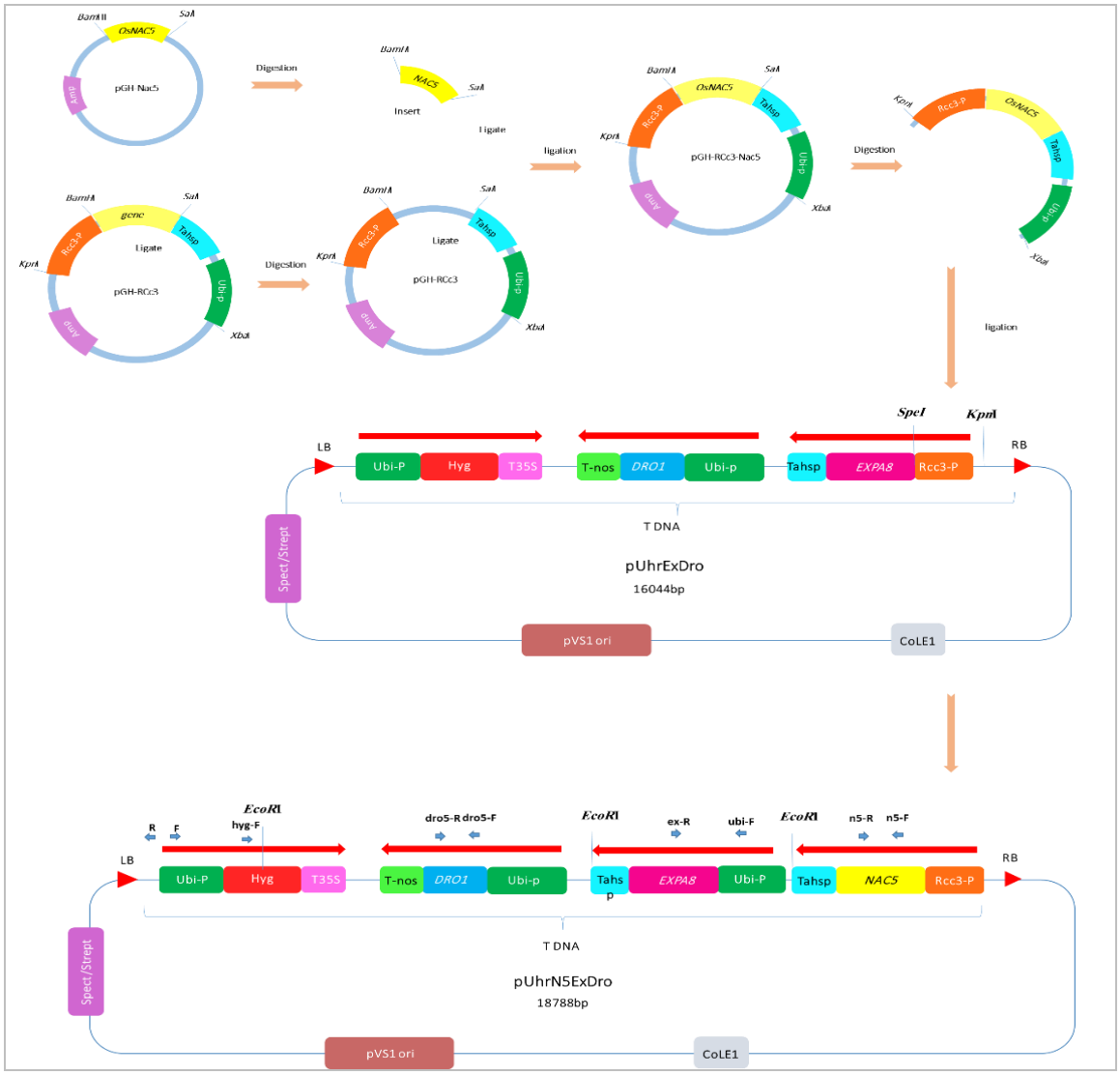
نام آغازگر	توالی آغازگر	نوع آغازگر
hyg-F	AGCTGCGCCGATGGTTTCTACAA	مختص سازه
nos-F	ATCGTTCAAACATTTGGC	
dro-F	GCAGTCCCTCCTCGCCATC	مختص ژن
dro-R	AGGGTGGAGGAGTTCTGCGGG	
ubi-F	CCGTAATAAATAGACACC	
ex-R	AGCCGAGGAGGTGTAGGTGG	
n5-F	AACGGCTTCTGGAGGTAG	
n5-R	CGACTACGGCTTCTACGA	
RG100-F	GCTGGACGTGCCAAAGAGAG	داخلی ژنوم برنج
RG100-R	CGAACCACAGCCACAGCATG	
F	CCGTAATAAATAGACACC	تعیین محل الحاق تراژن
R	GCTGCGGACATCTACATT	

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

نتایج و بحث

ساخت سازه چند ژنی دارای ژن‌های کاندید تغییردهنده

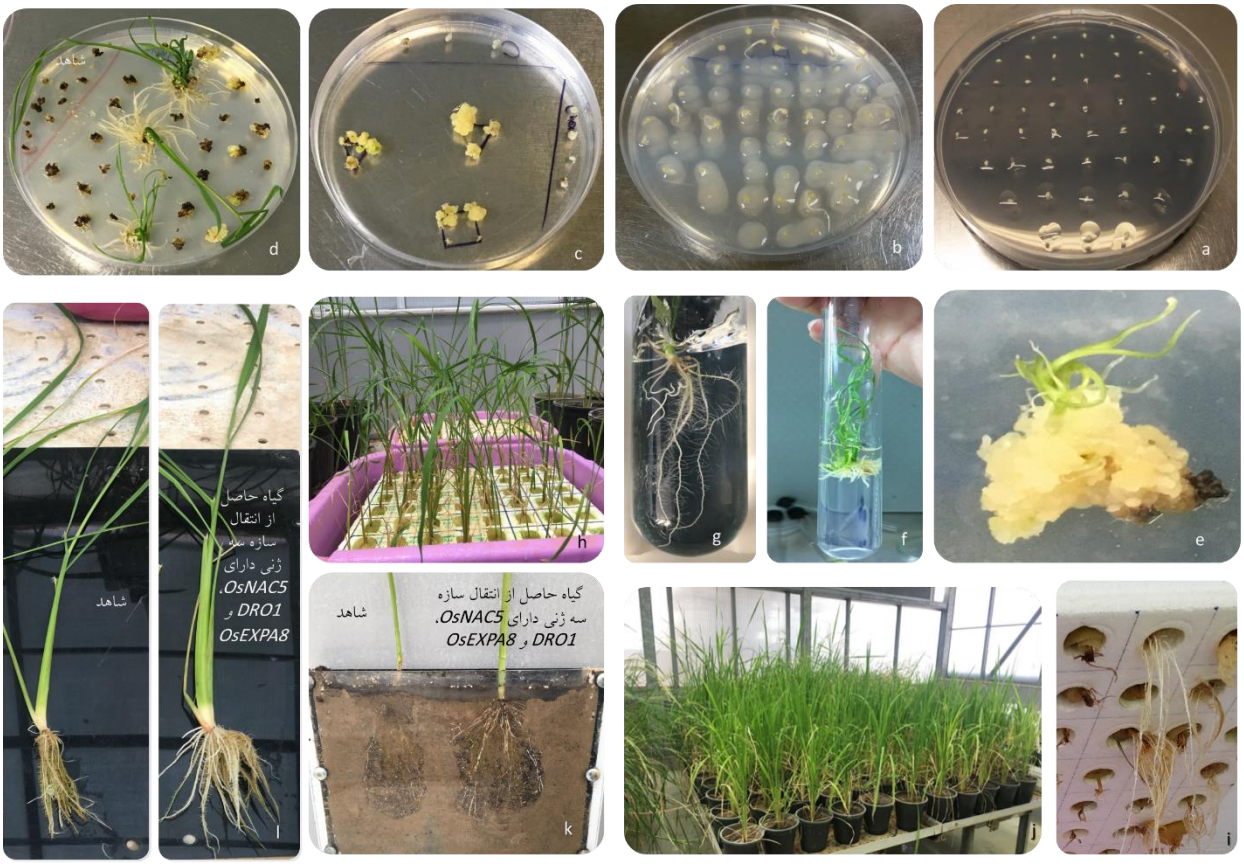
ساختار ریشه: قرار گرفتن کاست ژنی *OsNAC5* در کنار دو کاست ژنی *DRO1* و *OsEXPA8* که هر دو بهینه‌سازی کدونی شده بودند با هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تایید شد. آنزیم *Eco*RI که دارای سه جایگاه برش روی سازه است، سه قطعه ۱۲۶۵۶، ۳۶۲۲ و ۲۵۱۰ جفت بازی مورد انتظار را ایجاد کرد. سازه چندژنی حاصل موسوم به pUhrN5ExDro حاوی ژن *DRO1* تحت پیشبر یوبی‌کوئیتین و خاتمه‌دهنده Nos، ژن *OsEXPA8* تحت پیشبر مذکور و خاتمه‌دهنده Tahsp17 (از منشاء گندم) و ژن *OsNAC5* تحت پیشبر RCc3 و خاتمه‌دهنده Tahsp17 در ناحیه T-DNA سازه اگروباکتریومی است که این کاست‌های ژنی در خلاف جهت کاست ژنی مقاومت به هیگرومایسین قرار دارند (شکل ۱). مراحل شماتیک ساخت سازه در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- مراحل همسانه سازی ژن *OsNAC5* تحت پیشبر مختص ریشه و ساخت سازه نوترکیب pUhrN5ExDro. پلاسمیدهای pGH-*Nac5* حاوی ژن *OsNac5* و pGH-RCc3 حاوی کاست دارای پیشبر مختص ریشه به طور جداگانه با آنزیم‌های *BamH*I و *Sal*I هضم و قطعه ۱۰۰۲ جفت‌بازی *OsNAC5* تحت پیشبر 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 کاست ژنی *OsNAC5* (Rcc3-*OsNAC5-Tahsp-ubi*) در کنار کاست ژنی *DRO1* و *OsEXPA8* در پلاسمید نوترکیب pUheRxDro قرار گرفت و سازه نوترکیب pUhrN5ExDro ساخته شد.

Figure 1- The Schematic representation of cloning stages of *OsNAC5* under control of root specific promoter and construction of recombinant pUhrN5ExDro vector.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]



شکل ۲- مراحل انتقال ژن به جنین نارس برنج تا انتقال به گلدان و مشاهده فنوتیپ گیاهان نسل T0 حاصل از انتقال سازه سه ژنی pUhrN5ExDro. a- جنین نارس برنج روی محیط کشت قبل از تلقیح با باکتری؛ b- تلقیح با اگروباکتریوم حاوی سازه نوترکیب؛ c- کالوس‌زایی روی محیط انتخابی؛ d- باززایی گیاهان تراریخته احتمالی؛ e- کالوس باززاشده؛ f- انتقال به محیی ریشه زایی؛ g- ریشه زایی؛ h- انتقال به محلول یوشیدا؛ i- نمایی از ریشه‌های گیاهان تراریخته احتمالی در محلول یوشیدا؛ j- انتقال به گلدان؛ k- گیاهان تراریخته در کنار شاهد در Root box؛ l- نمایی از ریشه گیاه تراریخته در کنار گیاه شاهد.

Figure 2- Stages of gene transfer to immature embryos of rice until transfer to the pot and observing the phenotype of generation T0 of putative transgenic plants derived from transformation of three-gene construct pUhrN5ExDro.

انتقال ژن

بعد از گذشت یک هفته از تلقیح جنین‌های نارس برنج با اگروباکتریوم سویه EHA105 حاوی سازه نوترکیب، جنین‌ها به کالوس تبدیل شدند. حدود ۳۰ روز پس از تلقیح، کالوس‌هایی که به احتمال تراژن‌ها را دریافت کرده بودند در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین دوام آورده و شروع به رشد کردند و همچنین کالوس‌هایی که به عنوان شاهد غیرتراریخته در کنار کالوس‌های تراریخته احتمالی قرار گرفتند از بین رفتند (شکل ۲). بعد از گذشت حدود ۱٤ روز از قرار گرفتن در محیط باززایی انتخابی، روند سبز شدن و باززایی کالوس‌های جنین‌زا آغاز شد و پس از باززایی با حدود ۱۰ روز قرار گرفتن در محیط ریشه‌زایی، گیاهچه‌های مستقل ریشه‌دار شده تشکیل شدند (شکل ۲). آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین در تمامی مراحل تا قبل از انتقال گیاهان به یوشیدا مورد استفاده قرار گرفت. بعد از ۱۰ روز قرار دادن گیاهچه‌های کامل در محیط سازگاری، انتقال آنها 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. زمانی که گیاهان تراریخته احتمالی در کنار گیاه شاهد غیرتراریخته هم سن و حاصل از مراحل کشت بافت به طور همزمان داخل Root Box قرار داده شدند تفاوت ظاهری ساختار ریشه قابل مشاهده بود (شکل ۲).

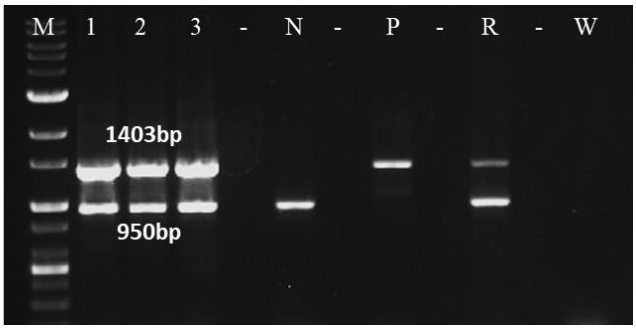
[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

آنالیزهای مولکولی: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه (Multiplex PCR) مختص سازه

در گام اول آنالیز مولکولی که غربال گیاهان تراریخته احتمالی را مستقل از نوع ژن کاندیدِ منتقل شده فراهم آورد، انجام شد. بدین منظور آغازگرهای مختص سازه به گونه‌ای طراحی شدند که قسمتی از ژن نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین و خاتمه‌دهنده نوپالین سینتاز ژن *DRO1* را تکثیر کنند. این واکنش به صورت مولتی‌پلکس با ژن مرجع داخلی ژنوم برنج (RG100) بهینه‌سازی شد (شکل ۳). غلظت‌های مختلفی از آغازگرها برای بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه مورد استفاده قرار گرفت که بهترین نتایج زمانی حاصل شد که آغازگرهای hyg-F و nos-R هر یک به میزان ۲۰ پیکومول و آغازگرهای RG100 به میزان ۱/۵ پیکومول مورد استفاده قرار گرفتند و حجم نهایی واکنش ٤٠ میکرولیتر تنظیم شد. دمای اتصال بهینه آغازگرها ^{o}C ٦٠ بود.

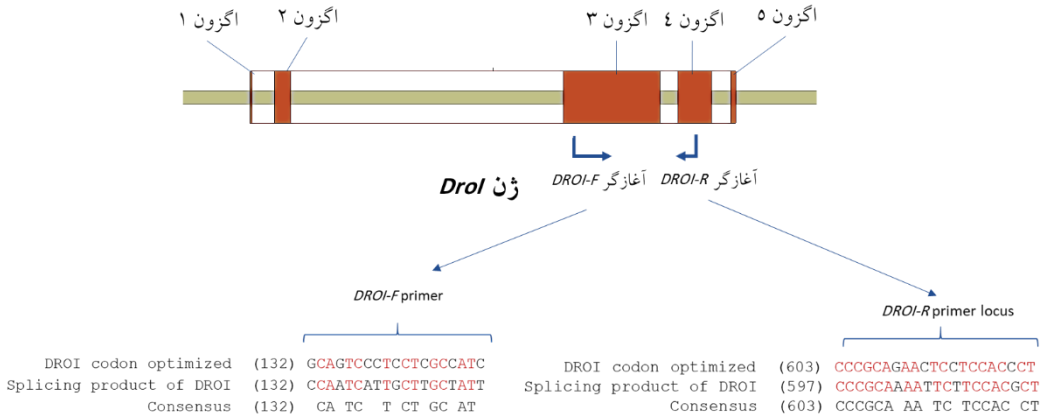
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه مختص ژن

به منظور طراحی آغازگرهای مناسبی که بتوان با استفاده از آنها بین تراژن و ژن مشابه داخلی تمایز قائل شد، آغازگرهای *DRO1* پس از هم ردیفی توالی بهینه‌سازی شده کدونی با توالی اسپیلایس شده اولیه طوری طراحی شدند که آغازگر dro-F ۹ نوکلئوتید متفاوت از ۱۹ نوکلئوتید تشکیل دهنده، داشته و پایانه ´۳ آن نیز با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی متفاوت باشد (شکل ٤).



شکل ۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با آغازگرهای مختص سازه hyg/nos و مرجع داخلی RG100 با الگوی دی.ان.ای استخراج شده از گیاه برنج باززاشده در محیط انتخابی پس از تراریختی. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای مختص سازه hyg-F و nos-F که باند مورد انتظار ۱٤۰۳bp در نمونه‌های باززاشده برنج تراریخته احتمالی حاصل از سازه سه ژنی (۱، ۲ و ۳) مشاهده شد. نمونه‌ها باند حدود ۹۵۰bp مربوط قطعه ژنوم برنج (RG100) را نیز نشان دادند.

Figure 3- Multiplex polymerase chain reaction using hyg/nos primers (construct specific) and RG100 (internal reference gene) for putative transgenic plants regenerated in selective medium. M, Molecular weight marker (1Kb Plus-Biofact company); P, plasmid DNA; R, reconstructed positive control of non-transgenic DNA with plasmid DNA (one copy per haploid genome); N, DNA from non-transgenic plant; W, water control (no DNA).

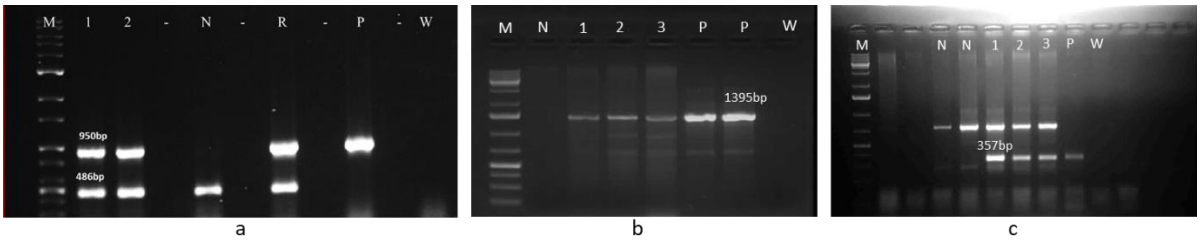


شکل ٤- نمای شماتیک ژن *DROI* شامل ٥ اگزون و محل طراحی آغازگرهای مختص تراژن از محل اگزون سوم و چهارم بهینه‌سازی شده کدونی به طوری که فاقد توانایی اتصال به ژنوم‌های رایج برنج باشد.

Figure 4- The Schematic representation of *DRO1* gene including 5 exons and representation the sites of designing transgene specific primers in exon 3 and 4 in codon optimized gene that not have anchor sites in native genome.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

آغازگر dro-R نیز در چهار نوکلئوتید با توالی موجود در بانک اطلاعاتی متفاوت انتخاب شد. ترکیب این جفت آغازگر مختص سازه در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با ژن مرجع داخلی RG100 با تغییر غلظت آغازگرهای مورد استفاده و دمای اتصال و سایر پارامترهای برنامه پی سی آر بهینه‌سازی شد. بهترین نتایج زمانی حاصل شد که آغازگرهای *DRO1* هر یک به میزان ۵ پیکومول و آغازگرهای RG100 به میزان ۱۰ پیکومول مورد استفاده قرار گرفتند. دمای اتصال بهینه آغازگرها ^{o}C ٦٥ بود (شکل ۵). همچنین واکنش زنجیره ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *OsNAC5* و *OsEXPA8* نیز حضور این ژن‌ها در گیاهان تراریخته نسبت به شاهد نشان داد.



شکل ۵– واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با آغازگرهای مختص تراژن‌ها و مرجع داخلی RG100. a– واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای مختص ژن dro-F و dro-R که باند مورد انتظار ٤٨٦bp را در نمونه‌های مورد آزمون (۱، ۲) نشان داد. نمونه‌ها باند حدود ۹۵۰bp مربوط قطعه ژنوم برنج (RG100) را نیز نشان دادند؛ b– واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای مختص ژن و سازه ubi-F و ex-R که باند مورد انتظار ۱۳۹۵bp را در نمونه‌های مورد آزمون (۱، ۲، ۳) نشان داد؛ c– واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای مختص ژن n5-F و n5-R که باند مورد انتظار ۳۵۷bp را در نمونه‌های مورد آزمون (۱، ۲، ۳) نشان داد.

Figure 5- Multiplex polymerase chain reaction using *DRO1* primers (gene specific) and RG100 (internal reference gene). M, Molecular weight marker (a:1Kb Plus-Biofact company; b,c: GeneRuler 1kb plus DNA ladder-Fermentas); N, DNA from non-transgenic plant; P, plasmid DNA; R, reconstructed positive control of non-transgenic DNA with plasmid DNA (one copy per haploid genome); W, water control (no DNA); 1,2,3, Putative transgenic plants.

تعیین تعداد نسخه های احتمالی انتقال یافته تراریخته ها با استفاده از تکنیک Real time-PCR

داده های حاصل از واکنش Real time-PCR یکی از گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد غیرتراریخته توسط برنامه SAS مورد آنالیز قرار گرفت که در جدول ۱ نشان داده شده است. بدین ترتیب کپی‌شمار قطعه NOS در برنج‌های تراریخته به طور تقریبی تعیین شد. قطعه NOS در سازه سه ژنی منحصر به فرد است و می‌تواند نشان‌دهنده یک کپی از ناحیه T-DNA باشد. در برنج تراریخته در مورد قطعه NOS، قسمتی که انتظار داشتیم فقط در لاین‌های تراریخته حضور داشته باشند، ΔCt (لگاریتم ۲ی نسبت بین تراژن و ژن مرجع داخلی) برابر با ۰/۲۱۵– به دست آمد که به معنای ۰/۸٦ برابر ژن مرجع می‌باشد. بر این اساس نتایج به طور تقریبی نشان‌دهنده حضور یک کپی از تراژن در گیاه تراریخته بود. نتایج در مورد تخمین کپی‌شمار گیاه برنج شاهد برای NOS به میزان ۰/۰۰۱۳ به دست آمد که همانطور که انتظار می رفت نزدیک صفر است (جدول ۲). تایید ثانویه تک نسخه بودن تراژن‌ها با استفاده از تعیین محل الحاق تراژن به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس انجام شد.

شناسایی محل الحاق تراژن‌ها در ژنوم برنج رخداد حاصل از سازه سه ژنی

باند حدود ٤۰۰ جفت بازی حاصل از واکنش پی‌سی‌آر معکوس یکی از رخدادهای برنج حاصل از انتقال سازه نوترکیب سه ژنی، ناحیه الحاق تراژن در ژنوم برنج را پس از آنالیزهای بیوانفورماتیک، در کروموزوم شماره ۱۰ نشان داد. محل الحاق تراژن در این رخداد، نوکلئوتید ۱٦،٤٤۳،۳۰۷ کروموزوم شماره ۱۰ برنج است و تا فاصله شش کیلوبازی در پایین دست و ۱۳

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

کیلوبازی در بالادست محل الحاق، ژنی گزارش نشده است. این آزمون الحاق تراژن‌ها به ژنوم برنج را اثبات کرد و برای طراحی پرایمرهای مختص رخداد از این نتیجه استفاده خواهد شد.

مقایسه فنوتیپ و ساختار ریشه گیاه تراریخته با گیاه شاهد هم سن در Root Box و در شرایط رشدی یکسان، نشان داد انتقال سه ژن *DRO1*، *OsEXPA8* و *OsNAC5* به طور قابل مشاهده‌ای توانسته است روی طول، قطر و تعداد ریشه‌های جانبی گیاه تراریخته تاثیر مثبت داشته باشد. همچنین ساقه قوی‌تری در گیاهان تراریخته مشاهده می‌شد. آنالیزهای دقیق‌تر، کمّی و با استفاده از نرم افزارهای آنالیز ریشه و در نسل‌های خالص مورد نیاز است که در مراحل بعدی انجام خواهد شد.

جدول ۲- تعیین کپی‌شمار ژن در یک رخداد تراریخته برنج حاصل از انتقال سازه pUhrN5ExDro و شاهد با آغازگرهای nos.

Table 2- Copy number determination of a putative transgenic rice after transformation of pUhrN5ExDro vector using nos primers.

Tested plant گیاه مورد آزمون	قسمت مورد بررسی	LgRt (T/C)	Copy Num	تعداد نسخه
Transgenic plant گیاه تراریخته	NOS	-0.215	0.861	1
Control plant گیاه شاهد	NOS	-9.515	0.0013	0

ستون ۳ لگاریتم ۲ی نسبت تبدیل شده تراژن به ژن مرجع را نشان می‌دهد. داده‌های این ستون مستقیماً از برنامه SAS حاصل شده‌اند. ستون ٤ تخمین عددی کپی‌شمار را نشان می‌دهد. کپی شمار محاسبه شده در ستون ٦ قرار دارد.

ایرانیان در تولید برنج تراریخته در دنیا پیشتاز بوده‌اند (Bennett *et al.*, 1997; Ghareyazie *et al.*, 1997). در این تحقیق سه ژن کاندید موثر در تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی به برنج رقم هاشمی منتقل شد. تاکنون انتقال همزمان چندین ژن کاندید ایجاد کننده صفات مختلف ریشه گزارش نشده است. انتظار بر این است حضور تراژن *OsNAC5* تحت پیشبر ریشه، در شرایط نرمال و به ویژه 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 *OSNAC5*، با افزایش قطر ریشه برنج، می‌تواند سبب افزایش مقاومت به خشکی و افزایش بازده محصول در مزرعه شود (Jeong *et al.*, 2013*b*). انتظار بر این است همزمان بیان ژن *OsEXPA8* نیز با کُد کردن پروتئین اکپنسین پیوندهای هیدروژنی متصل شده به سلولز و همی‌سلولز به خصوص گزیلوگلوکان را هدف قرار داده و باعث شل شدن دیواره سلولی و به دنبال آن لغزنده شدن پلیمرهای دیواره سلولی شده و در نتیجه گسترش رشد سلول و افزایش رشد را باعث شود (Bashline *et al.*, 2014; Fukuda, 2015). ژن *DRO1* نیز زاویه رشد ریشه را تغییر داده و ریشه‌ها به سمت عمق خاک رشد کنند (Kondo *et al.*, 2000; Uga *et al.*, 2013). 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). پیشبر مختص ریشه برای جلوگیری از اثرات ناخواسته بیان دائمی ژن *OsNAC5* بر محصول، مطلوب خواهد بود. تایید موارد مذکور نیاز به آزمایشات مزرعه‌ای و بررسی دقیق فنوتیپ ریشه در مقایسه با شاهد در آزمایشات تکمیلی و به ویژه بررسی تحمل به خشکی خواهند داشت.

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; Tohidfar and Mohsenpour, 2010; Raufi *et al.*, 2012; Dolatabadi *et al.*, 2014; Mohkami *et al.*, 2015). در تحقیق حاضر سه ژن مختلف در مدت زمانی کوتاه به گیاه برنج رقم هاشمی که از نظر عطر و طعم مورد پسند ایرانیان است منتقل شد. انتظار می‌رود

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

گیاهان تراریخته حاضر از نظر سایر صفات از جمله صفات مربوط به پخت مانند همتای غیرتراریخته خود باشند که پس از خالص‌سازی، آزمایش‌های اینهمانی و بررسی صفات کیفی بذر انجام خواهد شد. امید است پژوهش حاضر گام اولیه موثری جهت تولید گیاهان متحمل به خشکی و کاهش مصرف آب در کشاورزی کشور باشد.

تشکر و قدردانی

از خانم مهندس سمیه عبدی راد برای همکاری در بررسی منابع و انتخاب ژن‌ها، خانم مهندس فاطمه فرشاد برای انتقال تجربه استفاده از روش اسلامت لئودین و همکاران (۲۰۱٤) در انتقال ژن به برنج و پیشنهاد استفاده از ژن *DRO1*، از خانم دکتر مهرناز انتصاری برای انتقال تجربه روش انتقال ژن به برنج، از آقای مهندس سید محمد حسینی برای امور مربوط به گلخانه تراریخته و به ویژه از آقای مهندس سید محمد موسوی پاکزاد برای همکاری بی دریغ آزمایشگاهی سپاسگزاریم.

منابع

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

Arai-Sanoh Y, Takai T, Yoshinaga S, Nakano H, Kojima M, Sakakibara H, Kondo M, Uga Y. 2014. Deep rooting conferred by DEEPER ROOTING 1 enhances rice yield in paddy fields. Scientific reports **4**, 5563.

Araki H, Morita S, Tatsumi J, Iijima M. 2002. Physiol-morphological analysis on axile root growth in upland rice. Plant production science **5**, 286–293.

Ashraf A, Rehman OU, Muzammil S, Léon J, Naz AA, Rasool F, Ali GM, Zafar Y, Khan MR. 2019. Evolution of Deeper Rooting 1-like homoeologs in wheat entails the C-terminus mutations as well as gain and loss of auxin response elements. PloS one. **14**(4):e0214145.

Bashline L, Lei L, Li S, Gu Y. 2014. Cell wall, cytoskeleton, and cell expansion in higher plants. Molecular Plant **7**, 586–600.

Bennett J, Cohen MB, Katiyar SK, Ghareyazie B, Khush GS. 1997. Enhancing insect resistance in rice through biotechnology. Advances in insect control: the role of transgenic plants, 75–93.

Choi D, Cho H, Lee Y. 2006. Expansins: expanding importance in plant growth and development. Physiologia plantarum **126**, 511–518.

Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. Nature reviews molecular cell biology **6**, 850.

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. Journal of Plant Molecular Breeding **2**, 1–11.

Fukuda H. 2015. Plant cell wall patterning and cell shape. Wiley Online Library.

Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, De Palma JM, Liwanag EA, Cohen MB, Khush GS, Bennett J. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA(b) gene. Molecular Breeding **3**, 401–414.

Gowda VRP, Henry A, Yamauchi A, Shashidhar HE, Serraj R. 2011. Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. Field Crops Research **122**, 1–13.

Guseman JM, Webb K, Srinivasan C, Dardick C. 2017. DRO 1 influences root system architecture in Arabidopsis and Prunus species. The Plant Journal **89**, 1093–1105.

Jeong JS, Kim YS, Redillas MCFR, Jang G, Jung H, Bang SW, Choi Y Do, Ha S, Reuzeau C, Kim J. 2013*a*. OsNAC5 overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. **10**, 101–114.

Jeong JS, Kim YS, Redillas MCFR, Jang G, Jung H, Bang SW, Choi Y Do, Ha S, Reuzeau C, Kim J. 2013*b*. OsNAC5 overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. Plant Biotechnology Journal **11**, 101–114.

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 Science and Plant Nutrition **46**, 721–732.

Mohammadizadeh N, Tohidfar M, Mohsenpour M. 2010. Agrobacterium-Mediated Transformation of Wheat (Triticum Aestivum) Using Chitinase and Glucanase Genes (In Farsi with English abstract).

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. Journal of Cell and Molecular Research **7**, 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 (In Farsi with English abstract).

Mohsenpour M, Tohidfar M, Jelodar NB, Jouzani GS. 2015. Designing a new marker-free and tissue-specific platform for molecular farming applications. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology **24**.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

Nada RM, Abo-Hegazy SE, Budran EG, Abogadallah GM. 2019. The interaction of genes controlling root traits is required for the developmental acquisition of deep and thick root traits and improving root architecture in response to low water or nitrogen content in rice (Oryza sativa L.) cultivars. Plant Physiology and Biochemistry **141,**122-32.

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. Journal of Agricultural Biotechnology **3**, 27–46 (In Farsi with English abstract).

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

Slamet-Loedin IH, Chadha-Mohanty P, Torrizo L. 2014. Agrobacterium-mediated transformation: rice transformation. Cereal Genomics. Springer, 261–271.

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.

Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Duarte GL, Boff T, Lopes KL, Sperb ER, Grusak MA, Fett JP. 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.

Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K. 2010. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. Molecular Genetics and Genomics **284**, 173–183.

Tohidfar M, Mohsenpour M. 2010. Effective factors in cotton (*Gossipium* spp) transformation using Agrobacterium (In Farsi with English abstract).

Uga Y, Ebana K, Abe J, Morita S, Okuno K, Yano M. 2009. Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (Oryza sativa L.) with different genetic backgrounds. Breeding Science **59**, 87–93.

Uga Y, Kitomi Y, Yamamoto E, Kanno N, Kawai S, Mizubayashi T, Fukuoka S. 2015. A QTL for root growth angle on rice chromosome 7 is involved in the genetic pathway of DEEPER ROOTING 1. Rice **8**, 8.

Uga Y, Okuno K, Yano M. 2011. Dro1 , a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. **62**, 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. Nature Genetics, 1–9.

Wissuwa M, Kretzschmar T, Rose TJ. 2016. From promise to application: root traits for enhanced nutrient capture in rice breeding. Journal of Experimental Botany **67**, 3605–3615.

Yuan JS, Burris J, Stewart NR, Mentewab A, Stewart CN. 2007. Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. InBMC bioinformatics, BioMed Central, 8 (7): S6.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

Transformation of *DRO1, OsNAC5, OsEXPA8* genes in order to improve rice root architecture modification and improved drought tolerance in rice

Milad Zandi[1], Ramin Hosseini[1], Motahhareh Mohsenpour*[2], Ghasem Hosseini Salekdeh*[2] and Behzad Ghareyazie*[2]

1- M.Sc. student and Associate Professor, Imam Khomeini International University, Iran
2- Assistant Professor, Associate Professor and Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

Corresponding Authors Email: *mthrhm@yahoo.com, hsalekdeh@yahoo.com, ghareyazie@yahoo.com

Abstract

Root architecture modification can increase grain yield and seed quality. These can be achieved by better anchorage of the plant in soil, more effective use of water and nutrients, and through biosynthesis of amino acids and hormones. These will result in more effective use of nutrients and drought tolerance. Considering drought stress in Iran, production of drought tolerant plants is important. In this study three genes involved in modification of root length, number, thickness and growth angle were cloned into a construct for Agrobacterium-mediated transformation of rice plant. The genes, *OsEXPA8*, *OsNAC5*, and *DROI*, from native cultivars of rice were cloned under the control of constitutive and root specific promoters; afterwards, they were placed in T-DNA region of Agrobacterium-mediated transformation binary vector. The resulted construct, pUhrN5ExDro, was transferred into *Agrobacterium tumefactions* strain EHA105 and used for transformation of immature embryo of rice cultivar Hashemi. Selective medium containing 50 mgl^{-1} hygromycin B was used for selection of transgenic plants. Construct specific and gene specific PCR confirmed three putative transgenic lines and one copy of transgene were detected in one of them using Real time-PCR. Inverse PCR revealed that T-DNA was integrated in chromosome 10 of this rice event. Comparison of the phenotype and root structure of the transgenic plants with the control in the Root Box and in the same growth conditions showed that transgenic plants displayed stronger root phenotype compared with non-transgenic ones. The resulting multi-genic construct can be used for transformation of other crops in order to root structure modification and drought tolerance. It is hoped that the production of rice with modified root structure can increase drought tolerance in this important crop and reduce water consumption in rice cultivation.

Key words: Transgenic rice, Drought tolerance, multi-genic construct, Root architecture modification.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.5.1]