**مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی**
سال یازدهم، شماره دوم، پیاپی سی‌وششم، زمستان ۱۴۰۰ (۶۲-۴۹)

**Crop Biotech.**
Winter (2021) 11(2): 49-62. DOI: 10.30473/CB.2022.62378.1866

**«مقاله پژوهشی»**

# شناسایی و مطالعه ژن *DRO1* در برنج رقم هاشمی و انتقال همزمان آن با ژن *OsCKX4* به‌منظور مهندسی ریشه

**زهرا قربانزاده [۱]، مهربانو کاظمی‌الموتی [۲]، لیلا پورهنگ [۲]، سید محمد موسوی پاکزاد [۳]، الهه معتمد [۲]، مونا ماپار [۴]، علی اکبر عبادی [۵]، محمدرضا غفاری [۶]، قاسم حسینی سالکده [۷]، بهزاد قره‌یاضی [۷]، مطهره محسن‌پور [۶*]**

۱. دانشجوی دکتری، همکار طرح، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، کارشناس پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۳. دانش‌آموخته کارشناسی، کارشناس پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
٤. پژوهشگر پسادکتری، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۵. استادیار، مؤسسه تحقیقات برنج کشور (RRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
٦. استادیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۷. استاد، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۰۹/۲۹ – تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۲/۲۷)

# Identificatioan and investigation of *DRO1* gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with *OsCKX4* gene to improve root structure

**Zahra Ghorbanzadeh[1], Mehrbano Kazemi Alamouti[2], Leila Pourhang[2], Seyyed Mohammad Mousavi Pakzad[3], Elahe Moatamed[2], Mona Mapar[4], Aliakbar Ebadi[5], Mohammad Reza Ghaffari[6], Ghasem Hosseini Salekdeh[7], Behzad Ghareyazie[7], Motahhareh Mohsenpour[6*]**

1. Ph.D. Student, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
2. M.Sc., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
3. B.Sc, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
4. Postdoctoral Researcher, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
5. Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Rasht, Iran.
6. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
7. Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
(Received: Dec. 20, 2021 -Accepted: Mar. 18, 2022)

## چکیده

بهبود ساختار ریشه منجر به افزایش عملکرد دانه و کیفیت بالاتر بذر می‌شود و این امر از طریق بهبود رشد گیاه، استقرار بهتر در خاک، جذب بیشتر آب و تغذیه و بیوسنتز اسیدهای آمینه و هورمون‌ها حاصل شده و باعث افزایش کارایی استفاده از مواد مغذی و تحمل تنش در گیاه می‌شود. خشکسالی یک چالش جدی در کشور است و بنابراین تولید محصولات متحمل به خشکی دارای اهمیت خواهد بود. در این پژوهش حضور ژن *DRO1* (تغییر دهنده ساختار ریشه برنج) که در تغییر زاویه رشد ریشه نقش دارد در برنج رقم هاشمی بررسی و با توالی مشابه آن در برنج رقم Kinandang Patong مورد مقایسه قرار گرفت. سپس این ژن در کنار ژن *OsCKX4* (مؤثر در بهبود ساختار ریشه) قرار داده شد. ژن‌های *OsCKX4* و *DRO1* برگرفته از ارقام خودرو 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 pUhrCkDro 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 تایید و رخدادهای مستقل مشخص شدند. مقایسه فنوتیپ ریشه با گیاه شاهد تفاوت ظاهری در ساختار ریشه نشان داد. گیاهان تراریخته حاصل در گلخانه تراریخته پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی بذرگیری و در نسل‌های T1 و T2 تحت آزمون‌های مولکولی برای تشخیص رخدادهای خالص قرار گرفتند. با توجه به نتایج این پژوهش احتمالاً سازه چند ژنی حاصل می‌تواند با هدف تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی برای انتقال ژن به سایر گیاهان نیز مؤثر واقع شود. امید است تولید برنج تراریخته با ساختار ریشه قوی‌تر منجر به تحمل خشکی، کاهش مصرف آب و بهبود عملکرد در شرایط تنش خشکی شود.

**واژه‌های کلیدی:** انتقال چند ژنی، برنج تراریخته،، مهندسی معماری ریشه، *DRO1*، *CKX4*.

## Abstract

Improvement of the root architecture lead to higher grain yield and seed quality. This is achieved via improvement of the plant growth, better establishment in soil, higher absorption of water and nutrition resulting in the biosynthesis of the essential amino acids and hormones. It increases the efficiency of the nutrition usage and the stress tolerance. Drought conditions are a serious challenge in Iran; therefore, improving crop tolerance has a major importance. In this study, we investigate the presence of *DRO1* gene, which is involved in the modification of the root growth angle, in rice cultivar Hashemi and compared to the Kinandang Patong cultivar. We further analyze the simultaneous presence of *DRO1* and a second gene, *OsCKX4*, which is involved in the improvement of root structure. *DRO1* and *OsCKX4* are cloned together in a single construct under the control of the ubiquitin and the root specific promoters, respectively. The resulting construct, pUhrCkDro is transformed into the *Agrobacterium tumefactions* strain EHA105 and used for the gene transformation into Hashemi cultivar. Putative transgenic plants, survived on 50 mg. $L^{-i}$ 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. Transgenic plants show stronger root structure compared to the non-transgenic ones. Molecular analysis in the T1 and T2 generations leads to the homozygous events. The multi-genic construct used in this study, can be introduced into other crops for the aim of root structure improvement and drought tolerance. It is hoped that the production of transgenic rice with enhanced root structure results in improving drought tolerance, reducing water consumption and enhancing yield under drought stress conditions.

**Keywords:** *DRO1* gene, *CKX4* gene, Multi-gene transformation, Root architecture, Transgenic rice,

* نویسنده مسئول: مطهره محسن‌پور
E-mail: mthrhm@yahoo.com

## مقدمه

برنج از مهمترین غلات و اقلام غذایی جهان است. نیمی از جمعیت جهان، به برنج به‌عنوان یک غذای اصلی وابسته هستند. ریشه برنج سطحی و افشان بوده و حداکثر در عمق ۲۰ تا ۲۵ سانتی‌متری خاک نفوذ می‌کند و به‌دلیل داشتن ریشه سطحی مستعد تنش خشکی در میان غلات است. روش مرسوم کشت برنج در بسیاری از مناطق جهان از جمله ایران کشت نشایی است. افزایش دسترسی به مواد مغذی به‌عنوان مثال آهن، روی و فسفر و مهار علف‌های هرز از مزایای این روش است در حالی که تلفات زیاد آب، تبخیر سطحی، نفوذ عمقی آب، نیاز فراوان به نیروی انسانی و در نتیجه کاهش سود خالص از معایب این روش کشت است. این روش کشت علاوه بر کاهش نفوذپذیری خاک موجب از بین رفتن ساختمان خاک و بروز محدودیت‌های فراوان در کشت‌های پس از آن می‌شود. از آنجا که منابع آب‌های سطحی و زیرزمینی به‌دلیل گرمایش جهانی و تغییرات اقلیمی رو به کاهش هستند، تأمین آب مورد نیاز کشت به عامل محدود کننده تولید برنج تبدیل شده از این رو تغییر شیوه سنتی کشت، اهمیت بسیار بالایی دارد (Gowda *et al*., 2011; Hasanuzzaman *et al*., 2019). برنج به‌دلیل شرایط غرقابی بیشترین نیاز آبی را نسبت به سایر غلات، به خود اختصاص می‌دهد. تخمین زده شده است که کمبود آب بر بخش‌های عمده‌ای از مناطق تولید برنج در جهان تأثیر بگذارد (Lesk *et al*., 2016). معماری سیستم ریشه یک ویژگی مهم تکاملی و زراعی است که نقش مهمی در سازگاری و بهره‌وری گیاه در محیط‌هایی با محدودیت آب دارد. در سال‌های اخیر ویژگی‌های ریشه به‌عنوان صفات ثانویه‌ای مطرح شده است که می‌توان از آن در کنار عملکرد دانه در انتخاب ارقام برنج متحمل به تنش بهره برد (Singh *et al*., 2021). در مراحل بحرانی زایشی و پر شدن دانه خصوصیات هیدرولیکی مرتبط با ریشه می‌توانند موجب سازگاری گیاه به خشکی شوند. به‌دلیل اینکه آب و مواد غذایی به‌صورت ناهمگن در خاک پراکنده شده‌اند، آرایش سیستم ریشه‌ای، تعیین کننده توانایی گیاه در تأمین منابع مورد نیاز برای زنده ماندن است. بنابراین مطالعه آرایش و ساختار سیستم ریشه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Li *et al*., 2015).

در میان ژنوتیپ‌های مختلف برنج تنوع ژنتیکی وسیعی در خصوصیات مورفولوژیکی ریشه مثل قطر ریشه (Chang *et al*., 1986)، عمق نفوذ ریشه (Kato and Okami 2010)، نیروی کشش ریشه (Ekanayake *et al*., 1985)، نسبت عمق ریشه به بخش هوایی (Yoshida and Hasegawa 1982)، تعداد ریشه (Chang *et al*., 2008)، رشد (Price *et al*., 2002)، و قدرت نفوذ ریشه (Clark *et al*., 2008). گزارش شده است. به‌طور کلی آن دسته از ژنوتیپ‌های برنج که پرمحصول هستند و در سطح وسیعی کشت می‌شوند lowland بوده و آرایش ریشه‌ای سطحی دارند، ریشه‌های آنها فیبروسی نازک است و به‌دلیل سازگاری با شرایط غرقابی در مقایسه با سایر غلات، به کم آبی حساسیت بیشتری نشان می‌دهند. برخی دیگر از رقم‌های خودرو برنج upland هستند و برخلاف ارقام زراعی سیستم‌های ریشه‌ای وسیع، عمیق و کارآمدی دارند و نسبت به خشکی متحمل هستند اما محصول بی‌کیفیتی دارند مانند برنج‌های Kinandang Patong و Azucena. استفاده از ژن‌های درگیر در آرایش سیستم ریشه‌ای از این ارقام می‌تواند در اصلاح ژنتیکی ارقام زراعی برنج مؤثر باشد. ژنوتیپ‌های برنج با ریشه‌های بلند، ضخیم، منشعب و عمیق در شرایط خشکی تحمل بیشتری دارند (Zhang *et al*., 2009). 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. تحقیقات گسترده‌ای در چند دهه گذشته برای شناسایی و اعتبارسنجی miRNAها و کاهش اثرات تنش توسط آنها انجام گرفته است ولی در استفاده از miRNAها هنوز نکات مبهم بسیاری وجود دارد (Ghorbanzadeh and Ghafari 2019). در سال‌های اخیر ژن‌های موثری در ارتباط با تحمل به خشکی و تغییر ساختار ریشه در دنیا شناسایی و معرفی شده است که یکی از آنها ژن *DRO1* (*DEEPER ROOTING1*) است که سبب رشد عمیق ریشه‌ها شده (Uga *et al*., 2013) و با تغییر زاویه رشد ریشه تحمل به خشکی در گیاه برنج را افزایش می‌دهد (Kondo *et al*., 2000). بیان این ژن در رقم IR64 سبب تغییر زاویه‌ی رشد ریشه از حالت سطحی به عمیق می‌شود (Uga et al., 2015). غیرفعال‌شدن ژن *AtDRO1* در آرابیدوپسیس، در اثر جهش، منجر به تغییر زاویه‌ی ریشه‌های جانبی از حالت عمودی به افقی می‌شود (Guseman *et al*., 2017). ژن *DRO1* رابطه‌ای عکس با اکسین دارد، به‌طوری‌که اگر برای نوک ریشه دو ناحیه زیرین و بالایی در نظر گرفته شود، اکسین در ناحیه زیرین نوک ریشه تجمع می‌یابد این تجمع اکسین به‌دلیل رابطه عکس با بیان ژن *DRO1* سبب کاهش بیان این ژن در ناحیه زیرین نوک ریشه می‌شود. از طرفی در ناحیه بالایی نوک ریشه میزان اکسین کم است و در نتیجه بیان ژن *DRO1* در این ناحیه بیشتر است. این مساله منجر به تفاوت میزان رشد سلول‌ها در این دو ناحیه شده و رشد عمودی‌تر ریشه نسبت به سطح خاک و پاسخ به جاذبه زمین را افزایش می‌دهد (Araki *et al*., 2002). ژن *DRO1* در شرایط خشکی نقش مهمی در دسترسی ریشه‌های عمیق به لایه‌های زیرین و عمقی خاک داشته و سبب اجتناب از خشکی و حفظ عملکرد بالا در مقایسه با رقم شاهد می‌شود (Uga *et al*., 2011). Uga و همکاران (۲۰۱۵)، ژن *DRO1* از رقم مقاوم به خشکی Kinandang Patong (KP) را به IR64 انتقال داده و نشان دادند که در شرایط تنش خشکی لاین تراریخته‌ی مذکور حدود ۳۰ درصد عملکرد بالاتری را نسبت به رقم اولیه‌ی شاهد دارد. این در حالی است که میزان توده زیستی و طول ریشه تفاوت چندانی نشان نداد. ژن *DRO1* همچنین در افزایش جذب نیتروژن نقش داشته و با تنظیم جریان سیتوکینین، منجر به افزایش میزان دانه‌های پر شده می‌شود (Arai-Sanoh *et al*., 2014). سیستم ریشه‌ای برنج اغلب شامل ریشه‌های گره‌ای است که نقش مهمی را در رشد و نمو برنج برعهده دارند. مکانیسم مولکولی تشکیل ریشه‌های گره‌ای ناشناخته است. بررسی یک موتانت غالب برنج (*root enhancer1*, *ren1-D*) افزایش سیستم ریشه، افزایش تعداد ریشه‌های گره‌ای و کاهش ارتفاع گیاه را نشان داد (Gao *et al*., 2014). آزمون‌های ژنتیکی و مولکولی نشان داد که فعال شدن ژنی به نام *OsCKX4* که از خانواده سیتوکنین اکسیداز/دِهیدروژناز است باعث افزایش سیستم ریشه و افزایش تعداد ریشه‌های گره‌ای شده است. بررسی‌های بیشتر نشان دادند این ژن نقش مهمی در تشکیل ریشه‌های گره‌ای ایفا می‌کند. گائو و همکاران با گزارشی در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که *OsCKX4* در تغییر آرایش ریشه بسیار قدرتمند است و در بنیان‌گذاری ریشه‌های گره‌ای در برنج نقش ایفا می‌کند. بیان بالای این ژن با پیشبر اختصاصی در ریشه باعث افزایش طول، تعداد و وزن خشک ریشه‌های گره‌ای در رقم Zhonghua 11 شد (Gao *et al*., 2014).

از آنجا که تنش خشکی رشد و نمو گیاه زراعی را محدود و در نهایت منجر به کاهش شدید عملکرد می‌شود (Michaletti *et al*., 2018)، بنابراین به نظر می‌رسد شناسایی یا تولید ژنوتیپ‌های متحمل به

کمبود آب با عملکرد بالا و استفاده از آنها در مناطق مواجه با تنش، خسارت کمبود آب را به حداقل رسانده و پایداری تولید برنج را باعث شود. با در نظر گرفتن مسائل مطرح شده، به نظر می‌رسد به‌نژادی برنج برای افزایش تحمل به خشکی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک به‌منظور تولید ارقام متحمل به خشکی راهگشا باشد. هدف از این تحقیق انتقال ژن‌های *DRO1* و *OsCDKX4* به گیاه برنج بوده است تا در آینده بتوان به گیاهانی دست یافت که با ساختار ریشه قوی‌تر تحمل مناسبی در برابر شرایط کم‌آبی داشته باشند.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در این مطالعه که در سال‌های ۱۳۹۵-۱۴۰۰ در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شد، از برنج رقم هاشمی برای انتقال ژن استفاده شد. رقم هاشمی یک رقم برنج معطر است که ضمن داشتن عملکرد مناسب، دارای کیفیت مطلوب پخت و بازار پسندی بسیار زیاد است. بذور مورد نیاز از مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت تأمین شد.

### بررسی وجود و تفاوت توالی ژن *DRO1* در برنج رقم هاشمی

به‌منظور بررسی حضور و تفاوت‌های احتمالی ژن *DRO1* در برنج زراعی رقم هاشمی، آغازگرهای از نواحی حفاظت شده این ژن طراحی (جدول ۱، dro-1 و dro-2) و پس از استخراج DNA، قسمتی از توالی این ژن در هر دو رقم برنج هاشمی و Kinandang Patong با استفاده از پرایمرهای مذکور تکثیر شد. قطعات حاصل پس از همسانه‌سازی در حامل pTZ57R/T با استفاده از آغازگرهای عمومی حامل (آغازگرهای M13) توالی‌یابی و نتایج تعیین توالی پس از آنالیزهای بیوانفورماتیک برای تعیین محل اگزون‌ها و اینترون‌ها و ترجمه به اسیدآمینه با توالی رقم Kinandang Patong هم‌ریف و تفسیر شد.

### ساخت سازه چند ژنی حاوی ژن‌های *OsCKX4* و *DRO1*

طراحی سازه با استفاده از نرم افزار Vector NTI (Invitrogen) انجام شد. واکنش اتصال ابتدا در حامل‌های همسانه‌سازی تحت پیش‌بر اختصاصی ریشه RCc3 برای ژن *OsCKX4* و پیشبر یوبی‌کوئیتین در مورد ژن *DRO1* انجام و سپس در ناحیه T-DNA حامل دوگانه مختص انتقال ژن با واسطه اگروباکتریوم حاوی ژن نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین منتقل شدند. مخلوط اتصال به سلول‌های مستعد حاصل از *E. coli* سویه XLI-Blue منتقل شد و روی محیط انتخابی LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسپکتینومایسین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استرپتومایسین رشد داده شد. تایید همسانه‌سازی 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 Sambrook و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد (Sambrook *et al*., 1989). پلاسمید نوترکیب حاصل pUhrCKDro نامگذاری و به روش An و همکاران (۱۹۸۶) به اگروباکتریوم سویه EHA105 منتقل شد (An et al., 1986). جزئیات مراحل ساخت سازه مشابه گزارش‌های قبلی (Chamani Mohasses *et al*., 2017; Zandi *et al*., 2019; Kazemi alamouti *et al*., 2022) انجام شده است.

### انتقال ژن

ضدعفونی بذرهای رسیده رقم هاشمی، مراحل القای کالوس و تکثیر آن، تلقیح با اگروباکتریوم، هم‌کشتی و مراحل باززایی بر پایه گزارش قبلی ( Kazemi

alamouti *et al*., 2022) انجام شد که برگرفته از روش Ozawa و همکاران (۲۰۱۲) بود. به‌طور خلاصه اگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pUhrCKDro پس از رشد روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و اسپکتینومایسین (به‌ترتیب ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر) و تایید با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری از محلول ذخیره 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 محیط مایع R-N6AS یا (Ozawa R-DKNAS (2012 در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری سوسپانسیون شد وOD600nm روی ۰/۳ تنظیم شد. به‌منظور تلقیح با اگروباکتریوم، کالوس‌ها به‌طور مستقیم در کشت سوسپانسیون اگروباکتریوم به‌مدت ۲ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از تلقیح، کالوس‌ها بین دو کاغذ فیلتر استریل قرار داده شدند و در پتری‌دیش حاوی محیط مایع R-N6AS یاR-DKNAS قرار گرفتند و به‌مدت سه روز در ۲۵ درجه و تاریکی انکوبه شدند. پس از ۳ روز هم‌کشتی کالوس‌ها یکبار در آب استریل حاوی سفوتاکسیم شستشو داده شدند تا اگروباکتریوم حذف شود و روی کاغذ صافی قرار گرفتند. سپس کالوس‌ها به محیط R-N6Se1 یا R-DKNSe1 (Ozawa, 2012) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و نور مداوم منتقل شدند و هر ده روز واکشت انجام گرفت. پس از دو دوره انتخاب به‌تدریج کالوس‌های مقاوم به هیگرومایسین در حال رشد و قابل تشخیص بودند، 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 منتقل شده و در نهایت پس از ریشه‌زایی انتقال به محیط یوشیدا (Yoshida et al., 1976) و گلدان انجام گرفت.

**آنالیزهای مولکولی**

گیاهچه‌های تراریخته‌ی احتمالی که در محیط انتخابی حاوی هیگرومایسین زنده مانده و رشد کردند با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آغازگرهای اختصاصی تراژن و مختص سازه و همچنین ناحیه‌ای از ژنوم برنج (RG100) به‌عنوان کنترل داخلی آنالیز شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای اثبات حضور ژن‌های *OsCKX4* و *DRO1* انجام شد. توالی آغازگرها و اندازه قطعه تکثیری مورد انتظار در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در تایید مولکولی گیاهان تراریخته حاصل از انتقال سازه نوترکیب pUhrCkDro و اندازه قطعه تکثیری مورد انتظار.

| نام آغازگر | توالی آغازگر | نوع آغازگر | اندازه قطعه تکثیری (جفت باز) |
|---|---|---|---|
| dro-F | GCAGTCCCTCCTCGCCATC | رو به جلو | ۴۸۶ |
| dro-R | AGGGTGGAGGAGTTCTGCGG | رو به عقب | |
| dro-1 | GGCAGAATATGGGAAGTAGG | رو به جلو | |
| dro-2 | GAGCTCTTCTCGCACCTATG | رو به عقب | |
| RCc(ck)-F | GATGGCAGGGCAGGGTT | رو به جلو | ۴۹۴ |
| Ck(RCc)-R | ACGGTGAGCGGCGAACT | رو به عقب | |
| RG100-F | GCTGGACGTGCCAAAGAGAG | رو به جلو | ۹۵۲ |
| RG100-R | CGAACCACAGCCACAGCATG | رو به عقب | |

**آنالیز فنوتیپی اولیه**

به‌منظور مشاهده ساختار ریشه و مقایسه ظاهری با گیاه شاهد، گیاهان تراریخته نسل T0 در کنار گیاه شاهد غیر تراریخته هم سن در هنگام انتقال از محلول یوشیدا به خاک گلدان (قبل از انتقال به خاک) عکسبرداری شدند.

## نتایج و بحث

**ساخت سازه حاوی ژن‌های *DRO1* و *OsCKX4***

کاست ژنی *OsCKX4*، تحت پیش‌بر *RCc3* و پایان‌بر *Tahsp17* (از منشأ گندم)، در کنار کاست ژنی *DRO1* تحت پیش بر یوبی‌کوئیتین و پایانبر *NOS* در ناحیه‌ی T-DNAی باینری وکتور قرار گرفت. بهینه‌سازی کدونی بر اساس نتایج قبلی (Chamani Mohasses *et al.*, 2020) انجام شده بود. صحت سازه نوترکیب حاصل با استفاده از هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تایید شد. در سازه چند ژنی حاصل، موسوم به pUhrCkDro کاست‌های ژنی مذکور در خلاف جهت کاست ژنی مقاومت به هیگرومایسین قرار داده شده‌اند (شکل ۱). با توجه به نتایج این پژوهش احتمالاً سازه چند ژنی حاصل می‌تواند با هدف تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی برای انتقال ژن به سایر گیاهان نیز مؤثر واقع شود.

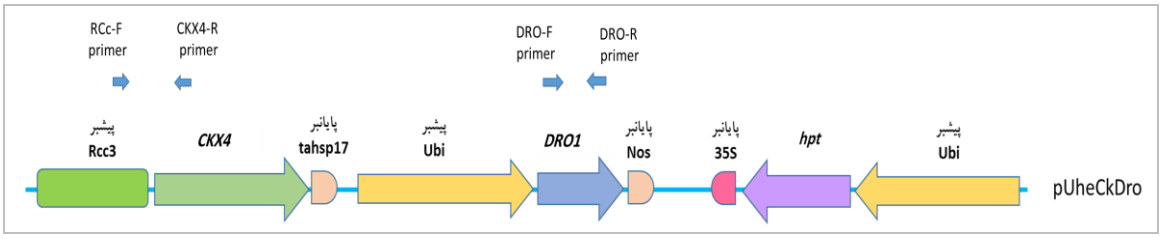
**تولید گیاهچه‌های تراریخته‌ی احتمالی**

کالوس‌های تراریخته احتمالی در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر هیگرومایسین رشد کرده و زنده ماندند؛ این در حالی است که، کالوس‌های شاهد همگی از بین رفتند. به‌تدریج روند سبز شدن و باززایی کالوس‌های جنین‌زا آغاز شده و تولید گیاهچه کردند و ریشه‌زایی با موفقیت انجام شد. زنده ماندن گیاهچه‌ها در تمامی مراحل رشد روی محیط کشت حاوی هیگرومایسین، تراریختگی آنها را به‌صورت اولیه نشان داد. انتقال گیاهچه‌های باززا شده به محلول یوشیدا سبب سازگاری آنها شده و انتقال به خاک با موفقیت انجام شد به‌طوری‌که گیاهان مهندسی شده حاصل توانستند در گلخانه تراریخته پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به مرحله باردهی برسند. ریشه‌ی گیاهان تراریخته احتمالی تفاوت ظاهری قابل ملاحظه‌ای نسبت به گیاهان شاهد غیر تراریخته هم سن و حاصل از مراحل کشت بافت نشان دادند (شکل ۲).

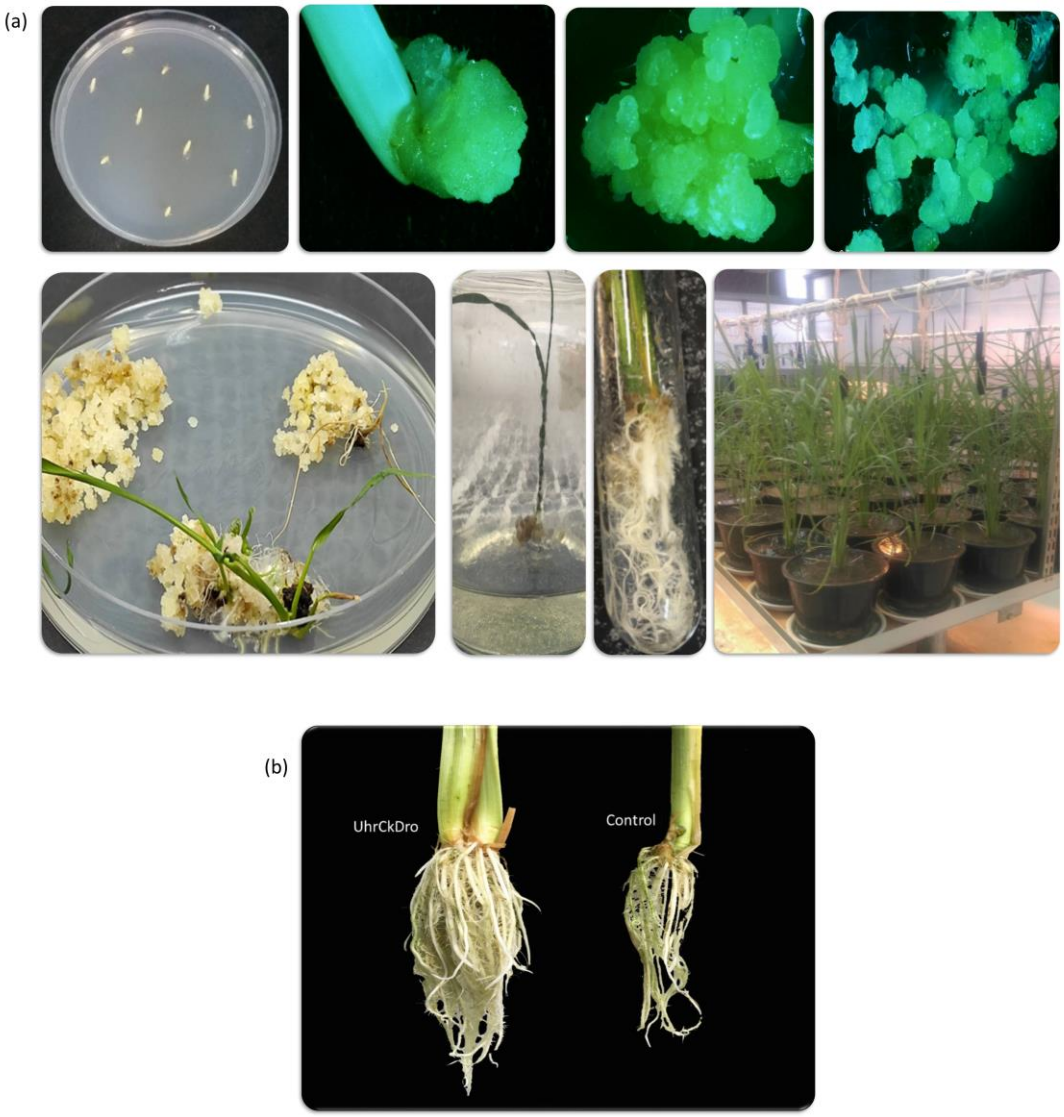
**تایید حضور ژن‌های انتقال یافته در گیاهان تراریخته**

آغازگرهای طراحی شده برای ژن *DRO1* به‌دلیل طراحی از نواحی دارای تفاوت با ژن داخلی که در اثر بهینه‌سازی کدونی ایجاد شده بود بخوبی توانستند در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بین تراژن و ژن مشابه داخلی تمایز قائل شوند، به‌طوری‌که در گیاه شاهد قادر به تکثیر نبودند. جزئیات طراحی قبلاً گزارش شده است (Zandi *et al.*, 2019). انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه به همراه ژن مرجع داخلی *RG100* برای آنالیز نسل T0، T1 و T2 رخدادهای حاصل توانست باند ۴۸۶bp مربوط به حضور تراژن *DRO1* و باند ۹۵۲bp مربوط به ژن کنترل داخلی را به‌صورت همزمان در نمونه‌های تراریخته نشان دهد (شکل ۳-d, e). نمونه‌هایی که باند مورد نظر برای هر دو ژن انتقال یافته و همچنین ژن مرجع داخلی را نشان دادند از نظر تراریختگی تایید شدند. همچنین حضور ژن *OsCKX4* با آغازگرهای که به‌صورت مختص سازه طراحی شده بودند مورد تایید قرار گرفت، به‌طوری‌که آغازگر رو به جلو در ناحیه پیش‌بر و آغازگر رو به عقب در ناحیه کد کننده این ژن متصل می‌شد و بدین ترتیب حضور هر دو ژن در گیاهان تراریخته حاصل مورد تایید قرار گرفت. در شکل ۲ نشان داده شده است که در نمونه‌های شماره ۴۰۰، ۴۰۱، ۴۰۲، ۴۰۳، ۴۰۴، ۴۰۵، ۴۰۸، ۴۰۹، ۴۱۳، ۴۱۴ و ۴۱۵ حضور هر دو ژن به اثبات رسیده است. نمونه شماره ۴۱۱ تنها حضور ژن *DRO1* را نشان داد و حضور *CKX4* در آن تایید نشد و سایر نمونه‌ها نیز منفی در نظر گرفته شدند.

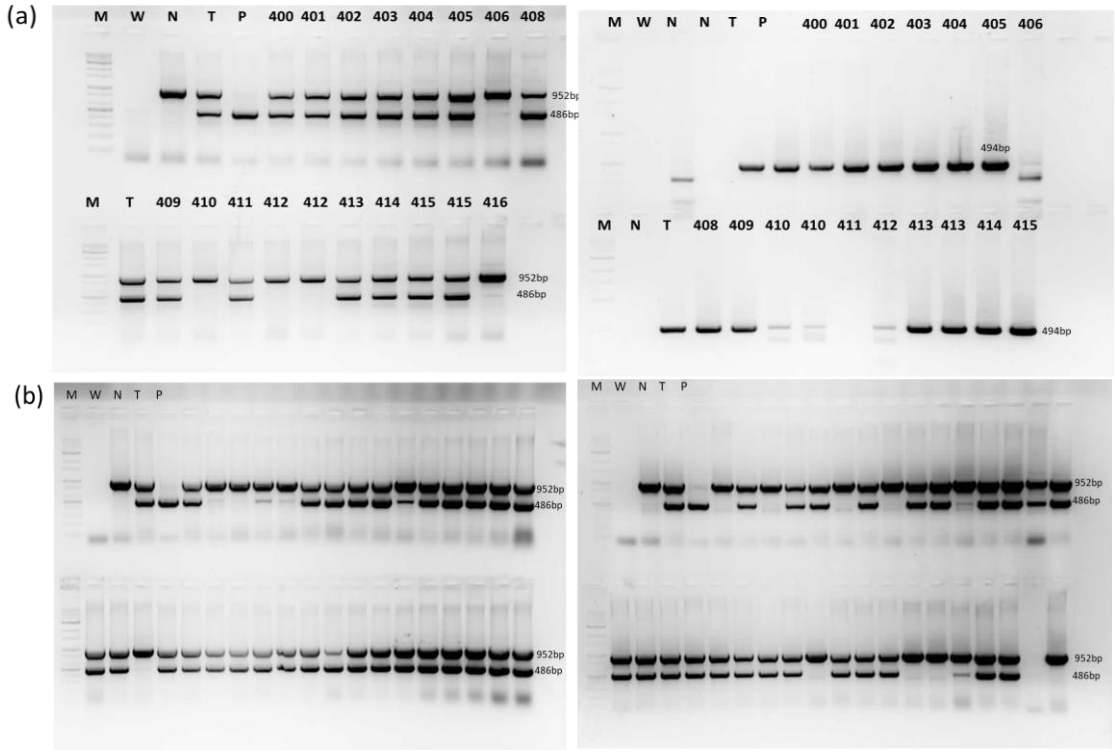
همچنین تفکیک رخدادها و تعیین محل الحاق تراژن در ژنوم برنج با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس انجام و محل الحاق ترا ژن تعیین شد (نتایج در دست چاپ).




شکل ۱. نمای شماتیک ناحیه T-DNAی سازه نوترکیب pUhrCkDro و محل اتصال آغازگرهای طراحی شده در این تحقیق.




شکل ۲. مراحل انتقال ژن‌های *DRO1* و *OsCKX4*. (a) مراحل استقرار بذر رسیده در محیط کشت، تهیه کالوس، تلقیح با سازه نوترکیب، باززایی روی محیط انتخابی، ریشه‌زایی و انتقال به گلخانه مخصوص گیاهان تراریخته؛ (b) فنوتیپ ظاهری ریشه یکی از رخدادهای نسل T0 قبل از انتقال به گلدان در کنار گیاه شاهد.




شکل ۳. تایید مولکولی انتقال ژن‌های *DRO1* و *OsCKX4* در برنج رقم هاشمی. (a) سمت چپ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با آغازگرهای مختص تراژن *DRO1* (باند مورد انتظار: bp ۴۸۶) و مرجع داخلیRG100 (باند مورد انتظار bp ۹۵۲) و سمت راست با استفاده از آغازگرهای مختص سازه برای تایید حضور ژن *CKX4* (باند مورد انتظار bp ۴۹۴) (در نمونه‌های شماره ۴۰۰، ۴۰۱، ۴۰۲، ۴۰۳، ۴۰۴، ۴۰۵، ۴۰۸، ۴۰۹، ۴۱۳، ۴۱۴ و ۴۱۵ حضور هر دو ژن به اثبات رسید. نمونه شماره ۴۱۱ تنها حضور ژن *DRO1* را نشان داد و حضور *CKX4* در آن تایید نشد و سایر نمونه‌ها نیز منفی در نظر گرفته شدند)؛ (b) نمونه‌ای از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با آغازگرهای مختص تراژن *DRO1* و مرجع داخلی RG 100در نسل T2 برای رسیدن به خلوص.

M، نشانگر اندازه وزن ملکولی (1Kb Plus-Biofact company)؛ P، پلاسمید pUhrCkDro (کنترل مثبت)؛ T، گیاه تراریخته (حاوی ژن منفرد به‌دست آمده از پروژه) به‌عنوان کنترل مثبت؛ N، گیاه شاهد غیر تراریخته به‌عنوان کنترل منفی؛ W، کنترل بدون الگو (آب)؛ سایر چاهک‌ها گیاهان نمونه گیاهان تراریخته نسل T2.

مقایسه ساختار ریشه گیاه تراریخته با گیاه شاهد هم سن پس از مرحله یوشیدا و پیش از انتقال به گلدان نشان داد انتقال ژن‌های *DRO1* و *OsCKX4* حجم ریشه گیاهان مورد بررسی را به‌صورت ظاهری تغییر داده است (شکل ۲-b) که نیاز به آنالیزهای دقیق‌تر دارد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آنالیز نسل‌های در حال تفکیک T1 و T2 رخدادهای تراریخته حاصل انجام و نتایج تعدادی از آنها در جدول ۲ خلاصه شده است. خالص‌سازی رخدادهای حاصل در حال انجام است. تراریختگی هفت رخداد مستقل برای سازه‌ی نوترکیب pUhrCkDro تایید شد که برخی از آنها دارای تکرار در مراحل کشت بافتی بودند. تکرارهای کشت بافتی که از یک قسمت کالوس با چندین گیاه باززا شده ایجاد شده بودند پس از آنالیز مولکولی همگی به‌عنوان یک رخداد واحد دسته بندی شدند. از هر رخداد، ۱۰ تا 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. چنانچه همه‌ی گیاهان

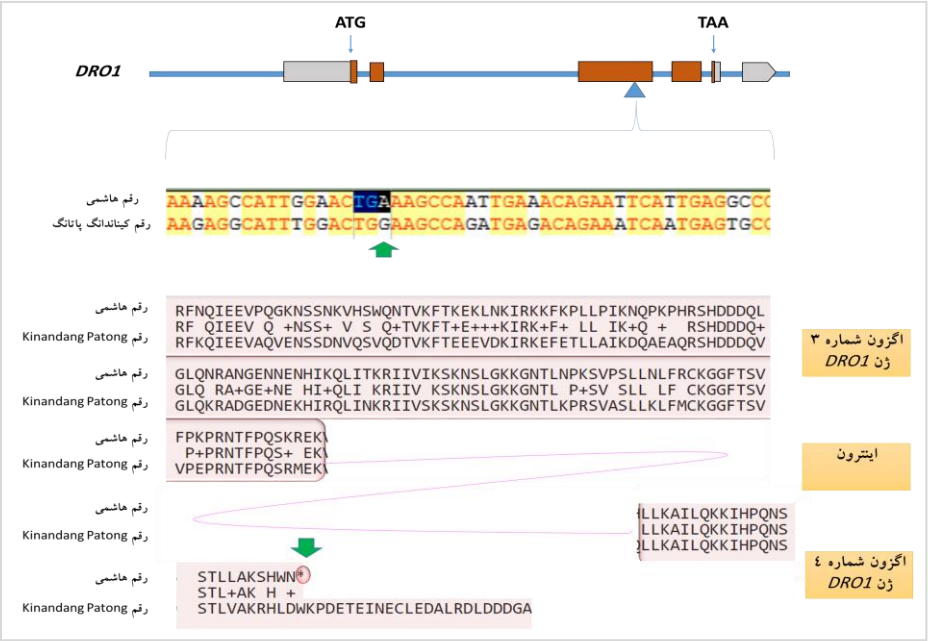
آنالیز شده در نسل T2 مثبت باشند، آن رخداد به‌عنوان خالص اولیه معرفی می‌شود. در صورت مشاهده ترکیبی از گیاهان مثبت و منفی در این نسل، آن گیاه ناخالص بوده و برای رسیدن به خلوص در این نسل (T2) نیاز به کشت بذور سایر گیاهان مثبت نسل T1 و آنالیز آنها در نسل T2 خواهد بود. روند خالص‌سازی برای رخدادهایی که به خلوص نرسیده‌اند ادامه خواهد داشت. تایید بیشتر خلوص نیز به آنالیز با تعداد بیشتر در نسل T3 نیاز خواهد داشت.

## بررسی وجود و تفاوت توالی ژن *DRO1* در برنج رقم هاشمی

بر پایه گزارش Uga و همکاران (۲۰۱۳) ژن *DRO1* برنج رقم Kinandang Patong با برنج رقم IR64 در حذف یک نوکلئوتید در اگزون چهارم اختلاف دارند. در پژوهش حاضر به‌منظور تشخیص این تفاوت در برنج رقم هاشمی، محدوده اگزون سوم و چهارم برنج هاشمی و Kinandang Patong پس از تکثیر توالی‌یابی و مقایسه شدند. نتایج نشان داد در برنج رقم هاشمی بر خلاف رقم IR64 حذف نوکلئوتید اتفاق نیفتاده بلکه تبدیل یک نوکلئوتید A به G در اگزون چهارم سبب ایجاد کدون پایان شده است (شکل ۴). همچنین در اگزون سوم و چهارم اختلاف‌های نوکلئوتیدی متعدد دیگری نیز مشاهده شد که برخی از آنها با تغییر اسیدآمینه همراه بودند (شکل ۴).

جدول ۲. رخدادهای احتمالی حاصل از سازه نوترکیب pUhrCKDro.

| خلوص احتمالی | نسل | تعداد باززاشده | کد اولیه | رخداد احتمالی |
|---|---|---|---|---|
| خالص | بذر T2 | 2 | C-1 | رخداد ۱ |
| ناخالص | بذر T2 | 1 | C-4 | رخداد ۲ |
| ناخالص | بذر T2 | 2 | C-6 | رخداد ۳ |
| ناخالص | بذر T2 | 10 | C-7 | رخداد ۴ |
| ناخالص | بذر T1 | 4 | C-9 | رخداد ۵ |
| ناخالص | بذر T2 | 10 | C-10 | رخداد ۶ |
| ناخالص | بذر T2 | 15 | C-12 | رخداد ۷ |




شکل ۴. تعیین تفاوت ژن *DRO1* در برنج رقم هاشمی و Kinandang Patong. جایگزینی نوکلئوتید A در رقم هاشمی با G در رقم Kinandang Patong باعث ایجاد کدون پایان شده است. افزون بر این اختلاف توالی اسیدآمینه نیز در اگزون‌های شماره ۳ و ۴ این ژن بین دو رقم قابل مشاهده است.

محل ایجاد کدون پایان در شکل ۴ با فلش نشان داده شده است. این بررسی نشان داد که ژن *DRO1* در رقم زراعی و پرطرفدار هاشمی، طی مراحل اصلاحی به‌دلیل تغییرات توالی و ایجاد کدون پایان زودهنگام فعالیت خود را از دست داده است. این ژن که بر اساس گزارش‌های Uga و همکاران (۲۰۱۱، ۲۰۱۳ و ۲۰۱۵) و نیز Kondo و همکاران (۲۰۰۰) سبب رشد عمیق ریشه‌ها شده و تحمل به خشکی را در گیاه برنج با تغییر زاویه رشد ریشه افزایش می‌دهد، در شرایط خشکی نقش مناسبی در دسترسی ریشه‌های عمیق به لایه‌های زیرین خاک داشته و اجتناب از خشکی و حفظ عملکرد بالا در مقایسه با رقم شاهد را سبب می‌شود. بنابراین احیای عملکرد مجدد این ژن با انتقال به ارقام زراعی به بهبود ساختار ریشه و تحمل آنها در شرایط خشکی کمک خواهد کرد. این موضوع در سال ۲۰۱۵ توسط Uga و همکاران با انتقال ژن *DRO1* از رقم Kinandang Patong به رقم IR64 نشان داده شده است به‌طوری‌که لاین حاصل حدود ۳۰ درصد عملکرد بالاتری را در شرایط تنش خشکی نسبت به رقم اولیه‌ی شاهد نشان داد. در پژوهش حاضر، این ژن (*DRO1*) در کنار ژن *OsCKX4* به برنج رقم هاشمی منتقل شده است. تاکنون انتقال همزمان این دو ژن به برنج و یا سایر گیاهان گزارش نشده است. اهمیت ژن *OsCKX4* در تشکیل ریشه‌های گره‌ای و افزایش طول، تعداد و وزن خشک ریشه‌ها توسط Gao و همکاران (۲۰۱۴) اثبات شده بود. بیان این ژن در تحقیق حاضر نیز تحت پیش‌بر مختص ریشه برای جلوگیری از اثرات ناخواسته بیان دائمی ژن *OsCKX4* بر محصول، مطلوب خواهد بود. تایید میزان تأثیر انتقال این ژن‌ها بر بهبود ساختار ریشه نیاز به آزمایش‌های مزرعه‌ای و بررسی دقیق فنوتیپ ریشه در مقایسه با شاهد در آزمایش‌های تکمیلی و به‌ویژه بررسی تحمل به خشکی خواهد داشت. تولید و استفاده از سازه‌های چند ژنی برای ایجاد گیاهان تراریخته در مراحل آزمایشگاهی در گیاهانی چون برنج، توتون، پنبه، گوجه‌فرنگی، گندم، سویا و جلبک در ایران انجام شده است (Mohsenpour *et al*., 2008, 2015; Mohammadizadeh *et al*., 2010; Raufi *et al*., 2012; Mohsenpour and Tohidfar 2011; Dolatabadi *et al*., 2014; Mohkami *et al*., 2015; Saboori-Robat et al., 2019). ایرانیان در تولید برنج تراریخته پیشتاز بوده‌اند (Bennett et al. 1997; Ghareyazie *et al*., 1997). همچنین) انتقال ژن *DRO1* در کنار ژن‌های *OsNAC5* و *OsEXPA8* (Zandi *et al*., 2019) و نیز در کنار ژن *PSTOL1* (Kazemi alamouti *et al*., 2022) برای بهبود ساختار ریشه، تحمل به خشکی و بهبود جذب عناصر غذایی گیاه برنج در کشور تا مرحله گلخانه‌ای انجام شده است.

در گزارش‌های قبلی سه ژن کاندید مؤثر در تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی به برنج رقم هاشمی منتقل شده بودند (Zandi *et al*., 2019) که تراژن *OsNAC5* تحت پیش‌بر ریشه که یک تنظیم‌کننده رونویسی است مورد استفاده قرار گرفت، به‌طوری‌که این ژن با افزایش در طول و قطر ریشه‌ها در افزایش تحمل به خشکی و افزایش بازده محصول در مزرعه مؤثر باشد (Jeong *et al*., 2013). بیان همزمان این ژن با ژن *DRO1* به‌منظور رشد ریشه‌ها به سمت عمق خاک و نیز ژن *OsEXPA8* که سبب گسترش رشد سلول شده و افزایش طول و رشد را باعث شود (Bashline *et al*., 2014; Fukuda 2015). در گزارش مذکور برای تغییر ساختار ریشه در نظر گرفته شده بود. همچنین در تحقیق دیگری (Kazemi alamouti *et al*., 2022) ژن‌های *OsPSTOL1* و *DRO1* به‌عنوان ژن‌های کاندید مؤثر در تغییر ساختار ریشه و تحمل به خشکی تحت نواحی تنظیمی جداگانه به‌صورت همزمان به برنج منتقل شدند که افزایش کارایی جذب فسفر و افزایش عملکرد نیز در آن گزارش موردنظر بوده است. در

پژوهش حاضر هفت لاین تراریخته با انتقال همزمان ژن *DRO1* و ژن *OsCKX4* به‌دست آمد که هر دو در تغییر ساختار ریشه نقش ایفا می‌کنند. انتقال همزمان چندین ژن برای بهبود صفات مختلف در گیاهان دارای اهمیت بوده و به‌عنوان یک روش اصلاحی مؤثر مطرح است که می‌تواند بهبود صفات مورد نظر را تسهیل کرده و زمان رسیدن به هدف مورد نظر برای اصلاح گیاهان 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 (Ye *et al*., 2000). همچنین 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 در گیاهان زراعی، به‌دلیل ایجاد تغییرات ناخواسته و غیر قابل پیش‌بینی در چینش ژنی و فعال‌شدن ژن‌های نامطلوب یا حذف ژن‌های سودمند ممکن است منجر به کاهش کیفیت محصول شود. به علاوه این روش‌ها زمان‌بر و پر هزینه هستند. در پی انتقال دو ژن تغییر دهنده‌ی ساختار ریشه به رقم تجاری هاشمی که مرغوبیت بالایی از نظر عطر و طعم دارد، انتظار بر این است که گیاهان تراریخته حاصل از نظر بازار پسندی، مانند همتای غیر تراریخته خود باشند. به‌منظور تایید این مساله، آزمایش‌های این‌همانی[1] و بررسی صفات کیفی پس از خالص‌سازی انجام خواهد شد. 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 تولید برنج مهندسی شده 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.

## سپاسگزاری

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

## REFERENCES

An, G., Watson, B.D., & Chiang, C.C. (1986). Transformation of tobacco, tomato, potato, and Arabidopsis thaliana using a binary Ti vector system. *Plant Physiology, 81*(1), 301-305.

Arai-Sanoh, Y., Takai, T., Yoshinaga, S., Nakano, H., Kojima, M., Sakakibara, H., & ... Uga, Y. (2014). Deep rooting conferred by deeper rooting 1 enhances rice yield in paddy fields. *Scientific Reports*, *4*(1), 1-6.

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

Bashline, L., Lei, L., Li, S., & Gu, Y. (2014). Cell wall, cytoskeleton, and cell expansion in higher plants. *Molecular Plant*, *7*(4), 586-600.

Bennett, J.O.H.N., Cohen, M.B., Katiyar, S. K., Ghareyazie, B. E. H. Z. A.D., & Khush, G.S. (1997). Enhancing insect resistance in rice through biotechnology. *Advances in insect control: The Role of Transgenic Plants*, 75-93.

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*(8), e0237334.

1. Substantial equivalence

Chamani, M. F., Soluki, M., Ghareyazie, B., Farshad, F., Fahmideh, L., Ghafari, A., & Mohsenpour, M. (2017). Isolation and functional analysis of PSTOL1 from wild species of rice. Gene Eng. *Biosafety J*. 6(1): 1-10 (In Persian).

Chang, E. H., Zhang, S. F., Zhi-Qin, W. A. N. G., Xue-Ming, W. A. N. G., & Jian-Chang, Y. A. N. G. (2008). Effect of nitrogen and phosphorus on the amino acids in root exudates and grains of rice during grain filling. *Acta Agronomica Sinica*, *34*(4), 612-618.

Chang, T. T., Armenta-Soto, J. L., Mao, C. X., Peiris, R., & Loresto, G. C. (1986). Genetic studies on the components of drought resistance in rice (*Oryza sativa* L.). In *Rice Genetics I: (In 2 Parts)* (pp. 387-398).

Clark, L. J., Price, A. H., Steele, K. A., & Whalley, W. R. (2008). Evidence from near-isogenic lines that root penetration increases with root diameter and bending stiffness in rice. *Functional Plant Biology*, *35*(11), 1163-1171.

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), 1-11.

Ekanayake, I. J., O'toole, J. C., Garrity, D. P., & Masajo, T. M. (1985). Inheritance of root characters and their relations to drought resistance in rice 1. *Crop Science*, *25*(6), 927-933.

Fukuda, H. (Ed.). (2014). *Plant cell wall patterning and Cell Shape*. John Wiley & Sons.

Gao, S., Fang, J., Xu, F., Wang, W., Sun, X., Chu, J., ... & Chu, C. (2014). Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase4 integrates cytokinin and auxin signaling to control rice crown root formation. *Plant Physiology*, *165*(3), 1035-1046.

Ghareyazie, B., Alinia, F., Menguito, C. A., Rubia, L. G., de Palma, J. M., Liwanag, E. A., ... & Bennett, J. (1997). Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA (b) gene. *Molecular Breeding*, *3*(5), 401-414.

Ghorbanzadeh, Z., & Ghafari, M. R. (2019). miRNAs: Superheroes in the Rice Plant Misery Time. *Journal of Biosafety*, *11*(4), 97-122.

Gowda, V. R., Henry, A., Yamauchi, A., Shashidhar, H. E., & Serraj, R. (2011). Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crops Research*, *122*(1), 1-13.

Guseman, J. M., Webb, K., Srinivasan, C., & Dardick, C. (2017). DRO 1 influences root system architecture in Arabidopsis and Prunus species. *The Plant Journal*, *89*(6), 1093-1105.

Hasanuzzaman, M., Anee, T. I., Bhuiyan, T. F., Nahar, K., & Fujita, M. (2019). Emerging role of osmolytes in enhancing abiotic stress tolerance in rice. In *Advances in rice research for abiotic stress tolerance* (pp. 677-708). Woodhead Publishing.

Jeong, J. S., Kim, Y. S., Redillas, M. C., Jang, G., Jung, H., Bang, S. W., ... & Kim, J. K. (2013). OsNAC5 overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnology Journal*, *11*(1), 101-114.

Kato, Y., & Okami, M. (2010). Root growth dynamics and stomatal behaviour of rice (*Oryza sativa* L.) grown under aerobic and flooded conditions. *Field Crops Research*, *117*(1), 9-17.

Kazemi, M., Ghorbanzadeh, Z., Pourhang, L., Mousavi Pakzad, S. M., Moatamed, E., Mapar, M., ... & Mohsenpour, M. (2022). Rice genetic engineering using transformation of Deeper Rooting1 and Phosphorus-Starvation Tolerance1 genes. *Agricultural Biotechnology Journal*, *14*(1), 1-20.

Kondo, M., Murty, M. V., & 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*(3), 721-732.

Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, *529*(7584), 84-87.

Li, J., Han, Y., Liu, L., Chen, Y., Du, Y., Zhang, J., ... & Zhao, Q. (2015). qRT9, a quantitative trait locus controlling root thickness and root length in upland rice. *Journal of Experimental Botany*, *66*(9), 2723-2732.

Li, L., Zhou, Y., Cheng, X., Sun, J., Marita, J. M., Ralph, J., & Chiang, V. L. (2003). Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(8), 4939-4944.

Michaletti, A., Naghavi, M. R., Toorchi, M., Zolla, L., & Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-18.

Mohammadi zadeh, N., tohidfar, M., Mohsenpooor, M. (2010). Agrobacterium-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum*) using chitinase and glucanase genes. *Agricultural Biotechnology Journal*, 2(1), 81-97.

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*(1), 53-58.

Mohsenpour, M., Babaeian Jeloudar, N.A., Tohidfar, M., Habashi, A.A. (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. (2011) Genetic Engineering of Plant Nuclear Genome for Specific gene Expression in Chloroplast Using Design and Transformation of Hybrid Sigma Factor. *Crop Biotechnology*, 1(1):35-48. (In Persian).

Mohsenpour, M., Tohidfar, M., Jelodar, N. B., & Jouzani, G. S. (2015). Designing a new marker-free and tissue-specific platform for molecular farming applications. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *24*(4), 433-440.

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

Price, A. H., Steele, K. A., Moore, B. J., & Jones, R. G. W. (2002). Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes: II. Mapping quantitative trait loci for root morphology and distribution. *Field Crops Research*, *76*(1), 25-43.

Vosouqi, A., Tohidfar, M., Solouki, M., & Mohsen Pour, 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. *Agricultural Biotechnology Journal*, *3*(2), 27-46.

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 Biotechnology*, *9*(27), 69-77.

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

Singh, B., Mishra, S., Bisht, D. S., & Joshi, R. (2021). Growing rice with less water: Improving productivity by decreasing water demand. In *Rice improvement* (pp. 147-170). Springer, Cham.

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*(1), 1-8.

Uga, Y., Okuno, K., & Yano, M. (2011). Dro1, a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. *Journal of Experimental Botany*, *62*(8), 2485-2494.

Uga, Y., Sugimoto, K., Ogawa, S., Rane, J., Ishitani, M., Hara, N., ... & Yano, M. (2013). Control of root system architecture by deeper rooting 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics*, *45*(9), 1097-1102.

Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., & Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, *287*(5451), 303-305.

Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. (1976). Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice, Ed 3. The International Rice Research Institute, Manila, The Philippines.

Yoshida, S., & Hasegawa, S. (1982). The rice root system: its development and function. *Drought Resistance in Crops with Emphasis on Rice*, *10*, 97-134.

Zandi, M., Hosseini, R., Mohsenpour, M., Hosseini Salekdeh, G., & Behzad, G. (2019). Transformation of DRO1, OsNAC5, OsEXPA8 genes in order to improve root architecture and drought tolerance in rice. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, *8*(1), 77-89.

Zhang, H., Xue, Y., Wang, Z., Yang, J., & Zhang, J. (2009). An alternate wetting and moderate soil drying regime improves root and shoot growth in rice. *Crop Science*, *49*(6), 2246-2260.