راهکاری نوین برای صرفه‌جویی در آب و افزایش تولید برنج: مهندسی ژنتیک با ژن‌های *OsNAC5* و *EPSPS*

سید محمد موسوی پاکزاد[۱]، الهه معتمد[۱]، نسرین سلطانی[۱]، محدثه محسن‌پور[۲]، علی اکبر عبادی[۳] و مطهره محسن پور[۱*]

۱.بخش مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲.گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران_شمال، تهران، ایران
۳.موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از روش‌های علمی برای حل مشکلات مرتبط با علف‌های هرز در کشت برنج می‌تواند روش‌های زراعی را متحول کند، به طوری که نیاز به غرقابی و سیستم‌های کرت‌بندی حذف شود و هزینه‌های تولید به طور قابل توجهی کاهش یابد. این مطالعه بر استفاده از فناوری‌های پیشرفته تمرکز دارد که با ترکیب ژن‌های تحمل به علف‌کش و ژن‌هایی که تحمل به خشکی یا افزایش عملکرد را فراهم می‌کنند، انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها: برای دستیابی به این هدف، یک سازه ژنی چندگانه طراحی شد که ژن تحمل به علف‌کش را در کنار ژن *OsNAC*۵، مرتبط با تحمل به خشکی، بهبود عملکرد و تغییر ساختار ریشه، در بر داشت. توالی کدکننده ژن ۵ *OsNAC* بهینه‌سازی کدونی شده و تحت کنترل پیش‌برRCc۳ و پایان‌بر tahsp۱۷ قرار گرفت و همراه با کاست ژنی *EPSPS* در ناحیه T-DNA یک وکتور مبتنی بر *Agrobacterium* همسانه‌سازی شد. سازه ژنی حاصل با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* به برنج منتقل شد و مراحل انتخاب و باززایی به‌طور مستمر انجام گرفت.

یافته‌ها: آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای مختص ژن و سازه، حضور تراژن‌ها را در گیاهان باززایی‌شده در محیط انتخابی تأیید کرد. از این فرآیند، شش رخداد مستقل از انتقال سازه نوترکیب موسوم به pUhErN۵ به دست آمد. این رخدادها با استفاده از واکنش PCR معکوس برای تفکیک رخدادهای مستقل و تعیین محل الحاق تراژن در گیاهان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: توسعه برنج با قابلیت مصرف کمتر آب گامی مهم در جهت مواجهه با محدودیت‌های اقلیمی و منابع کشور است و نقشی کلیدی در حفظ امنیت غذایی و دستیابی به خودکفایی دارد. استفاده از این فناوری‌ها می‌تواند به پایداری تولید برنج در ایران کمک کرده و آن را در برابر چالش‌های محیطی مقاوم‌تر سازد.

واژه‌های کلیدی: مهندسی ژنتیک برنج، *EPSPS*،*OsNAC ۵*، انتقال ترکیبی ژن‌ها، کاهش مصرف آب

A Novel Approach for Water Conservation and Yield Enhancement in Rice: Genetic Engineering with *OsNAC5* and *EPSPS* Genes

Seyyed Mohammad Mousavi pakzad[1], Elahe Moatamed[1], Nasrin Soltani[1], Mohaddeseh Mohsenpour[2], Aliakbar Ebadi[3], Motahhareh Mohsenpour[1*]

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2.Department of Microbiology, Faculty of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3.Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Rasht, Iran

Abstract

Introduction: Utilizing scientific approaches to address weed-related challenges in rice cultivation could revolutionize farming methods, eliminating the need for flooded fields and plot-based systems while significantly reducing production costs. This study focuses on leveraging advanced technologies by combining herbicide tolerance genes with genes conferring drought tolerance or yield improvement.

Methods: To achieve this, a multigenic construct was designed, incorporating a herbicide tolerance gene alongside *OsNAC5*, a gene associated with drought tolerance, improved yield, and root architecture modification. The coding sequence of *OsNAC5* was codon-optimized and placed under the control of the RCc3 promoter and tahsp17 terminator, alongside an *EPSPS* gene cassette within the T-DNA region of an *Agrobacterium*-based vector. The resulting genetic construct was introduced into rice using *Agrobacterium tumefaciens*, followed by continuous selection and regeneration processes.

Results: Polymerase chain reaction (PCR) analysis using gene- and construct-specific primers confirmed the presence of transgenes in regenerated plants grown on selective media. Six independent transformation events of the recombinant construct, recombinant pUhErN5, were obtained. These events were further characterized by inverse PCR to distinguish individual events and identify transgene insertion sites.

Conclusion: The development of these transgenic rice lines represents a significant step toward addressing the country's climatic and resource constraints, supporting food security and self-sufficiency. The adoption of such technologies could contribute to the sustainability of rice production in Iran, ensuring resilience against environmental challenges.

Keywords: Rice Genetic Engineering, *EPSPS*, *OsNAC5*, Combined Gene Transfer, Reduced Water Use

مقدمه

عصر مهندسی ژنتیک به مفهوم عصر استفاده از روش‌های زیست‌شناسی مولکولی برای بهبود صفات و ویژگی‌های موجوداتی است که در کشاورزی، پزشکی و محیط زیست استفاده می‌شوند. استفاده بهینه از آب در کشوری چون ایران که از نظر اقلیمی دارای وضعیت خشک تا نیمه خشک است از اهمیت ویژه‌ای در گسترش و توسعه فعالیت‌های کشاورزی برخوردار است. مبارزه با علف هرز در مزارع برنج هزینه‌برترین بخش تولید این محصول استراتژیک است. در حال حاضر برای مبارزه با علف هرز اقدامات پرهزینه‌ای انجام می‌شود، مانند لایروبی انهار (برای تقلیل جمعیت بذر علف هرز باقی مانده از سال قبل)، کرت بندی (برای نگهداشتن آب)، غرقاب کردن زمین، تهیه نشا و نشاکاری (لازمه کشت غرقابی است)، استفاده از علف‌کش اختصاصی، وجین دستی. طغیان علف هرز می‌تواند موجب خسارت جبران ناپذیری به زراعت برنج شود. این خسارت ممکن است تا ۸۰ ٪ هم برسد. بنابراین چنانچه بتوان معضل علف‌هرز را به نحو مطلوبی حل کرد می‌توان تحولی در روش کشت برنج ایجاد کرد که نیازمند غرقابی و کرت‌بندی مزارع برنج نباشد. با توجه به معضل خشکی در کشور و محدودیت آب از یک طرف و تولید برنج با سیستم زراعی متداول در ایران (غرقابی) که نیازمند آب فراوانی است از طرف دیگر، ایجاد واریته‌های متحمل به خشکی برای نیل به خودکفایی در این محصول ضروری است. کشت مستقیم برنج راه خوبی برای صرفه‌جویی در مصرف آب است. مهمترین چالش در این سیستم کشت، کنترل علف‌های هرز است. روش‌های سنتی کنترل علف‌های هرز در برنج شامل وجین‌دستی است، اما به دلیل کمبود نیروی کار در زمان بحرانی وجین و افزایش هزینه‌های نیروی کار، این روش با مشکلاتی همراه است و در سطح زیاد جوابگو نیست. علف‌کش‌ها نقش کلیدی در کنترل علف‌های هرز دارند و امروزه به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱).

برنج از جنبه فیزیولوژیک نیاز چندانی به آب ندارد. دو دلیل اصلی برای تولید غرقابی برنج عنوان شده است. دلیل اول کنترل علف هرز از طریق غرقابی و کشت نشایی است (۴-۲) و دلیل دوم خنثی کردن pH خاک است (۴). در واقع چنانچه برنج این دو مشکل را نداشته باشد کشت غیر غرقابی آن هم از جنبه کیفی (عطر و طعم) و هم از جنبه کمی تولید برتری خواهد داشت. ایجاد ارقام مهندسی شده متحمل به علفکش گلیفوسیت با انتقال ژن *EPSPS* که در مقایسه با علف‌کش‌های رایج، ایمن و کاراست قدم اول در کاهش مصرف آب در کشت برنج خواهد بود. دربرنج ۱۴۰ ژن *NAC* (NAM-ATAF-CUC) ردیابی شده است و تحقیقات نشان داده‌اند که ۱۸ مورد آنها در شرایط استرس القاء می‌شوند. گزارش‌ها نشان می‌دهد بیان در سطح زیاد *OsNAC ۵* قطر ریشهٔ برنج را افزایش داده و منجر به تحمل خشکی و افزایش عملکرد دانه در مزرعه می‌شود(۵). بیان بالای تنظیم کنندهٔ رونویسی *OsNAC۹* و *OsNAC۵* قطر بافت آئرانشیم و استل ریشه در رقم Nipponbare را افزایش داده و ریشه‌های سبک و قطورتری تولید می‌کند. میزان محصول نهایی در این گیاهان در شرایط تنش خشکی بین ۲۰ تا ۷۰ ٪ در مقایسه با شاهد افزایش نشان داده است(۶و۷). همچنین بیش بیان ژن*OsNAC۵*، تحمل به خشکی، شوری و دمای پایین در گیاهان تراریخته را افزایش می‌دهد(۸). تاکاساکی و همکاران گزارشی با بیش بیان*OsNAC۵* که یک عامل رونویسی است، عملکرد این ژن را در تحمل به خشکی هم با روش خاموشی ژن توسط آران‌ای مداخله‌گر (RNAi) و هم با استفاده از بیش بیان آن در آرابیدوپسیس و برنج تراریخته مورد

نویسنده مسئول: استادیار ، بخش مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران

آدرس الکترونیک :
mthrhm@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

بررسی قرار دادند. بیش بیان*OsNAC۵* 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 به طور معنی‌داری تحمل به خشکی را در مرحله باردهی از طریق رشد ریشه‌های طویل با افزایش عملکرد دانه افزایش داد. ژن *OsNAC۵* همراه با ABA نقش مهمی در حرکت دوباره Zn، Fe و آمینواسیدها از برگ به بذرها دارد(۹). بیش بیان *OsNAC۵* در گیاهان برنج منجر به انباشت پرولین و قندهای محلول و همچنین مقدار کمتر MDA (Malondiahdehyde) و H_2O_2 می‌شود. این تغییرات متابولیکی گیاهان را از کاهش آب و آسیب اکسیداتیو در شرایط تنش محافظت می‌کنند. بنابراین، *OsNAC۵* تحمل به تنش در برنج را بدون ایجاد نقایص در رشد بهبود می‌بخشد(۸ و ۱۰). علاوه بر این بیان *OsNAC۵* ، با افزایش قطر ریشه برنج، سبب افزایش مقاومت به خشکی و افزایش بازده محصول در مزرعه می‌شود(۶). تاکنون ژن‌های مختلفی برای تغییر ساختار ریشه برنج مورد بررسی قرار گرفته‌اند(۱۴-۱۱، ۵). بهبود سیستم ریشه و توانایی جذب آب بالا می‌تواند کلیدی برای توسعه ارقام برنج مناسب برای سیستم‌های کشاورزی مبتنی بر صرفه‌جویی آب باشد. هدف از این تحقیق انتقال ژن‌های *EPSPS* و *OsNAC۵* ایجادکننده تحمل به علف‌کش و تحمل به خشکی به منظور صرفه‌جویی در مصرف آب و افزایش عملکرد در کشت برنج است.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه چند ژنی حاوی ژن‌های *NRT* و *EPSPS*

طراحی سازه‌های ژنی با استفاده از نرم افزار Vector NT۱ (Invitrogen) انجام شد. واکنش اتصال ابتدا در حامل همسانه‌سازی تحت پیشبر مختص ریشه RCc۳ در مورد ژن *OsNAC۵* بهینه سازی شده کدونی (۱۵) انجام و سپس در حامل دوگانه مختص انتقال ژن با واسطه *اگروباکتریوم* حاوی ژن نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین قرار داده شد. مخلوط اتصال به سلول‌های مستعد تهیه شده از *E. coli* سویهٔ XL۱-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(۱۶). پلاسمید نوترکیب حاصل پس از تایید، به روش آن و همکاران (۱۹۸۶) به *اگروباکتریوم* سویه EHA۱۰۵ منتقل شد(۱۷).

مواد گیاهی و انتقال ژن

بذور برنج رقم هاشمی (دریافت شده از موسسه تحقیقات برنج رشت) برای انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفتند. دو تا سه روز قبل از انجام هم‌کشتی، باکتری بر روی محیط کشت LB همراه با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب (۷۵میلی‌گرم در لیتر ریف‌آمپیسین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسپکتینومایسین) کشت خطی شد. یک ساعت قبل از انجام هم‌کشتیِ با *آگروباکتریوم*، حدود یک لوپ پُر *آگروباکتریوم* از محیط LB برداشته و درون محیط تلقیح حاوی استوسیرینگون سوسپانسیون شد. چگالی نوری (OD_{600nm}) باکتری روی ۰/۳ تنظیم شد. محلول تلقیح به مدت یک ساعت درون انکوباتور تاریک ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا برای انتقال ژن آماده شود. سپس حدود ۵ میکرولیتر از محلول *آگروباکتریوم* حاوی پلاسمید روی ریزنمونه‌ها چکانیده شد. ریزنمونه‌ها حدود ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تاریک تلقیح شدند. پس از انجام هم‌کشتی با *آگروباکتریوم*، ریزنمونه‌ها به محیط کشت استراحت منتقل شدند 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 (۵۰میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند.

کالوس‌های مقاوم جنین‌زا در محیط کشت انتخابی به محیط کشت پیش باززایی منتقل و ۱۵ روز در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کالوس‌های مناسب دارای نقاط سبز رنگ در محیط کشت پیش باززایی انتخاب و به محیط باززایی و سپس به ترتیب به محیط یوشیدا و گلدان منتقل شدند. جزئیات بهینه‌سازی کشت بافت و انتقال ژن و محیط‌های کشت در "دستورالعمل فنی باززایی بذر رسیده برنج با هدف انتقال ژن توسط آگروباکتریوم" با شماره فروست ۶۴۱۹۵، در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی توسط مجری و همکاران به چاپ رسیده است (۳۴).

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 مختص ژن، مختص سازه و ناحیه‌ای از ژنوم برنج (RG۱۰۰) به عنوان ژن کنترل داخلی آنالیز شدند. تفکیک رخدادها و تعیین محل الحاق تراژن در ژنوم برنج با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس بهینه شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (۱۸) انجام شد. باند حاصل توالی‌یابی شد و تحت آنالیز بیوانفورماتیک برای تعیین دقیق محل الحاق قرار گرفت.

یافته‌ها

طراحی و ساخت سازه‌ها

قرار گرفتن کاست ژنی *OsNAC۵* (بهینه‌سازی کدونی شده بر اساس نتایج قبلی(۱۹) در کنار کاست ژنی *EPSPS* در ناحیه T-DNAی سازه آگرباکتریومی با هضم آنزیمی و PCR تایید شد. سازه نوترکیب حاصل موسوم به pUhErN۵ حاوی ژن *EPSPS* تحت پیشبر یوبی‌کوئیتین و پایانبر NOS و *OsNAC۵* تحت پیشبر RCc۳ و پایانبر Tahsp۱۷ (از منشاء گندم) در ناحیه T-DNA سازه آگروباکتریومی است که این کاست‌های ژنی در خلاف جهت کاست ژنی مقاومت به هیگرومایسین قرار دارند (شکل ۱). سازه چند ژنی حاصل می‌تواند با استفاده از اگروباکتریوم برای تحمل به علف‌کش و بهبود ساختار ریشه و عملکرد در گیاهان به ویژه در تک لپه‌ای‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

انتقال ژن

کالوس هایی 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. به تدریج روند سبز شدن و باززایی کالوس‌های جنین‌زا آغاز و تولید گیاهچه کردند و سپس گیاهچه‌های مستقل در محیط ریشه‌زایی، ریشه‌دار شدند. آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین در تمامی مراحل تا قبل از انتقال گیاهان به یوشیدا مورد استفاده قرار گرفت. انتقال گیاهچه‌های کامل 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 درگلخانه تراریخته پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی تا مرحله بذرگیری و انجام آنالیزهای تکمیلی نگهداری شدند.

آنالیزهای مولکولی

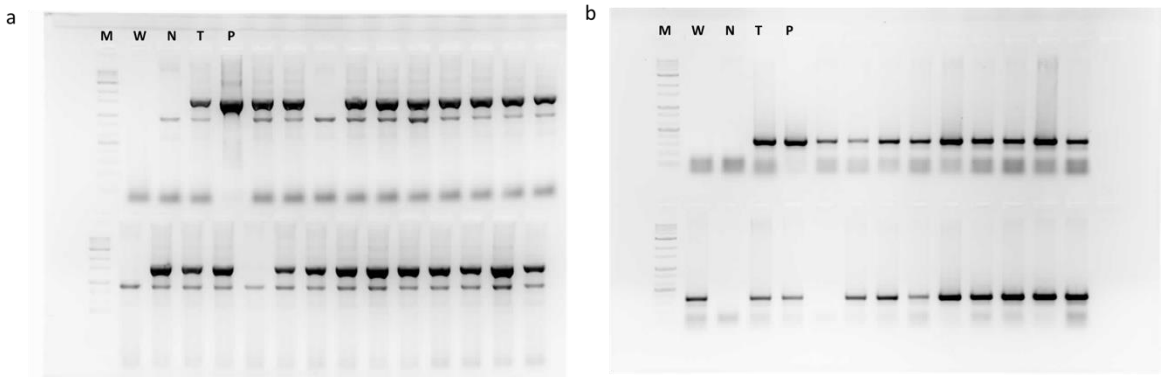
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه مختص ژن و سازه

آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای مختص سازه و ناحیه‌ای از ژنوم برنج (RG۱۰۰) به عنوان شاهد داخلی برای گیاهان تراریخته احتمالی که در مراحل انتخابی زنده مانده و باززاشده بودند، انجام شد. مشاهده باند حدود ۱۶۰۰bp که ژن EPSPS را از ناحیه کدکننده پپتید نشانه کلروپلاستی تا پایانبر NOS تکثیر می‌کند، حضور اولیه ژن را در گیاهان تراریخته احتمالی اثبات کرد (شکل ۲-I). به منظور طراحی آغازگرهای مناسبی که بتوان با استفاده از آنها بین تراژن و ژن مشابه داخلی تمایز قائل شد، آغازگرهای *OsNAC۵* پس از هم ردیفی توالی بهینه‌سازی شده کدونی با توالی اولیه طوری طراحی شدند که آغازگر دارای نوکلئوتید متفاوت از نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده ژن داخلی در انتهای ۳' باشد (شکل ۲-ب).

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

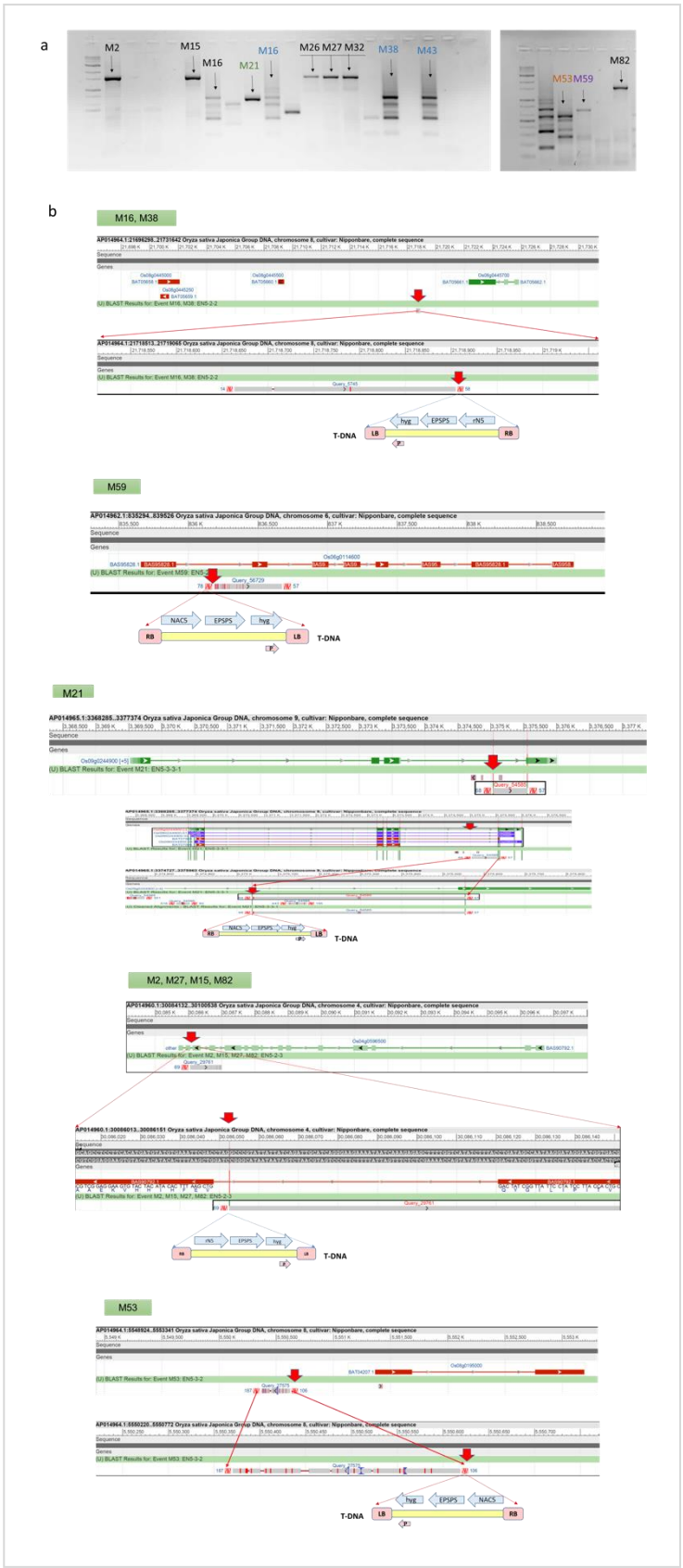
نتایج واکنش PCR معکوس تفکیک رخدادهای مورد بررسی را اثبات کرد (شکل ۳-I). محل الحاق تراژن در پنج رخداد از شش رخداد حاصل از انتقال سازه pUhErN۵ که هر دو ژن *EPSPS* و *OsNAC۵* را دریافت کرده بودند تعیین شد. آنالیزهای بیوانفورماتیک نشان داد در کروموزوم‌های شماره ۴، ۶، ۹ و در دو مورد کروموزوم شماره ۸ محل الحاق ناحیه T-DNA بودند که در سه رخداد در جهت مرز راست (RB) به مرز چپ (LB) و در دو رخداد به صورت مرز چپ به مرز راست الحاق صورت گرفته بود. نمای شماتیک و لوکوس ژنی محل الحاق رخدادها در شکل ۲-ب نشان داده شده است.

شکل ۱. نمای شماتیک ناحیه T-DNA سازه‌های نوترکیب pUhErN۵ طراحی و ساخته شده در این تحقیق.



شکل۲. نتایج آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مختص سازه برای تعدادی از لاین‌های برنج حاصل از انتقال سازه pUhErN۵.

a. نتایج PCR چندگانه با استفاده از آغازگرهای مختص سازه (Gt-F و NOS-R) باند مورد انتظار ۱۶۱۷bp را در لاین‌های برنج تراریخته نشان داد و به صورت همزمان نمونه‌ها باند حدود ۹۵۰bp مربوط به قطعه‌ای از ژنوم برنج (RG۱۰۰) را نیز به عنوان کنترل داخلی نشان دادند؛ b. استفاده از آغازگرهای مختص ژن *OsNAC۵* باند مورد انتظار ۳۵۷bp را در لاین‌های برنج تراریخته نشان داد.



شکل ۳. نتایج PCR معکوس برای اثبات تفکیک رخدادهای حاصل از انتقال سازه نوترکیب pUhErN۵.
a. تفکیک رخدادهای برنج به روش SUN-iPCR؛ b. تعیین محل الحاق تراژن.
M، نشانگر اندازه وزن ملکولی (۱Kb Plus-Biofact company)؛ W، کنترل بدون الگو (آب)؛ N، گیاه شاهد غیرتراریخته به عنوان کنترل منفی؛ P، پلاسمید pUhErN۵ (کنترل مثبت)؛ T، گیاه تراریخته (حاوی ژن منفرد به دست آمده از طرح) به عنوان کنترل مثبت؛ سایر چاهک‌ها گیاهان نسل T۲حاصل از انتقال سازه نوترکیب pUhENRT.

جدول ۱. رخدادهای حاصل از سازه نوترکیب pUhErN۵.

کد تراریختی	سازه	رخداد	کد رخداد	محل الحاق T-DNA
M۰۰۴	pUhErN۵	۱	۰۶-E-rN۵-۰۱	
M۰۰۷	pUhErN۵	۱	۰۶-E-rN۵-۰۱	
M۰۲۵	pUhErN۵	۱	۰۶-E-rN۵-۰۱	
M۰۶۰	pUhErN۵	۱	۰۶-E-rN۵-۰۱	
M۰۱۶	pUhErN۵	۲	۰۶-E-rN۵-۰۲	Chr.۸: ۲۱۷۱۸۹۰۴
M۰۲۳	pUhErN۵	۲	۰۶-E-rN۵-۰۲	
M۰۳۳	pUhErN۵	۲	۰۶-E-rN۵-۰۲	
M۰۳۸	pUhErN۵	۲	۰۶-E-rN۵-۰۲	Chr.۸: ۲۱۷۱۸۹۰۴
M۰۴۳	pUhErN۵	۲	۰۶-E-rN۵-۰۲	Chr.۸: ۲۱۷۱۸۹۰۴
M۰۴۴	pUhErN۵	۲	۰۶-E-rN۵-۰۲	
M۰۴۷	pUhErN۵	۲	۰۶-E-rN۵-۰۲	
M۰۸۶	pUhErN۵	۲	۰۶-E-rN۵-۰۲	
M۰۰۲	pUhErN۵	۳	۰۶-E-rN۵-۰۳	Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲ RB/LB
M۰۱۵	pUhErN۵	۳	۰۶-E-rN۵-۰۳	Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲RB/LB
M۰۲۶	pUhErN۵	۳	۰۶-E-rN۵-۰۳	Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲RB/LB
M۰۲۷	pUhErN۵	۳	۰۶-E-rN۵-۰۳	Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲RB/LB
M۰۳۲	pUhErN۵	۳	۰۶-E-rN۵-۰۳	Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲RB/LB
M۰۸۲	pUhErN۵	۳	۰۶-E-rN۵-۰۳	Chr.۴:۳۰۰۸۶۰۵۲ RB/LB
M۰۵۹	pUhErN۵	۴	۰۶-E-rN۵-۰۴	Chr.۶:۸۳۶۱۸۸, RB/LB
M۰۲۰	pUhErN۵	۵	۰۶-E-rN۵-۰۵	
M۰۵۳	pUhErN۵	۵	۰۶-E-rN۵-۰۶	Chr۸: ۵۵۵۰۶۱۹LB/RB
M۰۱۲	pUhErN۵	۶	۰۶-E-rN۵-۰۶	
M۰۲۱	pUhErN۵	۶	۰۶-E-rN۵-۰۶	Chr۹: ۳۳۷۵۰۳۶

رخدادهای حاصل در جدول ۱ خلاصه شده‌اند و خالص‌سازی آنها در حال انجام است. محل الحاق تراژن‌ها در دو رخداد (رخدادهای شماره ۲ و ۵) حاصل که در کروموزوم شماره ۸ و هر دو در جهت LB به RB الحاق شده بودند، نواحی بین ژنی تعیین شد. محل الحاق این دو رخداد حدود ۱۶هزار باز با یکدیگر اختلاف داشت و بنابراین مستقل بودن آنها با اطمینان اثبات شد. الگوی باندی PCR معکوس نیز تفکیک این دو رخداد را نشان داده بود. این در حالی است که یکسان بودن الگوی باندی مشابه گیاهان دارای کد تراریختی M۰۱۶، M۰۳۸ و M۰۴۳ که بر اساس اطلاعات مراحل انتقال ژن نیز یک رخداد درنظر گرفته شده بودند دسته‌بندی آنها به عنوان رخداد شماره ۲ را با اطمینان اثبات کرد. نتایج آنالیز

بیوانفورماتیک و الگوی باندی گیاهان دارای کد تراریختی M۰۰۲، M۰۱۵، M۰۲۶، M۰۲۷، M۰۳۲ و M۰۸۲ را که حضور تراژن‌ها را در لوکوس یکسانی از کروموزوم شماره ۴ به صورت LB به RB نشان می‌دادند نیز باعث شد علاوه بر اطلاعات انتقال ژن با اطمینان بتوان این گیاهان را به عنوان رخداد شماره ۳ دسته بندی کرد. این لوکوس (۳۰۰۸۶۰۵۲) در اینترون سیزدهم ژنی به نام

Os۰۴t ۰۵۹۶۵۰۰-۰۲: Translation elongation factor EFTu/EF۱A , C-terminal domain containing protein

رخدادهای شماره ۴ و ۶ نیز درناحیه اینترونی ژن‌هایی در کروموزوم شماره ۶ و ۹ الحاق شده اند. چندین مشاهده الحاق در ناحیه اینترونی و عدم تاثیر آن در رشد و باروری گیاهان حاصل می‌تواند اینطور تفسیر شود که ژن موجود در ژنوم برنج که ناحیه T-DNA در اینترون آن الحاق می‌شود، رونویسی شده و در اسپیلایسینگ پس از حذف اینترون‌ها و از جمله اینترون حاوی T-DNA بتواند mRNAی صحیح را تشکیل داده و مشکلی برای ترجمه پیش نیاید. از طرفی الحاق تراژن‌ها در یک ناحیه فعال از نظر رونویسی نیز می‌تواند جالب توجه باشد.

بررسی ایمنی پروتئین حاصل از تراژن *NAC5*

توالی پپتیدی *OsNAC۵* مورد استفاده در این تحقیق با طول ۳۲۹ اسید آمینه در پایگاه AllergenOnline مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز ۲۵۰ قطعه ۸۰ اسیدآمینه‌ای در کل توالی این پروتئین شباهت بالای ۳۵٪ با هیچ آلرژنی نشان نداد (شکل ۴-a). ولی آنالیز ۳۲۲ قطعه پپتید ۸ اسیدآمینه‌ای این توالی با یک آلرژن دانه گرده منطبق شد (شکل ۴-b). آنالیز کل توالی نیز شباهت بیش از ۵۰ درصد به آلرژن‌ها نشان نداد. این ژن در تحقیق حاضر تحت پیشبر اختصاصی ریشه منتقل شده است و انتظار بر این است در سایر بافت‌های گیاهی بیان نشود.

a

80mer Sliding Window Search Results

Database	AllergenOnline Database v21 (February 14, 2021)
Input Query	>query mecggalqlppgfrfhptddelvmyylcrkcgglplaapviaevdlykfnpwdlperamg gekewyffsprdrkypngqrpnraagtgywkatgadkpvgspravaikkalvfyagkppk gvktnwimheyrladvdrsaaarklsksshnalrlddwvlcriynkkgvierydtvdage dvkpaaaaaaakggrigggggaaamkvelsdygfydqepesemlcfdrsgsadrdsmprl htdssgsehvlspspspddfpgggdhdyaesqpsggcggwpgvdwaavgddgfvidsslf elpspaafsraagdgaafgdmftylqkpf
Length	329
Number of 80 mers	250
Number of Sequences with hits	0

No Matches of Greater than 35% Identity Found

AllergenOnline Database v21 (February 14, 2021)

b

>query

number of 8mer = 322

Number of Sequences with at least one 8mer match = 1

GI: **332205751** Hits: **1** -- Def: **pollen allergen Sec c 5 [Secale cereale]**

شکل ۴. نتایج پایگاه AllergenOnline برای بررسی احتمال آلرژی‌زایی پروتئین حاصل از تراژن *NAC5*.

استفاده از پیشبر مختص ریشه برای جلوگیری از اثرات ناخواسته بیان دائمی ژن *OsNAC۵* بر محصول، مطلوب خواهد بود. تایید تحمل به علف‌کش، بهبود صفات ریشه و اثر آنها بر عملکرد محصول 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.

بحث

تولید و استفاده از سازه‌های چندژنی برای ایجاد گیاهان تراریخته در مراحل آزمایشگاهی در گیاهانی چون برنج، توتون، پنبه، گوجه فرنگی، گندم، سویا و جلبک در ایران انجام شده است (۲۰-۲۵). ایرانیان در تولید برنج تراریخته پیشتاز بوده‌اند(۲۶ و ۲۷). همچنین انتقال ژن *DRO۱* در کنار ژن‌های *OsNAC۵* و *OsEXPA۸* (۱۵) و نیز لنتقال ژن *PSTOL۱* و *OsDRO۱* (۲۸) برای بهبود ساختار ریشه، تحمل به خشکی و بهبود جذب عناصر غذایی گیاه برنج و نیز انتقال دو ژن *OsCKX۴* و *OsDRO۱* (۲۹) در کشور تا مرحله گلخانه‌ای انجام شده است. انتقال همزمان ژن‌های *PSTOL۱*، *OsCKX۴* و *OsNAC۵* نیز به همین منظور گزارش شده است (۳۰). برای بهبود صفات مختلف در گیاهان انتقال همزمان چندین ژن دارای اهمیت است و روش موثری است که می‌تواند اصلاح صفات مورد نظر را تسهیل کرده و زمان رسیدن به هدف مورد نظر برای بهبود صفات گیاهان و اصلاح آنها را کاهش دهد. در گزارش Ye و همکاران (۲۰۰۰)، انتقال همزمان سه ژن دخیل در سنتز ویتامین آ به برنج منجر به افزایش ارزش غذایی آن و تولید این ویتامین در آندوسپرم برنج شد (۳۱). همچنین انتقال همزمان دو ژن دخیل در بهبود فرایند بیوسنتز لیگنین در درختان جنگلی موجب افزایش کارایی این سیستم در درختان شد(۳۲). استفاده از روش‌های اصلاح سنتی در محصولات زراعی، به دلیل انتقال تعداد زیادی از ژن‌های نامطلوب به همراه ژن مورد نظر، ممکن است منجر به کاهش کیفیت محصول شود. به علاوه این روش‌ها زمان‌بر و پر هزینه هستند. در پی انتقال دو ژن در تحقیق حاضر به رقم تجاری برنج هاشمی که مرغوبیت بالایی از نظر عطر و طعم دارد، انتظار بر این است که گیاهان تراریخته حاصل از نظر بازارپسندی، مانند همتای غیرتراریخته خود باشند. به منظور تایید این مساله، آزمایش‌های اینهمانی و بررسی صفات کیفی پس از خالص‌سازی انجام خواهد شد. همچنین بررسی‌های ایمنی‌زیستی تضمین بهره‌برداری از فواید قطعی بیوتکنولوژی مدرن و مدیریت آثار جانبی احتمالی کاربرد این فناوری را در پی داشته و استفاده از مزایای مهندسی ژنتیک در جهت امنیت غذایی را در پی دارد (۳۳). در این تحقیق دو ژن کاندید موثر در تحمل به علف‌کش و تحمل به خشکی به برنج رقم هاشمی منتقل شد. تاکنون انتقال همزمان این دو ژن گزارش نشده است. چنانچه بتوان معضل علف‌هرز را در مزارع برنج به نحو مطلوبی حل کرد می‌توان تحولی در روش کشت برنج ایجاد کرد که نیازمند غرقابی و کرت‌بندی مزارع برنج نباشد. مهندسی ژنتیک از فناوری‌های ارزشمند برای حل معضل علف‌هرز، بهبود عملکرد، بهبود جذب عناصر غذایی است. امید است پژوهش حاضر گام اولیه موثری جهت تولید گیاهان برنج متحمل به علف‌کش به منظور کاهش مصرف آب در کشاورزی و بهبود عملکرد در کشور باشد.

نتیجه‌گیری

برنج، به‌عنوان یکی از محصولات استراتژیک کشاورزی، نقش حیاتی در امنیت غذایی ایران دارد. اما محدودیت‌های منابع آبی، خشکی و تغییرات اقلیمی، تولید پایدار این محصول را با چالش‌های جدی مواجه کرده است. روش سنتی تولید برنج که بر پایه کشت غرقابی استوار است، نیازمند مصرف بالای آب بوده و دلایل اصلی آن شامل کنترل علف‌های هرز و خنثی‌سازی pH خاک است. این در حالی است که برنج از نظر فیزیولوژیکی نیازی به این حجم آب ندارد. تغییر روش کشت برنج از غرقابی به کشت مستقیم به‌عنوان راهکاری مؤثر برای کاهش مصرف آب و بهبود بهره‌وری مطرح است. این تحقیق بر ایجاد ارقام برنج تراریخته با تحمل به علف‌کش و تحمل به خشکی متمرکز بود. با استفاده از مهندسی ژنتیک، ژن‌های *EPSPS* و *OsNAC5* به برنج رقم هاشمی منتقل شدند که یک رقم که دارای محبوبیت و متناسب با ذائقه ایرانی و بازارپسند در ایران است. ژن *EPSPS* به گیاه توانایی مقاومت در برابر علف‌کش گلیفوسیت را می‌دهد و به کاهش استفاده از علف‌کش‌های مضر و پرهزینه کمک می‌کند. ژن *OsNAC5* نیز در تحمل به خشکی و بهبود ساختار ریشه نقش دارد. سازه‌های نوترکیب این ژن‌ها با پیش‌بر یوبیکویتین و پایان‌بر Tahsp۱۷در ناحیه T-DNA سازه آگروباکتریومی طراحی و به برنج منتقل شدند. گیاهان حاصل می‌توانند به کاهش نیاز به کشت غرقابی کمک کنند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به دلیل حمایت مالی در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۰۱-۰۵-۰۵-۰۱۹-۹۸۰۱۰ تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین با گرامیداشت یاد و خاطره استاد بزرگوار جناب آقای دکتر قره‌یاضی که تجربیات ارزشمند خود را بی‌دریغ در اختیار قرار دادند علو درجات این استاد گرانقدر را از درگاه پروردگار علیم مسئلت داریم.

Reference

1. Dehghannezhad H, Zaefarian F, Abbasi R, Nouralizadeh Otaghsara M. weed management methods in direct-seeded rice (Oryza sativa L.). J Crop Prod [Internet]. 2023;16(4):21–40. Available from: https://ejcp.gau.ac.ir/article_6784.html
2. Bayer DE, Hill JE, Seaman DE. Rice (Oryza sativa). In: Principles of Weed Control in California Fresno, CA: California Weed Conf. 1985. p. 262–8.
3. Monaco TJ, Weller SC, Ashton FM. Weed science: principles and practices. John Wiley & Sons; 2002.
4. Sahrawat KL. Soil fertility in flooded and non-flooded irrigated rice systems. Arch Agron Soil Sci. 2012;58(4):423–36.
5. Wu W, Cheng S. Root genetic research, an opportunity and challenge to rice improvement. F Crop Res. 2014;165:111–24.
6. Jeong JS, Kim YS, Redillas MCFR, Jang G, Jung H, Bang SW, et al. OsNAC5 overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. 2013;10:101–14.
7. Redillas MCFR, Jeong JS, Kim YS, Jung H, Bang SW, Choi YD, et al. The overexpression of OsNAC9 alters the root

architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. Plant Biotechnol J. 2012;10(7):792–805.

8. Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, et al. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. Mol Genet Genomics. 2010;284(3):173–83.

9. Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Duarte GL, Boff T, Lopes KL, Sperb ER, et al. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. Planta. 2009;230(5):985–1002.

10. Song S-Y, Chen Y, Chen J, Dai X-Y, Zhang W-H. Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. Planta. 2011;234(2):331–45.

11. Arai-Sanoh Y, Takai T, Yoshinaga S, Nakano H, Kojima M, Sakakibara H, et al. Deep rooting conferred by DEEPER ROOTING 1 enhances rice yield in paddy fields. Sci Rep. 2014;4:5563.

12. Rogers ED, Benfey PN. Regulation of plant root system architecture: Implications for crop advancement. Curr Opin Biotechnol [Internet]. 2015;32(Figure 1):93–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.015

13. Zhang T-Q, Chen Y, Liu Y, Lin W-H, Wang J-W. Single-cell transcriptome atlas and chromatin accessibility landscape reveal differentiation trajectories in the rice root. Nat Commun. 2021;12(1):1–12.

14. Kawai T, Shibata K, Akahoshi R, Nishiuchi S, Takahashi H, Nakazono M, et al. WUSCHEL-related homeobox family genes in rice control lateral root primordium size. Proc Natl Acad Sci. 2022;119(1):e2101846119.

15. Zandi M, Hosseini R, Mohsenpour M, HOSSEINI SG, Ghareyazie B. Transformation of DRO1, OsNAC5, OsEXPA8 genes in order to improve rice root architecture modification and improved drought tolerance in rice. 2019;

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

17. An G, Watson BD, Chiang CC. Transformation of tobacco, tomato, potato, and Arabidopsis thaliana using a binary Ti vector system. Plant Physiol. 1986;81(1):301–5.

18. Chamani Mohasses F, Mousavi Pakzad SM, Moatamed E, Entesari M, Bidadi H, Molaahmad Nalousi A, et al. Efficient genetic transformation of rice using Agrobacterium with a codon-optimized chromoprotein reporter gene (ChromoP) and introducing an optimized iPCR method for transgene integration site detection. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2024;156(1):5.

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

20. Mohammadizadeh N, Tohidfar M, Mohsenpour M. Agrobacterium-Mediated Transformation of Wheat (Triticum Aestivum) Using Chitinase and Glucanase Genes. 2010;

21. Raufi A, Tohidfar M, Soluki M, Mohsenpour M. Isolation and Cloning of Two Genes from PR1 Family and

Construction of Treble Plasmids Containing 3 Groups of Genes for Producing Transformed Plants Resistant to Fungal Diseases. J Agric Biotechnol. 2012;3(2):27–46.

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

23. Mohkami A, Marashi H, Shahriary Ahmadi F, Tohidfar M, Mohsenpour M. Evaluation of Agrobacterium-mediated Transformation of Chlamydomonas reinhardtii using a Synthetic amorpha-4, 11-diene Synthase Gene. J Cell Mol Res. 2015;7(1):53–8.

24. Mohsenpour M, Tohidfar M. Genetic Engineering of Plant Nuclear Genome for Specific gene Expression in Chloroplast Using Design and Transformation of Hybrid Sigma Factor. Crop Biotechnol. 2011;

25. Saboori-Robat E, Solouki M, Habashi AA, Moshenpour M, Emamjomeh A. Design and construction of two-genes construct consists of 11 kDa delta zein and EPSPS genes in order to transform soybean to improve the methionine content and induce resistance to glyphosate herbicide. Crop Biotechnol. 2019;9(27):69–77.

26. Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, De Palma JM, Liwanag EA, et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA(b) gene. Mol Breed. 1997;3(5):401–14.

27. Bennett J, Cohen MB, Katiyar SK, Ghareyazie B, Khush GS. Enhancing insect resistance in rice through biotechnology. Adv insect Control role transgenic plants. 1997;75–93.

28. Kazemi M, Ghorbanzadeh Z, Pourhang L, Mousavi pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, et al. Rice genetic engineering using transformation of Deeper Rooting1 and Phosphorus-Starvation Tolerance1 genes. Agric Biotechnol J [Internet]. 2022;14(1):1–20. Available from: https://jab.uk.ac.ir/article_3211.html

29. Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamouti M, Pourhang L, Mousavi Pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, et al. Identificatioan and investigation of DRO1 gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with OsCKX4 gene to improve root structure. Crop Biotechnol [Internet]. 2022;11(36):49–62. Available from: https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/article_8590.html

30. Pourhang L, Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamuti M, Mousavi Pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, et al. Multi-gene transformation evaluation of a serine/threonine protein kinase with a gene from the cytokinin oxidase/dehydrogenase family and a transcription factor induced under stress from the NAM-ATAF-CUC family to rice. Modares J Biotechnol. :0.

31. Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, et al. Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science (80-). 2000;287(5451):303–5.

32. Li L, Zhou Y, Cheng X, Sun J, Marita JM, Ralph J, et al. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(8):4939–44.

33. Mohsenpour M, Kahak S, Ghareyazie B.

Genetic Engineering and Food Security. Strateg Res J Agric Sci Nat Resour [Internet]. 2018;3(2):195–208. Available from: http://srj.asnr.ias.ac.ir/article_112926.html

34. https://agrilib.areeo.ac.ir/book_11874.html