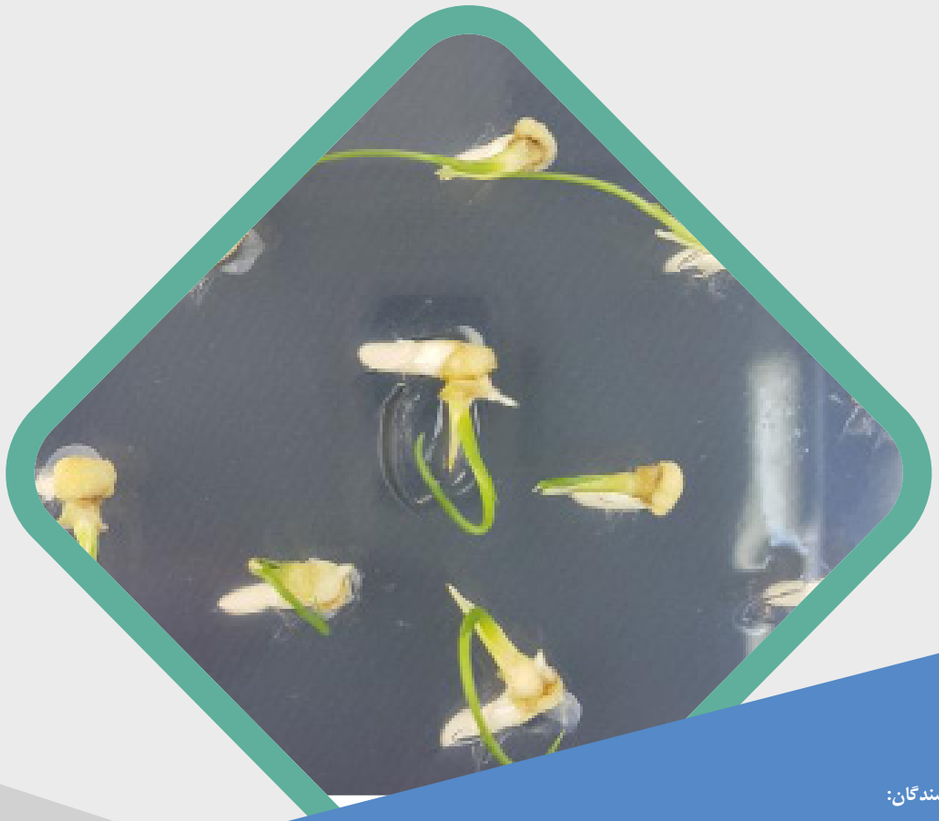
ABRII
پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

دستورالعمل فنی

باززایی بذر رسیده برنج با هدف انتقال ژن توسط اگروباکتریوم



امنیت غذایی یکی از مهم‌ترین چالش‌های بشر برای مقابله با تهدیدهای تغییرات اقلیمی و رشد جمعیت است. نوآوری‌های علمی در زمینه زیست‌فناوری گیاهی می‌تواند برای مقابله با این چالش‌ها، ابزار قدرتمندی ارائه دهد. اصلاح‌گران سنتی با استفاده از دانش ژنتیک به موفقیت‌هایی در بهبود کمی و کیفی محصولات زراعی دست یافته‌اند، ولی روش‌های سنتی اصلاح گیاهان با محدودیت‌هایی مواجه است. مهندسی ژنتیک ابزاری مکمل اما قدرتمند است که می‌تواند جهت رفع این محدودیت‌ها به به‌نژادگران کمک کند. برنج (*Oryza sativa*) غذای اصلی بیش از ۵۰ درصد مردم در جهان است و ۹۰ درصد برنج جهان در آسیا کشت می‌شود. مهندسی ژنتیک می‌تواند به بهبود خصوصیات این محصول کمک کند. در اولین تلاش‌ها برای انتقال ژن به برنج از روش‌های مستقیم مثل الکتروپوریشن، PEG یا بمباران ذره‌ای استفاده می‌شد، ولی امروزه انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم نسبت به سایر تکنیک‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته و دارای مزایای متعددی است. در مطالعات اخیر از جنین نارس و کالوس جنین‌زای حاصل از بذرهای رسیده به‌عنوان ریزنمونه برای انتقال ژن به برنج با کمک اگروباکتریوم استفاده شده است که با وجود موفقیت‌های به‌دست آمده با مشکلاتی نیز مواجه می‌باشد. دستورالعمل حاضر مبتنی بر تجربه نویسندگان در تراریختی برنج ایرانی رقم هاشمی که از برنج‌های پرطرفدار تجاری ایران است، ارائه شده است. در این دستورالعمل انتقال ژن به بذر رسیده برنج با استفاده از اگروباکتریوم و به‌روش ساده‌تری از گزارش‌های قبلی بیان شده، به‌طوری‌که مشکلات روش جنین نارس را نداشته و در انتقال ژن‌های مختلف (چندین سازه) موفق عمل کرده است. در این روش از سویه اگروباکتریوم EHA105 و نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین استفاده شده است و مانند روش انتقال به کالوس جنین‌زا، نیاز به انتظار برای دستیابی به کالوس دارای رشد مناسب و جنین‌زای حاصل از بذر رسیده برای استفاده به عنوان ریزنمونه وجود ندارد. استفاده از این دستورالعمل می‌تواند در مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی برنج برای ایجاد صفات مطلوب در این محصول مؤثر باشد.

نویسندگان:
مطهره محسن پور
سید محمد موسوی پاکزاد
الهه معتمد

کرج، بلوار شهید فهمیده، مجموعه موسسات تحقیقاتی کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی
تلفن: ۳۲۷۰۱۰۳۵ - ۰۲۶ فکس: ۳۲۷۰۱۰۶۷ - ۰۲۶
۳۲۷۰۳۵۳۶ - ۰۲۶ کد پستی: ۳۱۳۵۹۳۳۱۵۲

Shahid Fahmideh Blvd, Karaj, Iran.
Tel: +9826-3270 1035 Fax: +9826-3270 1067
+9826-3270 3536 Postcode: 3135933152

web: www.abrii.ac.ir e-mail: info@abrii.ac.ir

بسم الله الرحمن الرحیم

نوع نشریه: دستورالعمل فنی
نام نشریه: دستورالعمل باززایی بذر رسیده برنج با هدف انتقال ژن توسط اگروباکتریوم
نویسندگان: مطهره محسن‌پور، سید محمد موسوی پاکزاد، الهه معتمد
ویراستار ادبی: آمنه ناصری، منظر حیدری
طراحی: محمد قفلگری جداری، منظر حیدری
تهیه شده در: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی
شمارگان: ۳۰
نوبت انتشار: ۱
سال انتشار: ۱۴۰۲
مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۶۴۱۹۵ به تاریخ ۱۴۰۲/۰۶/۲۶ است.

دستورالعمل باززایی بذر رسیده برنج با هدف انتقال ژن توسط اگروباکتریوم

مطهره محسن‌پور، سید محمد موسوی پاکزاد، الهه معتمد

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱- مقدمه ۱

۲- مواد و روش‌ها ۳

۲-۱- ضدعفونی کردن بذر ۳

۲-۲- کشت بذور در محیط کشت پیش تلقیح ٤

۲-۳- آماده‌سازی باکتری ٦

۲-٤- تلقیح ۷

۲-۵- انتقال به محیط استراحت ۸

۲-٦- انتقال به محیط انتخابی ۱۰

۲-۷- انتقال به محیط پیش‌باززایی ۱۲

۲-۸- انتقال به محیط باززایی و ریشه‌زایی ۱۵

۲-۹- انتقال به محلول یوشیدا و استقرار در خاک ۱۸

۲-۱۰- آنالیز مولکولی ۲۳

۳- نتیجه‌گیری ۲٤

منابع ۲٤

چکیده

امنیت غذایی یکی از مهم‌ترین چالش‌های بشر برای مقابله با تهدیدهای تغییرات اقلیمی و رشد جمعیت است. نوآوری‌های علمی در زمینه زیست‌فناوری گیاهی می‌تواند برای مقابله با این چالش‌ها، ابزار قدرتمندی ارائه دهد. اصلاح‌گران سنتی با استفاده از دانش ژنتیک به موفقیت‌هایی در بهبود کمی و کیفی محصولات زراعی دست‌یافته‌اند. ولی روش‌های سنتی اصلاح گیاهان با محدودیت‌هایی مواجه است. مهندسی ژنتیک ابزاری مکمل اما قدرتمند است که می‌تواند جهت رفع این محدودیت‌ها به به‌نژادگران کمک کند. برنج (*Oryza sativa*) غذای اصلی بیش از ۵۰ درصد مردم در جهان است و ۹۰ درصد برنج جهان در آسیا کشت می‌شود. مهندسی ژنتیک می‌تواند به بهبود خصوصیات این محصول کمک کند. در اولین تلاش‌ها برای انتقال ژن به برنج از روش‌های مستقیم مثل الکتروپوریشن، PEG یا بمباران ذره‌ای استفاده می‌شد ولی امروزه انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم نسبت به سایر تکنیک‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته و دارای مزایای متعددی است. در مطالعات اخیر برای انتقال ژن به برنج با کمک اگروباکتریوم از جنین نارس و کالوس جنین‌زای حاصل از بذرهای رسیده به‌عنوان ریزنمونه استفاده شده است، اما با وجود موفقیت‌هایی که به‌دست‌آمده با مشکلاتی نیز مواجه هستند. دستورالعمل حاضر مبتنی‌بر تجربه نویسندگان در تراریختی برنج ایرانی برای رقم هاشمی که از برنج‌های پرطرفدار تجاری ایران است، ارائه شده، در این دستورالعمل انتقال ژن به بذر رسیده برنج با استفاده از اگروباکتریوم و به‌روش ساده‌تری از گزارش‌های قبلی بیان شده، به‌طوری‌که مشکلات روش جنین نارس را نداشته و در انتقال ژن‌های مختلف (چندین سازه) موفق عمل کرده است. در این روش از سویه اگروباکتریوم EHA105 و نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین استفاده شده و مانند روش انتقال به کالوس جنین‌زا نیاز به انتظار برای دستیابی به کالوس دارای رشد مناسب و جنین‌زای حاصل از بذر رسیده برای استفاده به‌عنوان ریزنمونه وجود ندارد. استفاده از این دستورالعمل می‌تواند در مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی برنج به‌منظور ایجاد صفات مطلوب در این محصول مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: باززایی بذر رسیده، برنج، انتقال ژن، اگروباکتریوم

مقدمه

مهندسی ژنتیک، ویرایش ژنومی و تولید محصولات تراریخته از روش‌های نوآورانه و مؤثر برای بهبود ویژگی‌های زراعی و تغذیه‌ای و خصوصیات کمی و کیفی محصولات، تحمل تنش‌های محیطی، افزایش تولید محصولات غذایی و افزایش عملکرد محصولات هستند که می‌توانند به بهبود ویژگی‌های محصولات زراعی از جمله برنج در کنار سایر روش‌های اصلاحی رایج کمک کنند. در بیش از دو دهه اخیر گیاهان تراریخته مقاوم به آفات و علف‌کش با جلوگیری از خسارت گیاه در شرایط تنش‌های زیستی به حفظ عملکرد گیاه کمک کرده و با هزینه کمتر برای کشاورزان، حفاظت محیط‌زیست و سلامت انسان را نیز در نتیجه مصرف کمتر سموم و آفت‌کش‌های شیمیایی باعث شده‌اند. همچنین، جنبه دیگری از پتانسیل این فناوری، افزایش عملکرد محصولات زراعی و بهبود خواص تغذیه‌ای یا سایر ویژگی‌های مطلوب مورد نظر با انتقال ژن‌های مناسب است. ارائه دستورالعمل‌های مناسب که در انتقال ژن‌های هدف به محصولات گیاهی استفاده شود، گام اولیه مؤثر برای استفاده از پتانسیل مهندسی ژنتیک در بهبود ویژگی‌های محصولات خواهد بود.

در اولین تلاش‌ها برای انتقال ژن به برنج در اواخر سال‌های دهه ۱۹۸۰ و اوایل ۱۹۹۰ از روش‌های مستقیم مثل الکتروپوریشن، PEG یا بمباران ذره‌ای استفاده می‌شد و اولین برنج تراریخته رهاسازی شده (رخداد BGH-00827-7) نیز با روش تفنگ ژنی به‌دست آمده است (Ghareyazie et al., 1997). روش‌هایی که از *Agrobacterium tumefaciens* استفاده می‌کردند در اوایل سال ۱۹۹۰ ایجاد شدند. از جمله مزایای استفاده از اگروباکتریوم برای انتقال ژن می‌توان به کارایی بالای انتقال ژن، الحاق نسخه‌های کمتری از T-DNA به داخل کروموزوم‌ها، انتقال قطعات بزرگ‌تری از DNA با ابتدا و انتهای مشخص و بازآرایی (Rearrangement) کمتر، اشاره کرد. بنابراین، انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم نسبت به سایر تکنیک‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعات اخیر از جنین نارس برنج و بذرهای رسیده به‌عنوان ریزنمونه برای انتقال ژن به کمک اگروباکتریوم استفاده شده است. نتایج نشان می‌دهند جنین‌های نارس در انتقال ژن موفق‌تر و کاراتر عمل می‌کنند، اما مشکلات کار کردن با آن‌ها مانند نیاز به کشت مکرر گیاه در تمام فصول (Staggered planting) برای در دسترس بودن ریزنمونه و وقت‌گیر و خسته‌کننده بودن مرحله جداسازی جنین نارس

باعث شده تمایل پژوهشگران به استفاده از بذر رسیده به‌عنوان ریزنمونه برای انتقال ژن، بیشتر باشد. بذور رسیده به هر تعداد که نیاز باشد همیشه در دسترس هستند و می‌توان آن‌ها را تا مدت طولانی در آزمایشگاه نگهداری کرد ولی جنین‌های نارس هربار به تعداد محدود در دسترس بوده و باید در بازه زمانی بسیار کوتاهی استفاده شوند، اما استفاده از جنین‌های نارس به‌دلیل مزیت کارایی بالاتر در انتقال ژن (Hiei and Komari., 2008; Slamet-Loedin et al., 2014) بیشتر مورد توجه پژوهشگران بوده است. این مزیت به‌ویژه هنگامی‌که استفاده از آن‌ها برای تراریزش برنج‌های ایندیکا با موفقیت همراه بود بیشتر مشخص شد، زیرا در گزارش‌ها به مشکل بودن باززایی و پاسخ به انتقال ژن این برنج‌ها همیشه اشاره شده است. دستورالعملی که در این گزارش شرح داده می‌شود براساس تجربه نویسندگان در تراریختی برنج ایرانی رقم هاشمی است که از برنج‌های پرطرفدار تجاری ایران است. این گروه در سال‌های قبل از پروتکل‌هایی که از جنین نارس (Slamet-Loedin et al., 2014) و کالوس جنین‌زای حاصل از بذر رسیده (Ozawa., 2012) گزارش شده بود نیز برای انتقال ژن به این رقم برنج به روش اگروباکتریوم استفاده کرده است (Zandi et al., 2019, Kazemi et al., 2022, Ghorbanzadeh et al., 2022, Pourhang et al., 2023) و با اعمال تغییراتی موفق بوده‌اند. دستورالعمل حاضر که از بذر رسیده به روش بسیار ساده‌تری استفاده می‌کند، مشکلات روش جنین نارس اسلامت و همکاران (۲۰۱٤) را ندارد و در انتقال ژن‌های مختلف (چندین سازه) موفق عمل کرده است. در این روش مانند روش اوزاوا و همکاران (۲۰۱۲) نیاز به انتظار برای دستیابی به کالوس دارای رشد مناسب و جنین‌زای حاصل از بذر رسیده برای استفاده به‌عنوان ریزنمونه وجود نداشته و از سویه اگروباکتریوم EHA105 و نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین استفاده شده است. انتظار می‌رود این دستورالعمل بتواند در انتقال ژن به سایر ارقام برنج نیز موفق عمل کند.

۲- مواد و روش‌ها

مراحل انتقال ژن به بذر رسیده برنج به شرح زیر است.

۲-۱- ضدعفونی کردن بذر

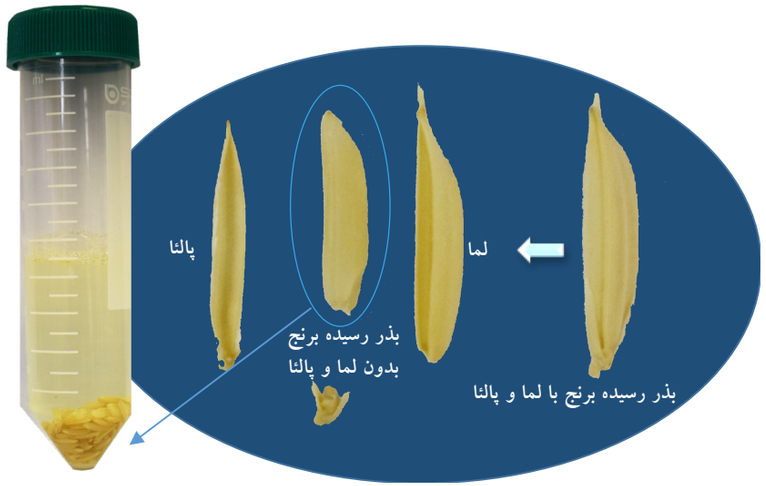
پوسته بذور رسیده برنج شامل لما و پالئا جدا و به شرح زیر ضدعفونی می‌شوند (شکل ۱).

الف) بذور به‌مدت یک دقیقه با اتانول ۷۰ درصد شسته می‌شوند؛

ب) یک‌بار آب‌شویی انجام می‌شود؛

ج) بذور به‌مدت ده دقیقه با هیپوکلریت سدیم پنج درصد حاوی یک قطره توین ۲۰ شسته می‌شوند؛

د) حداقل سه‌بار آب‌شویی انجام می‌شود.



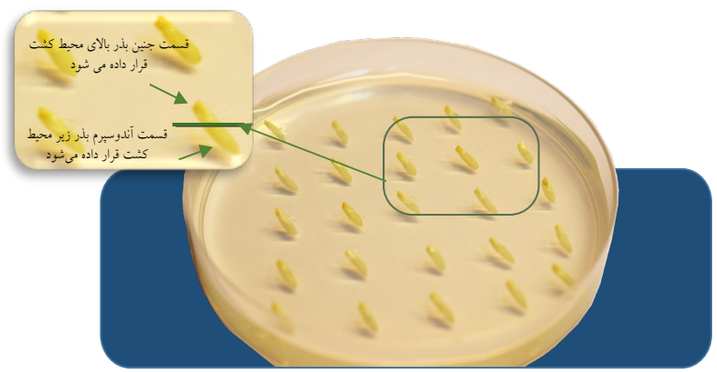
شکل ۱- جداسازی پوسته بذر رسیده برنج برای ضدعفونی. بذر برنج با لما و پالئا (راست)، بذر برنج بدون لما و پالئا (چپ)

۲-۲- کشت بذور در محیط کشت پیش تلقیح

بذور رسیده و استریل شده برنج روی محیط کشت پیش تلقیح (جدول ۱) کشت شده و به‌مدت چهار تا هفت روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نور ممتد قرار داده می‌شوند تا برآمدگی‌های اولیه کالوس مانند از محل جنین تشکیل شود. کشت بذرها باید به‌گونه‌ای انجام شود که آندوسپرم به‌طور کامل در محیط کشت فرو رود اما جنین روی سطح محیط باقی بماند (شکل ۲).

نکته ۱: بذرهای استریل شده قبل از قرار گرفتن در محیط کشت خشک شوند تا کالوس‌های حاصل از آن‌ها آب نیاندازند؛ اگر تعداد بذرها به‌قدری زیاد است که موجب می‌شود جنینی که طی مراحل ضدعفونی بذر، آب جذب کرده و متورم شده است تا زمان انتقال به محیط کشت، آب خود را از دست داده و خشک شود، بهتر است هربار تعداد کمی بذر، ضدعفونی، خشک و به محیط کشت منتقل شود؛ زیرا جنینی که آب جذب کند و دوباره آب از دست دهد ممکن است قوه نامیه خود را از دست بدهد.

نحوه تهیه محلول‌های ذخیره برای تهیه هر محیط کشت در انتهای این دستور العمل (ضمیمه ۱) ارائه شده است.



شکل ۲- تعداد و نحوه قرارگیری بذرهای ضدعفونی شده برنج در محیط کشت پیش تلقیح

جدول ۱- ترکیبات و نحوه تهیه محیط پیش تلقیح و هم‌کشتی

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار در یک لیتر	توضیحات
محیط پیش تلقیح و همکشتی	N6 major 1	۲۰ میلی‌لیتر	– (pH 5.2)
	N6 major 2	۱۰ میلی‌لیتر	– بعد از تنظیم pH مقدار ۵/۵ گرم آگارز نوع I اضافه می‌شود.
	N6 major 3	۱۰ میلی‌لیتر	
	N6 major 4	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 minor 1	۱۰ میلی‌لیتر	– استوسرینگون و تنظیم‌کنندگان رشد بعد از اتوکلاو وقتی دمای محیط کشت به ۵۵ درجه‌سانتی‌گراد رسید اضافه می‌شوند.
	B5 minor 2	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 minor 3	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 minor 4	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 vitamins	۵ میلی‌لیتر	۱۹/۶۲* میلی‌گرم استوسرینگون در یک میلی‌لیتر DMSO حل شده و به ازای هر لیتر محیط کشت یک میلی‌لیتر از آن اضافه می‌شود.
	L-glutamine	۰/۰۰۶ میلی‌گرم	
	Aspartic acid	۰/۰۰۲ میلی‌گرم	
	Argenine	۰/۰۰۱ میلی‌گرم	
	Casamino acid	۵۰۰ میلی‌گرم	
	L-proline	۵۰۰ میلی‌گرم	
	Sucrose	۲۰ گرم	
	D-glucose	۱۰ گرم	
	Acetosyringone	۱۹/۶۲ میلی‌گرم*	
	2,4-D	۲ میلی‌لیتر	
	NAA	۱ میلی‌لیتر	
	BAP	۱ میلی‌لیتر	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (ضمیمه ۱).

۲-۳- آماده‌سازی باکتری

دو تا سه روز قبل از انجام هم‌کشتی، اگروباکتریوم حاوی سازه موردنظر بر روی محیط کشت LB همراه با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب، بسته به نوع سازه و ریف‌آمپی‌سین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت خطی می‌شود. یک ساعت قبل از انجام هم‌کشتی با آگروباکتریوم، حدود یک لوپ پُر از باکتری رشد کرده ازمحیط LB برداشته شده و درون محیط تلقیح حاوی استوسیرینگون (جدول ۲) سوسپانسیون می‌شود. چگالی نوری (OD600nm) سوسپانسیون باکتری روی ۰/۳ تنظیم می‌شود. محلول تلقیح به‌مدت یک ساعت درون انکوباتور تاریک ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده تا برای انتقال ژن آماده شود.

جدول ۲- ترکیبات و نحوه تهیه محیط تلقیح

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار در یک لیتر	توضیحات
محیط تلقیح	B5 Vitamins	۱ میلی‌لیتر	– (pH 5.2)
	AA macro salts stock	۱ میلی‌لیتر	– محیط کشت فیلتر استریل و در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.
	AA iron stock	۱۰ میلی‌لیتر	
	Glycine	۱ میلی‌لیتر	– استوسرینگون درست قبل از استفاده، به میزان ۱۰۰ میکرومولار اضافه می‌شود (۱۹/٦۲ میلی‌گرم استوسرینگون در یک میلی‌لیتر DMSO حل و به ازای هر لیتر محیط کشت یک میلی‌لیتر از آن اضافه می‌شود).
	L-glutamine	۷٦۷ میلی‌گرم	
	Aspartic acid	۲٦۰ میلی‌گرم	
	Casamino acid	۵۰۰ میلی‌گرم	
	Sucrose	۲۰ گرم	
	D-Glucose	۱۰ گرم	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (ضمیمه ۱)

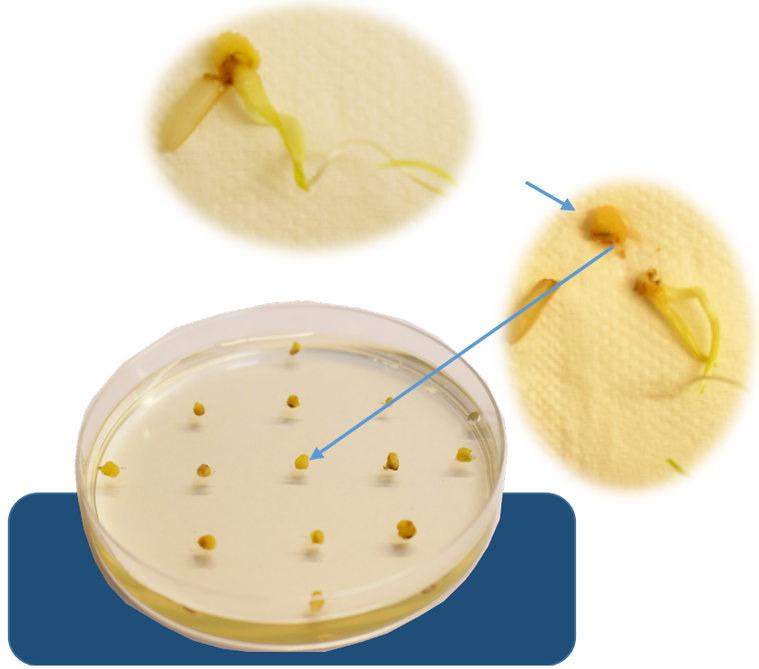
۲-٤- تلقیح

ده میکرولیتر از محلول آگروباکتریوم حاوی پلاسمید به روی برآمدگی‌های ریز کالوس مانند بذوری که چهار تا هفت روز در محیط پیش‌تلقیح کشت شده‌اند چکانیده می‌شود (شکل ۳). ریزنمونه‌های تلقیح شده به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تاریک در محیط هم‌کشتی (جدول ۱) قرار داده می‌شوند.

شکل ۳- بذور برنج در محیط پیش‌کشتی، پس از چهار روز و برآمدگی‌های کالوس اولیه ایجاد شده از قسمت جنین در بذرهای آماده برای تلقیح

۲-۵- انتقال به محیط استراحت

پس از این مدت هر ریز نمونه شامل سه قسمت اصلی کالوس، آندوسپرم و جوانه است که کالوس به‌وسیله اسکالپل و پنس از آندوسپرم و جوانه جدا (شکل ٤) و روی کاغذ صافی استریل، خشک و به محیط استراحت (جدول ۳) انتقال داده می‌شود (در هر پتری‌دیش، حداکثر ۱۵ نمونه قرار داده می‌شود). ریزنمونه‌ها به‌مدت پنج روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نور مداوم (شدت نور ٦۰۰۰-۷۰۰۰ Lux) قرار می‌گیرند.



شکل ٤- نحوه جدا کردن کالوس برنج از آندوسپرم و جوانه و استقرار کالوس‌ها بر روی محیط استراحت

جدول ۳- ترکیبات و نحوه تهیه محیط کشت استراحت برنج

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار در یک لیتر	توضیحات
محیط استراحت	N6 major 1	۲۰ میلی‌لیتر	- (pH 5.8)
	N6 major 2	۱۰ میلی‌لیتر	- بعد از تنظیم pH مقدار ۵ گرم ژلرایت اضافه شود.
	N6 major 3	۱۰ میلی‌لیتر	
	N6 major 4	۱۰ میلی‌لیتر	- تنظیم‌کنندگان رشد بعد از اتوکلاو وقتی دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید اضافه می‌شوند.
	B5 minor 1	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 minor 2	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 minor 3	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 minor 4	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 vitamins	۵ میلی‌لیتر	
	L-glutamine	۳۰۰ میلی‌گرم	
	Casamino acid	۵۰۰ میلی‌گرم	
	L-proline	۵۰۰ میلی‌گرم	
	Mannitol	۳٦ گرم	
	Maltose	۲۰ گرم	
	2,4-D	۱ میلی‌لیتر	
	NAA	۱ میلی‌لیتر	
	BAP	۰/۲ میلی‌لیتر	
	Cefotaxime	۱ میلی‌لیتر	
	Carbenicillin	۱ میلی‌لیتر	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (ضمیمه ۱).

۲-٦- انتقال به محیط انتخابی

پس از رشد کالوس‌ها به اندازه مناسب در محیط استراحت به محیط کشت انتخابی (جدول ٤) حاوی هیگرومایسین B (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شده و در نور ممتد، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ روز نگهداری می‌شوند (مرحله انتخاب اول). سپس، کالوس‌ها تقسیم شده (هر کالوس را می‌توان به ٤ قسمت تقسیم کرد) و روی محیط انتخابی تازه به‌مدت ۱۰ روز قرار داده می‌شوند (مرحله انتخاب دوم). سرانجام در مرحله انتخاب سوم، کالوس‌های جنین‌زا از کالوس‌های سیاه جداسازی و ۱۰ روز دیگر در محیط انتخابی تازه واکشت می‌شوند. قابل ذکر است که کالوس‌های مقاوم طی این مراحل رشد می‌کنند و تعداد کالوس در هر پتری‌دیش از ۱۵ کالوس (مرحله انتخابی اول) تا چهار کالوس (مرحله انتخابی سوم)، بسته به اندازه آن‌ها متغیر است (شکل ۵).

شکل ۵- رشد کالوس‌های تراریخته احتمالی برنج بر روی محیط کشت انتخابی و توقف رشد کالوس‌های غیرتراریخته

جدول ٤- ترکیبات و نحوه تهیه محیط کشت انتخابی برنج

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار در یک لیتر	توضیحات
محیط انتخابی	N6 major 1	۲۰ میلی‌لیتر	(pH 5.8) –
	N6 major 2	۱۰ میلی‌لیتر	
	N6 major 3	۱۰ میلی‌لیتر	– بعد از تنظیم pH مقدار ۵ گرم ژلرایت اضافه شود.
	N6 major 4	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 minor 1	۱۰ میلی‌لیتر	– تنظیم‌کنندگان رشد بعد از اتوکلاو وقتی دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید اضافه می‌شوند.
	B5 minor 2	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 minor 3	۱۰ میلی‌لیتر	
	B5 minor 4	۵ میلی‌لیتر	
	B5 vitamins	۵ میلی‌لیتر	
	L-glutamine	۳۰۰ میلی‌گرم	
	Casamino acid	۵۰۰ میلی‌گرم	
	L-proline	۵۰۰ میلی‌گرم	
	Mannitol	۳٦ گرم	
	Maltose	۲۰ گرم	
	2,4-D	۱ میلی‌لیتر	
	NAA	۱ میلی‌لیتر	
	BAP	۰/۲ میلی‌لیتر	
	Cefotaxime	۱ میلی‌لیتر	
	Carbenicillin	۱ میلی‌لیتر	
	Hygromycin	۰/٦ میلی‌لیتر	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (ضمیمه ۱).

۲-۷- انتقال به محیط پیش‌باززایی

کالوس‌های مقاوم جنین‌زا در محیط کشت انتخابی به محیط کشت پیش‌باززایی (جدول ۵) منتقل و به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نور ممتد نگهداری می‌شوند. هرچه تعداد کمتری نمونه در هر محیط کشت قرار داده شود، احتمال باززایی به‌دلیل دسترسی بهتر به مواد غذایی موجود در محیط کشت، بیشتر می‌شود (شکل ٦).

شکل ٦- باززایی کالوس‌های تراریخته احتمالی برنج در محیط پیش باززایی

جدول ۵- ترکیبات و نحوه تهیه محیط کشت پیش باززایی برنج

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار در یک لیتر	توضیحات
محیط پیش‌باززایی	B5 minor	۱۰ میلی‌لیتر	– (pH 5.8)
	MS1	۲۰ میلی‌لیتر	– بعد از تنظیم pH مقدار ۵ گرم ژلرایت اضافه شود.
	MS2	۱۰ میلی‌لیتر	
	MS3	۱۰ میلی‌لیتر	
	MS4	۱۰ میلی‌لیتر	– تنظیم‌کنندگان رشد بعد از اتوکلاو وقتی دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید اضافه می‌شوند.
	MS vitamins	۵ میلی‌لیتر	
	Maltose	۳۰ گرم	
	Sorbitol	۲۰ گرم	
	NAA	۵ میلی‌لیتر	
	Kinetin	۲ میلی‌لیتر	
	Cefotaxime	۱ میلی‌لیتر	
	Hygromycin	۱ میلی‌لیتر	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (ضمیمه ۱).

۲-۸- انتقال به محیط باززایی و ریشه‌زایی

کالوس‌های مناسب دارای جوانه‌های ریز در محیط کشت پیش‌باززایی انتخاب و به محیط باززایی و سپس به محیط توسعه ریشه منتقل می‌شوند (جدول ٦) تا برای انتقال به محلول یوشیدا و در نهایت خاک آماده شوند (شکل ۷).

جدول ٦- ترکیبات و نحوه تهیه محیط پیش تلقیح برنج

نوع محیط کشت	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار در یک لیتر	توضیحات
محیط باززایی	B5 minor	۱۰ میلی‌لیتر	– (pH 5.8)
	MS1	۲۰ میلی‌لیتر	– بعد از تنظیم pH مقدار ۳ گرم ژلرایت اضافه شود.
	MS2	۱۰ میلی‌لیتر	
	MS3	۱۰ میلی‌لیتر	
	MS4	۱۰ میلی‌لیتر	– تنظیم‌کنندگان رشد بعد از اتوکلاو وقتی دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید اضافه می‌شوند.
	MS vitamins	۵ میلی‌لیتر	
	Sucrose	۳۰ گرم	
	NAA	۱ میلی‌لیتر	
	Kinetin	۲ میلی‌لیتر	
	Cefotaxime	۱ میلی‌لیتر	
	Hygromycin	۱ میلی‌لیتر	
محیط توسعه ریشه	B5 minor	۱۰ میلی‌لیتر	– (pH 5.8)
	MS1	۲۰ میلی‌لیتر	
	MS2	۱۰ میلی‌لیتر	– بعد از تنظیم pH مقدار ۲ گرم ژلرایت اضافه شود.
	MS3	۱۰ میلی‌لیتر	
	MS4	۱۰ میلی‌لیتر	
	MS vitamins	۵ میلی‌لیتر	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (ضمیمه ۱).

شکل ۷- استقرار جوانه‌های ریز حاصل از کالوس‌های برنج در محیط باززایی (سمت راست)، رشد جوانه‌ها در محیط باززایی پس از ده روز (وسط) و استقرار گیاهچه در محیط توسعه ریشه (سمت چپ)

۲-۹- انتقال به محلول یوشیدا و استقرار در خاک

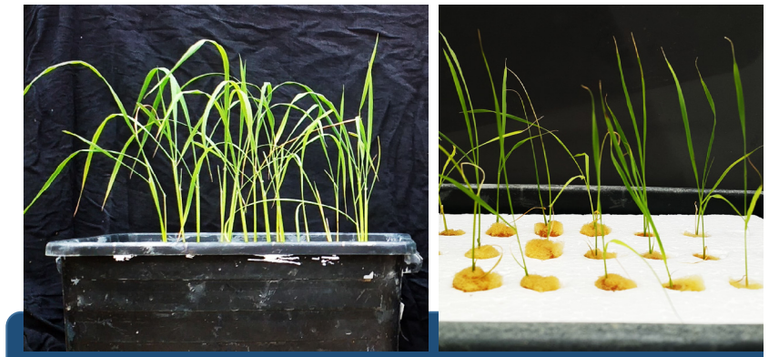
گیاهچه‌های درون لوله پس از ده روز دارای ریشه و اندام هوایی مناسبی برای انتقال به محلول یوشیدا (محلول هیدروپونیک) خواهند بود. استقرار گیاهچه‌های برنج در محلول یوشیدا ضمن ایجاد سازگاری با محیط خارج از شیشه، فرصت رشد کافی آن‌ها را قبل از انتقال به گلدان فراهم می‌کند. محلول یوشیدا (جدول ۷) داخل یک ظرف با اندازه مناسب ریخته شده و از یک شناور یا یونولیت دارای حفره‌های مناسب برای استقرار گیاهچه‌ها استفاده می‌شود. هر گیاهچه درون یکی از حفره‌ها به کمک تکه‌ای ابر استقرار می‌یابد، به‌طوری‌که پس از قرار دادن شناور روی محلول یوشیدا، ریشه‌ها درون محلول قرار گیرند. در هفته اول استقرار، pH هر روز کنترل شود، پس از آن می‌توان هفته‌ای دوبار pH را تنظیم نمود. محلول یوشیدا باید هر هفته تعویض و محلول تازه در اختیار گیاهان قرار داده شود (شکل ۸).

پس از گذشت چهار هفته از استقرار گیاهچه‌های برنج در محلول یوشیدا می‌توان آن‌ها را به گلدان انتقال داد. به این منظور گلدان‌هایی که به نسبت ۲ به ۱ از خاک و پیت ماس پُر شده از قبل آبیاری کرده، سپس حفره‌ای در گل حاصل ایجاد و گیاهچه درحالی‌که توسط انگشتان دست حفاظت می‌شود داخل گل کشت خواهد شد. لازم است قسمت طوقه گیاهچه زیر سطح خاک قرارگیرد، این‌کار باعث می‌شود ریشه‌ها از قسمت طوقه رشد کرده و موجب قوی‌تر شدن گیاه می‌شود (شکل ۹).

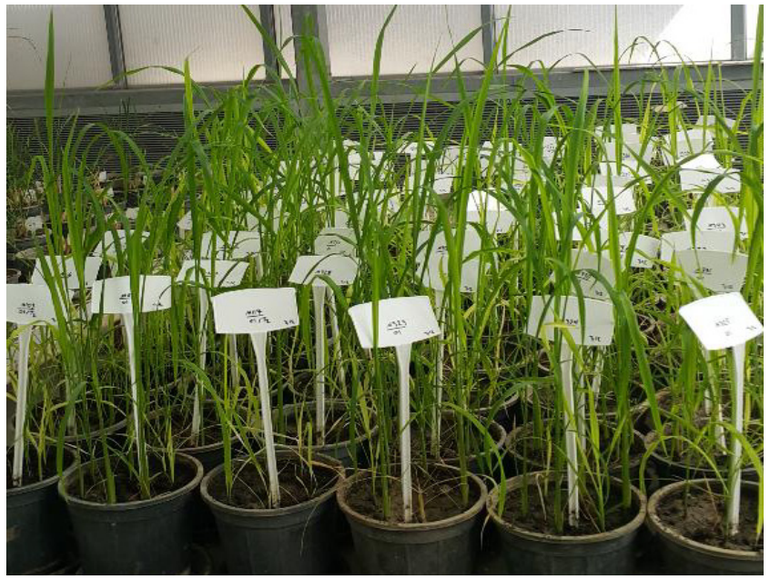
جدول ۷- ترکیبات و نحوه تهیه محلول یوشیدا برای برنج

نوع محیط کشت	نام محلول ذخیره	محلول ذخیره یا ماده شیمیایی	مقدار در یک لیتر	توضیحات
محلول یوشیدا	A	NH_4NO_3	٤٥/٧ گرم	- هر یک از محلول‌های ذخیره در حجم یک لیتر تهیه می‌شوند.
	B	$NaH_2PO_4.2H_2O$	٢٠/١٥ گرم	
	C	K_2SO_4	٣٥/٧ گرم	- برای تهیه محلول F، اجزای این محلول ذخیره به‌ترتیب در مقداری آب مقطر حل می‌شود. سپس، ٥٠ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ (H_2SO_4) به آن‌ها اضافه و با آب مقطر استریل به حجم یک لیتر رسانده می‌شود.
	D	$CaCl_2$	٤٤/٣ گرم	
	E	$MgSO_4.7H_2O$	١٦٢ گرم	
	F	$MnCl_2.4H_2O$	٧٥٠ میلی‌گرم	- به ازای هر چهار لیتر محلول یوشیدا ٥ میلی‌لیتر از هرکدام از محلول‌های ذخیره اضافه و pH نهایی روی ٥ تا ٥/٥ تنظیم می‌شود.
		$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	٣٧ میلی‌گرم	
		H_3BO_3	٤٦٧ میلی‌گرم	
		$ZnSO_4.7H_2O$	١٧/٥ میلی‌گرم	
		$CuSO_4.5H_2O$	١٥/٥ میلی‌گرم	
		$FeCl_3.6H_2O$	٣/٨٥ گرم	
		Citric Acid H_2O	٥/٩٥ گرم	

ترکیبات و نحوه تهیه محلول‌های ذخیره در انتهای دستورالعمل آورده شده است (ضمیمه ۱).



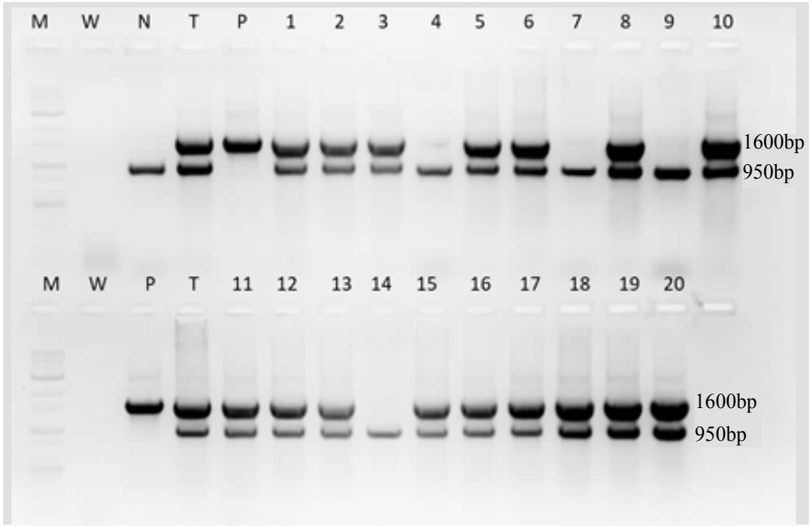
شکل ۸- گیاهچه‌های برنج پس از انتقال ژن در محیط یوشیدا



شکل ۹- گیاهچه‌های برنج پس از انتقال ژن در گلخانه مخصوص گیاهان تراریخته پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

۲-۱۰- آنالیز مولکولی

گیاهان حاصل از مراحل انتقال ژن پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مختص سازه و آغازگرهای ناحیه‌ای از ژنوم برنج (RG100) به‌عنوان ژن کنترل داخلی، تجزیه و تحلیل می‌شوند. در تولید گیاهان تراریخته، آنالیزهای دقیق‌تری نیز برای اثبات الحاق تراژن(ها) و بررسی ایجاد صفت موردنظر در مراحل بعدی تحقیق انجام می‌شود (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای گیاهان برنج تراریخته تولید شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی با استفاده از دستورالعمل حاضر با آغازگرهای مختص سازه (حاوی ژن تحمل به علف‌کش: باند مورد انتظار حدود ۱۶۰۰ bp) و آغازگرهای کنترل داخلی ژنوم برنج (RG100: باند مورد انتظار حدود ۹۵۰ bp) با الگوی DNA استخراج شده از ۲۰ گیاه برنج در نسل در حال تفرق T1؛ نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ که حضور هر دو باند مربوط به تراژن و کنترل داخلی را نشان می‌دهند، تراریخته هستند؛ نمونه‌های شماره ۴، ۷، ۹ و ۱۴ که تنها باند کنترل داخلی را نشان می‌دهند غیرتراریخته هستند؛ M، نشانگر اندازه وزن ملکولی (1Kb Plus-Biofact company)؛ P، پلاسمید (کنترل مثبت)؛ T، گیاه تراریخته تأیید شده به‌عنوان کنترل مثبت؛ N، گیاه شاهد غیرتراریخته به‌عنوان کنترل منفی؛ W، کنترل بدون الگو (آب)؛ سایر چاهک‌ها گیاهان برنج حاصل از انتقال ژن در نسل T1.

ضمیمه ۱

مواد مورد نیاز و محلول‌های ذخیره

محلول‌های ذخیره مورد نیاز در انتقال ژن به بذر رسیده برنج در جدول ۸ نشان داده شده است.

جدول ۸- محلول‌های ذخیره برای تهیه محیط‌های کشت برنج

محلول ذخیره (مقدار)	ترکیبات	وزن
N6 Major 1 (یک لیتر)	KNO_3	۱۴۱/۵ گرم
N6 Major 2 (یک لیتر)	$MgSO_4.7H_2O$ $(NH_4)_2SO_4$)	۱۸/۵ گرم ۴۶/۳ گرم
N6 Major 3 (یک لیتر)	KH_2PO_4	۴۰ گرم
N6 Major 4 (یک لیتر)	$CaCl_2.2H_2O$	۱۶/۶ گرم
B5 Minor 1 (یک لیتر)	$FeSO_4.7H_2O$ $Na_2EDTA.2H_2O$	۲/۷۸۵ گرم ۳/۷۲۵ گرم
B5 Minor 2 (یک لیتر)	$MnSO_4.4H_2O$ $ZnSO_4.H_2O$ H_3BO_3	۱ گرم ۰/۲ گرم ۰/۳ گرم
B5 Minor 3 (یک لیتر)	KI	۰/۰۷۵ گرم
B5 Minor 4 (یک لیتر)	$CuSO_4.5H_2O$ $Na_2MoO_4.2H_2O$ $CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۰۲۵ گرم ۰/۰۲۵ گرم ۰/۰۰۲۵ گرم

محلول ذخیره (مقدار)	ترکیبات	وزن
B5 Vitamins (۱۰۰ میلی‌لیتر)	Thiamin HCL	۲۰۰ میلی‌گرم
	Pyridoxine HCl	۲۰ میلی‌گرم
	Nicotinic acid	۲۰ میلی‌گرم
	Myoinositol	۲۰۰۰ میلی‌گرم
AA macro salts (یک لیتر)	$CaCl_2.2H_2O$	۱/۵ گرم
	$MgSO_4.7H_2O$	۲/۴۹ گرم
	$NaHPO_4.2H_2O$	۱/۷ گرم
	KCl	۲۹/۵ گرم
AA micro salts (یک لیتر)	$CoCl_2.6H_2O$	۲۵ میلی‌گرم
	$CuSO_4.5H_2O$	۲۵ میلی‌گرم
	H_3BO_3	۳۰۰۰ میلی‌گرم
	KI	۷۵۰ میلی‌گرم
	$MnSO_4$	۸/۹ میلی‌گرم
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۲۵۰ میلی‌گرم
	$ZnSO_4.7H_2O$	۲۰۰۰ میلی‌گرم
AA iron stock (یک لیتر)	$FeSO_4.7H_2O$	۲/۷۸ گرم
	$Na_2EDTA.2H_2O$	۳/۷۳ گرم
Glycine (یک لیتر)	Glycine	۵/۷ گرم
MS1 (یک لیتر)	KNO_3	۹۵ گرم
	NH_4NO_3	۸۲/۵ گرم
MS2 (یک لیتر)	$MgSO_4.H_2O$	۳۷ گرم
	$MnSO_4.4H_2O$	۲/۲۳ گرم
	$ZnSO_4.7H_2O$	۰/۸۶ گرم
	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۰۲۵ گرم

محلول ذخیره (مقدار)	ترکیبات	وزن
MS3 (یک لیتر)	$CaCl_2.2H_2O$	٤٤ گرم
	KI	۰/۰۸۳ گرم
	$CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۰۲۵ گرم
MS4 (یک لیتر)	KH_2PO_4	۱۷ گرم
	H_3BO_3	۰/٦۲ گرم
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۲۵ گرم
MS vitamins (۱۰۰ میلی‌لیتر)	Nicotinic acid	۱۰ میلی‌گرم
	Pyridoxine HCl	۱۰ میلی‌گرم
	Thiamine HCl	۲ میلی‌گرم
	Glycine	٤۰ میلی‌گرم
	Myoinositol	۲۰۰۰ میلی‌گرم
BAP (۱۰ میلی‌لیتر)	۱۰ میلی‌گرم	۱۰ میلی‌گرم BAP را در ۲۰۰ میکرولیتر NaOH یک نرمال حل کرده و با آب استریل به حجم رسانده می‌شود، سپس فیلتر استریل کرده و در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.
2,4-D (۵۰ میلی‌لیتر)	۵۰ میلی‌گرم	۵۰ میلی‌گرم 2,4-D را در ۲ میلی‌لیتر اتانول ۹٦ درصد حل کرده و با آب استریل به حجم رسانده می‌شود، سپس فیلتر استریل کرده و در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.
Kinetin (۲۵ میلی‌لیتر)	۲۵ میلی‌گرم	۲۵ میلی‌گرم kinetine را در NaOH یک نرمال حل کرده و با آب استریل به حجم رسانده می‌شود، سپس فیلتر استریل کرده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

محلول ذخیره (مقدار)	ترکیبات	وزن
NAA (۲۰ میلی‌لیتر)	۲۰ میلی‌گرم	۲۰ میلی‌گرم NAA را در NaOH یک نرمال حل کرده و با آب استریل به حجم رسانده می‌شود، سپس فیلتر استریل کرده و در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.
Carbenicillin (۱۰ میلی‌لیتر)	۱ گرم	یک گرم کربنی سیلین را در آب استریل حل و فیلتر استریل کرده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.
Cefotaxime sodium (۵۰ میلی‌لیتر)	۵ گرم	پنج گرم سفوتاکسیم را در چهار میلی‌لیتر آب استریل حل و فیلتر استریل کرده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.
Hygromycine B	۵۰ میلی‌گرم در لیتر	

سایر محلول‌های ذخیره در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند.

۳- نتیجه‌گیری

مهندسی ژنتیک در دهه‌های پیش رو به نقش آفرینی خود در تأمین امنیت غذایی ادامه خواهد داد. تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و صفاتی که از دیدگاه مصرف‌کننده جذاب‌تر باشند مانند بهبود ارزش تغذیه‌ای و تولید مواد باارزش پزشکی، صفات نسل آینده مهندسی ژنتیک و تراریخته‌ها را از آن خود خواهد کرد. فناوری‌های جدیدتر مثل روش‌های ویرایش ژنومی، پیشرفت بیشتری خواهد داشت و امنیت غذایی و سلامت انسان و محیط زیست را بیش از پیش متحول خواهد ساخت. استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی در وهله اول نیازمند استفاده از دستورالعملی کارا و تکرارپذیر برای انتقال ژن‌های مطلوب با سازه‌های مهندسی ژنتیک و یا سازه‌های ویرایش ژنومی است. در این گزارش، دستورالعملی برای انتقال ژن به بذر رسیده برنج با استفاده از اگروباکتریوم ارائه شد. این دستورالعمل ساده و تکرارپذیر بوده و در انتقال ژن‌های متعددی در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی موفق عمل کرده است. این روش نسبت به روش تفنگ ژنی بسیار کم هزینه‌تر و دارای کارایی بالاتری است؛ کارایی انتقال ژن با این روش حدود ٤۰ درصد برآورد شده است. همچنین این روش مشکلات استفاده از جنین نارس را در انتقال ژن به برنج منتفی می‌کند. جنین نارس همیشه در دسترس نیست و تهیه آن نیاز به کشت دائم برنج در تمام ایام سال برای دستیابی به ریزنمونه مناسب دارد که کاری وقت‌گیر و جاگیر است زیرا نیاز به تجهیزاتی مثل گلخانه با شرایط مناسب خواهد داشت. همچنین، روش ارائه شده در این دستورالعمل نیاز به انتظار برای دستیابی به کالوس جنین‌زا از بذر رسیده برنج و استفاده از آن به‌عنوان ریزنمونه برای تلقیح را نیز منتفی می‌کند. انتقال ژن به برآمدگی‌های کالوس مانند چهار تا هفت روزه حاصل از بذر رسیده با موفقیت در این روش به‌دست آمده است. استفاده از روش‌های اصلاح سنتی در محصولات زراعی به‌دلیل انتقال تعداد زیادی از ژن‌های نامطلوب به همراه ژن مورد نظر، ممکن است موجب کاهش کیفیت محصول شود. به‌علاوه، روش‌های اصلاح سنتی زمان‌بر و پر هزینه هستند. انتقال ژن به ارقام بازارپسندی مثل برنج رقم هاشمی که مرغوبیت بالایی از نظر عطر و طعم دارد با استفاده از مهندسی ژنتیک باعث می‌شود که چنین صفاتی در گیاهان تراریخته حاصل مانند همتای غیرتراریخته خود حفظ شوند و ویژگی جدیدی حاصل از انتقال یک یا تعداد معدودی ژن مشخص به گیاه اضافه شود

یا ویرایش یک یا چند ژن مشخص در گیاه صورت گیرد. همچنین، محصولات حاصل از مهندسی ژنتیک برخلاف سایر محصولات، تحت آزمایشات ارزیابی احتمال خطر قرار می‌گیرند و اصول ایمنی زیستی به تضمین بهره‌برداری از فواید بیوتکنولوژی مدرن و سلامت انسان و محیط زیست کمک خواهد کرد.

سپاسگزاری

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 شهید را از درگاه پروردگار علیم مسئلت داریم.

منابع

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.

Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamouti M, Pourhang L, Mousavi Pakzad M, Moatamed E, Mapar M, Ebadi AA, Ghaffari MR, Hosseini Salekdeh Gh, Ghareyazie B, Mohsenpour M. 2022. Identificatioan and investigation of *DRO1* gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with *OsCKX4* gene to improve root structure. Crop Biotechnology 11, 49–62.

Hiei Y, Komari T. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. Nature Protocols 3, 824–834.

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

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

Pourhang L, Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamuti, M, Mousavi Pakzad S.M, Moatamed E, Mapar M, Ebadi A.K, Zamani K, Ghareyazie B and Mohsenpour M 2023. 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 Journal of Biotechnology, 14 (1) Under press.

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

Zandi M, Hosseini R, Mohsenpour M, Hosseini Salekdeh Gh, Ghareyazie B. 2019. Transformation of *DRO1*, *OsNAC5*, *OsEXPA8* genes in order to improve rice root architecture modification and improved drought tolerance in rice. Gene Eng Biosafety J 8 (1), 77-89.