مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۱، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۱
صفحه ۱۲۰-۱۰۸

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7

DOR:20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1
2022

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

انتقال ژن *epsps* به نخود به منظور مقاومت به علفکش گلایفوسیت

Transfer of the *epsps* gene to chickpea *(Cicer arietinum)* for resistance to glyphosate herbicide

نسترن هراتی[۱]، نسرین مشتاقی [۲*]، عبدالرضا باقری [۲]، سیدحسن مرعشی[۲]

Nastaran Harati [1], Nasrin Moshtaghi [2*], Abdolreza Bagheri [2], Seyed Hasan Marashi[2]

۱-کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲- هیات علمی گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

1. MSc of Agricultural Biotechnology, 2. Biotechnology and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:*Corresponding Author, Email
moshtaghi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۳)

چکیده

نخود (*Cicer arietinum*) در رقابت با علف‌های هرز بسیار حساس بوده و دچار کاهش عملکرد و کیفیت محصول می‌شود. لذا تولید گیاهان مقاوم به علف‌کش‌های عمومی نظیر گلایفوسیت مفید می‌باشد. در این تحقیق، از *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121 و ژن موتاسیون یافته epsps برای ایجاد مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت استفاده شد که در آن ژن nptII به عنوان گزینشگر تحت پیش‌بر 35S قرار گرفته است. به‌منظور انتقال ژن از محورهای جنینی نخود رقم ثمین و بیونیج استفاده شد. ریزنمونه ها پس از هم‌کشتی با سوسپانسیون باکتری به مدت سه روز در محیط هم‌کشتی B5 قرار گرفت و پس از آن به‌منظور باززایی به محیط کشت MS به همراه غلظت مناسبی از هورمون‌های BAP، Kin و NAA منتقل گردید. درنهایت پس از گزینش‌های متوالی با استفاده از آنتی بیوتیک کانامایسین، ریشه‌زایی و استقرار گیاهان T0 در محیط هیدروپونیک انجام شد و با استفاده از آزمون PCR، در ۱۵گیاه ژن اختصاصی epsps و ژن nptII تکثیر و تراریختگی آنها تأیید شد. عدم آلودگی گیاهان مشکوک به تراریخته با استفاده از آغازگرهای نواحی ITS باکتری و همچنین با بررسی بیان ژن مورد نظر با استفاده از آزمون RT-PCR تأیید شد و درصد تراریختگی در این بررسی ۰/۷۵ درصد بود.

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم،
تراریخته،
علف هرز،
کانامایسین،
مهندسی ژنتیک

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1, 2022

Abstract

Chickpea (*Cicer arietinum*) is very sensitive in competition with weeds and suffers from a decrease in yield and product quality. Therefore, it is useful to produce plants resistant to general herbicides such as glyphosate. In this research, *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 was used. This bacterium contains plasmid pBI121 and mutated *epsps* gene of *Escherichia coli* to create resistance to glyphosate herbicide. In this plasmid *npt*II gene is placed under 35S promoter as a selective gene. In order to transfer the gene, embryonic axes of chickpea varieties (Samin and Bivanij) were used. Chickpea embryonic axes were placed on B5 co-culture medium after co-cultivation with bacterial suspension for 3 days and then transferred to MS culture medium with appropriate concentration of BAP, Kin and NAA hormones for regeneration. Finally, after successive selections using kanamycin antibiotic, rooting and establishment of T0 plants were done in hydroponic environment. Then, PCR amplified *epsps* and *npt*II genes in 15 plants and their transgenecity was confirmed. Non-contamination of DNA in putative transgenic plants was confirmed by using the primers of the bacterial ITS regions. Also the expression of the target gene verified using RT-PCR test and the transgenic percentage was 0.75% in this study.

Keywords: *Agrobacterium*, genetic engineering, kanamycin, transgenic, weed.

مقدمه

گیاهان زراعی و علف‌های هرز از منابع مشترک مانند نور خورشید، گازهای اتمسفری، منابع زیرزمینی و فضا استفاده می‌کنند. بنابراین رقابت، پاسخی قابل پیش‌بینی از موجودات زنده‌ای است که در یک اجتماع هستند و مبارزه‌ای است بین دو موجود برای منابعی محدود که برای رشد آن‌ها ضروری است. رقابت گیاهان و علف‌های هرز باعث تغییر در بهره برداری از منابع مختلف می‌شود و همچنین بر تعاملات پیچیده بین گیاهان و عوامل محیطی تأثیر می‌گذارد. از بین بردن علف‌های هرز در مزارع کشاورزی مؤثرترین و کاربردی‌ترین راه برای کاهش تعرق و در نتیجه‌ی آن ذخیره‌ی آب برای استفاده گیاه مورد نظر است. علف‌های هرز تهاجمی به دلیل استخراج بیشتر آب و مواد مغذی از خاک و توانایی زنده ماندن در شرایط نامطلوب، سازگارتر و پایدارتر از محصولات زراعی هستند و منجر به کاهش بازده محصول زراعی می‌شوند به همین دلیل تهدیدی جدی برای تولید محصول به شمار می‌روند (Kaur et al. 2018).

در اغلب مناطقی که حبوبات کشت می‌شود علف‌های هرز وجود داشته و سبب کاهش محصول می‌شوند (Whish et al. 2002 ؛ Somers et al. 2003). بنابراین وجود علف‌های هرز در بخش‌های مختلف ایران به یک مشکل بسیار جدی تبدیل شده‌است. امروزه روش‌های کنترل مکانیکی علف‌های هرز مانند وجین علف‌های هرز با دست یا روش‌های خاک‌ورزی کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد و کنترل شیمیایی، مدیریت غالب علف‌های هرز در ایران است (Nosrati el al. 2017).

با توجه به کاهش کمیت و کیفیت محصول به دلیل حضور علف‌های هرز در مزارع، استفاده از علف‌کش گلایفوسیت (N-phosphomethyl-glycine) به‌عنوان یک علف‌کش غیرانتخابی با طیف گسترده و پس از ظهور یا سبز شدن علف‌های هرز، به‌طور گسترده در مزارع حاوی گیاهان تراریخته مقاوم به علفکش گلایفوسیت مرسوم است (Kahrizi et al. 2007). همچنین از علف‌کش گلایفوسیت برای تسهیل برداشت محصول در پایان فصل نیز استفاده شده‌است. میزان مصرف سالانه گلایفوسیت در هر هکتار نیز افزایش یافته‌است (مانند سویا). در سال ۲۰۱۲ حدود ۱۲۷هزار تن گلایفوسیت در ایالت متحده آمریکا و ۷۰۰ هزار تن در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته‌است و در حال حاضر استفاده از علف‌کش گلایفوسیت در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، رایج است (Van Bruggen et al. 2018).

خاصیت کشندگی علف‌کش گلایفوسیت به‌دلیل ممانعت از تولید آنزیم ۵-انول پیروویل شیکیمات-۳-فسفات (EPSPS) است. گلایفوسیت مرحله‌ی ششم در مسیر شیکیمات را متوقف می‌کند،

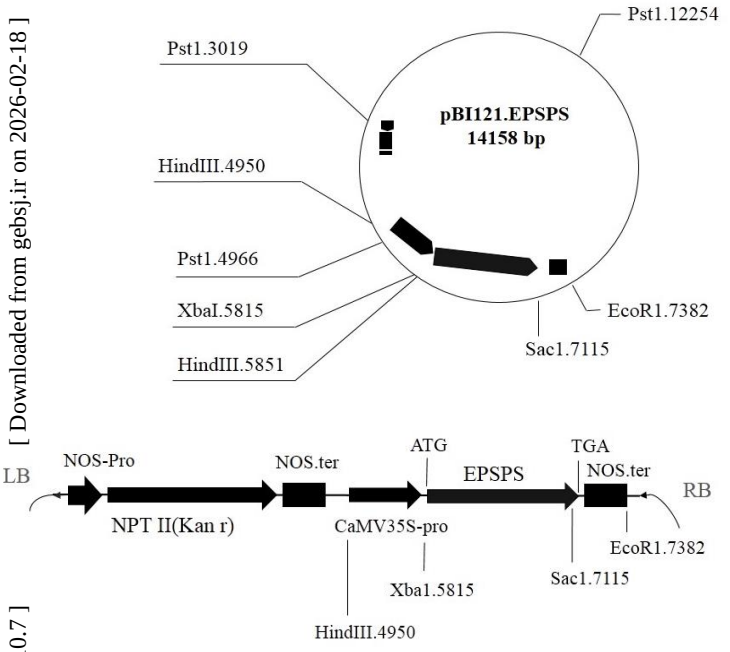
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

این مسیر برای تولید اسیدهای آمینه آروماتیک و ترکیبات ثانویه، برای عملکرد دفاعی در گیاهان و بسیاری از میکروارگانیسم‌ها ضروری است. لذا با توجه به نحوه عملکرد این علف کش در گیاهان و لزوم کنترل علفهای هرز در مزارع، تولید گیاهان زراعی مقاوم به این علف کش در نظام های زراعی مطلوب خواهد بود. از محصولات مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت می‌توان به سویا (*Glycine max*) و کلزا (*Brassica napus*) در سال ۱۹۹٦، پنبه (*Gossypium hirsutum*) در سال ۱۹۹۷ و ذرت (*Zea mays*) در سال ۱۹۹۸ اشاره کرد (Van Bruggen et al. 2018).

دست‌ورزی ژن *epsps* باکتریایی به‌منظور کاهش میل ترکیبی آنزیم با گلایفوسیت و انتقال آن به گیاهان، یکی از روش‌های مؤثر برای تولید گیاهان مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت است (Kahrizi et al. 2007). در تحقیق سعادتی جبلی و همکاران (۲۰۱۸) ژن *aroA* با یک جهش سه نقطه ای به همراه فرم معمول ژن به گیاه کلزا برای تولید بیشتر آنزیم و ایجاد مقاومت به علف کش گلایفوسیت مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاکی از این بود که بهترین سطح تحمل در لاینهای تراریخته، ۷٦ میلی مولار از علف کش بود. در مطالعه دیگری نیز از ژن *epsps* با یک جهش نقطه ای برای ایجاد مقاومت به علف کش گلایفوسیت در گیاه برنج رقم هاشمی استفاده شد و میزان زنده مانی گیاهان تراریخته نسل T1 پس از اسپری علف کش گلایفوسیت حدود ۹۱ درصد برآورد شد (Nasr Ramzi et al. 2018). در بررسی حاضر از ژن موتاسیون یافته *epsps* باکتری اشرشیاکلی که توسط کهریزی و همکاران (Kahrizi et al. 2007) به اگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل شده بود، به‌منظور انتقال ژن به گیاه نخود استفاده شد. هدف اصلی در این تحقیق، بررسی امکان انتقال ژن به گیاه نخود رقم ثمین و بیونیج با استفاده از روش تلقیح با اگروباکتریوم تومی فاشینس و تأیید مولکولی حضور ژن مورد نظر در گیاهان T_0 با استفاده از آزمون PCR و RT-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و باکتری: در این پژوهش دو رقم از نخودهای تیپ کابلی به نام ثمین و بیونیج (تهیه شده از مرکز تحقیقات حبوبات کرمانشاه، Sabbaghpour et al. 2017) استفاده شد. به منظور تهیه‌ی ریزنمونه استریل و هم‌کشتی با اگروباکتریوم، ابتدا بذرها به مدت یک دقیقه با الکل ۷۰ درصد و ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد زیر هود لامینار ضدعفونی شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل به مدت ۲٤ ساعت در آب قرار گرفتند. در این طرح از باکتری اگروباکتریوم تومی‌فاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه LBA4404 استفاده شد. این باکتری دارای پلاسمید pBI121 حاوی ژن موتاسیون یافته *epsps* می‌باشد که ژن *nptII* نیز به‌عنوان ژن گزینش‌گر تحت پیش‌بر 35S در آن تعبیه شده است (این سازه توسط دکتر سلمانیان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک تهیه شد). در این ساختار، ژن *gus* با استفاده از آنزیم‌های Sac1/Xbal حذف و بجای آن *epsps* دستورزی شده جایگزین شده است (شکل۱). جهش نقطه‌ای در ژن *epsps* باکتری اشرشیاکلی سویه K12 برای تبدیل گلایسین ۹٦ به آلانین و آلانین ۱۸۳ به ترئونین در تحقیق کهریزی و همکاران (Kahrizi et al. 2007)، ایجاد شده‌است.



شکل ۱- نقشه‌ی پلاسمید نوترکیب pBI121-EPSPS . در این ساختار، ژن *epsps* دستورزی شده با استفاده از آنزیم‌های Sac1/Xbal برش و در محل مربوطه قرار گرفته است (Kahrizi et al. 2007).

Fig 1. Map of recombinant plasmid pBI121-EPSPS. In this construct, the modified *epsps* gene was cut using Sac1 / Xbal enzymes and ligated in related place (Kahrizi et al. 2007).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

کشت اگروباکتریوم تومی‌فاشینس LBA 4404 حاوی پلاسمید در محیط کشت مایع LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین با OD ۰/۶ برای همکشتی استفاده شد.

بهینه‌سازی غلظت کانامایسین به‌منظور باززایی و انتخاب گیاهان تراریخته نخود: قبل از انجام هر آزمایش تراریختی باید نسبت به بهینه سازی غلظت عامل انتخابی جهت گزینش گیاهچه‌های تراریخته اقدام نمود، لذا در این بررسی قبل از انتقال، ریزنمونه‌های (لپه به همراه برش طولی از محور جنینی) هم‌کشتی شده به محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی و ۳ تکرار با رقم ثمین و بدون هم‌کشتی با اگروباکتریوم انجام شد، تا تأثیر غلظت‌های متفاوتی از آنتی‌بیوتیک کانامایسین بر جوانه‌زنی، تولید اپی‌کوتیل، شاخه‌زایی و ماندگاری مشخص شود. در این آزمایش مقدماتی از محیط کشت جامد MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳۰ گرم در لیترساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار به همراه غلظت‌های متفاوتی از کانامایسین به ترتیب صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰و۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. پس از تهیه ریزنمونه و قرارگیری در محیط کشت های مختلف در پایان هفته اول، پایان هفته دوم و پایان هفته چهارم به ترتیب تولید اپی‌کوتیل، شاخه‌دهی و ماندگاری شاخه‌های سبز محاسبه گردید و غلظت مناسب برای انتخاب و تفکیک گیاهان تراریخته مشخص شد.

تهیه ریز نمونه‌ی گیاهی و هم‌کشتی با اگروباکتریوم: به‌منظور هم‌کشتی محورهای جنینی با اگروباکتریوم، بذرهایی که به مدت ۲۴ ساعت در آب خیس شده بودند با کمک اسکالپل و پنس به دونیم تقسیم شد به گونه‌ای که هریک از لپه‌ها نصف محور جنینی را همراه خود داشته باشد و پوسته‌ی آن حذف گردید. ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه درون محیط کشت مایع MS و بدون هورمون غوطه‌ور شد و سپس ریزنمونه‌های آماده به مدت ۴۵ دقیقه درون محلول اگروباکتریوم (سوسپانسیون باکتری) قرارگرفت تا تلقیح انجام شود. پس از آن ریزنمونه‌ها روی کاغذ صافی استریل، خشک و آب‌گیری شد و در محیط کشت نیمه جامد هم‌کشتی قرار گرفت. محیط هم‌کشتی شامل محیط کشت جامد B5 ، فاقد آنتی بیوتیک و حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار به همراه یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP با pH معادل ۵/۸ بود. محیط هم‌کشتی حاوی ریز نمونه به مدت ۷۲ ساعت در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد. در مجموع طی ۱۴ تکرار جداگانه حدود ۱۲۰۰ بذر ثمین و ۸۰۰ بذر بیونیج برای هم‌کشتی استفاده گردید.

محیط باززایی و تحریک تشکیل شاخه: ریزنمونه‌هایی که با باکتری حاوی ژن موردنظر تلقیح شده، به مدت ۳ روز در محیط هم‌کشتی B5 قرار گرفتند تا باکتری فرصت کافی برای بیماری‌زایی و انتقال ژن هدف داشته باشد. پس از آن به‌منظور باززایی و انتخاب ریزنمونه‌هایی که ژن هدف را دریافت کرده‌اند از عامل انتخاب کننده‌ی کانامایسین به صورت مرحله ای از صفر تا ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و از ۲۵ به ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در واکشتهای متوالی جهت غربال‌گری مؤثر گیاهان تراریخت استفاده شد. پس از اینکه انتخاب شاخه‌های سبز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین صورت گرفت شاخه‌های سبز باقی‌مانده ۳ دوره‌ی ۱۴ روزه در محیطی با غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر واکشت شدند. محیط باززایی به ترتیب T1، T2 و T3 بود (Moshtaghi et al., 2009). محیط T1 اولین محیط انتخابی و شامل محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳۰ گرم در لیترساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار به همراه ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم با pH معادل ۵/۸ می‌باشد. ریزنمونه‌ها ابتدا به محیط انتخابی T1 با مقادیر کمی از کانامایسین منتقل شدند و به مدت دو هفته در این محیط کشت درون اتاقک رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا تشکیل شاخه و تحریک تشکیل جوانه‌های جانبی در محل برش صورت گیرد. شاخه‌ها به‌همراه پایه آن‌ها قبل از انتقال به محیط کشت بعدی از لپه‌ها جدا گردید، سپس به محیط کشت انتخابی T2 که بدون اکسین بود انتقال یافتند. محیط T2 شامل محیط کشت جامد MS بدون اکسین و حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

Kin، ۳۰ گرم در لیترساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار به همراه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم با pH معادل ۵/۸ بود. شاخه‌های جداشده به مدت دو هفته در این محیط کشت و درون اتاقک رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از دو هفته شاخه‌های زنده و پایه آنها به محیط کشت انتخابی بعدی واکشت شدند.

محیط T3 حاوی غلظت کمتری از سیتوکنین و بدون اکسین بود که شامل محیط کشت جامد MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم بود. شاخه‌های سبزی که در این محیط کشت بقا یافتند حدود ۳تا٤ دوره ١٤روزه در همین محیط کشت واکشت شدند.

ریشه‌زایی گیاهان مشکوک به تراریختگی: از آن‌جایی که ریشه‌زایی شاخه‌های باقی‌مانده، یک مرحله‌ی کلیدی برای حصول گیاهان تراریخته محسوب می‌شود لذا در این بررسی نیز از تیمارهای مختلف برای ریشه‌زایی استفاده شد. با توجه به بررسی‌های انجام شده ابتدا از محیط کشت MB (نمک‌های محیط کشت MS و ویتامین‌های محیط کشت B5) و هورمون IAA و پس از آن از هورمون IBA به منظور ریشه‌زایی شاخه‌های سبز باقی‌مانده استفاده گردید. اما بعد از دو هفته ریشه‌زایی در هیچ‌یک از شاخه‌ها مشاهده نشد. بنابراین هورمون NAA مورد استفاده قرار گرفت تا تأثیر آن در ریشه‌زایی نخود رقم ثمین و بیونیج مشخص شود. در نهایت از محیط کشت MB حاوی هورمون NAA با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر برای ریشه‌زایی رقم ثمین استفاده گردید و ریشه‌زایی شاخه‌های باقی‌مانده از رقم بیونیج در همان محیط با غلظت ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام شد.

سازگاری گیاهان مشکوک به تراریختگی: از محیط هیدروپونیک حاوی محلول هوگلند برای استقرار گیاهان ریشه‌دار استفاده شد و به منظور حفظ رطوبت گیاهچه‌هایی که تازه از محیط این‌ویترو خارج شده بودند و جلوگیری از ایجاد تنش، تمامی مراحل شستشوی ریشه و انتقال به محیط هیدروپونیک بدون وقفه و با دقت انجام شد و روی ظرف به مدت ده روز با سلفون پوشیده شد و هرروز منافذی روی سلفون ایجاد گردید. پس از برداشتن کامل سلفون، محلول هوگلند هر هفته با محیط جدید تعویض شد. حدودا با گذشت ۳ هفته از رشد گیاهان در محیط هیدروپونیک، از برگ‌های جوان و تازه هر یک از گیاهان باقی‌مانده، نمونه‌ی برگ برای استخراج DNA و تأیید تراریختگی تهیه و در فریزر منفی ۸۰ نگهداری شد.

تأیید مولکولی گیاهان مشکوک به تراریختگی: آزمون PCR با آغازگر اختصاصی ژن *epsps* و پس از آن با آغازگر *nptII* انجام شد. بدین منظور DNAی ژنومی از نمونه‌های برگ گیاهان سازگار یافته‌ی نخود در محیط هیدروپونیک به روش CTAB DNA Extraction با کمی تغییراستخراج شد. پس از تعیین غلظت نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ، به منظور استفاده از آن برای واکنش PCR، رقیق سازی DNA با استفاده از آب آمپولی و با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر انجام شد. سپس تجزیه و تحلیل PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *epsps* و *nptII* انجام شد. تأیید عدم آلودگی گیاهان به باکتری با استفاده از آغازگر باکتریایی *ITS* و همچنین آغازگرهای *p5cs* مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور اطمینان از بیان ژن *epsps* انتقال یافته به گیاه، استخراج RNA، سنتز cDNA و آزمون RT-PCR انجام شد. طراحی آغازگر با استفاده از توالی ژن موتاسیون یافته *epsps* و در سایت Primer3 انجام شد (جدول ۱). مخلوط واکنش با حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۲۵ نانوگرم از DNA ی ژنومی، ۵ میکرولیتر از Master mix Amplicon و نیم میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ میکرومولار بود.

چرخه‌های PCR نیز به این شرح انجام شد. واسرشت اولیه در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد مدت ۵ دقیقه و در ۳۵ چرخه بعدی به مدت ٤٥ ثانیه انجام شد. دمای مرحله اتصال آغازگرهای *epsps*، *nptII* ، *ITS* و *p5cs* به ترتیب ٦٠ ، ٥٠ ، ٥٨ و ٦٠ درجه سانتی‌گراد بود و در تمام چرخه‌ها زمان ٤٥ ثانیه برای آن‌ها در نظر گرفته‌شد. مرحله‌ی بسط آغازگر نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک دقیقه برای تمام چرخه‌ها و ۱۰ دقیقه برای چرخه نهایی انتخاب شد. در تمام واکنش‌های PCR علاوه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

بر DNAی گیاهان تراریخته از شاهدهای مناسب شامل DNAی گیاهان غیرتراریخته، واکنش PCR بدون DNA و یک واکنش با DNAی پلاسمیدی انجام گرفت تا کنترل‌های مناسب در حین آزمایش انجام شود.

جدول ۱- توالی الیگونوکلئوتیدی آغازگرهای *epsps*، *nptII*، *ITS* و *p5cs*

Table 1. Primer sequences for *epsps*, *nptII*, *ITS* and *p5cs* genes.

Gene name	Direction	Sequence	Amplicon size
epsps	Forward	5′-TCCATTACACGCAGAAGGTG-3′	600 bp
	Reverse	5′-TTTCCAGCACATCAGCAAAG-3′	
*npt*II	Forward	5′-CAGGTTCTCCGGCCGCT-3′	750 bp
	Reverse	5′-GAACTCGTCAAGAAGGC-3′	
ITS	Forward	5′-GCTATGCATGGCACGAC-3′	1500bp
	Reverse	5′-CCCACGGCTTTTCGCAG-3′	
p5cs	Forward	5′-CAGCTTCTTGTTACCGACAATG-3′	250 bp
	Reverse	5′-CCCAGAATATGCCAGAAGAATC-3′	

استخراج RNA از نمونه‌های مشکوک به تراریخته، با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت دنازیست انجام شد. به‌منظور بررسی کیفیت RNAی استخراجی از ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد و مقدار ۱ میکرولیتر از RNAی استخراجی به همراه ۰/۵ میکرولیتر رنگ روی ژل بارگذاری شد.

برای سنتز cDNA، از RNA با کیفیت بالا و عاری از DNA، طبق دستورالعمل شرکت پارس توس استفاده شد. ابتدا ۵۰۰ نانوگرم RNAی تیمار شده با DNase را به میکروتیوب حاوی ۱۰ میکرولیتر بافر مخلوط (2x) و ۲ میکرولیتر آنزیم مخلوط اضافه شدند. حجم واکنش با اضافه کردن آب تیمار شده با DEPC بدون نوکلئاز به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. بلافاصله مخلوط ایجاد شده ورتکس شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر Master cycler gradient قرار گرفت. در این مرحله، میکروتیوب‌ها به مدت ٦٠ دقیقه در دمای ٤٧ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. واکنش با قرار دادن میکروتیوب‌ها در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه پایان یافت. در مرحله نهایی، میکروتیوب‌ها داخل یخ قرار گرفت و سپس در فریزر منفی ۲۰ تا زمان استفاده نگهداری شد.

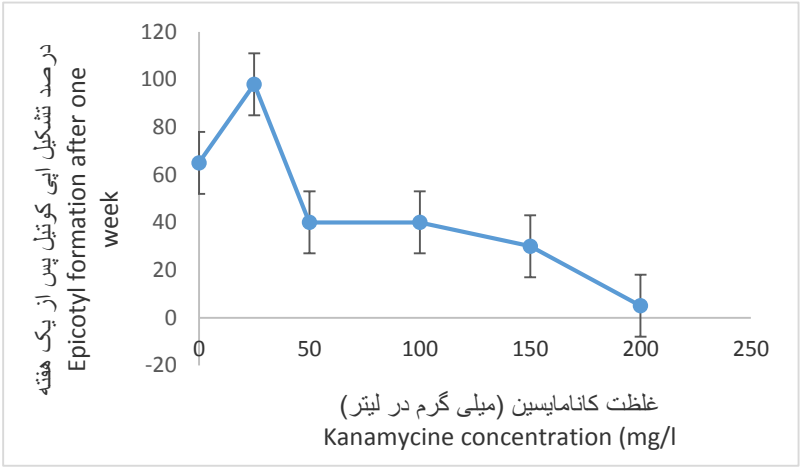
به‌منظور استفاده از cDNA در واکنش RT-PCR، رقیق‌سازی آن با استفاده از آب مقطر آمپولی انجام شد (غلظت cDNA ۵برابر رقیق شد). سپس تجزیه و تحلیلRT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *epsps* صورت گرفت. چرخه‌های RT-PCR نیز مطابق آزمون PCR با آغازگر اختصاصی ژن *epsps* انجام شد. در واکنش-RT PCR علاوه بر cDNA گیاهان تراریخته از شاهدهای مناسب شامل RNA گیاهان تراریخته به‌منظور صحت cDNA ساخته شده و عدم آلودگی آن به DNA، واکنش RT-PCR بدون cDNA و یک واکنش با DNAی پلاسمیدی انجام گرفت تا کنترل‌های مناسب در حین آزمایش انجام شود.

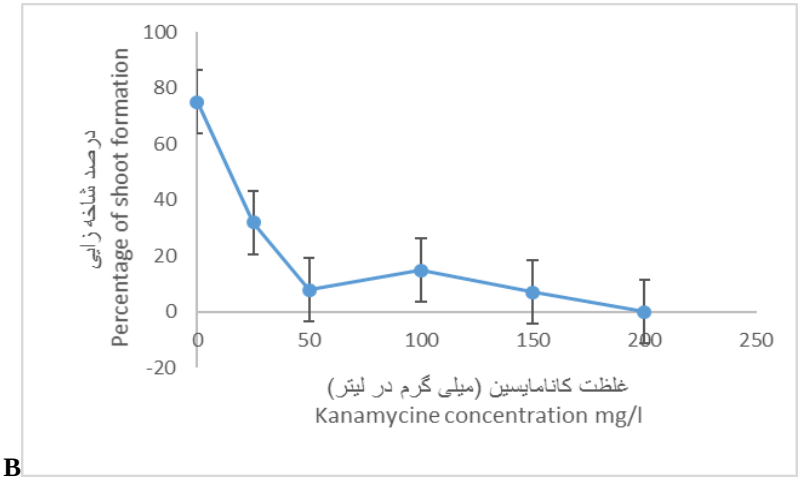
نتایج

بهینه‌سازی غلظت کانامایسین به‌منظور انتخاب گیاهان تراریخته: نتایج بررسی پس از یک هفته از زمان قراردادن ریزنمونه‌های محور جنینی در محیط کشت، نشان داد بین غلظت‌های مختلف کانامایسین در مرحله‌ی جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد؛ اما بین غلظت‌های مختلف کانامایسین در مرحله‌ی تشکیل اپی‌کوتیل اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد وجود دارد (شکل ۲ -A).

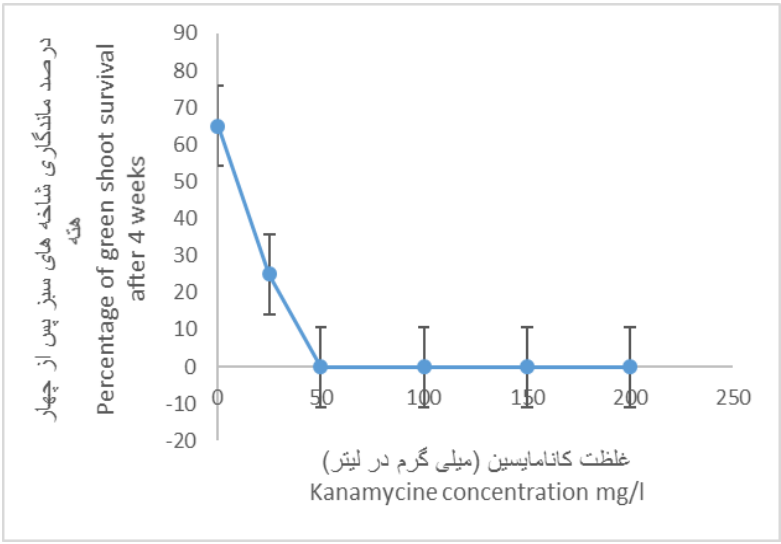
با گذشت دو هفته از زمان قرارگیری ریزنمونه‌های محور جنینی در محیط کشت MS به همراه غلظت‌های مختلف کانامایسین، درصد شاخه‌زایی در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی در این مرحله نشان داد که بین غلظت‌های مختلف کانامایسین اختلاف معنی داری وجود دارد (شکل ۲–B). درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌های محور جنینی نخود در غلظت‌های مختلف کانامایسین نشان دهنده‌ی بیشترین شاخه‌زایی در محیط فاقد کانامایسین و عدم شاخه‌زایی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین می‌باشد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]





B



C

شکل ۲- درصد تشکیل اپی کوتیل و شاخه زایی نخود تحت تاثیر غلظتهای مختلف کانامایسین **A** - درصد تشکیل اپی‌کوتیل پس از یک هفته، B : درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌های محور جنینی نخود در غلظت‌های مختلف کانامایسین. C : درصد ماندگاری شاخه‌های سبز نخود پس از ٤ هفته در غلظت‌های مختلف کانامایسین. در هرستون میانگین‌های دارای حرف مشابه تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig 2. The percentage of epicotyl formation and branching of chickpea under the influence of different concentrations of kanamycin A: Percentage of epicotyl formation after one week. B: Percentage of shoot formation of chickpea embryonic axis explants in different concentrations of kanamycin. C: Survival percentage of chickpea green shoots after 4 weeks in different concentrations of kanamycin. In each column, averages with the same letter are not significantly different.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش، بیشترین درصد شاخه‌زایی پس از محیط کشت شاهد (فاقد کانامایسین) در محیط کشت حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین مشاهده شد. درصد شاخه‌زایی در غلظت‌های ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بسیار پایین و از همان ابتدا شاخه‌ها سفید رنگ بود و غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر شاخه‌زایی نداشت، درحالی‌که شاخه‌های ایجاد شده در محیط کشت حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر ابتدا سبز و بعد از چند روز ساقه‌های گیاهچه سبز روشن مایل به سفید و برگ‌های سبز بود.

ریزنمونه‌های موجود در محیط کشت حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در مرحله‌ی اول بیش‌ترین درصد اپی‌کوتیل را دارا بودند، اما پس از گذشت دو هفته از زمان کشت، به‌دلیل سمیت کانامایسین و تأثیر آن بر شاخه‌زایی، درصد شاخه‌زایی نسبت به مرحله‌ی قبل کاهش یافت. به‌دلیل سمیت بالای کانامایسین در غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و بالاتر و ممانعت از شاخه‌زایی و رشد گیاهان در این آزمایش و بررسی های انجام شده، غلظت کانامایسین ابتدا کم و سپس افزایش یافت. بنابراین با توجه به بررسی‌های انجام شده و نتایج حاصل از این آزمایش، به‌دلیل ضعیف بودن گیاهان در مرحله‌ی ابتدایی رشد از غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین استفاده شد تا به گیاهان فرصت شاخه‌زایی و رشد داده شود و پس از آن، انتخاب گیاهان تراریخته در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر انجام شد.

پس از دو هفته شاخه‌ها از لپه‌ها جدا شده و روی محیط کشت MS با همان غلظت‌های کانامایسین قرار گرفتند. درصد ماندگاری شاخه‌های سبز پس از ٤ هفته از زمان کشت ریزنمونه‌های محور جنینی نخود محاسبه گردید. نتایج بررسی در این مرحله نشان داد بین غلظت‌های مختلف کانامایسین اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد (شکل ۲-C).

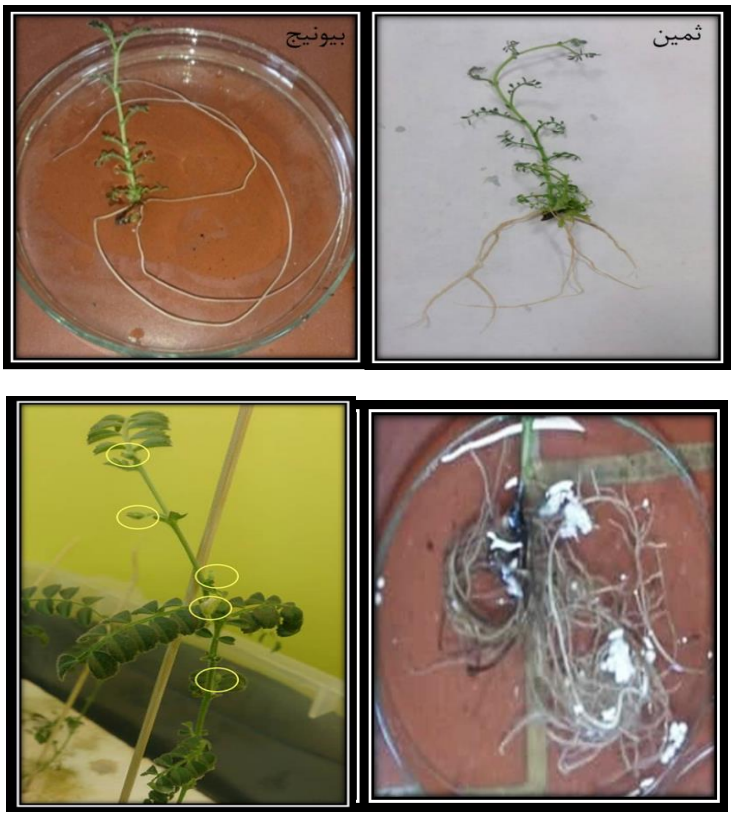
ریشه‌زایی رقم ثمین و بیونیج: حذف آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و استفاده از غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA باعث ظهور ریشه بعد از گذشت ۵ روز گردید. برای ریشه‌زایی گیاهچه‌های نخود رقم ثمین از هورمون NAA با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. اما گیاهان مشکوک به تراریختگی رقم بیونیج با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ریشه‌زایی نداشت بنابراین از غلظت بیشتری برای ریشه‌زایی رقم بیونیج استفاده شد. ریشه‌زایی رقم بیونیج در غلظت ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام شد (شکل۳). درصد ریشه‌زایی مجموع گیاهچه‌های انتقال یافته (رقم ثمین و بیونیج) در این دو محیط کشت ٤۸/۸ درصد بود.

سازگاری گیاهان در محیط هیدروپونیک: از محیط هیدروپونیک حاوی محلول غذایی هوگلند برای سازگاری گیاهان استفاده شد. ابتدا در این محیط بسیاری از گیاهان دوام نداشته و از بین می‌رفتند که احتمالا در مواردی به دلیل تماس طوقه‌ی گیاه با محلول و ایجاد پوسیدگی در محل طوقه‌ی گیاه بوده است، این مشکل نیز با قرار دادن پایه‌ای از جنس یونولیت در اطراف طوقه به منظور جلوگیری از خیس شدن و پوسیدگی آن و همچنین قرار دادن پایه‌ی نگهدارنده برای گیاه تا حد زیادی بهبود پیدا کرد و سرعت رشد گیاه بسیار مطلوب و بیش از حد انتظار بود، به‌طوریکه بعد از یک هفته ظهور برگ‌های جدید در قسمت‌های سرشاخه مشاهده شد. از طرفی استفاده از سلفون شفاف روی ظرف‌های کشت و ایجاد منافذ ریز روی آن‌ها باعث سازگاری تدریجی گیاهان به محیط این‌ویوو شد. شاید یکی از دلایل دیگری که باعث رشد بهتر گیاهان در محیط هیدروپونیک شده‌است حفظ رطوبت کافی در فضای زیر سلفون شفاف بوده‌است که این امر به دلیل تبخیر سطحی از محیط مایع و قرارگیری پوششی از سلفون روی ظرف محقق شده‌است و برای گیاهانی که تازه از محیط این‌ویترو با درصد بالایی از رطوبت خارج شده‌اند، شرایط مشابهی را فراهم کرده و گیاه به رشد خود ادامه می‌دهد. بعد از دو الی سه روز کم‌کم منافذ بسیار ریز روی سطح ایجادکرده و با جریان هوا در زیر سطح سلفون به تدریج رطوبت کاهش یافته و گیاه با تنش روبرو نمی‌شود. بنابراین استفاده از محیط هیدروپونیک باعث بهبود سرعت رشد گیاه شد در این آزمایش گیاهان تا مرحله‌ی گل‌دهی پیش رفتند (شکل ۳).

تأیید مولکولی گیاهان تراریخته با استفاده از آغازگر اختصاصی *epsps* : به منظور تأیید گیاهان مشکوک به تراریختگی از آغازگر اختصاصی ژن *epsps* استفاده شد. این آغازگر منجر به تکثیر یک قطعه‌ی ٦۰۰ جفت بازی می‌شود. علاوه بر DNAی گیاهان تراریخته از شاهد مناسب شامل DNAی گیاهان غیرتراریخته، واکنش PCR بدون DNA و یک واکنش با DNAی پلاسمیدی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

به‌عنوان کنترل مثبت در حین آزمایش استفاده شد (شکل٤ -A). حدود ۱۵ گیاه باند مورد نظر را نشان داده و مشکوک به تراریختگی بودند. برای اطمینان از انتقال ژن مورد نظر، از آغازگر ژن *nptII* که همراه با ژن هدف روی یک T-DNA قرار گرفته‌اند نیز استفاده شد. آغازگر مورد استفاده در گیاهان تراریخته منجر به تکثیر قطعه‌ای با اندازه‌ی تقریبی ۷۵۰ جفت بازی می‌شود (شکل٤-B). گیاهانی که باند مربوط به ژن هدف را نشان دادند دارای ژن *nptII* نیز بودند.

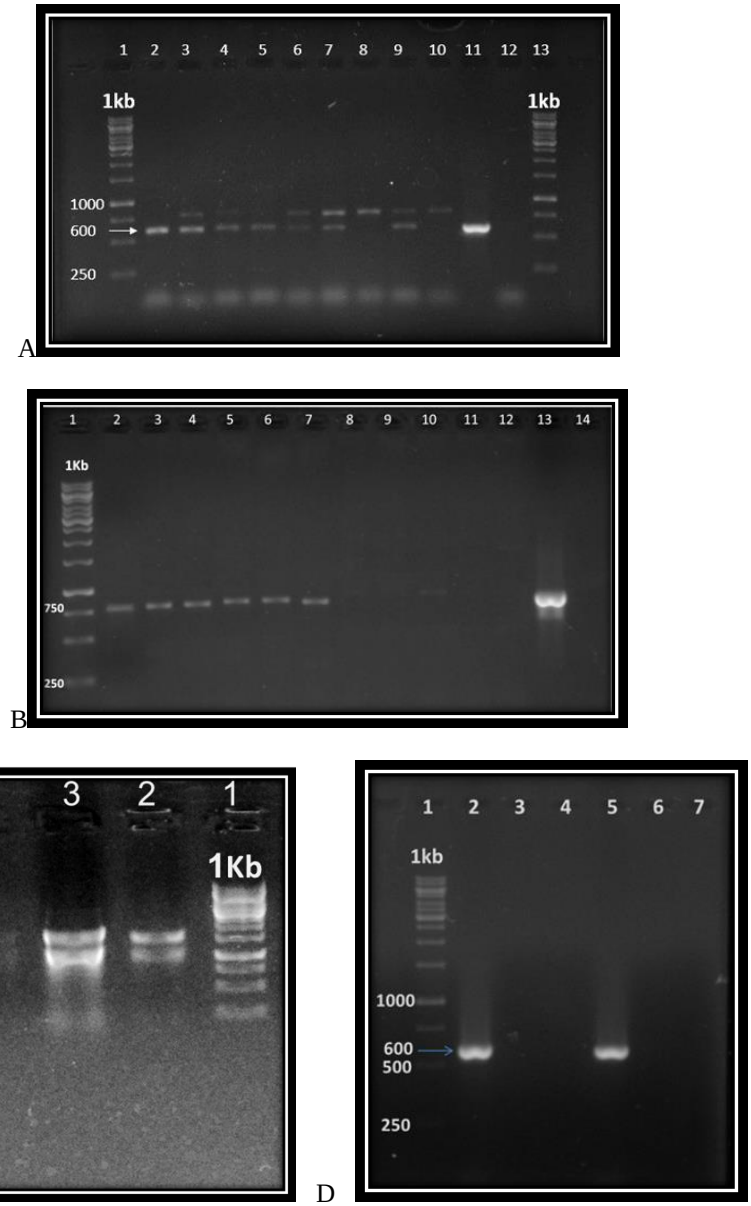


شکل ۳- مورفولوژی ریشه‌های ایجاد شده در محیط ریشه‌زایی MB با استفاده از NAA. (سمت راست بالا شامل ریشه زایی رقم ثمین در ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و سمت چپ بالا شامل ریشه زایی رقم بیونیج در ٤ /۰ میلی گرم در لیتر NAA) . توسعه‌ی سیستم ریشه‌ای و گلدهی گیاهان مشکوک به تراریختگی در محیط هیدروپونیک (تصاویر پایین).

Fig 3. Morphology of roots developed in MB rooting medium using NAA (The up right figure includes the rooting of the Sameen cultivar at 0.2 mg/L NAA and the up left figure includes the rooting of the Bivanij cultivar at 0.4 mg/L NAA).The development of the root system of the plants transferred to the hydroponic environment and flowering of putative transgenic plants in hydroponic culture (bottom figures).

همچنین به منظور بررسی عدم آلودگی نمونه‌های گیاهی به باکتری مورد استفاده، از آغازگر نواحی ITS باکتری نیز استفاده شد. این آغازگر منجر به تکثیر یک قطعه با اندازه‌ی تقریبی ۱۵۰۰ جفت بازی می‌شود. بنابراین علاوه بر DNAی گیاهان تراریخته از شاهد مناسب شامل DNAی گیاهان غیرتراریخته، واکنش PCR بدون DNA و یک واکنش با DNAی پلاسمیدی انجام شد تا کنترل‌های مناسب در حین آزمایش استفاده شود(تصویر نشان داده نشده است). نتایج واکنش PCR تکثیر قطعه‌ی موردنظر در DNAی پلاسمیدی بود. از ۲۰۰۰ ریزنمونه ای که در ابتدا برای همکشتی استفاده شد حدود ۲۰ گیاه پس از سازگاری باقی ماند و در ۱۵ گیاه تراریختگی با روش PCR تایید شد لذا درصد تراریختگی در این آزمایش حدود ۰/۷۵ درصد (نسبت گیاهان تراریخته به ۲۰۰۰ ریزنمونه ابتدایی) می‌باشد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]



شکل ٤-تایید مولکولی گیاهان تراریخته، A : تأیید حضور ژن هدف در گیاهان مشکوک به تراریختگی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *epsps* و تکثیر قطعه‌ی ٦٠٠ جفت بازی. چاهک ۱و۱۳. سایز مارکر، ۲تا۹. گیاهان مشکوک به تراریخته، ۱۰.گیاه غیرتراریخته (شاهد)، ۱۱. کنترل مثبت (DNAی پلاسمید باکتری)، ۱۲- واکنش PCR بدون DNA. B: تأیید حضور ژن هدف در گیاهان مشکوک به تراریخته با استفاده از آغازگرهای *nptII*. چاهک۱ سایزمارکر، ۲تا۱۱ گیاهان مشکوک به تراریخته (۲ تا ۷تکثیر قطعه‌ی مورد نظر و تأیید تراریختگی با آغازگر *nptII*)،۱۲. گیاه غیرتراریخته (شاهد)،۱۳ کنترل مثبت (پلاسمید باکتری). ١٤ واکنش PCR بدونDNA. **C** : بررسی کیفیت استخراج RNA و تیمار با DNase. (۱) سایز مارکر. (۲و۳) کیفیت استخراج RNA و عدم آلودگی به DNA. (٤) RNA تیمار شده با DNase. D : واکنش RT-PCR با استفاده از cDNA و آغازگر *epsps*. ۱. سایز مارکر. ۲و٥. cDNA گیاهان تراریخته و تکثیر قطعه مورد نظر. ۳و٦. RNA گیاهان تراریخته، عدم تکثیر قطعه نشان دهنده‌ی عدم آلودگی به DNA می‌باشد. ٤و۷. کنترل واکنش بدون استفاده از RNA و cDNA.

Fig 4. Molecular confirmation of transgenic plants, **A**: Confirming the presence of the target gene in putative transgenic plants using *epsps* primers. Wells 1 and 13. Marker size, 2 to 9 putative transgenic plants, 10. Non-transgenic plant (control), 11. Positive control (bacterial plasmid DNA), 12- PCR reaction without DNA, **B**: Confirmation of target gene presence in putative transgenic plants using *npt*II primers. Well 1 size marker, 2-11 suspected transgenic plants (2-7 propagating the target piece and verifying the transgenicity with nptII primer), 12. Non-transgenic plant (control), 13. Positive control (bacterial plasmid). 14. PCR reaction without DNA, **C**: Checking the quality of RNA extraction and DNase treatment. (1) Marker size. (2 and 3) the quality of RNA extraction and the absence of DNA contamination. (4) DNase-treated RNA. **D**: RT-PCR reaction using cDNA and *epsps* primers. 1. Marker size. 2 and 5. cDNA of transgenic plants and amplification of desired fragment. 3 and 6. RNA of transgenic plants, the lack of replication of the fragment indicates the absence of DNA contamination. 4 and 7. Reaction control without using RNA and cDNA.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

برای تأیید استفاده از DNAی ژنومی گیاهان تراریخته و غیرتراریخته‌ی نخود یک واکنش PCR با آغازگرهای ژن *p5cs* نیز انجام شد (تصویر نشان داده نشده است). در این واکنش، قطعه‌ی مورد نظر در گیاهان تراریخته و غیرتراریخته تکثیر شد و DNAی پلاسمید باکتری به‌عنوان کنترل این واکنش استفاده شد.

بررسی بیان ژن *epsps* انتقال یافته به گیاه: استخراج RNA از نمونه‌های مشکوک به تراریختگی با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت دنازیست انجام شد و از غلظت مناسب برخوردار بود. به‌منظور بررسی کیفیت RNAی استخراجی، از ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد. مقدار یک میکرولیتر از RNAی استخراجی به همراه ۰/۵ میکرولیتر رنگ روی ژل بارگذاری شد و از کیفیت مطلوبی برخوردار بود. آلودگی به DNA روی ژل مشاهده نشد با این‌حال نمونه‌ها پس از تیمار با DNase برای سنتز cDNA آماده شد و دوباره به همراه RNA اولیه روی ژل بارگذاری شد (شکل ٤ -C).

به‌منظور تأیید حضور RNA از ژن *epsps* درون بافت گیاهی از تجزیه و تحلیل RT- PCR استفاده شد. در این واکنش از cDNA سنتز شده به‌همراه آغازگر اختصاصی *epsps* استفاده شد. علاوه بر آن برای کنترل آلودگی DNA در حین انجام واکنش RT-PCR از واکنش PCR با نمونه RNA نیز استفاده شد تا از عدم آلودگی DNA در نمونه‌های RNA اطمینان حاصل شود (شکل ٤ –D).

بحث

نتایج کشت بافت نخود نشان داد این گیاه در محیط این‌ویترو به سرعت تحت تأثیر شرایط دمایی و نوری قرار می‌گیرد. به‌طوریکه با افزایش ۲ تا ۳ درجه‌ای دما از حد بهینه‌ی اتاقک رشد، برگ گیاه قهوه‌ای شده که اصطلاحا سرسوختگی گیاه نامیده می‌شود، همچنین زمانی‌که از فویل آلومینیوم برای پوشش شیشه‌های حاوی ریزنمونه استفاده گردید گیاهان دچار سرسوختگی برگ‌ها و در نهایت ریزش برگ و ممانعت از رشد مطلوب گیاه شد. مشابه چنین حالتی در طبقات بالایی اتاقک رشد نیز مشاهده شد. لازم به ذکر است با توجه به سرما دوست بودن نخود، جوانه زنی و شاخه زایی نیز در چنین شرایطی امکان پذیر نیست و یا با درصد بسیار کمی همراه است؛ بنابراین توصیه می‌شود از طبقات پایین اتاقک رشد برای نگهداری گیاه استفاده شود و برای پوشش شیشه‌های حاوی ریزنمونه می‌توان از دو لایه سلفون استفاده کرد.

با توجه به حساسیت نخود به غلظتهای مختلف کانامایسین در مرحله انتخاب ضروری است تا در ابتدا غلظت بهینه برای انتخاب گیاهان تراریخته بهینه شود. فونتانا و همکاران (Fontana et al. 1993) از غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین برای انتخاب گیاهان تراریخته نخود استفاده کردند. در بررسی امکان انتقال ژن به نخود رقم بیونیج، حمزه و همکاران (Hamze et al. 2004) نیز از غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین برای انتخاب گیاهان تراریخته استفاده کردند. در مطالعه پولوویک و همکاران (Polowick et al. 2004) از عامل انتخابی کانامایسین استفاده شده‌است. آنها غلظت کانامایسین را به تدریج افزایش دادند و از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به ۷۵ و سپس به ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر رساندند. ایندورکر و همکاران (Indurker et al. 2010) برای انتخاب گیاهان تراریخته‌ی چند ژنوتیپ نخود، غلظت کانامایسین را از ۵۰ به ۷۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش دادند. سری واستاوا و همکاران (Srivastava et al. 2012) پس از هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها را در محیط حاوی سفوتاکسیم و فاقد کانامایسین قرار دادند، سپس غلظت کانامایسین را به‌تدریج افزایش داده و از ۵۰ به ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر رساندند. نتایج مطالعه پولوویک و همکاران (۲۰۰٤) نیز نشان داد وجود کانامایسین در محیط ریشه‌زایی مانع رشد ریشه می‌شود. مشتاقی و همکاران (Moshtaghi et al. 2009) ابتدا در محیط ریشه‌زایی از کانامایسین استفاده کردند اما هیچ شاخه‌ای ریشه‌دار نشد. با توجه به بررسی های متعدد در رابطه با محیط کشت ریشه‌زایی نخود که در آن کانامایسین از محیط کشت ریشه‌زایی حذف شده بود در این آزمایش نیز از کانامایسین در محیط ریشه‌زایی استفاده نشده‌است. مشتاقی و همکاران با استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA، حدود ۳۷ درصد ریشه‌زایی را در گیاهچه‌های نخود تیپ دسی گزارش کردند در حالی‌که در بررسی حاضر گیاهچه‌های نخود تیپ کابلی (رقم ثمین و بیونیج) با استفاده از هورمون IAA ریشه‌دار نشد (Moshtaghi et al. 2009). فونتانا و همکاران (Fontana et al. 1993) از محیط کشت MS به

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

همراه غلظت پایینی از IAA و Kin برای ریشه‌زایی شاخه‌های تراریخته استفاده کرده و ۵۰ درصد ریشه‌زایی را گزارش نمودند. آنها در بررسی خود نشان دادند که کاربرد کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت ریشه‌زایی به‌شدت مانع ریشه‌زایی شده‌است. در انتقال T-DNA از اگروباکتریوم به گیاه نخود پارامترهای متعددی مانند نوع ریزنمونه، ژنوتیپ، مدت زمان هم‌کشتی، استفاده از استوسیرینگون و OD باکتری مؤثر هستند (Indurker et al. 2010). درصد تراریختگی در بررسی حاضر، بسیار پایین و ۰/۷۵ درصد است. علاوه بر عوامل مؤثر در انتقال T-DNA به گیاه، سرسخت بودن حبوبات ازجمله نخود در مراحل ریشه‌زایی و سازگاری موجب از دست رفتن تعداد زیادی از گیاهان و در نتیجه‌ی آن کاهش درصد تراریختگی می‌شود. در بسیاری از پژوهش‌ها درصد تراریختگی در گیاه نخود بسیار پایین و معمولا" بین ۰/۵ تا ۳ درصد می‌باشد و در بعضی از آن‌ها بهترین حالت تراریختگی را حدود ۵ درصد گزارش کرده‌اند (Fontana et al. 1993؛ Krishnamurthy et al. 2000 ؛ Senthil et al. 2004 ؛ Polowick et al. 2004 ؛ Moshtaghi et al. 2009). در بررسی حمزه و همکاران (Hamze et al. 2004) درصد تراریختگی با استفاده از ریزنمونه محور جنینی و حل کردن رسوب باکتری در محیط کشت مایع MS، ۰/٤ درصد گزارش شده‌است. در گزارش آنها از استوسیرینگون نیز استفاده شده‌است در حالیکه در بررسی حاضر انتقال ژن بدون استفاده از استوسیرینگون انجام شده‌است و درصد تراریختگی ۰/۷۵ درصد به‌دست آمده‌است.

سپاسگزاری

لازم است از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تامین اعتبار طرح با کد ٤٤٧٨٦ و امکانات لازم برای انجام کار سپاسگزاری شود. در ضمن از خانم بستانی کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد بابت کمک در اجرا، قدردانی می شود.

منابع

Fontana GS, Santini L, Caretto S, Frugis G, Mariotti D. 1993. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L.(chickpea). Plant Cell Reports 12:194-198.

Hamze S, Kobaz P, Habashi A, Farshadfar A. 2004. *Gus* gene transfer to chickpea (*Cicer arietinum*) using *Agrobacterium tomefascines*, 4th Iranian National Biotechnology Conference, Kerman, International Center for Advanced Science and Technology and Environmental Sciences.

Indurker S, Misra HS, Eapen S. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) with an insecticidal protein gene: optimisation of different factors. Physiology and Molecular Biology of Plants 16: 273-284.

Kahrizi D, Salmanian AH, Afshari A, Moieni A, Mousavi A. 2007. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. Plant Cell Reports 26: 95-104.

Kaur S, Kaur R, Chauhan BS. 2018. Understanding crop-weed-fertilizer-water interactions and their implications for weed management in agricultural systems. Crop Protection 103: 65-72.

Krishnamurthy KV, Suhasini K, Sagare AP, Meixner M, De Kathen A, Pickardt T, Schieder O. 2000. *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. Plant Cell Reports 19: 235-240.

Moshtaghi N, Bagheri A, Higgins TJ, Jalali Javaran M, Ghareyazi B. 2009. Genetic engineering of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to increase resistance to the cocoon-eating pest (*Helicoverpa armigera*). Iran Legume Research 1:65-75. (In Farsi with English abstract)

Nasr Ramzi S, Sohani M M, Shirzadian Khorramabad R, Amininasab M, Asghari J. 2018. The reaction of transgenic rice plants containing EPSPS gene to glyphosate . Genetic Engineering and Biosafety Journal 7:65-78. (In Farsi with English abstract)

Nosratti I, Sabeti P, Chaghamirzaee G, Heidari H. 2017. Weed problems, challenges, and opportunities in Iran. Crop Protection 134: 104371.

Polowick PL, Baliski DS, Mahon JD. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.): gene integration, expression and inheritance. Plant Cell Reports 23: 485-491.

Saadati Jebeli M, Kahrizi D, Nosratti I. 2018. The response of transgenic Brassica napus with aroA gene to glyphosate treatment. Genetic Engineering and Biosafety Journal 7:41-52. (In Farsi with English abstract)

Sabbaghpour SH, Faraidi Y, Kamel M, Mahmoudi AA, Mahdieh M, Mahmoudi F, Saeed A, Kanuni H, Pouralibaba H, Ahmadi M, Kh. Shabani A, Nematifard M, Shahab M Kh., Karami A. 2017. Sameen, a new drought tolerance, large seed size and high potential yield chickpea cultivar for spring planting on cold dryland condition of Iran. Scientific-Promotional Journal of

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]

Research Findings in Agricultural and Garden Plants 6: 111-121. (In Farsi with English abstract)

Senthil G, Williamson B, Dinkins RD, Ramsay G. 2004. An efficient transformation system for chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Reports 23: 297-303.

Somers DA, Samac DA, Olhoft PM. 2003. Recent advances in legume transformation. Plant Physiology 131:892-899.

Srivastava J, Das A, Soren K R, Chaturvedi SK, Nadarajan N, Datta S. 2012. Ontogeny of in vitro shoot organogenesis from axillary meristem explants in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Crop Science and Biotechnology 15:245-250.

Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, Morris J G. 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. Science of the Total Environment 616:255-268.

Whish JPM, Sindel BM, Jessop RS, Felton WL. 2002. The effect of row spacing and weed density on yield loss of chickpea. Australian Journal of Agricultural Research 53:1335-1340.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.10.7]