

انتقال ژن epsps به نخود به منظور مقاومت به علفکش گلايفوسیت

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 Harati¹, Nasrin Moshtaghi^{2*}, Abdolreza Bagheri², Seyed Hasan
Marashi²

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

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: moshtaghi@um.ac.ir

moshtaghi@um.ac.ir

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

چکیده

واژه‌های کلیدی

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 گلايفوسیت مفید می‌باشد. در این تحقیق، از *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121 و ژن موتاسیون یافته epsps برای ایجاد مقاومت به علف‌کش گلايفوسیت استفاده شد که در آن ژن nptII به عنوان گزینشگر تحت پیش‌بر 35S قرار گرفته است. به‌منظور انتقال ژن از محوره‌های جنینی نخود رقم ثمین و بیونج استفاده شد. ریزنمونه‌ها 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. در نهایت 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 ۱۵ گیاه 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 ۷۵/۰ درصد بود.

اگروباکتریوم،

تراریخته،

علف هرز،

کانامایسین،

مهندسی ژنتیک

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 *nptII* 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 *nptII* 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

شده است. امروزه روش های کنترل مکانیکی علف های هرز مانند وجین علف های هرز با دست یا روش های خاک ورزی کمتر مورد استفاده قرار می گیرد و کنترل شیمیایی، مدیریت غالب علف های هرز در ایران است (Nosrati et al. 2017).

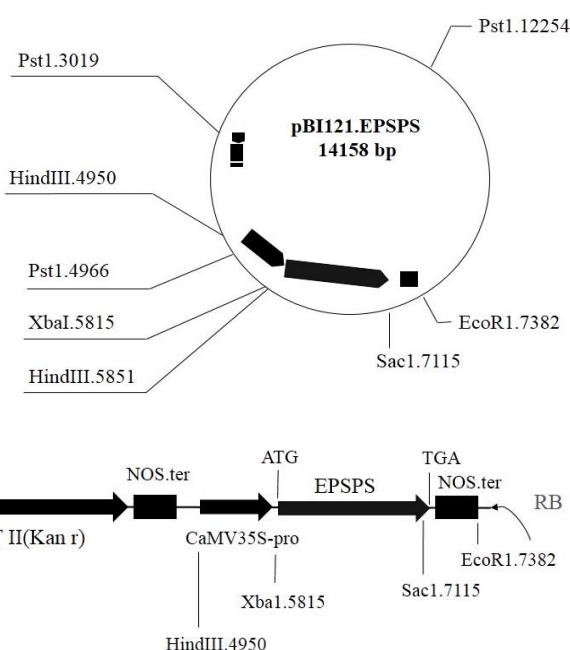
با توجه به کاهش کمیت و کیفیت محصول به دلیل حضور علف های هرز در مزارع، استفاده از علف کش گلايفوسیت (N-phosphomethyl-glycine) به عنوان یک علف کش غیرانتخابی با طیف گسترده و پس از ظهور یا سبز شدن علف های هرز، به طور گسترده در مزارع حاوی گیاهان تراریخته مقاوم به علف کش گلايفوسیت مرسوم است (Kahrizi et al.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

خاصیت کشندگی علف کش گلايفوسیت به دلیل ممانعت از تولید آنزیم ۵-انول پیروویل شیکیمات-۳-فسفات (EPSPS) است. گلايفوسیت مرحله ی ششم در مسیر شیکیمات را متوقف می کند،

گیاهان زراعی و علف های هرز از منابع مشترک مانند نور خورشید، گازهای اتمسفری، منابع زیرزمینی و فضا استفاده می کنند. بنابراین رقابت، پاسخی قابل پیش بینی از موجودات زنده ای است که در یک اجتماع هستند و مبارزه ای است بین دو موجود برای منابعی محدود که برای رشد آن ها ضروری است. رقابت گیاهان و علف های هرز باعث تغییر در بهره برداری از منابع مختلف می شود و همچنین بر تعاملات پیچیده بین گیاهان و عوامل محیطی تأثیر می گذارد. از بین بردن علف های هرز در مزارع کشاورزی مؤثرترین و کاربردی ترین راه برای کاهش تعلق و در نتیجه ی آن ذخیره ی آب برای استفاده گیاه مورد نظر است. علف های 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 می شوند به همین دلیل تهدیدی جدی برای تولید محصول به شمار می روند (Kaur et al. 2018).

در اغلب مناطقی که حبوبات کشت می شود علف های هرز وجود داشته و سبب کاهش محصول می شوند (Whish et al. 2002)؛ Somers et al. 2003). بنابراین وجود علف های هرز در بخش های مختلف ایران به یک مشکل بسیار جدی تبدیل

کرمانشاه، Sabbaghpour et al. 2017) استفاده شد. به منظور تهیهی ریزنمونه استریل و هم‌کشتی با آگروباکتریوم، ابتدا بذرها به مدت یک دقیقه با الکل ۷۰ درصد و ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد زیر هود لامینار ضد عفونی شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل به مدت ۲۴ ساعت در آب قرار گرفتند. در این طرح از باکتری آگروباکتریوم تومی‌فاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه LBA4404 استفاده شد. این باکتری دارای پلاسمید pBI121 حاوی ژن موتاسیون یافته *epsps* می‌باشد که ژن *nptII* نیز به عنوان 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 *SacI/XbaI* حذف و بجای آن *epsps* دست‌ورزی شده جایگزین شده است (شکل ۱). جهش نقطه‌ای در ژن *epsps* باکتری اشرشیاکلی سویه K12 برای تبدیل گلايسين ۹۶ به آلانین و آلانین ۱۸۳ به ترئونین در تحقیق کهریزی و همکاران (Kahrizi et al. 2007)، ایجاد شده است.



شکل ۱- نقشه‌ی پلاسمید نو ترکیب pBI121-EPSPS. در این ساختار، ژن *epsps* دست‌ورزی شده با استفاده از آنزیم‌های *SacI/XbaI* 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 *SacI* / *XbaI* enzymes and ligated in related place (Kahrizi et al. 2007).

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 گلايفوسيت می‌توان به سویا (*Glycine max*) و کلزا (*Brassica napus*) در سال ۱۹۹۶، پنبه (*Gossypium hirsutum*) در سال ۱۹۹۷ و ذرت (*Zea mays*) در سال ۱۹۹۸ اشاره کرد (Van Bruggen et al. 2018).

دست‌ورزی ژن *epsps* باکتریایی به منظور کاهش میل ترکیبی آنزیم با گلايفوسيت و انتقال آن به گیاهان، یکی از روش‌های مؤثر برای تولید گیاهان مقاوم به علف‌کش گلايفوسيت است (Kahrizi et al. 2007). در تحقیق سعادت‌تی جبلی و همکاران (۲۰۱۸) ژن *aroA* با یک جهش سه نقطه‌ای به همراه فرم معمول ژن به گیاه کلزا برای تولید بیشتر آنزیم و ایجاد مقاومت به علف کش گلايفوسيت مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاکی از این بود که بهترین سطح تحمل در لاینهای تراریخته، ۷۶ میلی مولار از علف کش بود. در مطالعه دیگری نیز از ژن *epsps* با یک جهش نقطه‌ای برای ایجاد مقاومت به علف کش گلايفوسيت در گیاه برنج رقم هاشمی استفاده شد و میزان زنده ماندن گیاهان تراریخته نسل T1 پس از اسپری علف کش گلايفوسيت 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 آگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل شده بود، به منظور انتقال ژن به گیاه نخود استفاده شد. هدف اصلی در این تحقیق، بررسی امکان انتقال ژن به گیاه نخود رقم ثمین و بیونج با استفاده از روش تلقیح با آگروباکتریوم تومی فاشینس و تأیید مولکولی حضور ژن مورد نظر در گیاهان T₀ 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 بیونج (تهیه شده از مرکز تحقیقات حبوبات

کشت اگرובاکتریوم تومی فاشینس LBA 4404 حاوی پلاسمید در محیط کشت مایع LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر از آنتی بیوتیک کانامایسین و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر از آنتی بیوتیک ریفامپیسین با OD ۰/۶ برای همکشتی استفاده شد.

بهینه سازی غلظت کانامایسین به منظور باززایی و انتخاب گیاهان تراریخته نخود: قبل از انجام هر آزمایش تراریختی باید نسبت به بهینه سازی غلظت عامل انتخابی جهت گزینش گیاهچه های تراریخته اقدام نمود، لذا در این بررسی قبل از انتقال، ریزنمونه های (لپه به همراه برش طولی از محور جنینی) همکشتی شده به محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی و ۳ تکرار با رقم ثمین و بدون همکشتی با اگرובاکتریوم انجام شد، تا تأثیر غلظت های متفاوتی از آنتی بیوتیک کانامایسین بر جوانه زنی، تولید اپی کوتیل، شاخه زایی و ماندگاری مشخص شود. در این آزمایش مقدماتی از محیط کشت جامد MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin، ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار به همراه غلظت های متفاوتی از کانامایسین به ترتیب صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم 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 اپی کوتیل، شاخه دهی و ماندگاری شاخه های سبز محاسبه گردید و غلظت مناسب برای انتخاب و تفکیک گیاهان تراریخته مشخص شد.

تهیه ریز نمونه ی گیاهی و همکشتی با اگرובاکتریوم: به منظور همکشتی محورهای جنینی با اگرובاکتریوم، بذرهایی که به مدت ۲۴ ساعت در آب خیس شده بودند با کمک اسکالپل و پنس به دو نیم تقسیم شد به گونه ای که هریک از لپه ها نصف محور جنینی را همراه خود داشته باشد و پوسته ی آن حذف گردید. ریزنمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه درون محیط کشت مایع MS و بدون هورمون غوطه ور شد و سپس ریزنمونه های آماده به مدت ۴۵ دقیقه درون محلول اگرובاکتریوم (سوسپانسیون باکتری) قرار گرفت تا تلقیح انجام شود. پس از آن ریزنمونه ها روی کاغذ صافی استریل، خشک و آب گیری 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 میلی گرم در لیتر NAA و یک میلی گرم 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 سانتی گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد. در مجموع طی ۱۴ تکرار جداگانه حدود ۱۲۰۰ بذر ثمین و ۸۰۰ بذر بیونج برای همکشتی استفاده گردید.

محیط باززایی و تحریک تشکیل شاخه: ریزنمونه هایی که باکتری حاوی ژن موردنظر تلقیح شده، به مدت ۳ روز در محیط همکشتی B5 قرار گرفتند تا باکتری فرصت کافی برای بیماری زایی و انتقال ژن هدف داشته باشد. پس از آن به منظور باززایی و انتخاب ریزنمونه هایی که ژن هدف را دریافت کرده اند از عامل انتخاب کننده ی کانامایسین به صورت مرحله ای از صفر تا ۲۵ میلی گرم در لیتر و از ۲۵ به ۵۰ میلی گرم در لیتر در واکشتهای متوالی جهت غربالگری مؤثر گیاهان تراریخت استفاده شد. پس از اینکه انتخاب شاخه های سبز در غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین صورت گرفت شاخه های سبز باقی مانده ۳ دوره ی ۱۴ روزه در محیطی با غلظت ۲۵ میلی گرم 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 میلی گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin، ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار به همراه ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم با pH معادل ۵/۸ می باشد. ریزنمونه ها 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 سانتی گراد قرار گرفتند تا تشکیل شاخه و تحریک تشکیل جوانه های جانبی در محل برش صورت گیرد. شاخه ها به همراه پایه آن ها قبل از انتقال به محیط کشت بعدی از لپه ها 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 میلی گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی گرم در لیتر

Kin، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار به همراه ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم با pH معادل ۵/۸ بود. شاخه‌های جدا شده 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 میلی گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی گرم در لیتر Kin، ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم بود. شاخه‌های سبزی که در این محیط کشت بقا یافتند حدود ۳ تا ۴ دوره ۱۴ روزه 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 بیونج مشخص شود. در نهایت از محیط کشت MB حاوی هورمون NAA با غلظت ۰/۲ میلی گرم در لیتر برای ریشه‌زایی رقم ثمین استفاده گردید و ریشه‌زایی شاخه‌های باقی‌مانده از رقم بیونج در همان محیط با غلظت ۰/۴ میلی گرم 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. حدوداً 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 DNA ژنومی از نمونه‌های برگ گیاهان سازگار یافته‌ی نخود در محیط هیدروپونیک به روش CTAB DNA Extraction با کمی تغییر استخراج 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 ۹۴ درجه سانتی‌گراد مدت ۵ دقیقه و در ۳۵ چرخه بعدی به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. دمای مرحله اتصال آغازگرهای *epsps*، *nptII*، *ITS* و *p5cs* به ترتیب ۶۰، ۵۰، ۵۸ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود و در تمام چرخه‌ها زمان ۴۵ ثانیه برای آنها در نظر گرفته شد. 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

DNA گیاهان تراریخته از شاهد های مناسب شامل DNA گیاهان غیر تراریخته، واکنش PCR بدون DNA و یک واکنش با

DNA پلاسمیدی انجام گرفت تا کنترل های مناسب در حین آزمایش انجام شود.

جدول ۱- توالی الیگونوکلو تیدی آغازگرهای *epsps*، *nptII*، *ITS* و *p5cs*Table 1. Primer sequences for *epsps*, *nptII*, *ITS* and *p5cs* genes.

Gene name	Direction	Sequence	Amplicon size
<i>epsps</i>	Forward	5'-TCCATTACACGCAGAAGGTG-3'	600 bp
	Reverse	5'-TTTCCAGCACATCAGCAAAG-3'	
<i>nptII</i>	Forward	5'-CAGGTTCTCCGGCCGCT-3'	750 bp
	Reverse	5'-GAACCTCGTCAAGAAGGC-3'	
<i>ITS</i>	Forward	5'-GCTATGCATGGCACGAC-3'	1500bp
	Reverse	5'-CCCACGGCTTTTCGCAG-3'	
<i>p5cs</i>	Forward	5'-CAGCTTCTTGTACCGACAATG-3'	250 bp
	Reverse	5'-CCCAGAATATGCCAGAAGAATC-3'	

شامل RNA گیاهان تراریخته به منظور صحت cDNA ساخته شده و عدم آلودگی آن به DNA، واکنش RT-PCR بدون cDNA و یک واکنش با DNA پلاسمیدی انجام گرفت تا کنترل های مناسب در حین آزمایش انجام شود.

استخراج RNA از نمونه های مشکوک به تراریخته، با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت دنایست انجام شد. به منظور بررسی کیفیت RNA استخراجی از ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد و مقدار ۱ میکرو لیتر از RNA استخراجی به همراه ۰/۵ میکرو لیتر رنگ روی ژل بارگذاری شد.

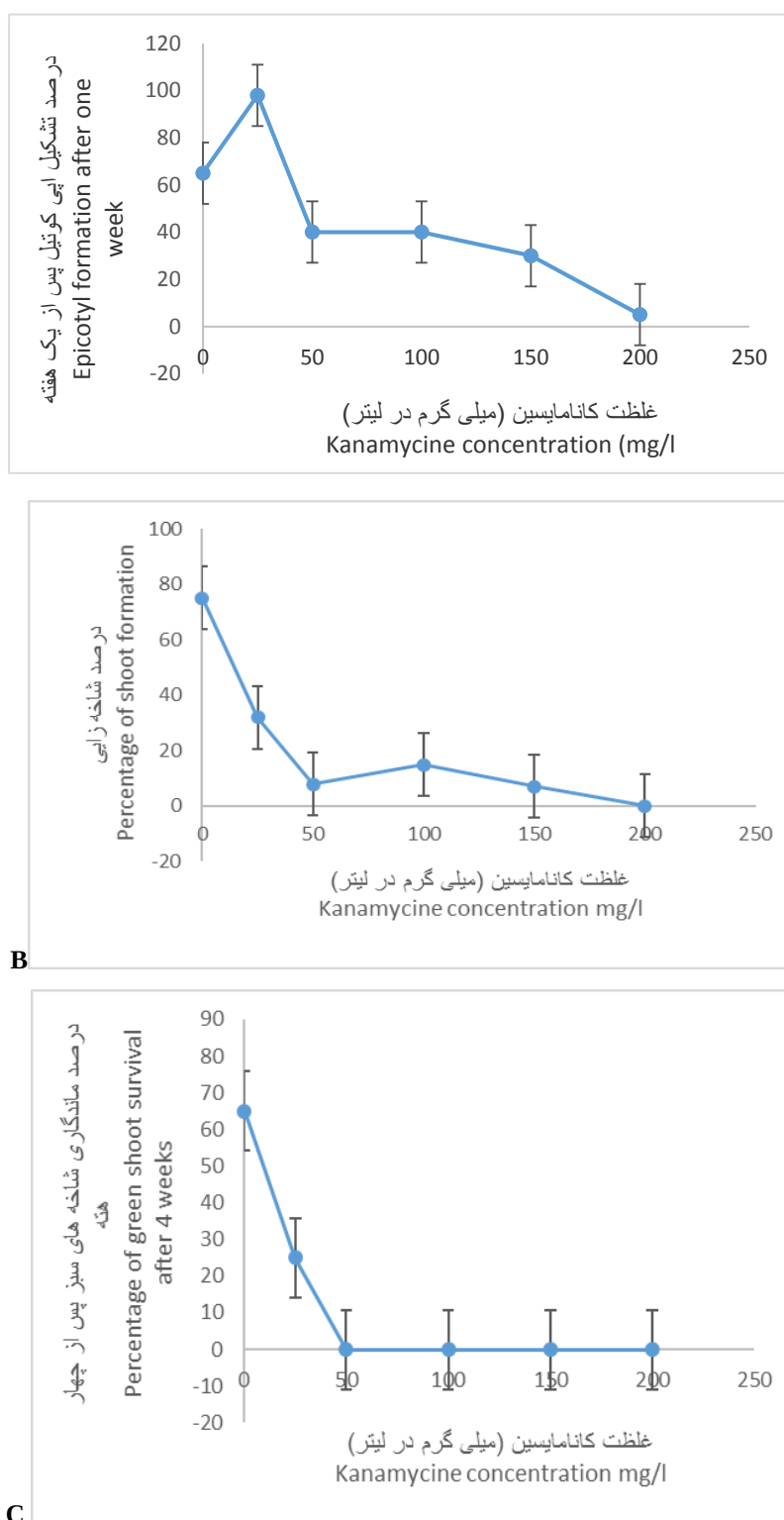
نتایج

بهینه سازی غلظت کانامایسین به منظور انتخاب گیاهان تراریخته: نتایج بررسی پس از یک هفته از زمان قراردادن ریزنمونه های محور جنینی در محیط کشت، نشان داد بین غلظت های مختلف کانامایسین در مرحله ی جوانه زنی اختلاف معنی داری وجود ندارد؛ اما بین غلظت های مختلف کانامایسین در مرحله ی تشکیل اپی کوتیل اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد وجود دارد (شکل ۲- A).

با گذشت دو هفته از زمان قرارگیری ریزنمونه های محور جنینی در محیط کشت MS به همراه غلظت های مختلف کانامایسین، درصد شاخه زایی در غلظت های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی در این مرحله نشان داد که بین غلظت های مختلف کانامایسین اختلاف معنی داری وجود دارد (شکل ۲- B). درصد شاخه زایی ریزنمونه های محور جنینی نخود در غلظت های مختلف کانامایسین نشان دهنده ی بیشترین شاخه زایی در محیط فاقد کانامایسین و عدم شاخه زایی در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین می باشد.

برای سنتز cDNA، از RNA با کیفیت بالا و عاری از DNA، طبق دستورالعمل شرکت پارس توس استفاده شد. ابتدا ۵۰۰ نانوگرم RNA تیمار شده با DNase را به میکروتیوب حاوی ۱۰ میکرو لیتر بافر مخلوط (2x) و ۲ میکرو لیتر آنزیم مخلوط اضافه شدند. حجم واکنش با اضافه کردن آب تیمار شده با DEPC بدون نوکلئاز به ۲۰ میکرو لیتر رسانده شد. بلافاصله مخلوط ایجاد شده ورتکس شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر Master cycler gradient قرار گرفت. در این مرحله، میکروتیوب ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. واکنش با قرار دادن میکروتیوب ها در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه پایان یافت. در مرحله نهایی، میکروتیوب ها داخل یخ قرار گرفت و سپس در فریزر منفی ۲۰ تا زمان استفاده نگهداری شد.

به منظور استفاده از cDNA در واکنش RT-PCR، رقیق سازی آن با استفاده از آب مقطر آمپولی انجام شد (غلظت cDNA ۵ برابر رقیق شد). سپس تجزیه و تحلیل RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *epsps* صورت گرفت. چرخه های RT-PCR نیز مطابق آزمون PCR با آغازگر اختصاصی ژن *epsps* انجام شد. در واکنش RT-PCR علاوه بر cDNA گیاهان تراریخته از شاهد های مناسب



شکل ۲- درصد تشکیل اپی کوتیل و شاخه زایی نخود تحت تاثیر غلظتهای مختلف کانامایسین **A** - درصد تشکیل اپی کوتیل پس از یک هفته، **B** : درصد شاخه زایی ریزنمونه های محور جنینی نخود در غلظت های مختلف کانامایسین. **C** : درصد ماندگاری شاخه های سبز نخود پس از ۴ هفته در غلظت های مختلف کانامایسین. در هرستون میانگین های دارای حرف مشابه تفاوت معنی داری 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.

بیشتری برای ریشه‌زایی رقم بیونچ استفاده شد. ریشه‌زایی رقم بیونچ در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام شد (شکل ۳). درصد ریشه‌زایی مجموع گیاهچه‌های انتقال یافته (رقم ثمین و بیونچ) در این دو محیط کشت ۴۸/۸ 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 احتمالاً 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 ایجاد کرده 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 ۶۰۰ جفت بازی می‌شود. علاوه بر DNA گیاهان تراریخته از شاهد مناسب شامل DNA گیاهان غیرتراریخته، واکنش PCR بدون DNA و یک واکنش با DNA پلاسمیدی

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.

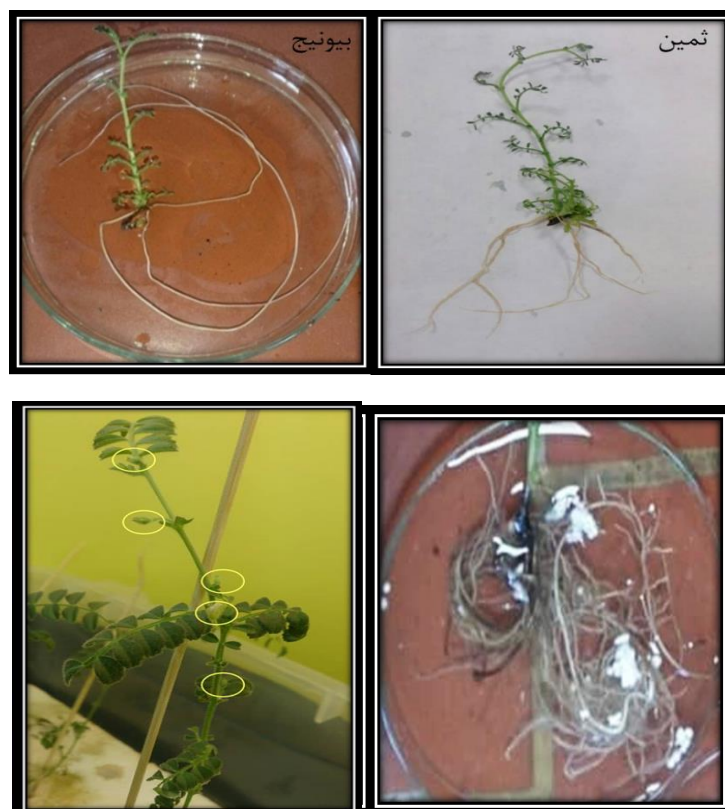
ریزنمونه‌های موجود در محیط کشت حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در مرحله‌ی اول بیش‌ترین درصد اپی‌کوتیل را دارا بودند، اما پس از گذشت دو هفته از زمان کشت، به‌دلیل سمیت کانامایسین و تأثیر آن بر شاخه‌زایی، درصد شاخه‌زایی نسبت به مرحله‌ی قبل کاهش یافت. به‌دلیل سمیت بالای کانامایسین در غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و بالاتر و ممانعت از شاخه‌زایی و رشد گیاهان در این آزمایش و بررسی‌های 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 ۴ 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 بیونچ: 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 بیونچ با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ریشه‌زایی نداشت بنابراین از غلظت

نیز استفاده شد. آغازگر مورد استفاده در گیاهان تراریخته منجر به تکثیر قطعه‌ای با اندازه‌ی تقریبی ۷۵۰ جفت بازی می‌شود (شکل ۴- B). گیاهانی که باند مربوط به ژن هدف را نشان دادند دارای ژن *nptII* نیز بودند.

به‌عنوان کنترل مثبت در حین آزمایش استفاده شد (شکل ۴- 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

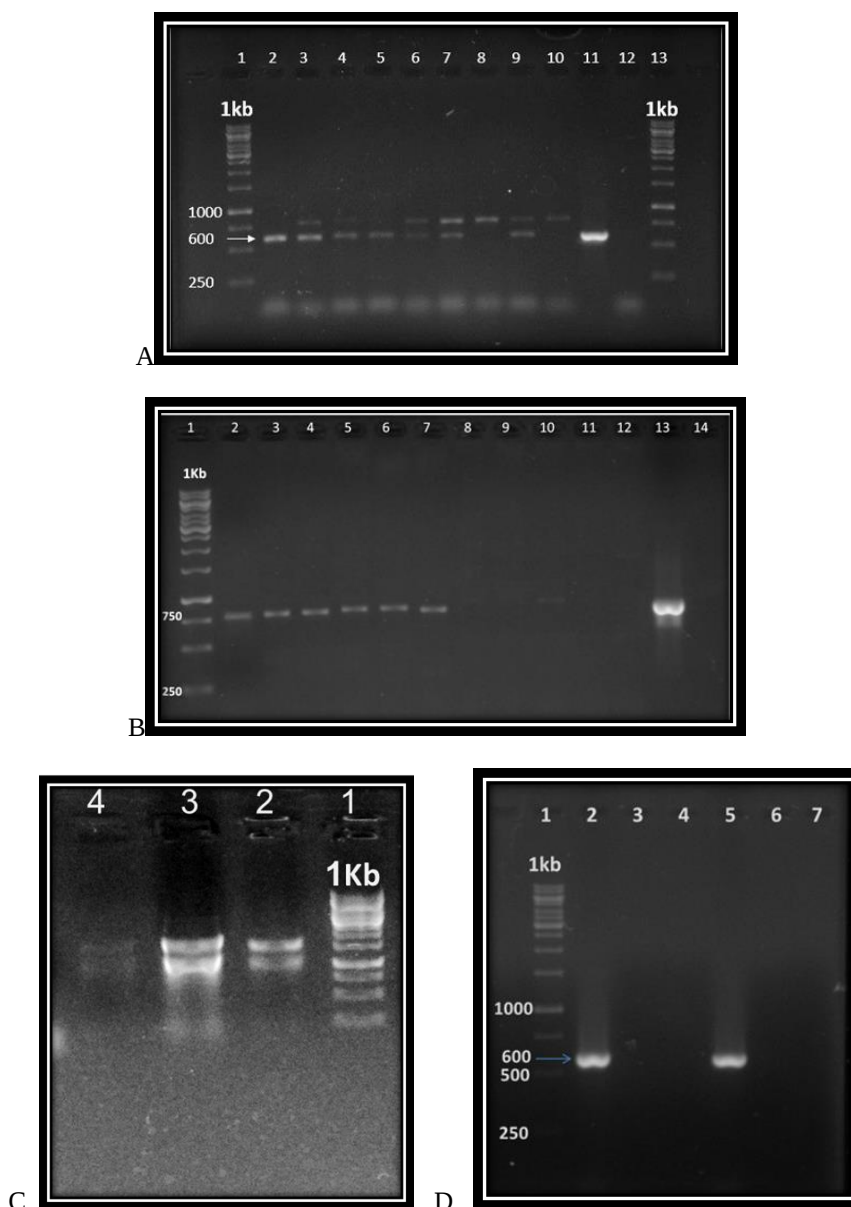


شکل ۳- مورفولوژی ریشه‌های ایجاد شده در محیط ریشه‌زایی MB با استفاده از NAA. (سمت راست بالا شامل ریشه‌زایی رقم ثمین در ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و سمت چپ بالا شامل ریشه‌زایی رقم بیونج در ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA). توسعه‌ی سیستم ریشه‌ای و گلدهی گیاهان مشکوک به تراریختگی در محیط هیدروپونیک (تصاویر پایین).

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 Bivonij 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).

است). نتایج واکنش PCR تکثیر قطعه‌ی موردنظر در DNA پلاسمیدی بود. از ۲۰۰۰ ریزنمونه‌ی 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.

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 DNA گیاهان تراریخته از شاهد مناسب شامل DNA گیاهان غیرتراریخته، واکنش PCR بدون DNA و یک واکنش با DNA پلاسمیدی انجام شد تا کنترل‌های مناسب در حین آزمایش استفاده شود (تصویر نشان داده نشده



شکل ۴-تأیید مولکولی گیاهان تراریخته، A: تأیید حضور ژن هدف در گیاهان مشکوک به تراریختگی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *epsps* و تکثیر قطعه‌ی ۶۰۰ جفت بازی. چاهک ۱۳. سایز مارکر، ۹ تا ۲. گیاهان مشکوک به تراریخته، ۱۰. گیاه غیرتراریخته (شاهد)، ۱۱. کنترل مثبت (DNA پلاسمید باکتری)، ۱۲-واکنش PCR بدون DNA. **B:** تأیید حضور ژن هدف در گیاهان مشکوک به تراریخته با استفاده از آغازگرهای *nptII*. چاهک ۱. سایز مارکر، ۱۱ تا ۲. گیاهان مشکوک به تراریخته (۲ تا ۷ تکثیر قطعه‌ی مورد نظر و تأیید تراریختگی با آغازگر *nptII*، ۱۲. گیاه غیرتراریخته (شاهد)، ۱۳. کنترل مثبت (پلاسمید باکتری). ۱۴. واکنش PCR بدون DNA. **C:** بررسی کیفیت استخراج RNA و تیمار با DNase. (۱) سایز مارکر. (۲ و ۳) کیفیت استخراج RNA و عدم آلودگی به DNA. (۴) RNA تیمار شده با DNase. **D:** واکنش RT-PCR با استفاده از cDNA و آغازگر *epsps*. ۱. سایز مارکر. ۲ و ۵. cDNA گیاهان تراریخته و تکثیر قطعه مورد نظر. ۳ و ۶. RNA گیاهان تراریخته، عدم تکثیر قطعه نشان دهنده‌ی عدم آلودگی به DNA می‌باشد. ۷. 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 *nptII* primers. Well 1 size marker, 2-11 suspected transgenic plants (2-7 propagating the target piece and verifying the transgenic 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.

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 بیونج، 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 شده است. 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 به تدریج افزایش داده و از ۵۰ به ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر رساندند. نتایج مطالعه پولوویک و همکاران (۲۰۰۴) 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 بررسی‌های 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 نشده است. 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 حالی که در بررسی حاضر گیاهچه‌های نخود تیپ کابلی (رقم ثمین و بیونج) با استفاده از هورمون IAA ریشه‌دار نشد (Moshtaghi et al. 2009). فونتانا و همکاران (Fontana et al. 1993) از محیط کشت MS به

برای تأیید استفاده از DNA 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 DNA 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 RNA استخراجی، از ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد. مقدار یک میکرولیتر از RNA 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 این حال نمونه‌ها پس از تیمار با DNase برای سنتز cDNA آماده شد و دوباره به همراه RNA اولیه روی ژل بارگذاری شد (شکل ۴ - 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 ۴ - 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 اصطلاحاً سرسوخستگی گیاه نامیده می‌شود، همچنین زمانی که از فویل آلومینیوم برای پوشش شیشه‌های حاوی ریزنمونه استفاده گردید گیاهان دچار سرسوخستگی 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

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، ۰/۴ درصد گزارش شده است. در گزارش آنها از استوسیرینگون نیز استفاده شده است در حالیکه در بررسی حاضر انتقال ژن بدون استفاده از استوسیرینگون انجام شده است و درصد تراریختگی ۰/۷۵ درصد به دست آمده است.

سپاسگزاری

لازم است از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تامین اعتبار طرح با کد ۴۴۷۸۶ 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 tumefaciens*, 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 Kather 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, Mahdiah 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

- 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.