مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰
ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

بهینه‌سازی یک روش کارآمد برای باززایی، ریشه‌زایی و بیان گذرای ژن با واسطه *اگروباکتریوم* در ارقام ایرانی نخود

20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5

نیلوفر پیکاری[۱،۲]، علاءالدین کردنائیج[۲]، کتایون زمانی[*۱]

۱- گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

katayounzamani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵
صفحه ۱۰۶-۹۵

چکیده

نخود (*Cicer ariethinum* L.) به‌عنوان یک منبع غذایی غنی از پروتئین در رژیم غذایی انسان و همچنین به‌عنوان خوراک دام اهمیت زیادی دارد. همچنین نخود نقش مهمی در افزایش حاصلخیزی خاک داشته و می‌تواند نیتروژن مورد نیاز خود را با تثبیت نیتروژن اتمسفری و از طریق همزیستی به‌ویژه در مناطق خشک تامین کند. در این پژوهش، روشی کارآمد برای باززایی و تکثیر درون شیشه چهار رقم نخود ایرانی هاشم، آزاد، آرمان و سعید با استفاده از محور جنینی ایجاد شده است که با تغییرات جزیی در غلظت هورمون‌ها می‌تواند برای تکثیر سایر ارقام نخود نیز مورد استفاده قرار گیرد. دو رقم هاشم و آزاد با تولید بیش از ۴۰ جوانه بیشترین باززایی را داشتند و گیاهان باززا شده با موفقیت ریشه‌دار و به گلدان منتقل شدند. همچنین عوامل موثر در تراریختی نخود، مانند سویه مناسب *اگروباکتریوم*، مدت زمان تلقیح و مدت زمان هم‌کشتی با استفاده از ژن گزارشگر *β-Glucoronidase* (*GUS*)و روش بیان گذرا بررسی و شرایط بهینه تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، بیان گذرا، محور جنینی، نخود.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

مقدمه

فناوری کشت بافت ابزاریست که برای مقاصد کاربردی و تحقیقاتی در دامنه وسیعی از پژوهش‌ها در مورد مراحل نمو گیاهان، بررسی بیان ژن، ریزازدیادی برای مقاصد تجاری، تولید گیاهان تراریخته با صفات خاص تجاری و زراعی، اصلاح و بهبود کیفیت گیاهان زراعی، حذف ویروس و سالم‌سازی گیاهان از عوامل آلوده‌کننده و تولید گیاهان سالم و با کیفیت بالا، حفظ و نگهداری از ژرم‌پلاسم گیاهان زراعی و تولید متابولیت‌های ثانویه صنعتی و دارویی استفاده می‌شود (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018).

از سوی دیگر با افزایش جمعیت جهان و نیاز روزافزون برای مواد غذایی و کاهش منابع، فناوری‌های نوین برای اصلاح گیاهان اهمیت بیشتری یافته است. نخود (*Cicer ariethinum* L.) در بیش از ۵۰ کشور دنیا کشت می‌شود و ۹۰٪ سطح زیر کشت آن در کشورهای در حال توسعه است و سهم کشورهای جنوب و جنوب شرق آسیا بیش از ۷۹٪ از تولید جهانی است (Kumar et al. 2018).

نخود به‌عنوان یک منبع غذایی غنی از پروتئین (۲۴/۵-۳۱/۲ درصد) در رژیم غذایی انسان و همچنین به‌عنوان خوراک دام اهمیت زیادی دارد. ارزش تغذیه‌ای پروتئین موجود در نخود بیش از سایر حبوبات است (Vandana et al. 2020). علاوه‌بر پروتئین، نخود منبعی غنی از کربوهیدرات‌ها (۷۰/۹-۵۲/۴ درصد) و مواد معدنی مانند کلسیم، فسفر، روی و آهن و ویتامین‌های گروه B است (Gopalakrishnan et al. 2018).

در دو دهه گذشته تولید نخود در جهان افزایش یافته و رتبه سوم را پس از لوبیا و نخود فرنگی به خود اختصاص داده است (Vandana et al. 2020).

نخود نقش مهمی در افزایش حاصلخیزی خاک داشته و می‌تواند بیش از ۷۰ درصد نیتروژن مورد نیاز خود و تا ۳۰ درصد نیتروژن مورد نیاز برای گیاهان زراعی فصل بعد را با تثبیت نیتروژن از طریق همزیستی به‌ویژه در مناطق خشک تامین کند. نخود می‌تواند ۱۷۶-۶۰ کیلوگرم نیتروژن را در هر هکتار تثبیت کند، بنابراین گیاه بسیار مناسبی برای تناوب زراعی به‌ویژه با گندم و جو است (O'Rourke et al. 2014; Meena et al. 2019; Wolde-meskel et al. 2018).

یافتن روش مناسب باززایی پیش‌نیاز کاربردهای دیگر در زیست‌فناوری از جمله مهندسی ژنتیک و تراریختی است. کشور هند بزرگترین تولیدکننده و مصرف‌کننده نخود است و بیشتر پژوهش‌ها بر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

روی این گیاه توسط پژوهشگران هندی و بر روی ارقام هندی انجام شده است. چندین روش باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیک و اندام‌زایی در نخود گزارش شده است. القای جنین‌زایی سوماتیک از برگچه‌ها و محور جنین بالغ و نابالغ و سوسپانسیون سلولی انجام شده است ولی درصد باززایی بسیار پایین بوده و کاربرد این روش‌ها را محدود ساخته است. در اغلب موارد محور جنینی بهترین پاسخ را به تیمارهای هورمونی داده است (Jayanand et al. 2003; Chakraborti et al. 2006)، با اینحال، ریشه‌زایی با مشکل مواجه بوده است. باززایی غیر مستقیم نخود از طریق کالوس در ارقام ایرانی نیز گزارش شده است(Mirakabad et al. 2010; Minaei et al. 2015).

در این پژوهش، باززایی ۴ رقم نخود ایرانی و سپس ریشه‌زایی گیاهان حاصل از کشت بافت مورد بررسی قرار گرفته و با موفقیت انجام شده است که می‌تواند در آینده برای اصلاح این گیاه مورد استفاده قرار گیرد. همچنین عوامل موثر در تراریختی نخود با واسطه *اگروباکتریوم تومه‌فاشنس* (*Agrobacterium tumefaciens*) همانند سویه مناسب باکتری، مدت زمان تلقیح، مدت زمان هم‌کشتی با بیان گذرای ژن *β-Glucoronidase* (*GUS*) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، استریل بذر و جوانه‌زنی

در این پژوهش ارقام نخود ایرانی هاشم، آزاد و آرمان از مرکز تحقیقات کشاورزی استان همدان و رقم سعید از مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان تهیه شده است. بذرها به مدت یک شب در وایتکس ۱٪ (V/V) تجاری خیسانده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه دراتانول ۷۰٪ و ۲۰ دقیقه در وایتکس ۲۰٪ استریل شدند. پس از چهار بار شستشو با آب استریل، پوست بذرها جدا و به مدت یک هفته به‌طور مستقیم بر روی محیط کشت با غلظت‌های مختلف هورمونی قرار داده شدند که برای باززایی تهیه شده بود.

بهینه‌سازی محیط باززایی نخود

با بررسی منابع موجود ۵ محیط کشت با ترکیب دو هورمون بنزیل آمینو پورین (benzylaminopurine; BAP) (۰، ۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالن استیک اسید (naphthaleneacetic acid; NAA) با غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر تهیه و باززایی در آنها بررسی شد. محیط‌های کشت بر اساس محیط پایه موراشیگ و اسگوک (MS)، ویتامین‌های B5، ساکارز ۳ درصد و آگار ۰/۷ درصد تهیه شدند. جداکشت‌ها بر روی محیط کشت در شرایط نوری

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲۳ درجه سلسیوس در فیتوترون قرارگرفتند. برای هر ترکیب محیط کشت ۴ تکرار و در هر تکرار بین ۵ تا ۶ جداکشت مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی ریشه‌زایی در نخود

ریشه‌زایی گیاهان باززایی‌شده در غلظت‌های مختلف هورمون IBA (indole-3-butyric acid) و NAA (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۴ و ۵ میلی مولار) بررسی شد. در این آزمایش‌ها محیط ریشه‌زایی شامل نمک‌های MS با نصف غلظت، ویتامین‌های B5، ساکارز ۳ درصد، غلظت‌های مختلف هورمون IBA و NAA بود و pH محیط بر روی ۶ تنظیم شد. محیط‌های مذکور با ۰/۷ درصد آگار گیاهی جامد شدند.

بهینه‌سازی تراریختی نخود

با استفاده از اطلاعات موجود در منابع و کارهای گذشته یک روش استاندارد یا پایه به شرح زیر برای تراریختی در نظر گرفته شد و سپس بر اساس نتایج حاصل از آزمایش‌های بعدی مربوط به بهینه‌سازی، این روش اصلاح شد. در کلیه آزمایش‌ها از رقم آزاد برای بهینه‌سازی تراریختی استفاده شد. کشت شبانه‌ای از *A. tumefaciens* دارای سازه *pCAMBIA2301* تهیه شد. سپس باکتری‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس و با rpm ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند و در دو برابر حجم از محیط القا (MS ½ مایع با حذف $CaCl_2$ و KH_2PO_4، استوسیرینگون (acetosyringone) ۲۵۰ میکرو مولار، ۴٪ ساکارز و pH برابر ۵/۲) دوباره تعلیق شدند. سوسپانسیون باکتری تا رسیدن به OD مناسب (OD600= 0.5-0.7) و آماده‌سازی جداکشت‌ها برای کار تلقیح، دوباره در شیکر انکوباتور با rpm ۱۸۰ و دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۰/۵ تا ۱ ساعت قرار گرفت. جداکشت‌ها پس از تلقیح به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط نوری نیمه تاریک قرار گرفتند و سپس به محیط گزینش دارای ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم (cefotaxime) و عامل انتخابگر (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین) منتقل شدند.

رنگ آمیزی GUS

بررسی بیان بافتی با استفاده از رنگ‌آمیزی GUS انجام شد (Jefferson et al. 1987). پس از گذشت ۲۴ ساعت بافت‌ها با اتانول۷۰٪ رنگ‌بری شدند و از نمونه‌ها عکس‌برداری شد.

انتخاب بهترین سویه *اگروباکتریوم* برای تراریختی

سازه *pCAMBIA2301* پس از انتقال به سویه‌های مختلف *اگروباکتریوم* شامل GV3101،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

LBA4404، GV2260 و AGL1 جهت آزمون بالاترین میزان انتقال ژن به سلول گیاهی بررسی شد.

بررسی بیشترین بیان گذرا

در این آزمایش نمونه‌ها پس از تراریختی در روزهای سوم، پنجم، هفتم و دهم، رنگ‌آمیزی GUS شدند. زمان مناسب برای بیشترین میزان بیان ژن بر اساس بیان ژن *GUS* و شدت رنگ ایجادشده در بافت انتخاب شد.

بررسی بهترین مدت زمان تلقیح

مدت زمان تلقیح در سه بازه زمانی دو ساعت، چهار ساعت و شبانه (overnight) بررسی شد. میزان انتقال ژن با استفاده از رنگ‌آمیزی GUS در روزهای هفتم، دهم و همچنین بعد از گذشت یک ماه بررسی و اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

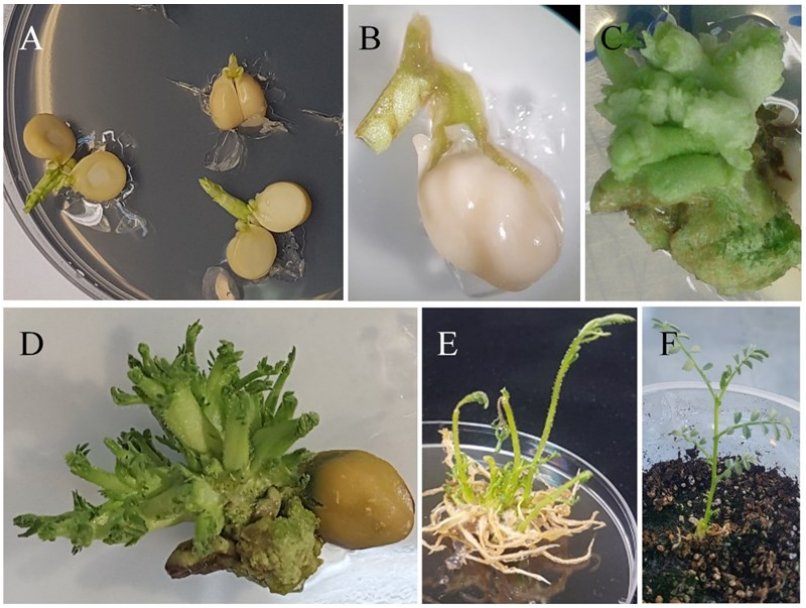
بهینه‌سازی باززایی ارقام ایرانی نخود

بررسی منابع در زمینه کشت بافت و باززایی نشان داد که در اغلب ارقام نخود بهترین بافت برای باززایی محور جنینی همراه با لپه است (Srivastava et al. 2017; Ali et al. 2009; Ugandhar et al. 2012). بنابراین، بافت مذکور برای بررسی باززایی از ارقام ایرانی نخود انتخاب شد. به‌منظور جوانه‌زنی و تولید جداکشت‌های مناسب و القای باززایی، بذرها پیش‌تیمار شده و از ابتدا بر روی محیط کشت با غلظت‌های مختلف هورمونی برای جوانه‌زنی قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته، بذرها جوانه زده و در این حالت رشد طولی ریشه کاهش پیدا کرد و بر رشد قطری آن افزوده شد (شکل 1A). سپس از این جوانه‌های ۷ الی ۸ روزه، ریشه و جوانه رأسی جدا شد. به‌منظور اجتناب از رشد جوانه‌های از پیش موجود، جوانه جانبی بین لپه و محور جنینی حذف و محور جنینی از وسط به دو قسمت مساوی تقسیم شد و بر روی محیط کشت با همان غلظت‌های اولیه در مرحله جوانه‌زنی قرار گرفت (شکل 1B). بررسی جداکشت‌ها نشان داد که با گذشت زمان ابتدا تورم‌هایی در محل اتصال لپه به محور جنینی شکل می‌گیرد (شکل 1C) که این بافت‌های متورم در مراحل بعدی تولید تعداد زیادی جوانه می‌کند (شکل 1D). این جوانه‌ها پس از رسیدن به اندازه ۱/۵ تا ۲ سانتیمتری از بافت پایه جدا و برای رشد بیشتر به محیط فاقد هورمون و سپس به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. در محیط فاقد هورمون، جوانه‌ها رشد مناسبی نداشتند. قطر ساقه‌ها باریک باقیمانده و نوک برگ‌ها حالت سوختگی پیدا می‌کرد. بنابراین غلظت KH_2PO_4،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

$CaCl_2$ دو برابر شد. سوختگی برگ‌ها در محیط اصلاح‌شده، برطرف شد و رشد گیاهان بیشتر و گیاهان سبزتر و قطرساقه‌ها بیشتر شد. ریشه‌زایی گیاهان حاصل از کشت بافت در غلظت‌های مختلف از هورمون IBA و NAA در محیط ½ MS و با استفاده از دو رقم هاشم و آزاد بررسی شد. در محیط ریشه‌زایی pH روی ۶ تنظیم شد. پس از گذشت ۱۰ روز در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر از IBA در رقم هاشم ریشه‌های نابجا ایجاد شد (شکل ۱E). گیاهچه‌های رقم آزاد نیز در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA و پس از گذشت یک هفته ریشه تولید کردند. گیاهان ریشه‌دارشده به گلدان حاوی مخلوط پیت و پرلیت منتقل شدند (شکل ۱F). بررسی منابع نشان داد که ریشه‌زایی در اغلب مواقع از ریزنمونه های نخود ناموفق بوده و برای انتقال به خاک و گلدان از پیوند استفاده شده است. در حالی‌که در ارقام ایرانی بعد از گذشت ده روز از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی، جوانه‌ها ریشه‌دار شدند (Chakraborti et al. 2006; Chakraborti et al. 2009; Ibrahim et al. 2016; Srivastava et al. 2017).



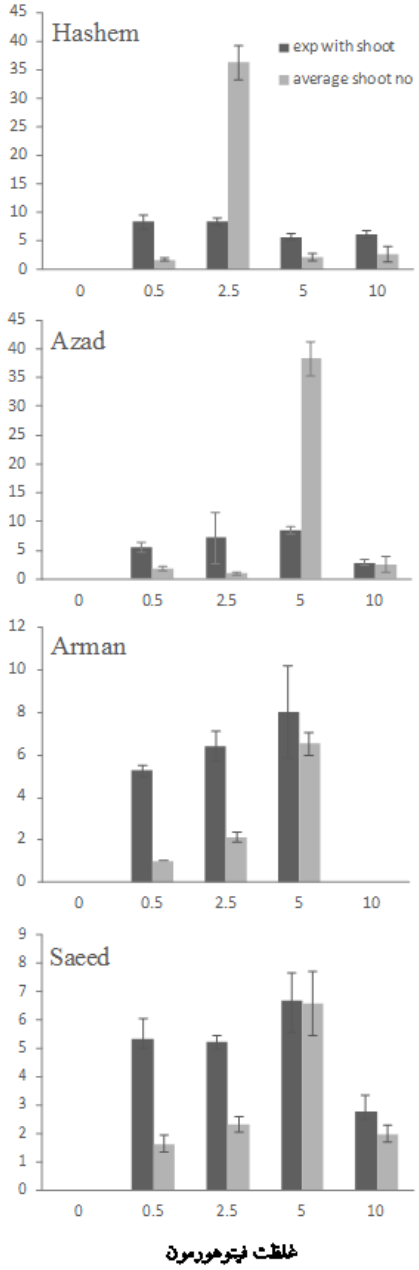
شکل ۱- مراحل مختلف باززایی از گیاه نخود.

A: بذر ۷ روزه جوانه‌زده برای تهیه بافت جهت تکثیر، B: جداکشت آماده‌شده برای ایجاد جوانه، C: تورم بافت و پدیدارشدن پیش‌جوانه‌ها D: رشد جوانه‌ها، E: ریشه‌دارشدن جوانه‌ها، F: انتقال جوانه حاصل از کشت بافت به گلدان.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

بهترین باززایی در رقم آزاد با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و پس از آن در رقم هاشم با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود که به ازای یک جداکشت بیش از ۴۰ جوانه و در مواردی تا ۴۸ جوانه مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- میزان باززایی ارقام مختلف نخود در محیط کشت‌هایی با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP. بیشترین باززایی به ازای یک قطعه جداکشت در دو رقم هاشم و آزاد مشاهده شد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

بیشترین باززایی در ارقام هندی، ۲۶ جوانه به ازای یک جداکشت توسط Chakraborti و همکاران (۲۰۰۶) و پس از آن ۱۱ جوانه به ازای یک جداکشت بوده که توسط Srivastava و همکاران (۲۰۱۲) به دست آمده است (Chakraborti et al. 2006; Srivastava et al. 2012). در ارقام ایرانی کالوس‌زایی در رقم بیونیج مورد بررسی قرارگرفته است (Minaei et al. 2015). مشتاقی و همکاران (۱۳۸۵) نیز موفق به باززایی حداکثر ۱۰ جوانه در رقم MCC505 شدند (Moshtagi et al. 2007). همچنین باززایی غیر مستقیم از طریق القای کالوس و سپس شاخه‌زایی در ژنوتیپ‌هایی بررسی شد که به‌طور گسترده در خراسان کشت می‌شوند و بیشترین باززایی در رقم MCC764 با میانگین ۲/۹ جوانه به ازای هر کالوس مشاهده شد (Zare Mirakabad et al. 2010).

زمان مناسب برای مشاهده حداکثر بیان در تراریختی گذرا

زمان مناسب برای مشاهده حداکثر بیان در تراریختی گذرا با استفاده از جداکشت‌هایی تعیین شد که ترکیبی از جوانه‌های نوظهور و بافت کالوس بودند. میزان بیان با رنگ‌آمیزی GUS بر روی نمونه‌های تلقیح‌شده، در روزهای سوم، پنجم، هفتم و دهم انجام شد. زمان مناسب بر اساس شدت رنگ آبی لکه‌ها بر روی جداکشت‌ها درجه‌بندی شد. نتایج رنگ‌آمیزی نشان داد که بیان ژن بین روزهای پنجم تا ششم به حداکثر رسیده و سپس روند کاهشی داشته و در روز دهم به حداقل می‌رسد (شکل ۳A).

انتخاب سویه مناسب *اگروباکتریوم* با بیشترین میزان تراریختی

ناقل *pCAMBIA2301* با روش ذوب و انجماد به چهار سویه LBA4404، GV3101، GV2260 و AGL1 *اگروباکتریوم* منتقل و حضور آن با کلونی PCR تایید شد. پس از تراریختی به شیوه گذرا، بیان ژن *GUS* در روز پنجم با شمارش تعداد لکه‌های ایجادشده بررسی شد.

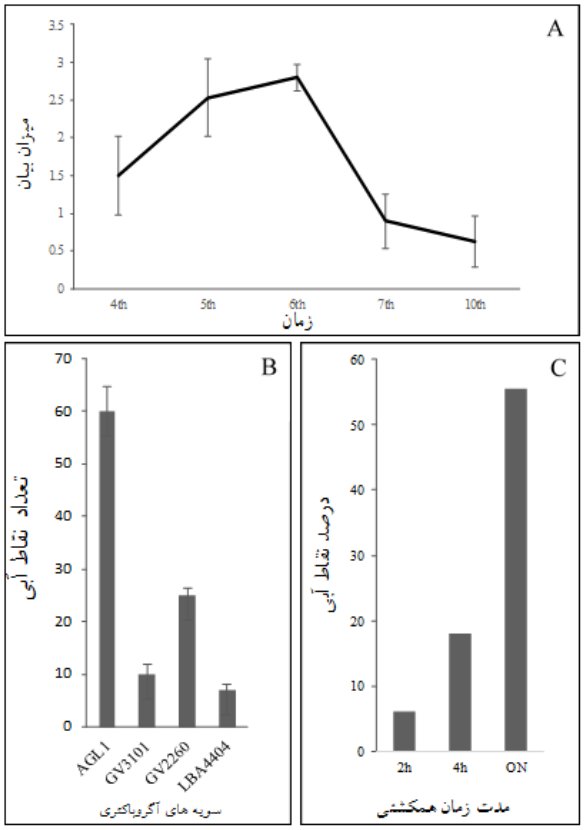
نتایج نشان داد که سویه AGL1 بیشترین تعداد لکه بر روی جداکشت‌ها را ایجاد کرده و بیشترین قابلیت انتقال ژن برای نخود را داراست. در رتبه بعدی سویه GV2260 قرار دارد و LBA4404 کمترین کارایی برای انتقال ژن به نخود را دارد (شکل ۳B). با توجه به اینکه ژن *GUS* در سازه‌های *pCAMBIA* دارای اینترون است، حضور اینترون مانع از بیان این ژن در باکتری شده و رنگ آبی مشاهده‌شده فقط مربوط به سلول گیاهی است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

بررسی مدت زمان تلقیح

نتایج نشان داد که میزان انتقال ژن با مدت زمان تلقیح رابطه خطی داشته و باقی‌ماندن بیشتر جداکشت‌ها در مجاورت *اگروباکتریوم* با افزایش انتقال ژن همراه است اما میزان آلودگی با *اگروباکتریوم* نیز به همین نسبت بیشتر می‌شود که در واکشت‌های بعدی حفظ گیاهان را به علت غیرقابل کنترل بودن آلودگی باکتریایی با مشکل مواجه می‌سازد. از سوی دیگر بخشی از جداکشت‌ها به‌حالت شیشه‌ای درآمدند. به‌منظور حصول اطمینان از درج ژن، داخل ژنوم و عدم مشاهده بیان گذرا، بخشی از نمونه‌ها (کالوس‌ها) پس از یک ماه، رنگ‌آمیزی GUS شدند و نتایج حاکی از افزایش نرخ تراریختی با تلقیح جداکشت‌ها به‌صورت overnight بود. از اینرو تعداد گیاهانی که باقی می‌ماندند بسیار کم و حفظ آنها دشوار است (شکل ۳C).



شکل ۳- بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر در تراریختی نخود.

A: تعیین زمان بیشترین بیان گذرا، B: انتخاب بهترین سویه *اگروباکتریوم*، C: تعیین مدت زمان مناسب تلقیح با *اگروباکتریوم*.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

به‌طور خلاصه، بر اساس نتایج این پژوهش، روشی کارآمد برای باززایی و تکثیر درون شیشه گیاه نخود معرفی می‌شود که با تغییرات جزیی در غلظت هورمون‌ها می‌تواند برای تکثیر سایر ارقام نخود نیز مورد استفاده قرار گیرد. همچنین برخی از عوامل موثر در کارایی تراریختی مورد بررسی قرار گرفت که می‌تواند در آینده برای اصلاح نخود با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک استفاده شود.

فهرست منابع

References

Ali SS, Yealla P, Sarmah BK. 2009. Bar as a potential selectable marker gene to obtain putative transformants in Indian Chickpea *(Cicer arietinum L.)* Cultivars. Transgenic Plant Journal. 3: 102-106.

Chakraborti D, Sarkar A, Das S. 2006. Efficient and rapid in vitro plant regeneration system for Indian cultivars of chickpea *(Cicer arietinum L.)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 86: 117-23.

Chakraborti D, Sarkar A, Mondal HA, Das S. 2009. Tissue specific expression of potent insecticidal, Allium sativum leaf agglutinin (ASAL) in important pulse crop, chickpea *(Cicer arietinum L.)* to resist the phloem feeding Aphis craccivora. Transgenic Research. 18: 529-44.

Gopalakrishnan S, Srinivas V, Vemula A, Samineni S, Rathore A. 2018. Influence of diazotrophic bacteria on nodulation, nitrogen fixation, growth promotion and yield traits in five cultivars of chickpea. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 15: 35-42.

Ibrahim DA, Khatib F, Baum M. 2016. Assessment the Response of Chickpea Genotypes to Agrobacterium-Mediated Transformation System. Science Journal of University of Zakho. 4: 73-80.

Jayanand B, Sudarsanam G, Sharma KK. 2003. An efficient protocol for the regeneration of whole plants of chickpea *(Cicer arietinum L.)* by using axillary meristem explants derived from in vitro-germinated seedlings. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 39: 171-9.

Jefferson RA.1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology Reporter. 5: 387-405.

Kumar M, Yusuf MA, Nigam M. 2018. An update on genetic modification of chickpea for increased yield and stress tolerance. Molecular Biotechnology. 60: 651-63.

Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N. 2018. An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. Plant cell culture Protocols: 3-13.

Meena BP, Biswas AK, Singh M, Chaudhary RS, Singh AB, Das H, Patra AK. 2019. Long-term sustaining crop productivity and soil health in maize–chickpea system through integrated nutrient management practices in Vertisols of central India. Field Crops Research. 232: 62-76.

Minaei H, Kahrizi D, Zebarjadi A. 2015. Effect of plant growth regulators and explant type upon cell dedifferentiation and callus induction in chickpea *(Cicer arietinum L.)*. Journal of Applied Biotechnology Reports. 2: 241-4.

Moshtagi N, Bagheri A, Jalali Javaran M, Ghareyazi B. 2007. In vitro direct multiple shoot regeneration in five genotypeas of chickpea *(Cicer arietinum L.)*. Agricultural Biotechnology. 6: 62-49. (In Farsi with English abstract).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

O'rourke JA, Bolon YT, Bucciarelli B, Vance CP. 2014. Legume genomics: understanding biology through DNA and RNA sequencing. Annals of Botany. 113: 1107-20.

Srivastava J, Das A, Soren KR, 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: 245-50.

Srivastava J, Datta S, Mishra SP. 2017. Development of an efficient Agrobacterium mediated transformation system for chickpea *(Cicer arietinum)*. Biologia. 72:153-60.

Ugandhar T, Venkateshwarlu M, Sammailah D, Reddy JM. 2012. Rapid in vitro micro propagation of chick pea *(Cicer arietinum L.)* from shoot tip and cotyledonary node explants. J Biotechnol Biomater. 2: 1-6.

Vandana UK, Barlaskar NH, Kalita R, Laskar IH, Mazumder PB. 2020. The Vital Foliar Diseases of *Cicer arietinum* L. (Chickpea): Science, Epidemiology, and Management. InManagement of Fungal Pathogens in Pulses. (pp. 169-190). Springer, Cham.

Wolde-meskel E, van Heerwaarden J, Abdulkadir B, Kassa S, Aliyi I, Degefu T, Wakweya K, Kanampiu F, Giller KE. 2018. Additive yield response of chickpea *(Cicer arietinum L.)* to rhizobium inoculation and phosphorus fertilizer across smallholder farms in Ethiopia. Agriculture, ecosystems and Environment. 261: 144-52.

Zare Mirakabad H, Bagheri AR, Zare Mehrjerdi M. 2012. Efficient protocol for break impasses of regeneration via callus for 20 genotypes of chickpea. International Journal of Plant Production. 4: 115-28.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]

Optimization of an Efficient Protocol for Regeneration, Rooting and *Agrobacterium* Transient Expression in Iranian Chickpea Cultivars

Niloufar Peykari1[1,2], Alaedin Kordnaeij[2], Katayoun Zamani[1*]

1- Department Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Tehran, Iran.
2- Department of Agricultural Biotechnology, Shahed University, Tehran, Iran.

katayounzamani@yahoo.com

Abstract

Chickpea (*Cicer ariethinum* L.) is a highly rich source of protein as the human food and animal feed. Chickpeas also play an important role in increasing soil fertility and can provide their required nitrogen through symbiotic fixation of atmospheric nitrogen, especially in arid regions. In this study, an efficient method has been developed to *in vitro* regenerate and propagate four Iranian cultivars chickpea Hashem, Azad, Arman and Saeed using the embryonic axis. This method with minor changes in hormone concentrations can be used to propagate other cultivars of chickpea. Hashem and Azad cultivars had the highest regeneration by producing more than 40 shoots and the regenerated plants were successfully rooted and transferred to pots. Also, effective factors in chickpea transformation, such as *Agrobacterium* strain, inoculation time and co-culture duration were investigated using *GUS* reporter gene and transient expression method and optimal conditions were determined.

Keywords: Chickpea, Regeneration, Embryonic Axis, Transient Expression.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.8.5]