دانشگاه فردوسی مشهد
دانشکده کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

بهینه‌سازی انتقال ژن *gus* به کالوس نخود به روش باززایی غیرمستقیم

مرتضی محمد پور

مهرماه ۱۳۸۹

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

بهینه‌سازی انتقال ژن *gus* به نخود به روش باززایی غیرمستقیم

مرتضی محمدپور

استاد راهنما

دکتر عبدالرضا باقری

استادان مشاور

دکتر نسرین مشتاقی

دکتر فرج ا... شهریاری

مهرماه ۱۳۸۹

تصویب نامه

این پایان‌نامه با عنوان «**بهینه‌سازی انتقال ژن *gus* به نخود به روش باززایی غیرمستقیم**» توسط مرتضی محمدپور در تاریخ با نمره و درجه ارزشیابی درحضور هیات داوران با موفقیت دفاع شد.

هیات داوران:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	سمت در هیات	امضاء
۱	آقای دکترعبدالرضا باقری	استاد	استاد راهنما	
۲	آقای دکتر فرج ا... احمدی شهریاری	دانشیار	استاد مشاور	
۳	خانم دکتر نسرین مشتاقی	استادیار	استاد مشاور	
٤	آقای دکتر حسن مرعشی	دانشیار	استاد مدعو	
٥	آقای دکتر سعید ملک زاده شفارودی	استادیار	استاد مدعو	
٦	آقای دکتر امین میرشمسی کاخکی	استادیار	نماینده تحصیلات تکمیلی	

تعهد نامه

عنوان پایان نامه:

بهینه‌سازی انتقال ژن *gus* به نخود به روش باززایی غیرمستقیم

اینجانب مرتضی محمدپور دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی- بیوتکنولوژی در کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی جناب آقای دکتر عبدالرضا باقری متعهد می‌شوم:

- **نتایج ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می‌گیرم.**
- **در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.**
- **مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.**
- **کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان‌نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.**
- **حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تاثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.**
- **در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان‌نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.**

تاریخ ۸۹/۷/۱٤

نام و امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده

نتایج مطالعات انجام شده روی انتقال ژن به نخود (*Cicer arietinum* L.) نشان می‌دهد که انتقال ژن به روش باززایی غیرمستقیم از طریق کالوس در این گیاه با موفقیت کمی همراه بوده است. القای نامناسب کالوس و باززایی دشوار از دلایل این عدم موفقیت می‌باشد. این تحقیق با هدف امکان سنجی انتقال ژن گزارشگر *gus* و باززایی غیرمستقیم در سه ژنوتیپ نخود MCC496، MCC763 و MCC798 که در مطالعات انجام شده پیشین بهترین شرایط باززایی غیرمستقیم را دارا بودند، انجام شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که محیط کشت پایه دارای نمک‌های MS و ویتامین‌های B5 به همراه هورمون‌های NAA وBAP محیط کشت مناسبی جهت القای کالوس از ریزنمونه جنین در این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. استفاده از مواد بازدارنده قهوه‌ای شدن مانند زغال فعال به میزان ۰/۵ گرم در لیتر یا اسید آسکوربیک به میزان ۰/۱۲۵گرم در لیتر و یا PVP به میزان ۰/۵گرم در لیتر به طرز معنی‌داری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها جلوگیری کرد. واکشت کالوس‌ها در محیط کشت‌های باززایی، کالوس‌های جنین‌زا تولید نمود ولی از آنها جنین سوماتیکی بدست نیامد. بررسی فلوسایتومتری این کالوس‌ها نشان داد که به دلیل پلی‌پلوئیدی توانایی کمی برای باززایی دارند. نتایج مربوط به انتقال ژن نشان داد که تیمارهای تلقیح ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه به همراه هورمون‌های BAP و NAA بهترین نتیجه را در محیط هم‌کشتی داشت. حضور حداقل یک نسخه از ژن *gus* و بیان آن در کالوس هر سه ژنوتیپ با آزمون‌های PCR و هیستوشیمیایی تایید شد. درصد تراریزش با ژن گزارشگر *gus* به طور میانگین ۰/٦ درصد بود. با توجه به پاسخ نسبتا مشابه هریک از ژنوتیپ‌ها به انتقال ژن، به‌نظر می‌رسد که این نتایج می‌تواند به عنوان یک راهبرد جهت پروژه‌های انتقال ژن در این ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: نخود، باززایی، انتقال ژن، ژن گزارشگر *gus*، آگروباکتریوم تومی‌فاشینس

فهرست مطالب

مقدمه ۱

بررسی منابع ۷

۲-۱- مقدمه ۷

۲-۲- باززایی در محیط این‌ویترو ۷

۲-۲-۱- باززایی مستقیم ۱۰

۲-۲-۱-۱- جنین زایی ۱۰

۲-۲-۱-۲- اندام زایی ۱۲

۲-۲-۲- باززایی غیرمستقیم ۱٤

۲-۲-۲-۱- جنین‌زایی به واسطه تولید کالوس ۱٤

۲-۲-۲-۲- اندام‌زایی به واسطه تولیدکالوس ۱۵

۲-۳- تنوع سوماکلونال ۱۸

۲-۳-۱- روش‌های تشخیص تنوع سوماکلونال ۲۰

۲-۳-۱-۱- تکنیک فلوسایتومتری ۲۰

۲-٤- قهوه‌ای شدن بافتها ۲۱

۲-۵- انتقال ژن ۲۳

۲-۵-۱- بیان موقت و پایدار ژن ۲٤

۲-٦- انتقال ژن به گیاهان توسط آگروباکتریوم ۲٤

۲-٦-۱- دامنه میزبانی آگروباکتریوم ۲٦

۲-٦-۲- مزایا و معایب انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم ۲٦

۲-٦-۳- انتقال ژن به گیاهان توسط اگروباکتریوم از طریق کشت بافت ۲۷

۲-٦-۳-۱- آلوده سازی گیاهان زخمی ۲۷

۲-٦-۳-۲- کشت توأم ۲۸

۲-٦-۳-۳- روش دیسک برگی ۲۸
۲-۷- روش های تائید تراریختگی ۲۹
۲-۷-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۲۹
۲-۷-۲- هیبریداسیون سادرن ۳۰
۲-۷-۳- استفاده از ژن‌های گزارشگر ۳۱
۲-۸- ژنهای گزارشگر ۳۱
۲-۸-۱- بتاگلوکورونیداز(*gus*) ۳۲
۲-۹- ژنهای گزینشگر ۳٤
۲-۹-۱- نئومایسین فسفوترانسفراز II (*nptII*) ۳۵
۲-۱۰- انتقال ژن به نخود ۳۵
۲-۱۰-۱- نژاد آگروباکتریوم تومی‌فاشینس ٤۰
۲-۱۰-۲- آماده سازی ریز نمونه و نحوه آلوده سازی آن با باکتری ٤۱
۲-۱۰-۳- محیط گزینش و باززایی ٤۳
۲-۱۰-٤- ژنوتیپ و درصد تراریزش ٤٤
۲-۱۰-۵- انتقال ژن به نتاج نسل بعد ٤۵
۲-۱۰-٦- انتقال ژن به نخود با هدف افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ٤۵
۲-۱۰-۷- تراریزش نخود به واسطه آگروباکتریوم رایزوجنز ٤۷
مواد و روش‌ها ٤۹
۳-۱- تهیه ریز نمونه ٤۹
۳-۱-۱- القای کالوس از گره لپه‌ای ٤۹
۳-۱-۲- القای کالوس از جنین ۵۱
۳-۲- شرایط کشت به منظور القای کالوس ۵۱
۳-۳- نژاد باکتریایی و پلاسمید ۵۳
۳-٤- تایید پلاسمید ۵۳

۳-٤-۱- مراحل استخراج DNAی پلاسمید به روش Miniprep ۵۳
۳-٤-۲- انجام واکنش PCR با آغازگرهای ژن *gus* ۵۵
۳-۵- تعیین غلظت آستانه تاثیر کانامایسین ۵۷
۳-٦- آماده سازی کشت باکتری و همکشتی ۵۷
۳-۷- آزمون هیستوشیمیایی بتاگلوکورونیداز ۵۸
۳-۸- تایید تراریختگی کالوس‌ها با استفاده از آزمون PCR ٦۱
۳-۹- تجزیه آماری ٦۱
نتایج و بحث ٦۳
٤-۱- جوانه زنی بذور ٦۳
٤-۲- کالوس‌زایی ٦۳
٤-۲-۱- نحوه القای کالوس ٦۳
٤-۲-۲- اثر ریزنمونه ٦۵
٤-۲-۳- اثر ژنوتیپ ٦۵
٤-۳- واکشت کالوس‌ها ٦۷
٤-٤- بررسی فلوسایتومتری ٦۹
٤-۵- کاربرد ترکیبات بازدارنده قهوه‌ای شدن در محیط کشت ۷۲
٤-٦- شاخه‌زایی ۷٦
٤-۷- ریشه‌زایی ۷۸
٤-۸- استخراج DNAی پلاسمید ۷۹
٤-۹- تعیین غلظت آستانه تاثیر کانامایسین ۸۱
٤-۱۰- تلقیح، هم‌کشتی و انتخاب ۸۲
٤-۱۱- بیان ژن *gus* ۸٦
٤-۱۲- استخراج DNAی ژنومی از کالوس ۸۷
٤-۱۳- تایید تراریزش کالوس‌ها با آزمون PCR ۸۷

٤-١٤- تایید تراریزش با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی ٨٨
نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات ٩١
پیشنهادات ٩٤
منابع ٩٧
پیوست ١١٠

فهرست اشکال

شکل ۳-۱: القا و رشد کالوس‌ها در اتاقک رشد ۵۲

شکل ۳-۲: نقشه پلاسمید pBI121 ..... ۵۳

شکل ٤-۱: تنوع شکل و رنگ کالوس‌های تولید شده از ژنوتیپ‌های مختلف نخود. ٦٤

شکل ٤-۲: تنوع بافت کالوس‌های تولید شده از ژنوتیپ‌های مورد آزمایش. ٦٤

شکل ٤-٤: اندام‌زایی متفاوت کالوس‌ها در محیط کشت. ٦٨

شکل ٤-٥: تبدیل کالوس‌های نرم به کالوس‌های جنین‌زا و و قهوه‌ای شدن آنها ٦٩

شکل ٤-٦: نمودار سطوح پلوئیدی سلول‌های کالوس نخود حاصل از دستگاه فلوسایتومتر ۷۱

شکل ٤-۷: کالوس‌های حاصل در محیط کشت‌های حاوی مواد بازدارنده قهوه‌ای شدن ۷۵

شکل ٤-۸: مقایسه رشد کالوس ژنوتیپ MCC763 در دو محیط کشت ۷٦

شکل ٤-۹: واکنش متفاوت ریزنمونه‌های کالوس در محیط القای کالوس ۷۷

شکل ٤-۱۰: انتقال شاخه‌های القا شده به محیط کشت رشد شاخه ۷۷

شکل ٤-۱۱: القای ریشه در ژنوتیپ MCC763 در محیط کشت ریشه‌زایی ۷۸

شکل ٤-۱۲: نمودار نورسنجی (نانودراپ) پلاسمید استخراج شده ۷۹

شکل ٤-۱۳: قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی مربوط به ژن *gus* ۸۰

شکل ٤-۱٤: مراحل همکشتی، انتخاب ۸٤

شکل ٤-۱٥: قرار دادن کالوس‌ها در محلول رنگ‌آمیزی ۸٤

شکل ٤-۱٦: الکتروفورز ژل ۱درصد آگارز مربوط به استخراج DNAی ژنومی کالوس‌ها ۸۷

شکل ٤-۱۷: حضور قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی در آزمون PCR در ژنوتیپ‌های نخود ۸۸

شکل ٤-۱۸: بیان ژن *gus* در کالوس ژنوتیپ‌های مختلف. ۸۹

شکل ٤-۱۹: آزمون شاهد منفی بر روی کالوس های غیرتراریخت ۸۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱: مقایسه برخی ژنهای گزارشگر با همدیگر ۳۲
جدول ۳-۱: ژنوتیپ‌های نخود کابلی این تحقیق و برخی از خصوصیات زراعی آنها ۵۰
جدول ۳-۲: ترکیبات جلوگیری کننده از قهوه‌ای شدن در محیط کشت (گرم در لیتر) ۵۲
جدول ۳-۳: اجزای مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تایید حضور ژن *gus* در پلاسمید ۵۶
جدول ٤-۱: درصد کالوس‌های زنده مانده هر ژنوتیپ در غلظت‌های مختلف کانامایسین. ۸۱
جدول ٤-۲: تعداد نقاط آبی مشاهده شده در کالوس هر ۳ ژنوتیپ. ۸۵
جدول ٤-۳: ویژگی‌های اندازه‌گیری شده درانتقال ژن به ۳ ژنوتیپ نخود. ۸۶
جدول ٤-٤: دستورالعمل پیشنهادی درانتقال ژن به نخود به روش باززایی غیرمستقیم ۹۳

فهرست نمودارها

نمودار ۲-۱: مسیرهای مختلف باززایی این‌ویترو و پاسخ آنها به دو روش مهم انتقال ژن ۹

نمودار ٤-۱: مقایسه میانگین رشد کالوس در ۳ ژنوتیپ نخود($P\leq ۰/۰۵$) ٦٧

نمودار ٤-۲: مقایسه میانگین وزن تر کالوس در محیط کشت‌های حاوی مواد بازدارنده ۷۳

نمودار ٤-۳: مقایسه میانگین وزن تر کالوس ژنوتیپ‌ها در محیط کشت‌ها ۷۵

فصل اول

مقدمه

خانواده حبوبات با دارا بودن ۲۰۰۰۰ گونه مختلف در مقایسه با سایر خانوادههای گیاهی از اهمیت زیادی برخوردار است. (باقری و همکاران، ۱۳۷٦)حبوبات از لحاظ ، سطح زیر کشت و کل تولید، دومین رتبه پس از غلات را دارا میباشند. در سال ۲۰۰٤ بیش از ۳۰۰ میلیون تن از حبوبات دانهای از ۱۹۰ میلیون هکتار(تقریبا ۱۳ درصد از کل زمینهای زیر کشت جهان) برداشت شده است(پارسا و باقری، ۱۳۸۷). حبوبات از مهمترین منابع پروتئینی در رژیم غذایی بسیاری از مردم کشورهای در حال توسعه میباشند. میزان پروتئین آنها حدوداً دو برابر غلات است و منبع ارزان پروتئین با کیفیت مناسب میباشد که به علت غنی بودن از نظر اسید آمینه لایسین[1] میتواند مکمل پروتئین غلات باشد(گوپتا و کوپر،۱۹۸۰). بنابراین ورود آنها به رژیم غذایی در مناطقی که غلات غذای اصلی را تشکیل میدهد، مفید خواهد بود. حبوبات همچنین دارای عناصر معدنی ضروری مورد نیاز انسان و ترکیبات ثانویه دارویی نظیر برخی ترکیبات ضد تومور میباشند. مصرف این محصولات در کاهش کلسترول و قند خون نیز موثر است، و لذا استفاده از آن دررژیم غذایی افراد دیابتی توصیه میشود.

[1] Lysine

به‌علاوه این گیاهان به واسطه توانایی تثبیت نیتروژن در کشاورزی با نهاده کم، اهمیت زیادی داشته و باعث کاهش مصرف کود ازته می‌شوند. در حقیقت، نقش این محصولات در حاصلخیزی خاک، عامل مهمی در ثبات تولید غلات در مناطق خشک و دیم‌زارهای کشورهای درحال توسعه می‌باشد(باقری و همکاران، ۱۳۷٦).

نخود با نام علمی *Cicer arietinum* L. یکی از حبوبات مهم از خانواده لگومینوزه[1] (*Fabaceae*) و زیرخانواده *Faboideae* می‌باشد که در بیش از ٤٠ کشور دنیا نظیر هند، حوزه مدیترانه، اتیوپی، استرالیا، آسیای مرکزی و از جمله ایران کشت می‌شود(سرما و همکاران ۲۰۰٤). شواهد مورفولوژیکی و گیاهشناسی حاکی از آن است که نخود جزء اولین گیاهان اهلی شده خاورمیانه بوده و کشت آن از دیرباز در ایران مرسوم بوده است (سامرز و همکاران،۲۰۰۳). بذر این گیاه غنی از کربوهیدراتها (٦٧/٦-٤٧/٢ درصد)، پروتئین(۳۱/٥-۱۲/٤ درصد)، نشاسته(٥٥-٤١ درصد) و همچنین مواد معدنی نظیر کلسیم، فسفر، آهن و ویتامین‌هایی نظیر نیاسین[2] و ریبوفلاوین[3] می‌باشد (پراکاش و همکاران۲۰۰٦). لذا در کشورهای در حال توسعه از دیرباز به‌عنوان یک منبع مهم پروتئین در سبد غذایی خانواده‌ها مورد توجه بوده‌است(سرما و همکاران ۲۰۰٤).

در ایران نیز این گیاه یکی از گیاهان مهم در گروه حبوبات می‌باشد که حدوداً ٦٤ درصد سطح زیرکشت حبوبات را در کشور به خود اختصاص داده است. این محصول از نظر سطح زیرکشت در کشور، در رتبه سوم و درجهان در رتبه چهارم قرار می‌گیرد(صباغ پور، ۱۳۸٤). بر اساس گزارش فائو[4] (۲۰۰۷) سطح زیر کشت این محصول در جهان ۱۱/٦ میلیون هکتار با متوسط عملکرد ۷۹۷ کیلوگرم

[1] Leguminosae
[2] Niacin
[3] Riboflavin
[4] F.A.O

در هکتار است که عمدتا به صورت دیم کشت می‌شود. سهم ایران از تولید جهانی نخود برابر ۳/٦۱ درصد می‌باشد(فائو، ۲۰۰۷). سطح زیرکشت آن در ایران برابر با ۷۵۵ هزار هکتار است که ۳۱۰۰۰۰ تن محصول از آن تولید می‌شود. عملکرد این محصول در ایران(٤۱۰ کیلوگرم در هکتار) در مقایسه با متوسط جهانی(۷۷۰ کیلوگرم در هکتار) و سایرکشورهای تولید کننده، پایین است. پایین بودن عملکرد نخود درکشور در مقایسه با عملکرد جهانی می‌تواند ناشی از عوامل مختلف از قبیل مدیریت غیرصحیح، بهره‌برداری غلط از نهاده‌های تولید، کشت آن در اراضی فقیر، تنش خشکی، سرما، حساسیت به برخی بیماری‌ها مانند برق‌زدگی نخود (*Ascochyta rabiei*) و برخی آفات همچون کرم پیله‌خوار (*Helicoverpa armigera*) (صباغ پور، ۱۳۸٤)باشد. با توجه به این مطلب لزوم اصلاح نخود برای شرایط آب و هوایی و همچنین اصلاح برای مقاومت به آفات و بیماریها ضروری به‌نظر می‌رسد.

تاکنون از روش‌های اصلاحی مانند دورگ‌گیری[1]، موتاسیون و انتخاب به کمک نشانگر در نخود استفاده شده است. استفاده از روش‌های سنتی اصلاح ژنتیکی گیاهان در بسیاری از موارد با صرف زمان، هزینه و نیروی کار زیاد همراه بوده است. ازاین‌رو تلفیق این شیوه‌ها با روش‌های نوینی چون کشت بافت گیاهی می‌تواند علاوه بر کوتاه کردن دوره اصلاحی، کاهش هزینه و افزایش کارایی را به دنبال داشته باشد(ناتش و همکاران،۱۹۹۲).

کشت این‌ویتروی[2] گیاهی یکی از روش‌های کارآمد جهت گزینش گیاهان متحمل به تنش‌ها می‌باشد. تحقیقات متعدد نشان داده است که سلول‌های تمایزنیافته در محیط کشت، دامنه وسیعی از مقاومت به تنش‌های محیطی را نشان می‌دهند(چولا، ۲۰۰۲). به‌نحوی‌که در حال حاضر گزینش در

[1] Hybridization
[2] In vitro

شرایط این‌ویترو به عنوان یکی از ابزارهای مهم در اصلاح نباتات مطرح می‌باشد. گزینش این‌ویترو می‌تواند با هدف انتخاب خصوصیات زراعی مورد علاقه بین ارقام و یا استفاده از تنوع سوماکلونال در شرایط کشت بافت انجام شود. یکی از مزایای گزینش این‌ویترو به منظور به‌گزینی ارقام و لاین‌های سلولی حاصل از تنوع سوماکلونال[1] و رهایی از اثرات محیطی غیر قابل کنترل است.

درعین‌حال تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و روش‌های انتقال ژن نیز می‌تواند فرصت‌های جدیدی را برای افزایش تنوع در گیاهان زراعی فراهم نماید (شرما و اورتیز،۲۰۰۰). در هر برنامه انتقال ژن، باززایی موثر از پیش‌نیازهای اصلی و ضروری دستیابی به گیاهان تراریخته است. انتقال ژن بدون باززایی گیاهان تراریخته بجز در مواردی که هدف تراریزش سلول‌ها به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط این‌ویترو می‌باشد، بی‌نتیجه است(فارسی و ذوالعلی ۱۳۸۵).

تکنیک‌های مهندسی ژنتیک سودمند برای دستیابی به ژنوتیپ‌های بهبود یافته در نخود نیاز به دستورالعمل باززایی سریع و کارآمد دارد(سرما و همکاران، ۲۰۰٤؛ سانیال و همکاران، ۲۰۰۵؛ چاکرابورتی و همکاران، ۲۰۰٦). اما نتایج مطالعات انجام شده روی نخود در شرایط این‌ویترو نشان می‌دهد که این گیاه مانند سایر حبوبات دانه‌درشت سرسختی زیادی در محیط کشت از خود نشان می‌دهد(زارع میرک آباد، ۱۳۸٦). در شرایطی که سلولها متحمل دستورزی ژنتیکی شده باشند مشکل از این هم حادتر می‌شود. با اینکه روش‌های مختلف زیادی جهت انتقال ژن به سلول‌های نخود مورد آزمایش قرارگرفته است، اما عمدتاً استفاده از دو روش تراریزش از طریق آگروباکتریوم[2] و بمباران ذره‌ای به طور وسیعی جهت انتقال ژن در این گیاه گزارش شده است(گوپتا و همکاران، ۱۹۹۸). در بیشتر روش‌های پیشین از باززایی مستقیم برای انتقال ژن در نخود استفاده شده است(سانیال و

[1] Somaclonal variation
[2] Agrobacterium

همکاران،۲۰۰۵؛ ایندروکر و همکاران،۲۰۰۷؛ مشتاقی،۱۳۸۷). در این روش اگرچه باززایی بهتر صورت می‌گیرد؛ اما راندمان انتقال ژن پایین می‌باشد. با توجه به شرایط گفته شده به‌نظر می‌رسد که انتقال ژن به کالوس نخود به عنوان بافت هدف دارای راندمان انتقال بهتری باشد. اگرچه برای بقولات و بخصوص نخود دستورالعملی کارامد و قابل تکرار برای باززایی غیرمستقیم از کالوس[1] وجود ندارد، اما با توجه به نتایجی که از تحقیق زارع میرک‌آباد (۱۳۸٦) در باززایی سه ژنوتیپ MCC496 ، MCC763 و MCC798 در کشت کالوس بدست آمده است، می‌توان به انتقال ژن به این سه ژنوتیپ در آینده امیدوار بود. با توجه به گزارش‌های متعدد از انتقال ژن گزارشگر *gus* به گیاهان مختلف خانواده چتریان نظیر آرابیدوبسیس، جعفری و شوید(قبولی، ۱۳۸٦) خانواده سیب‌زمینی مانند گوجه‌فرنگی (حسینی خلیفانی، ۱۳۸۳)، فلفل(پنگ و همکاران،۲۰۰۵) و نخل‌روغنی(غلام کدیر و همکاران ۱۹۹۸)، به‌نظر می‌رسد که بتوان این ژن گزارشگر را به نخود نیز منتقل نموده و پارامترهای درگیر در انتقال ژن‌های مفید به گیاه نخود را بهینه‌سازی نمود. لذا این مطالعه با هدف بهینه‌سازی انتقال ژن گزارشگر *gus* به کالوس این سه ژنوتیپ و باززایی گیاه از کشت‌های سلولی تراریخته انجام شده است.

[1] Callus