



***Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla nohut bitkisi (*Cicer arietinum* L.)'ne gen aktarımı**

Rıdvan TEMİZGÜL, Mikail AKBULUT

Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KAYSERİ

ÖZET

Bu çalışmada çeşitli eksplantlar (kotiledon nodları ve embriyo eksenleri), çeşitli büyüme düzenleyicileri ve bu düzenleyicilerin farklı konsantrasyonları gibi parametrelerin rejenerasyon ve transformasyona etkileri araştırılmıştır. Kotiledon nodlarının Agro-vakum infiltrasyonu, çimlendirilmiş nohut tohumlarının Agroinokülasyonu, embriyonun Agroenjeksiyonu ve yüzey sterilizasyonu yapılmış kuru nohut tohumlarının *Agrobacterium* solusyonu ile imbibisyonu (şişirme, emdirme) olmak üzere dört farklı transformasyon stratejisinin etkinliği denenmiştir. Transformasyon etkinliğine *Agrobacterium* suşları, kokültüvasyon süresi, eksplantın gelişme evresi, yaralama, infiltrasyon ve kültürvarlar gibi çeşitli parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Transformasyon etkinliği geçici GUS aktivitesine bakarak veya selektif ortamda yaşayan eksplantlara dayanarak belirlenmiştir. Transgenlerin varlığı, ayda bir alt kültüre alınan selektif ortamda 3-4 ay seleksiyona tabi tutulmuş bitkilerde PCR analizleri ile belirlenmiştir. Test edilen *Agrobacterium tumefaciens* suşları arasında (KYRT1, C58C1 ve EHA 101) en iyi yanıt EHA 101 suşundan elde edilmiştir. Selektif ortamda elde edilen sonuca göre transformasyona ise en iyi cevabı Er çeşidi vermiştir.

Anahtar Kelimeler

nohut,
Agrobacterium,
transformasyon,
enjeksiyon,
infiltrasyon.

***Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in chickpea (*Cicer arietinum* L.)**

ABSTRACT

In this study, the effect of various parameters such as different explants (cotyledonary nodes and embryo axes), different growth regulators (Benzylaminopurine and thidiazuron) and their various concentrations have been investigated. Four different transformation strategies namely; Agro-vacuum infiltration of cotyledonary nodes, Agroinoculation of germinating chickpea seedlings, Agro-injection of seedlings and imbibitions of surface sterilized dry chickpea seeds were also investigated. The effect of various parameters such as, *Agrobacterium* strains, infection durations, explant developmental stage, injury, infiltration and cultivars, on transformation efficiency were investigated. Transformation efficiency was determined based on transient GUS activity or survival on selective media. The presence of transgene was determined by PCR analysis on green plants subcultured monthly on selective media for 3-4 times. The best response were obtained from EHA 101 among the tested strains of *Agrobacterium tumefaciens* (KYRT1, C58C1 and EHA 101). Er was determined to be best responding cultivar according to the results obtained in selective medium.

Keywords

chickpea,
Agrobacterium,
transformation,
injection,
infiltration

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-posta: rtemizgul@erciyes.edu.tr

1. Giriş

Nohut (*Cicer arietinum*), soya fasulyesi ve fasulyeden sonra dünyada en çok yetiştirilen dane baklagillerden birisidir [1,2]. İnsan ve hayvan beslenmesindeki önemli rolünden başka nohut kısmi olarak kuru ve yağışlı alanlarda, toprağın verimliliğini korumaya da yardımcı olur [3].

Nohut, insan için protein kaynağı olarak önemli dane baklagillerden biridir. Nohudun %25.3–28.9 oranında protein içeren tohumları besin olarak kullanılır [4,5].

Baklagillerde bitki doku kültürü çalışmalarında genel olarak MS (Murashige and Skoog)[6] ortamı kullanılmış olup bazen modifiye MS ortamı da kullanılmaktadır. Dane baklagillerin rejenerasyonu için etkili yöntemle, soya fasulyesi [7, 8,9], bezelye [10], üçgül türleri [11], lotus [12], yerfıstığı [13], fiğ [14] ve mercimek [15,16] üzerinde yapılmıştır. Bitkiler doku kültürü veya hücrelerden temel olarak somatik embriyogenez ve organogenez olarak isimlendirilen iki metot aracılığıyla rejenere edilir. Baklagil türlerinin çoğunda, somatik embriyogenez, bitkileri rejenere etmek için sıkça kullanılan bir yöntem olmuştur. Doku veya protoplastlardan kalluslar aracılığıyla indirekt rejenerasyon Leguminaceae familyası üyelerinin birçoğu için etkili değildir. TDZ veya BAP benzeri sentetik sitokininler baklagil türlerinde çoklu sürgün indüksiyonu için kullanılmaktadır. Kotiledon nodları birçok araştırmacı tarafından eksplant kaynağı olarak seçilmiştir. *In vitro* köklendirme nohut ve mercimek de dahil bir çok baklagil türünde etkili değildir. Bu amaç için *in vitro* elde edilmiş sürgünlerin *in vitro* mikro aşılması geliştirilmiştir [15, 16, 17].

Agrobacterium temelli transformasyon, bitki hücreleri içine yabancı genlerin transformasyonu için *Agrobacterium tumefaciens*'in genetik olarak modifikasyonunun Zambryski [18] tarafından 1983'te ilk kez kullanımı rapor edildiğinden beri önemli derecede geliştirilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen transferinde, bitki genomuna entegre olmuş T-DNA tek kopya halinde olduğu için diğer yöntemlere göre daha avantajlı bulunmuştur. Bu metotta nadir durumlarda aktarılan DNA'nın yeniden düzenlenmesi görülür. Bunun aksine aktarılan DNA'nın yeniden düzenlenmesi diğer direkt DNA aktarım metotlarının büyük bir problemdir. *Agrobacterium* temelli transformasyonların basitliği bu yöntemin diğer bir avantajıdır [19].

Baklagil türlerinin transformasyonu ve transformasyon frekansı (%0.1-5), özellikle de büyük tohumlu dane baklagillerde, çok zordur [20, 21]. Soya fasulyesi, stabil gen transformasyonu yapılan ilk dane baklagiller arasındadır [7]. Baklagillerin genetik manipülasyonlarının zor olduğu kabul edilmesine bazı dane baklagiller *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla stabil olarak transforme edilmiştir [20]. *Cicer arietinum* [22,23,24], *Phaseolus sp* [25], *Pisum sp.* [10,26], *Vigna sp.* [27], *Cajanus sp.* ve *Medicago sp.* [28], *Lotus japonicus* [29], *Glycine sp* [7,8,30] ve *Vicia sp.* [31] olarak isimlendirilen bazı önemli baklagil türlerinde geçmiş 10 yıl süresince çeşitli transformasyon metotları kullanılarak genetik transformasyon ve *in vitro* rejenerasyonda büyük ilerleme sağlanmıştır. Çeşitli transformasyon metotları *Baklagillerin* transformasyonu için denenmiştir [21]. Baklagillerin transformasyonu için *Agrobacterium tumefaciens* yanında *Agrobacterium rhizogenez*, ve partikül bombardmanı gibi

bazı metotlar kullanılmıştır [32,33,34,35,36].

Günümüzde, nohutta çok az sayıda başarılı gen transformasyonu rapor edilmiştir. Kök uyarımı *Agrobacterium*'un kök indükleyici suşları ile nohut bitkileri muamele edilerek elde edilmişken[31], transforme olmuş kalluslar *Agrobacterium*'un yabancı suşları kullanılarak elde edilmiştir [36,37].

Stabil olarak transforme olmuş nohut bitkileri Fontana ve arkadaşları [22] tarafından 1993 yılında ilk kez gösterilmiştir. Apikal meristemi uzaklaştırılmış tohum kökenli embriyo ekseni 1.0 mg/L kinetin ile desteklenmiş MS ortamında adventif sürgün oluşumu için rejenere edilmiştir. Ko-kültürasyon teknikleri kullanılarak *Agrobacterium* aracılığı ile gen transferi gerçekleştirilmiştir. β -glukuronidaz ve *neomycin phosphotransferase II* aktivitesi gösteren transgenik nohut bitkileri elde edilmiştir.

Nohutun *Agrobacterium* aracılığı ile genetik transformasyonu 1997 yılında Kar ve arkadaşları [23] tarafından rapor edilmiştir. Metot, *Agrobacterium* ile ko-kültürasyon ve çoklu sürgün üretimi temeline dayanmaktadır.

Bu çalışmada çeşitli transformasyon stratejileri ve doku kültürü metotları kullanılarak *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla nohut bitkisine etkili bir gen aktarım metodu geliştirilmeye çalışılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Bitki Materyali

Doku kültürü çalışmalarında (*Cicer arietinum* L.) 3 farklı tescilli nohut kültüvarı (Er, Uzunlu, Gökçe) ve iki

tescilsiz çiftçi çeşidi (LK1, LK2 olarak isimlendirilmiştir) kullanılmıştır.

Doku kültürü ortamı

Modifiye Murashige ve Skoog ortamı (MS tuzları ve Gamborg vitaminlerinden oluşan)[6] %3 sukroz ile desteklenmiş ve % 0.8 oranında agar ile katılaştırılarak doku kültürü çalışmalarının tamamında kullanılmıştır. Kotiledon nodları ve embriyo ekseninden çoklu sürgün oluşturmak amacıyla sentetik sitokinlerden, benzylaminopurine (BAP) (1 ve 3 mg/L) veya thidiazuron (TDZ) (0.1, 0.25, 1 ve 2 mg/L) MS-Gamborg ortamına eklenmiştir.

Bakteri Suşları

Üç *Agrobacterium tumefaciens* suşu, C58C1/PTJK136 [38], EHA101PDNEM331 [39] ve KYRT1/PTJK136 [40] transformasyon çalışmaları boyunca kullanılmıştır. C58C1 kromozomal rifampicine (Rif) ve ampililine (Amp) direnç genlerini, EHA 101 kromozomal Rif direnci, KYRT1 kromozomal Rif, carbeniciline (Carb) ve gentamycine (Gen) direnç genlerini taşımaktadır.

Agrobacterium kültür ortamı ve *Agrobacterium* kültürü.

Petri kutularında yarı katı ortamda büyütülen *Agrobacterium* kültüründen tek koloni seçilmiş ve sıvı YEB ortamında (13,5 g/L NB, 1 g/L maya ekstraktı, 5 g/L sukroz, 2 mM MgSO₄.7H₂O, pH 7.2) gerekli antibiyotikler eklenerek 27 °C de büyütülmüştür

Vir genlerinin indüksiyonu

Daha önce YEB ortamında 27°C de 0.D. si 0,8 oluncaya kadar büyütülen *Agrobacterium* izolatları santrifüjasyon

sonrasında *Vir* genlerinin induksiyonu için AB tuzları (1 g/L NH₄Cl, 1,25 g/L MgSO₄.7H₂O, 0,15 g/L KCl, 0,01 g/L CaCl₂ ve 2,5 mg/L FeSO₄) ve AB Minimal Ortamı, 20 mM MES, %1 glukoz, 200 µM asetosyringone (3', 5'-Dimethoxy-4-Hydroxyacetophenone) ve Fe-EDTA' dan oluşan induksiyon ortamında 23 °C de 18 saat süreyle orbital çalkalayıcı inkübatörde 200 rpm de çalkalayarak uyarılmıştır.. Bu ortam aynı zamanda 2 mg/L tütün ekstraktı ile de desteklenmiştir.

Rejenerasyon ve transformasyon

Tohumların yüzey sterilizasyonunun optimizasyonu için sodyum hipokloridin çeşitli konsantrasyonları değişen sürelerde kullanılmıştır. Eksplant çeşidinin gereksinimlerine bağlı olarak çeşitli rejenerasyon ve transformasyon protokolleri takip edilmiştir.

1. Yüzey sterilizasyonu yapılmış nohut tohumları doğrudan uyarılmış *Agrobacterium* solüsyonu içine atılarak 16–24 saat imbibisyona bırakıldıktan sonra ko-kültüvasyon ortamında 23 °C'de 7-10 gün büyümeye bırakılmıştır.

2. 16 saat steril distile suda imbibisyon sonrası tek kotiledonu uzaklaştırılmış embriyolar *Agrobacterium* solüsyonu içerisinde vakum infiltrasyonu yapılarak ko-kültüvasyon ortamında 23°C'de 7–10 gün büyümeye bırakılmıştır. 100 ml İndüksiyon ortamında 18 saat boyunca büyütülen bakteri 25 ml sıvı ko-kültüvasyon ortamında çözülmüş ve bu süspansiyon içerisine steril bir erlen içerisine taşınarak yaralanmış nohutlar içerisine bırakılmış ve vakum sistemi içine konulmuştur. Farklı infiltrasyon zamanları (20 ve 30 dakika) ve değişen evaküasyon basıncı (200, 300, 400, 450 ve 500 mmHg negatif basınç) uygulanmıştır.

3. Olgunlaşmamış tohumlardan elde edilen embriyo ekseninden oluşan explant direkt olarak uyarılmış bakteri solüsyonu içerisinde 20 dakika inkübasyondan sonra ko-kültüvasyon ortamına alınmış ve 23 °C'de 7–10 gün süreyle büyütülmüştür.

4. Çimlendirilmiş (4-5 gün süre) tohumların plumula, radikula ve kotiledon kısımları uzaklaştırılarak kotiledon nodyumları (KN) elde edilmiştir. Elde edilen kotiledon nodyumlarına daha önce belirtildiği şekilde vakum infiltrasyonu yoluyla transformasyon gerçekleştirilmiştir. Kokültüvasyon ortamında 7 gün süreyle inkübe edildikten sonra içlerinden bazıları geçici gus ifadesi için alındıktan sonra kalan explantlar farklı konsantrasyonlarda BAP (1–3 mg/L) ve TDZ (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L) içeren MS Gamborg ortamına yerleştirilmiştir. Kültürler 16/8 saat aydınlık/karanlık periyodunda 23°C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen sürgünler selektif ortama taşınmıştır. 2 hafta da bir seleksiyon ortamı yenilenecek yaşayan sürgünler yeni ortama aktarılmıştır.

5. Bu sistem aynı zamanda 16 saat imbibisyon sonrası çıkarılan embriyolar için de uygulanmıştır.

6. Uyarılmış *Agrobacterium* izolatları C58C1 (pTJK136), KYRT1 (pTJK136) veya EHA 101 (pDNEM3300) santrifüj edildikten sonra yeni induksiyon ortamında süspansiyon edilerek explantlar (kotiledon nodları veya embryo eksenleri) içerisine bırakılarak transformasyon 23 °C'de 100 rpm'de çalkalanarak 2, 8, 16, 24 saat uygulanmıştır. Bundan sonra nohutlar MS –Gamborg ortamına transfer edilmiş ve 23 °C'de 4 gün boyunca ko-kültüvasyona bırakılmıştır. Her bir uygulamadan tesadüfi olarak 15–20 eksplant alınarak geçici gen ekspresyonu için GUS aktivitesine bakılmıştır. Transformant oldukları varsayılan eksplantların analizi için Jefferson (1987)

[36]'nin protokolü takip edilmiş ve GUS histokimyasal boyama yapılmıştır. Selektif ortamlarda en az üç kez alt kültüre alınan aday transgenik eksplantlardan genomik DNA CTAB metodu kullanılarak izole edilmiştir. Aday transgenik bitkilerden CTAB metodu ile izole edilen DNA'dan spesifik bar primeri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapılmıştır.

Aday transgenik bitkilerden DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için CTAB DNA ekstraksiyon prosedürü modifiye edilerek kullanılmıştır [37]. Aday transgenik bitkilerin dokularından Her bir örnek için 250-300 mg arasında yeşil doku kullanılmıştır. Dokular sıvı azot aracılığı ile toz haline ve 1 ml ekstraksiyon tamponu (%2 (W/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl Ph 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM Na EDTA pH 8.0, % 0.2 β-merkaptoetanol) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Yeni tüplere aktararak 62 °C' deki su banyosunda 60 dk bekletilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra 700 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve tüpler 100 defa yavaşça ters düz edilmiştir. Bu işlemin ardından tüpler 16000 g' de 7 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir tüpe alınmış ve üzerine hacmin 2/3' ü kadar soğuk isopropanol eklenerek -20 °C' de 30 dk bekletilmiş, bunu takiben 14000 g' de, +4 °C' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kalan pellet üzerine 500 µl yıkama tamponu (%76 EtOH, 10 M amonyum asetat) ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Beklemenin ardından 14000 g' de, +4 °C' de 5 dk santrifüj edilmiş ve sıvı kısım yine uzaklaştırılmıştır. Kalan beyaz pellet üzerine 300 µl TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) ilave edilerek 65 °C' de 60 dk bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra 10 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde RNaz

ilave edilerek 37 °C' de 30 dk bekletilmiştir. Ardından 200 µl TE ve 15 µl amonyum asetat (10 M, pH: 7.7) ilave edilmiş ve tüp içerisindeki toplam çözelti hacminin iki katı kadar %80' lik soğuk etanol eklenerek -20 °C' de 30 dk bekletilmiştir. Yine 14000 g' de, +4 °C' de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası sulu kısım dikkatlice uzaklaştırılarak kalan pellet gece boyunca kuruması için bırakılmıştır.

Kuruyan pellet uygun miktarda TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) içerisinde çözülerek PCR aşamasında kullanılmak üzere -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

PCR analizi:

PCR analizi aday bitkilerden izole edilen genomik DNA kullanılarak Vickers'in [50] metoduna göre yapılmıştır. Amplifikasyon reaksiyonu 94 °C de 5 dak başlangıç denatürasyonu ve 30 döngü 94 °C de 30 saniye denatürasyon, 60 °C de 2 dak yapışma (annealing) ve ve 72 °C de 1 dak uzama reaksiyonundan oluşmuştur. Son uzama 72 °C de 10 dak yapılmıştır. Bar geninin amplifikasyonu için kullanılan primerlerin dizisi şöyledir: F (CCAGAAACCCACGTGATGCC) ve R (CAGGAACCGGCA GGAGTGGA).

3. Bulgular ve Tartışma

Nohut tohumlarının yüzey sterilizasyonu için çeşitli kimyasallar (sodyum hipoklorit, etil alkol) farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde de denenmiş ve en uygun konsantrasyon ve süre bu denemeler sonunda bulunmuştur. Fungal kontaminasyonun ciddi problem oluşturduğu eksplantlarda antifungal kimyasallardan Nystatine yine yüzey sterilizasyonu aşamasında kullanılmış ve 5 dakika %5 sodyum hipoklorit uygulamasından sonra 1 gece su içerisinde bırakılmış tohumlara

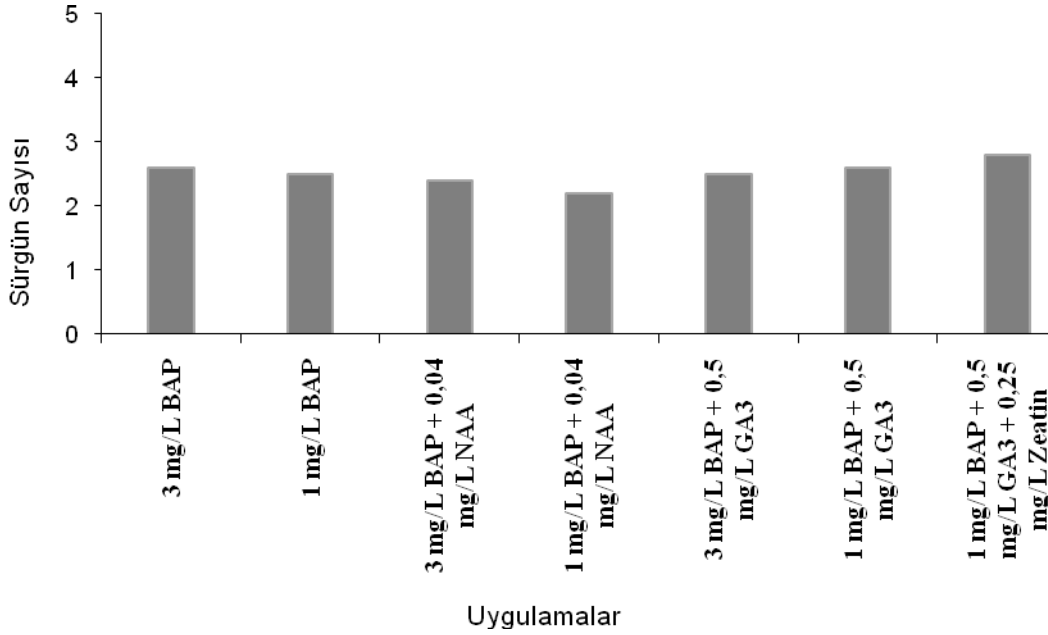
tekrar 5 dakika %5 sodyum hipoklorit uygulamasından en iyi sonuçlar alınmıştır.

Çalışılan yöntemlerin tamamında da en fazla sürgün sayısı 2 mg/L TDZ konsantrasyonunu takiben 3 mg/L BAP kullanımı ile elde edilmiştir. Bunlarla birlikte doku kültürü ve rejenerasyon çalışmalarında GA₃ (0.25, 0.5 ve 1 mg/L) ve zeatinin (0.25, 0.5 ve 1 mg/L) etkilerinin de olup olmadığı araştırılmış ve 0.5 mg/L GA₃ ile 0.25 mg/L zeatin kullanımının da sürgün gelişimi açısından faydalı olduğu gözlenmiştir.

Rejenerasyon ve transformasyon çalışmalarında eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyo, kotiledon nodu ve

apikal meristem kullanılmış ve en iyi sonuçlar kotiledon nodlarından elde edilmiştir. Tek kotiledonu alınmış ve uç

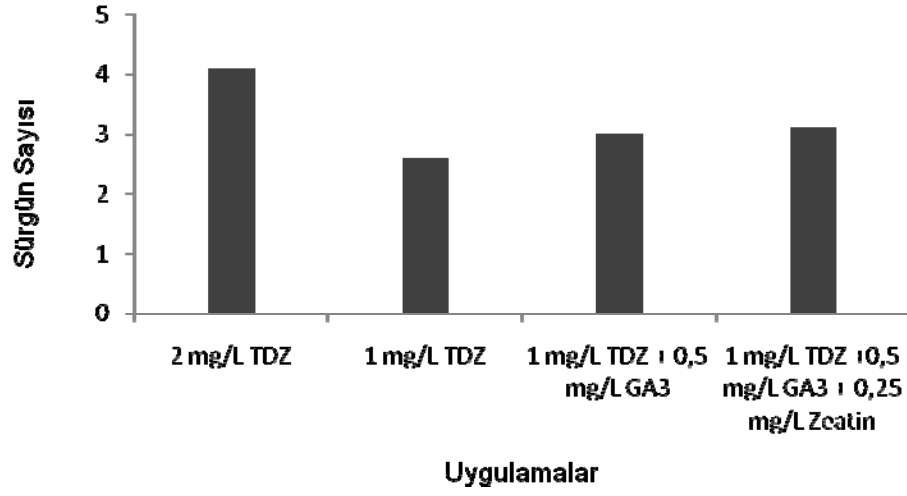
kısımları uzaklaştırılmış embriyoların daha fazla sayıda sürgün oluşturdukları gözlenmiştir. Aynı zamanda genetik transformasyonlarda kullanılan embriyoların embriyo ve kotiledon nodu kısımları doku kültürü ortamına alınmadan önce bakterinin enfeksiyon yapmasını artırmak için steril bir bisturi yardımıyla yaralanmıştır.



Şekil 1. Çeşitli BAP konsantrasyonlarında (mg/L) oluşan ortalama sürgün sayıları

Bu çalışmada 0.25, 0.5, 1.0 ve 2 mg/L TDZ kotiledon nodlarından çoklu sürgün indüksiyonu için kullanılmıştır. TDZ konsantrasyonu ve uygulama süresinin çoklu sürgün indüksiyonunun başarısı için önemli olduğu tespit edilmiştir. TDZ çoklu sürgün oluşturmada çok etkili olmasına rağmen yalnız 2 mg/L TDZ veya 2 mg/L BAP ile

kombinasyonu sürgünlerde anormal gelişime neden olmaktadır. 0.5 veya 1.0 mg/L TDZ, 2.0 mg/L'den daha etkili bulunmuştur (Şekil 2). Düşük TDZ konsantrasyonunda hormon uygulama süresinin uzatılması çok sayıda sağlıklı sürgün eldesi için daha uygun bulunmuştur.



Şekil 2. Çeşitli TDZ konsan-trasyonlarında oluşan ortalama sürgün sayıları

Singh ve ark. [42] nohut bitkisi ile yaptıkları çalışmada yüksek konsantrasyonda TDZ kullanımının sürgünlerin hem farklılaşmasını hem de büyümesini kısıtladığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar 1 μ M TDZ içeren ortamda 12 saatlik bir inkübasyonun çoklu sürgün indüksiyonu için yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Murthy ve ark. [43] ise çoklu sürgün indüksiyonu için TDZ'yi BAP'tan daha etkili olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise TDZ ve BAP'ın kombine kullanımı çoklu sürgün oluşumu açısından daha etkili bulunmuştur.

Khalafalla ve Hattori [44] TDZ ve BAP kombinasyonu kullanarak baklanın kotiledon nodu eksplantlarından çoklu sürgün indüksiyonu için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu araştırmacılar bu iki büyüme düzenleyicisinin kombine kullanımının, sitokininlerin bireysel kullanımından daha etkili bir şekilde ve daha fazla sayıda sürgün oluşumunu tetiklediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen

sonuçlar da bunlarla paralellik göstermektedir.



Şekil 3. 1 mg/L TDZ içeren ortamda çoklu sürgün oluşumu



Şekil 4. 2 mg/L TDZ içeren ortamda çoklu sürgün oluşumu

Ara bir kallus fazı ile nohutun rejenerasyonu için verilmiş birkaç rapor olmasına rağmen bu yöntemle rejenerasyon baklagil türlerinin birçoğunda etkili bir yöntem değildir [12,45] olgunlaşmış ve olgunlaşmamış kotiledonlar, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyo eksenleri, internodlar, epikotil, hipokotil ve genç yaprakçıklardan etkili bir şekilde sürgün oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3). 10 μ M BAP ve 10 μ M NAA kallus indüksiyonu ve eldesi için çok etkili olarak bulunmuştur (şekil 5). 2 mg/L 2,4-D'nin de, NAA ve BAP kombinasyonu kadar etkili olduğu gözlenmiştir.

Barna and Wakhlu (1993) [45] nohutun gelişmemiş yaprakçıklarının kallus kültüründen bitki rejenerasyonu sonucu somatik embriyogenezis rapor etmişlerdir. Çok miktarda globular embriyo gelişimi 25 μ M 2,4 D (2,4 Dichlorophenoxyacetic acid) ile desteklenmiş MS ortamında elde etmişlerdir.

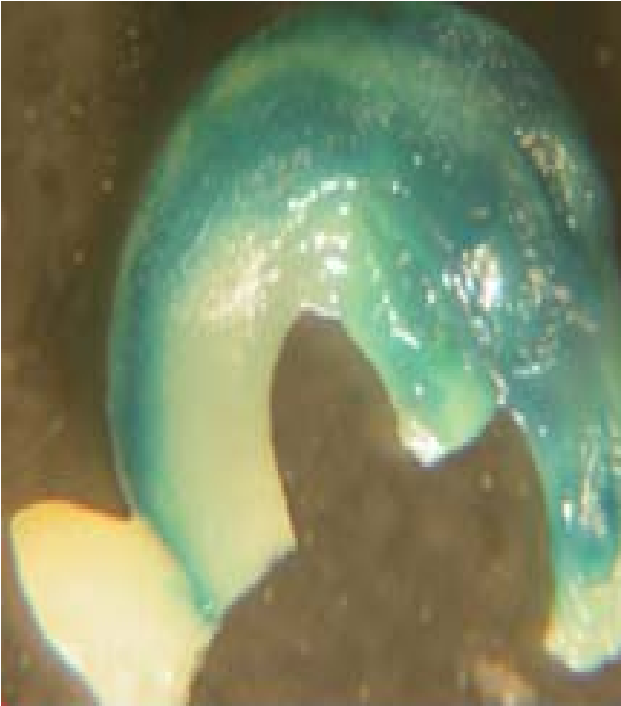
Etkili bir transformasyon protokolü için *Agrobacterium* temelli dört farklı uygulama çalışılmıştır:

- i. Kotiledon nodları ve embriyo ekseninin Agro-vakum infiltrasyonu
- ii. Tek kotiledonu uzaklaştırılmış çimlenmiş tohumların *Agroinokülasyonu*
- iii. 3 gün çimlendirilmiş tohumlara direkt *Agrobacterium* enjeksiyonu
- iv. Yüzey sterilizasyonunu takiben kuru nohutlara direkt bakteri emdirilmesi
- v. Olgunlaşmamış embriyo ekseninin uyarılmış bakteri ile transformasyonu

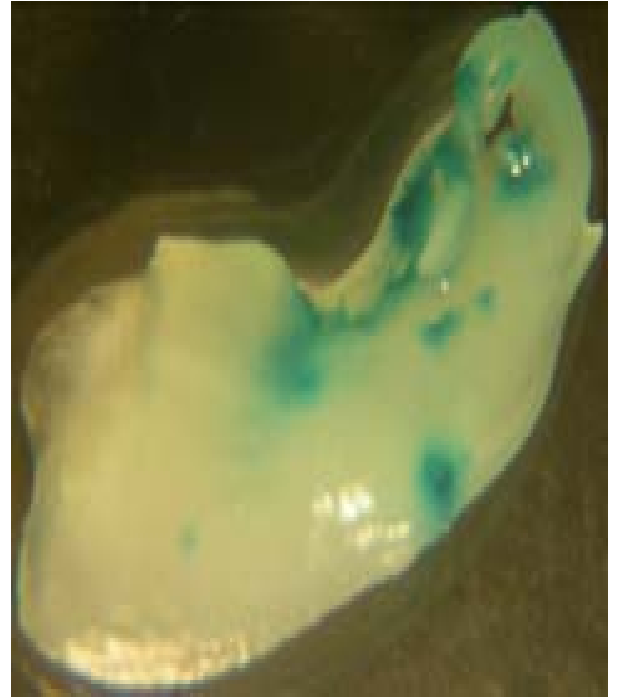
Nohudun kotiledon nodlarının eksplant kaynağı olarak kullanımına yönelik literatürde çalışma bulunmamakla beraber bu çalışmamızda kotiledon nodu ve embriyo eksenini *Agrobacterium*-vakum infiltrasyonu temelli transformasyon sisteminin optimizasyonu için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda kotiledon nodlarının yanı sıra embriyo eksenleride *Agrobacterium* temelli gen aktarımı için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 5. Nohut kotiledon nodyumlarından kallus indüksiyonu. 10 μ M BAP ve 10 μ M NAA içeren MMSG ortamında elde edilmiştir.



Şekil 6. KYRT1 suşu kullanılarak LK1 kültürünün Agro-vakum infiltrasyonu sonucu elde edilen geçici GUS ekspresyonu.



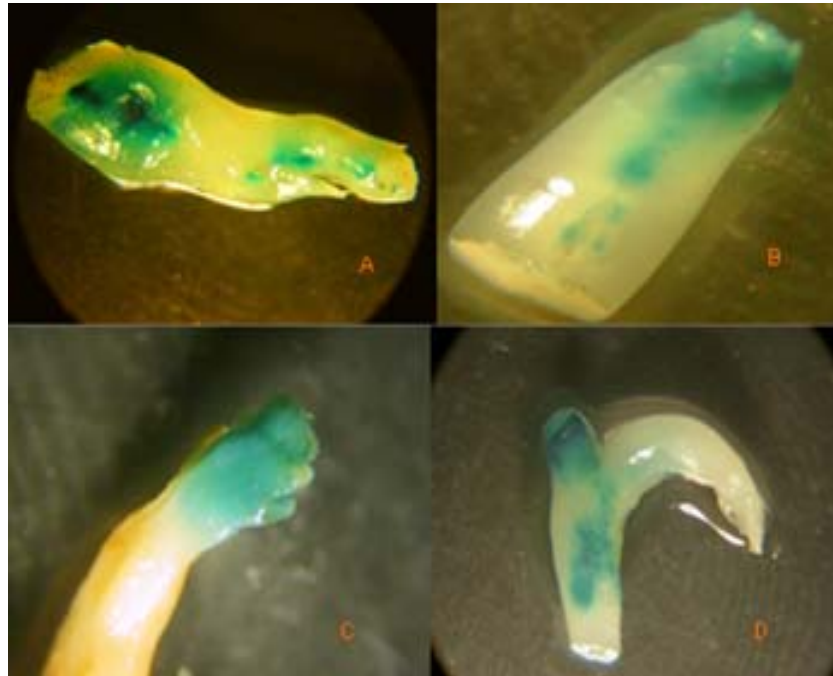
Şekil 7. C58C1 suşu kullanılarak LK1 kültürünün Agro-vakum infiltrasyonu sonucu elde edilen geçici GUS ekspresyonu

Vakum infiltrasyonunun etkisiyle *Agrobacterium* 'un bitki hücrelerine daha iyi nüfuz ederek transformasyonun etkinliğini artırdığı baklagillerde dahil olmak üzere bir çok yayında gösterilmiştir [1, 7, 8, 10, 12, 14, 19, 20, 24]. (Şekil 4). Negatif basıncın artmasına bağlı olarak geçici GUS ifadesinin artması bu görüşü desteklemekte, ancak yüksek vakum değerlerinde eksplantların hayatta kalma oranları azalmaktadır. Artan vakum süresinde geçici GUS ifadesini artırmakta, fakat uzun süreli vakum infiltrasyonlarında eksplantların hayatta kalma oranları düşmektedir. Yaptığımız denemelerde 450 mmHg evakuasyon basıncında 30 dakikalık bir vakum süresi nohut için optimum GUS boyanması vermektedir (Şekil 6-7).

Embriyo ve kotiledon nodlarının yapılan vakum infiltrasyonu denemeleri sonuçları

toplu olarak düşünüldüğü zaman, kotiledon nodlarının rejenerasyon yanıtı embriyo ekseninden daha iyi sonuç vermesine rağmen embriyo eksenini selektif ortamda geçici GUS ekspresyonu bakımından daha iyi sonuçlar vermiştir.

Nohut tohumlarının *Agrobacterium* solüsyonu ile imbibisyonu daha önceki çalışmalarda denenmemiş ve doku kültürü temeline dayanmayan bir transformasyon sistemidir. Bu teknik kullanılarak daha önceden elde edilmiş bir transforme nohut olmadığı için geçici ekspresyonda *Agrobacterium* suşu, inokülasyon zamanı, eksplantın tipi ve gelişimsel aşaması, yaralama, infiltrasyon ve kültür var gibi parametrelerin transformasyona etkileri de araştırılmıştır.



Şekil 8. Vakum infiltrasyonu sonucu farklı nohut çeşitlerinde geçici GUS ekspresyonu. A-B LK1, C-D Er kültüvarı.

Yapılan deneylerin tümünde transformasyon etkinliği histokimyasal GUS analizleri ile tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 6, 7, 8). Bunun için GUS histokimyasal boyaması *Agrobacterium* ile muamele edilmemiş eksplantlar üzerinde de yapılarak endojen GUS aktivitesinin olmadığı gösterilmiştir.. *Agrobacterium* ile muamele edilmemiş olup yaralanmış veya yaralanmamış eksplantların hiç birisi GUS aktivitesi göstermemiştir.

Agrobacterium'un üç farklı suşu C58C1, KYRT1 ve EHA101'in transformasyon etkinlikleri de belirlenmiştir. Tek kotiledonlu nohut tohumlarının tümü *Agrobacterium*'un C58C1 ve KYRT1 suşları ile muamele edildikten sonra geçici GUS ekspresyonu göstermişlerdir. Geçici GUS ekspresyonu bakımından C58C1 ve KYRT1 suşlarının etkinlikleri birbirine yakın bulunmuştur. Ancak uzun dönemli seleksiyon çalışmaları sonucunda stabil gen transformasyonu bakımından EHA101 suşunun, C58C1 ve KYRT1'den daha etkili olduğu gözlenmiştir. KYRT1 ve C58C1 suşları transformasyon etkinliği bakımından karşılaştırıldığında geçici GUS ifadesi bakımından KYRT1 suşunun C58C1 suşuna göre daha etkili olduğu görülmüştür. EHA101/PTJK136 KYRT1/pTJK 136 ve C58C1/pTJK 136 suşlarının transformasyon etkinlikleri Akbulut [46] tarafından karşılaştırılmış ve EHA101/PTJK136 suşunun transformasyon etkinliğinin diğerlerine oranlara çok düşük olduğu bulunmuştur. Ancak EHA 101/pDNEM 3300 suşu kullanılarak yaptığımız çalışmalarda bu durumun tersi bir sonuç elde edilmiş ve EHA101/pDNEM 3300 suşunun transformasyon etkinliği selektif ortamda daha etkili olmuştur.

Agrobacterium uygulama süresinin (8, 16 ve 24 saat) tohum canlılığı ve transformasyon etkinliği üzerine etkisi de araştırılmış ve transformasyon etkinliği bakımından en iyi sonuç 16 saatlik bakteri uygulamasından elde edilmiştir.

Aynı şekilde vakum infiltrasyonu çalışmalarında vakum uygulama süresinin (10, 20, 30 ve 40 dakika) tohum canlılığı ve transformasyon etkinliğine etkileri de araştırılmış ve 450 mmHg evakuasyon basıncında ve 30 dakika infiltrasyonda transformasyon ve tohum canlılığı bakımından en iyi sonuçlar alınmıştır.

Yapılan çalışmalarda baklagil transformasyonunda *Agrobacterium* etkinliğinin suşa göre değiştiği görülmüştür. Bizim test ettiğimiz *Agrobacterium tumefaciens* suşları arasında EHA 101 suşu deneysel sistemlerimiz için en iyisi olarak belirlenmiş ve çalışmalarımız da bu suş üzerinde yoğunlaşmıştır.

Birçok farklı deneyde transformasyon yaralanmış dokularda daha etkin olarak bulunmuştur. Geçici GUS ekspresyonu yaralanmış ve yaralanmamış dokularda *Agrobacterium* ile 10 gün ko-kültüvasyondan sonra gözlenmiştir. Yaralanmış ve yaralanmamış dokulardaki GUS ekspresyonu karşılaştırılmış ve yaralanmış dokularda daha yüksek bir GUS boyanması gözlenmiştir. Aynı zamanda 16 saat inkübasyon süreleri sonunda alınan eksplantlarda da GUS ifadesi 8 saat yaralananlardan daha yüksek bulunmuştur. Literatür verileri de yaralamanın transformasyon etkinliğini artırdığını desteklemektedir [47].

Yaralanmış ve *Agrobacterium* ile muamele edilmiş tek kotiledonlu nohut tohumlarının canlılığı da araştırılmış, yaralamadan dolayı geçici GUS ekspresyonunda bir artış görülmesine rağmen tohum yaşama oranında negatif bir etki görülmüştür.

Agrobacterium süspansiyonunda inkübasyon zamanının (8, 16 ve 24 saat) eksplantlara etkisi diğer parametrelerle birlikte araştırılmıştır. Artan inokülasyon zamanı GUS boyanmasını önemli derecede artırmıştır. Akbulut [46] tarafından yapılan çalışmada da artan inokülasyon zamanına bağlı olarak oluşan GUS boyanma noktalarında bir artış gözlenmiştir.

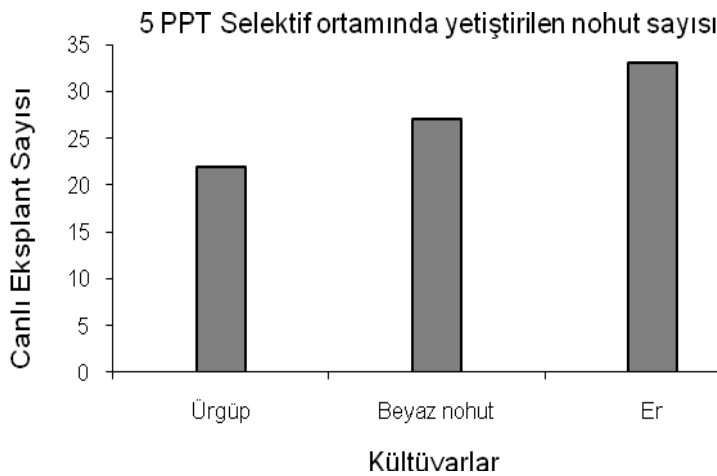
Çeşitli bitki türleri ile yapılan çalışmalarda *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferinde ko-kültürasyon süresinin iki gün uzatılmasının transformasyonda daha olumlu sonuçlar verdiği rapor edilmiştir [46,48]. Yaptığımız çalışmalarda ko-kültürasyon süresi on güne kadar çıkarılmış ve sonuçlar beş günlük ko-kültürasyon sonuçlarından daha iyi bulunmuştur.

Vakum infiltrasyonu, transformasyon etkinliğini artırmak için kullanılan

Agrobacterium temelli transformasyon sistemlerinden biridir [17, 28, 49]. Bu çalışmada çeşitli evaküasyon basınçları (200, 300, 400, 450 ve 500 mmHg) ve süreleri (20 ve 30 dk) araştırılmıştır. *Agrobacterium* infiltrasyonunda en uygun koşullar 30 dk süreyle 450 mmHg evaküasyon basıncı uygulanmasından elde edilmiştir.

Çimlendirilmiş ve çimlendirme olmadan sadece su emdirilmiş nohut tohumlarının *Agrobacterium* ile infiltrasyonunun geçici GUS ekspresyonlarına bakılmış, iki gün çimlendirilmiş tohumların çimlendirilmeden vakum infiltrasyonu yapılan eksplantlara oranla daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir.

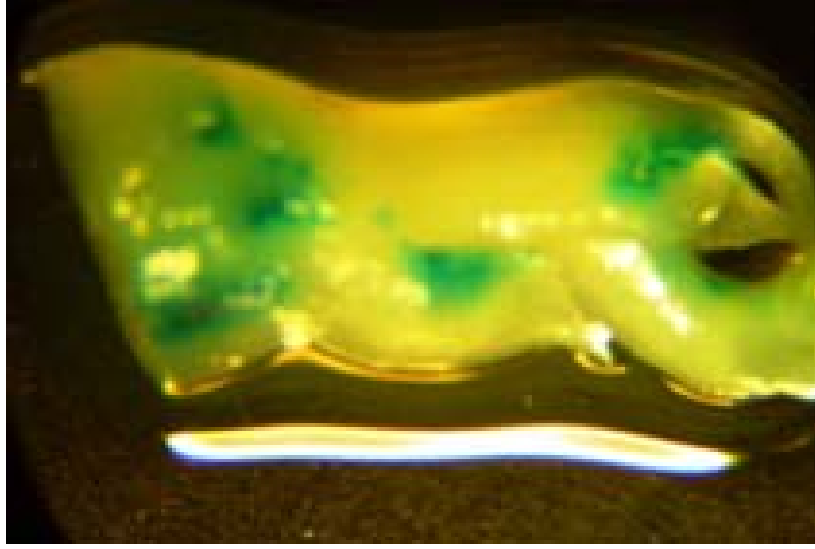
Agrobacterium aracılığıyla gen transfer sisteminde genotipin etkisi çok önemli bir parametredir. [37]. Beş Türk nohut çeşidinin (LK1, LK2, Gökçe, Er, ve Uzunlu) optimum transformasyon koşulları altında EHA 101 suşu ile transformasyon yanıtları araştırılmıştır. Yapılan seleksiyon sonucunda 5 mg/L PPT içeren ortamda LK2 çeşidinden 22, LK1'den 27 ve Er çeşidinden de 33 adet selektif ortamda yaşayan bitki elde edilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. 5 mg/L PPT içeren selektif ortamda canlı explant sayıları (transformasyonda 100 adet nohut kullanılmıştır)

Çimlendirilmiş tohumlara direkt *Agrobacterium* enjeksiyonuyla gen aktarımı için nohutlar üç gün çimlendirilmiş, kök uçları, bir kotiledonu ve embriyo ucu kesilmiştir. Bu süre sonunda induksiyon ortamından alınan ve santrifüj edilerek

yoğunlaştırılan bakteriler steril bir mikro enjektör yardımıyla kesilen bu nohutların kotiledon nodu bölgesine doğrudan enjekte edilmiştir. Bu yöntemle transformasyonda geçici GUS ekspresyonu ve seleksiyondan yeterli sonuçlar alınmıştır (Şekil 10,11).



Şekil 10. Agro-enjeksiyon yöntemi kullanılarak transformasyon yapılmış nohutta geçici GUS ekspresyonu (C58C1 ile inkübasyona tabi tutulmuş Er kültürü).

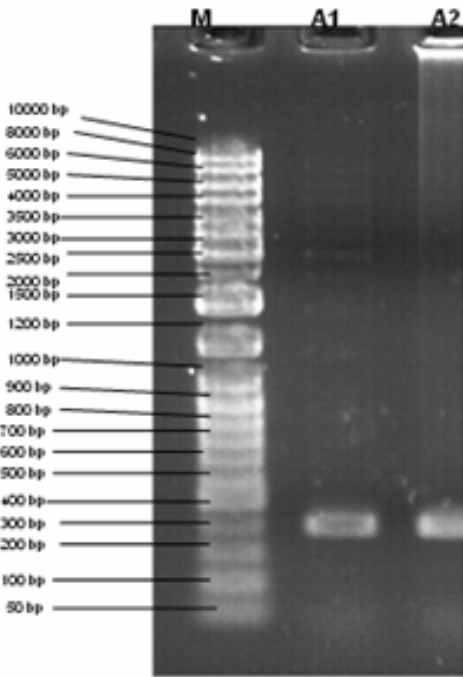


Şekil 11. EHA 101 suşu ile transforme edilmiş, 5 mg/L PPT içeren ortamda seleksiyona tabi tutulmuş Er kültürünün explantları

Direk bakteri emdirme çalışmalarında yüzey sterilizasyonu yapılmış ve 16 saat imbibisyon yapılmış nohutlar induksiyon ortamından alınan ve 2X hacim sıvı ko-kültürasyon ortamı ile resüspanse edilen ortamlarla 18 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra nohutlar 1 mg/L TDZ içeren katı ko-kültürasyon ortamında 10 gün boyunca ko-kültüre edilmiş ve bu süre sonunda geçici GUS ekspresyonu bakımından analiz edilmiştir.

Örneklerden geçici GUS ekspresyonu alınmış olmasına rağmen selektif ortamda yaşamamışlardır.

Aday transgenik sürgünlerden CTAB metoduna göre DNA izolasyonu yapılarak izole edilen DNA ile Bar spesifik primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. 372 bp'lik beklenen PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. EHA 101/pDNEM 3300 ile transformasyon yapılmış aday transformantların DNA'sından PCR amplifikasyonu (%1.2'lik agaroz jel kullanılmış ve ethidium bromid ile boyanmıştır. **M:** Marker, **A1:** Vakum infiltrasyonu yöntemiyle elde edilen aday transgenik bitkinin DNA'sının PCR amplifikasyonu, **A2:** Doğrudan emdirme yöntemiyle elde edilen aday transgenik bitkinin DNA'sının PCR amplifikasyonu)

4. Sonuç

Rejenerasyon çalışmaları; gelişmemiş embriyo, kotiledon nodu ve olgun embriyo eksenli dokuları da içeren farklı dokulara uygulanmıştır. İndirekt organogenez aracılığıyla embriyolarda yürütülen rejenerasyon çalışmaları kallus induksiyonuna rağmen başarılı olmamıştır. Ancak, çoklu sürgün induksiyonu aracılığıyla direkt organogenezden umut verici sonuçlar alınmıştır.

Embriyo eksenini ile karşılaştırıldığında kotiledon nodlarından rejenerasyon daha başarılı bulunmuştur. Her iki eksplant'ta, TDZ'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında (0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L) çoklu sürgün induksiyonu sağlıksız gözükmesine rağmen bu sürgünlerin uzatılması başarıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). Optimum kültür koşulları altında (3 mg/L BAP, 1 mg/L kinetin ve 0.5 mg/L GA₃) eksplant başına kotiledon nodlarından

2.77, embriyo ekseninden 2.83 sürgün elde edilmiştir.

Agrobacterium'un 450 mm Hg'de 30 dakika hücrelere vakum infiltrasyonu, her iki eksplanтта da geçici GUS ekspresyonu için optimum olarak bulunmuştur. Nohut için, tek kotiledonu uzaklaştırılan embriyoların agroinokulasyonundan, Akbulut ve ark. [46] tarafından alınan sonuçlara paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Test edilen *Agrobacterium tumefaciens* suşları arasında (KYRT1, C58C1 ve EHA 101) en iyi yanıt EHA 101 suşundan elde edilmiştir. Bu değerlendirme 5 mg/L PPT veya 150 mg/L Kanamisin içeren ortamlarda canlı kalan eksplant sayısına göre yapılmıştır. Bu sonuçlara göre 27 adet dirençli nohut bitkisi eldesi ile EHA 101 suşu *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla nohut bitkisine gen aktarımı için en uygun suş olarak belirlenmiştir. KYRT1 ve C58C1 suşlarının kendi aralarında ikili değerlendirilmelerinde ayrıca geçici GUS ekspresyonu analizlerine de bakılmış ve bunlar arasında da KYRT1 suşunun C58C1 suşundan daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Selektif ortamde elde edilen dirençli bitki ssayısına göre, Er çeşidinin transformasyona yanıtı daha yüksek olduğu belirlenmesine rağmen, LK1'in ticari değeri yüksek olması ve Er çeşidine yakın ceavp oluşturması nedeniyle çalışmalar LK1 üzerinde yoğunlaştırılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan yöntemler ile nohut bitkisinin başarılı bir şekilde transformasyonu yapılabilmektedir. Gelecekte, hastalıklara (özellikle de *Ascochyta blight*), herbisitlere, tuz ve soğuğa dirençli transgenik nohut bitkilerinin elde edilmesi için bu transformasyon yönteminin potansiyel olarak kullanılabileceği önerilebilir

KAYNAKLAR

1. Karthikeyan, A. S., Sharma, K. S., Veluthambi, K., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of (*Vigna mungo* L) Hepper. Plant Cell Rep 15:328-331, (1996).
2. Acharjee S., Sarmah B. K., Kumar P. A., Olsen K., Mahon R., Moar W. J., Moore A., and Higgins T. J. V., Transgenic chickpea (*Cicer arietinum* L.) expressing a sequence-modified cry2Aa gene. Plant Sci. 178:333-339, (2010).
3. Malik, K. A., and Saxena, P. K., Thidiazuron Induces High-frequency Shoot Regeneration in Intact Seedlings of Pea (*Pisum sativum*), Chickpea (*Cicer arietinum*) and Lentil (*Lens culinaris*). Aust.J. Plant. Physiol. 19:731-740, (1992).
4. Hulse, J. H., Nature, composition and utilization of grain legumes. p. 11-27. In: Uses of tropical Legumes: Proceedings of a Consultants' Meeting, 27-30 March 1989, ICRISAT Center. ICRISAT, Patancheru, A.P. 502 324, India, (1991).
5. Huisman, J., and van der Poel, A. F. B., Aspects of the nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed. p. 53-76. In: F. J. Muehlbauer and W. J. Kaiser (eds.) Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, (1994).
6. Murashige, T., and Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". Physiol. Plant:15: 473-497, (1962).
7. McCabe, D. E., Swain, W. F., Martinell, B. J., Christou, P., Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technology 6:923-926, (1988).
8. Sato, S., Newell, C., Kolacz, K., Tredo, L., Finer, J., Hinchee, M., Stable transformation via particle bombardment

- in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep.* 12:408-413, (1993).
9. Yun C. S., High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Acta Botanica Sinica.* 46 (5):610-617, (2004).
 10. Schoreder, H. E., Schotz, A. H., Wardley-Richardson, T., Spencer, D., Higgins, T. J. V., Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum Sativum*). *Plant Physiol* 101: 751-757, (1993).
 11. Geervani, P., Utilization of chickpea in India and scope for novel and alternative uses. *p. 47-54.* In: *Uses of Tropical Grain Legumes: Proceedings of Consultants' Meeting, 27-30 March, 1989.* ICRISAT Center, Patancheru, Andhra Pradesh, India, (1991).
 12. Lombardi, Ercolano, E., Alooui, H. E., Chiurazzi, M., A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large numbers of cells susceptible to *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Cell.Rep:Online Pub.10.1007/s00299-003-0576,* (2003).
 13. Eapen, S., George, L., Somatic embryogenesis in *Cicer arietinum* L.-Influence of Genotype and auxins. *Biol plantarum* : 36(3):343-349, (1994).
 14. Jaiwal, K., Ragini, K., Ignacimuthu, S., Potrykus, S., Kumar, I., Potrykus, C., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) a recalcitrant grain legume. *Plant-Science:* 161: 239-247, (2001).
 15. Gulati, A., Schryer, P., and McHugen, A., Regeneration and Micrografting of lentil shoots. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant:*37:798-802, (2001).
 16. Khawar, K. M., and Özcan, S., High frequency shoot regeneration from cotyledonary node explants of different lentil genotypes and in vitro micrografting. *Biotech. Biotechnol Eq.* 16:12-17, (2002).
 17. Mahmoudian, M., "Optimisation of Tissue Culture Conditions and Gene Transfer Studies In Lentil". Ph.D Thesis, METU, (2000).
 18. Wang, K., Herrera-Estrella, M., Van Montagu, M., Zambryski, P., Right 25 bp terminus sequence of the nopaline TDNA is essential fo , and determines the direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to plant genome. *Cell:* 38:35-41, (1984).
 19. Gelvin, S., The introduction and expression of transgenes in Plants. *Curr Opin Biotech* 9:227-232, (1998).
 20. Babaoğlu, M., Davey, M, R., Power, J. B., Genetic engineering of grain legumes:key transformation events. *AgbiotechNet, Vol 2, June ABN 050,* (2000).
 21. Smith, P., Biological fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculturr. Edited by A. Legocki, H. Bothe , A. pühler. Springer-Verlag, (1997).
 22. Fontana, G. S., Santini, L., Caretto, S., Frugis, G., Mariotti, D., Genetic transformation in the grain legume (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Rep:* 12:194-198, (1993).
 23. Kar, S., Basu, D., Das, S., Ramakrishnan, N. A., Mukherjee, P., Nayak, P., Sen, S. K., Expression of Cryia(C) Gene of *Bacillus-Thuringiensis* in Transgenic Chickpea Plants Inhibits Development of Pod-Borer (*Heliothis-Armigera*) Larvae. *Transgenic Res* 2: 177-185, (1997).
 24. Krishnamurthy, K. V., Suhasini, K., Sagare, A. P., Meixner, M., Kathen A., Pickardt, O., *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. *Plant Cell Rep* 19:235-240, (2000).
 25. Kim, J. W., Minamikawa, T., Stable delivery of canavalin promoter beta-

- glucuronidase gene fusion into French bean by particle bombardment. *Plant Cell Physiol* 38: 70-75, (1997).
26. Bean, S. J., Gooding, P. M., Mullineaux, P. M., Davies D. R., A simple system for pea transformation. *Plant Cell Rep* 16: 513-519, (1997).
 27. Karthikeyan, A. S., Sharma, K. S., Veluthambi, K., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of (*Vigna mungo* L) Hepper. *Plant Cell Rep* 15:328-331, (1996).
 28. Trieu, A., Burleigh, S. H., Kardailsky, I. V., Mendoza-Maldonado, I. E., Wersaw, W. K., Blaylock, L. A., Shin, H., Chiou Tzyy., Katagi, H., Dewbre, G. R., Weigel, D., Harrison, M. J., Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J* 22: 531-541, (2000).
 29. Oger, P., Petit, A., Dessaux, Y. A simple technique for direct regeneration of the diploid legume species *Lotus Japonicus*. *Plant sci* 116:159-168, (1996).
 30. Hinchee, M. A., Connor-Ward, D. V., Newell, C. A., McDonnell, R.E., Sato, S. J., Gasser, C. S., Fischhoff, D. A., Re, D. B., Farley, R. T., Horch, R. B., Atkins, C., Genetic transformation and Regeneration of Legumes. NATO ASI series Vol G 3, (1988).
 31. Siefkes-Boer, H. J., Noonan, M. J., Bullock, D. W., Conner, A. J., Hairy root transformation system in large-seeded grain legumes. *Isr J. Plant science* 43:1-5, (1995).
 32. Singh R., Singh N. P., Datta S., Yodav I. S., and Singh A. P., *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea using shoot meristem. *Ind J. Biot.* Vol. 8, pp. 78-84, (2009).
 33. Ignacimuthu S., and Prakash S., *Agrobacterium*- mediated transformation of chickpea with α -amylase inhibitor gene for insect resistance. *J. Biosci.* 31:339-345, (2006).
 34. Oz M. T., Eyidogan F., Yucel M., and Oktem H. A., Optimized selection and regeneration conditions for *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea cotyledonary nodes. *Pak. J. Bot.*, 41(4): 2043-2054, (2009).
 35. Pathak M. R., and Hamzah R. Y., An efficient method of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpeas. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 93:65-71, (2008).
 36. Mohapatra, S. T., Sharma, R. P., *Agrobacterium* mediated genetic transformation of chickpea, (*Cicer arietinum* L). *Indian J Exp Biol* 29:758-761, (1991).
 37. Doyle, J. J. and J. L. Doyle. A Rapid Total DNA Preparation Procedure For Fresh Plant Tissue, *Focus*, 12, 13-15, 1990.
 38. Deblare, R. *et all.*, Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 13, pp. 4777-4788, (1985).
 39. Hood, E. E., *et all.*, New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res:* 2:208-218, (1993).
 40. Torisky, R, S., Kovacs, L., Avdiushko S., Newman J. D., Hunt A. G., Collins, B., Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. *Plant Cell Rep* 17:102-108, (1997).
 41. Jefferson, R. A., *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405, (1987).
 42. Singh, K. B., Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crop Res* 53:161-170, (1997).
 43. Murthy, B. N. S., Murch, S. J., Saxena, P. K., Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* morphogenesis. *In Vitro Cell Dev -Pl* 34: 267-275, (1998).

44. Khalafalla, M. M., and Hattori, K., “A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.)”. *Plant Growth Regul* 27:45-148, (1999).
45. Barna, K. S., and Wakhlu, A. K., Somatic embryogenesis and Plant regeneration from callus cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Rep* 12:521-524, (1993).
46. Akbulut, M., Yücel, M., and Oktem, H. A., Analysis and optimization of DNA delivery into chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings by *Agrobacterium tumefaciens*. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7(8), pp. 1011-1017, (2008).
47. Orczyc, A. M., and Orczyc, W., Study of the factors influencing *Agrobacterium* mediated transformation of Pea (*Pisum Sativum*). *Mol Breeding* 6:185-194, (2000).
48. Warkentin, T. D., and McHughen, A., “Regeneration from lentil cotyledonary nodes and potential of this explant for transformation by *Agrobacterium tumefaciens*”, *LENS Newsletter*, Vol. 20, pp. 26-28, (1993).
49. Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G., In *Planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci* 316:1194-1199, (1993).
50. Vickers, J. E., Graham, G. C., and Henry, R. J., A protocol for the efficient screening of putatively transformed plants for bar, the selectable marker gene, using the polymerase chain reaction. *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 14 (4), pp. 363-368, (1996).