



ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELA KÖSE

Agrobacterium tumefaciens ARACILIĞI İLE HIYARIN (*Cucumis sativus* L.) GENETİK TRANSFORMASYONU VE BİTKİ REGENERASYONU

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2002

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞI İLE HİYARIN
(*Cucumis sativus* L.) GENETİK TRANSFORMASYONU VE
BİTKİ REGENERASYONU**

ELA KÖSE

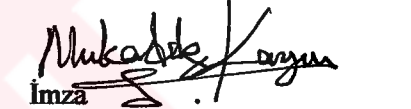
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

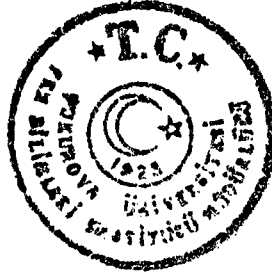
Bu tez 04/09/2002 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.


İmza
Prof. Dr. N. Kemal KQÇ
Danışman


İmza
Doç. Dr. Salih KAFKLAS
Üye


İmza
Yrd. Doç. Dr. Mukadder KAYIM
Üye

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No: 2049




Prof. Dr. Fikri AKDENİZ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FBE2001YL105

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Hıyar Bitkisinde (<i>Cucumis sativus</i> L.) Yapılan Bitki Regenerasyonu ile İlgili Çalışmalar	4
2.2. <i>Agrobacterium</i> Aracılığı ile Hıyar Bitkisine (<i>C. sativus</i> L.) Gen Transferi ile İlgili Çalışmalar.....	11
2.3. Diğer <i>Cucumis</i> spp. Türlerinde Yapılan Bitki Regenerasyonu ve Gen Transferi ile İlgili Çalışmalar	15
3. MATERYAL VE METOD.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Kimyasallar.....	21
3.1.2. Transformasyonda Kullanılan Bitki Materyalleri.....	21
3.1.3. Gen Transferinde Kullanılacak Olan Plazmid ve Bakteri Irkı.....	21
3.2. Metod.....	22
3.2.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması.....	22
3.2.2. Hıyar Tohumlarının <i>In Vitro</i> Koşullarında Çimlendirilmesi ve Bitkilerin Elde Edilmesi.....	22
3.2.3. Transformasyonda Kullanılan Tütün Yapraklarının <i>In Vitro</i> Sürgün Ucu Kültürü ile Elde Edilmesi.....	23
3.2.4. Transformasyonda Kullanılan Bitki Doku Parçaları ve Ortamların Belirlenmesi.....	23
3.2.5. <i>A. tumefaciens</i> 'in Kültürü.....	24

3.2.6. Transformasyonda Kullanılacak Olan Bakteri Solüsyonunun Hazırlanması.....	24
3.2.7. Bitki Doku Parçalarının <i>A. tumefaciens</i> ile Transformasyonu.....	25
3.2.8. Tütün Yapraklarının <i>A. tumefaciens</i> ile Transformasyonu.....	25
3.2.9. Transgenik Bitkilerin Regenere Edilmesi.....	26
3.3. Histokimyasal GUS Analizi.....	26
3.4. Regenere Edilen Bitkilerin Köklendirilmesi.....	26
3.5. Köklenen Bitkilerin Toprağa Aktarılması ve Adaptasyonları.....	27
3.6. Bitkiden Genomik DNA'nın İzolasyonu	27
3.7. PZR Analizleri.....	28
3.8. Agaroz Jel Elektroforez.....	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1. Araştırmada Kullanılacak Olan Bitki Materyallerinin Belirlenmesi....	29
4.2. Uygun Bitki Regenerasyon Ortamının Belirlenmesi.....	30
4.3. <i>Agrobacterium</i> ile Hıyar Bitkilerinin Genetik Transformasyonu.....	34
4.4. Elde Edilen Transgenik Bitkilerin Köklendirilmesi ve Doğal Koşullara Adaptasyonları.....	39
4.5. <i>Agrobacterium</i> Aracılığı ile Tütün Bitkisine Gen Transferi.....	41
4.6. Histokimyasal GUS Analizi.....	43
4.7. Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA'ların PCR Analizi ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	44
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	54
EKLER.....	55

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞI İLE HİYARIN
(*Cucumis sativus* L.) GENETİK TRANSFORMASYONU VE
BİTKİ REGENERASYONU**

Ela KÖSE

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

Danışman: Prof.Dr. N.Kemal KOÇ
Yıl: 2002, Sayfa:61
Üye: Prof.Dr. N.Kemal KOÇ
Doç.Dr. Salih KAFKAS
Yrd.Doç.Dr. Mukadder KAYIM

Kotiledon ve hipokotil bitki doku parçaları kullanılarak marker gen olarak kanamisine dayanıklılık (*npt II*) ve β -glukuronidaz (GUS) genlerini içeren *Agrobacterium tumefaciens*'in pGA482GG plazmidini taşıyan EHA101 ırkı ile hıyar bitkisine (*Cucumis sativus* L.) gen transferi yapılmıştır. *In vitro* koşullarda tohumların çimlendirilmesi ile elde edilen bitkilerin kotiledon ve hipokotil parçaları farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmış ve en uygun sürgün regenerasyon ortamının 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir. Denenen bitki doku parçalarından en fazla bitki regenerasyonu ortadan enine ikiye kesilmiş kotiledon yapraklarının sapa bağlanan kısımlarından elde edilmiştir. Doku parçaları *A. tumefaciens* ile 2 gün süre ile ko-kültüre alınmıştır. Kanamisinli ortamlarda seçilen bitki doku parçaları histokimyasal GUS⁺ analizi ile test edilmiş ve dokularda meydana gelen mavi renk değişimleri gözlenmiştir. Transgenik dokulardan regene olan sürgünler basal MS ortamı üzerinde 3 hafta süre ile kültüre alınarak kök gelişimi teşvik edilmiştir. 10 cm uzunluğa ulaşan ve kök oluşturan bitkiler toprağa aktararak bitkilerin doğal koşullara adaptasyonları sağlanmıştır. Bu bitkilerin normal çiçek ve meyve oluşturdıkları gözlenmiştir. Transgenik bitkilerden DNA izolasyonları yapılmış ve aktarılan *npt II* ve GUS genlerini belirlemek için PZR analizleri yapılmıştır. Böylece hıyar bitkisine *A. tumefaciens* aracılığı ile gen transferi için etkili bir protokol oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler : *Agrobacterium tumefaciens*, *Cucumis sativus*, Transgenik Bitki, Bitki Regenerasyonu, Hıyar

ABSTRACT
MSc THESIS

GENETIC TRANSFORMATION OF CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.) BY *Agrobacterium tumefaciens* AND PLANT REGENERATION

Ela KÖSE

**UNIVERSITY OF CUKUROVA
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCE
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION**

Supervisor : Prof.Dr. N.Kemal KOÇ
Year:2002,Page:61
Jury : Prof.Dr. N.Kemal KOÇ
Assoc.Prof.Dr. Salih KAFKAS
Assist.Prof.Dr. Mukadder KAYIM

Cotyledon and Hipocotyl segments of cucumber (*Cucumis sativus* L.) were used for the transformation performed by EHA101 strain of *A. tumefaciens* harboring the binary vector pGA482GG plasmid carrying the marker genes the neomycin phosphotransferase II (*npt II*) determining resistance to kanamycin and β -glucuronidase (GUS). Cotyledon and hipocotyl segments of plants which were obtained *in vitro* conditions were cultivated on MS medium containing different hormones combination and concentrations. The best suitable shoot regeneration medium was observed on MS medium containing 2 mg/L zeatin. In the tested tissues segments, the highest shoot regeneration was obtained from the proximal ends of cotyledon leaves which were cut transversely into two halves. Plant tissue segments co-cultivated with *A. tumefaciens* for 2 days. Plant tissue, selected in the MS medium containing kanamycin were tested by histochemical GUS⁺ assays and blue color staining was observed on the tissues. Shoots regenerated from the transgenic tissue were cultured on the basal MS medium to induce root formation for 3 weeks. The rooted plants with 10 cm height were transferred to the soil for their adaptation to the natural environment. It was observed that plants had normal flower and fruit. DNA was isolated from transgenic plants and PCR analyzes were done to indicate transferred *npt II* and GUS genes. Thus an effective protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of cucumber was set up.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, *Cucumis sativus*, Transgenic Plant, Plant Regeneration, Cucumber

TEŞEKKÜR

Bana bu konuyu veren , bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve her türlü konuda sorularımı yanıtlayan Sayın Hocam Prof. Dr. N. Kemal KOÇ'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmam esnasında bilgilerinden faydalandığım Yrd.Doç.Dr. Mukadder KAYIM'a, doktora öğrencisi Hatice SATAR'a, benden yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlisi Ş.Evrim ARICI ve Semiha ÜNLÜ'ye ve laboratuvarımız yüksek lisans öğrencilerinden Feray ERDAL ve Orçun OKYAY 'a teşekkür ederim. Yüksek lisans çalışmam boyunca çeşitli yönlerden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme de teşekkür ederim.

Bu tezde maddi destek sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonu ve tüm Bitki Koruma Bölümü elemanlarına teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SAYFA NO
Çizelge 4.1. Denemede kullanılan farklı sitokinin ve oksin hormon konsantrasyon ve kombinasyonu ile denemede kullanılan eksplant sayısı ve regenere olan bitki sayısı	32
Çizelge 4.2. <i>A. tumefaciens</i> ile gen aktarımı yapılan kotiledon ve hipokotil doku parçalarından teşvik edilmiş sürgün sayısı ve transformasyon başarısı	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

		SAYFA NO
Şekil 4.1.	Bitki transformasyonda kullanılan pGA482GG plazmidinin haritası	21
Şekil 4.2.	½ MS ortamı üzerinde karanlık koşullarda kültüre alınan hıyar tohumlarının çimlenmesinden 5 gün sonra gelişen bitkiler	29
Şekil 4.3.	Farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamın üzerinde bitki regenerasyonunu teşvik etmek amacıyla kültüre alınan kotiledon parçaları	31
Şekil 4.4.	Değişik hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan kotiledon yaprak parçalarından oluşan % bitki sayısı	31
Şekil 4.5.	2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan kotiledon ve hipokotillerden gelişen kalluslar ve bitkicikler (ok ile gösterilmiştir.)	33
Şekil 4.6.	Kotiledon doku parçalarından teşvik edilen ve(a) 2 mg/l zeatin ile (b) 0.1 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgünlerin 4 hafta sonraki görünümü	34
Şekil 4.7.	Kotiledon parçalarından teşvik edilmiş sürgünlerin gelişimini tamamlaması için erlenmayerler içerisinde 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan hıyar sürgünleri	34
Şekil 4.8.	<i>A. tumefaciens</i> ile transformasyonu yapılarak 50 mg/l kanamisin, 300 mg/l karbensilin ve 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan hipokotil doku parçalarından 5 gün sonra gelişen kalluslar	36

- Şekil 4.9.** Transformasyon için 2 gün süre ile *A. tumefaciens* ile ko-kültüre tabi tutulduktan sonra içerisinde 50 mg/l kanamisin, 300 mg/l karbensilin, 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmış kotiledon doku parçaları **37**
- Şekil 4.10.** Bakteri ile transformasyonu yapılarak petri kutuları içerisinde besi ortamı üzerinde kültüre alınan hipokotil ve kotiledon bitki doku parçalarının klima odasındaki genel görünümü **37**
- Şekil 4.11.** a) *A. tumefaciens* ile gen transferi yapılmış kotiledon yapraklarından antibiyotik içeren (Kanamisin ve Karbensilin) ortam üzerinde uygulamadan 2 hafta sonra geliştirdiği sürgünler (ok ile gösterilmiştir) b) *A. tumefaciens* ile gen transferi yapılmamış kotiledon yaprakların antibiyotik içeren ortam üzerindeki sararmış kotiledon ve hipokotil doku parçaları (Kontrol) **38**
- Şekil 4.12.** *A. tumefaciens* ile transformasyondan sonra antibiyotik içeren bitki regenerasyon ortamı üzerinde kültüre alınan hipokotil+kotiledon parçalarından teşvik edilmiş sürgünler **38**
- Şekil 4.13.** Transformasyon sonucu regenere edilen kotiledon, hipokotil+kotiledon bitki doku parçalarından teşvik edilen sürgünlerin gelişiminin teşviki için 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgünler **39**
- Şekil 4.14.** Basal MS ortamı üzerinde kök oluşturarak gelişimini tamamlayan toprağa aktarılma aşamasına gelmiş hıyar bitkileri **40**

	SAYFA NO
Şekil 4.15. Toprağa aktarılarak doğal koşullara adaptasyonları sağlanmış 5 haftalık transgenik hıyar bitkileri	40
Şekil 4.16. Klima odalarında geliştirilmiş 2 aylık transgenik hıyar bitkileri	41
Şekil 4.17. <i>In vitro</i> sürgün ucu kültürü ile geliştirilmiş tütün bitkisi	42
Şekil 4.18. a) <i>A. tumefaciens</i> ile transformasyonu yapılarak antibiyotik içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan tütün doku parçalarından 3 hafta sonra regenerere olan sürgünler (ok ile gösterilmiştir.) b) Transformasyonu yapılmış tütün bitkilerinin antibiyotik içeren MS ortamı üzerinde kök oluşturması	42
Şekil 4.19. a) Transformasyondan sonra bitki doku parçalarına yapılan GUS analizi sonucunda tütün ve hıyar bitki doku parçalarında gözlenen mavi renk oluşumu b) 2 aylık transgenik bitkilerde GUS analizi sonucu dokularda meydana gelen mavi renk değişimi	43
Şekil 4.20. Hıyar bitkisinin farklı ve aynı kotiledon yapraklardan elde edilen transgenik bitkilerin GUS geni için PZR analizi; kontrol: transgenik olmayan hıyar bitkisi	44
Şekil 4.21. Hıyar bitkisinin farklı ve aynı kotiledon yapraklardan elde edilen transgenik bitkilerin <i>npt II</i> geni için PZR analizi; kontrol: transgenik olmayan hıyar bitkisi	45

1. GİRİŞ

Hıyar (*Cucumis sativus* L.) Amerika, Asya ve Avrupa gibi dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de oldukça yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan ekonomik öneme sahip kültür bitkilerinden biridir. Ülkemizde toplam 793.000 hektar alanda 22.357.612 ton sebze üretimi yapılmaktadır ve bunun 1.825.000 tonu hıyar üretimine aittir. Bu sayısal veriler de gösteriyor ki hıyar ülkemizde üretimi yapılan sebzeler arasında 4. sırada yer almaktadır. Örtü altı alanda da 220.000 dekar alanda sebze üretimi yapılmakta ve bunun % 20'lik kısmında hıyar yetiştiriciliği yapılmaktadır (DİE,1998). Bu kültür bitkisinde abiyotik stres faktörlerinin yanı sıra çeşitli hastalık ve zararlılarda gibi biyotik faktörler sonucu da önemli derecede ürün kayıpları olmaktadır (Schulze ve ark., 1995). Bu ürün kayıplarını en az düzeyde tutabilmek için hastalık ve zararlılara karşı mücadelede kültürel, fiziksel ve kimyasal yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bu mücadele yöntemlerinden en yaygın olarak kullanılan kimyasal mücadele yönteminin, tarımsal üretimde girdileri aşırı derecede arttırması, insan sağlığı ve çevreye olan olumsuz etkileri nedeniyle son yıllarda hastalık ve zararlılara tolerant veya dayanıklı bitkiler elde etme üzerine yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmış ve dayanıklı çeşit kullanımı günümüzde zorunlu hale gelmiştir.

Yüksek verimli hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde genellikle klasik ıslah yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Ancak çoğu kez yapılan bu çalışmalarda bitkiler arasındaki olası seksüel uyumsuzluklar ve kısırlığın yanı sıra istenmeyen özelliklerinde bitkilere aktarılma olasılığının olması gibi nedenlerle klasik melezleme yöntemlerinin uygulanmasında güçlüklerle karşılaşıldığı gibi, istenilen özelliklere sahip bitkiler elde etmek de uzun zaman almaktadır (Nishibayaski ve ark., 1996). Türler arasındaki bu kısırılık engeli istenilen özellikteki bitkilerin elde edilmesinde önemli bir sınırlayıcı faktör olmaktadır.

Hıyar klasik melezleme yöntemlerinin uygulanmasında güçlüklerle karşılaşılacak bitkilerden birisi olup sadece *Cucumis sativus* ile *C.hardwickii* arasında melezleme yapmak mümkün olabilmektedir (Trulson ve ark., 1986). Bitkiler arasındaki uyuma bakmaksızın farklı iki organizma arasındaki gen aktarımına olanak sağlayan genetik transformasyon yöntemleri klasik ıslah programlarına destek sağlayan ve yararlı

yöntemler olarak kullanılmaya başlanmıştır. Transgenik bitkilerin elde edilmesi genlerin hedef hücrelere aktarılması, aktarılan bu genin nüklear genoma yerleşmesi, transform olmuş hücrelerin seçilmesi ve bitki regenerasyonu gibi aşamaları içermektedir. Bu amaçla doğrudan polietilen glycol (PEG), elektroporasyon ve mikroiinjeksiyon ile protoplastlara, partikül bombardımanı ile de hücre ve dokulara gen transferi yapılırken, dolaylı olarak *Agrobacterium*'un bakteriyel plazmid, bitki virüs DNA'sı ve bitki organel DNA'sından oluşan üç tip vektör ile gen aktırılabilir.

Dikotiledon bitkilerde tümör oluşumuna neden olan gram negatif bakteri *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımı bitkilerin genetik transformasyonunda daha ucuz ve daha etkin transformasyon yapılabilmesi nedeniyle bu konuda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Gen transferinde doğal vektör olarak adlandırılan *A.tumefaciens* ilk kez transgenik tütün bitkilerinin daha sonra da transgenik dikotiledon bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılmıştır (Fraley ve ark., 1983; Zambryski ve ark., 1983).

Son yıllarda yapılan araştırmalarla tarımsal açıdan önemli karakterleri belirleyen genlerin izole edilip klonlanması ve bu genlerin çeşitli gen transferi yöntemleri ile bitkilere aktarılmasıyla elde edilen başarılar sonucunda amaca uygun bitkilerin geliştirilmesinde çok önemli aşamalar kaydedilmiştir (Tan ve ark., 1987; Tabei ve ark., 1998 ve Sharma ve ark., 2000). Genetik mühendisliği özellikle ekonomik açıdan önemli kültür bitkilerine istenilen özellikteki genlerin bitkinin asıl özelliğini değiştirmeyecek şekilde aktarılmasında yardımcı olmaktadır. Bu genlerin bitki hücrelerine aktarılacak bitki hücrelerinin totipotensi özelliğinden de yararlanılıp yeni bitkiler elde edilebilmektedir.

Gen transferi yapılırken bitkilerin değişik doku parçalarından yararlanılır ve her bitki türü için transformasyonda kullanılacak olan bitki eksplantı farklılık gösterir. Trulson ve ark. (1986) tarafından hıyar bitkisinde somatik embriyo oluşumu bildirildikten sonra bu konuda bir çok araştırmacı tarafından daha detaylı çalışmalar yapılmıştır. Somatik embriyo elde edilmesinde bitkinin değişik parçalarından örneğin, gerçek yaprak, kotiledon, bitki gövde parçası olan hipokotil parçaları ve diğer bitki parçaları bu amaç doğrultusunda denenmiştir (Trulson ve ark., 1986; Lou

ve ark., 1994; Raharjo ve ark., 1996; Kim ve ark., 2000). Ancak Lou ve Kako (1996)'nın çalışmaları sonucunda incelenen internodlardan başarılı bir şekilde bitki regenerasyonunun olmadığı belirtilmiştir. Genellikle yapılan çalışmalarda düşük oranda somatik embriyogenesinin yanı sıra yüksek sıklıkta normal olmayan embriyoların da geliştiği örneğin; bipolarite, embriyo ölümü veya gelişmesinde duraklama, çok fazla embriyogenik olmayan kallus oluşumu ve embriyonun vernalizasyonu hıyar bitkisinde yaygın olduğu belirtilmiştir (Lou ve ark., 1994). Buradan da anlaşıldığı gibi hıyar bitkisinde bitki parçalarını kullanılarak bitki regenerasyonu oldukça zordur. Bunun aksine bazı araştırmacılar kotiledon parçalarından sürgün regenerasyonu ve embriyogenesinin yüksek oranda olduğunu belirtmişlerdir (Cade ve ark., 1990; Chee ve ark., 1990).

Yukarıda sözü edilen sorunlar nedeniyle istenilen özelliklere sahip yeni bitkilerin elde edilmesinde gen transferi yöntemleri ümit var görülmektedir. Ancak transgenik bitkilerin elde edilmesi, genlerin konukçu hücrelerine aktarılması onların nükleer genoma yerleşmesi ile transforme olmuş hücrelerin seleksiyonu ve bitki regenerasyonu her bitki türü için farklı yöntem ve koşullara gereksinim göstermektedir. Bu nedenle üzerinde çalışılacak her bitki türü için transformasyon sisteminin kurulması gerekmektedir.

Yapılan bu çalışmada bu nedenle transformasyon için uygun doku parçaları belirlenmiş ve kanamisine dayanıklılık (*npt II*) ile β -glukuronidaz (GUS) genlerini içeren ve 17.4 kb büyüklüğündeki pGA482GG plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA101 ırkı ile *npt II* ve GUS genlerinin hıyar bitkisinin kotiledon ve hipokotil doku parçalarına aktarılması, transgenik bitkilerin elde edilmesi ve bu bitkilerin doğal koşullara adaptasyon olanakları araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**2.1. Hıyar Bitkisinde (*C. sativus* L.) Yapılan Bitki Regenerasyonu ile İlgili Çalışmalar**

Nadalska-Orczyk ve Malepszy (1989) yapmış oldukları bir çalışmada kendileme yoluyla elde edilen 3 hattı (B, G, S), F2 ve BC1 generasyonlarının yaprak parçalarını kullanarak bitki regenerasyon kapasitesini (RA) araştırmışlardır. Hatların farklı RA'ya sahip olduklarını ve RA'nın oransal olarak da değerinin % 10-19 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) / BA (6-Bezyl adenin) ve NAA (1-Naphthalene acetic acid) / BA (6-Bezyl adenin) sırasıyla 1.0 / 2.5 μ M ve 5.0 / 5.0 μ M içeren MS (Murashige and Skoog) ortamı üzerinde 3676'nın kotiledon ve mezofil protoplastlarının kültüre alınmasından 21 gün sonra mikrokalluslar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Mezofil protoplastlarından 5.0 / 5.0 μ M NAA / BA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındığında 12. günün sonunda mikrokallusların oluştuğu tespit edilmiştir. Sürgün veya somatik embriyoların düşük konsantrasyonda 2,4-D / BA veya NAA / BA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmış ve sadece hormon içermeyen MS ortamı üzerinde kültüre alınan eksplantlardan çok az sayıda bitki oluştuğu rapor edilmiştir.

Başka bir çalışmada ön deneme olarak iki hıyar bitkisi (*C.sativus* L.) varyetesinin tohumları kullanılarak yüksek oranda bitki regenerasyonu elde edebilmek için uygun günün tespit edildiği bir ön çalışma yapılmıştır. Bunu takibeden araştırmada Gy14A hattının tohumlarını kullanarak sürgün gelişimini teşvik eden ideal ortam belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla *in vitro* da geliştirilmiş olan kotiledon yaprakları tohum çimlenmesinden 2-4-6-8 ve 10 gün sonra kesmişler ve bitki doku parçalarını 10 farklı kombinasyonda NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alarak en iyi bitki regenerasyonunun olduğu uygun gün ve ortam tespit edilmeye çalışılmışlardır. Bu araştırma sonucunda en iyi sürgün gelişiminin 6 günlük iken kullanılan kotiledon yapraklardan elde edildiği bildirilmiştir.

Bu sonuç alındıktan sonra en iyi sürgün gelişimini sağlayan uygun kültür ortamı denemesinde petiolden gelişen sürgün sayısının NAA konsantrasyonuna bağlı olarak belirgin bir şekilde artış gösterdiği de bu araştırma sonucunda elde etmişlerdir.

Araştırmada kullanılan Gy14A hıyar çeşidinde 3 mg/l BAP (6-Benzyl amino pürine) hariç, diğer tüm konsantrasyonlarda toplam sürgün / petiole sayısının NAA'nın değişen konsantrasyonu ile belirgin olarak teşvik edildiği belirtilmiştir. Denenen konsantrasyonlar içerisinde en iyi sürgün gelişimi 0,3 mg/l BA içeren ve hiç NAA içermeyen ortam üzerinde kültüre alınan eksplantlardan elde edilmiş ve en iyi kök gelişiminin de BA içermeyen fakat NAA içeren ortamların üzerinde olduğu rapor edilmiştir (Cade ve ark., 1990).

Chee (1990) yapmış olduğu bir çalışmada hıyar bitkilerinin (*C. sativus* L. Cv. Poinsett 76) kotiledon ve hipokotil bitki doku parçalarından bitki regenerasyonu için temel bir prosedür oluşturmaya çalışmışlardır. Somatik embriyogenesinin 2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin, vitaminler ve MS tuzları içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındığında teşvik edildiği bildirilmiştir. 0.5 mg/l kinetin ve 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamı üzerinde embriyo gelişiminin başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Olgun somatik embriyoların 5 / 7 oranında tipik bipolar bir sütrüktür oluştuğu da çalışma sonucunda rapor edilmiştir. Büyüme regülatörü içermeyen MS ortamına aktarılan bütün embriyolardan morfolojik olarak normal bitkilerin geliştiği bildirilmiştir.

Msikita ve ark. (1990) yapmış oldukları bir çalışmada Burpless Hibridi hıyar çeşidi tohumunun kabuklarını soyarak embriyo ve kotiledonu iki parçaya ayırmışlardır. Tohum parçalarını steril ederek BA (2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 mg/l) ve NAA (0.0, 0.1, 0.2 ve 0.3 mg/l)'nın 16 farklı kombinasyonlarını içeren modifiye edilmiş MS ortam üzerinde kültüre almışlardır. Bütün kültür ortamları üzerinde embriyo parçaları üzerinde sürgünlerin oluştuğu ve 4 hafta içerisinde bitkiciklerin geliştiği, ancak bu bitkilerin çiçek oluşturmadığını kotiledon parçalarından adventif sürgünler geliştiği ve bu sürgünlerden denenen ortamların üzerinde erkek çiçeklerin oluştuğu ve çok az sayıda da dişi çiçeklerin oluştuğunu belirtmişlerdir. En iyi sürgün regenerasyonu ve dişi çiçek oluşumunun 2.0 mg/l BA ve 0.3 mg/l NAA içeren ortam üzerinde kültüre alınan doku parçalarından oluştuğunu tespit etmişlerdir. İn vitro da tozlanan dişi çiçeklerden içerisinde sadece bir tanesinden meyve ve bunun içerisinde tohum meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Nawab ve ark. (1991) yapmış oldukları bir çalışmada "Marketer", "Marketmore", "Wisconsin SMR-18", "Tablegreen", "Spotfree" ve "China" hıyar

bitkisi (*C. sativus* L.) çeşitleri tohumlarını 3 °C’de % 38 nisbi nemde 26 yıl boyunca muhafaza etmişlerdir. 13 yıldan fazla saklanan tohumlarda çimlenmenin olmadığı gözlenmiş ve 10 yıl saklanan tohum çeşitlerinden “Wisconsin SMR-18” hıyar çeşidi hariç diğer tüm tohumlarda % 80 çimlenme olduğunu bildirmişlerdir. 10 yıl saklanan çeşitlerin tohum kabukları soyulmuş ve kotiledon yaprakları 6 parçaya kesilmiştir. Eksplantlar BAP’in (0, 1, 2 ve 3 mg/l) ve NAA’nın (0, 0.1, 0.2 ve 0.3 mg/l) değişik konsantrasyonlarını içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır. Bütün çeşitler NAA ve 1mg/l BAP içeren MS ortamında bitki oluştururken BAP veya NAA’nın olmadığı ortamlarda bitki regenerasyonunun olmadığı rapor edilmiştir.

Nawab ve ark. (1991)’nın yapmış oldukları bir araştırmalarda Burpless Hibridi hıyar çeşidinin bitki doku parçalarını 4 mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA içeren modifiye edilmiş MS ortamı üzerinde kültüre almışlar ve sürgün regenerasyonundan sonra gelişen bitkicikleri 1.5 mg/l NAA içeren bu ortam üzerinde kültüre alarak köklendirmişlerdir. Kotiledonun sapa bağlanan kısmı ile uç kısmından regenere olan bitki sayısı arasında büyük bir fark olduğunu tespit etmişlerdir. Kotiledon 24 parçaya ayrıldığında sadece 2 sürgün gelişirken 6 parçaya ayrıldığında % 47 oranında bir artış ile 54 sürgünün regenere olduğu tespit edilmiştir. Kotiledon 4 parçaya ayrıldığında 17 bitki, 2 parçaya ayrıldığında ise 28 bitki elde edilmiştir. Bunun yanında kotiledonlar tüm olarak kültüre alındığında çok az sayıda sürgün gelişiminin olduğu bildirilmiştir.

Debeaujan ve Branchard (1993) tarafından Cucurbitaceae familyasında yapılan bir denemede bitkinin değişik doku ve hücrelerinden bitki regenerasyonu kapasitesini araştırmışlardır. Yapılan araştırma sonucunda bitkinin kotiledon ve hipokotil parçaları ile yapılan denemelerde başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Yaptıkları bazı deneme sonuçlarında da protoplastların kültüre alınması ile gelişen somatik embriyolarda anormal gelişmelerin olduğu rapor edilmiştir.

Hooymans ve ark. (1994) hıyar bitkisinin kotiledonları taşıyan hipokotiller eksplantlarından yüksek oranda bitki regenerasyonu elde edebilmek için kullanılabilecek uygun bir metod oluşturmak amacıyla araştırma yapmışlardır. Optimum sayıda sürgün oluşması için gereken toplam sürenin 6 hafta olduğunu belirtmişlerdir. 3-5 günlük iken kullanılan fidelerin kotiledonlarından oluşan sürgün

sayısının diğer uygulamalara oranla % 100 arttığı gözlenmiştir. Regenere olan bir çok bitki polyploidi/mitoploid ve anormal morfolojiye sahip olduğu belirtilmiştir. Fide gelişimi boyunca (3-13 gün) kotiledon hücrelerindeki DNA'nın yapısında değişiklik olduğu ve bu değişiklik nedeniyle de bitki regenerasyon kapasitesinde farklılıklar oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Lou ve Kako (1994) yapmış oldukları bir araştırmada 7 hıyar (*C. sativus* L.) çeşidinden doku kültürü tekniklerinden faydalanılarak kotiledon, genç yaprak, ilk yaprak ve internodların embriyogenesis oluşturma oranında belirgin olarak farklılıklar saptanmış ve Fushinarimidari çeşidinin hem kotiledonlarından hemde ilk yapraklarından yapılan kültürlerde yüksek oranda embriyolar elde edildiği tespit edilmiştir. Kotiledon ve ilk yapraklardan internodlara göre daha çok embriyogenik kallus oluştuğu ve 'Aonaya F1' çeşidinin internodlarından da somatik embriyolar geliştiği bildirilmiştir. Fushinarimidari kotiledon doku parçalarından sürgün geliştirme ortamındaki sakkaroz seviyesinin yüksek olması (% 6-9) embriyogenik kallus oluşumunu % 90 oranında teşvik ettiği belirlenmiştir. Kültür ortamında % 12 seviyesinde şeker bulunmasının kallus oluşumu ve gelişmesini engellediği tespit edilmiştir. Somatik embriyoları % 0.5 aktif kömür içeren bazal sıvı MS ortamı üzerinde kültüre alarak sağlıklı bitkicikler oluşturduktan sonra gelişen bitkileri % 1 sakkaroz içeren yarı katı ortama aktardıklarını rapor etmişlerdir.

Misra ve Bhatnagar (1995) tarafından yapılan bir çalışmada hıyar bitkisi (*C. sativus* cv. Japanese Long Green) yaprak parçalarından direk sürgün gelişimi için uygulanabilecek etkili bir metod oluşturmak amaçlanmıştır. Bu amaçla 14 – 21 - 28 ve 35 günlük fidelerin yapraklarını üç farklı ölçüde (5-15 mm) kesmiş ve farklı kombinasyonlarda bitki büyüme regülatörü içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Bunlardan en ideal gelişmeyi 3.0 μ M BA içeren 14 günlük yaprak parçasından (5mm) elde edilmiştir. Hem yaş hem de bitki ölçüsünün kültürlerdeki sürgün regenerasyonu oranında ters orantılı olarak etki ettiği tespit edilmiştir. Sürgün gelişim ortamı üzerinde gelişen sürgünler basal ortamına (BM) aktararak daha sonra kök gelişimi için BM veya BM + 0.1 μ M IBA (Indole-3-butyric acid) içeren ortama almışlardır. Köklenen bitkiler plastik saksılara aktararak doğaya adaptasyonları sağlanmıştır.

Burza ve Malepszy (1995)'nin yapmış oldukları bir araştırma sonucunda *C. sativus* ve *C. anguria*'nın yaprak eksplantlarından bitki regenerasyonu için etkili ve hızlı bir teknik oluşturmak için çalışma yapmışlardır. Genç yapraklardan bitki regenerasyon oranında kültür ortamlarının içerisindeki NO_3NH_4 oranı, eksplant büyüklüğü ve büyüme regülatörlerinin oranı ve kombinasyonlarının etkili olduğunu belirtmişlerdir. Optimum büyüme koşulları altında eksplantlar kültüre alındıktan 4 hafta sonra eksplantlarda % 10-100 arasında regenerasyon elde edildiği bildirilmiştir. 6-7 hafta sonra yüksek oranda sürgün gelişimi gözlenmiş ve bitkiler köklendikten sonra toprağa aktarılarak gelişen bitkilerin bir çoğunun yaşadığını rapor etmişlerdir. *C. sativus* cv. Bonszczagowski çeşidinde kullanılan tek yapraktan 135 bitkiciğin regenere olduğu belirtilmiştir. Seraya aktarılan bütün bitkiler morfolojik ve fizyolojik olarak normal olarak geliştiği, çiçek açtığı ve meyve oluşturduğu gözlenmiştir. R0 analizinde bitkilerde genetik varyasyonun görülmediği, R1'de iki yeni fenotiplerin oluştuğu fakat bu varyasyonun R2'de gözlenmediğini bildirmişlerdir. Bu metodu homogeneous hıyar bitkileri üretiminde tavsiye edilebileceğini rapor etmişlerdir.

Kuijpers ve ark. (1996) yapmış oldukları bir çalışmada hıyar bitkisinin (*C. sativus* L.) yaprak parçalarını $4.5 \mu\text{M}$ bezylaminopurine (BA) içeren ortamda kültüre almışlar ve ilk kültürde değişik periyodlar ve farklı düzeylerde 2,4-D, picloram veya naphtalin asetik asit (NAA) bulunan ortamda kültüre almışlar ve daha sonra standart ortama aktarmışlardır.

Standart ortamda kültüre alınan eksplantlardan % 10 oranından daha az embriyogenik kallus oluşumu gözleendiği belirtilmiştir. Başlangıçta uygulanan picloram, NAA veya 2,4-D'nin düşük konsantrasyonunu içeren ($1.4 \mu\text{M}$) ortamlarda hiç embriyogenik kallus oluşumunun olmadığını rapor etmişlerdir.

Embriyogenik kallus oluşumunun ilk dönem boyunca (10 gün) 2,4-D konsantrasyonu $14 \mu\text{M}$ olduğu zaman % 40 oranında arttığı bildirilmiştir. Eksplantların $14 \mu\text{M}$ 2,4-D içeren ortamda daha uzun süre kültüre alınması durumunda daha düşük embriyogenik kallus oluşumuna neden olduğu rapor edilmiştir.

Reichert ve Zimmerman (1996) yapmış oldukları bir çalışmada 14 adet ticari hıyar çeşidinin kültür ortamı üzerindeki somatik embriyogenesis ve sürgün

organogenesisi oluşturma kapasitesini araştırmışlardır. Bu araştırmada için olgun kuru tohumlardan ve 7 günlük fideciklerden aldıkları kotiledon yapraklarını karşılaştırmışlardır. Yapılan incelemeler sonucunda araştırılan yedi hıyar çeşidinde (Burpless F1 Hibrit, Burpee Hibrit II, Cross Country, Picklebush, Sweet Delight, Tasty Green ve Yard Long) regenerasyon yeteneğinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Somatik embriyogenesis regenerasyonun elde edilmesinde Picklebush çeşidinin diğer çeşitlerden daha iyi sonuç verdiği, bunun yanında Burpless F1inde hibritinin sürgün gelişiminde en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir. Bahsedilen regenerasyon çeşidinde gelişen basamakta kotiledon parçalarının özelliğinin regenerasyon yeteneğinde etkili olduğu rapor edilmiştir.

Lou ve ark. (1996) yapmış oldukları bir çalışmada *in vitro* da geliştirilen hıyar bitkisinin kotiledon parçalarından oluşacak morfogenez üzerine sakkaroz seviyesinin etkisini araştırmışlardır. Hıyar kotiledon parçalarını ilk olarak (farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren modifiye edilmiş MS ortamı ve 131mM sakkaroz içeren ortam üzerinde kültüre alındıklarında 8 µM konsantrasyonunda 2,4-D içeren ortamın en fazla sayıda somatik embriyo oluşumunun gerçekleştiğini tespit edilmiştir. Bunun yanında yüksek seviyede (263mM) sakkaroz ve 1 - 16 µM 2,4-D içeren doku kültürü ortamı üzerinde kültüre alınan bitki parçalarından somatik embriyo oluşturma sıklığını teşvik ettiğini bildirmişlerdir (% 82-95). Normal embriyoların gelişmesi 4-8 µM 2,4-D içeren ortamda elde edilmiş ve diğer çalışmalarda yüksek seviyede sakkaroz bulunan kültür ortamlarında morfogenez regenerasyonun IAA ile teşvik olduğu tespit edilmiştir. Verilen mevcut IAA konsantrasyonu (57,1 µM) ve 131 mM sakkaroz ile sadece adventif sürgün oluşumu gözlemlendiği, halbuki 263 mM sakkaroz hem sürgün gelişimini hemde somatik embriyogenesis'i teşvik ettiği gözlenmiştir. Artan sakkaroz konsantrasyonu (394 mM) sadece somatik embriyogenesis'i teşvik ettiği ve % 70 oranında somatik embriyo oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir. Buda göstermiştir ki IAA ile kombine edilecek yüksek sakkaroz konsantrasyonu hıyarda somatik embriyo teşvikinde kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Mohiuddin ve ark. (1997) yapmış oldukları bir araştırmada 5 hıyar (*C. sativus* L.) çeşidini besi ortamı üzerinde kültüre alındığında ortama gümüş nitrat ($AgNO_3$)

ilavesinin hipokotil, distal ve proximal kotiledon parçalarından sürgün gelişimi üzerine olan etkisi incelemişlerdir. Araştırma esnasında hıyar çeşitlerinde distal kotiledon ve hipokotillerde çok az bir sürgün gelişimi gözlenmiştir. Kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda AgNO_3 ilavesinin (10.30 ve 50 μM) Suvo Long kültüvarı hariç distal kotiledonlarda sürgün gelişimini arttırdığı ve etkin olarak sürgün gelişimini bütün hıyar çeşitlerinde proximal kotiledon ve hipokotil bitki doku parçalarında eksplant başına sürgün sayısında artışa neden olduğu rapor edilmiştir.

Bir başka araştırmada kullanılan eksplant kaynağının embriyogenik kallus formasyonunda somatik embriyogenesisde ve bitki regenerasyonundaki etkisini *C. sativus* cv. Poinsett 76 çeşidi için araştırılmıştır. Kallus oluşumu ve gelişmesi bütün gövde ve kotiledon parçalarından oluştuğunu fakat gövde parçalarından embriyogenik kallus oluşumunda başarısız olduğu belirtilmiştir. En iyi sonucun kotiledonların ilk parçalarından % 56 oranında embriyogenik kallus formasyonu ve 5 adet bitki regenerasyonu ile elde edildiği rapor edilmiştir (Guedes ve Jennings, 1999).

Kim ve ark. (2000) yapmış oldukları bir çalışmada hıyar bitkilerinin (*C. sativus*) kotiledonlarını taşıyan hipokotil parçalarını kullanarak fazla sayıda sürgün oluşumunu teşvik eden uygun bir metod bulmak için araştırma yapmışlardır. En fazla sayıda adventif sürgün gelişimi 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan hıyar bitkilerinin hipokotil parçaları üzerinden elde edildiği bildirilmiştir. Kotiledon ölçüsünün ve hipokotil uzunluğunun sürgün oluşumu üzerindeki etkilerini karşılaştırmak amacıyla çimlendikten 3-5 gün sonra elde edilen bitki parçalarını bakteri ile transforme ederek elde ettiği bitkilerden aldıkları kısa hipokotil parçalarından (2 mm) ve 1-2 parçaya bölünmüş kotiledonlardan fazla sayıda (% 90-80) adventif sürgün gelişiminin olduğunu tespit etmişlerdir. Buna rağmen uzun hipokotiledon parçalarından ve 2'den fazla parçaya bölünmüş kotiledonlardan az sayıda sürgün oluştuğunu bildirmişlerdir. Kotiledon taşıyan hipokotillerden regene olan adventif sürgünler kesilerek 1 mg/l IAA taşıyan kök ortamlarına aktarmışlar ve köklenen bitkiciklerden normal bitkiler geliştiği rapor edilmiştir.

Ondrej ve ark. (2000) yapmış oldukları bir araştırmada *Cucumis* türlerinden (*C. sativus*, *C. melo*, *C. metuliferus*, *C. zeyheri*) embriyolar elde etmeyi çalışmışlardır. Kendine döllendikten bir, iki ve üç hafta sonra olgunlaşmamış meyvelerin

embriyolarını kesmişler ve bu embriyoları *in vitro* kültürde geliştirmişlerdir. *Cucumis* spp. için en uygun ortamın düşük seviyede şeker, büyüme regülatörleri ve ışığın var olduğu ortamlar olduğunu bildirmişlerdir. *C. sativus* ve *C. melo*'da kendine döllemeden iki hafta sonra alınan olgunlaşmamış embriyolardan bitki regenerere olduğunu, fakat bunun yanında diğer türler ile yapılan denemelerde üç hafta sonra alınan embriyolardan bitki gelişimi gözlenmediği belirtilmiştir. Genellikle, *C. sativus* ve *C. melo*'nun embriyo kültürleri ile diğer *Cucumis* spp.'den daha başarılı olduğu ve *C. sativus*'da kendine döllemeden bir hafta sonra alınan embriyolardan da başarılı sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir.

2.2. *Agrobacterium* Aracılığı ile Hıyar Bitkisine (*C. sativus* L.) Gen Transferi ile İlgili Çalışmalar

Trulson ve ark. (1986) yapmış oldukları bir çalışmada hıyar bitkilerinin (*C. sativus* L. cv. "Straight Eight") hipokotil doku parçalarını *A. rhizogenes*'in pARC8 plazmidini taşıyan ırkı ile ko-kültüre alarak transgenik bitkiler elde etmek için araştırmalar yapmışlardır. Bitkiye aktarılan DNA üzerindeki neomycin phosphotranferase geni aracılığı (*npt II*) ile Southern blot analizi yapmışlar ve transgenik olan bitkileri tespit etmişlerdir. Fakat bu test sonucunda aktarılmak istenen genin transgenik olduğu düşünülen bitkilerden sadece bazılarında bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Trulson ve ark. (1986) yapmış oldukları bir araştırmada hıyar bitkisinin hipokotil parçalarını *A. rhizogenesis*'in pARC8 vektörünü taşıyan ırkı ile transforme ederek elde ettikleri transgenik hıyar bitkilerinde (*C. sativus* L., cv. "Straight Eight") kök gelişimini gözlemişlerdir. Enzyme Neomycin Phosphotranferase II (*npt II*) geni taşıyan vektörün DNA'sını bitkiye aktarmışlar ve bu aktarılan genin bitki hücrelerini kanamisine karşı dayanıklı kıldığını belirtmişlerdir. Elde edilen transgenik bitkiler normal görünüşlü ve Neomycin Phosphotranferase II için pozitif sonuç verdiği tespit etmişler ve vektör DNA'yı taşıyan transgenik bitkileri Southern blot analizi ile test etmişlerdir ancak transgenik olduğu düşünülen bitkilerden sadece bazılarının Ri-plazmidin DNA'sını taşıdığı rapor edilmiştir.

Chee ve Slightom (1991) yapmış oldukları bir çalışmada hıyar bitkisinin (*C. sativus* L. cv. Poinsett 76) kotiledon yapraklarını disarmed *Agrobacterium*'un C582707'nin pGA482GG/cpCMV19 binary vektör plazmidini taşıyan ırkı ile transforme etmişlerdir. Araştırmada kullandıkları bakterinin T-DNA bölgesinde neomycine phosphotransferase II (*npt II*), β -glukorinodase (GUS) ve hıyar mozaik virüsü protein kılıfını C(CMV-C) içerdiğini bildirmişlerdir. Transformasyondan sonra kotiledon yaprak parçalarını 100 mg/l kanamisin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmış ve bu ortam üzerinde transgenik olduğu varsayılan embriyogenik kalluslardan oluşan embriyoların geliştiğini ve bunlardan transgenik bitkiler oluştuğunu bildirilmiştir. Bütün Ro transforme olmuş bitkilerinde morfolojik olarak normal gelişmenin gözlemlendiğini ve *npt II* için pozitif sonuçlar verdikleri tespit etmişlerdir. Southern blot analizi ile *npt II* GUS ve CMV-C protein kılıfının var olduğunu ispat etmişlerdir. Bu araştırmalar sonucunda *Agrobacterium* aracılığı ile gen transferi sistemi ve somatik embriyogenesis oluşumunda bu yöntem Cucurbitacea familyasında transgenik bitkilerin üretimi için etkili bir yöntem olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Bir araştırmada hıyar bitkilerinin kotiledon yaprakları *A. tumefaciens*'in GG/cpCMV19 binary vektör plazmidini taşıyan pGA482 ırkı ile gen transferi yapmışlardır. T-DNA bölgesinde binary vektör bitkilere aktarılabilen neomycin phosphotransferaz (*npt II*), β -glucuronidase (GUS) ve hıyar mozaik virüsünün protein kılıfını (CMV-C) taşıdığı bildirilmiştir. Transformasyondan sonra kotiledon yaprak parçalarını 100 mg/l kanamisin içeren MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Bu ortam üzerinde transgenik olduğu varsayılan embriyogenik kallusların oluştuğunu ve bunlardan bitki regenerasyonunun olduğunu gözlemlemişlerdir. Oluşan bütün bitkileri *npt II* açısından ile test etmişler ve gelişen bitkilerin morfolojik olarak normal oldukları bildirmişlerdir. Daha sonra olası transgenik bitkileri southern blot analizi ile seçmişler ve enzyme-linked immunosorbent analizi ve Western blot analizi ile test etmişlerdir (Chee ve ark.,1991).

Nishibayashi ve ark. (1996) yapmış oldukları bir çalışmada transgenik hıyar (*C. sativus* L) bitkisi elde etmek için hipokotil eksplantlarını *A. tumefaciens*'in NOS-

npt II, CaMV 35S-I-gus ve CaMV 35S-hph genlerini içeren ırkı ile tranforme ederek başarılı bir yöntem geliştirdiklerini rapor etmişlerdir. Acetosyringone ilavesi yapılan ortamlar üzerinde hipokotil doku parçalarının *A. tumefaciens* ile 5 gün boyunca ko-kültüre alındığı zaman transformasyon sıklığının arttığını bildirmişlerdir. Transgenik doku parçaları 50-1000 mg/l kanamisin içeren ortamdan 20-30 mg/l hygromicineB içeren ortamda daha etkili bir şekilde seçildiği bildirilmişlerdir. 4-6 hafta sonra sürgün regenerasyonunun olduğunu 12-21 hafta sonra da kök gelişiminin gözlemlendiği rapor etmişlerdir.

Punja ve Raharjo (1996) yapmış oldukları bir çalışmada Endeavor çeşidi üç hıyar bitkisi (*C. sativus* L.) hattına petunya, tütün ve soyadan elde etmiş oldukları kitinase genini *A. tumefaciens*'i kullanarak aktarmış ve *Alternaria cucumerina*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lagenarium* ve *Rhizoctonia solani* ile inokule edilmiş transgenik olmayan bitkiler ile transgenik bitkilerin tepkileri arasındaki farkları karşılaştırmışlardır. Her çalışmada da bitkilerin *in vitro* da yapraklarının inokule edilmesinde ve hastalıkların gelişmesinde transgenik olan ve transgenik olmayan bitkiler arasında bir fark bulunamadığını bildirmişlerdir. İki bitkiden izole edilmiş kitinase geni ile tranforme edilmiş havuç bitkisinin (*Dacus carota*) Nanco ve Golden State çeşitlerinin *A. radicina*, *B. cinerea*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* ve *Thielaviopsis basicola* patojenleri ile inokule edildikten sonra bitkilerde oluşan değişimleri gözlemlemiştir. Tütün kitinase genini içeren transgenik bitkilerin *B. cinerea*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* ile inokulasyonundan sonra lezyonların geliştiği son çapı ve gelişme oranı inokulasyondan 7 gün sonra belirgin olarak arttığı fakat petunya kitinase geninin aktarıldığı bitkilerde bunların gözlenmediğini bildirmişlerdir. Transgenik bitkilerde *A. radicina* veya *T. basicola*'ya karşı dayanıklılık arasında fark edilebilir bir değişiklik gözlenmediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçların ışığı altında havuç bitkisine aktarılan kitinase geni adı geçen üç fungal patojene karşı dayanıklılığı arttırdığını rapor etmişlerdir.

Raharjo ve ark. (1996) yapmış oldukları bir çalışmada petunya, tütün ve soyadan izole edilen kitinase genlerini içeren *A. tumefaciens*'in üç ırkı ile hıyar bitkisinin Endeavor çeşidine aktararak transgenik hıyar bitkisi elde etmişlerdir. Petiole bitki parçalarını bakteri süspansiyonu ile (10^8 hücre ml^{-1}) 48-96 saat ko-

kültüre alarak 5 µM 2,4-D , BAP , 50 mg/l kanamisin ve 500 mg/l karbensilin içeren MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır.

Embriyogenik kallus oluşturma oranının kullanılan *A. tumefaciens* vektörün ırklarına ve transformasyon süresinin uzunluğuna bağlı olarak % 0-12 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. En yüksek oranın kullanılan leucinopin ırkı ile petunya'nın asidik kitinase geninin aktarıldığı bildirmişlerdir. Kanamisine dayanıklı embriyogenik hücre hatlarının çoğaltmak için 1.0/1.0 µM 2,4-D/BA, 50mg/l kanamisin içeren ortamda kültüre alarak elde etmişlerdir. 1.0/1.0 µM NAA/BA ve 50mg/l kanamisin içeren sıvı MS ortamı üzerinde gelişen hücre agregatları gelişmesini tamamlayınca farklı ortama almışlardır. Leusinopine ırkı ile ve diğer üç vektör ile transformasyonu yapılan transgenik kallus ve bitkileri southern blot analizi ve PCR analizi ile test ederek *npt II* genin bitkilere aktarıldığını kanıtlanmışlardır. Western analizi ile de aktarılmış olan asidik kitinase geninin bitkilerde varlığını tespit etmişlerdir.

Tabai ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada çeltik bitkisinden izole edilen kitinase genini (Rcc2) *Agrobacterium* aracılığı ile hıyar (*C. sativus* L.) bitkisine transfer etmişlerdir. Transgenik olduğu varsayılan 200 sürgünün regenerere olduğunu ve bu sürgünlerin 100 mg/l kanamisin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındıklarını belirtmişlerdir. Gelişen 60 sürgünde aktarılan Rcc2 geninin integre olduğunu kanıtlamak için testler yapmışlar ve bu genlerin varlığını kanıtlamışlardır. Test edilen bu bitkilerden 20 tane bitkinin gri küf (*B. cinerea*) ile infekte edildiğinde 15 tane bitkinin kontrole göre daha fazla dayanıklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Elde edilen transgenik hıyar bitkilerinden 3'ünü *B.cinerea*'ya karşı dayanıklılık gösterdiğini (CR29, CR32 ve CR 33) ve bu nedenle hastalığın yayılmasının bu bitkilerde tamamen durduğunu belirlemişlerdir. Gen aktarımı yapılmış dayanıklı transgenik bitkiler (CR32 ve CR33) kontrol bitkilerle karşılaştırıldığında dayanıklı bitkiler ile kontrol bitkiler arasında hastalıklara karşı dayanıklılık açısından farklılıklar olduğunu belirlemişlerdir. CR33 çeşidinde patojenin apresorium oluşturmaması ve hiflerin penetrasyonunu durdurduğunu CR32'nin ise hiflerinin penetrasyonuna izin verirken hastalığın gelişmesini engellediğini belirlemişlerdir. Ayrıca CR32'nin ebeveynleri 3:1 (dayanıklı:duyarlı) oranında bir fark gösterdiği

kurşuni küfe karşı dayanıklılığın tamamen genetik olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen bu dayanıklı hıyar bitki çeşitlerinin hastalıklara dayanıklı bitkiler elde edilmesinde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Ganapothi ve Perl-Treves (2000) tarafından yapılan bir araştırmada hıyar bitkisine (*C. sativus* cv. Poinsett 76) *A. tumefaciens* aracılığı ile gen aktararak kotiledonlardan direk organogenesis olanaklarını incelemişlerdir. Düşük konsantrasyondaki BAP seviyesinde kültüre alınan kotiledonların sapa bağlanan kısmında sürgün ve kök gelişiminin olduğunu tespit etmişlerdir. Hıyar kotiledon parçaları *Agrobacterium*'un pME 524 (pGA 492 Gr-Bar (-)) plazmidini taşıyan EHA 105 ırkı ile inokule etmişlerdir. T-DNA bölgesi neomycin phosphotransferase II (*npt-II*), β -glukorinodase (*uidA*) ve bar genlerini içerdiği bildirilmiştir. Transforme olan sürgünler 6 mg/l PPT ile etkili olarak seçmişler ve 4 haftada sürgün regenerasyonu elde ederek acetosyringone kullanımının kotiledon eksplantlarında transformasyon sıklığını arttırdığını rapor etmişlerdir.

2.3. Diğer *Cucumis* spp. Türlerinde Yapılan Bitki Regenerasyonu ve Gen Transferi ile İlgili Çalışmalar

Fang ve Grumet (1990) yapmış oldukları bir araştırmada transgenik kavun bitkisi (*C. melo*) elde etmek için *A. tumefaciens*'in kanamisinine dayanıklılık genini içeren LBA 4404 ırkı ile kotiledon bitki parçalarını ko-kültüre alarak transformasyonda etkili bir yöntem tespit etmeye çalışmışlardır. Bitki parçalarını bakteri ile 3 gün süre ile ko-kültüre alarak daha sonra transforme olmuş dokuları seçmek için kanamisin içeren sürgün regenerasyon ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Kültüre aldıktan 3-5 hafta sonra bitki eksplantları üzerinde sürgün oluşumu gözlenmiş ve gelişen sürgünler kesilerek toprağa aktarılmadan önce kanamisin içeren kök gelişim ortamında kültüre almışlardır. Üç ay sonra morfolojik olarak normal bitkiciklerin geliştiği bildirilmiştir. *npt II* geni taşıyan regenere olmuş bitkiler Southern blot analizi yapılmışlar ve testlenen bitkilerden % 85'inde bu genin varlığı tespit edilmiştir. Dot blot analizi ile diğer generasyonlardaki genler transgenik

bitkilerde yaprak kallus araştırması ile test etmişler ve transformasyon etkinliğini etkileyen faktörleri araştırmışlardır.

Chee (1991) yapmış olduğu bir araştırmada kavun (*C. melo* cv. Topmark) bitkisinin kotiledon eksplantlarından regenerasyon için etkili olan bir metod araştırması yapmışlardır. En iyi bitki regenerasyonunun olduğu kültür ortamının 1 mg/l BA, vitamin ve MS tuzlarını içeren ortam olduğunu tespit etmişler ve 0.05 mg/l BA içeren MS ortamında kültüre alınan eksplantlardan da vegetatif sürgün geliştiğini bildirmişlerdir. Gelişen sürgünler 0.01 mg/l NAA içeren MS ortamında köklendirilerek toprağa aktarılmış ve morfolojik olarak normal bitkiciklerin geliştiği rapor edilmiştir.

Srivastava ve ark. (1991) tarafından yapılan bir araştırmada *C. vulgaris* [*C. lanatus*] cv. Melitopol'skii'nin kotiledon parçalarını *A. tumefaciens*'in pGV3850 plazmidini taşıyan ırkı ile seleksiyon ortamında kültüre almadan önce transforme ederek bitki regenerasyonunu gözlemişlerdir. *A. rhizogenes*'in pAK320 Neo + pRI15834 vektörünü taşıyan ırkı ile hipokotil parçaları ko-kültüre alınarak daha sonra selektive MS ortamı üzerinde kalluslardan köklerin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Kallusların kanamisin içeren bitki regenerasyonu için kullanılan regenerasyon ortamı üzerinde Neomycin Phosphotranferase II'ye pozitif tepki verdiği bildirilmiştir. Fenotipik ve enzimatik çalışmalar göstermiştir ki kimerik kanamisin resistanslık geni kotiledon disklerinden regenere olan bitkilere aktarıldığı tespit edilmiştir.

Dong ve Jia (1991) yapmış oldukları bir çalışmada 8 adet farklı karpuz (*C. lanatus*) çeşidinin değişik yaşlardaki kotiledon yapraklarının farklı kombinasyonlarda hormon içeren MS ortamında kültüre almışlardır. En fazla sürgün regenerasyon oranı (% 92-60) 5 mg/l BA ve 0.5 mg/l IAA içeren MS ortamında tohumların çimlenmesinden 5 gün sonra kullanılan kotiledonlar kullanıldığı zaman elde edildiğini tespit etmişlerdir. 0.2 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültüre alınan bitki doku parçalarından eksplant başına çeşide bağlı olarak 5-10 sürgün geliştiği gözlenmiştir. 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamında gelişen sürgünlerden kök gelişimi teşvik edilerek gelişen sürgünlerin kök oluşturmalarını sağlamışlardır. Zeatin içeren

ortamda sürgün gelişiminin BA içeren kültür ortamındaki kadar etkili olduğu, ancak kinetin veya isopentenyladenine içeren ortamdan daha etkili olduğu rapor edilmiştir.

Comptom ve Gray (1993) yapmış oldukları bir çalışmada BA içeren MS ortamında kotiledon yaprakları kültüre alarak karpuz bitkisinde (*C. lanatus* L.) adventif sürgün gelişimini gözlemlemişlerdir. Ön çalışmalar sonucundaki bulgular göstermiştir ki, BA (0, 5,10 ve 20µM) ve IAA (0, 0.5 ve 5µM) uygulamasının bitkilerde sürgün gelişimi için gerekli olduğu fakat konsantrasyonunun çok önemli olmadığı bildirilmiştir. Kültür ortamına BA ve IAA ilavesinin kallus oluşumunu arttırdığı ve sürgün gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir. Ancak en iyi sonucun % 30 > olduğu zaman elde edildiği tespit edilmiştir. Bitki doku parçalarından gelişen sürgün sayısının oranı kotiledonlar iki parçaya ayrıldığında (%39) veya kesilme yerine bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Kotiledonlar sapa bağlandığı yerden kesilirse % 43 oranında sürgün gelişimi gözlemlendiği, kotiledon boydan boya 4 parçaya ayrıldığında düşük oranda (% 16) sürgün gelişimi olduğu tespit edilmiştir. Kotiledonların uç kısmının sürgün gelişiminde başarısız olduğu belirtilmiştir. Sürgün gelişimi genç fideler kullanıldığında daha az gelişirken tohum çimlenmesinden 5 gün sonra kullanılan eksplantlardan ortalama gelişen sürgün sayısı parça başına Minilee'de % 90 <, S86NE'de % 64 ve JubileeII'de % 50 arasında olduğu bildirilmiştir. 10, 15 veya 20 günlük bitkiler kullanıldığında daha az sürgün gelişimini gözlemlemişlerdir. Sürgün gelişimde etkili olan bir çok sitokininin optimum koşullarda daha etkili olduğu tespit edilmiştir. 50-10µM BA uygulaması eksplant başına gelişen sürgün oranını ve eksplant başına sürgün sayısını kinetin (20µM) ve thidiazuron (0,1µM) uygulamasından yaklaşık 2-4 kez daha fazla arttırdığı bildirilmiştir. Eksplat başına regenere olan sürgün sayısı ve sürgün oranı diploid bitkilerde triploid ve tetraploid hatlardan daha fazla olduğu rapor edilmiştir.

Gray ve ark.(1993) yapmış oldukları bir çalışmada, kavun bitkisinin (*C.melo* L.) 'Male Sterile A147' kültivarını kullanarak yüksek sıklıkta somatik embriyogenesis için uygun olanakları araştırmışlardır. Ortadan ikiye kesilen kotiledonlar oksinlerden 2,4-D ve sitokininlerden BA, TDZ, Kin veya 2 İP içeren ebiryo gelişim ortamında (EI) kültüre almışlardır. 5 mg/l 2,4-D ve 0.1 mg/l TDZ içeren ortam üzerinde kültüre alınan eksplantlardan % 49 oranında bitki gelişimi

olduğu gözlemler ve eksplant başına 3.3 somatik embryo elde edildiği bildirilmiştir. 1-2 hafta EI ortamında kültüre alınan kotiledonlardan 3-4 hafta kültüre alınmasına göre daha iyi sonuç elde edileceği bildirilmiştir. Eksplantların 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodu takiben bir hafta karanlık periyotta eksplantların kültüre alınması 2, 2 haftadan daha fazla karanlıkta bırakmaktan veya hiç karanlıkta bırakmamaktan daha fazla (% 26) elde edildiği belirtilmiştir. Fakat gözlemler sonucunda eksplant başına 1-2 hafta karanlıkta bırakma ile aynı sayıda embriyo elde edildiği bildirilmiştir. EI ve ED ortamındaki sakkaroz seviyesinin kullanılan eksplantlardan embriyo oluşması ve gelişmesinde belirgin olarak etkili olduğu belirtilmiştir. EI ortamında % 3 sakkaroz bulunması % 1.5 veya % 6 bulunmasından daha fazla embriyo oluşumunu teşvik ettiği tespit edilmiştir. Buna rağmen % 3 sakkaroz içeren EI ortamı uygulamaları % 3 veya % 6 sakkaroz içeren ED ortamına oranla belirgin olarak eksplant başına diğer uygulamalardan daha fazla embriyo oluşturduğu bildirilmiştir (8, 5 ve 11,9).

Choi ve ark. (1994) yapmış oldukları bir çalışmada karpuz bitkisinden (*C. lanatus*) elde edilen kotiledon yapraklarının uç kısımlarını değişik büyüklüklerde keserek eksplantları 6 mg/l BAP içeren basal MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Işığın sürgün gelişiminde önemli olduğunu tespit etmişlerdir. Transform olmuş bitkileri elde etmek için, kotiledon bitki parçalarını *A. tumefaciens*'in CaMV 35S promotor- β -glucuronidase (GUS) genini ve NOS promotor-neomycin phosphotransferase genini taşıyan LBA 4404 ırkı ile 48 saat 1 mg/l BAP ve 200 μ M β -hydroxyacetosyringone içeren MS ortamı üzerinde ko-kültüre alarak gen transferi yapmışlardır. Ko-kültüre aldıktan 48 saat sonra eksplantları 1 mg/l BAP, 250 mg/l karbensilin ve 100 mg/l kanamisin içeren MS ortamında aydınlık koşullarda kültüre alınmış ve 4 hafta sonra adventif sürgünler oluştuğunu gözlenmişlerdir. Gelişen bu sürgünlere histokimyasal GUS testi yapılmış ve sonuç olarak genç yaprakların yaklaşık olarak % 16 oranında pozitif tepki verdiği tespit edilmiştir. Tekrar 1 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan kotiledon yaprakları 5 gün içerisinde *Agrobacterium* ile transform olmuş hücreler değişikliğe uğramış ve bu GUS analizi sonucu pozitif çıkan rejenere bitkilerde Southern blot analizi ile de test etmişlerdir.

Valles ve Lasa (1994) yapmış oldukları bir çalışmada kavun bitkisinin (*C. melo* L., cv. Amarillo Oro) kotiledon eksplantlarını *A. tumefaciens*'in pBI121.1 plazmidini taşıyan LBA4404 ırkı ile gen transferi yapmışlardır. T-DNA bölgesi kanamisinine dayanıklılık geni olan Nopaline sentetase/neomycin phospho transferase II (*npt II*) kimerik genini ve Karnıbahar Mozaik Virüs 35S/ β -glucuronidase (GUS) kimerik genini taşımakta olduğunu belirtmişlerdir. Transformasyondan sonra kotiledon parçaları 100 mg/l kanamisin içeren gelişme ortamına aktarılmış ve transgenik olduğu varsayılan sürgünlerin gelişimini takiben morfolojik olarak normal bitkilerin geliştiği bildirilmiştir. Transgenik bitkileri polimerase zincir reaksiyon (PCR) , southern blot analizi, *npt II* geni ile ortam üzerinde gelişen bitkiyi selekte ederek ve GUS geni aktarımı ile test edilmiştir. Transformasyon prosedürüne etki eden faktörleri araştırmışlardır.

Szalai (1995) yapmış olduğu bir araştırmada karpuz bitkisinin (*C. lanatus*) Szigetcepi5 F1 çeşidinde *in vitro* koşullarda 0.2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kallus oluşturmak amacıyla kotiledon eksplantlarını 4 hafta kültüre almışlardır. Hormon içermeyen ortamında kültüre alındıktan 9 hafta sonra ekkplantlar üzerinden kallus fakılaşmasını gözlemlendiğini ve 16. hafta sonunda da tamamen regenerasyon olduğunu belirtmişlerdir. Karpuzlarda regenerasyon kapasitesi bitki büyüme regülatörlerinin konsantrasyonundan çok bitki genotipine bağılı olduğu rapor edilmiştir.

İslam ve ark. (1997) yapmış oldukları bir araştırmada karpuz bitkisinin olgun zigotik embriyosundan yüksek oranda bitki regenerasyonu elde etmek için uygun bir yöntem araştırmışlardır. Verimli sürgün regenerasyonunun BA ve IAA taşıyan Linsmaer and Skoog ortamında elde ettiklerini belirtmişlerdir. Embriyosu kesilmiş eksplantlar kotiledonlara oranla daha fazla sürgün gelişimini elde ettiklerini belirtmişlerdir. Sürgün oluştuktan sonra kök oluşumu için 1 mg/l NAA içeren MS ortamının kullanıldığı rapor edilmiştir.

Amor ve ark. (1998) yapmış oldukları bir çalışmada bir antresense ACC oxidase geni aktarılmış transgenik *C. melo* bitkisinde etilenin sürgün gelişimdeki rolünü araştırmışlardır. ACC oxidase etilenin biyosentezinde son basamağın katalizi olduğunu ve transgenik bitkilerin yaprak ve kotiledon eksplantlarının da düşük

miktarda ACC oxidase aktivitesi ve etilen üretimi gösterdiğini tespit edilmişlerdir. Halbuki transforme olmamış kontrol dokularıyla karşılaştırıldığında dokuların arasında farklılık gözlenmediğini belirtmişlerdir. Transgenik dokulardaki sürgün regenerasyon oranı 50-100 μ M 2-chloro ethyl phospho asit ilavesi ile artırılmıştır. Sonuçlardan da açıkça görüldüğü gibi *in vitro* da *C. melo*'da etilenin bitki regenerasyonunda önemli bir rol oynadığını rapor etmişlerdir.

Mhatre ve ark. (1998) yapmış oldukları bir çalışmada *in vitro* da bitki oluşumunda bitki büyüme regülatörlerinin ve etilen inhibitörlerinin etkisini incelemiştir. Elde ettikleri sürgünleri içerisine IAA, BA ve caseinhydraлизat (CH) ilave edilen ortam üzerinde kültüre alınan kotiledonlar ve uç kısımlarından elde ettiklerini bildirmişlerdir. CH'nin yerine diğer büyüme regülatörleri ilave edildiğinde regenerasyonunun artmadığını fakat kallus gelişimini engellendiği belirtmişlerdir. Etilen inhibitörleri, kobalt chlorit ve gümüş nitrat gibi maddeler gelişme ortamına ilave edildiğinde kotiledonlardan sürgün gelişimi teşvik edildiği gözlenmiştir. Belirtilen diğer bileşiklerin de ortho-coumeric asit gibi teşvik edici etkisinin kotiledon üzerinden sürgün gelişimde oldukça yüksek etkide bulunduğu rapor edilmiştir.

Ezura ve ark. (2000) yapmış oldukları bir çalışmada kavun bitkisinde (*C. melo* L.) binary bir vektör olan β -glucuronidase genini taşıyan *A. tumefaciens* ile gen transferinde etilenin etkisini araştırmışlardır. Etilen üreten kavun bitkisinin kotiledon parçaları 1-aminocyclopropane-1-carboxylic asit (ACC, 20-200 μ M) ilavesi ile yükselen ve aminoethoxy- vinylglycine ilavesi ile inhibe olan (AUG, 10 μ M) bitki oluşturduğu gözlenmiştir. *Agrobacterium* inokulasyonu ile eksplantların etilen üretimi artmış ve inokulasyon boyunca AUG ilavesi ile etilen üretimi azaldığı bildirilmiştir. *Agrobacterium* ile 4 gün inkübasyondan sonra gen transfer edilen eksplantlar transient uidA ile test edilmiştir. Inkübasyon ortamına ACC ilavesi eksplantlara *Agrobacterium* ile gen transferi sıklığını azalttığını ve AUG'nin yükselttiğini belirtilmiştir. Bu sonuçlar ışığı altında etilenin *Agrobacterium* ile gen transferinde önemli olduğu rapor edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

Araştırma 2000-2002 tarihleri arasında Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal**3.1.1. Kimyasallar**

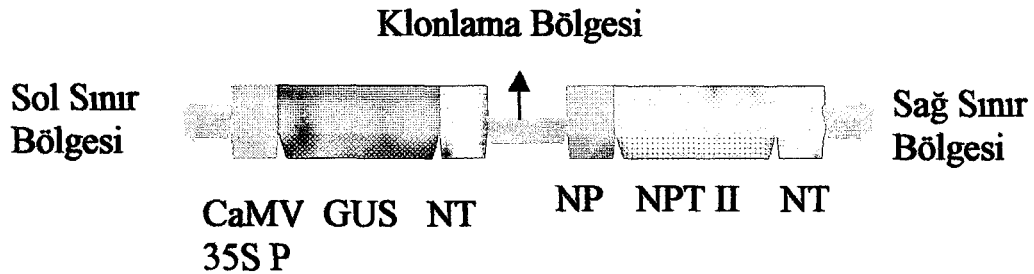
Araştırmada kullanılan kimyasallar bu kimyasallarla hazırlanan kültür ortamları stok solüsyonları ve bunların içerikleri ekler kısmında verilmiştir.

3.1.2. Transformasyonda Kullanılan Bitki Materyalleri

Çengelköy hıyar çeşidi (*C. sativus* L.) tohumlarının *in vitro* da çimlendirilmesi ile elde edilen bitkilerin kotiledon ve hipokotil parçaları ile kontrol olarak *in vitro* sürgün ucu kültürü ile elde edilen tütün bitkisinin (*Nicotiana tabaccum* var. samsun) yaprak parçaları bitki materyali olarak kullanılmıştır.

3.1.3. Gen Transferinde Kullanılan Plazmid ve Bakteri Irkları

Araştırmada kanamisine dayanıklılık geni (*npt II*) ile β -glukurodinaz (GUS) genlerini taşıyan ve 17.4 kb büyüklüğündeki pGA482GG plazmidini içeren *A. tumefaciens*'in EHA101 ırkı gen transferinde kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan plazmid Dr. Mukadder Kayım tarafından araştırmalarımızda kullanılmak üzere verilmiştir. Araştırmada kullanılan plazmidin haritası Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Bitki transformasyonun da kullanılan pGA482GG plazmidinin haritası

3.2. Metod**3.2.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması**

Araştırmada kültür ortamı olarak Murashige and Skoog (MS; 1962) ortamı değişik hormon konsantrasyon ve kombinasyonları ilave edilerek kullanılmıştır. Bu ortamların içerikleri ekte verilmiştir. Ortam ve stok solüsyonlarının hazırlanmasında destile su (dH₂O) kullanılmış olup, bitki büyüme düzenleyici hormonlar ilave edilerek hazırlanan ortamların pH'sı 0.5-1 M KOH ve 0.5-1 M HCl ile hıyar bitkileri (*C. sativus*) için 5.8 ve tütün bitkileri (*Nicotiana tabaccum*) için de 5.5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan kültür ortamlarını katılaştırmak amacıyla hıyar bitkileri (*C. sativus*) için % 0.2 phytogel ve tütün bitkileri (*N. tabaccum*) için % 0.8 agar (Merck agar) ilave edilerek ortamlar 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. Hazırlanan bu ortamlar otoklavda 121 °C'de 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika süre ile sterilizasyona tabi tutulmuştur.

Hazırlanan ortamlara antibiyotik ilavesi gerekli olduğu durumlarda, antibiyotikler yüksek sıcaklıkta bozulduğundan dolayı 0.22 µ por genişliğine sahip filtrelerden geçirilerek soğuk sterilizasyona tabi tutulmuş ve otoklavda steril edilmiş ortamlar 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine steril koşullarda istenilen düzeyde ilavesi yapılmıştır.

3.2.2. Hıyar Tohumlarının *In Vitro* Koşullarında Çimlendirilmesi ve Bitkilerin Elde Edilmesi

Transformasyon çalışmalarında kullanılmak amacıyla gerekli olan kotiledon ve hipokotil parçalarını elde etmek için hıyar bitkisinin (*C. sativus*) tohum kabukları soyularak % 70'lik ethanolde 1 dakika bekletilip bunu takiben tohumlar steril saf su ile yıkanarak ön sterilizasyonu yapılmıştır. Daha sonra tohumlar % 0.1'lik Tween-20 % 15' lik ticari sodyum hipoklorid (NaOCl) çözeltisi içerisinde 15 dakika çalkalanarak yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuş ve 3 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Bu şekilde steril edilen tohumlar steril kabin (Lamin air flow) içerisinde filtre kağıtları üzerinde 15-20 dakika bekletilerek üzerindeki fazla nemin alınması

için kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan tohumlar ½ MS ortamı üzerinde 3-5 ve 10 gün süre ile karanlık koşullarda 25-26 °C’de iklim odalarında kültüre alınmıştır.

3.2.3. Transformasyonda Kullanılan Tütün Yapraklarının *In Vitro* Sürgün Ucu Kültürü ile Elde Edilmesi

In vivo’da geliştirilen tütün bitkilerinden sürgün uçları kesilerek yüzeysel sterilizasyon amacıyla önce 30 dakika çeşme suyuyla yıkanmıştır. Bunu takiben alınan sürgün uçları deterjanlı su ile yıkanarak % 70’lik ethanolde 1 dakika çalkalanmış ve 1 kez steril destile su ile yıkanmıştır. Daha sonra sürgün uçları % 0.1’lik Tween-20 içeren % 10’luk NaOCl solüsyonunda 5 dakika çalkalanmış ve 3 kez steril destile su ile yıkanarak steril cam petriler içerisine yerleştirilen steril filtre kağıtları üzerinde bitki parçalarındaki nemin alınması için bekletilmiştir. Kuruyan sürgün uçları daha önceden hazırlanıp otoklavda steril edilmiş 250 ml cam erlen içerisindeki % 3 sakkaroz ve % 0.8 agar içeren pH’sı 5.5.’e ayarlanmış 50 ml ölçüsünde MS ortamı üzerine kültüre alınarak 25-26 °C ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık klima odalarında kültüre alınmışlardır.

3.2.4. Transformasyonda Kullanılan Bitki Doku Parçaları ve Ortamların Belirlenmesi

In vitro’da hıyar tohumlarının çimlendirilmesi ile elde edilen bitkilerden alınan kotiledon yapraklar üç değişik şekilde denenmiştir. Kotiledonlar tüm olarak, ortadan enine ve ortadan boyuna ikiye bölünerek ortamlar üzerinde kültüre alınmıştır. Araştırmada kullanılan diğer bitki doku parçası olan hipokotiller ise 0.5-1 ve 2 cm. uzunluğunda olacak şekilde kesilerek kültüre alınmıştır. Bunlara ilaveten hipokotil ve kotiledonları birlikte taşıyan bitki parçaları da denenmiştir. Sürgün gelişimini teşvik etmek amacıyla kotiledon ve hipokotil doku parçaları, içerisinde BAP (6-Benzyl amino purine), NAA (1-Naphthalene acetic acid), IAA (3-Indol acetic acid), zeatin, kinetin ve 2.4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)’nin farklı konsantrasyonu ve kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kotiledon yaprakların damarlı kısımları ortama temas edecek şekilde ve damarlı kısmı üste gelecek şekilde

hipokotil parçalarının da kesilen uç kısımları ortam içinde olacak şekilde kültüre alınmıştır.

3.2.5. *A. tumefaciens*'in Kültürü

Transformasyonda kullanılan üzerinde *npt II* genini içeren *A. tumefaciens*'in EHA 101 ırkı 50 mg/l kanamisin içeren 25 cm çapındaki cam petri kutularında bulunan katı YEP ortamı (Ek 2) üzerine öze ile çizilerek 28°C'de kültüre alınmıştır. Bakterileri taze olarak muhafaza etmek amacıyla katı ortam üzerinde geliştirilen bakteriden her 15 günde bir olmak üzere bir koloni öze ile alınarak tekrar 50 mg/l kanamisin içeren YEP ortamı üzerinde alt kültüre alınmış ve koloni gelişimini tamamlayana kadar bakteriler geliştirilmiştir. Koloni gelişimini tamamlamış olan bakteriler transformasyonda kullanılıncaya kadar petri kutuları içerisinde +4°C'de buzdolabında 1-1.5 ay muhafaza edilmiştir.

A. tumefaciens'in sıvı kültürünü hazırlamak için daha önceden katı YEP (Ek2) ortamı üzerinde çizilerek geliştirilmiş olan bakteri kolonisinden öze yardımı ile bir koloni alınarak, transformasyondan önce içerisinde 50 mg/l kanamisin bulunan steril sıvı YEP ortamı içerisine inokule edilmiştir. Bu şekilde inokule edilen bakteri kültürü 200 devir/dakika'da çalışan çalkalayıcı üzerinde 28 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi sabah yine içerisinde 50 mg/l kanamisin içeren 20 ml sıvı YEP ortamı içerisine önceki gece geliştirilmiş olan bakteri solüsyonundan 500-1000 µL alınarak taze ortama inokule edilerek 6 saat aynı koşullarda taze bakteri süspansiyonu elde edilinceye kadar geliştirilmiştir.

3.2.6. Transformasyonda Kullanılacak Olan Bakteri Solüsyonunun Hazırlanması

6 saat boyunca bir çalkalayıcı üzerinde geliştirilen bakteri solüsyonu 10 ml'lik santrifüj tüplerine eşit miktarlarda dağıtılmış ve 20 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilerek bakterilerin tüplerin tabanına çöktürülmesiyle pellet oluşturulması sağlanmıştır. Pelletin üstündeki sıvı alınmış ve 20 mg/l asetosiringon içeren sıvı MS ortamı ilave edilmiştir (Ek 7-8). Transformasyonda kullanılacak olan bakteri

yoğunluğu spektrofotometre (Shimadzu, UV 1208) yardımıyla UD= 550-600 nm'de ölçülerek transformasyon için uygun değer olan UD= 0.2-0.5'e ayarlanmıştır.

3.2.7. Bitki Doku Parçalarının *A. tumefaciens* ile Transformasyonu

Agrobacterium ile gen transferi yapılacak olan doku parçaları kesildikten sonra içerisinde ortamın pH'sını sabit tutmak amacıyla kullanılan 0.5 mg/l MES (2[N-Morpholino]ethanesulfonic acid), bakterilerin bitki dokusuna girişini teşvik eden 20 mg/l asetosiringon ve 1 mg/l IAA içeren sıvı MS ortamı içerisinde bekletilerek bakteri ile gen transferinde kullanılmak üzere hazır duruma getirilmişlerdir.

Transformasyonda kullanılan bitki doku parçaları (kotiledon, hipokotil, hipokotil ve kotiledonları birlikte taşıyan doku parçaları) 3.2.6.'da belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri solusyonunda petri kutuları içerisindeki 15 dakika süre ile bekletilmiştir. Bu süre sonunda bir pens yardımı ile alınan bitki parçaları üzerindeki fazla bakteri solusyonunun bitki parçalarından uzaklaştırılması amacı ile steril filtre kağıtları üzerinde bir süre bekletilmiş ve kotiledon yaprakların damarlı kısmı ortama gelecek şekilde veya tersi durumunda kültüre alınmıştır. Hipokotillerinde kesilen uç kısımları ortam içerisine girecek şekilde 9 cm çapındaki cam petri kutuları içerisinde hazırlanmış olan regenerasyon ortamı üzerinde 2 gün süre ile 25-26 °C'de karanlık koşullarda bakteri ile ko-kültüre alınmıştır.

3.2.8. Tütün Yapraklarının *A. tumefaciens* ile Transformasyonu

In vitro'da erlenmayerler (250 ml) içerisinde katı MS ortamı üzerinde sürüğün ucu kültürü ile geliştirilmiş olan tütün bitkilerinin yaprakları 1 cm² olacak şekilde küçük parçalara ayrılarak yukarıda 3.2.6.'de belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri solüsyonu içerisinde 10 dakika süre ile bekletilmiştir. Daha sonra bitki parçalarının üzerindeki fazla bakterinin uzaklaştırılması için yapraklar bir süre steril filtre kağıtları üzerinde kurutulmuş ve içerisinde 20 ml MS ortamı bulunan 9 cm çapındaki cam petri kutuları içerisindeki MS ortamı üzerinde 48 saat karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır.

3.2.9. Transgenik Bitkilerin Regenere Edilmesi

Bitki doku parçalarının iki gün süre ile bakteri ile ko-kültüründen sonra bakteri haleleri gözlenen bitki doku parçaları 50 mg/l kanamisin ve 300 mg/l karbensilin antibiyotiklerini ve 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Bu uygulama ile gen transferi yapılmış bitki doku parçalarının aktarılan *npt II* geni sayesinde kanamisin içeren ortamda seleksiyonları yapılmıştır. Kültürlerde aşırı bakteri gelişimi gözleendiği durumlarda bitki parçaları tamamen bakteriden arındırılıncaya kadar steril saf su ile yıkayıp filtre kağıtlarında kurutularak tekrar aynı kültür ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Bitki parçaları her 15 günde bir alt kültüre alınarak ortamlar tazelenip sürgün regenerasyonu izlenmiştir. Bakteri ile inokule edilmeden antibiyotikli ortam üzerinde kültüre alınan bitki doku parçaları negatif kontrol olarak, antibiyotiksiz bitki regenerasyon ortamında kültüre alınan bitki parçaları da pozitif kontrol olarak alınmıştır.

3.3. Histokimyasal GUS Analizi

Histokimyasal GUS analizi Kayım tarafından yapılan Jefferson ve ark. (1987)'nın modifikasyonlarla (1997) yapılmıştır. Antibiyotikli selektif kültür ortamı üzerinde embriyogenik kalluslardan oluşan bitkiciklerden ve ayrıca test bitkisi olarak kullanılan tütün yapraklarından küçük parçalar kesilerek Ek 4'de verilen solüsyon içerisinde cam bir petri kabında 37 °C'de 1-24 saat karanlıkta inkube edilen bitki doku parçaları her saat kontrol edilerek dokularda meydana gelen mavi renk değişimi gözlenmiştir.

3.4. Regenere Edilen Bitkilerin Köklendirilmesi

Kotiledon, hipokotil ve hipokotil + kotiledon parçalarından gelişen bitkicikler bitki parçalarından ayrılarak içerisinde antibiyotik içeren hormon içermeyen MS ortamında, 0.1 mg/l NAA ve 0.1 mg/l IAA içeren MS ortamında kültüre alınarak kök oluşumları teşvik edilmiştir.

3.5. Köklenen Bitkilerin Toprağa Aktarılması ve Adaptasyonları

In vitro koşullarında kök oluşturan ve yaklaşık 10 cm boyuna ulaşan bitkiler erlenmayerler içerisinde çıkarılıp köklerindeki ortam kalıntıları çeşme suyuyla tamamen yıkanarak temizlenmiş ve zedelenmeler sonucu oluşabilecek yaralardan herhangi bir hastalık etmeninin girişini engellemek amacıyla koruyucu bir fungusit olan kaptan (2 g/l) içeren su içerisinde bir süre bekletilmiştir. Bitkiler daha sonra 1:1:1 oranında torf ve kum karışımına aktarılmıştır. Toprağa aktarılan bitkilerin nem kaybını engellemek amacıyla 15 gün süre ile saksılar polietilen plastik bir torba ile kapatılarak ağızları bağlanmış ve birkaç gün ara ile havalandırılarak aşırı nemden bitkilerin zarar görmeleri engellenmiş ve bu suretle bitkilerin normal koşullara adaptasyonları sağlanmıştır.

3.6. Bitkiden Genomik DNA'nın İzolasyonu

Bitki genomik DNA izolasyonları bazı değişikliklerle Sharp ve ark. (1988)'nin yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

Transformasyon sonucu elde edilen 2 aylık bitkilerin genç yapraklarından yaklaşık 100 mg doku parçası alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüpler içerisine konan bitki doku parçaları sıvı azot içerisinde plastik bir çubuk yardımı ile iyice ezilerek toz haline getirilmiş ve üzerine 700 µl olacak şekilde ekstraksiyon bafırı (Ek 9) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Bu karışım 15-20 dakika süre ile 65 °C'deki sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra 700 µl Kloroform+İsoamilalkol (24:1) ilave edilerek 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu aşama tüpün üstündeki sıvı berrak görününceye kadar birkaç kez tekrarlanmıştır. Daha sonra üstte kalan sıvı yeni bir ependorfa alınarak üzerine 8 µl R-nase ekstraksiyon bafırı ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tüpün üstünde kalan sıvı boşaltılarak tabanda pellet halinde kalan DNA önce %100'lük ethanol ile daha sonra da %70'lik ethanol ile yıkanarak 15 dakika kuruması için bekletilmiştir. Kuruyan DNA üzerine 10-30 µl ddH₂O ilave edilerek 65 °C'deki sıcak su banyosunda 10 dakika bekletilmiş ve bu şekilde izole edilen DNA'lar PZR için hazır hale getirilmiştir.

3.7. PZR Analizleri

Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan *npt II* (5' GAGGCTATTCGGCTATGACTG 3', 3' ATCGGGAGCGGCGATAACCGTA5') ve GUS primerleri (5' GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG 3', 3' GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA 5') kullanılmıştır.

PZR analizi yapılacak olan bitki genomik DNA'ları GUS için pozitif sonuç veren kanamisine dayanıklı hıyar bitki yapraklarından izole edilmiştir. Her reaksiyon için 100 ng DNA kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı toplam 25 µl hacimde olacak şekilde 0.75 ml mikrosantrifüj tüplerinde hazırlanmış ve üzerine eşit miktarda mineral yağ (Sigma) ilave edilerek PZR aletine (Techne/Genus) yerleştirilmiştir. Örnekler ilk olarak 94°C'de 2 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra toplam 30 döngü her bir döngüde 94 °C'de 1 dakika, 54 °C'de 2 dakika ve 72 °C'de 3 dakika olacak şekilde yapılmıştır. Tüm döngüler tamamlandıktan sonra her örneğin sentez ürünü elektroforez yapılmış ve etidyum bromid ile boyandıktan sonra görülebilir DNA bantlarının fotoğrafları çekilmiştir.

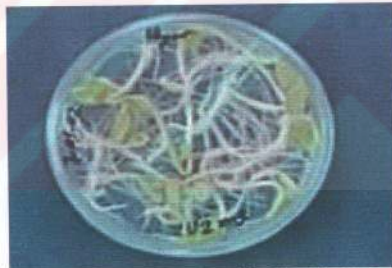
3.8. Agaroz Jel Elektroforez

Agaroz jeli 1XTBE (Tris Borik Asit) elektroforez bafırı kullanılarak hazırlanmıştır. Amaca uygun olarak % 1 agaroz (tip I, Sigma) içeren jeller 1XTBE içerisinde mikrodalga fırında eritilmiş ve 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra iki tarafı bant ile kapatılmış, taraklı jel kalıbına dökülerek jel katılaştıktan sonra tarak ve bantlar çıkarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kalıp elektroforez tankına yerleştirilerek 1/10 boya veya yükleme bafırı ile (% 0.25 bromofenol mavisi ve %25 Ficoll (400.000)) boyanan DNA'lar bir pipet yardımı ile çukurlara yerleştirilerek 60-100 voltta 180 dakika elektroforezleri yapılmıştır (Bio Rad Model 3000XI). Daha sonra jel 0.5 µg/ml etidyum bromid ile 10-20 dakika boyanarak elektroforez bafırı ile yıkanan jel örneği 260 nm dalga boyunda bir UV transillimatör (Vilber Lourmat) üzerinde oluşan bantların poloroid fotoğrafları çekilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Araştırmada Kullanılacak Olan Bitki Materyallerinin Belirlenmesi

Bitki regenerasyonunu teşvik etmek için kullanılacak bitki doku parçalarının alındığı hıyar bitkilerinin tohumlarının sterilizasyon çalışmasında, tohumların tohum kabukları soyulmadan steril edilerek ½ MS kültür ortamı üzerinde kültüre alındıklarında tohumlar üzerinde bakteri gelişiminin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca sterilizasyon işleminde % 30 konsantrasyonunda sodyumhipoklorit uygulaması yapıldığı zaman kültüre alınan tohumlardan gelişen bitkilerde deformasyonların olduğu ve tohumların çimlenme süresinin uzun zaman aldığı bu bitkilerden alınan doku parçalarından bitki regenerasyonun gözlenmediği ve zaman içerisinde öldüğü gözlenmiştir. Buna karşılık kabukları soyularak %15'lik sodyumhipoklorit ile sterilizasyonu yapılan tohumların ½ MS ortamı üzerinde kültüre alınmalarından 5 gün sonra gelişen bitkilerin normal görünümlü olduğu izlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. ½ MS ortamı üzerinde karanlık koşullarda kültüre alınan hıyar tohumlarının çimlenmesinden 5 gün sonra gelişen bitkiler

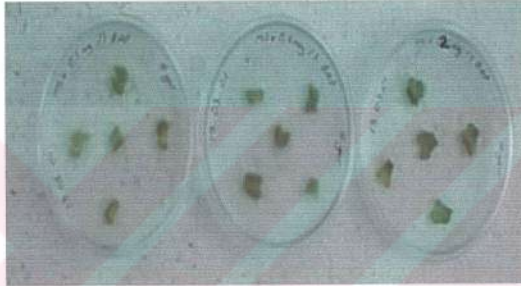
In vitro'da 3-5 ve 10 gün süre ile çimlendirilen tohumlardan elde edilen bitkilerden alınan bitki doku parçaları materyal ve metod 3.2.4.'de verildiği gibi çeşitli şekillerde kesilerek farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındıklarında en iyi bitki regenerasyonunun tohum çimlenmesinden 5 gün sonra alınan kotiledon ve hipokotillerden elde edildiği gözlenmiştir. Çimlenmeden 3 gün sonra kullanılan bitki doku parçalarının araştırma esnasında dokuların çok genç olduğu için bistirü ile

kesim esnasında parçalandığı gözlenmiş, çimlendirildikten 10 gün sonra kullanılan bitki parçalarından ise çoğunlukla kallus oluşumu gözlenmiştir. Trulson ve ark. (1986), Fang ve ark. (1990), Chee ve ark. (1991) ve Kim ve ark. (2000)'nın da yapmış oldukları çalışmalarda tohumun çimlenmesinden 5 gün sonra transformasyon için kullanılan kotiledon yapraklarından, denenen diğer zamanlara göre daha fazla bitki regenerasyonunun gerçekleştiğini rapor edilmiştir. Bu bakımdan yapılan bu araştırmada elde edilen sonuçlar literatürde elde edilen sonuçlarla uyum içerisinde. Ortadan enine iki parçaya bölünerek kültüre alınan kotiledon doku parçaları ile 1 cm uzunluğunda kesilerek kültüre alınan hipokotil parçalarından regene edilen bitki sayısı araştırmada ele alınan diğer doku parçalarına göre daha yüksek oranda olmuştur. Ortadan boyuna ikiye kesilen ve tüm olarak kullanılan kotiledon doku parçaları ile 0.5 ve 1.5 cm uzunluğundaki hipokotil parçalarından çoğunlukla 5 gün sonra kallus oluşumu gözlenmiştir. Kotiledon yaprak parçaları kültüre alınırken yaprağın damarlı kısımları kültür ortamı üzerine temas edecek şekilde kültüre alındığı durumlarda bitki regenerasyonu olurken bunun tersi durumunda bitki eksplantı üzerinden kallus oluşmuştur. Kim ve ark. (2000)'nın yapmış oldukları araştırmada da benzer sonuçlar alınmıştır. Genellikle bitki regenerasyonunun kotiledon yapraklarının sapa bağlanan kısımlarından daha fazla olduğu, yaprağın uç kısımlarından ise daha az sayıda bitki oluşumu gerçekleşmiştir (Ganapathi ve ark., 2000). Yapmış olduğumuz araştırmalar sonucunda petri kutuları içerisinde kültüre alınan eksplant sayısının da bitki regenerasyonu üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. 9 cm çapındaki bir petri kutusunda 15 adet bitki parçasından daha fazla sayıda doku parçası kültüre alındığı zaman eksplantların gelişmesinin yavaşlayarak sürgün regenerasyonunun oluşmadığı izlenirken buna karşılık 10 adet bitki doku parçası kültüre alındığında bitki regenerasyonunun gerçekleştiği görülmüştür.

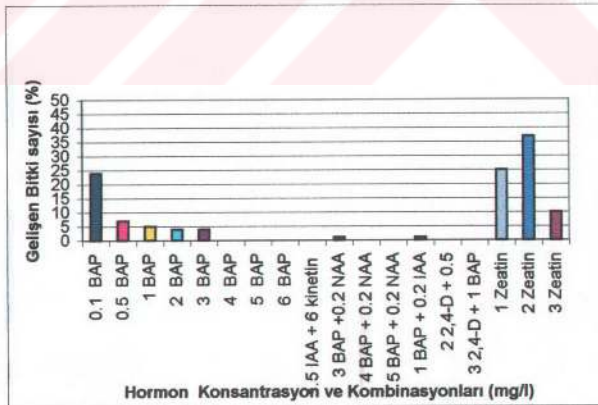
4.2. Uygun Bitki Regenerasyon Ortamının Belirlenmesi

4.1'de belirlenen sonuçlar ışığı altında belirlenen bitki doku parçaları kullanılarak içerisinde BAP, zeatin, IAA, NAA, kinetin ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde 2 gün süre ile

karanlık koşullarda daha sonraki günlerde ise 16 saat aydınlık 8 saat karanlık klima odalarında kültüre alınan hıyar kotiledon yaprak parçalarından iki hafta sonunda bitki regenerasyonu gözlenmeye başlanmıştır (Şekil 4.3 - 4.5). Alınan sonuçlar Çizelge 4.1 ve Şekil 4.5’de verilmiştir. Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4’de de görüldüğü gibi en yüksek oranda bitki oluşumu 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan kotiledon yapraklarından elde edilmiştir. Bunu 1 mg/l zeatin ve daha sonrada 0.1 mg/l BAP içeren MS ortamının takip ettiği gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamının üzerinde bitki regenerasyonunu teşvik etmek amacıyla kültüre alınan kotiledon parçaları



Şekil 4.4. Değişik hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan kotiledon yaprak parçalarından oluşan % bitki sayısı

Çizelge 4.1. Denemede kullanılan farklı sitokinin ve oksin hormon konsantrasyon ve kombinasyonu ile denemede kullanılan eksplant sayısı ve regenere olan bitki sayısı

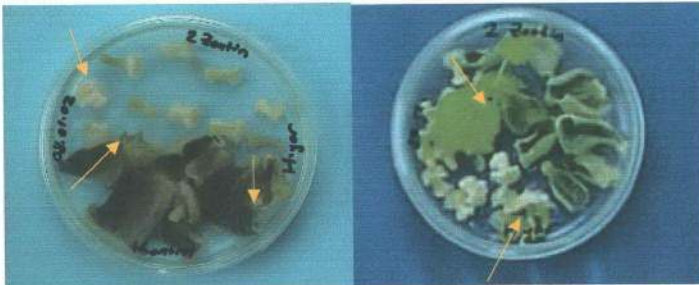
Kullanılan Hormonlar ve Kombinasyonları	Kullanılan Miktar (mg/l)	Kullanılan Eksplant Sayısı	Regenere Olan Bitki Sayısı
BAP	0,1	50	8
BAP	0,5	60	6
BAP	1	60	5
BAP	2	70	4
BAP	3	70	*0
BAP	4	70	*0
BAP	5	50	**0
BAP	6	50	***0
Zeatin	1	80	15
Zeatin	2	80	20
Zeatin	3	80	10
IAA + kinetin	1,5 / 6	80	*0
BAP + NAA	3 / 0,2	40	**0
BAP + NAA	4 / 0,2	40	**0
BAP + NAA	5 / 0,2	40	**0
BAP + IAA	1 / 0,2	30	*0
2,4-D + Kinetin	2 / 0,5	40	***0
2,4-D + BAP	2 / 0,5	40	***0

* : Az miktarda kallus oluşumu

** : Orta derecede kallus oluşumu

*** : Çok yoğun olarak kallus oluşumu

Kim ve ark. (2000)'nın da yapmış oldukları çalışmada 2 mg/l zeatin içeren kültür ortamından yüksek oranda bitki regenerasyonunun gerçekleştiği rapor edilmiştir. Ancak elde edilen sürgün sayısının bu çalışmada elde edilen sürgün sayısından daha fazla olma nedenini araştırmada kullanılan bitki çeşidinin yani genetik materyalin farklı oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Öteki hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarında genellikle bitki oluşumu yerine kallus oluşumu gözlenmiştir. En fazla kallus oluşumu kinetin ve BAP'ın 2,4-D ile kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan doku parçalarında gözlenmiştir. Ancak bu kalluslardan bitki regenerasyonu gerçekleştirilememiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar Kuijper ve ark. (1996)'nın hıyar bitkisi doku parçalarından sürgün regenerasyonun teşviki ile yapmış oldukları çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. Kültüre alınan eksplantlar her 15 günde bir alt kültüre alınmış ve regenere olan bitki sayıları tespit edilmiştir. BAP içeren kültür ortamı üzerinde kültüre alınan bitki eksplantlarında düşük dozda kullanılan konsantrasyonlarında bitki regenerasyonu gözlenirken yüksek dozdaki BAP uygulamalarında ise ilk haftalarda farklı derecelerde parlak ve kırılğan kalluslar oluştuğu, fakat 6. haftadan sonra da bu kalluslarda kahverengileşmeler ve bunu takiben de ölümler olduğu gözlenmiştir. Ganapathi ve ark. (2000)'nin yapmış olduğu araştırmada da BAP uygulamasında yüksek dozda eksplantlardan kallus oluştuğu rapor edilmiştir.



Şekil 4.5. 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan kotiledon ve hipokotillerden gelişen kalluslar ve bitkicikler (ok ile gösterilmiştir.)

2 mg/l zeatin içeren kültür ortamı üzerinde gelişen bitkicikler bistürü ile kesilerek sürgün gelişimini tamamlaması için aynı ortam üzerinde her 15 günde bir altkültüre alınmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kotiledon doku parçalarından teşvik edilen ve (a) 2 mg/l zeatin ile (b) 0.1 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgünlerin 4 hafta sonraki görünümü



Şekil 4.7. Kotiledon parçalarından teşvik edilmiş sürgünlerin gelişimini tamamlaması için erlenmayerler içerisinde 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan hıyar sürgünleri

4.3. *Agrobacterium* ile Hıyar Bitkilerinin Genetik Transformasyonu

Önceki çalışmalar sonucu belirlenen bitki materyallerinin *A. tumefaciens* ile transformasyonunda gen transferi yapılacak bakteri solüsyonu içerisine asetosiringon ilave edildiğinde transformasyon sıklığının arttığı gözlemlenmiştir.

Benzer sonuçlar Rharjo ve ark. (1996) ve Nishibayashi ve ark. (1996)'nın da yapmış oldukları çalışmalar sonucunda rapor edilmiştir. Transformasyon çalışmasında Nishibayashi ve ark. (1996)'nın belirtilerinin aksine bitki doku parçalarının 15 dakikadan daha fazla bir süre bakteri solüsyonun içerisinde bekletilmesi durumunda yada 2 günden daha uzun bir süre bitki parçalarının bakteri ile ko-kültüre alındığı zaman bakterinin daha sonra antibiyotik içeren ortam üzerinde kültüre alındığında bakterilerin ölmediği ve gelişmesini sürdürdüğü gözlenmiştir. Bakteri ile transformasyonu yapılmış hipokotil bitki parçalarından transformasyondan 5 gün sonra kallus oluşumu olduğu fakat 4. haftadan itibaren kallusların sararak öldükleri gözlenmiştir (Şekil 4.8). Nishibayashi ve ark. (1996)'nın yapmış oldukları çalışmada rapor edilen sonuçların aksine transformasyonda kullanılan hipokotil parçalarından gelişen bitki sayısının kotiledon parçalarından elde edilen bitki sayısına oranla çok daha az olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Böylece Ganapathi ve ark. (2000)'nin yapmış oldukları araştırma sonuçları ile bu araştırma sonuçları uyum içerisindedir.

Çizelge 4.2. *A. tumefaciens* ile gen aktarımı yapılan kotiledon ve hipokotil doku parçalarından teşvik edilmiş sürgün sayısı ve transformasyon başarıları

	Kullanılan Eksplant sayısı	Elde Edilen Sürgün Sayısı	Sürgün Regenerasyon oranı (%)	Transformasyon Başarısı (%)
Kotiledon	474	98	20.6	80
Hipokotil	650	4	0.6	80
Toplam	1124	102	21,2	

Bunun üzerine Chee (1990)'nin yapmış olduğu çalışmada olduğu gibi hipokotil parçaları 4 gün boyunca 0.5 mg/l kinetin ve 2 mg/l 2,4-D bulunan ortamda kültüre alınıp daha sonraki günlerde sürgün gelişimini teşvik etmek için 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l kinetin içeren ortamda kültüre alınmışlar fakat benzer sonuçlar alınamamıştır. Bunun başlıca sebebi bu çalışmada kullanılan bitki çeşidinin farklı olmasına dayandırılabilir. Çünkü Lou ve ark. (1994)'nin yapmış olduğu bir

çalışmada araştırmada kullanılan her bitki çeşidinin uygulamalar sonucunda farklı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir.

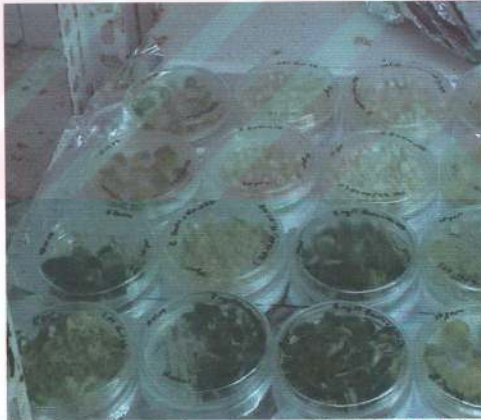


Şekil 4.8. *A. tumefaciens* ile transformasyonu yapılarak 50 mg/l kanamisin, 300 mg/l karbensilin ve 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan hipokotil doku parçalarından 5 gün sonra gelişen kalluslar

Ayrıca transformasyondan sonra kültür ortamı üzerinde kültüre alınan kotiledon parçalarının yaprağın sapa bağlandığı kısımlarından 1 veya 2 bitkicik geliştiği gözlenirken, yaprağın uç kısımlarından alınan doku parçalarından nadiren bitkicik geliştiği veya hiç bitki gelişmeyip sadece kallus oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.9 – 4.10). Buna paralel sonuçlar Ganapathi ve ark. (2000)'nin yapmış olduğu çalışmalar sonucunda da elde edilmiştir. Transformasyondan sonra kültür ortamı üzerinde kültüre alınan bitki parçalarından birinci haftada kırılgan, yeşil ve parlak kallus oluşturmaya başlayıp ikinci haftadan sonra sürgün gelişimi gözlenmiştir.



Şekil 4.9. Transformasyon için 2 gün süre ile *A. tumefaciens* ile ko-kültüre tabi tutulduktan sonra içerisinde 50 mg/l kanamisin, 300 mg/l karbensilin, 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmış kotiledon doku parçaları



Şekil 4.10. Bakteri ile transformasyonu yapılarak petri kutuları içerisinde besi ortamı üzerinde kültüre alınan hipokotil ve kotiledon bitki doku parçalarının klima odasındaki genel görünümü

Araştırmada bakteri ile gen transferi yapılmadan antibiyotik içeren ortam üzerinde kültüre alınan kontrol bitkileri ilk haftalarda normal gelişmesini

sürdürürken daha sonraki haftalarda bitki parçalarının sararak öldükleri gözlenmiştir (Şekil 4.11-b).



Şekil 4.11. a) *A. tumefaciens* ile gen transferi yapılmış kotiledon yapraklarından antibiyotik içeren (kanamisin ve karbensilin) ortam üzerinde uygulamadan 2 hafta sonra geliştirdiği sürgünler (ok ile gösterilmiştir) b) *A. tumefaciens* ile gen transferi yapılmamış kotiledon yaprakların antibiyotik içeren ortam üzerindeki sararmış kotiledon ve hipokotil doku parçaları (Kontrol)

Bir başka denemede de hipokotil+kotiledonların beraber bulunduğu bitki parçaları 2 mg/l zeatin içeren ortam üzerinde kültüre alınarak gelişen sürgün sayıları tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *A. tumefaciens* ile transformasyondan sonra antibiyotik içeren bitki regenerasyon ortamı üzerinde kültüre alınan hipokotil+kotiledon parçalarından teşvik edilmiş sürgünler

Kültüre alınan bu bitki parçalarından her eksplanttan sadece bir sürgün gelişiminin olduğu gözlenmiştir. Bitki eksplantlarından elde edilen sürgünlerin gelişmelerini tamamlaması için erlenlerde bitki regenerasyon ortamı üzerinde kültüre alındıktan 4 hafta sonra gelişimini tamamladığı izlenmiştir(Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Transformasyon sonucu regene edilen kotiledon, hipokotil+kotiledon bitki doku parçalarından teşvik edilen sürgünlerin gelişiminin teşviki için 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgünler

4.4. Elde Edilen Transgenik Bitkilerin Köklendirilmesi ve Doğal Koşullara Adaptasyonları

4 hafta erlenlerde kültüre alınarak sürgün gelişimini tamamlayan sürgünler daha sonra kök gelişimi için hormon içermeyen MS ortamı üzerinde, 0.1 NAA ve 0.1 IAA içeren köklendirme ortamı üzerinde kültüre alındığı zaman hormon içermeyen MS ortamı üzerinde kök gelişimini daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Transformasyondan sonra sürgün gelişimi tamamlanarak köklenme ortamı üzerinde kültüre alınan bitkilerden 3 hafta sonra 10 cm uzunluğunda kök oluştuğu izlenmiştir. Toprağa aktarılacak doğal koşullara adaptasyonları sağlanan bitkiler normal büyüme göstermişler ve çiçek oluşturmuşlardır (Şekil 4.14, 4.15, 4.16).



Şekil 4.14. Basal MS ortamı üzerinde kök oluşturarak gelişimini tamamlayan toprağa aktarılma aşamasına gelmiş hıyar bitkileri



Şekil 4.15. Toprağa aktarılarak doğal koşullara adaptasyonları sağlanmış 5 haftalık transgenik hıyar bitkileri



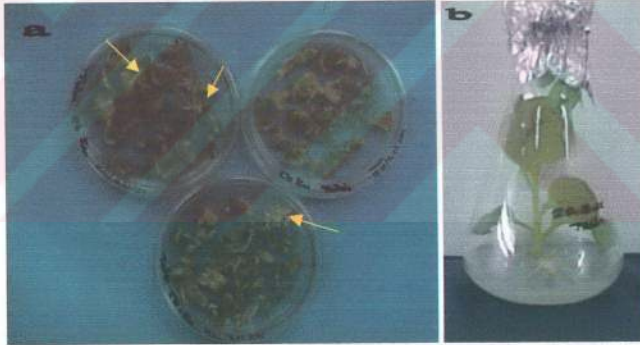
Şekil 4.16. Klima odalarında geliştirilmiş 2 aylık transgenik hıyar bitkileri

4.5. *Agrobacterium* Aracılığı ile Tütün Bitkisine Gen Transferi

In vitro sürgün ucu kültürü ile elde edilmiş olan tütün bitkisi yapraklarından 1 cm² büyüklüğündeki parçalar alınarak 4.3.2.'de olduğu gibi *A. tumefaciens* aracılığı ile gen transferi yapılmış daha sonra doku parçaları antibiyotik içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındıktan 2 hafta sonra yaprak parçalarının kesim yerlerinden sürgün gelişimi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17). Gen transferi gerçekleşmemiş dokuların antibiyotik içeren kültür ortamı üzerinde klorofillerini kaybederek sararıp öldükleri izlenmiştir. Bu sayede kanamisine karşı dayanıklılık geninin aktarıldığı eksplantlar seçilmiştir. Oluşan sürgünler basal MS ortamı üzerinde kültüre alınarak kök gelişimi teşvik edilmiş ve köklenen bitkiler toprağa akatarılmışlardır (Şekil 4.18).



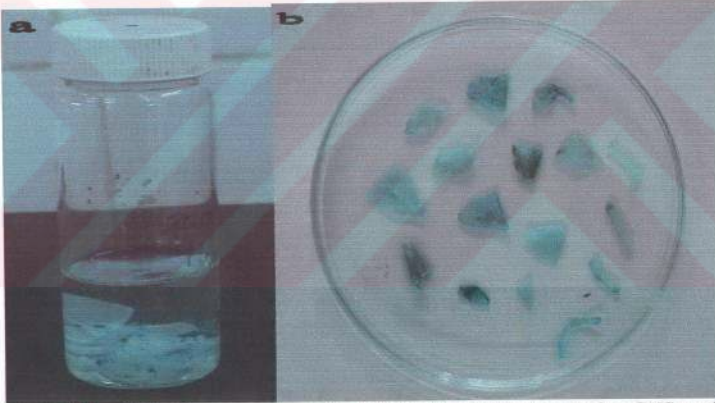
Şekil 4.17. *İn vitro* sürgün ucu kültürü ile geliştirilmiş tütün bitkisi



Şekil 4.18. a) *A. tumefaciens* ile transformasyonu yapılarak antibiyotik içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan tütün doku parçalarından 3 hafta sonra regenere olan sürgünler (ok ile gösterilmiştir.) b) Transformasyonu yapılmış tütün bitkilerinin antibiyotik içeren MS ortamı üzerinde kök oluşturmaları

4.6. Histokimyasal GUS Analizi

A. tumefaciens ile transformasyonu yapılarak kanamisin içeren bitki regenerasyon ortamı üzerinde gelişmesini sürdüren tütün ve hıyar bitki doku parçalarına istenilen genlerin aktarıldıklarını kanıtlamak amacıyla uygulanan histokimyasal GUS analizinde bitki doku parçaları X-gluk solüsyonunda 37°C'de inkübe edildikten 12 saat sonra transgenik dokularda meydana gelen mavi renk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.19(a)). Analizde kullanılan doku parçalarından % 90'nının mavi renge dönüştükleri izlenmiştir. Buradaki doku parçalarının mavi renge boyanmaları plazmid üzerindeki GUS geninin transformasyonda kullandığımız bitki doku parçalarına aktarıldığının bir göstergesidir (Choi ve ark., 1994; Valles ve ark., 1994; Nishibayashi ve ark., 1996; Ganapathi ve ark.,2000; Ezura ve ark., 2000).

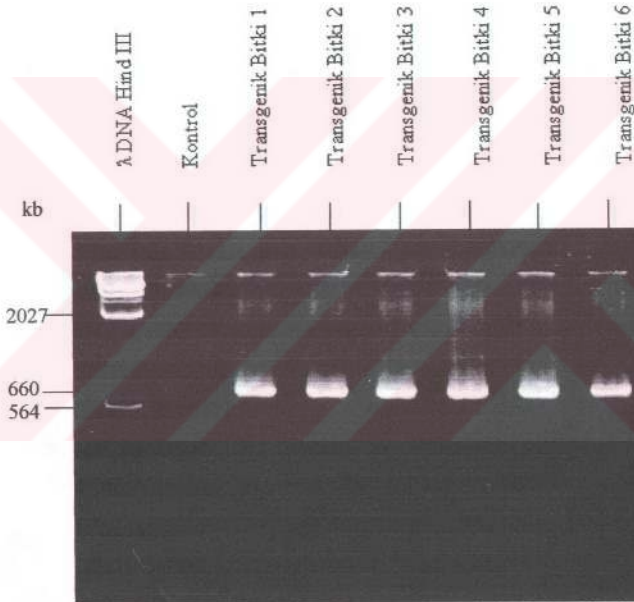


Şekil 4.19. a) Tranformasyondan sonra bitki doku parçalarına yapılan GUS analizi sonucunda tütün ve hıyar bitki doku parçalarında gözlenen mavi renk oluşumu b) 2 aylık transgenik bitkilerde GUS analizi sonucu dokularda meydana gelen mavi renk değişimi

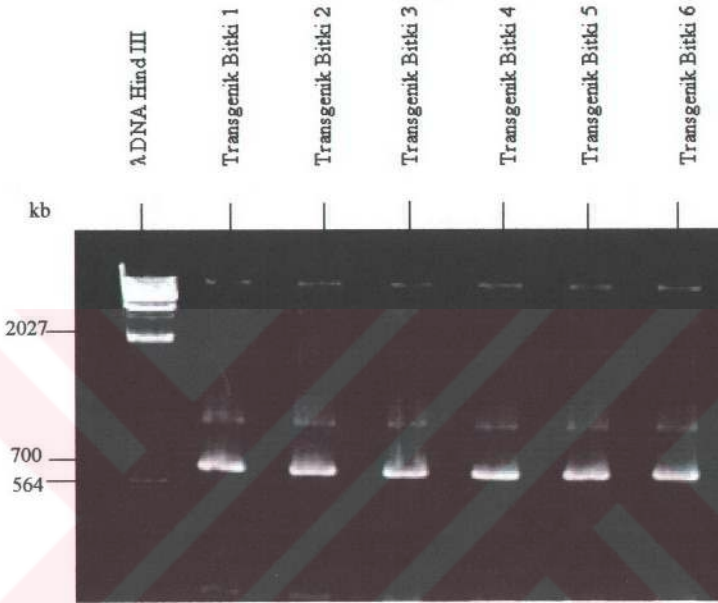
Toprağa adaptasyonu sağlanarak 2 ay süre ile geliştirilen transgenik hıyar bitkilerine uygulanan GUS analizi sonucunda kullanılan bitki materyallerinden %80'inin mavi renge boyandıkları gözlenmiştir (Şekil 4.19(b)).

4.7. Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA'ların PZR Analizi ve Agoroz Jel Elektroforezi

DNA izolasyonu 6 transgenik bitkiden ve 1 kontrol bitkisinden PZR analizi için 3.7.'de verilen yönteme göre yapılmıştır. Yapılan PZR analizleri sonucunda *npt II* ve GUS genlerinin marker gen ile aynı büyüklükte bant oluşturdukları şekil 4.20 ve 4.21'de görülmektedir.



şekil 4.20 : Hıyar bitkisinin farklı ve aynı kotiledon yapraklardan elde edilen transgenik bitkilerin GUS geni için PZR analizi; kontrol: transgenik olmayan hıyar bitkisi



Şekil 4.21 : Hıyar bitkisinin farklı ve aynı kotiledon yapraklardan elde edilen transgenik bitkilerin *npt II* geni için PZR analizi; kontrol: transgenik olmayan hıyar bitkisi

Şekil 4.20 ve 4.21’de de görüldüğü gibi kontrol bitkisi PZR ürünleri elektroforez sonucunda herhangi bir bant oluşturmazken antibiyotikli ortam üzerinde seçilerek GUS analizinde pozitif sonuç veren transgenik bitkilerin PZR ürünleri *npt II* (700 kb) ve GUS (660 kb) genlerine spesifik DNA bantları oluşturmuşlardır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hıyar bitkisine *Agrobacterium* aracılığı ile gen transferi yapmak için değişik hormon konsantrasyon ve kombinasyonları kullanılarak bitki hücrelerinin totipotensi özelliğinden yararlanmak suretiyle yüksek oranda bitki regenerasyonu teşvik eden uygun ortamın belirlenmesi ve *Agrobacterium* 'un kanamisine dayanıklılık (*npt II*) ve β -glukuronidaz genlerini taşıyan pGA482GG plazmidini bulunduran EHA101 ırkı ile gen transferi yapmak amaçlanmıştır. Daha sonra kanamisin içeren ortam üzerinde gelişmesini sürdüren bitki doku parçalarını seçerek transgenik olduğu varsayılan sürgünlerin histokimyasal GUS analizi ile de test ederek daha sonra köklendirme ortamı üzerinde kültüre alınarak gelişmesini tamamlayan bitkilerin doğal koşullara adaptasyonlarını sağlamak hedeflenmiştir.

1) Bu amaçla hıyar bitkisi tohumları kabukları soyularak %10 konsantrasyonunda ticari sodyum hipoklorit ile steril edilerek ortam üzerinde karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda kullanılan doku parçalarından en fazla sürgün regenerasyonu tohum çimlenmesinden 5 gün sonra transformasyonda kullanılan eksplantlardan elde edilmiştir. Çimlenmeden 3 ve 10 gün sonra kullanılan bitki doku parçalarından sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

2) Uygun sürgün regenerasyonu ortamını belirlemek için yapılan ön çalışmalar sonucunda % 25 sürgün regenerasyonu başarıları ile 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir. Bunu % 20'lik başarı ile 1 mg/l zeatin içeren regenerasyon ortamı takip etmiştir. Araştırılan diğer hormon konsantrasyon ve kombinasyonları üzerinde kültüre alınan bitki doku parçalarında genellikle kallus oluşumu gözlenmiştir.

3) Araştırmada kullanılan bitki doku parçalarından en fazla sürgün regenerasyonu kotiledon yapraklar ortadan ikiye enine bölünerek damarlı kısmı ortama temas edecek şekilde kültüre alındığı zaman elde edildiği ve regenere olan sürgünlerin daha çok kotiledon yaprakların sapa bağlanan kısımlarından geliştiği gözlenmiştir. Hipokotil bitki parçalarından çok az sayıda sürgün oluştuğu daha çok kallus gelişimi olduğu izlenmiştir. Ayrıca petri içerisinde kültüre alınan bitki doku parçası sayısında bitki regenerasyonu üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir.

4) Gen transferi çalışmalarında bitki doku parçalarının uzun süre bakteri ile kökültüre alınması durumunda bakterilerin daha sonraki antibiyotik içeren ortam üzerinde kökültüre alındıklarında ölmeden gelişmesini devam ettirdikleri gözlenmiştir. Ayrıca gen transferi yapılırken bakteri solüsyonunun hazırlandığı ortam içerisine 50 µM asetosiringon ilavesinin transformasyon sıklığını arttırdığı belirlenmiştir. Gen transferi yapılmış bitki doku parçaları 50 mg/l kanamisin içeren bitki regenerasyon ortamı üzerinde kökültüre alındığında % 80'ninin gelişmesini devam ettirdiği belirlenmiştir. Gelişen bu doku parçalarına uygulanan histokimyasal GUS analizi sonucunda da uygulamadan 12 saat sonra dokularda aktarılan genin etkisi ile mavi renk değişimi gözlenmiş ve 24 saat sonra yapılan gözlemlerde de uygulamaya tabi tutulan doku parçalarından % 75'inin mavi renge dönüştükleri izlenmiştir.

5) Regenere olan transgenik olduğu tesbit edilen sürgünler basal MS ortamı üzerinde 3 hafta kökültüre alındıktan sonra 10 cm uzunluğunda kök oluşturdıkları ve bu şekilde gelişen bitkilerin saksılara aktarıldığında % 78'inin doğaya adapte olduğu belirlenmiştir. Klima odalarında saksılarda gelişen transgenik bitkilerin normal yeşil aksam ve çiçek oluşturdıkları gözlenmiştir.

6) Elde edilen transgenik bitkilerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Yapılan PZR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin elektroforezi yapılarak *npt II* genlerinin varlığı dolayısıyla da bitkilerin transgenik olduğu kanıtlanmıştır.

Yapılan bu çalışma ile hıyar bitkisinde daha sonra yapılacak tarımsal açıdan önemli olan genlerin aktarılması için uygun bir protokol oluşturulmuştur. Daha sonraki yapılacak çalışmalarda farklı hıyar çeşitleri ele alınarak bitki regenerasyon kapasiteleri saptanıp en yüksek kapasiteye sahip çeşit seçilebilir ve bu araştırma ışığı altında hastalık ve zararlılara dayanıklılık genleri bu araştırma ile belirlenen yöntemle göre bitkiye aktararak testlenebilir. Transgenik olduğu kanıtlanan bitkiler tarla koşullarına aktarılarak tohumları alınıp bu tohumlardan tekrar bitki yetiştirilerek bu bitkilerde aktarılan genlerin diğer nesillere de aktarıldığını belirlemek için tekrar test edilebilir.

KAYNAKLAR

- AMOR, M.B., M. GUİS, A. BOUZAYEN, J. C.PECH, and J.P. ROUSTAN, 1998. Expression of an Antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate Oxidase Gene Stimulates Shoot Regeneration in *Cucumis melo*. Plant Cell Reports, 17:6-7, 586-589.
- BURZA, W., S. MALEPSZY, 1995. Direct Plant Regeneration from Leaf Explants in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is Free of Stable Genetic Variation. Plant Breeding, 114:4, 341-345.
- CADE, R.M., T.C. WEHNER, F.A. BLAZICH, 1990. Effect of Explant Age and Growth Regulator Concentration on Adventitious Shoot Formation from Cucumber Cotyledonary Tissue. Report Cucurbics Cooperative, 13, 14-17.
- CHEE, P.P., 1990(a). High Frequency of Somatic Embryogenesis and Recovery of Fertile Cucumber Plants. HortScience, 25:7, 792-793.
- 1990(b). Transformation of *Cucumis sativus* Tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the Regeneration of Transformed Plants. Plant Cell Reports, 9:5, 245-248.
- CHEE, P.P., J.L. SLIGHTOM, 1991. Transfer and Expression of Cucumber Mozaic Virus Coat Protein Gene in the Genome of *Cucumis sativus*. J.Amer.Soc.Hort.Sci., 116:6, 1098-1102.
- CHEE, P.P., 1991. Plant Regeneration from Cotyledons of *Cucumis melo* "Topmark". HortScience, 26:7, 908-910.
- CHOI, P.S., W.Y. SOH, Y.S. KİM, O.J. YOO, and J.R. LIU, 1994. Genetic Transformation and Plant Regeneration of Watermelon Using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 13, 344-348.
- COLIJN-HOOYMANS, C.M., J.C. HAKKERT, J.J. ANSEN, J.B.M. CUSTERS, 1994. Competence for Regeneration of Cucumber Cotyledons is Restricted to Specific Developmental Stages. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 39:3, 211-217.

- COMPTON, M.E., and D.J. GRAY, 1993 (a). Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Diploid, Triploid, and Tetraploid Watermelon. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 118:1, 151-157.
- 1993 (b). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Cotyledons of Watermelon. *Plant Cell Reports*, 12:2, 61-65.
- DEBEAUJON, I., M. BRANCHARD, 1993. Somatic Embryogenesis in Cucurbitaceae. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 34:1, 91-100.
- DİE, 1998. Devlet İstatistik Enstitüsü Araştırma Sonuçları.
- DONG, J.Z., S. R. JIA, 1991. High Efficiency Plant Regeneration from Cotyledons of Watermelon (*Citrullus vulgaris* Schard.). *Plant Cell Reports*, 9:10, 559-562.
- EZURA, H., K.-I. YUHASHI, T. YASUTA and K. MINAMISAWA, 2000. Effect of Ethylene on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Gene Transfer to Melon. *Plant Breeding*, 119, 75-79.
- FANG, G., and R. GRUMET, 1990. *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation and Regeneration of Musk Melon Plants. *Plant Cell Reports*, 9, 160-164.
- FRALEY, R.T., S.G. ROGERS, R.B. HORSCH, P.R. SANDERS, J.S. FLICK, S.P. ADAMS, M.L. BITTNER, L.A. BRAND, C.L. FINK, J.S. FRY, G.R. GALLUPPI, S.B. GOLDBERG, N.L. HOFFMAN, S.C. WOO, 1983. Expression of Bacterial Genes in Plant Cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 80:4803-4807.
- GANAPATHI, A., R. PERL-TREVES, 2000. *Agrobacterium*-mediated Transformation in *Cucumis sativus* Via Direct Organogenesis. *Acta Hort.*, 510, 405-407.
- GRAY, D.J., D.W. MCCOLLEY, and M.E. COMPTON, 1993. High-frequency Somatic Embryogenesis from Quiescent Seed Cotyledons of *Cucumis melo* Cultivars. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 118:3, 425-432.
- GUEDES, N.M.P., P.H. JENNINGS, 1999. Somatic Embryogenesis using *Cucumis sativus* L. Cotyledons. *Seed-Technology*, 21:1, 72-76.

- ISLAM, R., A. AHAD, M.A. REZA, A.N.K. MAMUN, O.I. JOARDER, 1995. *In vitro* Plant Regeneration from Zygotic Embryos of *Citrullus lanatus* Thunb. Pakistan-Journal-of-Scientific-and-Industrial-Research, 38:11-12, 445-447.
- JEFFERSON, R.A., BURGESS, S.M., and HIRSH, D., 1987. Assaying Chimeric Genes in Plants. The Gus Fusion System. Plant Molecular Biology Reporter, 5: 387-405.
- KAYIM, M., 1997. Kütüden Limon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) Çeşidinde Genetik Transformasyon ve Transgenik Bitkilerin Elde Edilmesi. Ç.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, Adana.
- KİM, J., S. HAN, S.K. WON, H. LEE, Y. LİM, J.R. LİU, S.K. WAK, J.V. KİM, S.K. HAN, S.Y.K. WON, Y. TABEİ, S. KİTADE, Y. NİSHİZAWA, N. KİKUCHİ, T. KAYANO, T. HİBİ, K. AKUTSU, 1998. Transgenic Cucumber Plants Harboring a Rice Chitinase Gene Exhibit Enhanced Resistance to Gray Mold (*Botrytis cinerea*). Plant Cell Reports, 17, 159-164.
- KİM, J.W., H. SU-KYUNG, K. SUK-YOON, L. HAENG-SOON, L.P. YONG, L.R. JANG, K. SANG-SOO, 2000. High Frequency Shoot Induction and Plant Regeneration from Cotyledonary Hypocotyl Explants of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Seedlings. Journal of Plant Physiology, 157:1, 136-139.
- KLEE, H., R. HORSCH and S. ROGERS, 1987. Agrobacterium-mediated plant transformation and Its Further Application to Plant Biology. Annv.Rev.Plant Physiol, 38:476.
- KUIJPERS, A.M., 1996. Increase of Embryogenic Callus Formation in Cucumber by Initial Culture on High Concentration of 2,4-diclorophenoxyacetic Acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 46:1, 81-83.
- LOU, H., and S. KAKO, 1994. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Cucumber. HortSciense, 29:8, 906-909.

- LOU, H., P. OBARA-OKEYO, M. TAMAKI, S. KAKO, H.B. Lou, 1996. Influence of Sucrose Concentration on Morphogenesis in Cultured Cucumber Cotyledon Explants. *Journal of Horticultural Science*, 71:3, 497-502.
- MALEPSZY, S., K. WITKOWSKI, S. ZGAGACZ, 1991. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Variants Resistant to Metribuzin or Linuron are not Viable. *Report Cucurbit Genetics Cooperative*, 14, 34-42.
- MHATRE, M., M. MIRZA, P.S. RAO, 1998. Stimulatory Effect of Ethylene Inhibitors and Ortho-coumaric Acid in Tissue Cultures of Cucumber, *Cucumis sativus* L. *Indian-Journal-of-Experimental-Biology*, 36:1, 104-107.
- MISRA, A.K., S.P. BHATNAGAR, 1995. Direct Shoot Regeneration from the Leaf Explants of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Phytomorphology*, 45:1-2, 45-55.
- MOHIUDDIN, A.K.M., M.K.U. CHOWDHURY, Z.C. ABDULLAH, N. SUHAIMI, S. NAPI, 1997. Influence of Silver Nitrate (ethylene inhibitor) on Cucumber Shoot Regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 51:1, 75-78.
- MSIKITA, W., R.M. SKIRVIN, J.A. JUVIK, W.E. SPLITTSTOESSER, A. NAWAB, 1990. Regeneration and Flowering of "Burples Hybrid" Cucumber Cultured from Excised Seed. *HortScience*, 25:4, 474-477.
- MURASHIGE, T., F. SKOOG, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol.Plant.*, 15, 473-497.
- NADALSKA-ORCZYK, A., S. MALEPSZY, 1989. Culture of *Cucumis sativus* L. 7 Genes Controlling Plant Regeneration. *Theoretical and Applied Genetics*, 78:6, 836-840.
- NAWAB, A., R. SKIRVIN, W.E. SPLITTSTOESSER, and W.L. GEORGE, 1991. Germination and Regeneration of Plants from Old Cucumber Seed. *HortScience*, 6:7, 917-918.
- NAWAB, A., R.M. SKIRVIN, W.E. SPLITTSTOESSER, 1991. Regeneration of *Cucumis sativus* from Cotyledons of Small Explants. *HortScience*, 26:7, 925.

- NISHIBAYASHI, S., H. KANEKO, T. HAYAKAWA, 1996. Transformation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Plants Using *Agrobacterium tumefaciens* and Regeneration from Hypocotyl Explants. *Plant Cell Reports*, 15:11, 809-814.
- ONDREJ, V., B. NAVRATÍLOVA, and A. LEBEDA, 2000. Embryo Culture of Wild and Cultivated Species of the Genus *Cucumis* L. *Acta Hort.*, 510, 409-414.
- PUNJA, Z.K. and S.H.T. RAHARJO, 1996. Response of Transgenic Cucumber and Carrot Plants Expressing Different Chitinase Enzymes to Inokulation whit Fungal Pathogens. *Plant Disease*, 80:9, 999-1005.
- RAHARJO, S.H.T., M.O. HERNANDEZ, Y.Y. ZHANG, Z.K. PUNJA, 1996. Transformation of Pickling Cucumber whit Chitinase-encoding Genes Using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 15, 591-596.
- REICHERT, N.A., N.J. ZIMMERMAN, 1996. Somatik Embryogenesis Versus Organogenesis in Cucumber: Developing a Laboratory Exercise. *HortTecnology*, 6:1, 84-86.
- SCHULZE, J., C. BALKO, B. ZELLNER, T. KOPREK, R. HONSCH, A. NERLICH, R.R. MENDEL, 1995. Biolistic transformation of Cucumber using Embriyogenic Suspension Culters : Long-term Expression of Reporter Genes. *Plant Sci.*, 112:197-206.
- SHARMA, H.C., K.K. SHARMA, N. SEETHARAMA and R. ORTIZ, 2000. Prospects for Using Transgenic Resistance to Insect in Crop Improvment. *EJB. Electronic Journal of Biotechnology*.ISSN:0717-3458.
- SHARP, P.J., M. KREIS, P.R. SHEWRY and M.D. GALE, 1988. Location of B-amylase Sequences in wheat and its Relatives. *Theo.Appl.Genet.*, 75:286-290.
- SONGSTAD, D. D., C. L. ARMSTRONG, W. L. PETERSEN, B. HAIRSTON and M. A. W. HINCHEE, 1995. Advances in Alternative DNA Delivery Techniques. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 40:1-15.

- SRIVASTAVA, D.K., V.M. ANDRIANOW, E.S. PIRUZIAN, E.S. PIRUZIAN, J. PRAKASH, R.L. M. PIÉRIK, 1991. Regeneration and Genetic Transformation Studies in Watermelon (*Citrullus vulgaris* L. cv. Melitopolski). Horticulture New Technologies and Applications. Proceedings of the International Seminar on New Frontiers in Horticulture, Organized by Indo-American Hybrid Seeds, Bangalore, India, November 25-28, 1990. 1991, 127-130; Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol:12.
- SZALAI, J., 1995. The Micropropagation of Watermelon. Horticultural-Science, 27:3-4, 111-113.
- TABEL, Y., S. KITADE, Y. NISHIZAWA, N. KIKUCHI, T. KAYANO, T. HIBI, K. AKUTSU, 1998. Transgenic Cucumber Plants Harboring a Rice Chitinase Gene Exhibit Enhanced Resistance to Gray Mold (*Botrytis cinerea*). Plant Cell Reports. 17:159-164.
- TAN, M.M.C., E. M. RIETVELD, G.A.M.V. MARREWISK and A.J. KOOL, 1987. Refeneration of Leaf Mesophyll Protoplast of Tomato Cultivars. Factors Important for Efficient Protoplast Culture and Plant Regeneration. Plant Cell Reports, 6:172-175.
- TRULSON, A.J., R.B. SIMPSON and E.A. SHAHIN, 1986. Transformation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Plants with *Agrobacterium rhizogenesis*. Theor Appl Genet, 73, 11-15.
- VALLES, M.P., and J.M. LASA, 1994. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Commercial Melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro). Plant Cell Reports, 13, 145-148.
- ZAMBRYSKI, P., H. JOSS, C. GENETELLO, J. LEEMANS, M. VAN MONTAGU, J. SCHELL, 1983. Ti Plazmid Vector for the Introduction of DNA into Plant Cell without Alteration of Their Normal Regeneration Capacity. EMBOJ., 2:2143-2150.
- ZHANG, X.P., B.B. RHODES, J.W. ADELBERG, 1994. Shoot Regeneration from Immature Cotyledons of Watermelon. Report Cucurbit Genetics Cooperative, 17, 111-115.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Mersin'nin Mut ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Mut'ta tamamladım. 1995 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandım ve 1999 yılında birincilik derecesiyle mezun oldum. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı tarafından açılan yüksek lisans sınavına girerek Bitki Koruma Bölümünün Fitopatoloji Anabilim Dalı Biyoteknoloji Laboratuvarında yüksek lisans yapmaya hak kazandım.



EKLER

Ek 1. Bakteri kültürlerinde kullanılan antibiyotikler, bu antibiyotiklerin çözüldüğü maddeler, stok solüsyonları ve kullanma konsantrasyonları.

Kullanılan Antibiyotikler	Çözücü Madde	Stok Solüsyon (mg/ml)	Kullanılan Konsantrasyon (µg/ml)
Kloramfenikol	Metanol	20	20
Tetrasiklin	Metanol	10	10
Kanamisin	H ₂ O	10	25-50
Streptomisin	H ₂ O	200	100-200
Rifampisin	Metanol	10	50
Sefoksım	H ₂ O	25	250
Vankomisin	H ₂ O	25	250
Sefotaksim	H ₂ O	25	250

Ek 2. *Agrobacterium tumefaciens*' in geliştirilmesinde kullanılan katı YEP ortamı (pH 7.0 olmalı)

Kimyasallar	Miktarları (gr/l)
NaCl (Merck)	5
Yeast Ekstrakt (Difco)	5
Tryptone (Difco)	10
Agar (Difco)	15

Ek 3. Hıyar ve tütün bitki parçalarının kültüre alındığı MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortam içeriği

Kimyasallar	Miktarları (mg/l)
İnorganik Maddeler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ .EDTA..2H ₂ O	37,3
Organik Maddeler	
Myoinositol	100
Nikotinik asit	0,5
Piridoksin HCl	0,5
Thiamin HCl	0,1
Glisin	2
Sakkaroz	% 3
Phytogel	% 0,2

Ek 4. Histokimyasal GUS analizinde kullanılan X-Gluk analiz bafırı (X-Gluc)

Kimyasallar	Miktarları
5-Brom-4-klor-3-indolil-B-D-glukuronid	1 mM
NaHPO ₄	100 mM pH 7.0
Triton X-100	% 0.1
K + ferriksiyanit	4 mM
Kloramfenikol	100 µg/ml

Ek 5. Histokimyasal GUS anlizinde kullanılan sodyum fosfat buffer (pH 7.0 olmalıdır).

Kimyasallar	Miktarları
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (A)	0.05 M
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (B)	0.05 M

0.05 M konsantrasyonunda hazırlanan A solüsyonundan 39 ml, B solüsyonundan 61 ml alınarak karıştırıldığında elde edilen solüsyonun pH'sı 7.0 olur.

Ek 6: Asetosiringon (As) hazırlanması

Asetosiringon	Kullanılan Miktarlar
Asetosiringon	10 ml
Dimetil sulfoksit (DMSO) veya EtOH	0.5 ml
ddH ₂ O	9.5 ml

Solüsyon filtre ile steril edilir.

Transformasyon Denemelerinde Kullanılan Ortamlar ve Stoklar

Ek 7: Tütün transformasyon ortamı

Kimyasallar	Kullanılan Miktarları
MS makro elementleri	10 ml
MS mikro elementleri	10 ml
Sakkaroz	% 3
BAP	2 mg/l
NAA	0.5 mg/l
Asetosiringone	20 mg/l
MES	500 mg/l
Agar	% 0.8

Ek 8: Hıyar bitki eksplantlarının trasformasyon ortamı

Kullanılan Kimyasallar	Kullanılan Miktarları
MS ortamı	10 ml
Zeatin	2 mg/l z
Asetosiringon	20 mg/l
MES	500 mg/l
Sakkaroz	% 3
Phytogel	% 0.2

Ek 9: Moleküler Biyoloji Testlerinde Kullanılan Ortamlar Ve Stok Solüsyonlarının İçerikleri

TE Bafır

Tris-HCl (10mM)	1.21 gr
Na ₂ -EDTA (1 mM)	0.37 gr
ddH ₂ O	1000 ml

HCl asit ile pH 8.0'a ayarlandıktan sonra ddH₂O ile toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanır ve otoklav edilir.

1M Tris-HCl ph 8.0

Trisma-Base	60.6
ddH ₂ O	500 ml

300 ml ddH₂O içerisinde Tris çözülür HCl ile pH 8.00'a ayarlandıktan sonra toplam hacim ddH₂O ile 500 ml'ye ayarlanarak otoklav edilir.

5 M NaCl

NaCl	29.22 gr
ddH ₂ O	100 ml

Otoklav ile steril edilir.

0.5 M Na₂-EDTA pH 8.0

Na ₂ -EDTA	93 gr
ddH ₂ O	500 ml

400 ml ddH₂O'da Na₂-EDTA NaOH ile pH'sı ayarlandıktan sonra toplam hacim ddH₂O ile 500 ml'ye tamamlanır ve otoklav edilir.

Rnaz (10mg/1 ml stok)

Rnaz A (Sigma)	10 mg
ddH ₂ O	1 ml

15 dakika steril bidestile su içerisinde kaynatılır ve -20 °C'de saklanır.

5XTris Borik Asit Bafırı (TBE)

Trizma	54 gr
Borik asit	27.5 gr
0.5 M Na ₂ -EDTA	20 ml

ddH₂O ile toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanır ve otoklav edilir.

Etidyumbromid (EtBr) (0.8 µg/ml)

Etidyumbromid	4 µl
ddH ₂ O	50 ml

PZR Reaksiyon Karışımı

KCl	50 mM
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
MgCl ₂	2.5 mM
Her bir dNTP(dATP, dGTP, dCTP ve dTTP)'dan	200 µM
Her primer için	1 µM
Taq polimeraz	1 Unit