

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİNEM SERBEST-KOBANER

**HIYAR BİTKİSİNDE (*Cucumis sativus L.*) REJENERASYONUN
OPTİMİZASYONU ve *AGROBACTERIUM* ARACILIĞIYLA GFP (YEŞİL
FLORESAN PROTEİN) GENİNİN AKTARILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2006

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HIYAR BİTKİSİNDE (*Cucumis sativus* L.) REJENERASYONUN
OPTİMİZASYONU ve *AGROBACTERIUM*
ARACILIĞIYLA *gfp* (YEŞİL FLORESAN PROTEİN) GENİNİN
AKTARILMASI**

Sinem SERBEST-KOBANER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 07 /07 / 2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından **Oybirliği** /
Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

İmza.....

Doç.Dr.Yeşim YALÇIN-MENDİ
DANIŞMAN

İmza.....

Prof.Dr. Selim ÇETİNER
ÜYE

İmza.....

Doç.Dr.Mukaddes KAYIM
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof.Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2004YL32

- 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.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HIYAR BİTKİSİNDE (*Cucumis sativus* L.) REJENERASYONUN
OPTİMİZASYONU ve *AGROBACTERİUM*
ARACILIĞIYLA GFP (YEŞİL FLORESAN PROTEİN) GENİNİN
AKTARILMASI**

Sinem SERBEST-KOBANER

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Doç.Dr. N.Yeşim YALÇIN-MENDİ
Yıl : 2006, Sayfa : 97
Jüri : Doç.Dr. N.Yeşim YALÇIN-MENDİ
Prof.Dr. Selim ÇETİNER
Doç.Dr. Mukaddes KAYIM

Bu tezde, hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde etkili bir rejenerasyon ve *Agrobacterium* aracılığıyla gen transformasyonu yöntemi geliştirilmiştir. Çeşitli rejenerasyon ve transformasyon yöntemleri test edilmiştir. Dört günlük fidelerin kotiledon eksplantlarının 2 mg/l BAP+1 mg/l IAA ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınması ile en yüksek rejenerasyon frekansı (% 82) elde edilmiştir. rejenerasyon protokolü *Agrobacterium tumefaciens*'in, CaMV 35S promotorü kontrolünde *npt II* (seçici markör geni) ve yeşil floresan proteinini kodlayan mGFP5-ER genlerini taşıyan pBin-mGFP5-ER binari vektör plazmidi içeren, AGL-1 ırkı kullanılarak gen aktarılmış bitkilerin eldesinde başarı ile uygulanmıştır. Bakteri süspansiyonu ile enfekte edilen kotiledon eksplantları, 2 mg/l BAP, 1 mg/l IAA, 200 µM asetosiringon, 0.5 g/l MES ve phytigel içeren MS ortamında birlikte kültüre alınmıştır. Transform olmuş dokular çok erken bir dönemde el UV'si ile 254/365 nm emisyon aralığında tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hıyar, rejenerasyon, mGFP5-ER, transformasyon, *Agrobacterium tumefaciens*

ABSTRACT

MSc THESIS

REGENERATION OPTIMISATION OF CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.) and GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) GENE TRANSFORMATION via *Agrobacterium tumefaciens*

Sinem SERBEST-KOBANER

**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF CUKUROVA**

First Supervisor	: Doç.Dr. Neslihan Yeşim YALÇIN-MENDİ
Year	: 2006, Page: 97
Jury	: Doç.Dr. Neslihan Yeşim YALÇIN-MENDİ Prof.Dr. Selim ÇETİNER Doç.Dr. Mukaddes KAYIM

An efficient method for shoot regeneration and *Agrobacterium* mediated gene transformation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) has been developed in this study. The optimum regeneration and transformation protocol were tested. The use of cotyledon explants excised from 4 day-old seedlings cultured in Murashige and Skoog's medium, supplemented with 1mg/l BAP and 1 mg/l IAA, resulted in a high regeneration frequency (% 82). Regeneration protocol has been successfully applied to obtain transformed plants, using *Agrobacterium tumefaciens* strain AL-1 which is harboring a binary vector pBin m-GFP5-ER carrying *npt II* (selectable marker gene) and mGFP5-ER (Haseloff, 1995) (reporter gene), encoding green fluorescent protein, driven by cauliflower mosaic virus 35S promoter. Cotyledon explants, infected by *Agrobacterium* suspension, cocultivated in the MS medium supplemented with 2 mg/l BAP, 1 mg/l IAA, 200 µM acetosyringon, 0.5 g/l MES and phytigel. Transformed tissues were detected at a very early stage at 254/365nm emission by hand UV.

Keywords: Cucumber, regeneration, mGFP5-ER, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve yazım aşamasında yönlendirici katkılarıyla desteğini bulduğum danışman hocam ve ablam, Sayın Doç.Dr. Yeşim Yalçın-Mendi'ye; çalışmalarımı yürüttüğüm, aynı zamanda bana bir yuva olan Biyoteknoloji Laboratuvarının kurucusu Prof.Dr. Selim ÇETİNER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yürütülmesi aşamasında bilgi, deneyim ve en önemlisi bana olan inaçları ile her zaman yanımda hissettiğim Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı, Sayın Hocam Prof. Dr. Kazım ABAK'a, Prof Dr. Nebahat SARI'ya, Doç.Dr. Mukaddes KAYIM'a ve Bahçe Bitkileri Bölümü değerli öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuara ayak bastığım andan itibaren bana ablalık yapan sevgili hocam Yrd. Doç.Dr. Yıldız AKA-KAÇAR'a, bana zamanla en iyi dostlardan olan çalışma arkadaşlarım Ar. Gör. Songül ÇÖMLEKÇİOĞLU'na, Ar. Gör. Hatıra TAŞKIN'a, Ar. Gör. Mehtap YILDIZ'a, Ar. Gör. İlknur SOLMAZ'a, Aslıhan AGAR'a, İsmail VAROL'a, Aydın DEMİREL'e, Veysel ARAS'a, Şebnem DEMİRKAZIK'a, Tuğrul CEYHAN'a, Muzaffer İPEK'e ve çalışmada kullanmış olduğum hıyar tohumlarını hediye eden sevgili arkadaşım İbrahim MANCAK'a, tez çalışmalarım sırasında nöbetlerimi tutan öğretmen arkadaşlarım Seda TÜFEKÇİ ve Aslıhan DEMİRBUĞA'ya özel teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazım ve istatistik çalışmaları sırasında bana olan desteklerini esirgemeyen, en iyi dostlarım, Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda görev yapan Ar. Gör. İlker ÜNAL'a ve Öğr. Gör. Esin ÜNAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim sırasında ve hayatımın her aşamasında maddi-manevi destek sağlayan, sıkıntılı günlerimde daima sabır gösteren kız kardeşim Seda, annem Hatice ve babam İbrahim Serbest, sizi çok seviyorum. Babacığım bu tez en çok senin için...

Son olarak, akıl hocam, dostum, sevdiğim, sevgili eşim özel insan Murat KOBANER'e yanımda olduğu için teşekkür ederim.

SİMGE VE KISALTMALAR

ABA	: Absisik Asit
BAP	: 6-Benzyl amino purin
CaMV 35S	: Karnabahar mozaik virüsü 35 S promotörü
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksi asetik asit
g	: Gram
GA ₃	: Giberellik asit
GFP	: Green fluorescent protein geni(Yeşil floresan protein geni)
<i>gus</i>	: β - glucoronidase
HCl	: Hidroklorik Asit
IAA	: İndol-3-asetik asit
2IP	: İzopentil adenin
LB (sıvı)	: %5 Yeast extract + %1 tyrptone + % 1 NaCl (pH=7)
LB (katı)	: %5 Yeast extract + %1 tyrptone + % 1 NaCl +8 g/l Agar (pH=7)
MS	: Murashige and Skoog ortamı (1962)
KOH	: Potasyum Hidroksit
NAA	: Naftalen asetik asit
l	: Litre
mg	: Miligram
mg/l	: Miligram/Litre
ml	: Mililitre
<i>npt II</i>	: Neomycin phosphotransferase II
μ g	: Mikrogram
μ M	: Mikromol
ZEA	: Zeatin

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ I

ABSTRACTII

TEŞEKKÜR..... III

SİMGE VE KISALTMALAR..... IV

İÇİNDEKİLER..... V

ÇİZELGELER DİZİNİ..... VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ..... IX

ŞEKİLLER DİZİNİ..... IX

1. GİRİŞ1

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR7

2.1. Hıyar Bitkisinde (*Cucumis sativus* L.) Yapılmış Doku.....
Kültürü Çalışmaları7

2.2. Hıyar Bitkisinde (*Cucumis sativus* l.) *Agrobacterium*
Aracılığıyla Yapılmış Gen Transformasyonu Çalışmaları 11

2.3. Diğer Cucurbitacea Familyası Türlerinde Yapılmış
Doku Kültürü ve Gen Transformasyonu Çalışmaları 16

2.4. Çeşitli Bitki Türlerinde *GFP* Geni İle Yapılmış Çalışmalar21

3. MATERYAL VE METOD26

3.1. MATERYAL26

3.1.1. Rejenerasyon ve Transformasyonda Kullanılan Bitki.....
Materyalleri.....26

3.1.2. Transformasyonda Kullanılan Plazmid ve Bakteri
İrkları26

3.2. METOD27

3.2.1. Rejenerasyon Çalışmasında Uygulanan Denemeler27

3.2.1.1.	Hıyar Tohumlarının Sterilizasyonu	27
3.2.1.2.	Tohumların <i>In vitro</i> Ortamda Çimlendirilmesi	27
3.2.1.3.	Genel Doku Kültürü Şartları ve Besin	
	Ortamlarının Hazırlanması.....	27
3.2.1.4.	Araştırmada Kullanılacak Olan Eksplant	
	Kaynağının Belirlenmesi.....	29
3.2.1.5.	Rejenerasyon Ortamına Eklenecek Uygun	
	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin ve Uygun.....	
	Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	30
3.2.1.6.	Rejenerasyon ve Gen Transformasyonu	
	Çalışmalarında Kullanılan En Uygun Fide	
	Yaşının Belirlenmesi.....	31
3.2.1.7.	Rejenerasyon Ortamına ilave edilecek Uygun	
	Katılaştırıcı Maddenin Belirlenmesi.....	31
3.2.1.8.	Gen Transformasyonu Çalışmalarında Kullanılan	
	Etkili Kanamisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	32
3.2.2.	Gen Transformasyonu Çalışmasında Uygulanan	
	Denemeler	32
3.2.2.1.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ve İnokulasyon	
	Solüsyonunun Hazırlanması.....	32
3.2.2.2.	Eksplantların <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile	
	İnokulasyonu	33
3.2.2.2.1.	Eksplantların Bakteri Kültürü ile İnokulasyonundan	
	Önce Rejenerasyon Ortamında Kültüre Alınması.....	33
3.2.2.2.2.	Eksplantların Bakteri Kültürü ile İnokulasyonundan	
	Sonra Rejenerasyon Ortamında Kültüre Alınması.....	34
3.3.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ	36
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1.	Tohumların sterilizasyonu	37
4.2.	Uygun Bitki Rejenerasyon Ortamının Belirlenmesi	37

4.3.	Araştırmada Kullanılacak Olan Eksplant Kaynağının	
	Belirlenmesi.....	54
4.4.	Rejenerasyon ve Gen Transformasyonunda Kullanılan	
	En Uygun Fide Yaşının Belirlenmesi.....	58
4.5.	Rejenerasyon Ortamında Kullanılacak Katılaştırıcı	
	Maddenin Belirlenmesi	61
4.6.	Gen Transformasyonu Çalışmalarında Kullanılan Etkili	
	Kanamisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	63
4.7.	Eksplantların <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile	
	inokulasyonu ve Gen Transformasyonu	67
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	71
	KAYNAKLAR.....	75
	ÖZGEÇMİŞ.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	2005 FAO Verilerine Göre Hıyar Üretiminde İlk 5 Ülke Sıralaması ...	1
Çizelge 3.1.	MS Temel Besin Ortamında Bulunan Besin Maddeleri ve Konsantrasyonları (Murashige ve Skoog 1962).....	28
Çizelge 3.2.	Rejenerasyon Denemesinde Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri, Konsantrasyonları ve Kombinasyonları	31
Çizelge 4.1.	Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarında Kotiledon ve Flamingo-Bill Eksplantlarından Elde Edilen Tomurcuk ve Sürgün Oluşum Sayıları	38
Çizelge 4.2.	<i>In vitro</i> Ortamda Çimlendirilmiş Farklı Yaştaki Fidelerden Alınan Kotiledon Eksplantlarından Alınan Rejenerasyon Sonuçları.....	58
Çizelge 4.3.	<i>In vitro</i> ortamda çimlendirilmiş farklı yaştaki fidelerden alınan kotiledon eksplantlarından alınan rejenerasyon kapasitelerine ait p değerleri	59
Çizelge 4.4.	Agar veya Phytigel içeren ortam üzerindeki eksplantların oluşumlara ait yüzde değerleri	61
Çizelge 4.5.	Agar veya Phytigel içeren ortam üzerindeki eksplantların rejenerasyon kapasitelerine ait p değerleri	61
Çizelge 4.6.	Farklı kanamisin konsantrasyonlarında oluşan tomurcuk-sürgün ve beyazlaşan sürgün sayılarına ait değerler	63
Çizelge 4.7.	Kanamisinin Farklı Konsantrasyonlarını İçeren Ortamlarda Eksplantların Rejenerasyon Kapasitelerine Ait p Değerleri	64
Çizelge 4.8.	Kesim Sırasında ve Sonrasında İnokule Edilen Eksplantlardan Elde Edilmiş Transformant Sayısına Ait p Değerleri.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. GFP (Yeşil Floresan Protein) nin Moleküler Yapısı.....	5
Şekil 1.2. GFP (Yeşil Floresan Protein) Geninin Elde Edildiği <i>Aequoria victoria</i> Adlı Deniz Anası.....	6
Şekil 3.1. Pbm m-GFP-5-ER Doğrusal Plazmid Haritası.....	26
Şekil 3.2. ‘Flamingo Bill’ Tipi Eksplantların Hazırlanması	30
Şekil 3.3. İnokulasyon (Aşılama) Solüsyonu İçinde Bekleyen Kotiledon Eksplantları.....	35
Şekil 3.4. Kotiledon Eksplantlarının Antibiyotiksiz Rejenerasyon Ortamı Üzerine Yerleştirilmesi.....	35
Şekil 3.5. Gen Aktarılmış Eksplantların Seleksiyon Ortamına Yerleştirilmesi.....	36
Şekil 4.1. Kotiledon ve ‘Flamingo Bill’ Eksplantlarından BAP’ın Farklı Konsantrasyonlarından Gelişen Tomurcuk ve Bunlardan Gelişen Sürgün Oluşum Sayıları.....	40
Şekil 4.2. Kotiledon ve ‘Flamingo Bill’ Eksplantlarından Zeatin’in Farklı Konsantrasyonlarından Gelişen Tomurcuk ve Bunlardan Gelişen Sürgün Oluşum Sayıları.....	41
Şekil 4.3. BAP ve Zeatin’in Farklı Konsantrasyonlarının Kotiledon Eksplantında Tomurcuk Oluşumu ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısı Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.4. BAP ve Zeatin’in Farklı Konsantrasyonlarının Flamingo-Bill Eksplantında Tomurcuk Oluşumu ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısı Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.5. BAP ve IAA’in Dört Kombinasyonunun Her İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısı Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.6. 1 mg/L BAP ve BAP ile IAA’in Farklı Konsantrasyon Kombinasyonlarında, İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısının Karşılaştırılması.....	47

Şekil 4.7. 2 mg/L BAP ve BAP İle IAA’ın Farklı Konsantrasyon	
Kombinasyonlarında, İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu ve	
Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısının Karşılaştırılması	48
Şekil 4.8. 1 mg/L Zeatin ve BAP ile IAA’ın Farklı Konsantrasyon	
Kombinasyonlarında, İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu ve	
Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısının Karşılaştırılması	49
Şekil 4.9. 2 mg/L Zeatin ve BAP ile IAA’ın Farklı Konsantrasyon	
Kombinasyonlarında, İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu ve	
Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısının Karşılaştırılması	50
Şekil 4.10. Yalnız IAA İçeren MS Ortamında Kültüre Alınmış Eksplantlardan	
Kök Oluşumu	51
Şekil 4.11. Rejenerasyon Ortamında Kültüre Alınmış Eksplantlardan Tomurcuk	
Oluşumu.....	51
Şekil 4.12. Rejenerasyon Ortamında Kültüre Alınmış Eksplantlardan Sürgün	
Oluşumu.....	52
Şekil 4.13. Her İki Eksplantta da Farklı Ortamlarda Elde Edilen Tomurcuk	
ve Bu Tomurcuklardan Elde Edilen Sürgün Yüzdeleri ve Bunlara	
Ait %95’lik Güven Aralığı	53
Şekil 4.14. “Flamingo Bill” Tipi Elde Edilmiş Eksplanttan Sürgün Gelişimi.....	56
Şekil 4.15. Kotiledonların Proksimal Bölgelerinden Alınan Eksplantlardan	
Sürgün Gelişimi	57
Şekil 4.16. 2mg/L BAP + 1 mg/L IAA İçeren Rejenerasyon Ortamında	
Kotiledon Eksplantından Sürgün Gelişimi	57
Şekil 4.17. <i>In Vitro</i> Ortamda Çimlendirilmiş Farklı Yaştaki Fidelerden	
Alınan Kotiledon Eksplantlarının Rejenerasyon Kapasiteleri	60
Şekil 4.18. Agar ve Phytigel (Gelrite) Kullanımının Rejenerasyon ve	
Vitrifikasyon Üzerine Etkisi	62
Şekil 4.19. Phytigel (Gelrite) İçeren Rejenerasyon Ortamı Üzerinde	
Sürgün Oluşumu	63
Şekil 4.20. Rejenerasyon Ortamında Bulunan Kanamisin Konsantrasyonun	
Tomurcuk ve Sürgün Oluşumuna Ait Etkisi	65

Şekil 4.21. Rejenerasyon Ortamında Bulunan Kanamisin Konsantrasyonun Tomurcuk ve Sürgün Oluşumu ile Beyazlaşma Üzerine Etkisi.....	66
Şekil 4.22. Kanamisin Varlığında Beyazlaşan Tomurcuk ve Sürgün Oluşumu	66
Şekil 4.23. Kesim Sırasında ve Sonrasında İnokule Edilen Eksplantlardan Elde Edilmiş Transformant Oluşumu.....	68
Şekil 4.24. GFP Geninin İfade Olduğu Kotiledon Eksplantları.....	69
Şekil 4.25. El UV'si Altında Eksplantın Kesilmesi ile Elde Edilen Parçalarda GFP Gen İfadesi.....	70
Şekil 4.26. Parçalara Bölünmüş Kotiledon Eksplantında GFP Geninin İfadesi	70

1. GİRİŞ

Cucurbitacea familyası türlerinden hıyar (*Cucumis sativus L.*), günümüzde en çok tüketilen sebzelerin biridir. Hıyarda açık tozlanan çeşitlerin yanı sıra, hibrit çeşitler de geliştirilmiştir. Örtü altı yetiştiriciliğinin neredeyse tamamına yakını bu hibrit ve partenokarpik olarak meyve bağlayan çeşitlerle yapılmaktadır. Geliştirilen bu verimli ve erkenci çeşitler sonucunda ülkemiz 1,7 milyon tonluk üretimiyle Dünya üretiminde Çin'den sonra ikinci sırayı almaktadır (Anonim, 2005).

Çizelge 1.1. 2005 FAO Verilerine Göre Hıyar Üretiminde İlk 5 Ülke Sıralaması

	Hıyar	Yıl
	Üretim (Mt)	2005
1	Çin	26,559,600
2	Türkiye	1,725,000
3	İran	1,400,000
4	Rusya	1,300,000
5	Endonezya	423,333

Bu kültür bitkisinde, abiyotik stres faktörleri ile birlikte çeşitli hastalık ve zararlılar gibi biyotik faktörler de önemli ürün ve kalite kayıplarına, birim alandan alınan verimin azalmasına, bazı çeşitlerimizin kaybolma tehlikesiyle karşı karşıya kalmasına neden olmaktadır (Schulze ve ark., 1995). Bunların içinde de doğrudan mücadelesi olmadığı için Zucchini Sarılık Mozaik Virüsü (ZYMV) ve Hıyar Mozaik Virüsü (CMV) gibi ülkemizde yaygın olarak görülen virüs hastalıkları özellikle tehlike oluşturmaktadır. Ürün kayıplarını azaltmada, virüs hastalıkları dışında hastalık ve zararlılarla mücadelede en yaygın olarak kimyasal uygulamalardan yararlanılmaktadır. Hastalık etmenlerinin kimyasal maddelere dayanıklı ırklar geliştirmeleri yeni ve farklı kimyasalların kullanımını gerekli kılmaktadır. Kullanılan kimyasallar doğal denge ve insan sağlığını tehdit ederek önemli çevre sorunları

oluşturmaktadır. Özellikle son yıllarda çevre bilincinin artması ile birlikte hastalık ve zararlılara toleranslı veya dayanıklı çeşit geliştirme yönünde çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (Çetiner, 1993). Yüksek verimli, hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde genellikle klasik ıslah yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Ancak bitkiler arasındaki seksüel uyumsuzluklar, istenmeyen özelliklerin de bitkiye aktarılma riski ve ıslahın uzun zaman alması gibi nedenler, genetik transformasyon yöntemlerinin kullanımını gerekli kılmaktadır.

Başarılı bir genetik transformasyon yapabilmek için öncelikle etkili bir rejenerasyon protokolünün oluşturulması gerekmektedir. Bitkiyi meydana getiren ve son farklılaşmasını tamamlamış olan canlı hücrelerden herhangi birisinin tekrar bölünerek ve farklılaşarak yeni bir bitki meydana getirebilme kapasitesi olan totipotensi özelliği kullanılarak protoplastların, hücrelerin, dokuların ve organların kültürleri yapılarak *in vitro* bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmektedir. Organogenesis ise hücrelere ve dokulara baskı uygulanarak bazı değişikliklere sebep olunarak sürgün veya kök primordiyumu (taslağı) diye isimlendirilen tek kutuplu ve vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesine yol açan bir işlemdir. *In vitro* organogenesis üzerine yapılan araştırmaların büyük bir kısmında, etkin bir organ oluşumunun yerine getirilebilmesi için gerekli olan şartlardan en önemli olanları arasında; 1) Uygun eksplantın seçilmesi, 2) Büyümede aktif maddeleri içeren uygun bir besin ortamının seçilmesi ve 3) Fiziksel çevre koşullarının kontrolü sayılabilmektedir (Gürel ve Wren, 1995). Hıyar kültür bitkisinin organogenesisi üzerine ilk rapor, Maciejewska-Potapczykowa ve ark., (1972) tarafından yapılmış olmakla birlikte günümüze kadar bu kültür çalışmasında yapılmış pek çok organogenesis ve gen transformasyonu çalışması bulunmaktadır.

Ancak yayımlanmış bu çalışmalar sonucunda gerek genotip etkisi gerek eksplant kaynağı gibi çeşitli faktörler sebebi ile bu kültür bitkisinde, sürekli ve tatmin edici bir organogenesis ve gen transformasyon protokolü oluşturulamamıştır. Bu çalışmada yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı bitki biyoteknolojisi yöntemlerinden, *in vitro* organogenesis ve genetik transformasyon teknikleri üzerinde durulacaktır. Genetik transformasyon yöntemleri bitkiler arasındaki uyuma bakmaksızın farklı iki organizma arasındaki gen aktarımına olanak sağlamakta ve

klasik ıslah yöntemlerine destek olmaktadır. Genetik transformasyon, yabancı nükleik asit molekülünün hücreye girişi (insersiyon), genoma bağlanması (entegrasyon), genin anlatımının yapılması (eksprasyon, ifade) ve yavru döllere aktarımı aşamalarından oluşmaktadır. Bitkilere gen aktarımı; elektroporasyon, biyolistik partikül bombardımanı, mikro-injeksiyon, sonikasyon ve desikasyon gibi doğrudan gen aktarım yöntemleri ile yapılabildiği gibi *Agrobacterium* ve bitki virüs DNA'sının vektör olarak kullanılması ile de yapılabilmektedir (Akçelik, 2001, Genetik Mühendisliği Ders Notları, Ankara Üniversitesi)

Rhizobiaceae familyasının bir türü ve aynı zamanda doğanın genetik mühendisi olan *Agrobacterium*, bitkinin kök boğazında oluşan yaralardan bitkiyi enfekte ederek kök boğazı uruna neden olan Gram (-) bir bakteridir. *Agrobacterium* enfeksiyonu sonucunda bitki hücresinde bulunan Ti (Tumor inducing) plazmidi üzerinde yer alan hareketli bir DNA parçası olan T-DNA (Transfer DNA) bitki hücrelerine aktarılmakta ve kromozomlarla sabit olarak bütünleşmektedir (De la Riva ve ark., 1998; Zaenen ve ark., 1974). Araştırmacılar T-DNA sınırları içerisine yerleştirilen herhangi bir DNA parçasının kolaylıkla bitki hücresine aktarılabilirdiğini keşfetmişlerdir (Leesman ve ark., 1982; Schell ve Montagu, 1983).

Transfer edilmek istenen genlerle birlikte, transgenik hücrelerin ve bunlardan gelişen sürgünlerin seleksiyonu için kanamisine dayanıklılığı sağlayan neomisin fosfotransferaz (*npt II*), higromisine dayanıklılığı sağlayan higromisin fosfotransferaz (*hpt*) v.b. gibi markör yani seçici işaret genleri ile genin bitkide ifadesini sağlayacak uygun bir promotor ve transfer edilen genin izlediği yolları takip etmemizi sağlayan raportör genler de aktarılacak gen bölgesine eklenmelidir.

Bitkilere aktarılan belli genlerin aktarılmış oldukları dokularda ifade edilip edilmedikleri çoğu zaman kolayca anlaşılamamaktadır. Pek çok örnekte, aktarılan genin ürünü olan protein belirli koşullarda ve belirli hücre tiplerinde sentezlenmekte ve bu genlerin ürünleri her zaman kolaylıkla saptanabilecek bir enzimatik aktivite veya diğer fonksiyonel aktiviteler ile ilişkili olmayabilmektedir. Bu nedenle, gen aktarımı için kullanılan vektörlere ürününün kolaylıkla ayırt edilebileceği raportör genlerin yerleştirilmesi gerekebilmektedir (Arı, 2001). Araştırmacılar tarafından kullanılmakta olan çeşitli raportör genler bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak

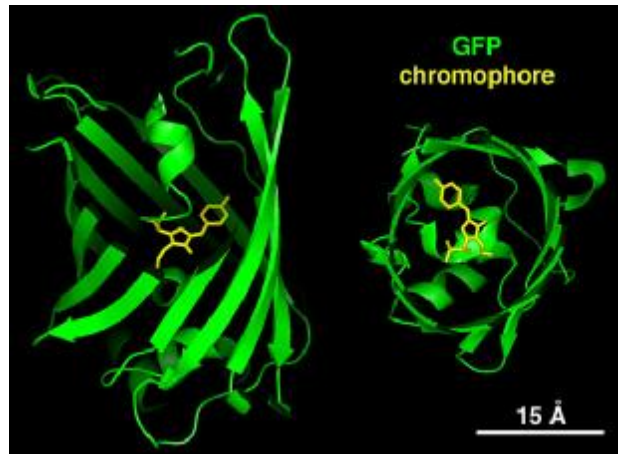
kullanılan *E.coli* bakterisinden izole edilmiş olan, β -glukuronidaz enzimini kodlayan ***gus (uidA)*** genidir. *gus* geninin ifadesi sonucu ürünler spektrofotometrik ve histokimyasal yöntemlerle (Jefferson ve ark.,1987) belirlenebilmektedir. Ancak bu yöntem canlı hücre ve dokular için toksik ve tahrip edici olduğundan *in vivo* koşullarında gen ürününün fonksiyonlarını izlemede kullanılamamaktadır. Gözle gözlenilebilir ve sıklıkla kullanılan bir diğer raportör gen de Lusiferaz enzimini kodlayan, ateş böceğinden izole edilip klonlanan ***luc*** genidir. Lusiferin etkin maddesi, nakledilen organizmada fosforlu sarı ışık yansıtmaktadır. Fakat bu yöntem dışarıdan bir substrata (Lusiferin) ihtiyaç göstermektedir ve pahalı bir yöntemdir. Ayrıca ışığı yalnız çok düşük seviyelerde yaydığı için transgenik bitkilerin seçiminde yaygın olarak kullanılmamaktadır (Molinier J. ve ark.;1999, Ow ve ark., 1986)

Son yıllarda 509 nm dalga boyunda yeşil parlak ışık veren yeşil floresan proteinini kodlayan (GFP) adlı raportör geni, gen transformasyonu çalışmalarında önemli bir yer kazanmıştır. GFP geni Pasifik sahillerinde yaşayan ve mavi ışık yayan *Aequoria victoria* denizanasından izole edilip klonlanmıştır. *Aequoria victoria* üzerindeki ilk araştırmalar Shimomura ve ark. tarafından 1960'lı yıllarda başlamıştır. Rekombinant DNA teknolojisinde GFP geninin markör gen olarak kullanılmaya başlanması ilk olarak model organizmalar olan *E. Coli* bakterisi ve *Caenorhabditis elegans* nematodunda gösterilmiştir (Chalfie ve ark, 1994). Bu tarihten sonra GFP geni çeşitli organizmalarda (bakteri, maya, sinek, çeşitli memeliler... v.b.) raportör gen olarak kullanılmaya başlamıştır. Bitkilerde ilk çalışmalar ise model bitki olan *Arabidopsis* (Sheen ve ark.1995), portakal (Niedz ve ark, 1995), ve tütünde (Reichel ve ark.) yapılmıştır. GFP tarafından sentezlenen yeşil floresan proteini, 238 aminoasit molekülünden meydana gelmektedir. Bu 238 molekülün meydana getirdiği üç boyutlu yapı silindire benzemektedir. Molekülün ışık vermesini sağlayan yapı sarmalın ortasında yer almaktadır. Genelde ışık verme özelliği gösteren proteinler tek başlarına çalışamayıp, yardımcı bir molekül veya protein varlığına ihtiyaç duymaktadırlar. Yeşil floresan proteinin ise başka bir proteine, moleküle veya kimyasal reaksiyona ihtiyaç duymadan etrafına floresan yeşil ışık vermesi, keşfinden hemen sonra biyolog ve biyoteknoloji uzmanlarının ilgisini çekmiştir. Bu protein üzerinde pek çok çalışmalar yapılmış ve sadece yeşil değil kırmızı veya mavi gibi

diğer renklerde de ışık verebilen proteinler bulunmuş, ayrıca yalnızca mavi ışıkla değil, morötesi gibi değişik ışıklarla da aktif hale gelen, uyarılan floresan proteinleri yapılmıştır. Bitkilerde daha etkili bir ekspresyon elde edebilmek amacı ile çeşitli araştırmacılar tarafından yabancı tip GFP'nin farklı varyeteleri yani mutantları geliştirilmiştir (Stewart, 2001). GFP'nin toksik etkilerinin olduğu düşünüldüğünden Haseloff ve ark., 1997 tarafından tarafından yüksek protein ifadesi gösteren mGFP5-ER ve mGFP4-ER varyantları geliştirilmiştir. Bu iki varyant hücrede itoplazma içinde değil de endoplazmik retikulum organeli içinde ifade (eksprese) olmaktadır (Elliot ve ark., 1999)

Canlı hücre ve organizmalardaki dinamik değişimleri anında gözleme olanağı sağlaması, dışarıdan bir substrata ihtiyaç göstermemesi, gus ve diğer birçok raportör gen gibi hücre ve dokuyu tahrip edici olmaması ve *in vivo* ortamda gözlemin sürekli ve kolay olması gibi nedenlerden dolayı GFP raportör geni son yıllarda diğer raportör genlere tercih edilmektedir (Stewart , 2001).

Bu tez çalışmasında amaç, hıyar kültür bitkisinde (*Cucumis sativus* L.) etkili bir rejenerasyon protokolü oluşturmak ve *Agrobacterium tumefaciens* vasıtasıyla hıyar bitkisine GFP geninin başarılı transformasyonunu gerçekleştirmek olmuştur.



Şekil 1.1. GFP (yeşil floresan protein) nin Moleküler Yapısı
(<http://www.mekentosj.com>)



Şekil 1.2. GFP (yeşil floresan protein) Geninin Elde Edildiği *Aequoria victoria* Adlı Deniz Anası (<http://www.steve.gb.com/images/science/aequoria.jpg>)

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hıyar Bitkisinde (*Cucumis sativus* L.) Yapılmış Doku Kültürü Çalışmaları

Wehner ve Locy (1981) tarafından hıyarın rejenerasyonu ile ilgili ilk çalışmalardan birisi yapılmıştır. 85 çeşide ait 7 günlük fidelerden kotiledon ve hipokotil eksplantları alınarak 1 mg/l BA ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamında 45 gün kültüre alınmıştır. Her bir kallus parçasından gözlenebilen sürgün ve kök sayısı kaydedilmiştir. Hipokotil dokusundan sürgün oluşumu gözlenmezken, kotiledon dokusundan % 33 oranında sürgün gelişimi gözlenmiştir. Genellikle her bir eksplantın birden fazla sürgün oluşturmadığı ve kök oluşumu bakımından hipokotil ve kotiledon eksplantları arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı bildirilmiştir. En yüksek sürgün oluşturma kapasitesinin % 53'lük oranla PI 279463 ve % 40'luk oranla PI 401732 hatlarının kotiledonlarından elde edildiği kaydedilmiştir.

Novak ve Dolezelova (1982), hıyarın *in vitro* doku kültüründe büyüme ve farklılaşma üzerinde hormon kontrolünün etkisini 5 farklı çeşit üzerinde araştırmışlardır. 8 günlük fidelerin kotiledonlarından kallus dokusu oluşturmak üzere IAA, BAP, NAA, Kinetin ve 2,4-D hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonları ile karanlık ve aydınlık denemesi uygulanmıştır. IAA uygulamasının gerek karanlık gerekse aydınlık ortamda yalnız kök oluşturduğu, uzun süreli kallus oluşumunda en uygun NAA ve BAP kombinasyonunun olduğu, düşük NAA ve BAP konsantrasyonlarında (3 µM'a kadar) kök ve sürgün oluşumunun meydana geldiği bildirilmiştir.

Trulson ve Shahin (1986) tarafından hıyar bitkisinde yapılmış olan *in vitro* rejenerasyon çalışmasında, 'Straight Eight'çeşidine ait 5 günlük fidelerin kotiledonları ve kökleri eksplant kaynağı olarak kullanılırken; kotiledon diskleri ve kök parçaları embriyo gelişimini uyarmak amacı ile 1 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 mg/l α -naphtaleneacetic acid (NAA) ve 0,5 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) içeren yarı katı MS ortamında kültüre alınmıştır. Kotiledon eksplantlarının kesim yerlerinde 2-3 hafta sonunda 1-2 mm büyüklüğünde

sarımsı yeşil embriyoların oluştuğu gözlenirken kök dokusunda ise embriyo uyartımı 3-4 hafta sonra belirlenmiştir. Hem kotiledon hem de kökten elde edilmiş embriyoların 1mg/l NAA ve 0,5 mg/l BAP içeren ortama aktarıldığında genişlediği, yeşile döndüğü ve görülebilen yaprak yapılarını oluşturduğu, bitkicik rejenerasyonunun ise bu embriyoların hormonsuz MS ortamına aktarılması ile elde edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar aynı çalışmada protoplastları kullanarak hıyar rejenerasyonunu denemişler ve mini kallus oluşum frekansının normal, bipolar embriyo oluşum frekansının ise düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Gambley ve Dodd (1990), kotiledon eksplantlarından rejenerasyon elde etmek amacıyla, farklı sitokininler (BAP, kinetin, 2iP) ve oksinler (IAA ve NAA) denemişlerdir. Tüm sitokininlerden sürgün elde edilmeisne rağmen en uygun sitokininin 2 mg/l Kinetin olduğu tespit edilmiş ve eksplant büyüklüğü denemesinde yine bu hormon kullanılmıştır. Oksin varlığında, kallus oluşumu gözlenirken, sürgün gelişimi saptanamamıştır. Eksplantlar küçük parçalara kesilerek kültüre alındığında, eksplant üzerinde gelişen sürgün sayısının arttığı bildirilmiştir.

Msikita ve ark. (1990), ‘Burbless hybrid’ hıyar tohumlarının kabuklarını soyup steril ettikten sonra kotiledonları keserek BAP ve NAA’in 16 farklı kombinasyonunda kültüre almışlardır. 8 hafta sonunda NAA ve BAP arasında sürgün rejenerasyonu bakımından önemli bir ilişki gözlenmediği ve en iyi sürgün gelişiminin 2 mg/l BAP’dan elde edildiği olduğu rapor edilmiştir. Sürgün gelişiminin BAP konsantrasyonunun arttırılması ile (2’den 5 mg/l’ye gözlenmiştir) önemli bir şekilde düştüğü gözlenmiştir.

‘Sumter’ ve ‘Straight 8’adlı iki hıyar çeşidinde **Cade ve ark. (1990)**’nın yapmış oldukları bir rejenerasyon çalışmasında tohumlar yüzeysel olarak steril edildikten sonra, % 50’lik kloroks çözeltisinde 30 dk. bekletilmiş ve 5 defa steril saf su ile yıkanmıştır. Tohumlar, her birine 10 tane gelecek şekilde % 1 Bactoagar içeren petri kaplarında 30 °C’de çimlendirme amacı ile 2, 4, 6, 8 veya 10 gün süresince kültüre alınmıştır. Bu sürelerin sonunda çimlenmiş fidelerin kotiledonları kesilerek alınan eksplantlar 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren Murashige-Skoog (MS) içeren besin ortamlarında kültüre alınmıştır. ‘Sumter’ çeşidinin 4 günlük; ‘Straight 8’çeşidinin ise 5 günlük fidelerinden alınan eksplantlarda 3-4 hafta sonunda sürgün

oluşumu gözlenirken, 8 ve 10 günlük çimlendirme süresi uygulamasında sürgün gelişim oranının düştüğü, en yüksek oranın 6 günlük fidelerin kotiledonlarından alındığı rapor edilmiştir.

Aynı araştırmacılar tarafından bu çalışmaya paralel olarak, Gy14A hattına ait, *in vitro* ortamda çimlendirilmiş, 5 günlük fidelerin kotiledonları NAA ve BA büyüme düzenleyicilerinin 16 farklı kombinasyonunu (NAA ve BA'nın her biri için 0, 0.1, 0.3 ve 1 ppm) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. NAA konsantrasyonunun, oluşan sürgün sayısını oldukça etkilediği, ortamda NAA olmadığında, BA'nın 3 mg/l konsantrasyonu hariç tüm konsantrasyonlarında sürgün gelişiminin gözlemlendiği ancak en yüksek sürgün oluşumunun 0.3 mg/l BA içeren ve NAA içermeyen MS ortamında gözlemlendiği bildirilmiştir.

Ali ve ark. (1991)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, 6 çeşide ait hıyar tohumları kullanılmıştır. Kotiledonlar kesilerek BAP ve NAA'nın farklı kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Rejenerasyon çalışması sonucunda aynı konsantrasyon ve kombinasyonlarda büyüme düzenleyicilerine karşı; 'Marketer', 'Marketmore', 'Wisconsin SMR-18', 'Tablegreen', 'Spotfree' ve 'China' çeşitlerinin farklı tepkiler verdiği ve kiminin hiç sürgün oluşturmazken, bazı çeşitlerin ise yüksek oranda sürgün oluşturduğu rapor edilmiştir. Sürgün oluşumu üzerine genotip farklılığının etkisi olduğu bildirilmiştir.

Nawab ve ark. (1991)'nin 'Burbless Hibridi' çeşidi ile yapmış oldukları rejenerasyon çalışmasında eksplantlar, 4 mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA içeren modifiye edilmiş MS ortamı üzerinde kültüre alınmış, sürgün rejenerasyonu ile gelişmiş sürgünler, 1.5 mg/l NAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Araştırmacılar kotiledonunun sapa bağlanan (proksimal) kısımları ile uç kısımlarından (distal) rejenere olan bitki sayısı arasında önemli bir fark olduğunu belirlemişlerdir. Eksplant büyüklüğünün de incelendiği çalışmada, kotiledonlar 24 parçaya ayrıldığında sadece 2 sürgün geliştiği, 6 parçaya ayrıldığında % 47 oranında bir artış ile 54 sürgünün rejenere olduğu; 4 parçaya ayrıldığında 17 bitki, 2 parçaya ayrıldığında ise 28 bitki elde edildiği, bunun yanında kotiledonlar tüm olarak kültüre alındığında çok az sayıda sürgün gelişiminin olduğu tespit edilmiştir.

Hooymans ve ark. (1994)'nın kotiledon eksplantlarından 6 hafta içinde yüksek oranda rejenerasyon elde ettikleri çalışmada, 3-5 günlük fideler kullanıldığında, sürgün oluşumunun, % 100 arttığını bildirmişlerdir. Rejenere olmuş bitkilerin normal görünüşlü ve sağlıklı çiçek oluşumu göstererek tohum oluşturduğu rapor edilmiştir. 7 günlük veya daha yaşlı kotiledonlarda sürgün oluşumunun dramatik olarak düştüğü ve oluşan sürgünlerin ise poliploidy/mitoploidy özelliği ile anormal morfoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Fide gelişim sürecinde (3-13 gün) kotiledon hücre DNA'larında değişiklik olduğu ve bu değişikliğin bitki rejenerasyon kapasitesini etkilediği belirtilmiştir.

In vitro'da çimlendirilmiş yedi hıyar çeşidine ait fidelerden, farklı doku teknikleri uygulanması amacı ile kotiledon, genç yaprak, ilk yaprak ve internod olmak üzere farklı tipte eksplantlar alınmıştır. Bu eksplantlardan embriyo gelişim düzeyleri belirgin farklılık gösterirken, en yüksek embriyo gelişimi 'Fushinarimidari' çeşidinin hem kotiledon hem de ilk yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. 'Aonaya F1' çeşidinde internodlardan da somatik embriyoların geliştiği ancak kotiledon ve ilk yapraklardan internodlara göre daha çok embriyogenik kallus oluştuğu bildirilmiştir. 'Fushinarimidari' çeşidine ait kotiledon eksplantlarından % 6-9 oranında sakkaroz içerikli ortamda embriyogenik kallus oluşumunun % 90 oranında arttığı kültür ortamında sakkaroz seviyesinin % 12 olduğu durumda, kallus oluşumu ve gelişiminin engellendiği tespit edilmiştir (**Lou ve Kako, 1994**).

Burza ve Malepszy (1995), *C.sativus*'a ait 2 hattın ve *C.anguria*'nın yaprak eksplantlarını kullanarak, hızlı ve genetik varyasyon olmaksızın sürgün gelişim protokolü oluşturmuşlardır. Bu protokolde, çimlendirme ortamı içeriğindeki $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ oranı ile ilgili 2 değişik uygulama yapılmış; birinci uygulamada KNO_3 içeren fakat NH_4NO_3 içermeyen $\frac{1}{2}$ MS makro kullanılırken, ikinci uygulamada NH_4NO_3 içeren fakat KNO_3 içermeyen $\frac{1}{2}$ MS makro tuzları kullanılmıştır. Ayrıca BA, Kinetin, Zeatin, 2iP sitokininlerin ve IAA, NAA oksinlerinin farklı kombinasyonları ile kotiledon yaşı denenmiştir. En yüksek rejenerasyon $1.7\times$ NH_4NO_3 içeren fakat KNO_3 içermeyen genç yaprak eksplantlarından sağlanmıştır (% 46). $1.7\times$ NH_4NO_3 içeren fakat KNO_3 içermeyen olgun yaprak eksplantlarından düşük rejenerasyon oranı elde edilmiştir (% 2). B hattında en yüksek rejenerasyonu,

2iP:2,4-D (0.8/0.8 mg/l) kombinasyonu verirken, S hattında, 2iP:NAA (0.4/0.8); *C.anguria*'da 2iP:NAA (0.4/0.8 mg/l) kombinasyonlarının verdiği bildirilmiştir.

Kim ve ark. (2000), tarafından 3-5 günlük fidelerden elde edilen 'kotiledonumsu hipokotil'olarak adlandırılan eksplantlar, 2 mg/l Zeatin içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. '1 kotiledon + 2 mm hipokotil' ve 'yarım kotiledon + 2 mm hipokotil'eksplantlarından %80-90 oranı ile en yüksek rejenerasyon oranı elde edilmiştir. 2 kotiledonlu veya hipokotili 2 mm'den uzun eksplantlarda rejenerasyon oranı düşmüştür. Elde edilen sürgünler, 1 mg/l IAA ortamında köklenmeye alınmışlardır.

Mendi (2003), tarafından farklı kotiledon yaşı (6, 15, 21 saat ve 3 gün); kotiledon pozisyonu (distal ve proksimal bölge) ve büyüme düzenleyicileri (BAP ve Zeatin) karşılaştırılarak, hıyar bitkisinde, rejenerasyonu etkileyen faktörler araştırılmıştır. Sürgün oluşumu 20. günde tespit edilmiştir. 6-15 ve 21 saatlik kotiledonların proksimal bölgelerinden benzer sonuçlar alınırken (2-2.7 sürgün/eksplant), distal kısımlardan daha az sayıda sürgün elde edilmiştir (0.75-1.5 sürgün/eksplant). 3 günlük kotiledonların proksimal bölgelerinden 0.75 sürgün/eksplant elde edilirken, distal kısımdan 0.25 sürgün/eksplant elde edilmiştir. BA veya Zeatin kullanımının sürgün oluşumu üzerine etkisinin istatistiksel açıdan önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

2.2. Hıyar Bitkisinde (*Cucumis sativus* L.) *Agrobacterium* Aracılığıyla Yapılmış Gen Transformasyonu Çalışmaları

Trulson ve ark. (1986) yapmış oldukları bir çalışmada hıyar bitkilerinin (*Cucumis Sativus* L.cv. "Straight Eight") hipokotil doku parçalarını *Agrobacterium rhizogenesis*'in pARC8 ve buna ek olarak, Ri plazmidini taşıyan ırkı ile ko-kültüre almışlar, transgenik bitkilerin seleksiyonunda *npt II* markör geni ve Southern blot analizi yapmışlardır. Seleksiyon amaçlı Kanamisinli ortamda sağlıklı sürgün oluşturan bitkilerin *npt II* açısından pozitif sonuç verdiği bu yüzden bunların transgenik olduğu düşünülmüş fakat southern blot analizi sonucu transgenik

bitkilerin çoğunun vektör DNA'sını taşıdığı fakat bazılarının Ri plazmid DNA'sını taşımadıkları gözlenmiştir.

Chee (1990)'nin yapmış olduğu çalışmada hıyar bitkisinin (*Cucumis Sativus L.*) Poinsett 76 çeşidinin 3-5 günlük kotiledonlarına *A. Tumefaciens*'in *npt II* genini içeren C58Z707 suşu ile gen transformasyonu yapılarak, somatik embriyogenesis yoluyla yüksek sayıda normal morfolojiye sahip transgenik bitki elde edilmiştir. Bakterinin kotiledonlarla muamelesinden sonra 2 mg/l 2,4- D ve 0.5 mg/l Kinetin içeren basal MS ortamında kültüre alınan eksplantlardan gelişen transgenik bitkiler 100 mg/l Kanamisin içeren ortamda seçilmişlerdir. Elde edilen transgenik olduğu düşünülen bitkilerden genomik DNA izole edilerek, *npt II* gen bölgesini içeren 2.0 kb (*BamHI*'den *Hind III*'e kadar)'lık bölgenin hibridizasyon verdiği tespit edilmiştir.

Chee ve Slightom (1991), tarafından yine Poinsett 76 çeşidi ile yapılmış olan bir çalışmada, kotiledon eksplantları, *Agrobacterium*'un pGA 482GGlcp CMV19 binari plazmidini taşıyan suşu ile kültüre alınmıştır. Bu binari 5 vektörün T-DNA bölgesi, bitkide ifade olabilen *npt II*, β -glukoronidaz (*gus*) ve C(CMV-C) hıyar mozaik virüsü kılıf proteini genlerini taşımakta olduğu bildirilmiştir. Enfeksiyondan sonra, kotiledonlar 100 mg/l kanamisin içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Transform olmuş embriyonik kallus oluşumunu takiben olgun embriyoların gelişimi ve bunların bitkilere dönüşümü gözlenmiştir. Tüm transform olmuş R₀ hıyar bitkilerinin morfolojik olarak normal olduğu ve *npt II* bakımından pozitif test verdiği, southern blot analizleri ile seçilmiş hıyar DNA'larının *npt II*, *gus* ve CMV-C kılıf protein genlerinin genomlara entegre olduğu tespit edilmiştir. Progeny bitkilerinin protein ekstraktlarında (özütlerinde) CMV-C kılıf proteinin varlığı enzim bağlı immünsorbent test ve western blot analizleri ile kanıtlanmıştır. Cucurbitaceae familyası bitkilerinde transgenik bitki üretiminde *Agrobacterium*'la gen transferi ve somatik embriyogenesis ile rejenerasyonunun etkili bir yöntem olduğu vurgulanmıştır.

Sarmiento ve ark. (1992), yapmış oldukları bir çalışmada, 2 turşuluk genotipin petiyol ve yaprak segmentlerini, pBIN ve pCGN binari plazmidlerini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in oktopin tipi olan LB 4404 ile transforme etmişlerdir. Aminoglikozid kanamisin dayanıklılığını kodlayan neomycin

fosfotransferaz (*npt II*), seçici markör olarak kullanılmıştır. 75 mg/l Kanamisin içeren ortam üzerinde kallus oluşum frekansının; eksplant büyüklüğü, bakteri yoğunluğu, bakteri ile muamele edilme uzunluğu, kokültivasyon süresi ve asetosiringon varlığı gibi faktörlerden etkilendiği belirlenmiştir. 10^8 hücre/ml yoğunlukta bakteri ve 20 μ M asetosiringon içeren bakteri süspansiyonunda 5 dk tutulan 4–6 mm büyüklüğünde petiyol segmentleri veya 0,5 cm² büyüklüğünde yaprak segmentlerinin 48 saat kokültivasyon süresinde bekletilmesini takiben bu eksplantlar 500 mg/l karbenisilin, 75 mg/l kanamisin, NAA/BA (5,0 / 2,5 μ M) veya 2,4 D / BA (5,0 / 5,0 μ M) içeren ortama yerleştirilmiştir. Tüm transforme olmuş kallus oranının % 20–50, transforme olmuş kallustan gelişen bitkicik rejenerasyon oranının ise % 8-15 olduğu bildirilmiştir.

Raharjo ve ark. (1996)'nın Endavour çeşidi turşuluk hıyar ile yapmış oldukları bir çalışmada *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA 105 (lökopin tipi), MOG 101 (oktopin tipi) ve MOG 301 (nopalin tipi) olmak üzere 3 suşu kullanılmıştır. 2 binari vektörden birinin petunya asidik kitinaz genini ve tütün temel kitinaz genini içerdiği, bu 3. vektörün her 3 suşa da transfer edildiği ve tüm vektörlerin *npt II* markör geni ile CAMV 35S promotorunu taşıdığı bildirilmektedir. ½ MS ortamında 2 gün 29 C°'de karanlıkta, daha sonra 25-28 C°'de aydınlıkta çimlendirilen 10-21 günlük fidelerin ilk ve ikinci gerçek yapraklarından alınan petiyol eksplantları 5 dakika süresince bakteri süspansiyonunda bekletildikten sonra 5 μ M 2,4-D + 5 μ M BA içeren MS ortamında 2-4 gün karanlıkta 27 C°'de kültüre alınmıştır. 50 mg/l kanamisin ve 500 mg/l karbenisilin içeren ortamda 4-5 hafta 24-26 C°'de kültüre alınmıştır. Kokültivasyondan 8 hafta sonra embriyogenik kallus oluşumunun kullanılan suşlara, vektörlere ve kokültivasyon süresinin uzunluğuna bağlı olarak değişmekte olduğu bildirilirken en yüksek frekansın % 12 ile EHA 105 lökopin tipi kullanıldığında elde edildiği gözlenmiştir. Kokültivasyon süresinin (2-4 gün) istatistiksel açıdan önemli olmadığı 3 aylık peryodda embriyogenesis veya organogenesis yoluyla sürgün oluşumu elde edilemediği bildirilmiştir.

Nisbiyashi ve ark. (1996)'nın yapmış oldukları bir araştırmada, CMV'ye dayanıklılık oluşturmak amacı ile 7 günlük hipokotil eksplantları CMV-O kılıf protein genini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* ile inokule edildikten sonra 4 mg/l

IAA, 1 mg/l N₆-(2-isopentyl) adenin (2 İP) ve 100 µM asetosiringon da denilen 3',5'dimethoxy-4'-hydroxyacetofenon içeren ortamda 5 gün süresince kültüre alınmıştır. Kokültive edilen hipokotil eksplantları daha sonra 1,1 mg/l 2,4-D, 0,23 mg/l BAP, % 1 kazein hidrolizat, 500 mg/l karbenisilin ve 20 mg/l higromisin B içeren MS ortamında 4-6 hafta süresince kültüre alınmıştır. Ro transgenik hıyar bitkisi yapraklarında ve transgenik bitkilerin 2 kotiledon taşıyan epikotillerinde CaMV 35s-*cp* geninin RNA transkriptleri Northern blot analizleri ile saptanırken, kılıf proteini Western blot analizleri ile tespit edilememiştir. 'Sharp 1' ile transgenik bitkilerin melezlenmesi sonucu oluşan döller, CMV-Y suşu ile inokule edildiğinde güçlü bir dayanıklılık gösterirken, 'Sharp 1' kontrol çeşidi ve kılıf proteini taşımayan (*cp*) bitkilerin yapraklarında inokulasyondan 5-6 gün sonra hastalık semptomları gözlenmiştir. Transgenik hıyar bitkilerinin ZYMV dayanıklılık geni taşımalarına rağmen ZYMV'ye dayanıklılık göstermediği, CMV ve ZYMV'nin ikili inokulasyonunda hastalık semptomlarını nispeten daha az gösterdiği bildirilmiştir.

Szwacka ve ark. (1996), thaumatin mRNA'sından elde edilmiş cDNA'yı içeren binari vektörü taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla hıyar bitkisine ait genç yapraklara gen transformasyonu yapmışlardır. En iyi sonucun 1/1 mg/l 2iP ve 2,4-D içeren indüksiyon ortamından ve iki kademeli seleksiyon ortamından (100-150 mg/l kanamisin içeren) elde edildiği bildirilmiştir.

Tabei ve ark. (1998) tarafından *Botrytis cinerea* (Gri küf)'ya dayanıklılık arttırıcı gen olan çeltik kitinaz geni *Agrobacterium tumefaciens* vasıtası ile hıyar bitkisine aktarılmıştır. 100 mg/l kanamisinle desteklenmiş MS ortamında 200'den fazla transgenik sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. RCC2 geninin varlığı 60 adet gelişmiş sürgünde tespit edilmiş, bunlardan 20 tanesi *Botrytis cinerea* (Gri küf)'ya karşı test edilerek 15 bağımsız sürgünün kontrole yani transgenik olmayana göre daha yüksek direnç gösterdiği bildirilmiştir. *B. cinerea*'ya karşı en yüksek dayanıklılığı CR29, CR32 ve CR33 transgenik hıyar hatlarının gösterdiği ve hastalık yayılmasının bu hatlarda tamamen durduğu rapor edilmiştir. Çok dayanıklı hatlarda hastalık direncine ait farklı cevaplar alınmış, CR33'te tallus oluşumu ve hif yayılmasının engellendiği gözlenmiş ve gri küfe dayanıklılığının kalıtılabilir olduğu rapor edilmiştir.

2.3. Diğer Cucurbitacea Familyası Türlerinde Yapılmış Doku Kültürü ve Gen Transformasyonu Çalışmaları

Moreno ve ark. (1985), İspanyol kavun çeşitlerinden Amarillo Oro'ya ait 11-13 günlük fidelerin kotiledon ve hipokotil eksplantlarını, IAA ve kinetinin farklı konsantrasyonlarını içeren BM3 (MS tuzları+100 mg/l myo-inositol+1 mg/l Thiamine-HCl+%3 sakkaroz+8 g/l Agar) ortamlarında, 27 ± 2 °C sıcaklıkta karanlık koşullarda kültüre aldıklarını ve rejenerasyon yeteneğini incelediklerini bildirmektedirler. Araştırmacılara göre; eksplant kaynağı ve kültür ortamı koşullarına bağlı olarak, kavun dokuları hem organogenesis hem de embriyogenesis yoluyla morfogenesis uğrayabilmektedirler. Denenen ortamlardan IK1560 (1.5 mg/l IAA ve 6 mg/l kinetin içeren BM3) ortamında kotiledonlardan elde edilen kallusların % 90'ının tamamıyla gelişmiş sürgünler ürettiği, kotiledon eksplantlarının oksin içeren ortamda genellikle bol miktarda sürgün ve nadiren embriyo meydana getirdiği, hipokotil eksplantlarının ise sürgün oluşturmadığı ancak somatik embriyo üretebildiği bildirilmektedir. Bu çalışma sonunda hem kotiledondan meydana gelen kalluslardan, hem de organogenik hücre hatlarından oluşturulan adventif sürgünlerden bitkilerin elde edilebildiği bildirilmiştir.

'Hale's Best Jumbo' kavun çeşidinin *in vitro* koşullarda yetiştirilen 4 günlük fidelerinden alınan kotiledon eksplantları, en yüksek sürgün tomurcuğu oluşturma frekansını 5 µM IAA, 5 µM BA ve 1 µM ABA içeren MS ortamında, 25-29 °C 5-30 µmol/m²s ışık yoğunluğu koşullarına sahip büyütme odasında kültüre alındıklarında göstermişlerdir. Bu sürgün tomurcuklarının 3 µM BA içeren MS ortamında alt kültüre alınması ile bu gözlerin %30'unun sürgüne dönmesi sağlanarak eksplant başına ortalama 4.67 sürgün elde edilmiştir. Absisik asidin farklı konsantrasyonları (1, 10 ve 30 µM) ortama eklendiğinde, sürgün tomurcuğu üreten eksplant sayısında önemli bir artış gözlenirken, araştırmacılar; genotip, fide yaşı, ışık yoğunluğu ve sıcaklık gibi faktörlerin tomurcuk oluşumunu etkilediğini; rejenerasyon ortamına giberellik asit, thidiazuron veya gümüş nitrat ilavesinin

tomurcuk ya da sürgün oluşumu üzerine etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir (Niedz ve ark., 1989).

Leshem (1989)'in kavun kotiledon yapraklarında organ uyartım zamanını ve organogenesisin olduğu bölgeyi araştırdığı çalışmada kallus, kök veya sürgün rejenerasyonu oluşumunun kotiledonların yalnız basal kısmından meydana geldiğini bildirmiştir. Organ uyartımı için; köklerde 1-3 gün (en az 1, en çok 3), sürgünlerde ise 3-5 gün (en az 3, en çok 5) gerektiği, besin ortamına IAA'in taşınmasını engelleyen TIBA'nın 2 mg/l konsantrasyonunda eklendiğinde kotiledonlardaki organogenesisin tamamı ile durduğu gözlenmiştir. Organogenik tepkinin kesim işleminden sonra endojenik büyüme faktörü IAA'in polar olarak taşınması ve eksplantın basal kısmında birikmesiyle meydana geldiği ve eksojenik hormonların organ oluşumunu uyardığı belirtilmiştir. Ekzojenik oksin/sitokonin oranının yeni bir rejeneratif bölge oluşturmadığı, sadece organogenesis oranının artmasını teşvik ettiği rapor edilmiştir.

Fang ve Grumet (1990), adlı araştırmacılar tarafından *Agrobacterium tumefaciens*'in *npt II*, kanamisin dayanıklılık, genini taşıyan LBA 4404 suşunu içeren sıvı bakteri kültürü içinde 4-5 günlük kavun fidelerine ait kotiledonlar kesilmiş, aynı sıvı içinde 10-60 dk. bekletilerek kokültivasyon süresinin etkisi denenmiştir. 10 dakikalık kokültivasyon süresinin transformasyon için uygun olduğu tespit edilmiştir. Eksplantlar, seleksiyon ortamına koyulmadan önce, 5 µM IAA, 5 µM BAP, 1 µM ABA içeren MS ortamında 3 gün kültüre alınmıştır. Seleksiyon için 0-200 mg/l arasında kanamisin dozları denenirken, en etkili kanamisin konsantrasyonu 75 mg/ olarak saptanmıştır. 3-5 hafta içinde sürgün rejenerasyonu gözlenirken, southern blot analizleri ile bu sürgünlerin % 80'inin *npt II* genini taşıdığı tespit edilmiştir.

Kavun bitkisinde morfogenetik tepkinin araştırıldığı bir çalışmada, Topmark ve Perlita çeşitlerinin 9-10 günlük fidelerinden elde edilmiş kotiledonlar, eksplant kaynağı olarak alınırken, bunların 1 mg/l BA içeren MS ortamında kültüre alınması ile en iyi morfogenetik tepki gözlenmiştir. Bu şekilde elde edilen organogenik kalluslar 0,05 mg/l BA içeren MS ortamına aktarıldığında vejetatif tomurcuk oluşumu gözlenmiştir (Chee, 1991b).

Sekiz adet farklı karpuz çeşidi ile yapılmış bir rejenerasyon çalışmasında, sürgün organogenesi üzerine kotiledon yaşı ve hormon kombinasyonunun etkisi araştırılmıştır. En yüksek sürgün organogenesinin 5 mg/l BA ve 0,5 mg/l IAA içeren MS ortamında 5 gün çimlendikten sonra kesilmiş kotiledon eksplantlarının 0,2 mg/l Kinetin içeren MS ortamında kültüre alınması ile elde edildiği bildirilirken; elde edilen sürgünler 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir (**Dong ve Jia, 1991**).

Roustan ve ark. (1992) tarafından, 0.54 μ M NAA ve 2.2 μ M BA içeren MS ortamında düşük rejenerasyon oranı (%17-35) göstermiş 5 ayrı kavun hattına ait kotiledon yapraklarında rejenerasyon oranını arttırmak amacı ile ortama bir etilen inhibitörü olan AgNO_3 'ın 60-120 μ M'lık konsantrasyonları eklenmiştir. TC hattında gözlenen sürgün rejenerasyonu 2 kat artarken, diğer 4 genotipte de benzer etkilerin gözlemlendiği, besin ortamına, etilen üreten 'Ethepon' ilavesi ile AgNO_3 'ın neden olduğu yüksek sürgün oluşumunun gerilemediği rapor edilmiştir. Kültür kabı içinde biriken etilenin kavundaki organogenesi azalttığı, etilenin bu olumsuz etkisinin ortama etilen inhibitörü ilavesi ile ortadan kaldırılabileceği bildirilmiştir.

Molina ve Nuez (1995) adlı araştırmacıların farklı araştırmacıların görüşlerine dayanarak yazdıkları derlemede, kavunda kotiledon (Moreno ve ark., 1985; Bouabdhallah ve Branchard, 1986; Trulson ve Shahin, 1986; Niedz ve ark., 1989; Gray ve ark.,1993), hipokotil (Kathal ve ark., 1986), gerçek yaprak (Kathal ve ark.,1988; Dirks ve Van Buggenum, 1989; Punja ve ark., 1990), yaprak sapı (Punja ve ark.,1990) ve protoplast (Moreno ve ark., 1986; Li ve ark., 1990; Debeaujon ve Branchard, 1992) eksplantları kullanılarak rejenerasyon sağlanmaktadır. Bu çalışmalar kavunda genetik, fizyolojik ve çevre faktörleri tarafından etkilenen morfogenetik tepki açısından oldukça yüksek varyasyonun var olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bu faktörlerden hangisinin oransal olarak daha önemli olduğu bilinmemektedir. Ayrıca, kotiledon (Orts ve ark., 1987; Niedz ve ark., 1989; Gray ve ark., 1993), tohum (Oridate ve ark., 1992) ve protoplastlardan (Li ve ark., 1990; Debeaujon ve Branchard, 1992) meydana gelen rejenerasyon üzerinde genotipin etkisi gözlenmiştir. Eksplant tipinin de bu işlemde oldukça etkili olduğu gözlenmektedir. Moreno ve ark. (1985) ile Bouabdhallah ve Branchard (1986), kallus

elde etmek için kullandıkları kotiledon ve hipokotil arasındaki tepki farklılığını tanımlamışlardır. Kotiledon ve gerçek yapraklardan farklı rejenerasyon oranı gözlenmiştir (Dirks ve Van Buggenum, 1989). Punja ve ark. (1990) gerçek yaprak ve yaprak sapından sürgün elde ettiklerini ancak kotiledonlardan hiç rejenerasyon sağlayamadıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Niedz ve ark. (1989) 18 günlük bitkilerden alınan yaprak sapı, gerçek yaprak, hipokotil ve kotiledon eksplantlarından elde edilen yüzde sürgün oluşturma oranlarındaki farklılığın önemli olmadığını rapor etmişlerdir.

Toppi ve ark. (1997), tarafından kabak (*Cucurbita pepo* L.) bitkisine, *Agrobacterium rhizogenes*'in NCPPB 1855 suşu ile gen transformasyonu yapılmış, bu amaçla, Lungo Fiorentino ve Diamant hibrid çeşitlerinin tohumları steril koşullarda *in vitro* çimlendirildikten sonra, 2, 6 ve 8 haftalık bitkiciklerin kök ve kotiledonları, delinerek bakteri süspansiyonuna batırılmıştır. Southern Blot hibridizasyonu ile gen aktarılmış olan kabak bitkileri tespit edilmiştir.

Gaba ve ark. (1999), *in vitro* koşullarda direkt organogenesis ile sürgün oluşturan 'Galia' kavun çeşidinde tomurcuk rejenerasyonun anatomisi ve morfolojisini araştırmışlardır. 3 günlük fidelerin kotiledon eksplantları 1 mg/l BA içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında 3 gün kültüre alındığında eksplantın proksimal kısmındaki kesim (yaralanma) bölgesi ile adaksiyal tarafındaki epidermal tabakasında hücre bölünmesinin başladığı ve meristematik bölgeye epidermisteki hücre bölünmesiyle hücre tabakalarının yığıldığı bildirilmektedir. Aktif alanlarda, epidermisin inaktif hale geçtiği bölgelerin bulunması ile birlikte, alt epidermal tabakalarda hücre bölünmesi devam etmektedir. Bu aşamadaki eksplantın enine kesitine bakıldığında adaksiyal yüzeyde çıkıntılar olduğu gözlenmiştir. Kültür ortamındaki 10. günün sonunda adaksiyal yüzeyde ve proksimal kesim yüzeyinde ilk gelişim işaretleri gözlenirken, bu aşamada görülen yaprak taslaklarının henüz gelişmediği gözlenmiştir. İlk sürgün gözü, eksplantların sitokinin içeren MS ortamında kültüre alınmasından 15 gün sonra histolojik olarak tespit edilmiştir. Bu aşamada rejenerasyon yüzeyinde çok sayıda çıkıntı, küçük yaprak ve yaprak taslağı gözlenmiştir. İlk sürgünün 22. günde oluştuğu, bu evrede rejenerasyon bölgesinin yüzeyi, koltuğunda tomurcuk bulunmayan çok sayıda yapraklarla kaplandığı tespit

edilmiştir. Bu araştırma sonucunda, kavun kotiledon yapraklarından elde edilen direkt rejenerasyonun epidermis tabakasındaki hücre bölünmesi sonucu olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, bu bilginin rejenerasyonla ilgili biyolojik olayların derinliğine anlaşılmasında olduğu gibi genetik mühendisliğinde kullanılacak bitki transformasyonu yöntemlerinin düzenlemesinde de oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır.

Compton (1999), bitki dokusuna karanlık uygulamasının sürgün organogenesi üzerine etkisini 4 farklı karpuz çeşidinde araştırmıştır. Embriyo çimlenmesi amacıyla steril edilen karpuz tohumları, kabukları çıkartıldıktan sonra MS çimlendirme ortamı içeren majenta kaplarında, yarısı karanlıkta yarısı ise aydınlıkta olmak üzere, 5 gün süre ile çimlendirilmiştir. Kotiledonların proksimal kısımları 5 µM BA içeren MS rejenerasyon ortamında yüzeyi ortama gelecek şekilde (adaksiyal) kültüre alındıktan 3 hafta sonra taze besin ortamına aktarılmış ve 6 hafta süre ile kültürde bekletilmiştir. Karanlıkta çimlenen embriyoların, 16 saatlik fotoperyodda çimlenenlere göre önemli oranda sürgün oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak bu artışın ‘Crimson Sweet’çeşidinde 2 kat oranında iken ‘Sweet Gem’ ve ‘Yellow Doll’ çeşitlerinde 1,5 kat oranında olduğu, ‘Minilee’ çeşidinde ise karanlık uygulamasının istatistiksel açıdan önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

2.4. Çeşitli Bitki Türlerinde GFP Geni İle Yapılmış Çalışmalar

Ponappa ve ark. (1999)'larının Soya Fasülyesinin transformasyonunda GFP kullanımının etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada GFP'yi kodlayan 5 farklı gen, partikül bombardımanı yoluyla embriyogenik soya fasülyesi (*Glycine max* L.Merrill) süspansiyon kültürüne aktarılmıştır. Tüm genler mavi ışık altında yeşil floresan rengi verirken, smRS-GFP (çözünebilir modifiye edilmiş kırmızı-değiştirilmiş GFP) geninin en yüksek ekspresyonu verdiği gözlenmiştir. Floresan ışığın bombardımandan en erken 1,5 saat sonra görünür hale geldiği fakat 6,5 saat sonra ekspresyonunun maksimuma çıktığı, 48 saat sonra ise genin ifade edildiği bölgelerin geniş parçalar halinde tespit edilir duruma geldiği bildirilmiştir.

Harper ve ark., (2000)'ları tarafından transgenik bitkilerde yeşil floresan proteininin seyrini gözlemek amacıyla yapılmış bir araştırmada, tütün bitkisine (*Nicotiana tabacum*, Xanthi) Karnabakar Mozaik Virüsü 35 S promotörüne (CaMV 35S) bağlanan mGFP5-ER (Haseloff, 1995) geni *Agrobacterium* aracılığıyla aktarılmıştır. GFP ifadesinin, 35 S promotör kullanılan genç yapraklar, gövde, çiçek ve 35 S promotörün en aktif olduğu organlarda yüksek seviyede gözlemlendiği ve değiştirilmiş GFP'nin raportör gen olarak *gus*'ın yerine geçebileceği rapor edilmiştir.

Aktarılmış genlerin transgenik bitkilerden onların yabani akrabalarına geçip geçmediğini görmek için yapılmış bir çalışmada model sistem olarak böcek direnç (*Bt*, *Bacillus thuringiensis*) genini taşıyan kanola ve onun yabani akrabaları kullanılmıştır. Transfer edilmiş genlerin yani transgenlerin hareketi onların yeşil floresan proteini geni (GFP) ile etiketlenmesi ile ortaya konmuştur. Transgen akışını çalışmak amacıyla geliştirilen modelde, kanola bitkisine (*Brassica napus*'un Westar çeşidi) iki GFP konstraktı (dizayn edilmiş gen bölgesi yapısı) transforme edilmiştir. Bu gen yapılarının, sadece GFP'den oluşan mGFP5-ER (Haseloff, 1995) ve cryI Ac endotoksini üreten sentetik *Bt* geni bağlanmış GFP'den oluşan pSAM 12 DNA yapılarının olduğu bildirilirken yeşil floresan rengi veren transforme olmuş kalluslar, doku kültürü aşamasında seçilmişlerdir. 4 bağımsız GFP kanola bitkisi ve 12 GFP/*Bt* kanola bitkisi doku kültürü yoluyla rejenere olmuşlar ve bunların yeşil

floresan protein ifadesi sayesinde canola bitkisinin tüm hayat döngüsü makroskobik olarak aşama aşama tespit edilmiştir. GFP/Bt'li kanola bitkileri *Helicoverpa zea*'nın larvalarına karşı insektisidal tepki göstermiş ve bitkisel zarardan korunmuştur. Floresan duyarlılığı transforme olmuş bağımsız bitkicikler arasında 508 nm'de 7.6×10^5 ile 13.8×10^5 cps (count per second) arasında değişiklik göstermiştir. Fakat yabani formlarında bunun tersi olarak, 5.3×10^5 cps olduğu tespit edilmiştir. *Brassica nap*a'nın 3 yabani tipi ile 9 GFP/Bt ve 3 GFP geni taşıyan kanola bitkileri melezlendiğinde oluşan F1 hibritlerinin floresan yeşil ışık verdiği ve neonate mısır başak kurdu larvalarına transgenik kanola ebeveynleri ile aynı derecede dayanıklılık gösterdiği gözlenmiştir. Fakat bunların floresan duyarlılıklarının ebeveynlerine göre azalmış oldukları gözlenmiştir. Bu bilgilerin ışığında GFP raportör geninin gen akışlarının belirlenmesinde iyi bir araç olduğu bildirilmiştir. (Halfhill ve ark., 2001).

Hudson ve ark. (2001)'lerinin transgenik bitkilerden polen akışını gözlemek amacıyla yapmış oldukları bir çalışmada, *Nicotiana tabacum* polenlerinde GFP geninin ifadesini sağlamak için özellikle polen ve anterlerde aktif olan, domatesten izole edilmiş LAT59 promotoru kullanılmış ve GFP ile etiketlenmiş polenler, polenin çevredeki hareketini gözlemek için geliştirilmiş bir araç görevi görmüştür. NPTII (kanamisin direnç geni) ve mGFP5-ER (Haseloff, 1995) genleri *Agrobacterium* vasıtasıyla tütün yaprak disklerine aktarılmış ve oluşan transgenik bitkiler toprağa geçirilmiştir. Bitkiler geliştikten sonra el UV'si ile polenlerin GFP ifadesi gözlenmiştir. Daha sonra GFP içeren çiçekli bitkiler 7 gün süre ile 24 tane arı içeren kapalı bir ortamda tutulmuş ve bu süre sonunda arılar petri kaplarında -20° C'de dondurulmuştur. Daha sonra epifloresan mikroskop altında arılar lam üzerine yerleştirilmiş ve kanat, baş ve bacak bölgelerinde GFP'li polen varlığına bakılmıştır. Arıların baş ve bacak bölgelerinde GFP kolaylıkla tespit edilmiştir.

Li ve ark. (2002)'nin yapmış oldukları bir çalışmada üzüm ve şarap endüstrisi için son derece yıkıcı, böceklerle bulaşan, etkeni *Xylella fastidiosa* olan bir hastalık olan Pierce's hastalığına (PD) dayanıklı asma yetiştiriciliğinde antimikrobiyal litik bir peptid gen olan Shiva-1 geninin ifadesinin tespiti için EGFP/*npt II* raportör genleri kullanılmıştır. Thompson Seedless çeşidine ait transgenik bitkiler üretilmiş, GFP ifadesi ve ekspresyon yolları çeşitli dokularda

mikroskopik olarak görüntülenmiştir. Sonuç olarak; iki yönlü ikili promotor içeren bağımsız transgenik bitkilerin % 92'sinde, GFP'nin iletim dokularında daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Fakat tek yönlü promotor içeren transgenik bitkilerin % 78'inde GFP ekspresyonunun epidermal hücrelerde ve iletim dokusu dışındaki dokularda yoğun olduğu gözlenmiştir. Buna ilaveten, tek yönlü promotor dizaynının kullanımının ekspresyonu arttırdığı gözlenmiştir. Shiva-1 proteininin yaprak ve ksilem özsuyundaki üretimi, yeni geliştirilmiş bir ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir.

Golis ve ark. (2002), tarafından şeftali ve erik bitkilerinde *gus* ve GFP ifadelerinin karşılaştırılması amacıyla yapılmış bir çalışmada, erik bitkisinin hipokotil parçalarında ve şeftalinin çeşitli doku parçalarının rejenerasyon ve transformasyonunda *gus* ve GFP ifadeleri karşılaştırılmıştır. *gus* ifadesi, 'Bluebyrd' eriğinin hipokotil parçalarında % 45 oranında bulunmuştur. GFP ifadesi Doku parçalarının % 25'inde çok yüksek oranda gözlenirken, % 20'sinde doku başına ortalama 4.6 mavi nokta şeklinde gözlenmiştir. GFP ifadesi 'Bluebyrd' eriğinin hipokotil parçalarında % 82 oranında bulunmuştur. 'Bailey' şeftali hipokotil parçalarında *gus*, doku parçalarının sadece % 7'sinde ifade edilirken (2 nokta/doku), GFP hiçbir dokuda ifade edilmemiştir. Yine 'Bailey' şeftali çeşidinin internodlarından alınan doku parçalarının % 3'ünde *gus* ifadesi gözlenirken (1,2 nokta/doku), doku parçalarının % 10'unda GFP ifadesi gözlenmiştir (2,3 nokta/doku) şeftali yapraklarında ise % 2 *gus* (2 nokta/doku) ve % 4 GFP (3,5 nokta/doku) ifadesi gözlenmiştir. 9 şeftali çeşidi ve 3 farklı doku kaynağı denenilen çalışmada, hiçbir çeşidin hipokotil dokularında herhangi bir ifade gözlenmemiştir. Çeşide göre değişmekle birlikte kotiledonlarda % 0-35 (0-26 nokta/doku) ve internodlarda % 0-28 (0-5 nokta/doku) oranında ifade gözlenmiştir. Sonuç olarak; erik hipokotil parçalarında hem *gus* hem de GFP'nin yoğun olarak ifade edildiği, şeftalinin tüm doku parçalarında her iki genin de düşük ifade edildiği, şeftalideki düşük ifadenin büyük olasılıkla transformasyon oranının düşük olmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu durum çerçevesi içinde daha hızlı, pratik olması ve dokuya zararı olmamasından dolayı şeftali ve erikte raportör sistem olarak GFP'nin, *gus*'a göre daha faydalı olacağı rapor edilmiştir.

Turunçgil bitkisiyle yapılmış bir çalışmada protoplast füzyonunun baştan sona tüm sürecinin ve rejenerasyonunun izlenmesinde yeşil floresan proteininin etkinliği araştırılmıştır. Somatik füzyon denemesinde yeşil floresan proteinini sentezleyen transgenik turunç bitkisi ebeveyn olarak kullanılmıştır. Transgenik turunç protoplastlarında, hibrid kallus, embriyo ve bitkilerde yüksek seviyede yeşil floresan protein sentezi tespit edilmiştir. GFP'nin füzyon sürecinin sürekli takibinde, hibrit kolonilerin ve kallus oluşumunun gözlenmesinde ve somatik hibrit embriyolar ile bitkilerin seleksiyonunda kullanışlı olduğu saptanmıştır (**Fuster ve ark., 2002**).

Bastar ve ark. (2002)'nin yapmış oldukları bir araştırmada soğan bitkisinin (*Allium cepa* L.) ovaryumlarından gelişmiş olan organogenik yapılarına *Agrobacterium*'un LBA4404 ile EHA105 ırkları ile *gus* ve GFP genleri aktarılmış ve raportör gen olarak GFP'nin *gus*'tan daha kullanışlı olduğu rapor edilmiştir.

Li ve ark. (2002)'nin yapmış oldukları bir çalışmada asma bitkisinin *Agrobacterium*'la transformasyonunu etkileyen faktörler, raportör gen olan GFP ile belirlenmiştir. Farklı asma çeşitlerinin embriyonik kültürleri GFP genini içeren *Agrobacterium*'un binari vektörü ile inoküle edilmiştir. Test edilen 18 genotip içerisinde hem GFP ifadesi hem de kalıcı transformasyonu açısından en yüksek frekans sırasıyla, *V. rupestris*, *V. vinifera*, Thompson seedless ve *V. vinifera* hibrit çeşitlerinden Seyval Blanc'da gözlenmiş ve *V. rupestris* doku parçalarının %90'ı geçici GFP ifadesi gösterirken, dokuların % 70'inin kalıcı transformasyon gösteren kallus ürettiği rapor edilmiştir. Thompson çekirdeksiz çeşidinin transgenik embriyolarında, *Agrobacterium* ile inokulasyondan 2 ay sonra hem kanamisin dayanıklılığı hem de GFP geninin ifadesi tespit edilmiştir.

Galperin ve ark., (2003)'ları tarafından yeni tanımlanan bir kavun hattı olan BU-21/3'ün transformasyon ve rejenerasyon tepkisinin araştırılması amacıyla yapılmış olan bir çalışmada modifiye edilmiş bir GFP olan mGFP5-ER (Haseloff, 1995) ve *gus* genleri *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA105 ve LBA4404 ırkları kullanılarak kavun kotiledonlarına aktarılmıştır. Araştırmacılar eksplant başına 0.4-1.5 transgenik sürgünle başarılı bir transformasyon gerçekleştiğini belirtirken transgenik bitkilerdeki gen ifadesini *gus* analizi ve 480 nm'de mavi ışık altında stereomikroskop ile tespit etmişlerdir. Oluşan transgenik bitkilerin morfolojik olarak

normal geliştikleri, bitkilerin transformasyondan en az 8 hafta sonra seraya aktarıldığı ve GFP içeren bitkilerin yeşil parlak renk yaydığı rapor edilmiştir.

Türkiye’de turuncgillerde stabil GFP ekspresyonunu sağlamak amacı ile yapılmış bir çalışmada üç farklı GFP geni (EGFP1, GFPC3 ve mGFP5-ER) *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile *Carrizo citrange*’in uzunlamasına kesilmiş epikotil segmentlerine aktarılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda mGFP5-ER ile en fazla sayıda transgenik bitki rejenerasyonunun sağlandığı ve sera koşullarındaki transgenik bitkilerde bu varyant GFP’nin daha stabil olduğu bildirilmiştir. (Kayım ve ark., 2004)

Bu çalışmalardan başka, ortakal (Guo ve ark.,2004; Olivares-Fuster ve ark., 2002; Guo ve ark., 2004), elma (Maximova ve ark., 1998), muz (Dugdale ve ark., 1998), patates, havuç, biber (Hibberd ve ark., 1998), soğan (Eady ve ark., 2003), ıspanak (Zhang ve Zee-Vaart, 1999) ve tatlı patates (Lawton ve ark.,2000) bitkilerinde gerek partikül bombardımanı gerekse *Agrobacterium* vasıtası ile çeşitli GFP varyantları aktararak yeşil floresan proteinin ifadesi erken bir dönemde görsel olarak tespit edilebilmiştir (Mendi ve ark., 2005).

3. MATERYAL VE METOD

Çalışma 2004-2006 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü ve Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

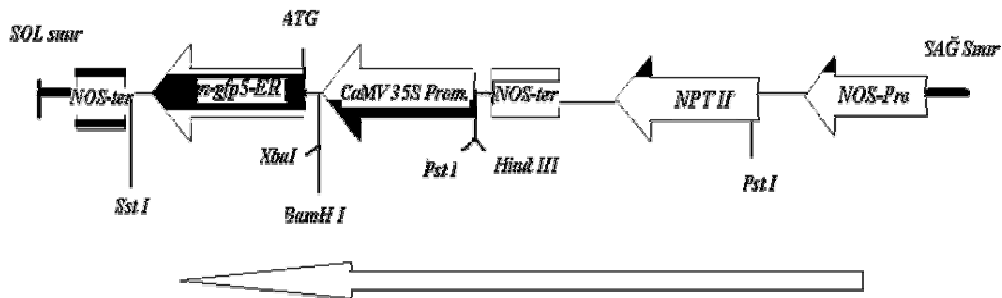
3.1. Materyal

3.1.1.Rejenerasyon ve Transformasyonda Kullanılan Bitki Materyalleri

Beit Alfa tipi hıyar çeşidi (*Cucumis sativus* L.)'ne ait tohumlar kullanılmıştır.

3.1.2.Transformasyonda Kullanılan Plazmid ve Bakteri Irkları

npt II (Kanamisine dayanıklılık), mGFP5-ER genlerini içeren pBin m-GFP5-ER binari plazmidini taşıyan ve transformasyon çalışmasında kullanılan *A. tumefaciens*'in AGL-1 ırkı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyelerinden. Doç.Dr. Mukaddes Kayım'dan temin edilmiştir.



Şekil 3.1. pBIN m-GFP-5-ER Doğrusal Plazmid Haritası

3.2. Metod**3.2.1. Rejenerasyon Çalışmasında Uygulanan Denemeler****3.2.1.1. Hıyar Tohumlarının Sterilizasyonu**

Steril kabinde kabukları pens yardımıyla soyulan tohumlar, 1-2 damla Tween-20 içeren % 15'lik sodyum hipoklorid çözeltisi içerisinde 15 dk. bekletildikten sonra 3 defa steril saf su ile yıkanmıştır.

3.2.1.2. Tohumların *In vitro* Ortamda Çimlendirilmesi

Tohumlar steril edildikten sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS tuzları (Murashige ve Skoog, 1962) + MS vitaminleri + 0.1 mg/l myo-inositol + %3 sakkaroz + 8 g/l Agar içeren besi ortamında 16 saatlik fotoperiyotta 25- 26 °C'de kültüre alınmıştır.

3.2.1.3. Genel Doku Kültürü Şartları ve Besin Ortamlarının Hazırlanması

Doku kültürü uygulamalarının tümü aseptik koşullar altında yapılmış, bunun için steril kabin kullanılmıştır. Kullanılan bistüri bıçağı ve pensler önceden steril edilmiş ve kesim işlemi sırasında da % 96'lık etil alkole batırılıp elektrikli sterilizatörde tutularak steril koşulların devamı sağlanmıştır. Besin ortamları kullanım amacına göre ya tüplere 40 ml olacak şekilde doldurularak otoklav edilmiş, ya da erlenler içerisinde otoklav edildikten sonra steril petri kutularına steril kabin içerisinde 20–25 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Ortamların otoklavda sterilizasyonu, 1.2 atmosfer basınç altında, 121°C sıcaklıkta 17 dakika sürede gerçekleştirilmiştir. Besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog 1962) temel ortam bileşimi

kullanılmıştır. Tohum çimlendirme aşamasında hormonsuz MS ortamına % 3 sakkaroz ve %0.8 agar ilave edilmiş ve pH 5.7'ye ayarlanmıştır. Çalışmanın değişik aşamalarında besin ortamlarına gerek büyüme düzenleyicileri gerekse antibiyotik ilavelerinde bulunulmuştur. Hazırlanan ortamlara antibiyotik ilavesi yapılacağı durumlarda, antibiyotiklerin otoklav şartlarında kimyasal yapıları bozulacağından bunların sterilizasyonu 0.2 µ çapta por genişliğine sahip filtreler kullanılarak yapılmıştır. Bu yapılan işlemler, ilgili konu başlıklarında verilmiştir. MS ortam reçetesine göre mineral tuzların ve vitaminlerin isim ve konsantrasyonları Çizelge 3.1'de olduğu gibidir.

Çizelge 3.1. MS Temel Besin Ortamında Bulunan Besin Maddeleri ve Konsantrasyonları (Murashige ve Skoog 1962).

Ortam bileşenleri	Miktarı (mg/litre)
(NH ₄)NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Myo-inositol	100
Glisin	2,0

3.2.1.4. Araştırmada Kullanılacak Olan Eksplant Kaynağının Belirlenmesi

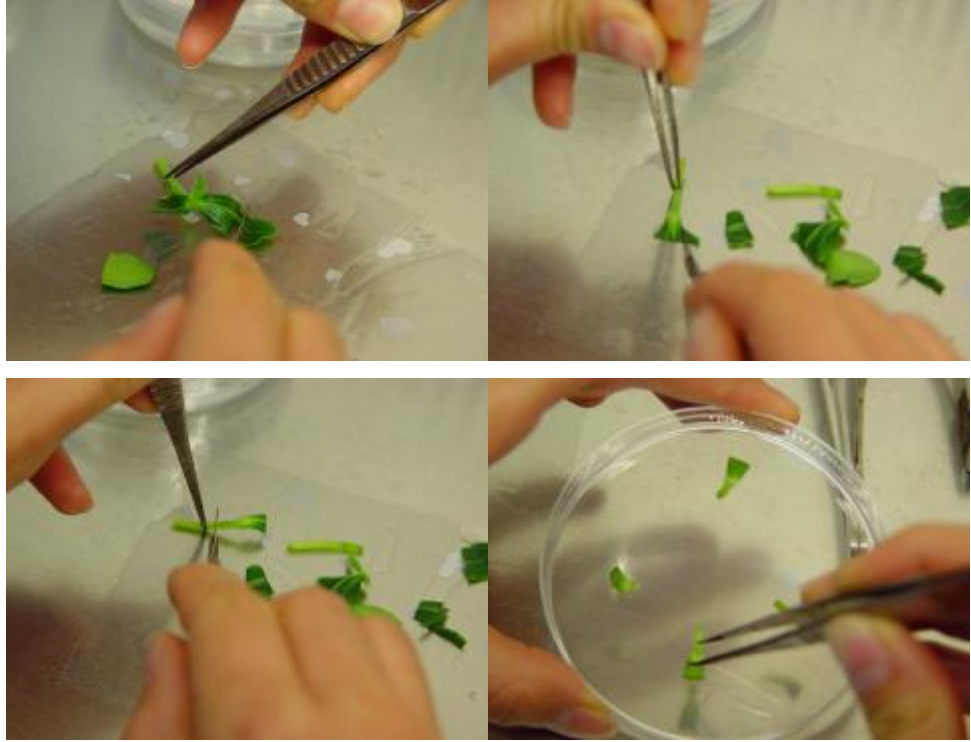
Bu tez çalışmasında 2 ayrı eksplant kaynağı denenmiştir.

3.2.1.4.1 Kotiledon Yapraklarının Eksplant Kaynağı Olarak Hazırlanması

Kotiledon yapraklarının kesilmesi ile elde edilen eksplantlar, fidelerin kesilmesi ile elde edilmiştir. Kotiledonların büyüme uçları (Apeks) ve yaprak sapına uzak olan distal bölgesi kesilip atılarak uzaklaştırıldıktan sonra arada kalan kısmın, proksimal bölgenin 4 tarafı kesilerek yara dokusu oluşturulmaktadır ve geriye kalan parça 3'e kesilmektedir. Bu parçaların her biri sonraki denemelerde bir eksplant olarak kabul edilecektir.

3.2.1.4.2 Hipokotil Ucu + Yaprak Sapı (Flamingo Bill) Eksplantının Hazırlanması

'Flamingo bill' de denilen bu eksplant tipinde *in vitro* koşullarda yetiştirilen 4 günlük fidelerin hipokotilleri, kotiledon yapraklarına mümkün olduğu kadar yakın bir yerden, kotiledonlar ise proksimal kısmının yaklaşık ortasından kesilmiştir. Bistirü bıçağının ucu, iki kotiledon yaprağının arasına yerleştirilmiş ve eksplantta geriye kalan hipokotil yaklaşık olarak ortadan kesilmeye çalışılmıştır. Bu şekilde elde edilmiş eksplant için, Çürük (1999), 'Hipokotil Ucu + Yaprak Sapı' adını kullanmıştır.



Şekil 3.2. ‘Flamingo Bill’ Tipi Eksplantların Hazırlanması

3.2.1.5. Rejenerasyon Ortamına Eklenecek Uygun Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin ve Uygun Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Etkili bir rejenerasyon protokolü oluşturarak adventif sürgün gelişimini sağlamak amacı ile standart MS ortamı içerisine Çizelge 3.2.’de belirtilen çeşitli hormonların farklı konsantrasyonlarının, farklı kombinasyonları eklenmiştir. Her denemede 5 petri kullanılırken, bir petride 12 eksplant kültüre alınmıştır. Deneme hem kotiledon hem de ‘flamingo bill’ eksplant tipi için denenmiştir. Büyütme odasında 16 saatlik fotoperiyotta 25- 26 °C’de kültüre alınan eksplantlar 4 haftada bir alt kültüre alınmak üzere 8 hafta süresince gözlemlenmiştir. Gözlem yaparken eksplantlar üzerinde tomurcuk ve sürgün oluşma oranlarına bakılmıştır.

Çizelge 3.2. Rejenerasyon Denemesinde Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri, Konsantrasyonları ve Kombinasyonları

Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri	Konsantrasyonları
BAP	0 mg/l
BAP	1 mg/l
BAP	2 mg/l
ZEATİN	0 mg/l
ZEATİN	1 mg/l
ZEATİN	2 mg/l
IAA	0 mg/l
IAA	1 mg/l
IAA	2 mg/l
BAP+IAA	1 mg/l + 1 mg/l
BAP+IAA	1 mg/l + 2 mg/l
BAP+IAA	2 mg/l + 1 mg/l
BAP+IAA	2 mg/l + 2 mg/l

3.2.1.6. Rejenerasyon ve Gen Transformasyonu Çalışmalarında Kullanılan En Uygun Fide Yaşının Belirlenmesi

Rejenerasyon kapasitesi açısından en uygun fide yaşını tespit etmek amacı ile, 24 saatlik, 1, 2 ve 4 günlük fideler kullanılmıştır. 1, 2 ve 4 günlük fideleri elde etmek için, tohumlar 3.2.1.1’de belirtildiği gibi steril edildikten sonra 3.2.1.2’de bahsedilen hormon içermeyen MS ortamı içeren tüplerde 25-26 C’de 16 saatlik fotoperiyodite gösteren büyütme odasında kültüre alınmıştır. Kontrolü, 0 günlük; yani, steril edildikten sonra kotiledonları kesilen tohumlar oluştururken, 24 saatlik fideler ise, tohumların steril edildikten sonra karanlıkta, steril saf su içinde 24 saat bekletilmesi ile elde edilmiştir.

3.2.1.7. Rejenerasyon Ortamına ilave edilecek Uygun Katılaştırıcı Maddenin Belirlenmesi

Ortamda kullanılan katılaştırıcı tipi, rejenerasyon çalışmasındaki sonucu değiştirebilmektedir. Bu amaçla denemede katılaştırıcı olarak kabakgil türlerinde yaygın olarak kullanılan Sigma Agar ile Sigma Phytigel (Gelrite)’in tomurcuk ve sürgün oluşturma kapasiteleri ile vitrifikasyon (camlaşma) oranlarına bakılmıştır. Bu

denemede, kotiledon eksplantlarının proksimal kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2.1.8. Gen Transformasyonu Çalışmalarında Kullanılan Etkili Kanamisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Etkili dozu tespit etmek için yürütülen çalışmada kanamisinin 50, 100, 200 mg/l ve bir de kontrol olmak üzere 3 farklı konsantrasyonu denenmiştir. Kanamisinin farklı konsantrasyonları, Çizelge 3.2.'de belirtilen bitki büyüme düzenleyicilerinin denendiği rejenerasyon denemesi sonucunda tespit edilen en iyi ortam içeriğine eklenmiştir. Eksplant kaynağı olarak 4 günlük fidelerin kotiledon yapraklarının proksimal kısımları kullanılırken, büyütme odası koşulları, rejenerasyon uygulamaları ile aynıdır. Rejenerasyon ortamında 8 hafta bekletilen ve 4 haftada bir yeni ortama alınan eksplantlarda tomurcuk ve sürgün oluşturma oranlarına bakılmıştır.

3.2.2. Gen Transformasyonu Çalışmasında Uygulanan Denemeler

3.2.2.1. *Agrobacterium tumefaciens* ve İnokulasyon Solüsyonunun Hazırlanması

A. tumefaciens'in pBin m-GFP5-ER binari plazmidini taşıyan AGL-1 ırkı 50 mg/l kanamisin ve 30 mg/l gentamisin, 5 g/l NaCl, 5 g/l Yeast Ekstrakt, 10 g/l Triptofan, 8 g/l agar (Sigma) içeren katı LB ortamı üzerine öze ile çizilerek 28 °C'de kültüre alınmıştır.

Sıvı bakteri kültürünü hazırlamak için gelişmiş bakteri kültüründen öze ile bir koloni alarak tüp içerisinde 50 mg/l kanamisin ve 30 mg/l gentamisin bulunan sıvı LB ortamına aşılanmıştır.

Bu şekilde aşılanan bakteri kültürü 200 devir/dk.'da çalışan çalkalayıcıda 28 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.

İnkübe edilmiş bakteri solüsyonundan 500–600 µl alınarak içerisinde 50 mg/l kanamisin ve 30 mg/l Gentamisin içeren taze sıvı LB ortamına aşılınmış ve 200 devir/dk.'da 4 saat kültüre alınmıştır.

Bu şekilde hazırlanan taze bakteri süspansiyonu transformasyonda kullanılmadan önce 2000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek, tüp dibinde bakteri çökeltisi elde edilmiş ve bu çökeltinin üzerindeki faz alınmıştır.

Faza 20 mg/l asetosiringon içeren sıvı MS ortamı ilave edilerek transformasyon için gerekli olan bakteri yoğunluğu spektrofotometride okunarak, 550-600 nm'de optik yoğunluk 0.5'e ayarlanmıştır.

3.2.2.2. Eksplantların *Agrobacterium tumefaciens* ile İnokulasyonu

Eksplantların *Agrobacterium tumefaciens* ile transformasyonunda iki farklı deneme uygulanmıştır. Her iki uygulamada da kullanılan transformasyon yöntemi Tabei ve ark. (1998)'ndan geliştirilmiştir.

3.2.2.2.1 Eksplantların Bakteri Kültürü İle İnokulasyonundan Önce Rejenerasyon Ortamında Kültüre Alınması

In vitro'da çimlendirilmiş 4 günlük fidelerin 3.2.1.4.1 bölümünde açıklanan şekilde kesilmesi ile hazırlanan kotiledon eksplantları antibiyotik içermeyen rejenerasyon ortamı (0,5 g/l MES, % 3 sakkaroz, 1 mg/l BA, 1mg/l IAA, 200 µM asetosiringon ve % 3'lük phytagel içeren), üzerinde karanlık ortamda 25–26 °C'de 2 gün süresince kültüre alınmıştır. 2. günün sonunda eksplantlar rejenerasyon ortamından alınarak 3.2.2.1'de belirtildiği gibi hazırlanmış olan *Agrobacterium tumefaciens*'in inokulasyon solüsyonunda 10 dakika bekletildikten sonra eksplantların whatman no:1 filtre kağıdı üzerine yayılması ile solüsyonun fazlası alınmış ve aynı içerikli ortamda 2 gün karanlıkta 25 - 26° C' de kültürde bırakılmışlardır. Eksplantlar daha sonra MSO çözeltisi (MS tuzları + % 3 sakkaroz + 200 µM Asetosiringon) ile 3 defa yıkandıktan ve çözeltinin fazlası filtre kağıdı ile

elimine edildikten sonra, eksplantlar, kanamisin ve karbenenisilin içeren seleksiyon ortamı üzerinde 16 saatlik fotoperyodda 25-26 °C’de 4 haftada bir yenilenmek üzere 8 haftalık kültüre alınmıştır. Tomurcuk ve sürgün oluşturan eksplantlarda GFP ifadesi (eksprasyonu) el UV’si ile karanlık ortamda 365nm ışıktaki tespit edilmiştir.

3.2.2.2.2 Eksplantların Bakteri Kültürü ile İnokulasyonundan Sonra Rejenerasyon Ortamında Kültüre Alınması

In vitro’da çimlendirilmiş 4 günlük fideler 3.2.2.1’de belirtildiği gibi hazırlanmış olan *Agrobacterium tumefaciens* inokulasyon solüsyonunu içeren petri kabı içinde kesilerek hazırlanmış eksplantlar aynı solüsyon içinde 10 dakika bekletildikten sonra solüsyonun fazlası, whatman no:1 filtre kağıdı ile alınmıştır. Bu şekilde dokunun yaralandığı anda bakterinin dokuya girmesi hedeflenmiştir. Eksplantlar, 0,5 g/l MES, % 3 sakkaroz, 1 mg/l BA, 1mg/l IAA, 200 µM asetosiringon ve % 3’lük phytagel içeren, antibiyotik içermeyen rejenerasyon ortamı üzerinde karanlık ortamda 25–26 °C’de 2 gün kültüre alınmıştır. 2. günün sonunda eksplantlar rejenerasyon ortamından alınarak MSO çözeltisi (MS tuzları + % 3 sakkaroz + 200 µM Asetosiringon) ile 3 defa yıkanarak, çözeltinin fazlası filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış 20–25 ml kanamisin ve karbenisilin eklenmiş seleksiyon ortamı içeren 9 x 15 cm ebatlarındaki petrilerde 16 saatlik fotoperyodda 25–26 °C’de 4 haftada bir yenilenmek üzere 8 haftalık kültüre alınmıştır. Tomurcuk ve sürgün oluşturan eksplantlarda GFP ifadesi (eksprasyonu), el UV’si ile karanlık ortamda 254/365nm ışık yoğunluğunda tespit edilmiştir.



Şekil 3.3. İnokulasyon Solüsyonu İçinde Bekleyen Kotiledon Eksplantları



Şekil 3.4. Kotiledon Eksplantlarının Antibiyotiksiz Rejenerasyon Ortamı Üzerine Yerleştirilmesi



Şekil 3.5. Gen Aktarılmış Eksplantların Seleksiyon Ortamına Yerleştirilmesi

3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS for Windows paket programının 14.0 versiyonu kullanılmıştır. Analizlerde oluşum oranlarını karşılaştırmak amacıyla ki kare test istatistiğine başvurulmuştur. 2x2 tablo karşılaştırmalarında SPSS paket programı tarafından hesaplanan Fisher's Exact test sonucu dikkate alınmıştır. Tüm testlerde önem düzeyi 0.05 alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Tohumların sterilizasyonu

Tohumların sterilizasyonunda Kontaminasyon sorunu ile karşılaşılmadığı için yüzey sterilizasyonu yeterli olmuştur. Bunun için sterilizasyonda farklı yöntemlere başvurulmamıştır.

4.2. Uygun Bitki Rejenerasyon Ortamının Belirlenmesi

Hıyar bitkisi ile yapılmış pek çok rejenerasyon çalışmasında, 4 günlük fidelerden alınan eksplantların kullanılması sebebiyle, uygun hormon kombinasyonunun tespiti amacı ile yapılmış bu uygulamada da, 4 günlük fidelerden elde edilmiş olan kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Kotiledon ve ‘flamingo bill’ eksplantları, BAP, IAA ve Zeatin hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını (Çizelge 3.2) içeren MS rejenerasyon ortamı üzerinde, 8 hafta kültüre alınarak, oluşan tomurcuk ve sürgün sayılarına ait veriler, çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarında Kotiledon ve Flamingo-Bill Eksplantlarından Elde Edilen Tomurcuk Ve Sürgün Oluşum Sayıları

Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri	Konsantrasyonları	Kullanılan eksplant sayısı*	Kotiledon eksplantı		Flamingo-bill eksplantı	
			Tomurcuk oluşumu	Sürgün oluşumu	Tomurcuk oluşumu	Sürgün oluşumu
BAP	0 mg/l	60	2	0	0	0
BAP	1 mg/l	60	28	3	30	3
BAP	2 mg/l	60	32	24	34	6
ZEATİN	0 mg/l	60	0	0	0	0
ZEATİN	1 mg/l	60	26	9	8	1
ZEATİN	2 mg/l	60	29	12	9	3
IAA	0 mg/l	60	0	0	0	0
IAA	1 mg/l	60	0	0	0	0
IAA	2 mg/l	60	0	0	0	0
BAP+IAA	1 mg/l + 1 mg/l	60	45	36	32	7
BAP+IAA	1 mg/l + 2 mg/l	60	22	5	12	2
BAP+IAA	2 mg/l + 1 mg/l	60	58	49	29	9
BAP+IAA	2 mg/l + 2 mg/l	60	15	2	5	0

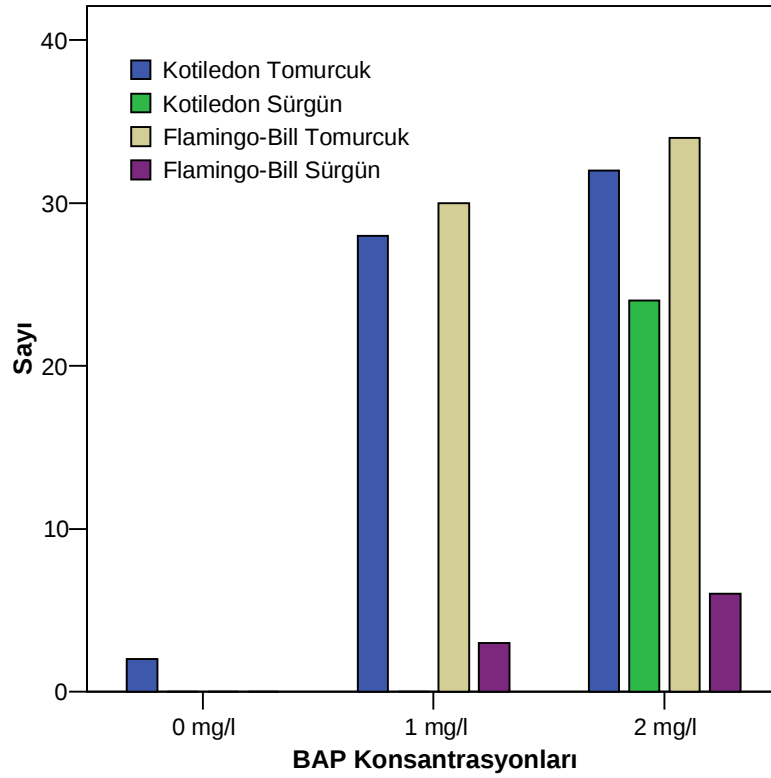
Uygulama sonucunda hem kotiledon hem de ‘flamingo bill’eksplantları bakımından 0 ve 1 mg/l BAP içeren MS rejenerasyon ortamında kültüre alınan toplam eksplant sayısının yarı oranında tomurcuk oluşumu gözlenirken sürgün oluşumunun yok denecek kadar az olduğu tespit edilmiştir. Gambley ve Dodd (1990) tarafından yapılan rejenerasyon çalışmasında, 0,5 ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamından %100 oranında sürgün; 2 mg/l BAP ortamından ise % 50 oranında sürgün elde edilmiştir. İki araştırma arasındaki farkın, bilimsel çalışmalarla rejenerasyon kapasitesi üzerine önemli etkisi olduğu ispatlanmış genotip farkından kaynaklandığı düşünülmektedir (Molina ve Nuez, 1995a).

Yine yalnız 2 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınmış olan kotiledon eksplantları üzerinde % 53 oranında tomurcuk oluşumu gözlenirken, bu tomurcukların % 75’inin sürgüne dönüştüğü gözlenmiştir. Aynı ortam üzerinde

‘flamingo bill’ eksplantları kültüre alındığında tomurcuk oluşumunun yüksek (%57) olduğu fakat sürgün oluşum oranının % 17’ye düştüğü gözlenmiştir.

BAP konsantrasyonlarına göre tomurcuk oluşumu, hem kotiledonda hem de flamingo-bill eksplantında değişmektedir. Ortama BAP’ın eklenmesi ile oluşumun arttığı istatistiksel olarak gösterilmiştir (Her iki durum için de $p < 0.001$). Ancak BAP konsantrasyonunun 1 veya 2 mg/l olması, her iki eksplantta da tomurcuk oluşumunu istatistiksel düzeyde önemli olacak şekilde arttıramamıştır ($p = 0.584$ ve $p = 0.583$). Burada dikkat çekici bir durum, kotiledonda 2 mg/l BAP kullanımının tomurcuktan sürgün oluşumunu istatistiksel olarak önemli olacak şekilde arttırdığıdır ($p < 0.001$). Ancak bu durum ‘flamingo-bill’ eksplantında saptanamamıştır ($p = 0.483$). Elde edilen bulguların grafiksel değerleri Şekil 4-1’de verilmiştir.

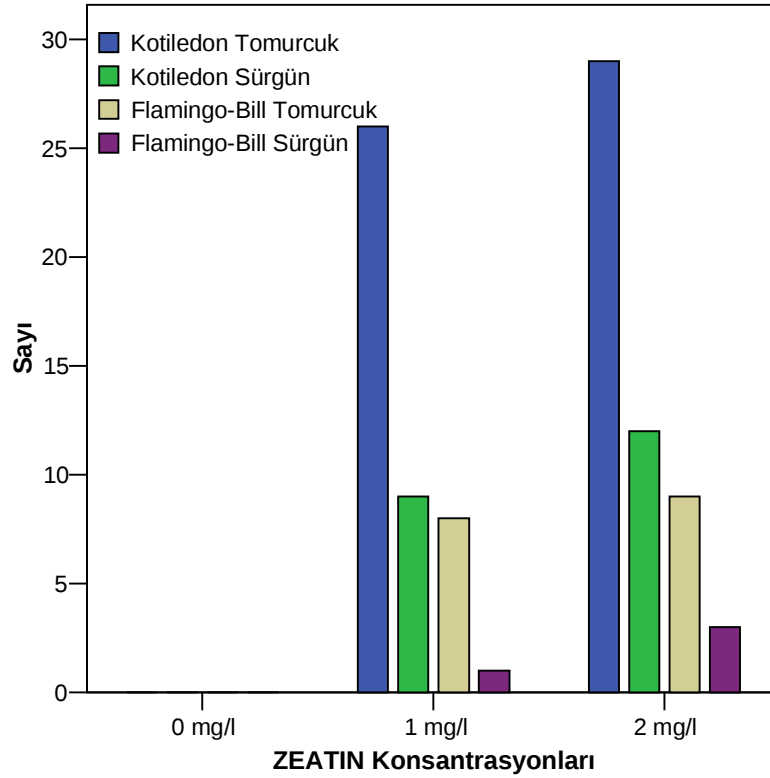
Zeatin hormonunun 1 mg/l kullanıldığı uygulamada, kotiledon eksplantlarının % 43 oranında tomurcuk ve bu tomurcukların % 35 oranında sürgün oluşturduğu; 2mg/l kullanıldığı uygulamada ise % 48 oranında tomurcuk oluşumu ve % 41 sürgün oluşumu gözlenmiştir. ‘Flamingo bill’ eksplantları Zeatin içeren ortamda kültüre alındığında 1mg/l’lik dozunda % 13 oranında tomurcuk oluşumu ve % 12.5 sürgün oluşumu gözlenirken; 2 mg/l Zeatin içeren MS ortamında % 15 tomurcuk oluşumu ve % 33 sürgün oluşumu gözlenmiştir (sürgün oluşum oranları tomurcuktan gelişmiş sürgün sayısını vermektedir).



Şekil 4.1. Kotiledon ve ‘Flamingo bill’ Eksplantlarından BAP’ın Farklı Konsantrasyonlarından Gelişen Tomurcuk Ve Bunlardan Gelişen Sürgün Oluşum Sayıları

Zeatin’in 1 veya 2 mg/l dozları kullanıldığında, BAP’a benzer şekilde sonuç verdiği, tomurcuk oluşumunun iki eksplant türünde de arttığı istatistiksel olarak gösterilmiştir ($p < 0.001$ ve $p = 0.005$). Ancak konsantrasyonun 1 veya 2 mg/l olmasının oluşacak tomurcuk sayısını değiştirmedeği tespit edilmiştir ($p = 0.714$ ve $p = 0.999$). Kotiledon eksplantları kullanıldığında 1 ve 2 mg/l Zeatin içeren MS ortamından yüksek oranda tomurcuk elde edilmiş fakat bu tomurcukların bir kısmı sürgüne dönüşmüştür. ‘Flamingo-bill’ eksplantından ise elde edilen sürgün oluşum oranı yok denecek kadar düşüktür (1mg/l Zeatin için % 1.7 sürgün; 2 mg/l Zeatin için, % 5 sürgün). 0 mg/l Zeatin içeren ortamlarda tomurcuk oluşmadığından sürgün de gözlenememiştir. Dolayısıyla kontrol değeri olan 0 mg/l ile 1 ve 2 mg/l Zeatin konsantrasyonlarını sürgün oluşumu yönünden karşılaştırmak mümkün olamamıştır. Zeatinin 1 ve 2 mg/l’lık konsantrasyonları karşılaştırıldığında ise oluşan sürgün

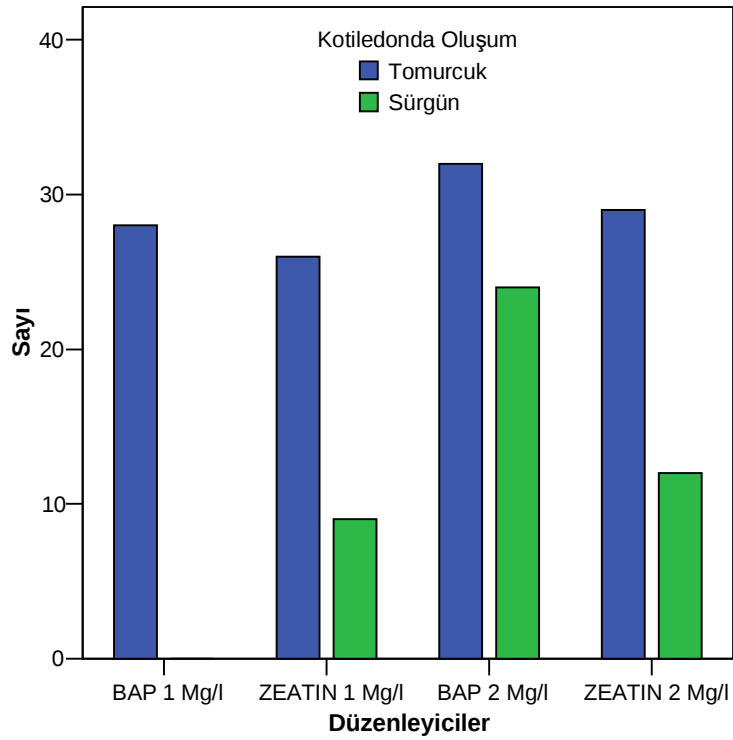
sayıları istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p=0.782$ ve $p=0.576$). Şekil 4-2’de elde edilen sonuçlar gösterilmiştir.



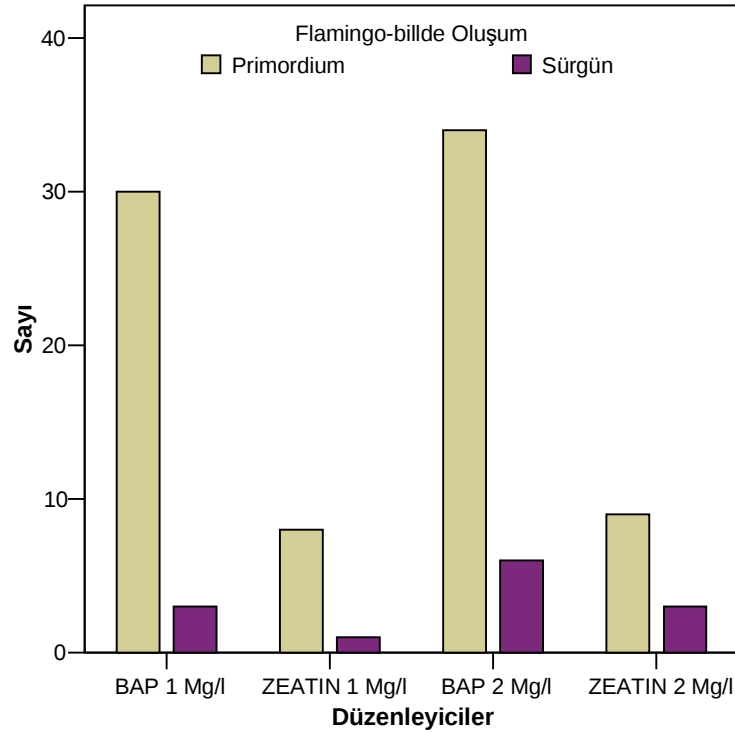
Şekil 4.2. Kotiledon ve ‘Flamingo bill’ Eksplantlarından Zeatin’in Farklı Konsantrasyonlarından Gelişen Tomurcuk ve Bunlardan Gelişen Sürgün Oluşum Sayıları

Kotiledon eksplantları kullanıldığında, BAP ve Zeatin hormonlarının tüm konsantrasyonlarında benzer sayıda tomurcuk oluşumu gözlenirken ($p>0.05$), seçilen hormon ve bunun konsantrasyonu, kotiledon eksplantlarında, tomurcuktan sürgün oluşumuna etki etmiştir. Buna göre kotiledon eksplantı için 32 tomurcuğun 24’ünde (%75) sürgün oluşumu ile 2 mg/l BAP, Zeatin’e göre daha üstün bulunmuştur ($p<0.001$). 1 mg/l BAP uygulaması ile 2 mg/l BAP uygulaması kotiledonda tomurcuk oluşumu yönünden benzer bulunurken, sürgün oluşumu yönünden 2 mg/l BAP uygulaması, 1 mg/l BAP uygulamasından daha üstün bulunmuştur. ($p<0.001$) Flamingo-bill eksplantında ise durum biraz farklıdır. Burada tomurcuk oluşumu,

BAP ve Zeatin'in farklı konsantrasyonlarına göre değişim göstermektedir ($p<0.001$). Kotiledona benzer olarak 2 mg/l BAP, Zeatin'in tüm konsantrasyonlarına göre ön plandadır. Sürgün oluşumu ise tüm uygulamalarda benzer bulunmuştur. BAP ve Zeatin'in farklı konsantrasyonlardaki tomurcuk ve sürgün oluşum sayıları kotiledon eksplantı için Şekil 4-3'te, flamingo-bill eksplantı için ise Şekil 4-4'te verilmiştir.



Şekil 4.3. BAP ve Zeatin'in Farklı Konsantrasyonlarının Kotiledon Eksplantında Tomurcuk Oluşumu ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısı Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması



Şekil 4.4. BAP ve Zeatin'in Farklı Konsantrasyonlarının Flamingo-Bill Eksplantında Tomurcuk Oluşumu ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısı Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması

IAA'in 0, 1, 2 mg/l dozlarını içeren MS ortamında kültüre alınan kotiledon ve 'flamingo bill' eksplantlarında tomurcuk ve sürgün oluşumu gözlenmezken, eksplantların proksimal kesim bölgelerinden IAA'in artan dozları ile birlikte artan kök oluşumu gözlenmiştir. BAP+IAA'in farklı kombinasyonları denendiğinde tomurcuk ve sürgün oluşum oranının arttığı (1mg/l BAP+1mg/l IAA; 2mg/l BAP+1mg/l IAA) saptanmıştır. Tabei ve ark. (1998), *C.metuliferus* kotiledonlarından en yüksek rejenerasyon frekansını (% 92.5) 1 mg/l BAP+0,2 mg/l IAA içeren MS ortamından elde ettiklerini bildirirken, Novak ve Dolezelova (1982)'nın hıyar kotiledonları ile yaptıkları çalışmada; IAA'in yalnız kullanımında kök oluşumunu; fakat Kinetin veya BAP sitokininleri ile birlikte kullanıldığında, kallus oluşumunu teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Abrie ve Staden (2001), tarafından çeşitli Cucurbit türlerinde yapılmış rejenerasyon çalışmasında 'Ashley' hıyar çeşidine ait kotiledon parçaları, 5 mg/l BAP ve 0,5 mg/l IAA içeren MS ortamında kültüre alındığında

adventif sürgün oluşumunun sağlandığı bildirmiştir. Gambley ve Dodd (1990), oksin varlığında organogenesisin tamamen durduğunu rapor etmişlerdir. Tabei ve ark. (1998); Novak ve Dolezelova (1982); Abrie ve Staden (2001)'nin bulguları, araştırma bulgularımızı desteklerken, Gambley ve Dodd (1990)'un çalışması bu çalışma ile ters düşmektedir.

BAP ve IAA kombinasyonlarındaki farklı konsantrasyonlar sonucu, flamingo-bill eksplantında sürgün oluşumu dışındaki tüm oluşumlarda konsantrasyonlardaki değişim, sonucu etkilemiştir. Buna göre kotiledonda tomurcuk oluşumu BAP 1 mg/l + IAA 2 mg/l ve BAP 2 mg/l + IAA 2 mg/l konsantrasyonları benzer ($p=0.235$) diğer tüm karşılaştırmalar ise istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Kotiledonda tomurcuk oluşumuna göre bir sıralama yapmak gerekirse,

1. BAP 2 mg/l + IAA 1 mg/l
2. BAP 1 mg/l + IAA 1 mg/l
3. BAP 1 mg/l + IAA 2 mg/l veya BAP 2 mg/l + IAA 2

sırası doğru sıralama olur. Kotiledonda tomurcuktan sürgün oluşumuna bakılacak olursa, benzer sıralama şu şekilde olurdu.

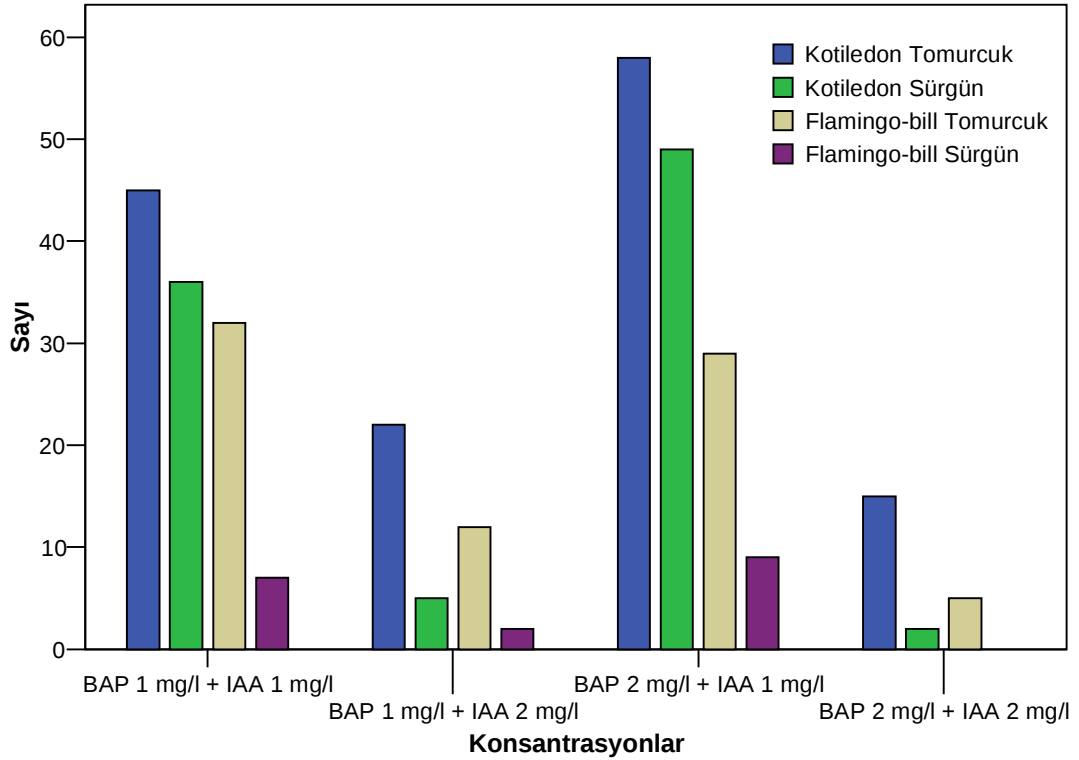
1. BAP 2 mg/l + IAA 1 mg/l veya BAP 1 mg/l + IAA 1
2. BAP 1 mg/l + IAA 2 mg/l veya BAP 2 mg/l + IAA 2

Buradan da anlaşılabileceği gibi sürgün oluşumundaki 1. sıradaki iki konsantrasyon benzer ve 2. sıradaki iki konsantrasyon da benzer bulunmuştur.

Flamingo-bill eksplantında ise tomurcuk oluşumu kotiledonda sürgün oluşumuna benzer bulunmuştur. Buna göre sıralama kotiledon sürgün ile aynı olacaktır. Yani,

1. BAP 2 mg/l + IAA 1 mg/l veya BAP 1 mg/l + IAA 1
2. BAP 1 mg/l + IAA 2 mg/l veya BAP 2 mg/l + IAA 2

Flamingo-billde tomurcuktan sürgün oluşumu hiçbir konsantrasyonda farklı bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4-5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. BAP ve IAA'in Dört Kombinasyonunun Her İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısı Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması

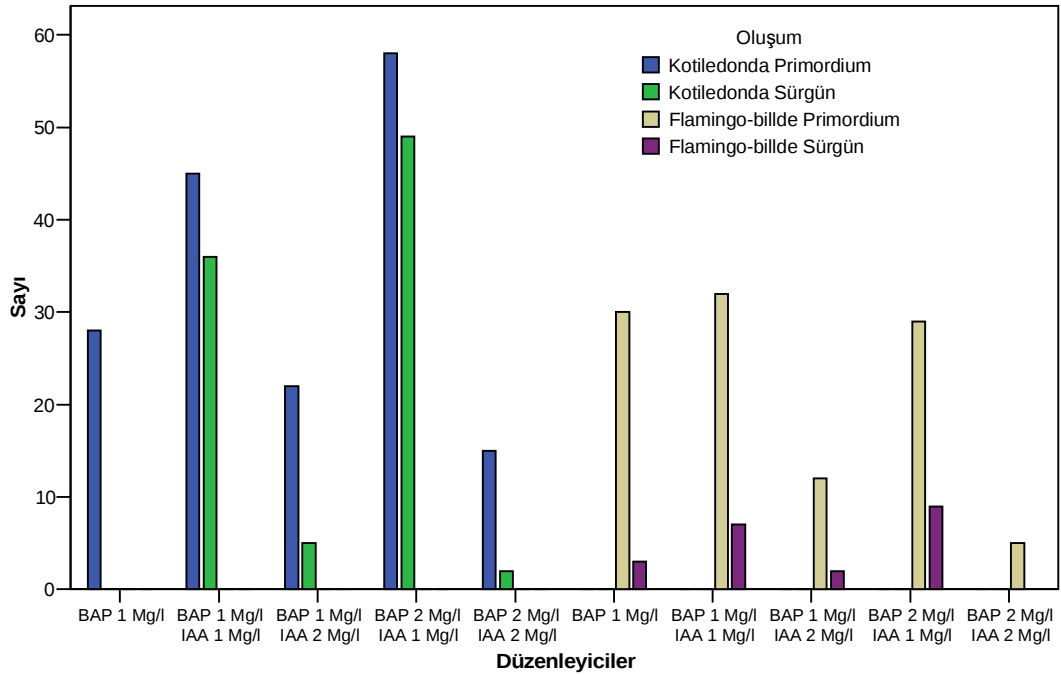
Şekilden de görülebileceği gibi ortam içerisine BAP ile birlikte eklendiğinde IAA'in 2 mg/l dozunun hem kotiledon hem de 'flamingo bill'eksplantlarında, sürgün oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. (Yeşil ve bordo sütunlardaki düşüş dikkat çekicidir.)

BAP ve IAA kombinasyonu ile tekli sitokinin uygulamaları arasında da farklılıklar saptanmıştır. Buna göre kotiledonda tomurcuk oluşumu, 1 mg/l BAP verilmesi ile 1 mg/l BAP ve 2 mg/l IAA verilmesi durumunda benzer bulunmuş ($p=0.355$), diğer durumlarda ise farklılıklar saptanmıştır. Buna göre kotiledon eksplantlarında, tomurcuk oluşumu açısından 1 mg/l BAP + 1 mg/l IAA ve 2 mg/l BAP + 1mg/l IAA uygulamasının yalnız 1 mg/l BAP uygulamasından daha iyi olduğu gözlenmiştir ($p=0.003$ ve $p<0.001$). Ancak 2 mg/l BAP + 2 mg/l IAA

verilmesi 1 mg/l BAP verilmesinden tomurcuk oluşumu yönünden daha kötü bulunmuştur ($p=0.022$).

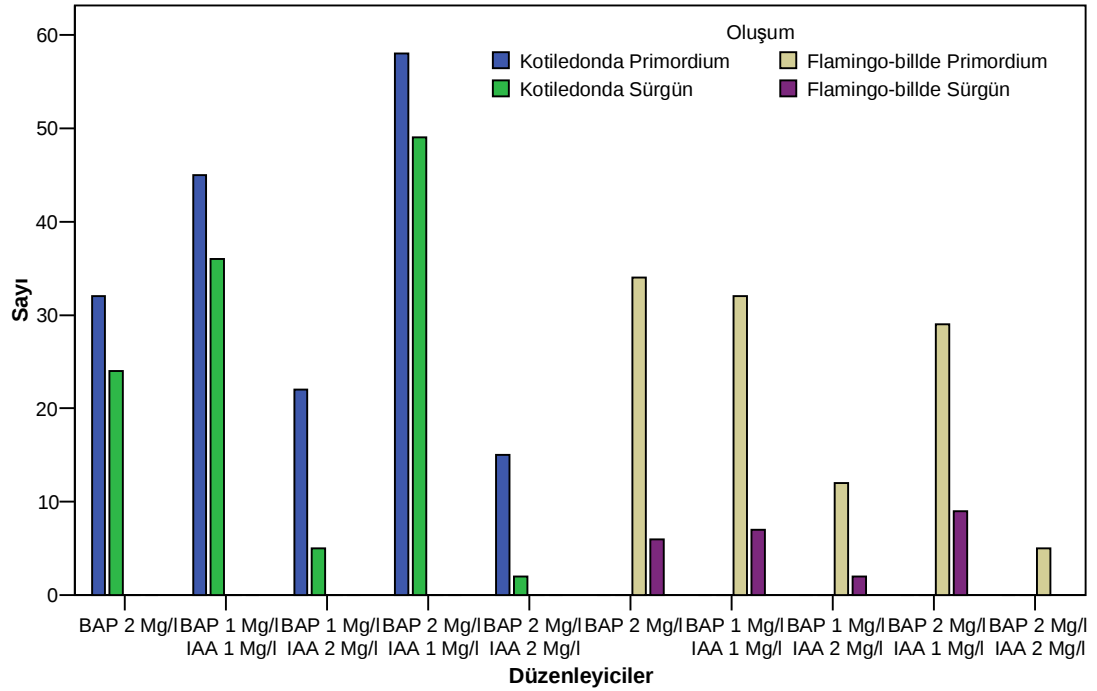
Kotiledon eksplantlarında sürgün oluşumuna bakıldığında, 1 mg/l BAP yerine 1 mg/l BAP + 1 mg/l IAA veya 1 mg/l BAP + 2 mg/l IAA ya da 2 mg/l BAP + 1 mg/l IAA verilmesinin sürgün oluşumunu arttırdığı saptanmıştır. (üç durum için de $p<0.01$) Ancak burada da 2 mg/l BAP ve 2 mg/l IAA verilmesi ile 1 mg/l BAP verilmesi arasında fark bulunamamıştır ($p=0.116$). Sonuç olarak, 1 mg/l BAP yerine 2 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA verilmesi kotiledonda tomurcuk ve sürgün oluşumunu arttırdığından, uygulamada bunun seçilmesi doğru olacaktır.

Flamingo-bill eksplantında ise, tomurcuk oluşumunda, 1 mg/l BAP verilmesi, 1 mg/l BAP + 2 mg/l IAA veya 2 mg/l BAP + 2 mg/l IAA verilmesinden daha iyi bulunmuştur. ($p<0.001$) 1 mg/l BAP + 1 mg/l IAA ya da 2 mg/l BAP + 1 mg/l IAA verilmesi ile 1 mg/l BAP verilmesi arasında ise fark saptanamamıştır ($p>0.05$). Sürgün oluşumunda ise istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanamamıştır. Flamingo-bill eksplantında tomurcuk oluşumunda, yalnız 1 mg/l BAP uygulamasının, 1 mg/l BAP ile birlikte IAA verilmesinden daha iyi olduğu tespit edilmiştir. 1 mg/l BAP ile BAP + IAA kombinasyonları sonucu elde edilen tomurcuk ve sürgün oluşum sayıları Şekil 4-6'da gösterilmiştir.



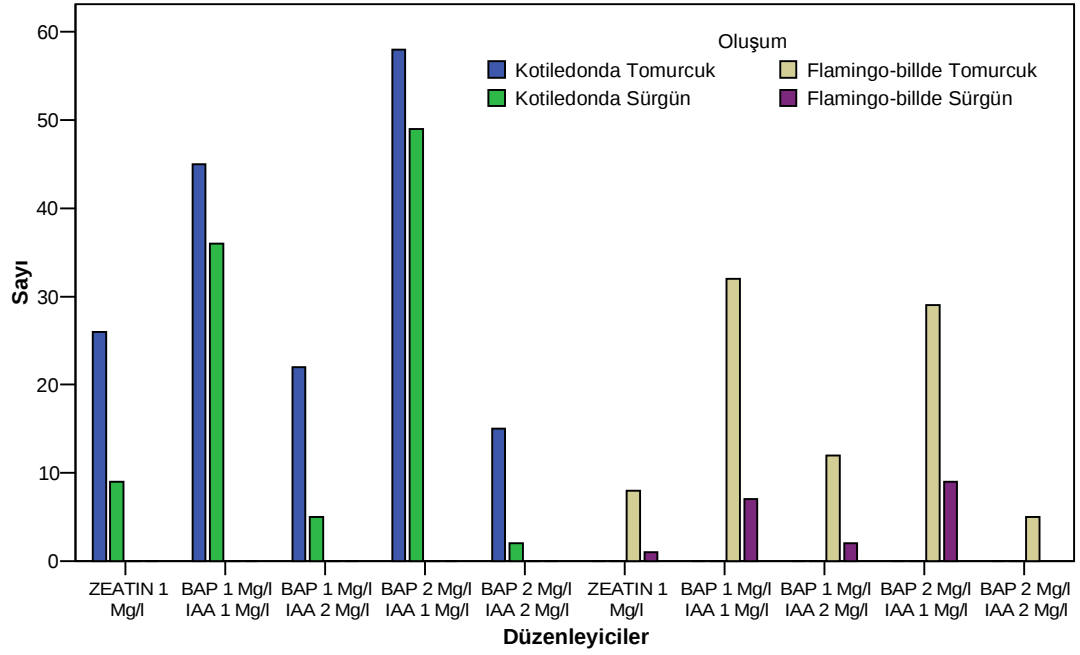
Şekil 4.6. 1 mg/l BAP ve BAP ile IAA’ın Farklı Konsantrasyon Kombinasyonlarında, İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu Ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısının Karşılaştırılması

2 mg/l BAP uygulaması ile BAP + IAA kombinasyonları incelendiğinde, kotiledon eksplantlarından tomurcuk oluşumu yönünden, 2 mg/l BAP uygulaması ile 1 mg/l BAP + 2mg/l IAA kullanımı benzer sonuçlar vermiştir ($p=0.098$). 2 mg/l BAP kullanımı yerine 1 mg/l BAP + 1mg/l IAA ve 2 mg/l BAP + 1mg/l IAA kullanımının daha avantajlı olduğu gözlenmiştir ($p=0.022$ ve $p<0.001$). Ancak 2 mg/l BAP + 2 mg/l IAA uygulaması 2 mg/l BAP’tan daha düşük oranda tomurcuk oluşumuna neden olmuştur ($p=0.003$). Sürgün oluşumu incelenecek olursa tomurcuktan oluşan sürgün sayısı açısından 2 mg/l BAP ortamından yüksek oranda sürgün elde edilmiştir. Ancak, 1 mg/l IAA varlığında rejenerasyon kapasitesinin (tomurcuk+sürgün) arttığı gözlenmiştir. ‘Flamingo bill’ için ise en uygun ortamın 2 mg/l BAP olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.7’de sonuçlar gösterilmiştir.

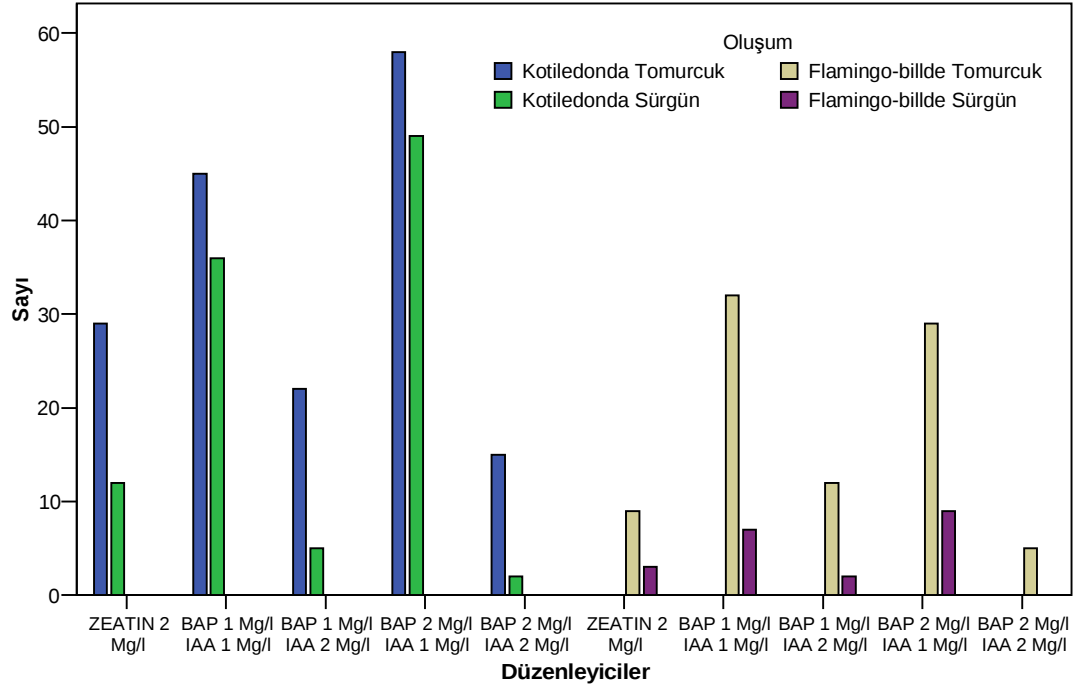


Şekil 4.7. 2 mg/l BAP ve BAP ile IAA'nın Farklı Konsantrasyon Kombinasyonlarında, İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu Ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısının Karşılaştırılması

Zeatin konsantrasyonları ile BAP + IAA kombinasyonları karşılaştırıldığında da 1 mg/l BAP + 1 mg/l IAA ile 2 mg/l BAP + 1 mg/l IAA kombinasyonlarının her iki eksplanta da Zeatin'in tüm konsantrasyonlarından üstün olduğu görülmüştür (tüm karşılaştırmalarda $p < 0.001$). Bu durum kotiledon eksplantında tomurcuktan sürgün oluşumunda da devam etmektedir ($p < 0.001$). Ancak flamingo-bill eksplantında Zeatin ve BAP + IAA kombinasyonları benzer sonuçları almıştır. 1 ve 2 mg/l Zeatin ile BAP + IAA kombinasyonlarının sonuçları Şekil 4-8 ve 4-9'da verilmiştir.



Şekil 4.8. 1 mg/l Zeatin ve BAP ile IAA'nın Farklı Konsantrasyon Kombinasyonlarında, İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısının Karşılaştırılması



Şekil 4.9. 2 mg/l Zeatin ve BAP ile IAA'ın Farklı Konsantrasyon Kombinasyonlarında, İki Eksplant Tipinde Tomurcuk Oluşumu ve Bunlardan Gelişen Sürgün Sayısının Karşılaştırılması



şekil 4.10. Yalnız IAA İçeren MS Ortamında Kültüre Alınmış Eksplantlardan Kök Oluşumu

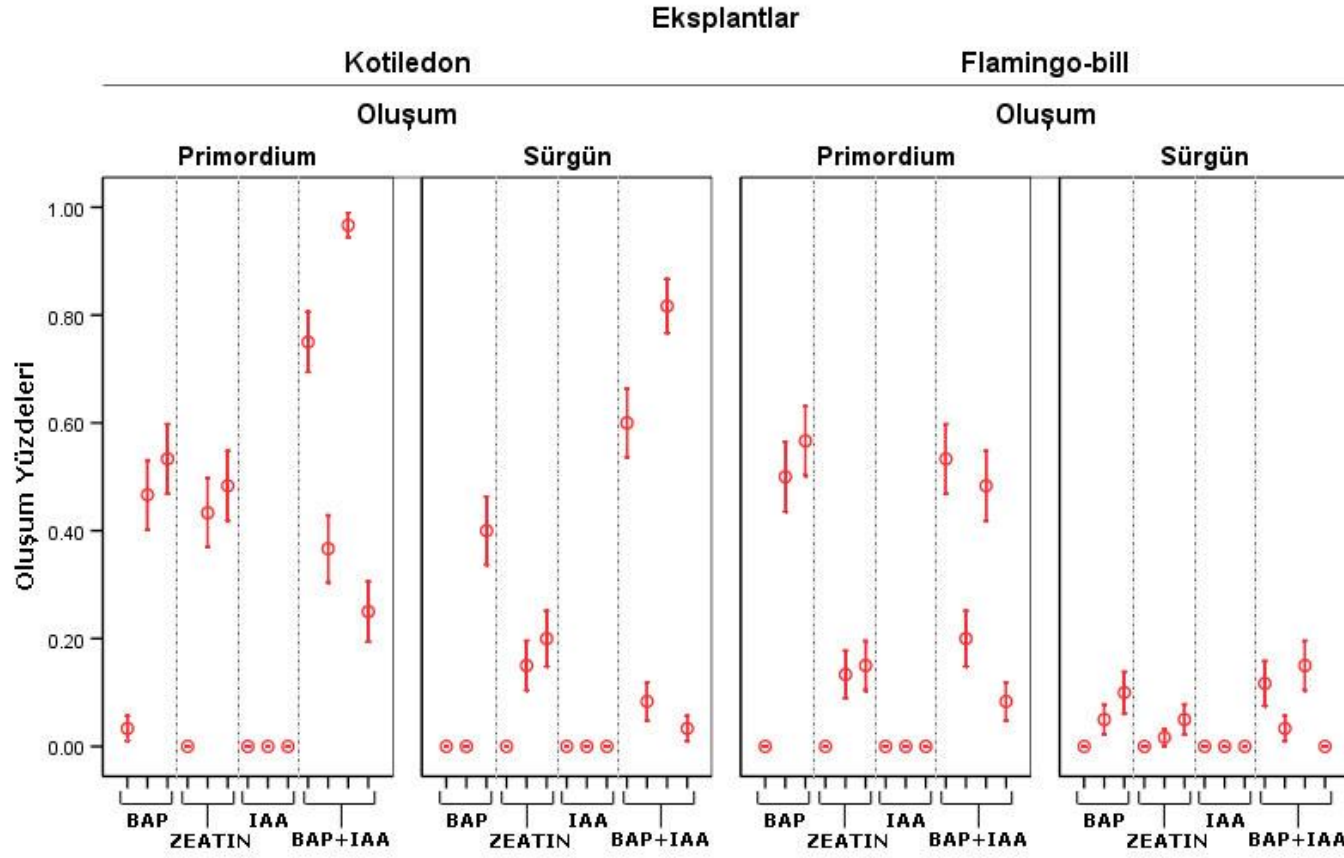


şekil 4.11. Rejenerasyon Ortamında Kültüre Alınmış Eksplantlardan Tomurcuk Oluşumu



Şekil 4.12. Rejenerasyon Ortamında Kültüre Alınmış Eksplantlardan Sürgün Oluşumu

Sonuç olarak konsantrasyon seçiminde yüksek oranda tomurcuk oluşumunun yanında bu tomurcuklardan yine yüksek oranda sürgün oluşumu dikkate alınacağından 2 mg/l BAP ile 1 mg/l IAA kombinasyonu tercih edilmesi gereken düzenleyici kombinasyonudur. Çalışmada 5 petride tekrarlanan denemeler sonucu elde edilen bulguların genele uyarlanması amacıyla Şekil 4-13'te tüm sonuçlara ait ortalama oluşum yüzdesi ve bu yüzdenin % 95 güven aralığı verilmiştir. Bu grafikte ilgili düzenleyicilerin sırasıyla 0, 1 ve 2 mg/l konsantrasyonlarının ve kombinasyonlara ait 1 + 1, 1 + 2, 2 + 1 ve 2 + 2 mg/l konsantrasyonlarının sonuçları her iki eksplantta ve oluşumda ayrı ayrı verilmiştir. Grafikte görülen kırmızı noktalar ortalama yüzdeyi ve o ortalamanın üzerinden geçen kırmızı çizgi ise ortalamaya ait alt ve üst sınırları vermektedir. Şekilden görülebileceği gibi 2 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA uygulaması kotiledon eksplantında en yüksek ortalama yüzdeye ve dar bir güven aralığına sahiptir.



Şekil 4.13. Her İki Eksplantta da Farklı Ortamlarda Elde Edilen Tomurcuk Ve Bu Tomurcuklardan Elde Edilen Sürgün Yüzdeleri ve Bunlara Ait % 95'lik Güven Aralığı

4.3. Araştırmada Kullanılacak Olan Eksplant Kaynağının Belirlenmesi

Kim ve ark. (2000) tarafından hıyar bitkisinde, ‘cotyledonary hypocotil’ olarak adlandırdıkları eksplant tipi ile yapmış oldukları çalışmada 1 veya 2 yarım kotiledon taşıyan 2 mm uzunluğundaki hipokotil eksplantlarını 2 mg/l Zeatin içeren MS ortamında kültüre alarak % 80–90 oranında rejenerasyon elde etmişlerdir. Kim ve ark.(2000)’nın anlattıkları eksplant tipi ‘flamingo bill’ eksplant tipi ile oldukça büyük benzerlik göstermekle birlikte, bu çalışmada Zeatinin farklı konsantrasyonları (0, 1, 2 mg/l), ‘flamingo bill’eksplantı için denendiğinde düşük rejenerasyon tepkisi gözlenmiştir. Çürük (1999) tarafından kavunda yapılmış tez çalışmasında ‘flamingo bill’ eksplant tipi, ‘Hipokotil Ucu + Yaprak Sapı’ olarak adlandırılırken 1 mg/l BAP içeren MS ortamından yüksek oranda rejenerasyon elde edilmiştir. Bu çalışmada ise ‘flamingo bill’eksplantları, BAP’ın farklı dozlarını (0, 1, 2 mg/l) içeren MS ortamında kültüre alındığında 1 mg/l BAP konsantrasyonunda, kültüre alınmış toplam eksplant sayısının yarı oranında tomurcuk oluşumu gözlenirken sürgün oluşumunun yok denecek kadar az olduğu tespit edilmiştir. 2 mg/l BAP içeren MS ortamından % 57 oranında tomurcuk oluşumu ve % 17 oranında sürgün oluşumu gözlenmesi ile ‘Flamingo bill’eksplantı için en yüksek rejenerasyon frekansı; 2 mg/l BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir.

En uygun eksplant tipinin seçilmesi amacı ile yapılmış uygulamada denenen bir diğer eksplant tipi de Kabakgil türlerinde yaygın olarak kullanılan kotiledon eksplantıdır. 4 günlük fidelerden elde edilmiş kotiledonların yalnız proksimal kısımları kullanılmıştır. Kotiledonların distal kısımlarının alınmamasının sebebi, rejenerasyon üzerine proksimal kısımların olumlu etkisini gösteren pek çok araştırma bulunmasıdır (Ali ve ark., 1991; Mohiuddin ve ark., 1995; Gambley ve Dodd, 1990; Hooymans ve ark., 1994; Mendi, 2003). Kotiledon eksplantlarından % 97 oranında tomurcuk oluşumu ve bu oluşan tomurcukların % 84’ünün sürgün oluşturması ile en yüksek rejenerasyon kapasitesi, 2mg/l BAP + 1mg/l IAA içeren MS ortamından sağlanmıştır. Oysa ‘flamingo-bill’ eksplant tipinden elde edilmiş olan en yüksek rejenerasyon, 2 mg/l BAP içeren MS ortamından sağlanan % 57 oranında tomurcuk oluşumu ve % 17 oranında sürgün oluşumu ile elde edilmiştir. Ayrıca 4.3’de verilmiş

olan deneme bulgularına göre rejenerasyon ortamının içerdği hormon konsantrasyonları ve kombinasyonlarına göre şu istatistiksel veriler elde edilmiştir; 1 mg/l BAP ortamında kotiledon ile flamingo-bill eksplantlarında tomurcuk ve sürgün oluşumu yönünden fark bulunamamıştır ($p=0.855$ ve $p=0.999$).

2 mg/l BAP ortamında kotiledon ile flamingo-bill eksplantlarında tomurcuk oluşumu yönünden fark bulunamamıştır ($p=0.855$). Ancak sürgün oluşumu yönünden kotiledon daha üstün olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$).

1 mg/l Zeatin ortamında kotiledon ile flamingo-bill eksplantlarında tomurcuk oluşumu yönünden kotiledon lehine fark bulunmuştur ($p<0.001$). Ancak sürgün oluşumu yönünden iki eksplant arasında fark saptanamamıştır ($p=0.385$).

2 mg/l Zeatin ortamında kotiledon ile flamingo-bill eksplantlarında tomurcuk oluşumu yönünden kotiledon lehine fark bulunmuştur ($p<0.001$). Ancak sürgün oluşumu yönünden iki eksplant arasında fark saptanamamıştır ($p=0.999$).

1 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA ortamında kotiledon ile flamingo-bill eksplantlarında tomurcuk ve sürgün oluşumu yönünden kotiledon lehine fark bulunmuştur ($p=0.022$ ve $p<0.001$).

1 mg/l BAP ve 2 mg/l IAA ortamında kotiledon ile flamingo-bill eksplantlarında tomurcuk ve sürgün oluşumu yönünden fark bulunamamıştır ($p=0.067$ ve $p=0.999$).

2 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA ortamında kotiledon ile flamingo-bill eksplantlarında tomurcuk ve sürgün oluşumu yönünden kotiledon lehine fark bulunmuştur ($p<0.001$ ve $p<0.001$).

2 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA ortamında kotiledon ile flamingo-bill eksplantlarında tomurcuk oluşumu yönünden kotiledon lehine fark bulunmuştur ($p=0.026$). Ancak sürgün oluşumu yönünden iki eksplantın benzer sonuca sahip oldukları belirlenmiştir ($p=0.999$).

2 mg/l BAP ortamında sürgün oluşumu yönünden; 1 ve 2 mg/l ZEATIN ortamlarında tomurcuk oluşumu yönünden; 1 mg/l BAP+1 mg/l IAA, 2 mg/l BAP+1 mg/l IAA ve ayrıca 2 mg/l BAP+1 mg/l IAA ortamlarında hem tomurcuk hem de sürgün oluşumu yönünden kotiledon eksplantının flamingo-bill eksplantından üstün olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Bu bulguların ışığında, % 84 oranında

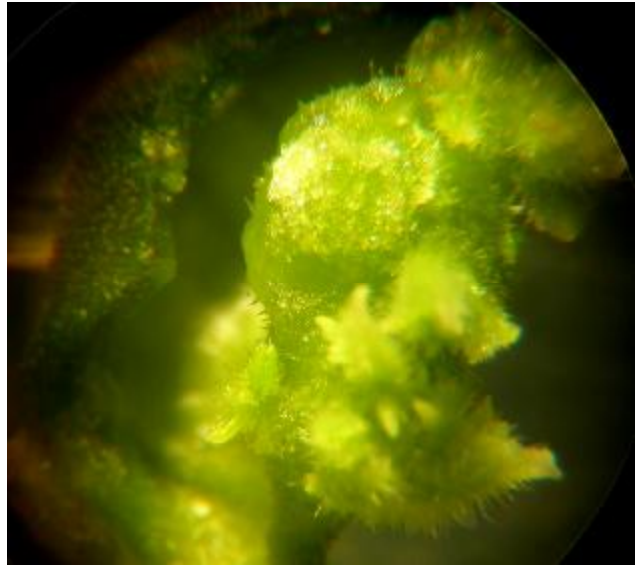
sürgün gelişimi ile kotiledon eksplantlarının ‘flamingo bill’ eksplant tipine göre daha avantajlı olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple sonraki uygulamalarda ve gen transformasyonu uygulamalarında kotiledonların proksimal kısımları eksplant tipi olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.14. “Flamingo Bill” Tipi Elde Edilmiş Eksplanttan Sürgün Gelişimi



şekil 4.15. Kotiledonların Proksimal Bölğelerinden Alınan Eksplantlardan Sürğün Gelişimi



şekil 4.16. 2mg/l BAP + 1 mg/l IAA İçeren Rejenerasyon Ortamında Kotiledon Eksplantından Sürğün Gelişimi

4.4. Rejenerasyon ve Gen Transformasyonunda Kullanılan En Uygun Fide Yaşının Belirlenmesi

4.2 ve 4.3'te verilmiş olan bulguların ışığında fide yaşının belirlenmesi uygulamasında, sürgün geliştirme ortamı olarak; 2mg/l BAP+1mg/l IAA içeren MS ortamı kullanılırken eksplant tipi olarak kotiledonların proksimal bölgeleri kullanılmıştır. *In vitro* ortamda çimlendirilmiş farklı yaştaki fidelerden alınan kotiledon eksplantlarından alınan rejenerasyon sonuçları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. *In vitro* Ortamda Çimlendirilmiş Farklı Yaştaki Fidelerden Alınan Kotiledon Eksplantlarından Alınan Rejenerasyon Sonuçları

Çimlendirme süresi (Gün) ^a	Kullanılan sürgün geliştirme ortamı ^b ve Konsantrasyonu	Kullanılan eksplant sayısı ^d	Tomurcuk oluşumu	Sürgün oluşumu
0	BAP 2 mg/l + IAA1 mg/l	48	2	0
0 ^c	BAP 2 mg/l + IAA1 mg/l	48	7	2
1	BAP 2 mg/l + IAA1 mg/l	48	12	7
2	BAP 2 mg/l + IAA1 mg/l	48	23	14
4	BAP 2 mg/l + IAA1 mg/l	48	36	33

^a Çimlendirme ortamı olarak bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen bazal MS ortamı ile katılaştırıcı olarak AGAR (Sigma) kullanılmıştır.

^b Ön denemeler ışığında en yüksek sürgün oluşum frekansını gösteren sürgün geliştirme ortamı ve konsantrasyonları seçilmiştir.

^c Bu gruptaki eksplantlar, steril edildikten sonra 24 saat süre ile steril didistile su içerisinde karanlıkta bekletilen hıyar bitkilerinin tohumlarının kotiledonlarının kesilmesi ile elde edilmiştir.

^d Eksplantlar her petriye 12 tane gelecek şekilde 4 petride kültüre alınmışlardır.

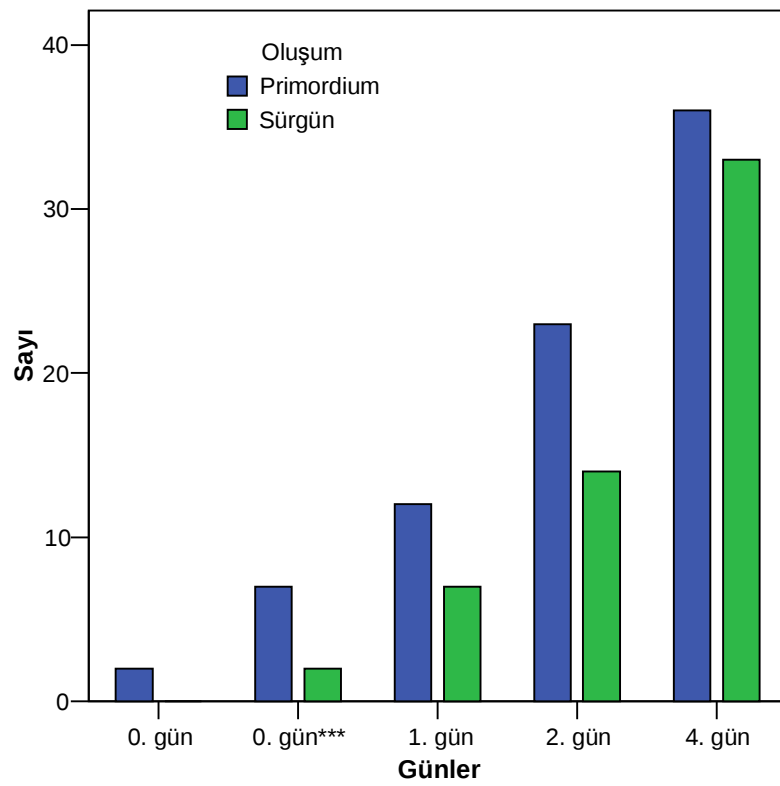
Çizelge 4.3. *In vitro* ortamda çimlendirilmiş farklı yaştaki fidelerden alınan kotiledon eksplantlarından alınan rejeneasyon kapasitelerine ait p değerleri

Günler	Tomurcuk oluşumu	Sürgün oluşumu
0. gün – 0. gün*	0.159	> 0.999
0. gün – 1. gün	0.007	0.462
0. gün – 2. gün	< 0.001	0.183
0. gün – 4. gün	< 0.001	0.014
0. gün* – 1. gün	0.306	0.350
0. gün* – 2. gün	0.001	0.204
0. gün* – 4. gün	< 0.001	0.001
1. gün – 2. gün	0.033	> 0.999
1. gün – 4. gün	< 0.001	0.017
2. gün – 4. gün	0.011	0.007

0. gün* : Bu gruptaki eksplantlar, steril edildikten sonra 24 saat süre ile steril didistile su içerisinde karanlıkta bekletilen hıyar bitkilerinin tohumlarının kotiledonlarının kesilmesi ile elde edilmiştir.

Çizelge 4.2’den de görülebildiği gibi, tomurcuk ve sürgün oluşumu ile kotiledon eksplantlarının elde edildiği fidelerin çimlendirme ortamında kaldıkları gün arasında doğrudan fark bulunmuştur. Tomurcuklardan oluşan sürgünlere bakacak olursak, 0.gün, 0.gün* (24 saat), 1.gün ve 2.gün sürgün oluşumu istatistik olarak aynı iken 4.gün bu ölçümlerden farklı bulunmuştur. En yüksek tomurcuk ve sürgün oluşumunun, çimlendirme ortamında 4 gün kalan fidelerden sağlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Hooymans ve ark. (1994), 3-5 günlük hıyar fidelerinden %

100; Kim ve ark. (2000), yine 3-5 günlük fidelerden % 80-90 rejenerasyon elde ederken her iki araştırmacı grubu da, daha genç ve yaşlı fideler kullanıldığında rejenerasyon kapasitesinin düştüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacıların bulguları, bu araştırma sonuçları ile uyum göstermektedir. Sonraki rejenerasyon ve gen transformasyonu çalışmaları bu bulgu ışığında yürütülmüştür.



Şekil 4.17. *In vitro* Ortamda Çimlendirilmiş Farklı Yaştaki Fidelerden Alınan Kotiledon Eksplantlarının Rejenerasyon Kapasiteleri

4.5. Rejenerasyon Ortamında Kullanılacak Katılaştırıcı Maddenin Belirlenmesi

Rejenerasyon ve gen çalışmalarında kullanılacak rejenerasyon ortamları için uygun katılaştırıcı maddeyi saptamak amacı ile kullanılan iki farklı jel yapıcı madde (Agar ve Phytigel) ile ilgili olarak elde edilen veriler, istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve buna ait yüzde ve p değerleri aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.4. Agar veya Phytigel içeren ortam üzerindeki eksplantların oluşumlara ait yüzde değerleri

Kullanılan katılaştırıcı tipi	Kullanılan eksplant sayısı	Tomurcuk oluşumu	Sürgün oluşumu	Vitrifikasyon (Camlaşma)
AGAR	48	19 (%39.6)	12 (%63.2)	0 (%0.0)
PHYTAGEL	48	34 (%70.8)	32 (%94.1)	7 (% 14.6)

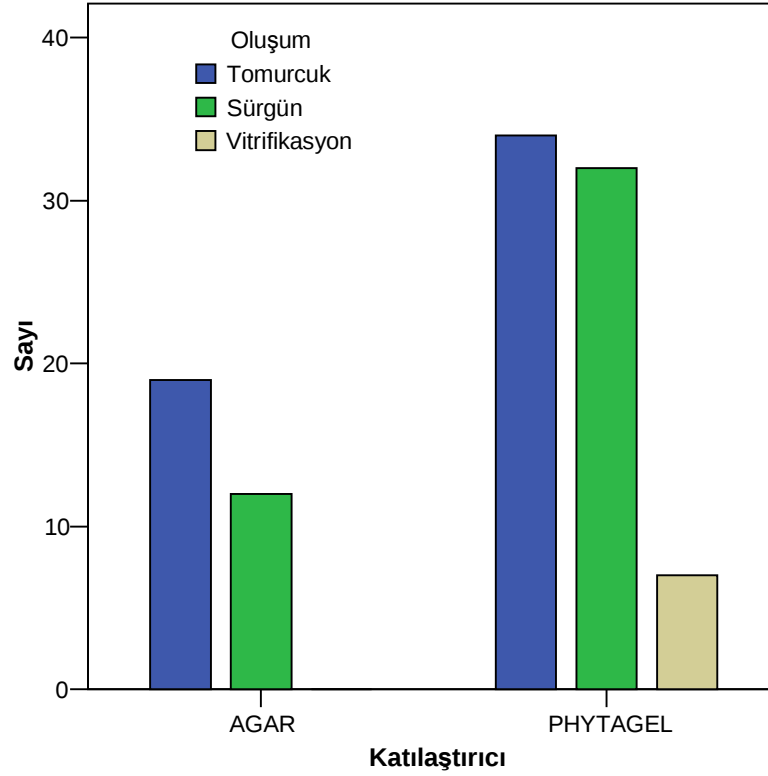
Çizelge 4.5. Agar veya Phytigel içeren ortam üzerindeki eksplantların rejenerasyon kapasitelerine ait p değerleri

Katılaştırıcı	Tomurcuk oluşumu için p değeri	Sürgün oluşumu için p değeri
AGAR – PHYTAGEL	0.004	0.007

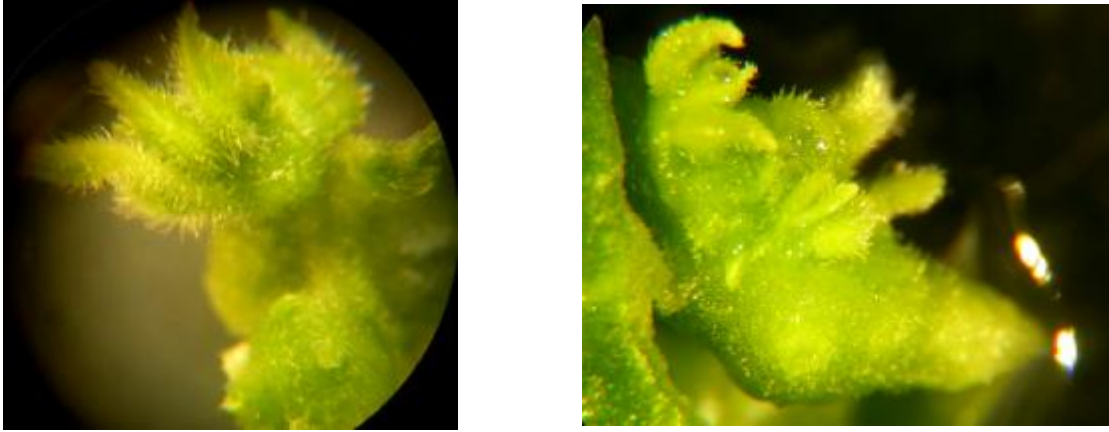
Çizelge 4.4'te verilen tabloya ve çizelge 4.5'te verilen p değerine göre phytigel kullanımı ile tomurcuk oluşumu daha yüksek olmuş ve bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Benzer durum sürgün oluşumu için de saptanmıştır. Buna ait veriler Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Verilere ait grafik, şekil 4.18'de verilmiştir. Grafikten de anlaşılabileceği gibi phytigel kullanımı ile elde edilen tomurcuk oranı, ortam içeriğinde agar kullanıldığında oluşan tomurcuk oranından yüksektir. Ayrıca, phytigel kullanımında

oluşmuş tomurcukların sürgün oluşturma kapasiteleri agar kullanımından daha yüksek bulunmuştur. Phytigel kullanımında vitrifikasyon (camlaşma) oranı artmış olsa da genel rejenerasyon kapasitesine bakıldığında phytigel kullanımının agar kullanımından daha üstün olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.18. Agar ve Phytigel (Gelrite) Kullanımının Rejenerasyon ve Vitrifikasyon Üzerine Etkisi



Şekil 4.19. Phytigel (Gelrite) İçeren Rejenerasyon Ortamı Üzerinde Sürgün Oluşumu

4.6. Gen Transformasyonu Çalışmalarında Kullanılan Etkili Kanamisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Etkili kanamisin konsantrasyonunu saptamak amacı ile kullanılan 4 farklı doz (0, 50, 100 ve 200 mg/l) ile ilgili olarak elde edilen veriler, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna ait veriler ve p değerleri aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı kanamisin konsantrasyonlarında oluşan tomurcuk-sürgün ve beyazlaşan sürgün sayılarına ait değerler

Kullanılan Kanamisin Konsantrasyonu	Kullanılan eksplant sayısı ^a	Tomurcuk oluşumu	Sürgün oluşumu	Beyazlaşma ^c
0 mg/l	48	39	32	0
50 mg/l	48	34	28 ^b	2
100 mg/l	48	23	11 ^b	19
200 mg/l	48	9	2	35

^a Eksplantlar her petriye 12 tane gelecek şekilde 4 petride kültüre alınmışlardır.

^b Sürgünlerin normal olarak tomurcuk oluşumunu takiben oluşumundan sonra bazılarının renkleri açılmıştır.

^c Kimi eksplantta beyazlaşma, eksplantın bütününde gözlenirken bazı eksplantlarda ise kısmen gözlenmiştir.

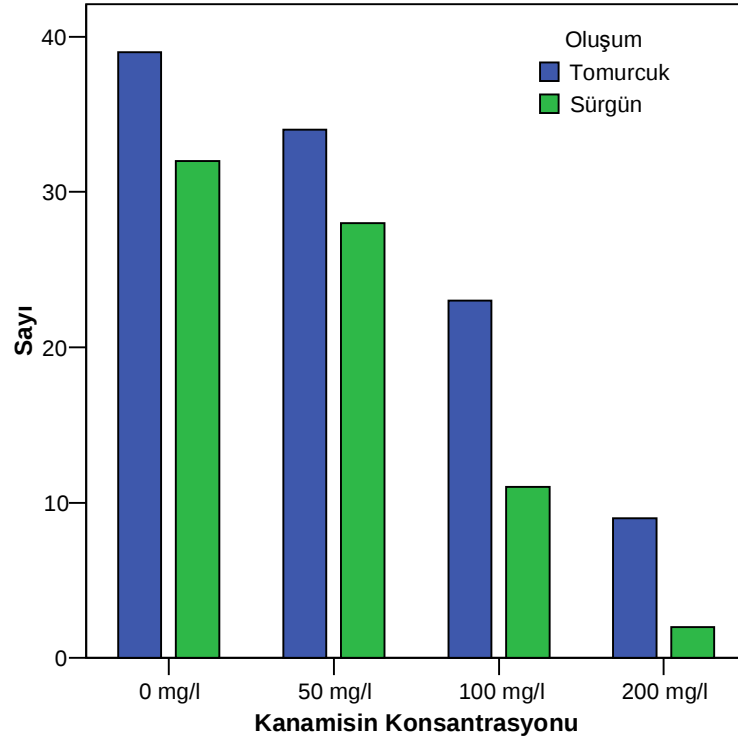
Çizelge 4.7. Kanamisinin Farklı Konsantrasyonlarını İçeren Ortamlarda Eksplantların Rejenerasyon Kapasitelerine Ait p Değerleri

Kanamisin Konsantrasyonu	Tomurcuk oluşumu için p değeri	Sürgün oluşumu için p değeri	Sararma için p değeri
0 mg/l – 50 mg/l	0.339	> 0.999	0.495
0 mg/l – 100 mg/l	0.015	0.007	< 0.001
0 mg/l – 200 mg/l	< 0.001	0.001	< 0.001
50 mg/l – 100 mg/l	0.034	0.006	< 0.001
50 mg/l – 200 mg/l	< 0.001	0.001	< 0.001
100 mg/l – 200 mg/l	< 0.001	0.252	0.002

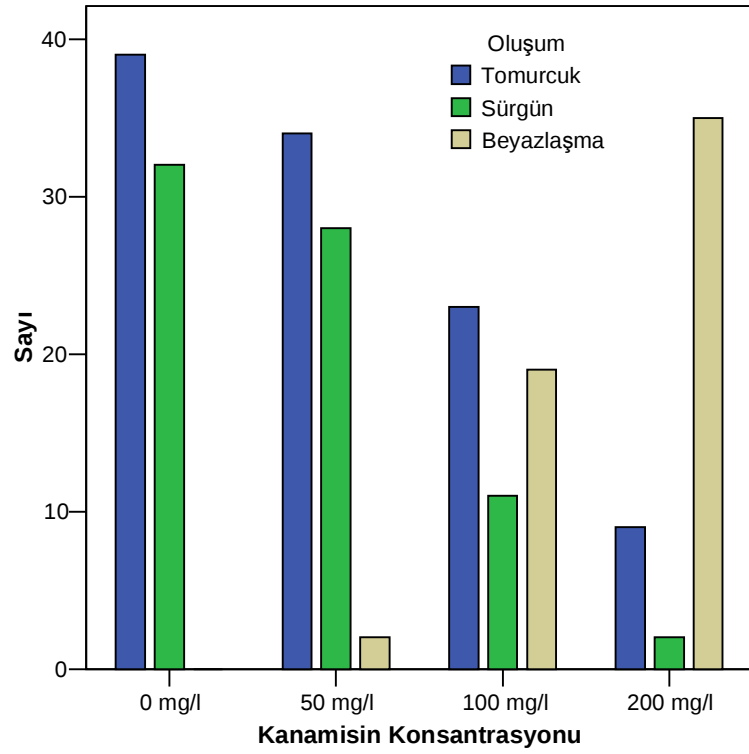
Verilen p değerlerine göre rejenerasyon kapasitesi açısından yani tomurcuk oluşturma yönünden 0 ve 50 mg/l ile 50 ve 100 mg/l arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmazken, bunun dışındaki konsantrasyon karşılaştırmaları tomurcuk oluşturma bakımından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Şekil 4.18.'deki grafikten de anlaşılabileceği gibi rejenerasyon ortamına eklenen kanamisin konsantrasyonu arttırıldıkça oluşan tomurcuk sayısı azalmaktadır. Sürgün oluşum oranına baktığımızda, 0 ve 50 mg/l ile 100 ve 200 mg/l arasında sürgün oluşumu yönünden istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Yine kanamisin konsantrasyonunun ortamda arttırılması, sürgün sayısının düşmesine sebep olmuştur.

Eksplantlardaki beyazlaşma ile ilgili verilere bakıldığında, durumun daha farklı olduğu gözlenmektedir. Kanamisinin 0 ve 50 mg/l konsantrasyonları uygulandığında beyazlaşma miktarının aynı olduğu gözlenirken, konsantrasyon

arttırıldıkça beyazlaşma miktarının istatistiksel olarak önemli olacak şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu durum şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Rejenerasyon Ortamında Bulunan Kanamisin Konsantrasyonunun Tomurcuk ve Sürgün Oluşumuna Ait Etkisi



Şekil 4.21. Rejenerasyon Ortamında Bulunan Kanamisin Konsantrasyonunun Tomurcuk ve Sürgün Oluşumu ile Beyazlaşma Üzerine Etkisi



Şekil 4.22. Kanamisin Varlığında Beyazlaşan Tomurcuk ve Sürgün Oluşumu

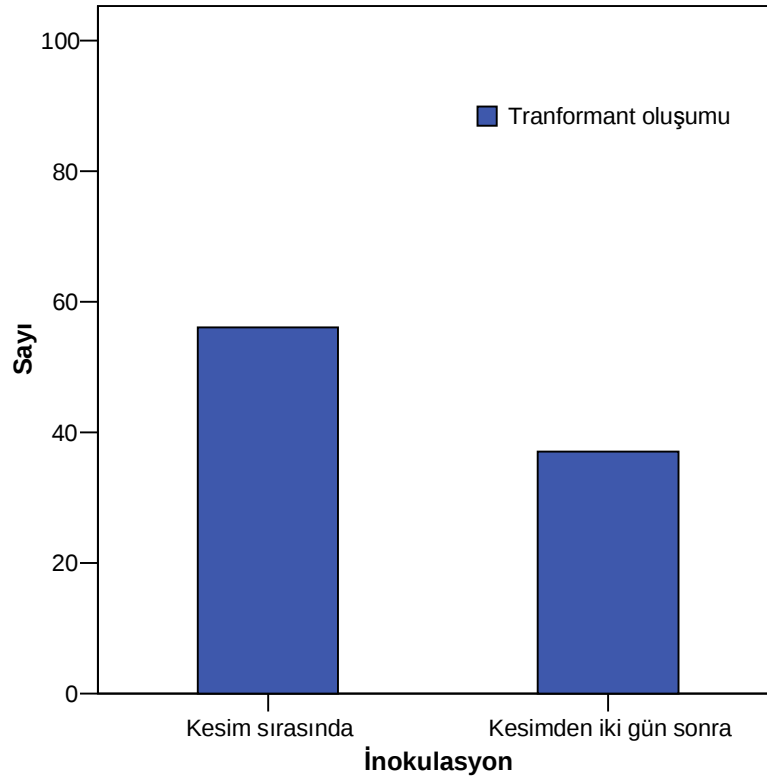
4.7. Eksplantların *Agrobacterium tumefaciens* ile inokulasyonu ve Gen Transformasyonu

Agrobacterium tumefaciens ile gen transformasyonunda, rejenerasyon denemelerine ait bulgu ve sonuçların ışığında; 4 günlük fidelerin kotiledonlarının proksimal bölgelerinin alınması ile elde edilmiş bitki parçaları, eksplant kaynağı olarak kullanılırken, kotiledon eksplantları için en yüksek organogenesis oranı sağlayan rejenerasyon ortamı kullanılmıştır. Gen transformasyonunda MS tuzları ve MS vitaminleri ile 2 mg/l BAP, 1 mg/l IAA, 20 mg/l asetosiringon, 0,5 g/l MES, %3 Sakkaroz ve %0,3 Phytigel içeren rejenerasyon ortamı kullanılmıştır.

Agrobacterium tumefaciens ile gen transformasyonunda iki yöntem denenmiştir. Kesim sırasındaki inokulasyon ile kesimden sonra rejenerasyon ortamında kültüre alınan ve 2 gün sonunda bakteri solüsyonu ile inokule edilmesi elde edilen transformant oluşumu ile kesimden iki gün sonraki inokulasyon ile elde edilen transformant oluşumu istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p=0.011$). Buna göre kesim sırasındaki inokulasyon ile daha çok transformant oluşmuştur. Elde edilen bulgular ve p değeri Çizelge 4.8 'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kesim Sırasında ve Sonrasında İnokule Edilen Eksplantlardan Elde Edilmiş Transformant Sayısına Ait p Değerleri

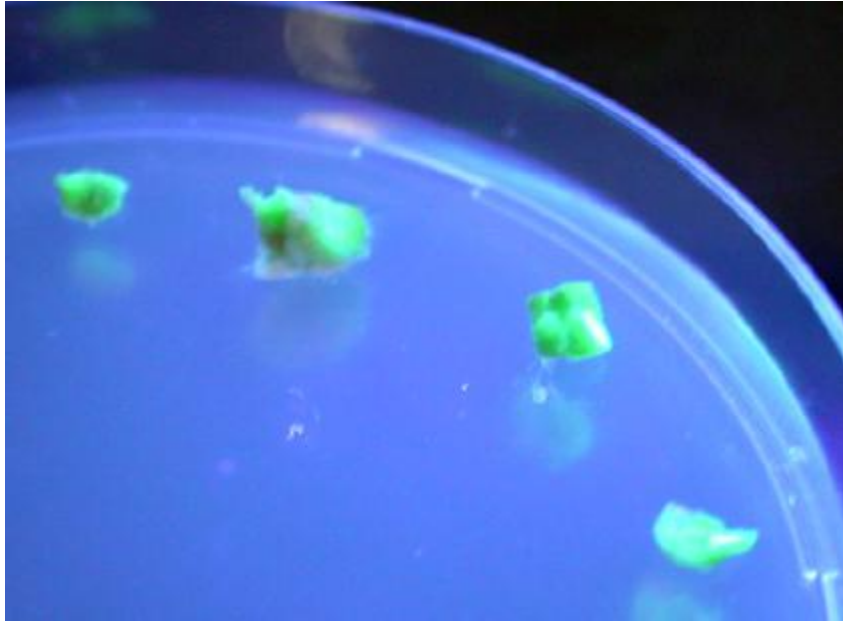
İnokulasyon	Kullanılan eksplant sayısı	Transformant Oluşumu	p değeri
Kesim sırasında	100	56	0.011
Kesimden iki gün sonra	100	37	



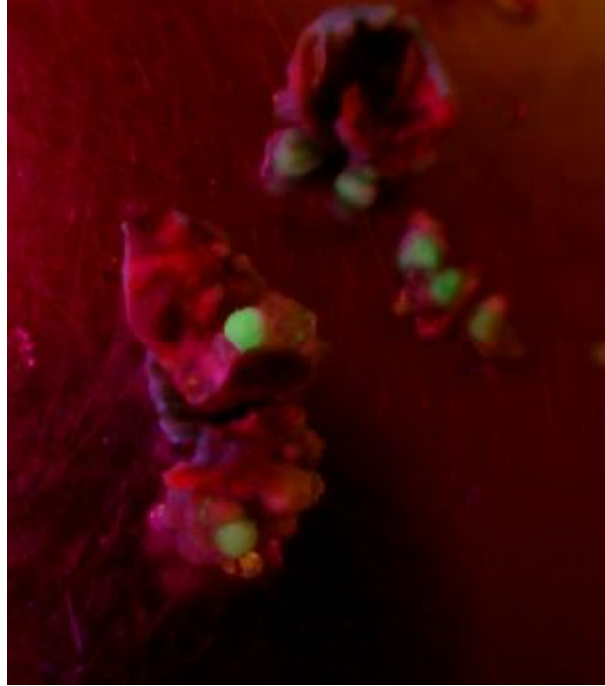
Şekil 4.23. Kesim Sırasında ve Sonrasında İnokule Edilen Eksplantlardan Elde Edilmiş Transformant Oluşumu

Trangenik eksplant elde etmek amacıyla 4 günlük fidelerden elde edilmiş kotiledon eksplantlarının 3.2.2.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan bakteri inokulasyon solüsyonu içerisinde kesilerek bu solüsyon içinde 10 dakika bekletildiğinde, transformant oluşumu açısından kesilmeden önce 2 gün karanlıkta, rejenerasyon ortamında kültüre alınmış eksplantların inokulasyon solüsyonunda bekletilmesinden daha avantajlı olduğu gözlenmiştir. Gafni ve ark.(1995); Creasap ve ark. (2005)’nın yapmış oldukları araştırmalar sonucunda, rejenerasyon ortamı içerisinde oksin hormonu varlığının *Agrobacterium tumefaciens* ile gerçekleştirilen transformasyon (gen aktarımı) çalışmalarında avantaj sağladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan rejenerasyon ortam içeriğinde oksin olarak IAA kullanılmıştır. Ortamda IAA varlığının rejenerasyon kapasitesini arttırdığı tespit edilirken, gen transformasyonunda da üstünlük sağladığı düşünülmektedir. Seleksiyon ortamı üzerinde gelişen tomurcuk ve sürgünlerde mGFP5-ER gen ifadesi (eksprasyon), yeşil

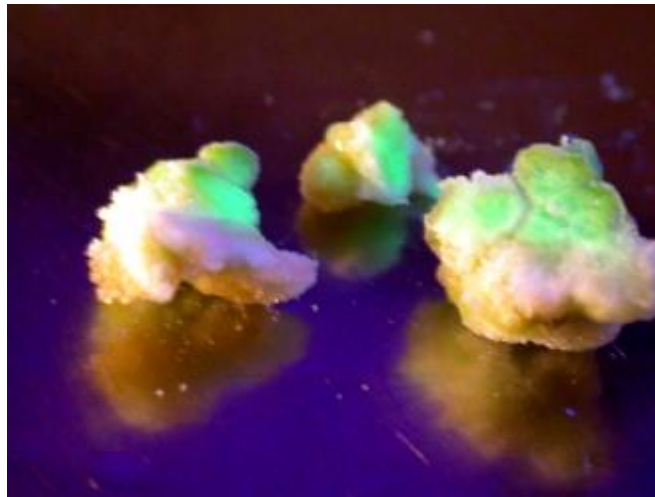
floresan proteininin 254/365 nm UV altında fosforlu yeşil renk vermesi ile oldukça erken zamanda, dokuya zarar vermeden tespit edilebilmiştir. Transgenik dokular, eksplantların seleksiyon ortamına alınmasından 2-3 hafta sonra el uv'si ile görsel olarak tespit edilmiştir. Elde edilmiş olan transgenik tomurcuk ve kallus yapılarının sürgüne dönüşmediği gözlenmiştir.



Şekil 4.24. GFP Geninin İfade Olduğu Kotiledon Eksplantları



şekil 4.25. El UV'si Altında Eksplantın Kesilmesi İle Elde Edilen Parçalarda GFP Gen İfadesi



şekil 4.26. Parçalara Bölünmüş Kotiledon Eksplantında GFP geninin İfadesi

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Hıyar bitkisinde etkili bir rejenerasyon ve gen transformasyonu yöntemi oluşturmak amacı ile yapılmış olan çalışmadan elde edilen sonuçlar ve bu sonuçlara karşılık getirilen öneriler aşağıda sıralanmıştır.

Rejenerasyon ve transformasyon çalışmalarında kullanılacak en uygun hormon konsantrasyonu ve kombinasyonunu belirlemek amacı ile yapılmış rejenerasyon uygulaması iki farklı eksplant tipi için denenmiştir. Kotiledon eksplantı için en yüksek tomurcuk oluşum frekansı (% 97), 2 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA içeren MS ortamından sağlanmıştır. Eksplantlar üzerinde oluşmuş tomurcuklardan gelişen sürgün oluşumu ise % 84 oranında yine 2 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA içeren MS ortamından sağlanmıştır. ‘Flamingo-bill’ eksplant tipinde ise en yüksek tomurcuk oluşumu, 2 mg/l BAP içeren MS ortamından, en yüksek sürgün ise 2 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Araştırmada kullanılacak olan eksplant kaynağının belirlenmesi amacı ile yapılmış olan uygulamada; 2 mg/l BAP ortamında sürgün oluşumu; 1 ve 2 mg/l Zeatin ortamlarında tomurcuk oluşumu; 1 mg/l BAP+1 mg/l IAA, 2 mg/l BAP+1 mg/l IAA ortamlarında hem tomurcuk hem de sürgün oluşumu bakımından kotiledon eksplantının flamingo-bill eksplantından üstün olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Kotiledonların proksimal bölgelerinin, çalışmada denenilen tüm bitki büyüme düzenleyicileri bakımından ‘flamingo-bill’ eksplant tipinden daha yüksek rejenerasyon kapasitesi (tomurcuk+sürgün oluşumu) gösterdiği belirlenmiştir. Hıyar bitkisi ile yapılacak transformasyon çalışmalarında yüksek oranda organogenesis kapasitesi göstermesi sebebi ile kotiledon eksplantlarının proksimal bölgelerinin kullanılması önerilmiştir. Sonraki araştırmalarda ‘flamingo-bill’ eksplantlarında rejenerasyon oranını arttırabilmek amacı ile farklı sitokininlerin ve bunların farklı konsantrasyonlarının uygulanması önerilmektedir.

Rejenerasyon ve gen transformasyonunda kullanılan en uygun fide yaşının belirlenmesi amacı ile yapılmış uygulamada, en yüksek tomurcuk ve sürgün oluşumu (%75-tomurcuk); (%92-sürgün) oranları ile hormonsuz MS ortamında *in vitro*

çimlendirilmiş 4 günlük fidelerin kesilmesi ile elde edilmiş kotiledonların proksimal bölgelerinden sağlanmıştır. Literatürde yer alan pek çok çalışma ile de desteklenmesi sebebi ile gerek rejenerasyon gerekse transformasyon çalışmalarında 4 günlük fidelerin kotiledonlarının kullanılması önerilmektedir.

Rejenerasyon ve gen transformasyonu çalışmasında kullanılacak besi ortamı katılaştırıcısı olarak agar ve phytagel (gelrite) denenmiştir. Agar kullanımında kallus oluşumunun phytagel kullanımına göre arttığı, tomurcuk oluşum yüzdesinin %39.6, sürgün oluşumunun ise %63.2 olduğu belirlenmiştir. Phytagel kullanımında ise rejenerasyon kapasitesinin artarak, %70.8 oranında tomurcuk, %94.1 sürgün oluşumu gözlenmiştir. phytagel kullanımında gelişen sürgünlerde düşük oranda (%14.6) vitrifikasyon (camlaşma) gözlenirse de sonraki rejenerasyon ve transformasyon çalışmalarında ortam katılaştırıcısı olarak phytagel kullanılmıştır.

Gen transformasyonu çalışmalarında seleksiyon ortamına eklenecek kanamisin konsantrasyonunu tespit etmek amacı ile yapılmış uygulamada, kanamisinin artan konsantrasyonlarında sürgün oluşumunun azaldığı istatistiksel olarak saptanırken, oluşan sürgünlerin bazılarının beyazlaştığı gözlenmiştir. Sonraki tüm gen transformasyonu çalışmalarında kullanılan seleksiyon ortamında 100 mg/l kanamisin konsantrasyonu sabit tutulmuştur. Ancak tomurcuktan sürgün oluşumunu teşvik edebilmek amacı ile eksplantların seleksiyon ortamında iki hafta kültüre alınmasından sonra kanamisin konsantrasyonunun azaltılması önerilmektedir.

Gen transformasyonu çalışmasında gen aktarılması frekansını arttırabilmek amacı ile eksplantların bakteri ile inokulasyonunda iki ayrı uygulama denenmiştir. Bu iki uygulamadan ilkinde, kotiledon ekplantları bakteri inokulasyon solüsyonu içinde kesilerek 2 gün birlikte kültüre alındığı ortama alınırken, ikinci uygulamada ise kotiledonlar kesildikten sonra eksplantlar bakteri ile inokule edilmeden önce 2 gün karanlıkta rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. İki günün sonunda bu eksplantlar inokulasyon solüsyonu ile muamele edilerek iki gün karanlıkta birlikte kültüre alınmıştır. Bu iki uygulama sonucu en yüksek transformant (gen aktarılmış) doku oluşumu (% 56) ilk uygulamadan elde edilmiştir.

Rejenerasyon çalışmalarında elde edilen bulguların ışığında 4 günlük *in vitro*'da çimlendirilmiş fidelerden elde edilmiş kotiledonların proksimal bölgeleri

Agrobacterium tumefaciens inokulasyon solüsyonu içinde kesilerek yara dokusu oluşturulmuş ve aynı solüsyon içinde 10 dakika bekletildikten sonra eksplantlar, 2 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında 2 gün karanlıkta birlikte kültüre alınmıştır. Ayrıca bu ortam içine pH'ı sabit tutmak amacı ile 0,5 g/l MES ve transformasyon etkinliğini arttırmak için 20 mg/l (200 µM) asetosiringon eklenirken ortam katılaştırıcısı olarak phytagel kullanılmıştır. Seleksiyon ortamı üzerinde gelişen tomurcuk ve sürgünlerde GFP gen ifadesi (ekspresyon) yeşil floresan proteininin 365 nm UV altında fosforlu yeşil renk vermesi ile oldukça erken zamanda, dokuya zarar vermeden tespit edilebilmiştir. Gen ifadesi yalnız tomurcuk oluşumlarında gözlenirken, bunlardan gelişen sürgün ve ortam içinde oluşan diğer hiçbir sürgünde gen ifadesi gözlenememiştir. Ancak gen ifadesi yalnız görsel olarak saptanmıştır. mGFP5-ER (Haseloff, 1995) geninin hücrede lokalizasyonu ve genin transgenik doku genomundaki varlığını ispatlamak için PCR ve Southern blot ile genin protein ifadesi için Western blot gibi moleküler ve serolojik teknikler kullanılmamıştır. Çalışmanın geliştirilmesi bakımından sonraki araştırmalarda bu tekniklerin de uygulanması tavsiye edilmektedir. Hıyar bitkisinde sürgün rejenerasyonu konusunda genotip etkisinin çok belirgin olduğu tezin önceki bölümlerinde literatürlerle desteklenmiştir. Üzerinde çalışılacak her yeni hıyar genotipi için sürgün rejenerasyonu denemelerinin tamamlanması, bunun ardından gen transformasyonu çalışmalarına başlanması tavsiye edilmektedir.

Hıyar bitkisine farklı genlerin transferi yapılmış olmakla birlikte, literatürde GFP geninin transfer edilmesi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma bu bağlamda bir öncü niteliği taşımaktadır. Gen transformasyonunda genotip kadar aktarılan genin niteliği de büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle konu ile ilgili çalışma yapmak isteyen araştırmacılara smRS-GFP, smGFP (Davis and Vierstra, 1998), mGFP4-ER (Haseloff, 1997) v.b. gibi farklı GFP modifikasyonları ile farklı hıyar genotiplerinde deneme yapmaları önerilmektedir.

Son olarak, bu tez çalışmasında yeşil floresan proteininin görsel tespiti 254/365 nm emisyon aralığına sahip el UV'si ile yapılmıştır. Oysa tezde kullanılan mGFP5-ER varyantının uyarılma/emisyon aralığı 395, 475/509 nm'dir (Stewart, 2001). Bazı dokularda zayıf gen ifadesinin gözlenmiş olmasındaki sebeplerden

birinin de GFP'nin bu varyantının uyarılma aralığının el UV'sinin sahip olduğu değerden yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Gen ifadesinin daha etkin olarak gözlenebilmesi için 395, 475/509 nm aktivasyon/emisyon aralığına sahip stereomikroskoplar kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- ALI, N., SKIRVIN, R., SPLITTSTOESSER, W.E., GEORGE, W.L., 1991. Germination and Regeneration of Plants from Old Cucumber Seed. Hortsciense, 26 (7): 917-918.
- ANONYMOUS, 2005.
<http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&hasbulk=0&version=ext&language=EN>
- ABRIE, A.L., and STADEN, J. Van, 2001. Development of Regeneration protocols for Selected Cultivars. Plant Growth Regulation 35: 263-267.
- ARI, Ş., ŞAHİN, S., GÜREL, F., GÜRLE, S.D., COCKBURN, B., GÖZÜKIRMIZI, N., 1997. Transfer of HyHel 10 scFv Gene to Plants. Progress in Botanical Research, Proceedings of the 1st Balcan Botanical Congress. Eds. I.Tsekos, M. Moustakas, p: 461-464, Kluwer Academic Publishers, Dortrecht, Boston, London. ISBN 0-7923-5305-6.
- BASTAR, M.T., LUTHAR, Z. and BOHANEK B., 2002. Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Onion (*Allium cepa* L.) Using Direct Somatic Organogenesis,
http://altweb.jhsph.edu/publications/journals/iva/iva38_suppl/iva38suppl9h.htm.
- BURZA, W., and MALEPSZY, S., 1995. Direct Plant Regeneration from Leaf Explants in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is Free Of Stable Genetic Variation. Plant Breeding, 114: 341-345.
- CADE, R.M., WEHNER, T.C., BLAZICH, F.A., 1990. Effect of Explant Age and Growth Regulator Concentration on Adventitious Shoot Formation from Cucumber Cotyledonary Tissue. Report Cucurbits Cooperative, 13, 14-17.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W.W., and PRASHER, D.C., 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. Science 263: 802-805

- CHEE, P.P., 1990 Transformation of *Cucumis sativus* Tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and The Regeneration of Transformed Plants. Plant Cell Reports, 9:245-248.
- CHEE, P.P., and SLIGHTOM, J.L., 1991. Transfer and Expression of Cucumber Mosaic-Virus Coat Protein Gene In The Genome of *Cucumis sativus*. J.Amer.Soc.Hort.Sci, 116:6, 1098-1102.
- CHEE, P., 1991. Plant Regeneration from Cotyledons of *Cucumis melo* "Topmark". HortScience, 26 (7): 908-910.
- COMPTON, M.E.,1999. Dark Pretreatment Improves Adventitious Shoot Organogenesis from Cotyledons of Diploid Watermelon. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 58: 185–188.
- CREASAP, J E; REID, C L; GOFFINET, M C; ALONI, R; ULLRICH, C; BURR, T.J., 2005. Effect of wound position, auxin, and *Agrobacterium vitis* strain F2/5 on wound healing and crown gall in grapevine. Phytopathology, 95(4): 362-367.
- ÇETİNER, S., 1993. Hastalıklara Dayanıklı Bitki Islahında Genetik Mühendisliği. Doğa, 17:1121-1131.
- ÇÜRÜK, S., 1999. Bazı Kavun (*Cucumis melo* L.) Çeşitlerinde İn vitro Rejenerasyon ve Genetik Transformasyon Üzerinde Araştırmalar. Ç.Ü. Doktora Tezi, Adana, 217s.
- DE LA RİVA, G., A., GONZALEZ-CABRERA, J., VAZQUEZ-PADRON, R., AYRA-PARDO, C., 1998. *Agrobacterium*: a Natural Tool for Plant Transformation. Elect. J. Biotech., 1: 2-16.
- DAVIS, S.J., and VIERSTRA, R.D., 1998. Soluble, Highly Fluorescent Variants of Green Fluorescent Protein (GFP) for Use in Higher Plants. Plant Mol. Biol. 36 (4), 521-8
- DONG, J.Z., and JIA, S.R., 1991. High Efficiency Plant Regeneration fom Cotyledons of Watermelon (*Citrullus vulgaris* (Schrad.)). Plant Cell Rep. 9: 559–562.
- DUGDALE, B., BEETHAM, B.R., BECKER, D.K., HARDING, R.M., and DALE, J.L., 1998. Promoter Activity Associated with the Intergenic Regions of

- Banana Bunchy Top Virus Dna-1 To -6 in Transgenic Tobacco and Banana Cells. *Journal of General Virology* 79, 2301-2311.
- EADY, C.C., READER, J., DAVIS, S., AND DALE, T., 2003. Inheritance and Expression of Introduced DNA in Transgenic Onions Plants (*Allium cepa*). *Annals of Applied Biology* 142, 219-224.
- ELLIOT, A.R., CAMPBELL, J.A., DUGDALE, B., BRETTELL, R.I.S., GROF, C.P.L., 1999. Green-Fluorescent Protein Facilitates Rapid In Vivo Detection Of Genetically Transformed Plant Cells. *Plant Cell Reports*, 18: 707-714.
- GABA, V., SCHLARMAN, E., ELMAN, C., SAGEE, O., WATAD, A.A., and GARY, D.J., 1990. *In vitro* Studies on the Anatomy and Morphology of Bud Regeneration in Melon Cotyledons. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 35: 1-7.
- GAFNI, Y., ICHT, M., RUBINFELD, B.Z., 1995. Stimulation of *Agrobacterium tumefaciens* Virulence with Indole-3-Acetic acid. *Letters In Applied Microbiology* 20, 98-101.
- GAMBLEY, R.L., and DODD, W.A., 1990. An In Vitro Technique for the Production De Novo of Multiple Shoots in Cotyledon Explants of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 177-183.
- GALPERIN, M., PATLIS, L., OVADIA, A., WOLF, D., ZELCER, A., and KENIGSBUCH, D., 2003. A Melon Genotype with Superior Competence for Regeneration and Transformation. *Plant Breeding*, 122, 66-69.
- GOLIS, A., PADILLA, I.M.G., GENTILE, A., DAMIANO, C., and SCORZA, R., 2002. Comparison of GFP and *gus* Selectable Marker Gene Expression in Explains of Peach and Plum.
http://altweb.jhsph.edu/publications/journals/iva/iva38_suppl/iva38suppl9e.htm.
- GUO, W.W., and GROSSER, J.W., 2004. Transgenic Sweet Orange Plant Regeneration by Protoplast Co-Transformation with a Potential Canker

- Resistance Gene and a GFP Marker Gene. Xth International Citrus Congress, Agadir, Morocco, 15-20 February 2004.
- GÜREL, E., VE WREN, M.J., 1995. Measuring Polyphenol Oxidase Activity in Small Leaf Discs of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). Turkish J.Bot., 19: 497-502.
- GÜREL, E., TÜRKER, A., 2002. BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİ-DÜLTÜRÜ VE UYGULAMALARI, M., BABAOĞLU, E., GÜREL, S., ÖZCAN, Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya, 36-70.
- HALFHILL, M.D., RICHARDS, H.A., MABON, S.A., STEWART, C.N. JR., 2001. Expression of GFP and BT Transgenes in *Brassica napus* And Hybridization and Introgression With *Brassica rapa*. Theor. Appl.Genet., 103:362–368.
- HARPER, B.K., and STEWART JR. C.N., 2000. Patterns of Green Fluorescent Protein Expression in Transgenic Plants. Plant Molecular Biology Reporter, 18: 141a-141i.
- HASELOFF, J., and AMOS, N.D.B., 1995: GFP in Plants.TIG Vol: 11 No. 8
- HIBBERD, J.M., LINLEY, P.J., KHAN, M.S., and GRAY, J.C., 1998. Transient expression of Green Fluorescent Protein various Plastid Types Following Microprojectile Bombardment. The Plant Journal 16, 627-632.
- HOOYMANS, C.M., HAKKERT, J.C., JANSEN, J., CUSTERS, J.B.M., 1994. Competence for Regeneration of Cucumber Cotyledons is Restricted to Specific Developmental Stages. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 39 (3): 211-217.
- HUDSON, L.C., CHAMBERLAIN, D., and STEWART JR, C.N., 2001. GFP-Tagged Pollen to Monitor Pollen Flow Of Transgenic Plants. Molecular Ecology Notes, 1, 321-324.
- JEFFERSON, R.A., KAVANAGH, T.A., and BEWAN, M.W., 1987. Gus Fusions: β -glucuronidase as a Sensitive and Versalite Gene Fusion Marker in Higher Plants. EMBO J, 6: 3901-3909.
- JORDAN, M.C., 2000. Green Fluorescent Protein as a Visual Marker for Wheat Transformation. Plant Cell Reports, 19:1069-1075.

- KAYIM, M., DERRICK, K.S., BARTHE, G.A., AND BERETTA, J.M., 2004. Expression of Mutant Green Fluorescent Protein Genes in Transgenic Citrus Plants. Xth International Citrus Congress, Agadir, Morocco, 15-20 February 2004.
- KIM, J.W. HAN, S.K., KWON, S.Y., LEE, H.S., LIM, Y.P., LIU, J.R., KWAK, S.S., 2000. High Frequency Shoot Induction and Plant Regeneration from Cotyledonary Hypocotyl Explants of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings.
- LAWTON, R., WINFIELD, S., DANIELL, H., BHAGSARI, A.S., and DHIR, S.K., 2000. Expression of Green-Fluorescent Protein Gene in Sweet Potato Tissues. Plant Molecular Biology Reporter, 18: 139a–139i.
- LEEMANS, J., LANGENAKENS, J., DE GREVE, H., DEBLAERE, R., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J., 1982. Broad Host Range Cloning Vectors Derived from the W-plasmid Sa. Gene, 19: 361-364.
- LESHEM, B., 1989. Polarity and Responsive Regions for Regeneration in the Cultured Melon Cotyledon. J.Plant Physiol., 135: 237-239.
- LOU, H., and KAKO, S., 1994. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Cucumber. HortScience, 29:8, 906-909.
- LI, Z., JAYASANKAR, S., and GRAY D.J., 2002. Use of Marker Genes to Target Disease Resistance Gene Expression in Grape.
- http://altweb.jhsph.edu/publications/journals/iva/iva38_suppl/iva38suppl9c.htm
- LI, Z.J, JAYASANKAR, S., BARNETT, N.J., and GRAY, D.J., 2002. Characterization of *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Grapevine (*Vitis spp.*) Using the Green Fluorescent Protein (GFP) Gene.
- http://altweb.jhsph.edu/publications/journals/iva/iva38_suppl/iva38suppl9b.htm
- MACIEJEWSKA-POTAPCZYKOWA, W., RENNERT, A., and MILEWSKA, E., 1972. Callus Induction and Growth of Tissue Cultures Derived from

- Cucumber Plant Organs of Four Different Sex Types. Acta. Societatis Botanicorum Polloniae, 41:329-339.
- MENDI-YALÇIN, N.Y., 2003. Effect of Cotyledon Age and Explant Location on Regeneration of *Cucumis sativus*. Biotechnol& Biotechnol.Eq.
- MENDI-YALÇIN, N.Y., SERBEST-KOBANER, S., and AKA-KAÇAR, 2005. The Utility of GFP in Genetic Engineering of Horticultural Plants. Europ.J.Hort.Sci., 70 (4). S. 157-161.
- MAXIMOVA, S.N., DANDEKAR, A.M., AND GUILTINAN, M.J., 1998. Investigation of *Agrobacterium* Mediated Transformation of Apple Using Green Fluorescent: High Transient Expression and Low Stable Transformation Suggest That Factors Other Than Tdna Transfer Are Rate Limiting. Plant Molecular Biology 37, 549-559.
- MOHIUDDIN, A.K.M., CHOWDHURY, M.K.U., ABDULLAH, Z.C., NAPIS, S., 1995. The Influence of Cobalt Chloride on In-Vitro Shoot proliferation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51-1, 75-78.
- MOLINA, R.V., and NUEZ, F., 1995a. Correlated Response of *in vitro* Regeneration Capacity from Different Source of Explants in *Cucumis melo*. Plant Cell Reports, 15:129-132.
- MOLINA, R.V., and NUEZ, F., 1995b. Characterization and Classification of Different Genotypes in a Population of *Cucumis melo* Based on Their ability to Regenerate Shoots from Leaf Explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43: 249-257.
- MOLINIER, J., HIMBER, C., HAHNE, G., 1999. Use of Fluorescent Protein for Detection of Transformed Shoots and Homozygous Offspring. Plant Cell Reports, 19:219-223.

- MORENO, V., GARCIA-SOGO, M., GRANELL, I., GARCIA-SOGO, B., and ROIG, L.A., 1985. Plant Regeneration from Calli of melon (*Cucumis melo* L., cv. 'Amarillo Oro'). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 5:139-146.
- MSIKITA, W., SKIRVIN, R.M., JUVIK, J.A., and SPLITTSTOESSER, W.E., 1988. In Vitro Regeneration and Flowering of Cucumber Cultivars and Lines Cultured from Excised Seed. *Cucurbit Genet. Coop. Rpt.* 11:5-7.
- MURASHIGE, T., and SKOOG, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- NAWAB, A., SKIRVIN, R.M., SPLITTSTOESSER, W.E., 1991. Regeneration of *Cucumis sativus* from Cotyledons of Small Explants. *HortScience*, 26:7, 925.
- NEIDZ, R.P., SUSSMAN, M.R., and SATERLEE, J.S., 1995. Green Fluorescent Protein. an *in vivo* Reporter of Plant Gene Expression. *Plant Cell Rep* 14, 403-406.
- NIEDZ, R.P., SHITH, S.S., DUNBAR, K.B., STEPHENS, C.T., and MURAKISHI, H.H., 1989. Factors Influencing Shoot Regeneration from Cotyledonary Explants of *Cucumis melo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 18: 313-319.
- NISHIBAYASHI, S., HAYAKAWA, T., NAKAJIMA, T., SUZUKI, M., KANEKO, H., 1996. CMV Protection in Transgenic Cucumber Plants with an Introduced CMV-O Cp Gene. *Theor. Appl. Genet.* 93:672-678.
- NISHIBAYASHI, S., KANEKO, H., and HAYAKAWA, T., 1996. Transformation of Cucumber (*Cucumis sativus*) Plants Using *Agrobacterium tumefaciens* and Regeneration from Hypocotyl Explants. *Plant Cell Reports*, 15:809-814.
- NOVAK, F.J., and DOLEZELOVA, M., 1982. Hormone Control of Growth and Differentiation in the *In Vitro* Cultured Tissue of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biologia*, 37, 3. 283-289.

- OLIVARES, O., FUSTER, and NAVARRO, L., 2002 Green Fluorescent Protein as Visual Marker in *Citrus* Somatic Hybridization Annals of Botany, 89, 4, 491.
- OW, D.W., WOOD, K.V., DE LUCA, M., WET, JR., D.E., HELSINKI, D.R., HOWELL, S.H., 1986. Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cell and Transgenic Plants. Science 234:856-859
- PONAPPA, T., BRZOZOWSKI, A.E., FINER, J.J., 1999. Transient Expression and Stable Transformation of Soybean Using Jellyfish Green Fluorescent Protein. Plant Cell Reports, 19:6-12.
- RAHARJO, S.H.T., HERNANDEZ, M.O., ZHANG, Y.Y., and PUNJA, Z.K., 1996. Transformation of Pickling Cucumber with Citinase-Encoding Genes Using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 15:591-596.
- ROUSTAN, J.P., LATCHE, A., and FALLOT, J., 1992. Enhancement of Shoot Regeneration from Cotyledons of Cucumis melo by AgNO₃, an Inhibitor of Ethylene Action. J. Plant Physiol., 140: 485-488.
- SARMENTO, G.G., ALPERT, K., TANG, F.A., PUNJA, Z.K., 1992. Factors Influencing *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation and Expression of Kanamycin Resistance in Pickling Cucumber. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 31 (3): 185-193.
- SCHULZE, J., BALKO, C., ZELLNER, B., KOPREK, T., HONSCH, R., NERLICH, A., MENDEL, R.R., 1995. Biolistic Transformation of Cucumber Using Embryogenic Suspension Cultures: Long Term Expression of Reporter Genes. Plant Science, 112:197-206.
- SCHELL, J., and VAN MONTAGU, M., 1983. The Plasmids as Natural and as Practical Gene Vectors for Plants. Bio/Technol., 1: 75.

- SHEEN, J., HWANG, S., NIWA, Y., KOBAYASHI, H., GALBRAITH, D.W., 1995. Green Fluorescent Protein as a New Vital Marker in Plant Cells. *Plant J* 8:777-784.
- STEWART, JR C.N., 2001. The Utility of Green Fluorescent Protein in Transgenic Plants. *Plant Cell Reports*, 20:376-382.
- SZWACKA, M., PIWORUN, E., OZDOBA, A., SZELAG, T., and URBANCZYK-WOCHNIAK, E., 2002. Spatial and Temporal Expression of the Sweet Protein (Thatimatin I) Gene in Transgenic Cucumber Plants, http://altweb.jhsph.edu/publications/journals/iva/iva38_suppl/iva38suppl19b.htm.
- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., and SAIGA, Y., 1962. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein From The Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59:223–227.
- TABEI, Y., NISHIO, T., KURIHARA, K., and KANNO, T., 1994. Selection of Transformed Callus in a Liquid Medium and Regeneration of Transgenic Plants in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Breeding Science*, 44, 47-51.
- TABEI, Y., KITADE, S., NISHIZAWA, Y., KIKUCHI, N., KAYANO, T., HIBI, T., AKUTSU K., 1998. Transgenic Cucumber Plants Harboring a Rice Chitinase Gene Exhibit Enhanced Resistance to Gray Mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports*, 17:159-164.
- TABEI Y., YAMADA, T., MORISHITA, T., and OSAKI, T., 1998. Plant Regeneration via Shoot Organogenesis from Cotyledons in Two Wild Cucumis Species, *C. figarei* and *C. metuliferus*. *J. Jap. Agric. Res. Quart. (JARQ)*. 32(4).
- TRULSON, A.J., SIMPSON, R.B., and SHAHIN, E.A., 1986. Transformation of Cucumber (*Cucumis sativus*) Plants with *Agrobacterium rhizogenes*. *Theor. Appl. Genet.*, 73:11-15.

- TRULSON, A.J., and SHAHIN, E.A., 1986. In vitro Plant Regeneration in the Genus *Cucumis*. Plant science, 47: 35–43.
- TOPPI, L.S., PECCHIONI, N., and DURANTE, M., 1997. *Cucurbita pepo* L. Can Be Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 51: 89-93.
- WEHNER, T.C., and LOCY, R.D., 1981. *In Vitro* Adventitious Shoot and Root Formation of Cultivars and Lines of *Cucumis sativus* L. HortScience 16(6): 759-760.
- ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J., (1974). Supercoiled Circular DNA in Crown Gall-Inducing *Agrobacterium* strains. J. Mol. Biol., 86: 109-127.
- ZHANG, H.X., and ZEEVAART, J.A.D., 1999. An Efficient *Agrobacterium Tumefaciens* Mediated Transformation and Regeneration System for Cotyledons of Spinach (*Spinacia oleracea* L.). Plant Cell Rep. 18, 640-645.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Adana’da doğdum. İlk öğretimimi Lütfiye Kısacık İlköğretim okulunda tamamladıktan sonra orta ve lise öğrenimimi Özel Çukurova Bilfen Lisesi’nde tamamladım. 1996 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandım. 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek lisansa başladım. 2003 yılında Biyoteknoloji Anabilim Dalına yatay geçiş yaptım. Yine 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Eğitim Bilimler Fakültesi Biyoloji Orta Öğretim Programında Yüksek lisansımı tamamladım. Halen özel bir eğitim kurumunda biyoloji öğretmeni olarak görev yapıyorum.