

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra KOCAMAN

**KAVUN'DA (*Cucumis melo L., var cantalupensis Naud*) AROMA
SENTEZİNDEN SORUMLU Cm-ADH GENLERİNİN TRANSFORMASYON
ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAVUN'DA (*Cucumis melo L., var cantalupensis Naud*) AROMA
SENTEZİNDEN SORUMLU Cm-ADH GENLERİNİN
TRANSFORMASYON ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra KOCAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

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

İmza.....
Doç.Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
DANIŞMAN

İmza.....
Prof.Dr. Selim ÇETİNER
ÜYE

İmza.....
Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri 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: ZF2009YL36

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

**KAVUN'DA (*Cucumis melo L., var cantalupensis Naud*) AROMA
SENTEZİNDEN SORUMLU Cm-ADH GENLERİNİN
TRANSFORMASYON ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra KOCAMAN

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Doç.Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Yıl : 2009, **Sayfa** : 62
Jüri : Doç.Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Prof.Dr. Selim ÇETİNER
Doç.Dr. Yıldız AKA KAÇAR

Yapılan bu çalışma ile kavunda aroma sentezinden sorumlu (*Cucumis melo L., var cantalupensis Naud*) olan Cm-ADH genleri *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla Védrantais kavun çeşidine aktarılmıştır. *Escherichia coli* (DH5 α)' den *Agrobacterium tumefaciens*' e aktarılmış ticari rekombinant RNAi - pFGC5941 plasmidi kullanılmıştır. Gen aktarımı olan bitkilerden DNA izolasyonu ve PCR yapılmıştır. Jel elektroforezi sonucunda elde edilen bantlara UVP jel dökümantasyon sistemiyle bakılmış, istenilen bölgelerde bantlar görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Agrobacterium tumefaciens*, RNAi, *Cucumis melo*, aroma, transformasyon

ABSTRACT

MSc. THESIS

**DETERMINATION OF TRASFORMATION EFFICIENTS OF CM-ADH
GENES RESPONSIBLE FOR AROMA SYNTHESIS IN MELON (*Cucumis
melo L., var cantalupensis Naud*)**

Esra KOCAMAN

**DEPARTMENT OF HORTICULTURE
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor : Doç.Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Year : 2009, **Page** : 62
Jury : Doç.Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Prof.Dr. Selim ÇETİNER
Doç.Dr. Yıldız AKA KAÇAR

In this research, Cm-ADH genes responsible from synthesis of aroma volatiles in melon (*Cucumis melo L., var cantalupensis Naud*) were transformed by *Agrobacterium tumefaciens*, for that, commercial recombinant RNAi - pFGC5941 plasmid which was transformed from *Escherichia coli* (DH5 α) to *Agrobacterium tumefaciens*, was used. After transformation and regeneration, the integration of the transgenes in the plant genom was confirmed by PCR, Gel Electrophoresis and UV documentation system after DNA isolation. Bands were seen in the intended regions.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, RNAi, *Cucumis melo*, aroma, transformation

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve çalışmam süresince beni her konuda yönlendiren ve hiçbir yardımı esirgemeyen, tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi sırasında içten desteğini ve katkılarını aldığım danışman hocam sayın Doç. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Çalışmam sırasında ve sonlandırılmasında Moleküler Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndaki bütün imkanlarını sağlayan, her zaman desteğini gördüğüm hocam sayın Doç. Dr. Yıldız Aka KAÇAR'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmalarımı yürüttüğüm Biyoteknoloji Laboratuvarının kurucusu Prof. Dr. Selim ÇETİNER'e saygı ve teşekkürlerimi arz ederim.

Çalışmamda kullandığım genlerin ve kavun tohumlarının temininde yardımcı olan Dr. Jean Claude PECH'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında desteklerini gördüğüm dostlarım, yakın çalışma arkadaşlarım, Biyolog Tolga İZGÜ, Biyolog Esra BOZ, Biyolog Ceren ÜNEK, Özhan ŞİMŞEK, Biyolog, Dilek TEKDAL ve Ziraat Yüksek Mühendisi Pembe ÇÜRÜK'e teşekkür ederim.

Çalışmam süresince yanımda olan manevi destekçilerim ve Safranbolu'yu güzel yapan tüm dostlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmayı destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminin sayın yetkililerine ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak yaşamım boyunca her zaman yanımda olan kaybedildiğinde yerlerinin doldurulamadığını bildiğim aileme, özellikle ablam Emel Kocaman'a çalışmam boyunca gösterdikleri destek için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	12
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Rejenerasyonda ve Transformasyonda Kullanılacak Bitki Materyalleri.....	20
3.1.1.1. Vedrantais (<i>Cucumis melo L. var cantalupensis</i>).....	20
3.1.2. Transformasyonda Kullanılan Plasmid ve Bakteri Irkları.....	20
3.2. Metod.....	23
3.2.1. Rejenerasyon ve Transformasyon Denemeleri için Sterilizasyon Uygulamaları.....	23
3.2.2. Tohumların <i>In vitro</i> Ortamda Çimlendirilmesi.....	24
3.2.3. Doku Kültürü Şartları.....	24
3.2.4. Transformasyon Çalışmaları.....	25
3.2.4.1. Transformasyonda Kullanılacak Olan Bakteri Çözeltisinin Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	25
3.2.4.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ve İnokülasyon Solüsyonunun Hazırlanması.....	25
3.2.4.3. Eksplantların Bakteri Kültürü ile İnokülasyonu.....	26
3.2.5. Moleküler Uygulamalar.....	27
3.2.5.1. DNA İzolasyonu.....	27

3.2.5.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /pFGC5941-ADH (S-L) Ticari Rekombinant Bakterisinde Plazmid DNA İzolasyonu.....	31
3.2.5.3. PCR Protokolünün Optimizasyonu ve Uygulanması.....	31
3.2.5.4. Elektroforez Koşulları.....	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Bulgular	34
4.1.1. Tohumların Sterilizasyonu.....	34
4.1.2. Tohumların Çimlendirilmesi.....	34
4.1.3. Rejenerasyon Ortamının Optimizasyonu.....	34
4.1.4. Transformasyon Çalışmaları.....	34
4.1.4.1. Transformasyon Esnasında Kullanılan Horman Konsantrasyonları ve Antibiyotik Uygulaması	34
4.1.4.2. Transformasyon Denemesi Sonuçları	35
4.1.5. Moleküler Çalışmalar	40
4.1.5.1. DNA İzolasyonu	40
4.1.5.2. DNA'nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi	40
4.1.5.3. PCR Sonrası Elde Edilen Bantlar	40
4.2. Tartışma	46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ	58
EKLER.....	59

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik Asit
BAP	: 6-Benzylamino Purin
bç	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
CTAB	: Cetyltrimethylamoniumbromide
DNA	: Deoksiribonükleikasit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum Bromid
IAA	: Indole-3-asetik Asit
GA3	: Giberellik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
KOH	: Potasyum Hidroksit
kb	: Kilobaz
LB	: Luria Bertani
l	: Litre
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
mg/l	: Miligram/Litre
ml	: Mililitre
mRNA	: Haberci Ribonükleik asit
miRNA	: Mikro Ribonükleik asit
MS	: Murashige ve Skoog besi ortamı
MES	: (2-(N-Morpoholino)ethanesulfonic acid)
NAA	: Naftalen Asetik Asit
NaCl	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
O.D	: Optik Yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R.O.	: Replikasyon Orijini

Rpm	: revolution per minute
RNAi	: Ribonükleikasit interferaz
RNAaz	: Ribonükleaz
siRNA	: Küçük interferans Ribonükleik asit
TAE	: Tris/ acetate/ EDTA (Buffer)
TE	: Tris-EDTA
UV	: Mor ötesi
V	: Volt
μm	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
v/v	: Hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. <i>Agrobacterium</i> bakterisinde bulunan plasmid DNA'nın Özellikleri	22
Çizelge 3.2. DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği	27
Çizelge 3.3. PCR'da kullanılan primerler	31
Çizelge 3.4. PCR reaksiyonlarında uygulanan protokol.....	32
Çizelge 3.5. ADH-L, ADH-S ve BAR genlerini elde etmek için PCR cihazına yüklenen programı.....	32
Çizelge 3.6. Bar primeri için kullanılan PCR protokolü.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. RNA İnterferans Mekanizması.....	8
Şekil 3.1. <i>Escherichia coli</i> (DH5 α)' dan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e aktarılmış ticari rekombinant RNAi - pFGC5941 plasmidi.....	21
Şekil 3.2. (A) Pens ile tohum kabuklarının çıkarılması; (B) Yüze sterilizasyonunda kullanılan sodyum hipoklorit çözeltisi ve steril saf su; (C) Sodyum hipoklorit çözeltisi ile tohumların muamelesi; (D) Saf su ile tohumların yüzeyinin deterjandan arındırılması; (E) Tohumların filtre kağıdı üzerinde kurutulması; (F) Tohumların çimlendirme ortamına aktarılması	23
Şekil 3.3. (A) Öze yardımı ile tek koloni <i>Agrobacterium sp.</i> seçimi; (B) LB ortamına seçilen tek koloni <i>Agrobacterium</i> 'un inokülasyonu	25
Şekil 3.4. (A) Tek koloni bakteri eldesi için aşılınmış kültürün uygun koşullarda inkübasyonu, (B) Üreyen ve üremeyen <i>Agrobacterium</i> 'un genel görüntüsü.....	26
Şekil 3.5. (A) Proksimal eksplant, (B) Kotiledon eksplant	27
Şekil 3.6. (A) MSG sürgün ortamındaki aday transgenik bitkiler (B), (C), (D), DNA izolasyonu için bitki örneklerinin alınması	29
Şekil. 3.7. (A) Eksplantların öğütülmesi, (B) Öğütülen eksplantların ependorf tüplerine alınması, (C), (D), (E) Ependorftaki örneklerin üzerlerine CTAB çözeltisinin eklenmesi, (F) CTAB çözeltisi eklenen örneklerin genel görünümü	30
Şekil 3.8. Agorose jel elektroforezde PCR ürünlerinin koşulması.....	33
Şekil 4.1. ADH-L bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda on gün sonra elde edilen rejenerasyon tomurcuğu oranları	35
Şekil 4.2. ADH-S bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda on gün sonra elde edilen kallus oranları	35

Şekil 4.3. ADH-L bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda on gün sonra elde edilen kallus oranları	36
Şekil 4.4. ADH-S bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda on gün sonra elde edilen kallus oranları	36
Şekil 4.5. Kotiledon eksplantların gelişimlerinin 15. günündeki görünüşleri.....	37
Şekil 4.6. Proksimal eksplantların gelişimlerinin 15. günündeki görünüşleri.....	37
Şekil 4.7. ADH-L bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda 24 günün sonunda elde edilen sürgün gelişimleri	38
Şekil 4.8. ADH-S bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda 24 günün sonunda elde edilen sürgün gelişimleri	38
Şekil 4.9. (A) Rejenerasyon ortamındaki bitkiler; (B), (C), (D) Sürgün geliştirme ortamlarındaki bitkilerin görünüşleri.....	39
Şekil 4.10. ADH-S antisens geni aktarılan bitkilerdeki ADH-S geni DNA'larının PCR profilleri	41
Şekil 4.11. ADH-S antisens geni aktarılan bitkilerdeki Bar geni DNA'larının PCR profilleri.....	42
Şekil 4.12. ADH-L antisens geninin ADH-L geni DNA'larının PCR profilleri.....	43
Şekil 4.13. ADH-L antisens genlerinin aktarıldığı bitkilerdeki Bar geni DNA'larının PCR profilleri	44

1. GİRİŞ

Türkiye’de 1 milyon ha’lık alanda yaklaşık 23 milyon ton sebze üretimi yapılmaktadır. Yapılan bu üretimin yaklaşık % 33’ünü Cucurbitaceae familyasına ait sebze türleri oluşturmakta ve kavun, bu familya içerisinde üretim bakımından 1.7 milyon ton ile karpuzdan sonra ikinci sırayı almaktadır (FAO, 2006).

Kavunun anavatanı Afrika kıtasıdır, ancak Türkiye’den Japonya’ya kadar uzanan alanların ikincil gen merkezi olduğu ve bu bölgelerde oldukça fazla çeşitlilik görüldüğü bilinmektedir (Robinson ve Decker-Walters, 1997). Kavun (*Cucumis melo*), *Cucumis* cinsi içerisinde en fazla çeşitlilik gösteren bir tür olup (Whitaker and Davis, 1962; Kirkbride, 1993), subsp. *melo* ve subsp. *agrestis* olmak üzere 2 alt türe ayrılmaktadır (Jeffrey, 1980; Munger ve Robinson, 1991; Kirkbride, 1993). *C melo* subsp. *melo* da 1) *cantalupensis* 2) *inodorus* 3) *flexuosus* 4) *conomon* 5) *chito* ve *dudaim* 6) *momordica* 7) *agrestis* olarak 7 alt grubu içermektedir (Munger ve Robinson, 1991).

Kavun *Cucurbitaceae* familyasının kültüre alınmış önemli türlerinden biri olup, farklı coğrafik orijinlerde tanımlanmış yabani ve kültüre alınan birçok tipi mevcuttur (Pitrat ve ark., 2000). Bu türler içerisinde yaprak, bitki ve meyve karakterleri bakımından yüksek düzeyde morfolojik çeşitlilik bulunmaktadır. (Kirkbride, 1993; Şensoy, 2005; Sarı ve Solmaz, 2005).

Kavunun ikincil gen merkezleri arasında yer alan ülkemiz, lokal kavun genotipleri açısından son derece zengin olup *cantalupensis* grubu kavunların Avrupa’ya Türkiye’nin doğusundan yayıldığı bilinmektedir (Zhukovsky, 1951; Günay, 1993).

Dünya nüfusundaki hızlı artış bitkisel ürünlerde verim ve hasat sonrası kayıpların önlenmesi konularındaki çalışmaların ön plana çıkmasını sağlamıştır. Son yıllarda özellikle tat, aroma ve besin değeri yüksek sebze tüketimi tüm dengeli beslenme reçetelerine girmiş bulunmaktadır. Bunun sonucunda sebze ve meyve tüketiminde talep artışı söz konusudur. Kavun, farklı tüketim şekilleri, besin içeriği ve kendine özgü aroması ile sağlıklı beslenme reçetelerinde ön planda olan bir sebze türüdür.

Artan talep doğrultusunda son yıllarda Akdeniz bölgesinde kavun üretimi ve ihracatında önemli artışlar olmuştur. Bu artışlar diğer bölgelerde de aynı oranda olmuş ve buna bağlı olarak kavunda farklı destekler ile birçok ıslah projeleri yürütülmüştür. Ancak bu çalışmalarda hasat sonrası kalite fizyolojisi ihmal edilmiş veya üreticiye bırakılmıştır. Bunun sonucunda ıslah çalışmaları ile elde edilmeye çalışılan farklı dayanıma sahip veya kalite kriteri taşıyan ürünlerin hasat sonrasında muhafaza ve taşıma kriterlerinden oluşan kayıplar elde edilen kazanımdan daha fazla olabilmektedir.

Kavun, klimakterik olgunluk gösteren meyve grupları içerisinde yer almaktadır. Klimakterik meyve türlerinde etilen gazı başta olgunlaşma olmak üzere birçok fizyolojik olay üzerine etkilidir. Etilen bu sebze türünün derim sonrası olgunlaşması ve muhafazası üzerine en çok etkili olan faktörlerden biridir (Crisisto ve ark., 1999). Kavunda muhafaza süresini kısıtlayan en önemli faktörlerden biri yumuşama, unluşma ve buna bağlı olarak geliştiği düşünülen çürümelerdir. Bu fizyolojik bozulmaların muhafaza süresinin uzaması ile soğuk zararından meydana geldiği bilinmektedir. Bu nedenle muhafaza süresince bu sebze türünde kalitenin korunması ve etilenin kalite üzerine etkilerinin hem fizyolojik hem de biyoteknolojik yöntemler kullanılarak araştırılması gerekmektedir.

Kantalop kavunu etilen ile olgunlaşma işlevinin düzenlenmesi ve olgunlaşma oranına etkisi ile tipik bir klimakterik bitki özelliği göstermektedir. Kantalop kavunu ile klimakterik özellik göstermeyen kavunun çaprazlanması sonucu, klimakterik karakterin kavunda dominant bir özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte başka bir denemede klimakterik özellik göstermeyen iki kavunun çaprazlanmasıyla klimakterik özellik gösteren meyve oluşması, klimakterik karakterlerin karmaşık ve farklı bir genetik yapıda olduğunu göstermiştir. ‘Charentais’ kavununda etilen üretiminin baskılanmasının, RNA ACC oksidaz antisens tarafından gerçekleştirildiği görülmüş, bunun yanında birçok olgunlaşma süreci etilen tarafından düzenlenirken etilenden bağımsız olduğu durumların da olduğu görülmüştür (Pech, 2001).

Tarımsal üretimin artırılmasında modern biyoteknolojik yöntemler arasında şüphesiz en fazla ilgi çeken genetik mühendisliği ya da ‘Rekombinant DNA’ teknikleridir. Bunun nedeni özellikle bitki ıslahı alanında somaklonal varyasyon ve

protoplast füzyonu tekniklerinin ilk zamanlardaki fazla iyimser beklentilere yanıt veremeyişlerinin yanında, genetik mühendisliğinin açtığı yeni ufuklardır (Çetiner, 1993).

Genetik mühendisliği ya da Rekombinant-DNA teknikleri ile bitkilere gen transferinde; transgenik hücrelerin *in vitro* koşullarda uygun besi ortamlarında rejenera olması ve bunlardan bitki elde edilmesi son derece önemlidir. Farklı genotiplerin ve farklı eksplantların farklı düzeylerde rejenera olduğu kavunda bu konu özellikle dikkat çekecek düzeydedir (Çürük, 1999).

Bugüne kadar meristem ucu kültürü, embriyo kurtarma, somatik hücre füzyonu, somaklonal varyasyon, haploid/poliploid bitki üretimi ve genetik mühendisliği gibi bitki biyoteknolojisi yöntemleri kavun ıslahına katkıda bulunmuştur (Ezura, 1999).

Rhizobiaceae familyasının bir türü olan *Agrobacterium tumefaciens*, kök boğazında oluşan yaralardan bitkiyi enfekte ederek kök boğazı uruna sebep olan Gram (-) negatif 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 geçmekte 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 (Leesmans ve ark., 1982; Schell ve Van Montagu, 1983).

Transgenik bitkilerin üretiminde *A. tumefaciens* yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu bakteri aracılığı ile her çeşit bitki hücresine gen aktarmak mümkün iken, gen aktarılan hücre oranı son derece düşüktür. Bu sebeple, çok sayıda gen aktarımı yapılamayan hücre içerisinden gen aktarımı yapılan hücrelerin belirlenerek seçilmesi gerekmektedir. Gen aktarılma başarısını en çok etkileyen faktör ise aktarımı yapılan hücrenin rejenerasyon kabiliyetidir. Rejenerasyon kabiliyeti (totipotensi) olmayan hücrelere yapılan gen aktarımı hiçbir anlam ifade etmemekte ve ayrıca gen aktarılan hücrelerden yeni bitkilerin oluşması gerekmektedir. Ancak bitki dokularındaki hücrelerin az bir bölümü hem rejenerasyon hem de gen aktarımı yeteneğine sahiptirler. Bu sebeple, tarımsal öneme sahip olan genleri bitkilere

aktarabilmek için bitki doku ve hücrelerinden etkili bir rejenerasyon protokolü geliştirilmesi oldukça önemlidir (Özcan ve Özgen, 1996).

Kavunda uçucu aroma molekülleri, önemli meyve kalite kriteridir. Son 10 yılda yapılan araştırmalar, meyve aromaları içerisinde bulunan uçucu moleküllerin tanımlanması ve onların biyosentetik dönüşüm safhaları üzerine yoğunlaşmıştır. Son çalışmalar ise meyvelerdeki uçucu aroma maddelerinin sentezinde rol oynayan genlerin izolasyonuna yöneliktir (Aharoni, 2000, Beekwilder ve ark., 2004). Kantalop kavunlarında, esterler uçucu aroma maddelerinin esas grubunu oluşturmaktadır. Kantalop kavunlar arasında, 'Charentais' tipi yüksek oranda aromatiktir.

Charentais kantalo kavunu (*Cucumis melo L., var cantalupensis Naud*) çok iyi aromatik özelliği ve tadı ile karakterize edilmektedir. Bununla beraber kısa raf ömründen dolayı, ıslahçılar çalışmalarını raf ömrünün uzatılması, verimin artırılması, bir örneklik ve zararlılara dayanıklılık karakterlerinin kazandırılması yönünde yoğunlaştırmışlardır. Bu tür karakterlerin kazandırılması da aynı zamanda meyve tadının kaybolmasına neden olmuştur. Etilen üretiminin baskılanması, Charentais kantalo kavunundaki aroma maddelerinin kuvvetli bir şekilde engellenmesi ile sonuçlanmıştır

Diğer kantalo kavun çeşitlerinde olduğu gibi Charentais kantalo kavunundaki aroma maddeleri de; esterler, doymuş ve doymamış aldehitler, alkoller ve sülfür bulunduran molekülleri içeren kompleks yapılardan oluşmaktadır. Bu moleküller arasındaki uçucu esterler, miktar olarak önemli ve aroma konusunda anahtar rolü oynayan bir moleküldür. Kavunun aromatik kompozisyonu hakkında tam bir bilgiye sahip olursa da, metabolik reaksiyonlarda rol oynayan enzimlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu hakkında çok az veri bulunmaktadır.

Uçucu aroma moleküllerinin sentezi etilen hormonu tarafından düzenlenmektedir. Bitki hormonu etilen, klimakterik meyvelerin olgunlaşma safhalarında önemli rol oynamaktadır. Diğer hormonlar ve gelişimsel faktörler de etkili rol oynamaktadırlar ancak bu faktörlerin doğal yapısı bilinmemektedir. Son dönemlerde gerçekleştirilen önemli çalışmalardan biri de etilenin inhibe edilmiş olduğu transgenik domateslerin ve kavunların kullanımı ile etilene bağımlı ve

bağımsız olgunlaşma döngü ayrımının yapılmasıdır. 1-aminocyclopropane (1-MCP) 1-carboxylic acid (ACC) ve oxidase (ACO) içeren transgenik kavun içerisinde şeker birikimi, asitlik kaybı gibi kriterler etilenin baskılanması ile değiştirilemez. Karşıt olarak, yumuşama, çiçek sapının bozulması gibi olgunluk kriterleri ve aroma maddelerinin üretimi, transgenik meyvelerde etilenin noksanlığında kuvvetli bir şekilde azalmaktadır. Etilenin baskılanmış olduğu meyveleri artan miktarlarda dıştan etilen ile muameleye tabi tuttuğumuzda hormona karşı farklı olgunluk safhalarında duyarlılığın geliştirildiği görülmektedir (Flores ve ark., 2001).

Farklı kavun çeşitleri karşılaştırıldığında, Charentais, alifatik ve dallanmış ester aromalarını üreten önemli bir aromatik kavundur. Transgenik bitkilerde, Antisens ACC oksidaz mRNA (AS), bitkilerde sentezlenen etilen hormonunun seviyesini oldukça düşürmektedir. Alifatik ester oluşum aşamalarında, etilenin düzenleyici bir rolü olduğu belirlenmiştir. Hexyl ve butyl asetat gibi alifatik esterlerin üretiminin, AS meyvelerinde sınırlandırıldığı görülmüştür. Başlangıçtaki var olan çeşitlerde inkübe edilen meyve diskleri kullanılarak, AS bitkilerinde ester formasyonunun inhibe edildiği adımlar, yağ asitlerinin ve aldehidlerin indirgenliğini göstermektedir. Bunun aksine, etilen antagonisti 1-metilsiklopropan (1-MCP) ile muamele edilen AS meyveleri, asetil transferaz aktivite inhibisyonunun yaklaşık % 50 oranında olduğunu göstermiştir. Bu oran, bağlı etilenin ve AS meyve disklerinde artık şeklinde kalan düşük etilen konsantrasyonu tarafından da doğrulanmıştır. Sonuç olarak, yağ asitleri ve aldehitlerin indirgenmesi, temel olarak bağlı etilen olduğunu göstermektedir (Flores ve ark., 2002).

Kavunlarda aroma sentezinde, esterlerin üretimindeki son safha Alkol açıl transferaz enzimi (AAT) tarafından katalizlenmektedir. Alkol açıl transferaz, kavunda alkollerin asetilasyonundan sorumlu enzimdir. AAT aktivitesini gösteren gen çilekten izole edilmiştir. Kavunda ise AAT proteinini kodlayan genler ise Charentais kantaloop kavun meyvesinden izole edilmiştir. Araştırmacılar, iki AAT geninin (CM-AAT1 ve CM-AAT2) ekspresyonunu ve CMAAT1 geni tarafından kodlanan AAT enziminin biyokimyasal ve fonksiyonel karakterizasyonunu incelemişlerdir. Bu genler, çilek gibi karakterize edilmiş diğer meyve açıl transferaz ile % 21 oranında aynı özellik göstermiştir. RT-PCR çalışmaları her iki genin de

olgunlaşmanın erken ve orta dönemlerinde artan oranlarda meyvede spesifik olarak eksprese olduğunu göstermiştir. Ekspresyon, etilenin baskılandığı antisens ACC oksidaz (AS) meyvelerinde ve etilen antogonisti 1-MCP ile muamele edilmiş yabancı tiplerde ciddi olarak azalmıştır. Maya içerisine 2 genin klonlanması, CM-AAT1 proteininin alkol açıl transferaz aktivitesini gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. CM-AAT1 ve CM-AAT2 arasında yüksek oranda homoloji olmasına rağmen CM-AAT2’de açıl transferaz aktivitesi belirlenememiştir. CM-AAT1, geniş oranda alkol ve acyl-CoAs kombinasyonundan esterleri üretme yeteneğine sahiptir. Alifatik alkollerin yüksek karbon zincirleri, yüksek aktiviteye sahiptir. Brançlaşmış alkoller, metil grubun pozisyonuna bağlı olarak farklı oranlarda esterleşmektedir. Fenil ve benzoyl alkoller de iyi substratlardır, ancak aromatik eklentinin büyüklüğü ve pozisyonu ile aktivitesi değişmektedir. Cis ve trans değişimler aktiviteyi ya olumlu ya da olumsuz olarak etkilemektedir. Sonuç olarak CM-AAT1 proteini kavunlarda aroma uçucu bileşiklerinde önemli role sahiptir (Yahyaoui ve ark., 2002).

Alkol açıl transferaz (AAT) tarafından sentezlenen uçucu esterler, çoğu aromalı meyvelere katkıda bulunan ana bileşik sınıflarından biridir. Charentais (*Cucumis melo var. Cantalopensis*) kavununda AAT geni amino asit farklılıkları olan 4 üyeden oluşmaktadır; [%84 (CM-AAT1/Cm-AAT2), %58 (Cm-AAT1/Cm-AAT3) ve %22(Cm-AAT1/Cm-AAT4)]. Cm-AAT2 dışındaki tüm kodlanmış proteinlerin mayada enzim ekspresyonları incelenmiştir ve onun dışında substrat farklılıkları gösterilmiştir. Kodlanmış bölgelerdeki direk mutasyonlar uçucu esterlerin üretimi için Cm-AAT2 nin aktivitesinin bozulduğunu ve bu mutasyonun tüm aktif AAT proteinlerinde threonin yerine 268 alenin var olması ile ilgili olduğunu göstermiştir. CmAAT-1 ise 268-A içerisinde 268-T mutasyonunun gelmesi ile aktivitesini kaybetmektedir. Bu üç proteinin aktivitesi meyve olgunlaşması süresince keskin substrat artışları ile ölçülmüştür. Bu çalışmada sunulan bu veriler, çoklu AAT genlerinin kavunda ester formlarının büyük bir çeşitliliği olduğunu göstermektedir (El-Sharkawy ve ark., 2005).

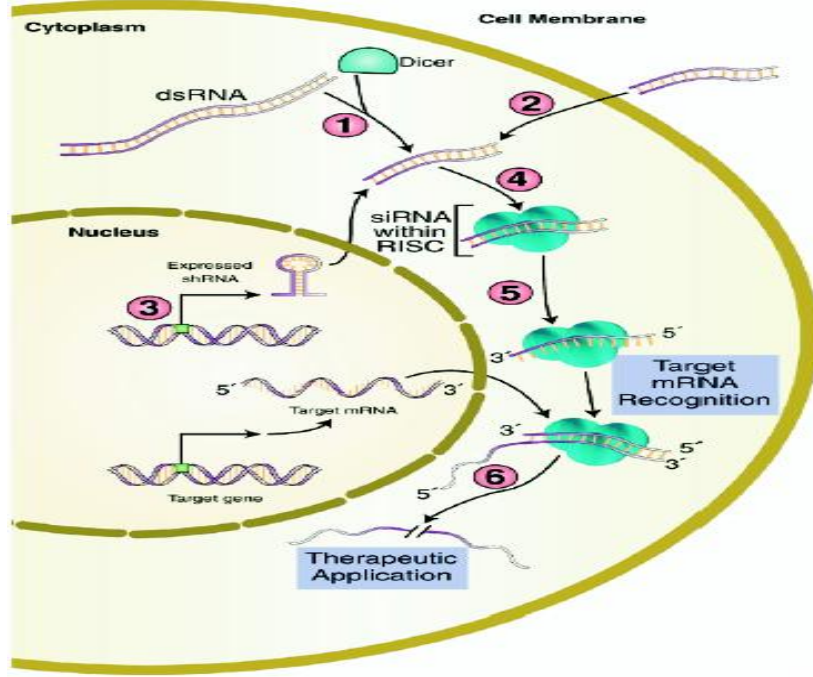
Alkol dehidrogenaz (ADH), aldehytleri alkollere çevirerek ve ester oluşumları için substrat sağlayarak meyvelerde uçucu aroma moleküllerinin sentezine katılmaktadır. Charentais kantalo kavunu (*Cucumis melo L., var cantalupensis*

Naud)’ndan aminoasid düzeyinde % 15 benzerlik gösteren iki farklı ADH genleri izole edilmiştir. CmADH1, orta zincirinde çinko atomuna bağlı bir yapı göstermektedir. CmADH2, ADH’lerin kısa zincirli tipidir. İki kodlanmış proteininde mayadaki ekspresyonlarına bakılarak enzimatik olarak aktif oldukları bulunmuştur. Her iki CmADH proteinleri de redüktazlar olarak daha aktiftirler ve spesifik olarak meyvede eksprese olarak, olgunlaşma sırasında sentez oranları artmaktadır. Toplam ADH aktivitesi, antisense oksidaz kavunları içerisinde ve etilenin antagonisti 1-metilsiklopropan (1-MCP) ile muamele edilmiş kavun meyvelerinde kuvvetli bir şekilde engellenmekte buda etilen tarafından pozitif düzenlenmeyi göstermektedir (Manriquez ve ark., 2006).

Moleküler biyoloji alanında günümüzde sık rastlanan konulardan birisi, genlerin işlevlerinin anlaşılmasında bu işlevlerin bastırılması veya durdurulması yönteminin kullanılmasıdır. Son yıllarda gen ifadesinin durdurulması amacıyla kullanılan “RNA interference” (RNAi) tekniği öne çıkmaya başlamıştır (Anonim, 2007).

Fire ve Mello (1998) yılında toprak kurtçuğu (*Caenorhabditis elegans*) üzerinde yaptıkları araştırmalarda bu transkripsiyon sürecine nasıl müdahale edilip, istenmeyen proteinleri üreten genlerin işlevsiz hale getirileceğini keşfetmişlerdir. Gen susturma mekanizmaları ilk önce ökaryotik canlılarda patojenlere karşı savunma ve gen ifadesinin düzenlenmesi amaçlarıyla geliştirilmiştir (Waterhouse ve ark., 2001). Ayrıca bu mekanizmalar tek hücreliler ve hemen hemen tüm ökaryotlarda da bulunmuştur. Araştırmacılar, hücreye çift sarmallı bir RNA aktarıldığında, bunun kendisiyle aynı kodu taşıyan geni susturduğunu gözlemlemişler ve bu RNA müdahalesinin yararlı bir araç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Mekanizmada çift sarmallı RNA, ‘Dicer’ adı verilen bir protein kompleksine bağlanmakta, Dicer ise bu çift sarmallı şeridi daha küçük parçalara bölmektedir. Daha sonra devreye RNA ile uyarılmış susturma kompleksi (RISC) adlı başka bir protein kompleksi girmekte ve ‘RISC’, küçük parçalara ayrılmış RNA sarmal çiftlerinden birini almaktadır. İki sarmaldan birini attıktan sonra ötekinin üzerine bağlanmaktadır. RISC’ e bağlı sarmal parçası da bir sonda gibi kendi şifresine uyan mRNA’ ları aramakta ve üzerindeki baz dizilişine uyan mRNA ipliğini yakalayınca

da RISC, hedef mRNA'yı parçalamaktadır. Böylece mesaj yerine ulaşmamakta ve dolayısıyla işlevi o proteini kodlamak olan gen susturulmuş olmaktadır (Gürdilek, 2006).



Şekil.1.1. RNA İnterferans Mekanizması. Uzun çift iplikli RNA (dsRNA) RNAaz Pol III enzimi olan Dicer tarafından tanınır ve 21 - 23 nükleotid uzunluğundaki siRNA dublekslerine dönüştürülür (1). Sentetik siRNA (2) veya endojenik siRNA'lar (3) RISC ile etkileşirler bundan dolayı Dicer işlevi bloke olur. siRNA'lar multiprotein kompleksi olan RISC ile etkileşir (4) RISC kompleksindeki bir helikaz, siRNA dubleksini açar ve tek iplikli siRNA'yı içeren RISC mRNA'ya komplementerize olur (5). RISC içinde tanımlanmamış bir RNAaz (silecer) mRNA'yı parçalar (6) (Karaboz ve Çolak, 2007)

RNAi basit olarak; hücre içerisinde meydana getirilen ya da doğal olarak üretilen çift zincirli RNA molekülleri, evrimsel olarak korunmuş bir dizi ardışık moleküler olay zinciri ile dizi eşleniği olan mRNA'ya bağlanıp parçalanmasını sağlamakta ve böylece gen anlatımında transkripsiyon ötesi bir susturulma sağlanmış olmaktadır (Anonim, 2006).

Bitkilerde RNAi, tek sarmallı RNA'dan çift sarmallı RNA uyarıcıları oluşturan bir RNA'ya bağlı RNA polimerazdan (cRdRP) oluşur. RNAi, kromatin baskılama yoluyla veya hedef RNA'yı parçalamak suretiyle transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) yoluyla transkripsiyonel gen susturmayı (TGS) uyarabilir. RNA müdahale yolları, çift sarmallı (dsRNA) RNA uyarıcılarını kullanarak bunları Dicer proteini ile parçalamak suretiyle 21-25 nükleotid uzunluğunda kısa susturucu RNA' lar (siRNA) oluştururlar (Waterhouse ve ark., 2001).

RNAi, transkripsiyon sonrasındaki aşamada çalışır ve sitoplazmada homolog mRNA'nın sekans spesifik parçalanmasına yol açar. Transgenik bitkilerde gen ifadesini değiştirmede karşılaşılan temel problem, hedefteki genin hücrenin temel fonksiyonlarında veya spesifik gelişme aşamalarında anahtar rol oynayan bir gen olması durumunda görülür. Bu problemi önlemede bitkiler aleminde uyarılabilen düzenleyiciler (promotor), transfer edilen genin temporal ve kantitatif kontrolü için bir yol sağlarlar (Karakurt ve ark., 2007). Bitkilerde kullanılan uyarılabilen ifade sistemleri arasında, kimyasal uyarıcılara tepki gösteren bir kaç düzenleyici belirlenmiştir (Hammond ve ark., 2001). Bu düzenleyiciler, tetrasiklin (Verdel ve ark., 2004), bakır (Baumberger ve Baulcombe, 2005), etanol (Tang ve ark., 2003) ve steroid gibi farklı çevresel uyarıcılarla kontrol edilirler (Qi ve ark., 2005) .

Eklemeli mutagenesisin aksine, RNAi ile gen ifadesinin engellenmesi son zamanlarda bitki fonksiyonel genomik çalışmalarında kullanılmaktadır. RNAi, fonksiyonel genomik için kullanılan eklemeli mutagenesis stratejilerine göre bir kaç avantaja sahiptir. Temel avantaj seçilen geni spesifik olarak hedefleme kabiliyetidir. RNAi homolojiye bağlı bir olay olduğu için, hedef sekansının spesifik bir bölgesinin dikkatli seçimi, spesifik bir gen ailesi üyesinin susturulmasını garantileyebilir veya bir gen ailesinin bir çok üyesi yüksek derecede korunmuş sekans bölgelerinin hedeflenmesi yoluyla aynı anda susturulabilir. RNAi aynı zamanda bitkiler için hayati genlerin fonksiyonlarını analiz etmede kullanılabilir. Buna ilaveten, uyarılabilen düzenleyicilerden iRNA' ların ifadesi gen susturulmasının derecesini ve zamanlamasını kontrol edebilir (Hammond ve ark., 2000). Öyle ki faydalı genler sadece istenilen bitki organlarında ve istenilen büyüme aşamalarında susturulabilir. Bu şekilde, RNAi farklı fonksiyonlu genlerin karakterizasyonu için gereken esnekliği

sağlar. Virüsle ve agroinfiltrasyon ile uyarılan metotların aksine, RNAi susturulması stabildir (Carthew, 2001). T-DNA eklemesi ve transpozon işaretlemesi gibi diğer mutajenik metotların aksine, RNAi susturulması uyarılabilir ve geriye dönüştürülebilir (Gupta ve ark., 2004). Bu özelliklerden yararlanılarak, özellikle bitki gelişiminin ilk dönemlerinde etkili olan genler üzerinde çalışılabilir. Birçok avantajlarına rağmen, gen keşfi ve karakterizasyonu için RNAi'nin değeri gen fonksiyonunun görünür bir fenotip oluşturamadığı durumlarda azalmaktadır. RNAi'nin kullanılmasında diğer bir dezavantaj ise bireysel transformantlar için etkilerinin değişebilmesidir.

Bitkilerde üç RNA susturma yolu vardır; birincisi, transkripsiyon sonrası gen susturulması (PTGS) olup çift sarmallı RNA'lardan oluşan 21 nukleotidli siRNA'lar tarafından gerçekleştirilir. İkinci yol, bir sınıf küçük bünyesel RNA'lar olan miRNA'ları kapsar. miRNA'lar miRNA genlerinden transkripsiyon yoluyla elde edilen miRNA ön polinükleotidlerden Dicer-benzeri 1 (DCL1) tarafından üretilirler. miRNA'lar hedef mRNA'lar ile baz çifti oluşturmak yoluyla gen ifadesini engellerler. Üçüncü yol, transkripsiyonel gen susturulması olup DNA ve histon metilasyonu dahil siRNA ile yönlendirilmiş kromatin modifikasyonları ile ortaya çıkmaktadır (Baulcombe, 2004).

Bitkilerdeki RNAi sistemi birçok RNAi tetikleyicilerine farklı yollar kullanarak cevap vermektedir. *Arabidopsis* RNAi yollarındaki birçok anahtar görevi gören proteinler ve genler gerek ileri genetik taramalar ve gerekse de geriye genetik analizler ile ortaya çıkarılmıştır. Fakat, bitki RNA susturma yollarının biyokimyasal mekanizmalarının tam anlamıyla anlaşılması henüz mümkün görünmemektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, daha çok diğer organizmalardan genetik çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler değişik biyokimyasal modellere uydurulmuş ve kısmen de olsa RNAi'nin çalışma mekanizması ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Her ne kadar bitkilerdeki RNAi sistemi bir çok yönden diğer organizmalardaki RNAi sistemine benzerlik göstermese de, bitki RNAi sinyal amplifikasyonu, kısa ve uzun mesafeli sinyal iletimi ve TGS tepkileri dahil bir çok farklı özelliklere sahiptir. Bu yüzden RNAi bileşenlerinin biyokimyasal karakterizasyonu bitki RNA susturma modelinin tam olarak anlaşılabilmesi için gereklidir (Karakurt ve ark., 2007).

Kavunda ADH genlerinin fonksiyonları Şimdiye kadar sadece mayadaki heterologus ifadesiyle açıklanmıŐtır. Bununla birlikte bu genlerin rolü in vivo' da meyvede açıklanamamıŐtır. Spesifik aromatik bölgelerdeki genlerin her birinin rolü aydınlatılamamıŐtır. AraŐtırcılar yaptıkları bu çalışmada, *A. tumefaciens* aracılığıyla RNAi yapısının oluŐturulması ile kavun meyvesinde iki ADH genlerinin fonksiyonunun araŐtırılmasını amaçlamıŐlardır (YayınlanmamıŐ).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Abak ve Dumas de Vaultx, (1980), kavunda rejenerasyonla ilgili ilk bilgileri vermişlerdir. Araştırmacılar, Charentais tipi iki kavun hattında iki farklı eksplant kullanarak (hipokotil ve çiçek sapı) kallus ve kallustan sürgün uyartımı üzerinde çalışmışlar ve farklı ortamlar (MS ve G bileşimi, şeker NAA, kinetin, agar) denemişlerdir. MS ortamında % 4 sakkaroz, 2 mg/l kinetin ve 0.2 mg/l NAA ile kallus ve bu kalluslardan % 3 sukroz, % 0.02-0.2 mg/l NAA ile iki hafta içinde sürgün oluşumu sağlandığı rapor edilmiştir.

Moreno ve ark., (1985), İspanyol kavun çeşitlerinden *Amarillo oro*'nun 11-13 günlük fidelerinin kotiledon ve proksimal eksplantlarını, farklı dozlarda IAA ve Kinetin 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 ortamda kültüre aldıklarını ve rejenerasyon etkinliğini incelediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar yapılan çalışmalar sonucunda, kültür ortamı koşulları ve eksplant kaynağına bağlı olarak, kavun dokularının hem organogenesis hem de embriyogenesis yolu ile morfogenezise uğrayabildiklerini belirtmişlerdir. Kullanılan ortamlardan IK1560 (1.5 mg/l IAA ve 6 mg/l Kinetin içeren BM3) ortamında kotiledonlardan elde edilen kallusların % 90'ının bütünüyle gelişmiş sürgünler ürettiği, kotiledon eksplantlarının oksin içeren ortamda genellikle bol miktarda sürgün ve nadiren embriyo oluşturabildiği, hipokotil eksplantlarının ise sürgün oluşturmadığı ancak somatik embriyo üretebildiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonunda hem kotiledondan meydana gelen kalluslardan, hem de organogenik hücre hatlarından oluşturulan adventif sürgünlerden bitkiler elde edilmiştir.

Leshem ve ark., (1988), yapmış oldukları çalışmalarda, farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren sıvı ve katı ortamlarda kültüre aldıkları kavun sürgün uçlarında gözledikleri vitrifikasyonun (camlaşma) oluşumunu ve gelişimini incelemişlerdir. Araştırmacılara göre vitrifikasyonu teşvik eden ortam koşullarının varlığı söz konusu olmasına rağmen, besi ortamında sitokinin bulunmadığından vitrifikasyon oluşmamıştır. Bu sebeple sitokinini, vitrifikasyonu teşvik edebilecek birincil faktör olarak belirlemişlerdir. Sitokininsiz

ortamda vitrifikasyonu teşvik edecek faktörler olmamasına rağmen, düşük oranda spontan vitrifikasyon gözlemlendiği saptanmıştır. Vitrifikasyonun görülme frekansının, ortamın içeriği ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılara göre, sıvı ortamda hiçbir etki görülmezken, katı ortamdaki vitrifikasyon zamana bağlı olarak artmıştır. Katı ortamda vitrifiye olmuş tüm eksplantlar, 2. veya 3. alt kültürden sonra kallusa dönüşmüştür. Bu duruma bakılarak, ortamda sitokinin bulunmasına tepki olarak gözlerde vitrifikasyonun oluştuğu öne sürülmüştür.

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

Niedz ve ark., (1989), kavunlarda eksplantlardan rejeneren olan 1.5 ve 4 mm³ büyüklüğünde ve yaprak taslağı içeren yeşil nodüler yapıyı 'göz' (tomurcuk); 0.5 mm'den uzun gövdesi olan ve gövde üzerinde genişlemiş yaprak ve yaprak sapı bulunduran ayrıca sürgün apeksine sahip bitkicikleri de 'sürgün' olarak isimlendirmişlerdir.

Fassuliotis, (1990), farklı yazarlara dayanarak gerçek yaprak dokusu (Katkel ve ark., 1988; Dirks ve Van Bugennum, 1989), kallus suspansiyon kültürü (Oridate ve Oosawa, 1986), protoplast kültürü (Roig ve ark., 1988; Moreno ve ark., 1986) ve kotiledonlardan (Dirks ve Van Bugennum, 1989; Roig ve ark., 1988; Mackay ve ark., 1989; Brachard ve ark., 1988) bitki rejenerasyonunun gerçekleştiğini belirtmekle birlikte, çok az sayıda genotipin *in vitro* koşullarda başarıyla rejeneren edilebildiğini (Orts ve ark., 1987) bildirmiştir.

Fang ve Grumet, (1990), *in vitro* koşullarda yetiştirilen 4-5 günlük fidelerin kotiledon yapraklarının 4 kenarını bistüri ucu ile keserek elde ettikleri eksplantları kullanmak suretiyle, NPTII genini Hale's Best Jumbo kavun çeşidine aktarmak amacıyla çeşitli denemeler yapmışlardır. Gen aktarma çalışmalarının 10^7 - 10^8 hücre/ml yoğunluğundaki bakteri kültürü ile yürütüldüğünü, en uygun bakteri inokülasyon süresinin 10 ile 30 dakika olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, inoküle ettikleri eksplantlardan % 3 ile % 7'sinden transgenik bitki elde ettiklerini vurgulamışlardır.

Gonsalves ve ark., (1994), yaptıkları rejenerasyon çalışmalarında; Dirks ve Van Buggenum (1989) adlı araştırmacıların kullandığı rejenerasyon protokolünü (rejenerasyon ortamı: MS tuzları ve vitaminleri + 4.4 μ M BA; sürgün büyütme ortamı MS tuzları ve vitaminleri + 0.22 μ M BA; köklendirme ortamı % 2 sukroz içeren MS tuzları ve vitaminleri) modifiye ederek Burpee Hybrid, Hale's Best Jumbo, Topmark, Heart of Gold ve Harvest Queen çeşitlerinin rejenerasyon yeteneklerini araştırdıklarını ve rejenerasyon oranının sırasıyla % 14, % 69, % 21, % 33 ve % 41 olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar eksplantların 4 kesim yerinden birinde rejenerasyonun oluştuğunu ve proksimal eksplantların proksimal kesim yerinde oluşan rejenerasyon oranının, eksplantların distal bölgesine göre biraz daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca eksplantların rejenerasyon ortamına alınmasından 9 gün sonra mikroskopik olarak kallus oluşumunun gözlendiğini, 2 hafta sonra sürgün taslaklarının görülebildiğini, 3 hafta sonra ise eksplantın proksimal kesim bölgesinde bir veya daha çok noktada yaklaşık 50-75 sürgün taslağının meydana geldiğini saptamışlardır. Bununla birlikte bu sürgün taslaklarından sadece (eksplant başına) 2 ila 10'unun sürgün haline geldiğini tespit etmişlerdir.

Valles ve Lasaj, (1994), adlı araştırmacılar, *in vitro* koşullarda yetiştirilen 5 günlük fidelerin kotiledon yapraklarını kullanarak, pBI121 plazmidine sahip *A. tumefaciens*'in LBA4404 suşu aracılığıyla, NPTII ve GUS genlerini *Amarillo oro* kavun çeşidine aktarmak amacıyla çeşitli denemeler yapmışlardır. IK1560, NB00101 ve BM3 ortamlarını sırasıyla rejenerasyon, sürgün büyütme ve köklendirme ortamları olarak kullanmışlardır. Rejenerasyonda 0, 25, 100 ve 200 mg/l'lik

kanamisin konsantrasyonlarını deneyerek 100 mg/l'lik dozda büyüme ve gelişmenin engellendiğini belirlemişlerdir. Eksplantların *Agrobacterium* ile bulaştırıldıktan sonra antibiyotik (kanamisin ve sefatoksim) içermeyen rejenerasyon ortamında 1, 2 ve 3 günlük farklı bekletme sürelerinin transformasyon oranı üzerine olan etkisini araştırdıklarını ve en uygun sürenin 2 gün olduğunu belirtmişlerdir. 3 günlük sürenin uygulandığı eksplantlarda hiç rejenerasyon gözlenmediğini ve bunun *Agrobacterium*'un ortamdaki uzaklaştırılmamasından kaynaklanmış olabileceğini ifade etmişlerdir. İnokülasyondan 10 gün sonra eksplantların yaklaşık % 10'unun tomurcuk oluşturduğunu, oluşan tomurcukların ise % 50'sinin küçük sürgünlere dönüştüğünü tespit edilmiştir.

Ayub ve ark., (1996), etilenin klimakterik meyvenin olgunlaşmasında önemli rol oynayan bir bitki hormonu olduğunu bildirmişlerdir. Antisens ACC (ACC oksidaz etilen biyosentezinin son basamağını katalize eden gen) oksidaz genini eksprese eden transgenik kantalop (Charentais) kavununun rejenerasyonunu sağlamışlardır. Transgenik meyvenin etilen üretimi transgenik olmayan meyvenin etilen üretiminin % 1'inden daha az miktarda olduğunu ve olgunlaşmayı bloke ettiğini bildirmişlerdir. Antisens özellikli olgunlaşmayan meyveye sahip bitkinin dışarıdan etilen uygulamasıyla geri dönüştürülebildiğini saptamışlardır. Antisens ACC oksidazlı kavunların analizi, etilene bağlı olarak ve etilen söz konusu olmadan gerçekleşen olgunlaşma işlemini göstermiştir. Elde edilen transgenik hat nedeniyle kavunun depolama ömrü ve kalitesinin arttığını ve buna bağlı olarak ticari olarak gelişimde bir potansiyel teşkil ettiğini bildirmişlerdir.

Bordas ve ark., (1997), kavunda genetik transformasyon etkinliğinde rol oynayan pek çok faktörün etkisini araştırdıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, eksplant olarak 'Pharo' kavun çeşidinin hem gerçek yapraklarından hem de kotiledon yapraklarından, '*Amarillo canario*' çeşidinin ise yalnızca gerçek yapraklarından aldıkları parçaları kullanmışlardır. Araştırmada HAL1 (Tuzluluğa dayanıklılık sağlayan gen), GUS ve NPTII genlerini içeren pRS655 plazmidine sahip *A.tumefaciens*'in LBA4404 suşunu kullanmışlardır. Pharo çeşidinin gerçek yaprakları kullanılarak yapılan gen aktarma çalışmalarında, % 0.4 oranında transgenik bitki elde edildiğini saptamışlardır. *Amarillo canario* çeşidinin gerçek

yapraklarının eksplant olarak kullanıldığı ve 200 µM acetosyringone'nun co-cultivation ortamına ilave edildiğinde veya hem bakteri çoğaltma ortamında hem de co-cultivation süresi boyunca ortama eklendiğinde ya da asetosyringon eklenmediğinde elde ettikleri transformasyon oranının sırasıyla % 0.7, % 13 ve % 0 olduğunu bildirmişlerdir.

Çürük ve ark., (1998), yapmış oldukları çalışmada kavunun hipokotil uç kısmını içeren eksplantlarının, tepe tomurcuğu olmaksızın MS ve BA içeren ortamda çok sayıda sürgün oluşturabilme yeteneğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan araştırmalar sonucunda; hipokotilin tepe kısmından rejenerasyonun daha hızlı olduğunu ve 2 gün içerisinde ilk sürgünlerini oluşturduğunu buna nazaran kotiledon yapraklarında bu sürenin 1 ay gibi bir süre olduğunu, hipokotilin tepe kısmından rejenerasyonun karanlıkta meydana geldiğini, kotiledon eksplantlarından rejenerasyonun ise ışığa gereksinim duyduğunu, hipokotilin tepe kısmından rejenerasyonun % 100 diploid olan sürgün oluşumu ile sonuçlandığını, buna karşıt olarak kotiledon kısmından rejenerasyonun % 42 tetraploid olarak sonuçlandığını bildirmişlerdir.

Ezura (1999)'nın bildirdiğine göre; Fang ve Grumet (1993) adlı araştırmacılar ZYMV'ne dayanıklılık sağlayan kılıf protein genini kavuna aktararak ZYMV'ne dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir.

Gaba ve ark., (1999)'nın bildirdiğine göre, *In vitro* koşullarda kotiledon eksplantlarından sadece direkt organogenesis yoluyla rejenere olan kavunun Galia çeşidinde gözlenen göz (tomurcuk) rejenerasyonunun anatomisi ve morfolojisi araştırma sonucunda, kavun kotiledon yapraklarından elde edilen direkt rejenerasyonun epidermis tabakasındaki hücre bölünmesi sonucu oluştuğu bildirilmiştir.

Gaba ve ark., (1999)'nın bildirdiğine göre; hıyar (Gambley ve Dodd 1990; Colijn-Hooymans ve ark. 1994), kavun (Leshem, 1989; Gonzalves ve ark., 1994) ve karpuz (Compton ve Gray, 1993) gibi çoğu kabakgil türlerinde kotiledon yaprağının proksimal kısmının tohum apeksine yakın kesim bölgesi rejenerasyon açısından en çok aktif olan bölge olduğu belirtilmiştir.

Guis ve ark., (2000), *Cucumis melo* var. *cantalupensis*'nin (cv. Vedranta) yaprak eksplantlarından yeni bir transformasyon yöntemi geliştirerek çoğunluğu diploid transgenik bitkiler elde ettiklerini belirtmişlerdir. Birçok rejenerasyon protokolü kullanarak rejenerasyonun etkinliğini ve rejenerant kavun bitkilerinin ploidi düzeylerini araştırmışlardır. Bitkilerin 10 günlük fidelerinin kotiledon yapraklarının kullanıldığı ve 1 mg/l BA ve 1 mg/l 2İP (isopentyladenin) içeren MS ortamında kültüre alındığı sonuçta % 73 oranında rejenerasyon elde edildiği bildirilmiştir. Elde edilen rejenerant bitkilerin % 84'ten fazlasının diploid olarak bulunduğu bildirilmiştir. Transformasyonda *Agrobacterium* ortama eklendiğinde rejenerant diploid bitki eldesinde önemli bir değişme olmadığı (% 81) kaydedilmiştir. Bu protokolün ACC oksidaz geninin aktararak diploid bitki eldesinde başarı ile uygulandığı bildirilmiştir.

Nora ve ark., (2001), Kathal ve ark., (1988) tarafından tanımlanan rejenerasyon protokolünü kullanarak, kavundan alınan yaprak ve kotiledon eksplantları ile rejenerant bitki oranını, transformasyon ve ploidi oranlarını saptamışlardır. Genç yaprak eksplantlarından elde edilen rejenerant bitkilerde ploidi seviyesinin daha yüksek oranda görüldüğü belirlenmiş ve bunlar transformasyon için alıcı dokular olarak seçilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* ile gen transformasyonunda oran % 3 olarak belirlenmiştir. ACC oksidaz içeren PAP4 geni transformasyonda kullanılmıştır. Bu geni içeren transgenik bitkilerin düşük bir etilen üretimi gerçekleştirdiği saptanmıştır.

Martin ve ark., (2003), yapmış olduğu çalışmada, Vat geni taşıyan kavun hatlarında *A.gossypii* tarafından oluşturulan virus taşımına karşı dayanıklılık mekanizmasını araştırmışlardır. Vat geni, kavunlarda temel vektör olan *A.gossypii*. tarafından virüs taşınımının engellenmesini sağlamaktadır. Çalışmalarında, afitin bitki üzerindeki davranışları araştırılmış fakat dayanıklılık arasındaki ilişki anlaşılamamıştır. Ayrıca afit virulansa karşı hassas ve dayanıklı (Vat geni taşıyan) kavun türleri incelenmiş, Hıyar Mozaik Virüsü (CMV) inoküle edilmiş *A.gossypii* içeren hassas bitkilerin bir önceki araştırılan dayanıklı bitkilere göre daha etkili olduğu saptanmıştır.

Taner ve ark., (2004), yapmış oldukları çalışmada, *in vitro* mutasyon çalışmalarına temel olması için; Yuva kavun çeşidine ait bitkilerden alınan kotiledon ve yapraklı hipokotil parçalarının MS besin ortamında sürgün oluşturma kapasiteleri üzerine farklı şeker konsantrasyonlarının (% 15, 20 ve 25) ve pH seviyelerinin (5.6, 5.7, 5.8) etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, kotiledon parçalarından sadece kallus oluşumu sağlanırken, yapraklı hipokotil parçalarından kallus oluşumu ile birlikte sürgün oluşumu meydana gelmiştir. En yüksek oranda ve en kaliteli sürgün oluşumu bitki parçası başına 4.89 adet sürgün olacak şekilde % 15 şeker içeren ve pH' ısı 5.6 olan besi ortamından elde edilmiştir.

Yalçın-Mendi ve ark., (2004 a), yürütmüş oldukları araştırmada Türkiye'de ekonomik önemi olan Kırkağaç 637 kavun çeşidinde bitki rejenerasyonu ve gen transferi koşullarını optimize etmişler ve *Agrobacterium tumefaciens* yoluyla bu çeşitlere Kabak Sarı Mozayik Virüsüne (ZYMV; Zucchini Yellow Mosaic Virus) karşı dayanıklılık genini aktararak önemli ekonomik kayıplara neden olan bu virüs hastalığına dayanıklı kavun hatları elde etmişlerdir.

Yalçın-Mendi ve ark., (2004 b), yapmış oldukları çalışmada, Türkiye'de önemli bir kavun çeşidi olan Kırkağaç 637 kavun tohumlarının suda bekletilme zamanlarının (6, 15 ve 21 saat) eksplant tiplerinin (kotiledon, proksimal ve distal kısmı) ve eksplantın ortam üzerine konulma şeklinin (kotiledonun abaksiyal veya adaksiyal yüzeyleri) rejenerasyon üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda kotiledonun abaksiyal ve adaksiyal yüzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığa rastlanmamıştır. Buna ek olarak suda bekletilme zamanları (6, 15 ve 21 saat) arasındaki farklılıkların da önemsiz olduğu belirtilmiştir. Kotiledonun proksimal kısmındaki rejenerasyon ve sürgün oluşum kapasitesinin, distal kısmına nazaran daha yüksek olduğu belirlenmiş, ayrıca farklı suda bekletme zamanının rejenerasyonda olmasa da, sürgün oluşumunda önemli olduğu bulunmuştur. 15 ve 21 saat suda bekletilmiş olan tohumlarda sürgün oluşumunun (3.0 sürgün/eksplant), 6 saat suda bekletilmiş olan tohumlardakine nazaran (1.5 sürgün/eksplant) daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Yoko ve ark., (2003), Vedrantais (*Cucumis melo L. var. cantalupensis*) ve Earl's Favourite Fuyu A. (*Cucumis melo L. var. reticulatus*) kavun çeşitleri ile

yapmış oldukları çalışmalarda, somatik embriyogenesis ile, transgenik bitki elde etme üzerine çalışmışlar ve rejenerasyon denemelerinde etkili olacak bir metod saptamışlardır. 1 - 4 mm²'lik tohum parçaları kotiledon ve hipokotil eksplant olarak kullanılmıştır. Embriyo formasyonunu uyartmak için eksplantlar EI (2 mg/l 2,4-D ve 0,1 mg/l BA) ortamlarına aktarılmıştır. 4 haftanın sonunda embriyo oranları, 116.7 Vedrantaıs ve 148.6 Earl's Favourite Fuyu olarak tespit edilmiştir. İki haftanın sonunda çimlenme oranı sıvı MS ortamlarında % 80 (Vedrantaıs) ve % 35 (Earl's Favourite Fuyu) olarak belirtilmiştir. Rejenerant bitkilerin % 60'dan fazlasının diploid ve arazi koşullarında normal fenotip özellikleri gösterdiği kaydedilmiştir. *Agrobacterium* ile transformasyon çalışmalarında, Vedrantaıs çeşidi kullanılarak bir protokol geliştirilmiştir. Embriyo ve kalluslardan, embriyo-yapma seçici ortamlarında (25 mg/l kanamisin ve 375 mg/l Augmentin) bakteriyel inokülasyondan 8 hafta sonra % 80 oranında transgenik bitki elde edilmiştir. 50 mg/l kanamisin içeren MS ortamlarında aday transgenik bitkiler geliştirilmiş ve seraya aktarılmıştır. Transformasyon sonrası yapılan PCR analizleri, GUS ve Southern blot analizleri ile transformasyon oranı % 2.3 olarak saptanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

Çalışma 2008-2009 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü ve Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal**3.1.1. Rejenerasyonda ve Transformasyonda Kullanılan Bitki Materyalleri**

Araştırmada, Fransa Ulusal Tarımsal Araştırma Enstitüsü (INRA)'nden temin edilmiş olan Vedrantaïs kavun genotipi kullanılmıştır.

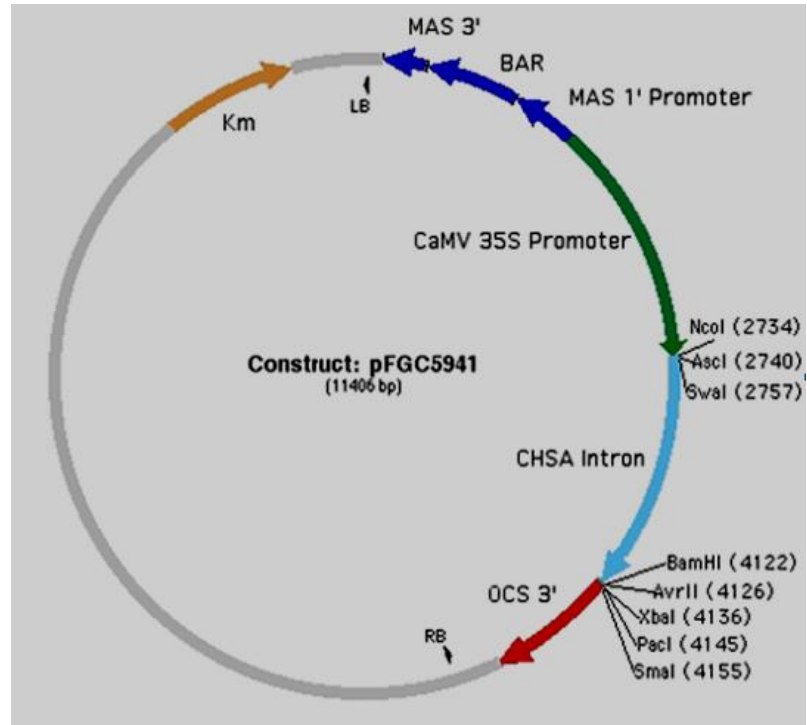
3.1.1.1. Vedrantaïs (*Cucumis melo* L. var *cantalupensis*)

Orijini İtalya olan bu kavun genotipi kantolop grubundandır. Meyve derisi tek renk olup, meyve aroması tatlı ve güzel kokuludur (Anonim, 2008).

3.1.2. Transformasyonda Kullanılan Plasmid ve Bakteri İrkıları

Transformasyonda *E. coli* (DH5 α) suşu içerisinde *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılan rekombinant RNAi-pFGC5941 ticari plasmidi kullanılmıştır.(Şekil 3.1.) (Çizelge 3.1.)

RNAi yapısı: Her bir grup veya tip genin birkaç karakterinin korunduğu ADH genlerinin bir kısım sekansları BamH1'in 5' ucundaki XbaI ve AscI bölümü ve 3' ucundaki SwaI bölümünü bulunduran tam olgunlaşmamış kavun meyvesinin cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri önce AscI ve SwaI ile kesilmiş ve bitki transformasyon vektörü olan pFGC5941 ile bağlanmış ve *E. coli* (DH5 α) içerisine koyulmuştur. Sekans her bir genin dört klonuyla belirlenmiştir. Meydana gelen uygun sekansa sahip olan plazmid pFGC5941-S olarak isimlendirilmiştir. Önceden bahsedilen iki genin antisens olarak sıralanmış kısımlarını elde etmek için PCR ürünleri BamH1 ve XbaI ile kesilmiş ilgili vektöre bağlanmış ve tekrar *E. coli* içerisine yerleştirilmiştir (Manríquez ve ark., 2006)



Şekil 3.1. *Escherichia coli* (DH5 α)' den *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılmış ticari rekombinant RNAi - pFGC5941 plasmidi

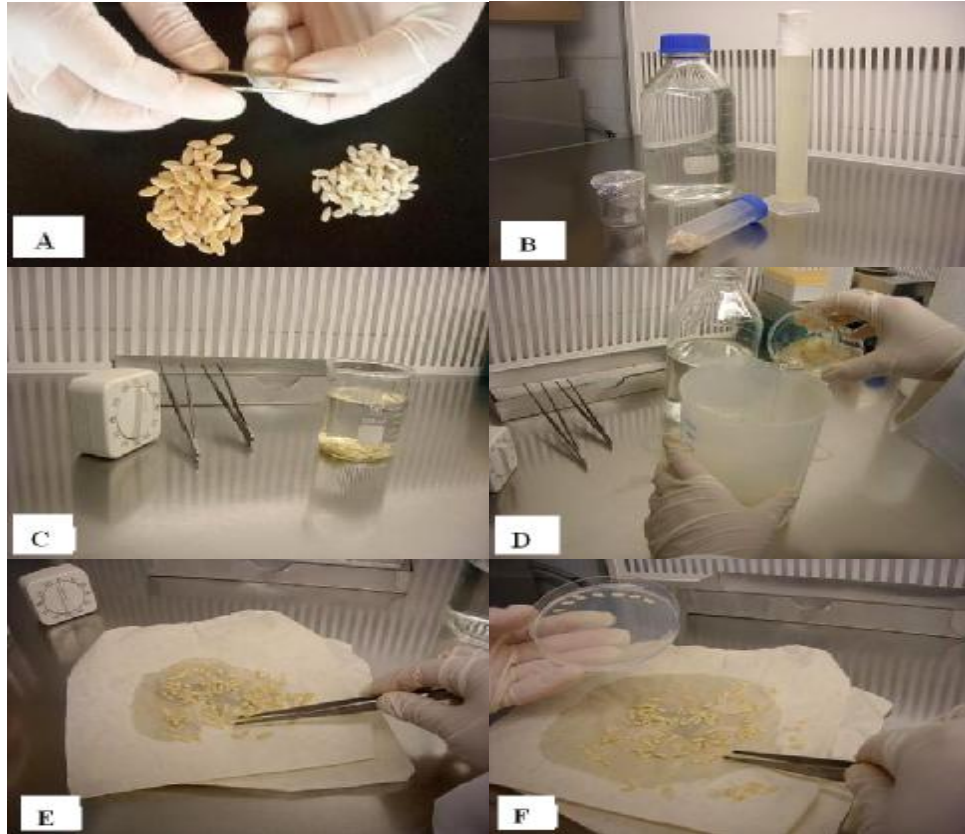
Çizelge 3.1. *Agrobacterium* bakterisinde bulunan plasmid DNA' nın Özellikleri

PLASMİDİN ÖZELLİKLERİ	
Plasmid adı	pFGC5941-(11406 bç)
ABRC stok numarası	CD3-447
Bakteri seleksiyonu	Kanamycin 50mg/l
Bitki seleksiyonu	Basta herbisiti
Promotor büyüklüğü (bç)	1400
İntron fragmenti	ChsA intron
Km (Kan^R)	Bakteriyel kanamycin direnç geni
BAR	Basta herbisitine dayanıklılığı kodlayan gen
OCS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens'</i> in poliadenilasyon sinyal dizisi
MAS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens'</i> in poliadenilasyon sinyal dizisi
MAS 1' Promotor	<i>Agrobacterium tumefaciens'</i> deki bitki promotoru
CaMV 35S Promotor	Karnabahar 35S mozaik virüsü viral promotoru
LB	T-DNA sol bölge
RB	T-DNA sağ bölge
ChsA İntron(1353 bç)	Petunia chalcone sentaz A geni

3.2. Metod

3.2.1. Rejenerasyon ve Transformasyon Denemeleri için Sterilizasyon Uygulamaları

Bu tez çalışmasında kavun tohum sterilizasyonundan kaynaklanan kontaminasyon sorunuyla karşılaşılmamıştır. Sterilizasyonda, kavun tohumlarının kabukları soyulmuş, %15 'lik sodyum hipoklorit çözeltisine %2 'lik tween-20'den 2 damla damlatılmış ve ara sıra çalkalanarak 10-12 dakika bekletilmiştir. Steril saf su ile 3-5 kez yıkanan tohumlar MS (Murashige ve Skoog, 1962) (Ek. 1.1) ortamında kültüre alınmış karanlıkta 16-18 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2. (A) Pens ile tohum kabuklarının çıkarılması; (B) Yüzeysel sterilizasyonda kullanılan sodyum hipoklorit çözeltisi ve steril saf su; (C) Sodyum hipoklorit çözeltisi ile tohumların muamelesi; (D) Saf su ile tohumların yüzeyinin deterjandan arındırılması; (E) tohumların filtre kağıdı üzerinde kurutulması; (F) Tohumların çimlendirme ortamına aktarılması

3.2.2. Tohumların *In vitro* Ortamda Çimlendirilmesi

Tohumlar sterilizasyon işlemlerinden sonra kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuş ve bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamlarında 16 saatlik fotoperiyotta 25-26 °C de 3 gün kültüre alınmıştır.

3.2.3. Doku Kültürü Şartları

Doku kültürü ve transformasyon çalışmalarının tümü aseptik koşullarda Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, steril koşulların sağlanması için steril kabinler kullanılmıştır. Rejenerasyon ve transformasyonda kullanılan tüm malzemelerin (bistüri bıçağı, pensler, kurutma kağıtları, cam malzemeler, pipet uçları, kullanılan saf su) 1.05 atmosfer basınç altında, 121°C sıcaklıkta 15 dakika süresince otoklavda sterilizasyonu sağlanmıştır. Steril kabin içerisinde, steril koşulların sürekliliğinin sağlanması için bistüri bıçağı ve pensler % 96'lık etil alkole batırıldıktan sonra elektrikli sterilizatörde sterilizasyona devam edilmiştir. Ön hazırlık odasında hazırlanan besi ortamları, 121°C'de, 1.05 atm basınç altında 15 dakika otoklav edildikten sonra amacımıza uygun olarak 20 ml steril petrilere ya da 25-30 ml steril cam kavanozlara aktarılmıştır. Besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel ortam bileşimi kullanılmıştır. Tohum çimlendirme aşaması için bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamına % 3 sakkaroz ve % 0.75 agar ilave edilerek pH 5.7'ye ayarlanmıştır. Rejenerasyon denemelerinin farklı aşamalarında besin ortamlarına bitki büyüme düzenleyici ve antibiyotik ilavesi yapılmıştır. Antibiyotik ilavesi gereken çalışmalarda, antibiyotik sterilizasyonu 0.2 mikron çapta por genişliğine sahip filtreler kullanılarak yapılmış ve daha sonra steril edilen besin ortamlarına ilave edilmiştir. Otoklav şartları altında antibiyotiklerin kimyasal yapısı bozulacağından besin ortamlarına sonradan eklenmiştir. MS ortamına göre mineral tuzların ve vitaminlerin isim ve konsantrasyonları Ek 1.1'de olduğu gibidir.

3.2.4. Transformasyon Çalışmaları

3.2.4.1. Transformasyonda Kullanılan Bakteri Çözeltisinin Yoğunluğunun Belirlenmesi

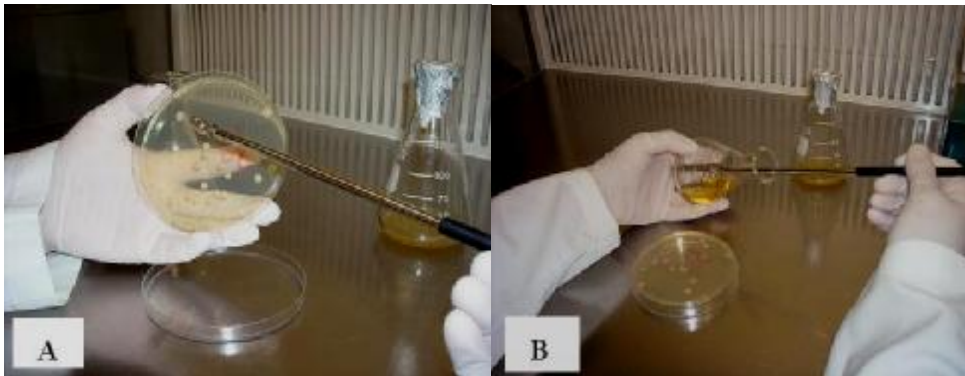
Bakteri çözeltisinin yoğunluğunu belirlemek amacı ile spektrofotometre kullanılmıştır. Spektrofotometrede uygun bakteri konsantrasyonu O.D. 600 nm λ 600 olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrede okunan değerler sonucunda en uygun miktarının 750 μ l olduğu görülmüştür.

3.2.4.2. *Agrobacterium tumefaciens* ve İnokülasyon Solüsyonunun Hazırlanması

Bakterileri katı ortamda geliştirmek amacı ile Katı LB (Ek. 1.2(a)) ortamı, sıvı ortamda geliştirmek için ise sıvı LB (Ek.1.2 (b)) ortamları hazırlanmıştır.

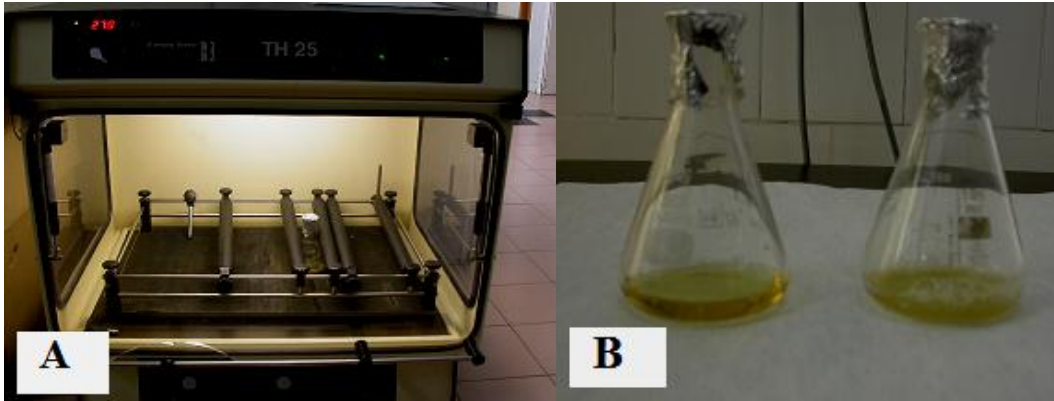
Agrobacterium tumefaciens'e ait olan ADH-L ve ADH-S ırkları, LB ortamı içerisine agar eklenerek hazırlanan katı ortamlarda öze yardımı ile çizilerek geliştirilmiştir ve 28 °C'de 1-2 gün etüvde inkübe edilmiştir. Her iki ırk içinde LB + 50 mg/l Kanamycin kullanılmıştır. Saklama koşullarını sağlamak amacı ile 4 °C'de dolapta saklanmıştır. Seçilen tek koloniler transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Sıvı bakteri kültürünün hazırlanmasında, katı LB ortamında gelişen bakteri kolonilerinden öze yardımı ile tek koloni seçilmiş ve hazırlanan 20 ml antibiyotikli LB ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. (A) Öze yardımı ile tek koloni *Agrobacterium sp.* seçimi; (B) LB ortamına seçilen tek koloni *Agrobacterium*'un inokülasyonu

Bu şekilde hazırlanan bakteri kültürü 200 rpm/dk.'da ve 28-30 °C'de çalışan çalkalayıcı içerisinde bir gece inkübe edilmiştir. Bir gece inkübe edilen bakteri solüsyonundan yapılan spektrofotometre ölçümleri sonucunda en uygun olan miktar 750 µl olarak belirlenmiş ve 750 µl bakteri solüsyonu antibiyotiksiz sıvı LB içerisinde 200 rpm/dk.'da 3-4 saat kültüre alınmıştır.(Şekil 3.4.)

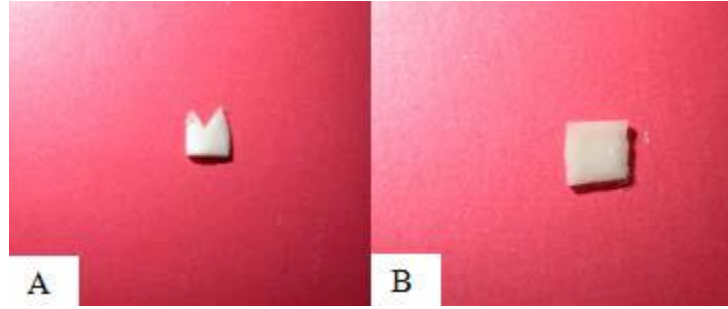


Şekil 3.4. (A) Tek koloni bakteri eldesi için aşılınmış kültürün uygun koşullarda inkübasyonu, (B) Üreyen ve üremeyen *Agrobacterium*'un genel görüntüsü

3.2.4.3. Eksplantların Bakteri Kültürü ile İnokülasyonu

Tohumların sıvı bakteri solüsyonu içerisinde testası ve apikal meristeme yakın olan kısmı çıkarılmıştır. Tohum ikiye ayrıldıktan sonra yara dokusu oluşturmak amacı ile kenarlarından kesilmiştir. Oluşturulan parçaların proksimal kısmı V şeklinde kesilmiş, kalan kısım bisturi bıçağı ile 4 eşit parçaya ayrılarak eksplantlar elde edilmiştir. Proksimal ve kotiledon olmak üzere iki çeşit eksplant kullanılmıştır.(Şekil 3.5.) Her bir besi ortamına 10 adet eksplant yerleştirilmiştir.

Bakteri solüsyonuna 200 µM asetosiringon ilave edilmiştir. Bakteri solüsyonunda kesilen tohumlar antibiyotik içermeyen M1 (Ek 1.3.) ortamlarında karanlıkta (alüminyum folyo kullanılarak petripler sarılmıştır) iklim odası koşullarında 3 gün bekletilmiştir. Bu süre içerisinde tohumda açılan yara dokularından bakteri girişini sağlamak amaçlanmıştır. Daha sonra eksplantlar kabin içerisinde steril malzemeler ve otoklavlanmış steril saf su kullanılarak yıkanmış ve rejenerasyon M2 (Ek 1.4.) ortamlarına aktarılmıştır.



Şekil 3.5. A: Proksimal eksplant, B: Kotiledon eksplant

3.2.5. Moleküler Uygulamalar

Gen aktarma çalışmaları sonunda kavun bitkilerine aktarılan ADH antisens genlerinin varlığını tespit etmek için moleküler çalışmalar yapılmıştır. Moleküler uygulamalara ait analizler Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. DNA İzolasyonu

Transformasyon çalışmaları sonucunda MSG (Ek.15) ortamı içerisinde kavun eksplantlarında meydana gelen sürgünlerden alınan örneklerle DNA izolasyonu yapılmıştır.(Şekil 3.6.). Bu çalışmada MiniPrep DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır (Johnstone ve Thompson, 1991). DNA izolasyonu aşamasında kullanılan tampon çözeltinin içeriği Çizelge 3.2’te sunulmuştur. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltiler dışında kloroform:izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1 M pH:8, EDTA: 0.5 M pH:8), RNase A (10 mg/ml) solüsyonu, izopropanol ve etil alkol (%99) kullanılmıştır.

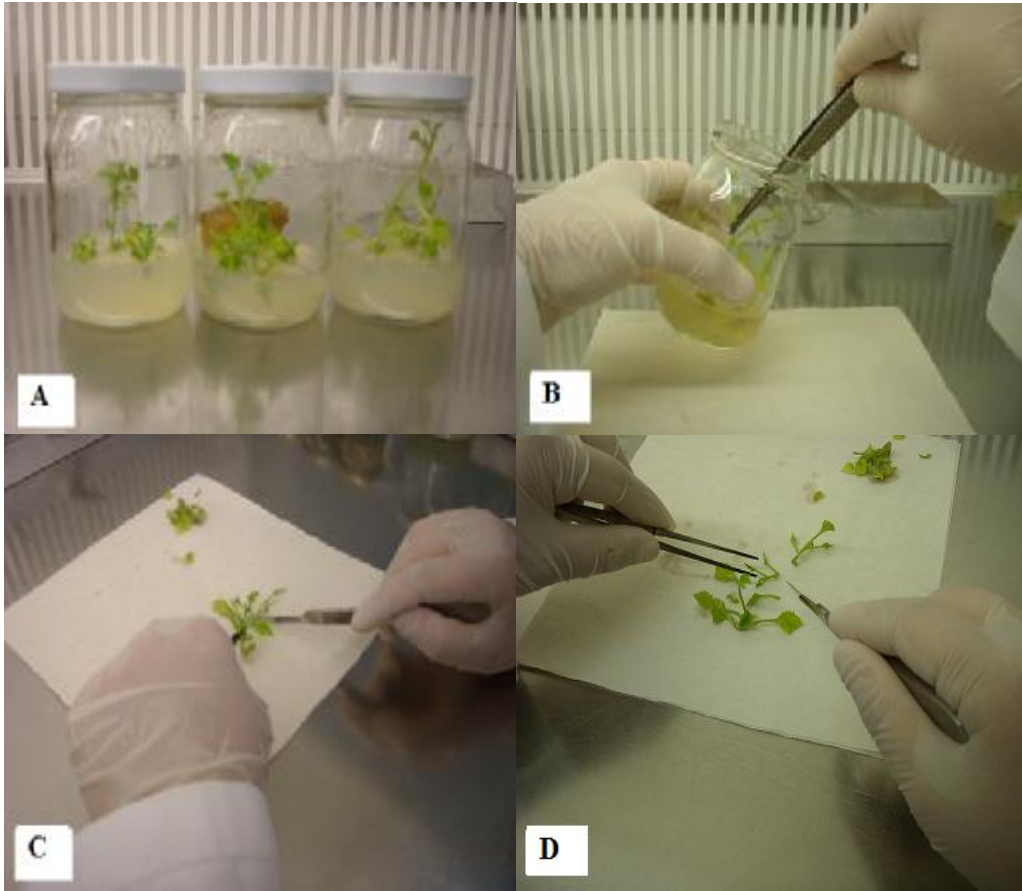
Çizelge 3.2. DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği

Solüsyon	Konsantrasyon
CTAB	%2.00
NaCl (5 M)	1.4 M
EDTA (0,5 M) pH 8,0	0.2 M
TRIS-HCl (1 M) pH 8,0	0.1 M

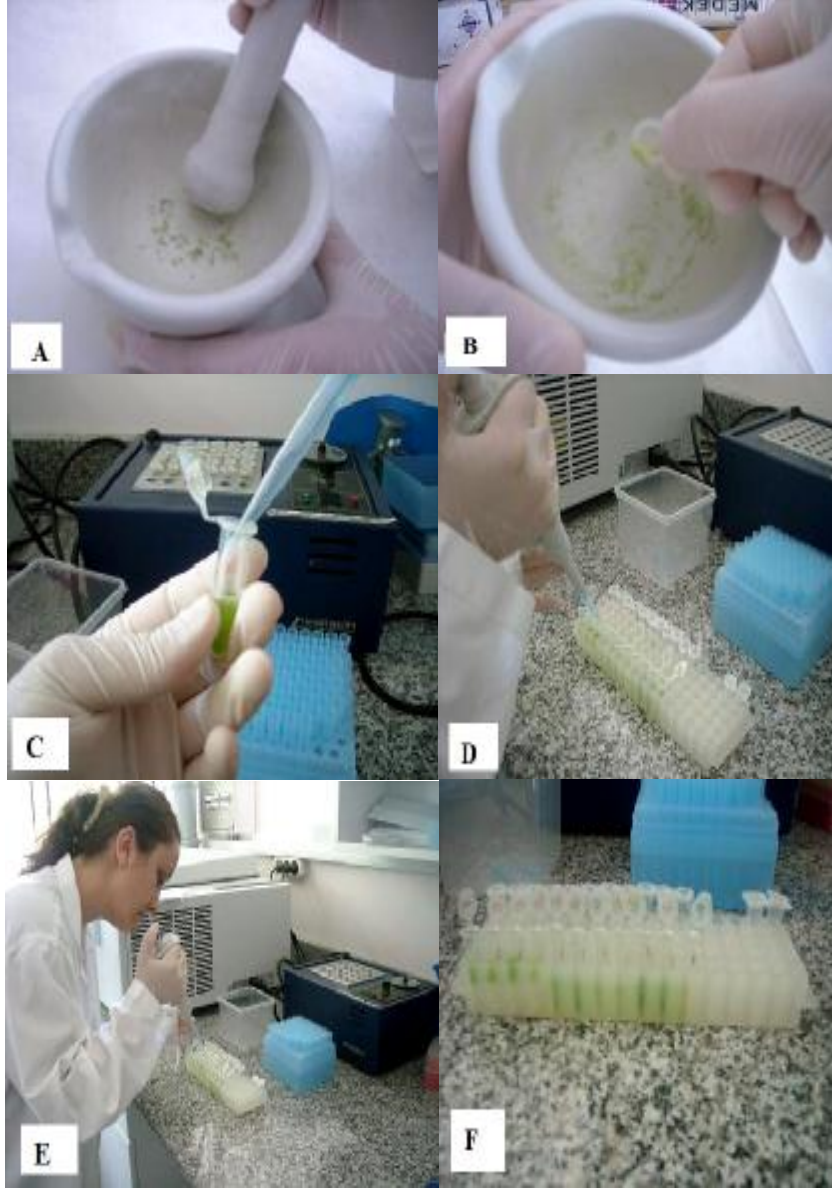
DNA İzolasyon Aşamaları;

DNA izolasyon aşamaları (Şekil 3.7.)'de verilmiştir.

- Ø Hazırlanmış olan ekstraksiyon solüsyonundan her tüpe 396µl ve 4µl β-merkaptotanol eklenmiştir.
- Ø Bir pipet aracılığıyla tüpler homojenlik sağlanana kadar karıştırılmış ve daha sonra tüpler 65°C'de 20 dakika bekletilmiştir ve iki defa karıştırılmıştır.
- Ø Her tüpe 400µl kloroform:izoamilalkol eklenerek 15 dakika vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.
- Ø Tüpler 5 dakika 13.000 rpm/dk santrifüj edilmiştir. Bekleme sırasında her örnek için yeni temiz bir santrifüj tüpü hazırlanıp etiketlenmiştir ve tüplerin içine 400 µl soğuk (-20°C) izopropanol eklenmiştir.
- Ø Santrifüj tamamlandığında tüplerin üst kısmındaki sıvı kısım steril pipet aracılığıyla 400 mikrolitre soğuk (-20°C) izopropanol içeren santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle -20°C'de bekletilmiştir.
- Ø 5 dakika 13.000 rpm/dk santrifüj edilmiştir.
- Ø Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Pelletin kuruması için tüpler ters bırakılarak bekletilmiştir
- Ø Kuruyan Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür. Her tüpe 4 µl RNase A eklenmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında tüpler bekletilmiştir.
- Ø Her tüpe 500 µl soğuk EtOH (%100) (buzluktan çıkmış) eklenmiştir ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle -20°C'de bekletilmiştir.
- Ø 5 dakika 13.000 devirde santrifüj edilmiştir.
- Ø Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüş ve pelletin kuruması için tüpler ters çevrilmiştir
- Ø Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür.
- Ø Örnekler -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.6. (A) MSG Sürgün ortamındaki aday transgenik bitkiler (B), (C), (D), DNA izolasyonu için bitki örneklerinin alınması



Şekil 3.7. (A)Eksplantların öğütülmesi, (B) Öğütülen eksplantların ependorf tüplerine alınması (C), (D), (E) Ependorftaki örneklerin üzerlerine CTAB çözeltisinin eklenmesi, (F) CTAB çözeltisi eklenen örneklerin genel görünümü

3.2.5.2. *Agrobacterium tumefaciens* pFGC5941-ADH (S-L) Ticari Rekombinant Bakterisinde Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için önceden katı besi yerinde yayma yöntemi ile elde edilen bakteriden tek koloni alınarak 500 µl steril ddH₂O içeren ependorf tüpüne alınmıştır. Tek koloni bakteri ile su karışımını içeren ependrof tüpü 90°C'de 10 dk. bekletilmiştir. 10 dk. sonunda elde edilen örneğin 3 µl'si PCR'da pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Ünek, 2008).

3.2.5.3. PCR Protokolünün Optimizasyonu ve Uygulanması

İzolasyonu gerçekleştirilen bitki materyalleri ve spesifik primerler kullanılarak PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonlarında kullanılan primer kombinasyonları Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR'de Kullanılan Primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Uzunluk (bp)
Cm-ADHL1 (forward)	AGTCTAGAGGCGCGCCTGTGTTCTTAGCTGCGGCATTT	366
Cm-ADHL1 (reverse)	CTGGATCCATTTAAATTTTGAATGCATCGTCTTTGTTT	
Cm-ADHS2 (forward)	AGTCTAGAGGCGCGCCTTGGACATGGAAGAAGAGAGAG	369
Cm-ADHS2 (reverse)	CTGGATCCATTTAAATGATCTTATACTTTCCAACATCC	
Bar gene (forward)	GAACGACGCCCGGCCGACATCC	500
Bar gene (reverse)	GTCCAGCTGCCAGAAACCCAC	

PCR protokolünün optimizasyonu için çeşitli denemeler yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda optimum protokol tespit edilmiş olup tüm bitki örnekleri ve spesifik primerler kullanılarak bu protokole göre PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Uygulanan PCR protokolü Çizelge 3.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR Reaksiyonlarında Uygulanan Protokol

Master Mix	16.25µl
Primer (Forward)	1.25µl
Primer (Reverse)	1.25µl
MgCl ₂	1.25µl
H ₂ O	3 µl
Taq Polimeraz	0.125 µl

50 ng'a ayarlanmış DNA örneklerinden 3 µl PCR için kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. ADH-L ve ADH-S primerleri için kullanılan PCR protokolü

95 °C 30 sn	ön denatürasyon	35 döngü
95 °C 3 dk	DNA'nın çift ipliğinin ayrılması	
58 °C 1dk	primerlerin bağlanması	
72 °C 2 dk	yeni iplikçiğin yazılımı	
72 °C 10 dk	son yazılım	
4	∞	

Çizelge 3.6. Bar primeri için kullanılan PCR protokolü

95 °C 60 sn	ön denatürasyon	35 döngü
95 °C 3 dk	DNA'nın çift ipliğinin ayrılması	
60 °C 1dk	primerlerin bağlanması	
72 °C 2 dk	yeni iplikçiğin yazılımı	
72 °C 10 dk	son yazılım	
+ 4	∞	

3.2.5.4. Elektroforez Koşulları

Elde edilen PCR ürünlerine 5 µl 6 x boya solüsyonu eklenmiş ve % 1.5'lik agaroz jelde Şekil 3.8.'de görüldüğü gibi, 1 x TAE solüsyonu eklenerek koşulmuştur. Jel, % 0.1 oranındaki EtBr. solüsyonu ile boyanmıştır. İşlem sona erdikten sonra UV altında DNA bantlarına bakılmış ve oluşan amplifikasyon ürünlerinin varlığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.8. Agaroz Jel Elektroforezde PCR Ürünlerinin Koşulması

4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. Bulgular****4.1.1. Tohumların Sterilizasyonu**

Tohumların sterilizasyonunda 3.2.1.'de verilen protokol uygulanmış olup kontaminasyon sorunu ile karşılaşılmadığı için yüzey sterilizasyonu yeterli olmuştur. Bu nedenle sterilizasyonda farklı yöntemlere başvurulmamıştır.

4.1.2. Tohumların Çimlendirilmesi

Tohumlar sterilizasyon işlemlerinden sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen (Murashige ve Skoog, 1962) MS Bazal besi ortamlarında 16 saatlik fotoperiyotta 25-26 °C de 3 gün kültüre alınmıştır. Bu süre sonunda tohumlarda çimlenme başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir.

4.1.3. Rejenerasyon Ortamının Optimizasyonu

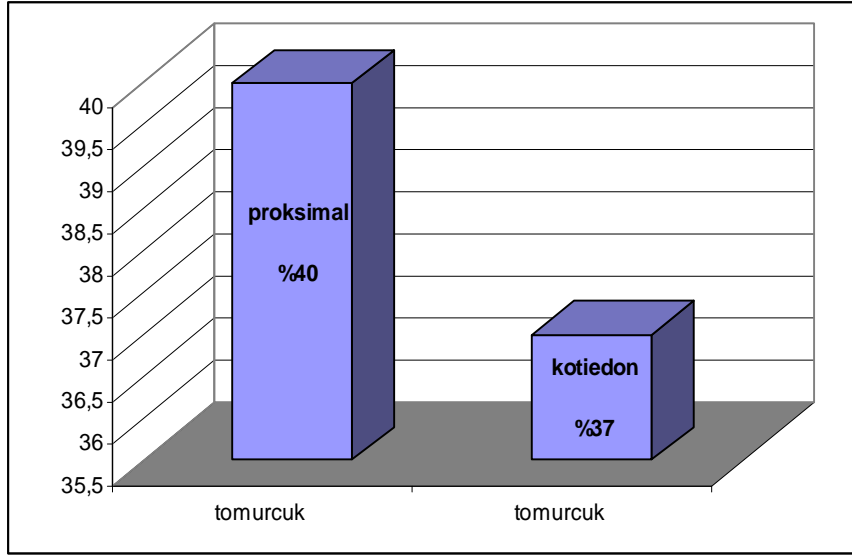
Bu çalışmada Vedrantais kavun tohumlarının rejenerasyonunu sağlamak amacıyla Ayub ve ark., (1996) tarafından önerilen protokol denenmiştir. Kurulan ön denemede, Ayub ve ark., (1996)'nın protokolü modifiye edilerek çalışılmış ve bu protokolün rejenerasyonda iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (Ek1.3).

4.1.4. Transformasyon Çalışmaları**4.1.4.1. Transformasyon Esnasında Kullanılan Hormon Konsantrasyonları ve Antibiyotik Uygulaması**

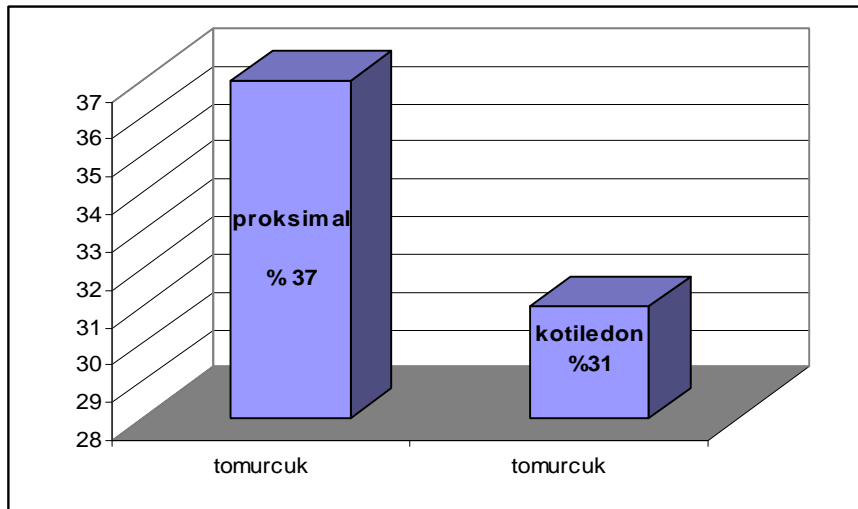
Gen aktarma çalışmalarında antibiyotik (750 mg/l sefuroksim sodyum) içeren besi ortamı M2, rejenerasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Transformasyon denemelerinde yapılan en iyi bitki büyüme düzenleyici konsantrasyon ve kombinasyonunun Ayub ve ark., (1996) tarafından optimize edilen konsantrasyon olduğu doğrulanmıştır.

4.1.4.2. Transformasyon Denemesi Sonuçları

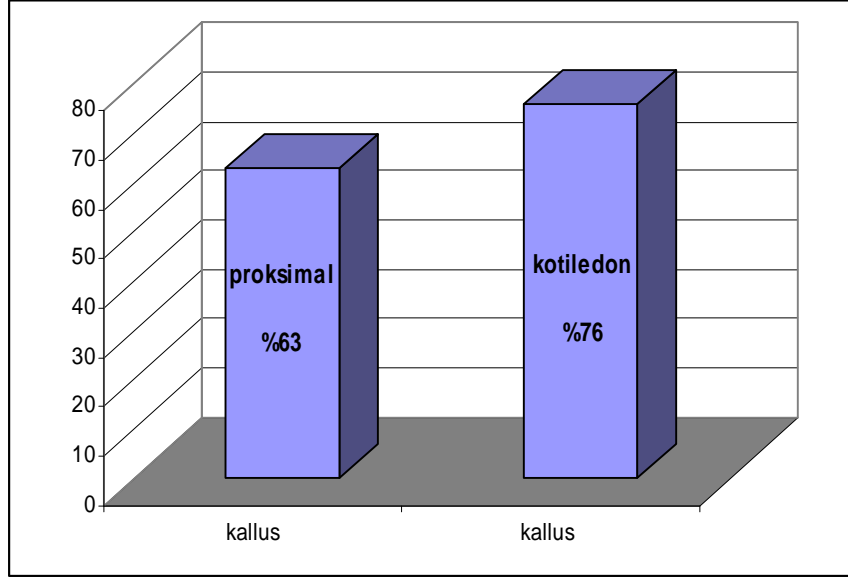
Transformasyon çalışmalarında 10. gün sonunda hem proksimal eksplantlarda hem de kotiledon eksplantlarda kallus gelişimleri ve rejenerasyon tomurcuklarının oluşumları gözlemlenmiştir (Şekil 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5. ve 4.6.).



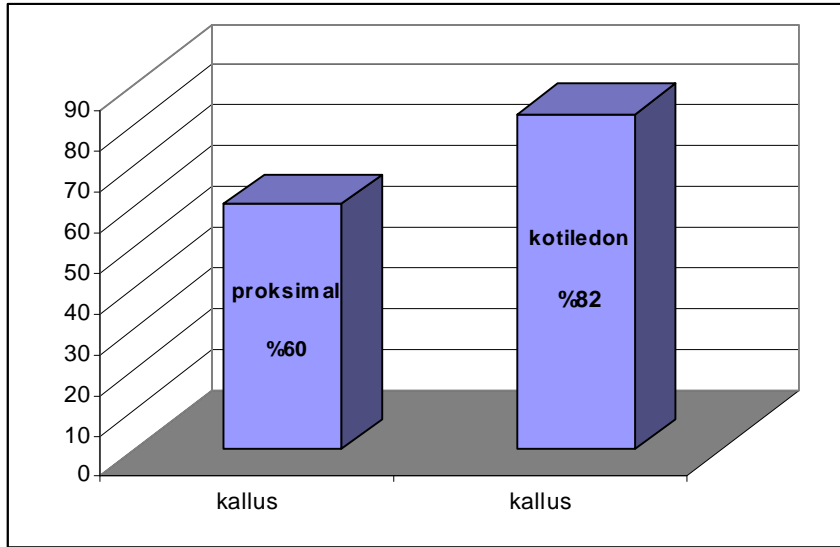
Şekil 4.1. ADH-L bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda on gün sonra elde edilen rejenerasyon tomurcuğu oranları



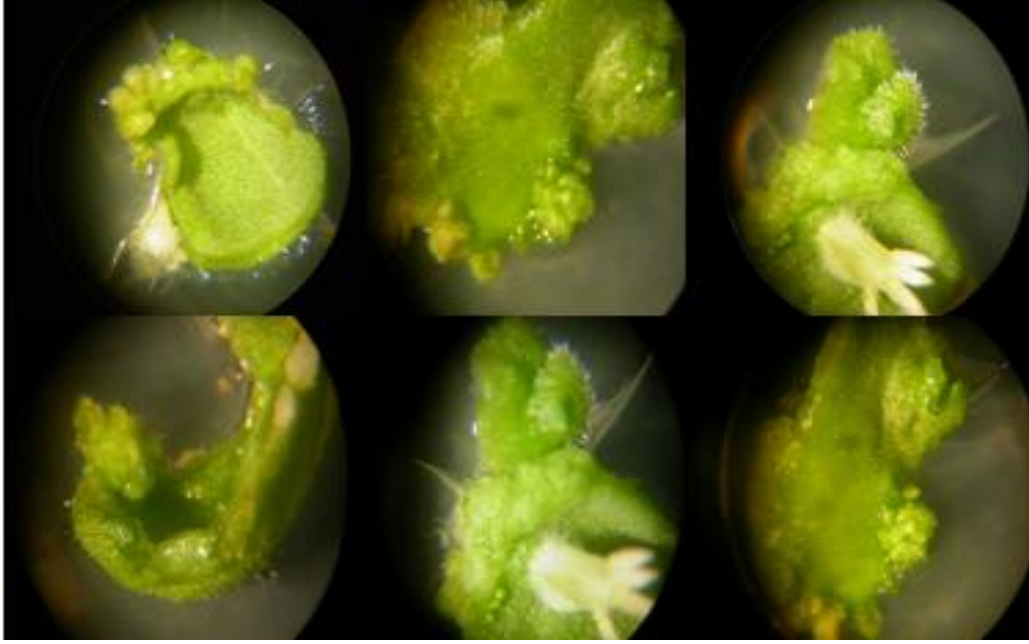
Şekil 4.2. ADH-S bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda on gün sonra elde edilen rejenerasyon tomurcuğu oranları



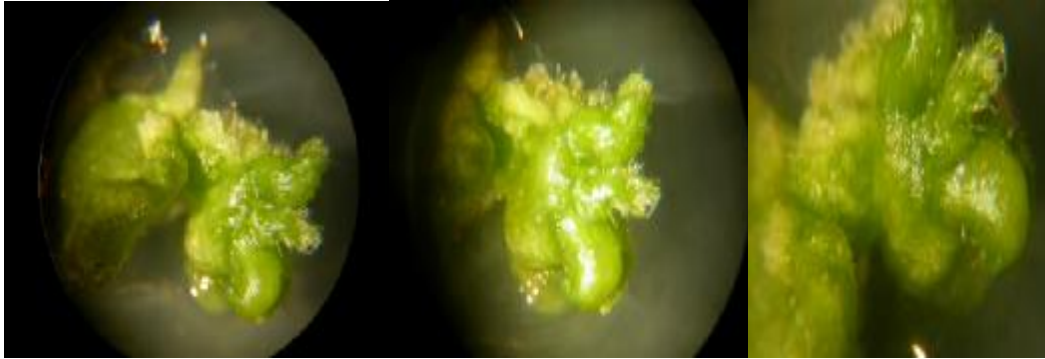
Şekil 4.3. ADH-L bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda on gün sonra elde edilen kallus oranları



Şekil 4.4. ADH-S bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda on gün sonra elde edilen kallus oranları



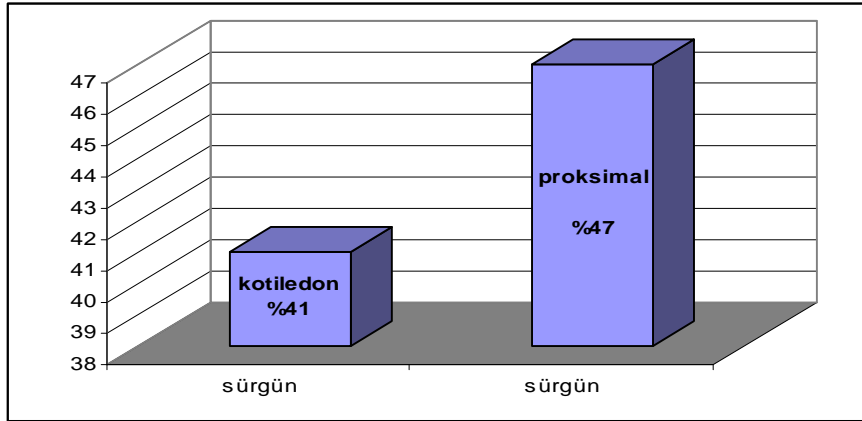
Şekil 4.5. Kotiledon eksplantların gelişimlerinin 15. günündeki görünüşleri



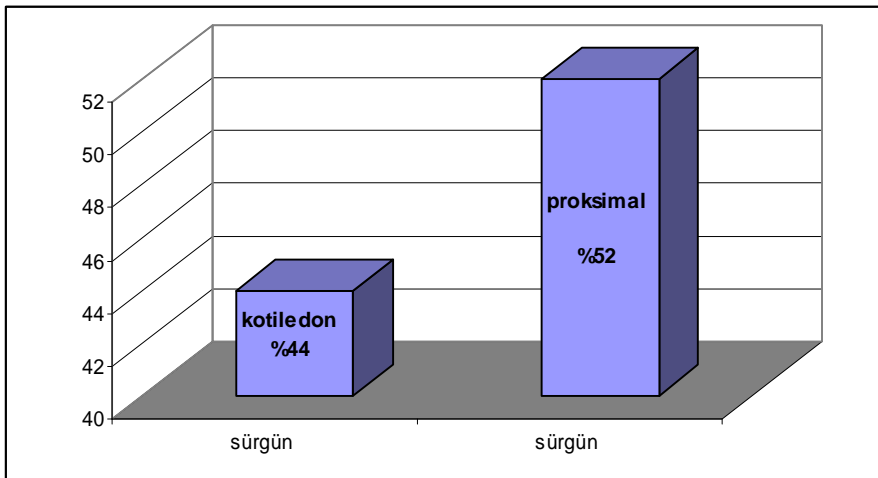
Şekil 4.6. Proksimal eksplantların gelişimlerinin 15. günündeki görünüşleri

Denemeler sonucunda, antibiyotikli besi ortamı olan M2 ortamında bitkilerin 20 günden daha fazla süre tutulmaması gerektiği tespit edilmiştir. Yaklaşık 20 günün sonunda besi yerindeki antibiyotik etkisini yitirmekte ve besi yerlerinde bakteri gelişimi gözlemlenmektedir. Bu nedenle rejenerasyon ve rejenerasyon tomurcuğu olan eksplantlar taze M2 besi yerlerine aktarılmış, kallus, beyaz kallus veya bakteri enfekteli eksplantlar seçilmiş ve elemine edilmiştir.

Gelişen rejenerasyon tomurcuklarından 3. haftadan itibaren sürgün gelişimleri gözlemlenmiştir. Oluşan sürgünler, bitki elde etmek amacıyla MSG (Ek1.5) besi yerlerine aktarılmıştır.

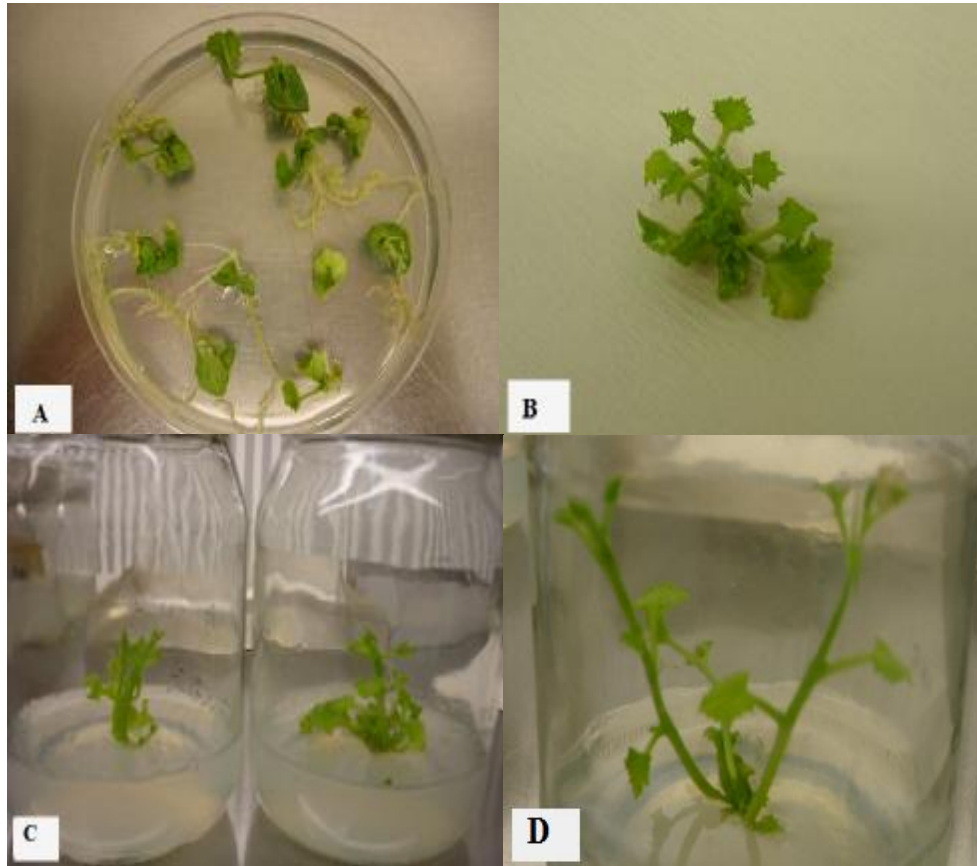


Şekil 4.7. ADH-L bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda 24. günün sonunda elde edilen sürgün gelişimleri



Şekil 4.8. ADH-S bakteri suşu kullanılarak yapılan transformasyonda 24. günün sonunda elde edilen sürgün gelişimleri

Rejenerasyon gelişimi devam eden fakat henüz sürgün oluşturmamış bitkiler sürgün eldesi için taze M2 besi ortamına aktarılmıştır. Bu şekilde 1-2 alt kültürden sonra rejenerasyon gelişimi başlamış tüm eksplantlardan sürgün, oluşan sürgünlerden de bitki elde edilmiştir.



Şekil 4.9. (A) Rejenerasyon ortamındaki bitkiler; (B), (C), (D) Sürgün geliştirme ortamlarındaki (MSG) Bitkilerin görünümüleri

4.1.5. Moleküler Çalışmalar**4.1.5.1. DNA İzolasyonu**

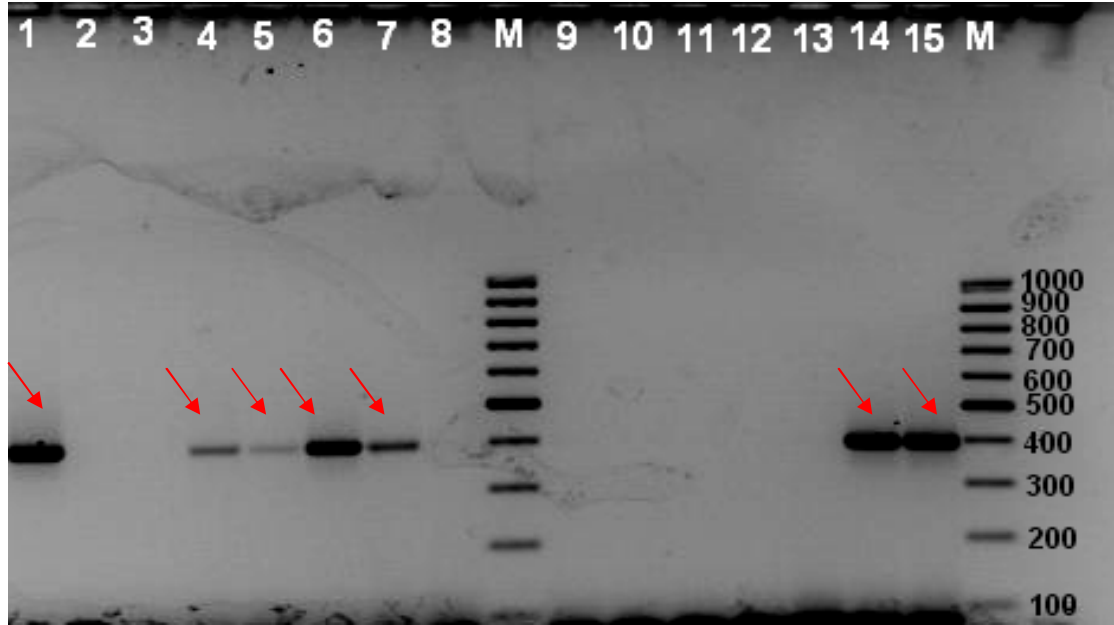
Yapılan transformasyon çalışmaları sonrasında elde edilen Vedrantais genotipine ait MSG ortamlarında yer alan 10 aday transgenik bitkinin ve 1 negatif kontrol Vedrantais bitkisinin DNA izolasyonu yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak *Agrobacterium tumefaciens*'den elde edilen ve istediğimiz geni taşıyan plazmid DNA'sı kullanılmıştır.

4.1.5.2. DNA'nın Kantite ve Kalitesinin Belirlenmesi

DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrede (Nanodrop) 260-280 nm'de okuma yapılarak belirlenmiştir.

4.1.5.3. PCR Sonrası Elde Edilen Bantlar

Transformasyon çalışmaları sonrasında elde edilen aday transgenik bitkilerde, aktarmak istediğimiz genlerin transferinin gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü için PCR analizleri yapılmıştır. PCR ürünleri % 1.5 lik agaroz jel içerisinde koşularak DNA bant profilleri elde edilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.10., Şekil.4.11., Şekil.4.12., Şekil.4.13.'de gösterilmiştir.

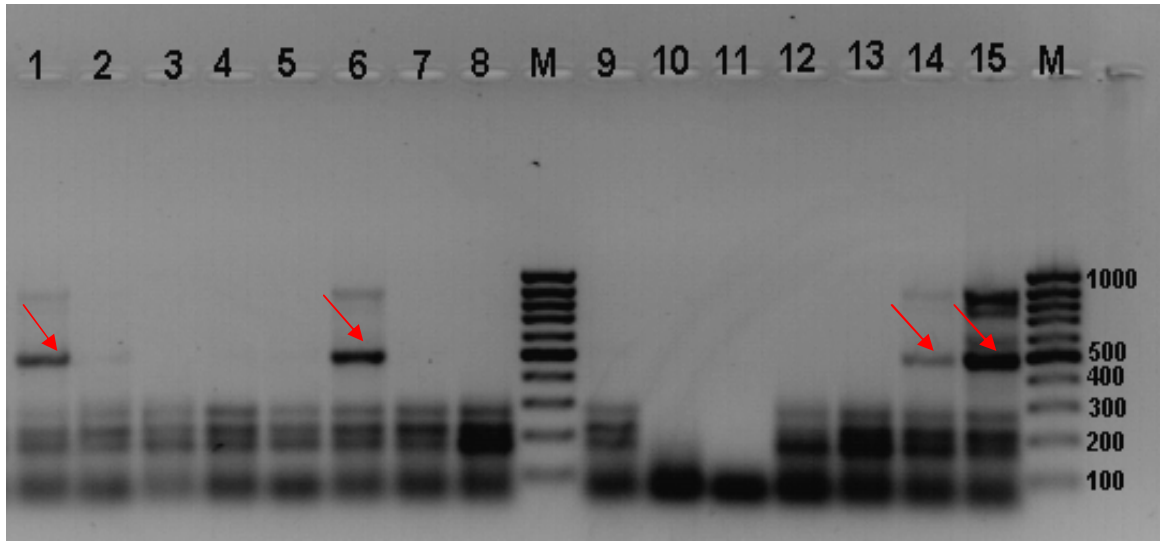


Şekil 4.10. ADH-S antisens geni aktarılan bitkilerdeki ADH-S geni DNA'larının PCR profilleri

M: Marker (100 bç), **1:** Pozitif Kontrol (*Agrobacterium tumefaciens* plazmid DNA'sı (ADH-S antisens geni taşıyan), **2:** Negatif kontrol (Vedrantais kotiledon DNA'sı), **3:** Negatif Kontrol-PCR solüsyonu, **4, 5, 6, 7, 8:** Transgenik aday Vedrantais kotiledon DNA'ları (ADH-S antisens geni takılı *Agrobacterium* plazmidi taşıyan), **9:** Negatif Kontrol (Vedrantais proksimal DNA'sı), **10, 11, 12, 13, 14, 15:** Transgenik aday Vedrantais proksimal DNA'ları (ADH-S geni taşıyan *Agrobacterium* plazmidi taşıyan)

Şekil 4.10'de sunulmuş agaroz jel görüntüsü üzerinde 4, 5, 6, 7 ve 8 rakamları ile kodlanmış bölümler gen aktarımının gerçekleştiği düşünülen Vedrantais genotipine ait kotiledon eksplantları; 10, 11, 12, 13, 14 ve 15 şeklinde numaralandırılmış DNA bant profilleri ise gen aktarımının gerçekleştiği düşünülen proksimal eksplantları göstermektedir. 2 ve 9 numaralı bantlar ise transformasyon yapılmamış Vedrantais genotiplerinin DNA profillerini göstermektedir. 3 numara ile kodlanmış bölüm ise amplifikasyonunu beklemediğimiz PCR solüsyonunu içeren bölgedir. 1 numaralı bölge ise bu tez çalışmasında kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin ADH-S suşuna ait 369 bç uzunluğundaki DNA bantı göstermektedir. PCR'da ADH-S gen amplifikasyonu için 369 bç uzunluğunda amplifikasyon sağlayan ticari primer kullanılmıştır.

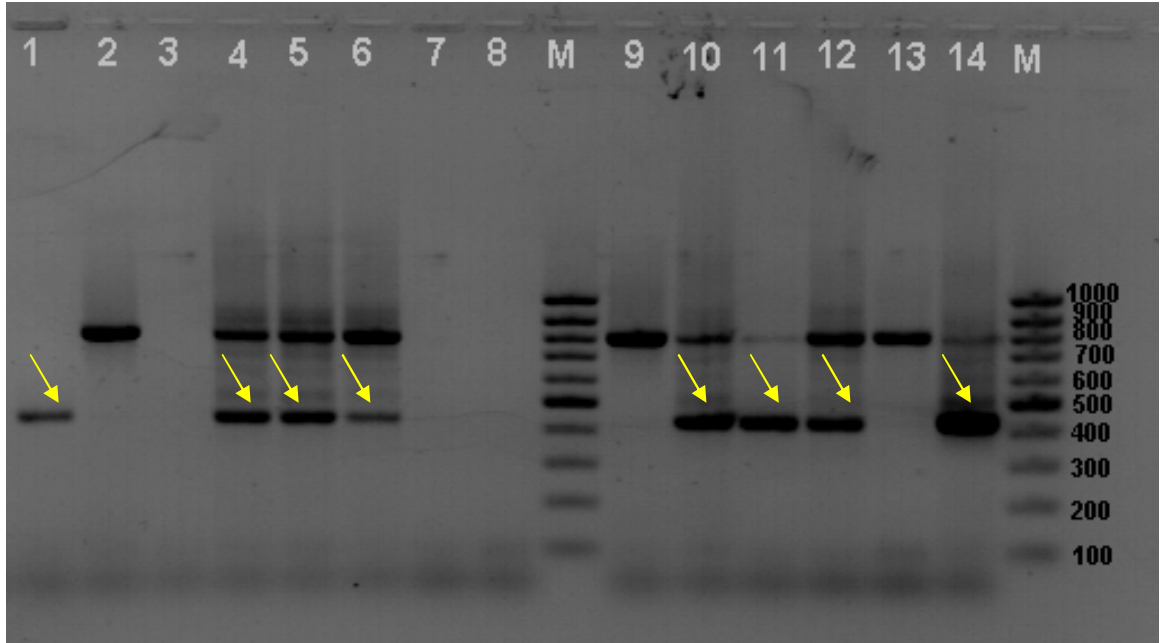
Elde edilen agaroz jel görüntülerinde 4, 5, 6, 7, 14 ve 15 numaralı bitkilerde *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin ADH-S suşuna ait 369 bç uzunluğundaki DNA bantı ile aynı uzunlukta DNA bant profilleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda transformasyon başarısı bu örnekler için (4, 5, 6, 7, 14, 15 numaralı olanlar) doğrulanmıştır.



Şekil 4.11. ADH-S antisens geni aktarılan bitkilerdeki Bar geni DNA'larının PCR profilleri

M: Marker (100 bç), **1:** Pozitif Kontrol (*Agrobacterium tumefaciens* plazmid DNA'sı (ADH-S geni taşıyan), **2:** Negatif kontrol (Vedrantais kotiledon DNA'sı), **3:** Negatif Kontrol-PZR solüsyonu, **4, 5, 6, 7, 8:** Transgenik aday Vedrantais kotiledon DNA'ları (ADH-S antisens geni takılı *Agrobacterium* plazmidi taşıyan), **9:** Negatif Kontrol (Vedrantais proksimal DNA'sı), **10, 11, 12, 13, 14, 15:** Transgenik aday Vedrantais proksimal DNA'ları (ADH-S geni takılı *Agrobacterium* plazmidi taşıyan)

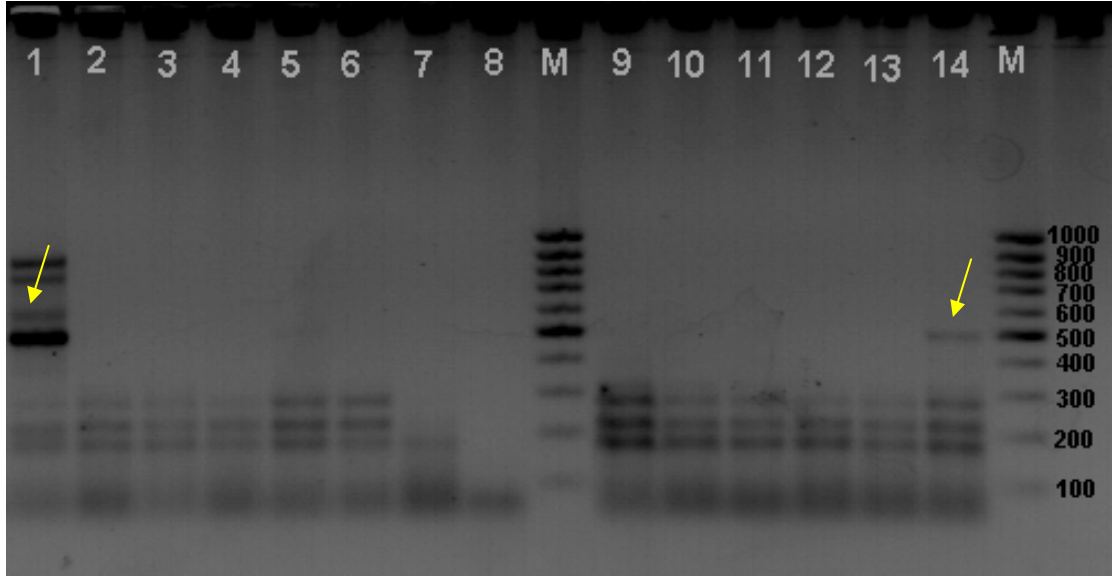
ADH-S antisens geni içeren bakteri suşu ile çalışılmış aday transgenik bitkiler 500 bç uzunluğunda amplifikasyon ürünü vermesi beklenen BAR primeri ile taranmıştır. Elde edilen agaroz jel görüntüsünde 6, 14 ve 15 numaralı bitkilerde istenilen bölgelerde amplifikasyon görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda transformasyon başarısı bu örnekler için (6, 14, 15 numaralı olanlar) doğrulanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.12. ADH-L antisens geni aktarılan bitkilerdeki ADH-L geni DNA'larının PCR profilleri

M: Marker (100 bç), **1:** Pozitif Kontrol (*Agrobacterium tumefaciens* plazmid DNA'sı(ADH-L antisens geni taşıyan), **2:** Negatif kontrol (Vedrantais kotiledon DNA'sı) **3:** Negatif Kontrol-PCR solüsyonu, **4, 5, 6, 7, 8:** Transgenik aday Vedrantais kotiledon DNA'ları (ADH-L antisens geni takılı *Agrobacterium* plazmidini taşıyan), **9:** Negatif Kontrol (Vedrantais proksimal DNA'sı), **10, 11, 12, 13, 14:** Transgenik aday Vedrantais proksimal DNA'ları (ADH-L geni takılı *Agrobacterium* plazmidini taşıyan)

Şekil 4.12'de sunulmuş agaroz jel görüntüsü üzerinde 4, 5, 6, 7 ve 8 rakamlarıyla kodlanmış bölümler gen aktarımının gerçekleştiği düşünülen Vedrantais genotipine ait kotiledon eksplantları; 10, 11, 12, 13, 14, rakamları ise gen aktarımının gerçekleştiği düşünülen proksimal eksplantları göstermektedir. 2 ve 9 numaralı bantlar ise transformasyon yapılmamış Vedrantais genotiplerini göstermektedir. 3 numara ile kodlanmış bölüm ise amplifikasyonunu beklemediğimiz PZR solüsyonunu içeren bölgedir. 1 numaralı bölge ise bu tez çalışmasında kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin ADH-L suşuna ait 366 bç uzunluğundaki DNA bant profilini göstermektedir. 4, 5, 6, 10, 11, 12 ve 14 numaralı örneklerde transformasyon başarısı doğrulanmıştır.



Şekil 4.13. ADH-L antisens genlerinin aktarıldığı bitkilerdeki Bar geni DNA'larının PCR profilleri

M: Marker (100 bp), **1:** Pozitif Kontrol (*Agrobacterium tumefaciens* plazmid DNA'sı(ADH-L antisens geni taşıyan), **2:** Negatif kontrol (Vedrantais kotiledon DNA'sı) **3:** Negatif Kontrol-PCR solüsyonu, **4, 5, 6, 7, 8:** Transgenik aday Vedrantais kotiledon DNA'ları (ADH-L antisens geni takılı *Agrobacterium* plazmidini taşıyan), **9:** Negatif Kontrol (Vedrantais proksimal DNA'sı), **10, 11, 12, 13, 14:** Transgenik aday Vedrantais proksimal DNA'ları (ADH-L geni takılı *Agrobacterium* plazmidini taşıyan)

ADH-L bakteri suşu ile çalışılmış aynı aday transgenik bitkiler 500 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü vermesi beklenen BAR primeri ile taranmıştır . Elde edilen agaroz jel görüntüsünde 14 numaralı bitkide beklenen DNA bant profili gözlenmiştir. 14 numara ile gösterilen bu örnekte transformasyon başarısı doğrulanmıştır (Şekil 4.13).

4.2. Tartışma

Rejenerasyon ve transformasyon esnasında Ayub ve ark., (1996) geliştirdikleri protokol modifiye edilerek kullanılmıştır. Araştırmacılar 2.2 µM BAP ve 0.5 µM NAA, hormon konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda rejenerasyon esnasında aynı hormon konsantrasyonları kullanılmış buna ek olarak besi yerlerine 1 g/l MES ve 200 µM asetosiringon eklenerek sürgün gelişimleri arttırılmıştır. *Amarillo canario* çeşidinin gerçek yapraklarının eksplant olarak kullanıldığı ve 200 µM asetosiringon kokültüvasyon ortamına ilave edildiğinde veya hem bakteri çoğaltma ortamında hem de kokültüvasyon süresi boyunca ortama eklendiğinde ya da asetosiringon eklenmediğinde elde ettikleri transformasyon oranının sırasıyla % 0.7, % 13 ve % 0 olduğunu bildirmektedirler (Bordas ve ark., 1997). Transformasyon çalışmaları esnasında asetosiringon kullanılmasının transformasyon etkinliğini arttırdığı çoğu araştırmacı tarafından da saptanmıştır.

Aday transgeniklerin moleküler analizinde PCR yöntemi kullanılmıştır. PCR'da pozitif kontrol grubu olarak istenilen geni içeren rekombinant plazmid kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak ise hem herhangi bir muamele uygulanmayan bitki DNA'sı hem de PCR solüsyonu (herhangi bir DNA içermeyen) kullanılmıştır. Şekil 4.10'deki görüntü ADH-S antisens geninin transformasyon çalışması ürünlerinin PCR'na ait görüntü olup, pozitif kontrol grubunda normal olarak primer amplifiye bölgesi olan 369 bp uzunluğunda DNA bant profili elde edilmiştir. Beklenildiği üzere negatif kontrol grubunda herhangi bir DNA bant profili gözlenmemiştir. Ayrıca negatif kontrol grubu olarak kullanılan PCR solüsyonunda da bant gözlenmemesi PCR çalışmasında kullanılan malzeme ve kimyasallardan veya bireyden kaynaklanan herhangi bir kontaminasyonun söz konusu olmadığını göstermiştir. Aday transgeniklerden 4, 5, 6, 7, 14 ve 15 numaralı örneklerde istenilen DNA bandı elde edilirken 8, 10, 11, 12 ve 13 numaralı örneklerde herhangi bir DNA bandı gözlenmemiştir. Buna karşın Şekil 4.11'deki aynı örnekler ile yapılan BAR geni taramasında görüldüğü üzere 6, 14 ve 15 numaralı örneklerde primer amplifiye bölgesi olan 500 bp uzunluğunda DNA bantları elde edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ise 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12 ve 13 numaralı örneklerde transformasyonun başarılı olmadığı sonucuna varılırken 6, 14 ve 15 numaralı örneklerde

transformasyonun başarısı doğrulanmıştır. BAR geni taramalarında ise 4, 5 ve 7 numaralı örneklerde DNA bandı gözlenmemesinin nedeni olarak transformasyon esnasında T-DNA'nın sol kolunda yer alan BAR geninde kırılma olabileceği ve bundan kaynaklı olarak uygun primer bağlanmasının gerçekleşmediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca PCR agaroz jel profilinde primer artığı veya RNA fazlalığı olan bant benzeri yapılar gözlenmiştir. Bu yapılar RNA fazlalığı ise RNaz'ın yeterince çalışmadığı ve bundan dolayı DNA'nın yeterince saf olmadığı düşünülmüştür. DNA'nın yeterince saf olmadığı durumlarda primerler RNA'ya da bağlanabileceklerinden dolayı istenilen gen amplifikasyonu primer yetersizliğinden dolayı gerçekleşmeyecektir. Buna bağlı olarak BAR geni taramasında istenilen DNA bantlarının gözlenememiş olabileceği de düşünülmüştür. BAR geni taraması sonucunda istenilmeyen yerlerde bant gözlenmesinin nedeni olarak Tm sıcaklığına bağlı olarak spesifik olmayan bağlanmaların olabileceği düşünülmüştür. Benzer sonuçlar ADH-L antisens geninin transformasyonu sonucunda elde edilen ürünlerin PZR sonuçlarında da gözlenmiştir. Buna göre Şekil 4.12, ADH-L antisens geninin transformasyonu sonucu elde edilen bitkilerden izole edilen DNA'ların uygun primer taraması sonucunun göstergesi olup 4, 5, 6, 10, 11, 12 ve 14 numaraları örneklerde primer amplifiye bölgesi olan 366 bp uzunluğunda DNA bandı gözlenirken, 7, 8, 9 ve 13 numaralı örneklerde istenilen bant gözlenmemiştir. 7 ve 8 numaralı örnekler de diğer örnekler ile kıyaslandığında hiç DNA bandı görülmemesinin nedeni olarak ayrıca pipetleme hatası olabileceği de düşünülmüştür. Dolayısı ile bant gözlenmeyen bu örneklerde transformasyonun başarılı olmadığı sonucuna varılmıştır. Aynı örneklerin BAR geni için yapılan taramaları sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü Şekil 4.13'deki gibi olup yalnızca 14 numaralı örnekte istenilen DNA bandı gözlenmiştir. 4, 5, 6, 10, 11 ve 12 numaralı örneklerde DNA bandı gözlenmemesinin nedeni olarak transformasyon esnasında T-DNA'nın sol kolunda yer alan BAR geninde kırılma olabileceği ve bundan kaynaklı olarak uygun primer bağlanmasının gerçekleşmediği veya DNA'nın yeterince saf olmayıp uygun primer bağlanmasının gerçekleşmediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca istenilmeyen yerlerde DNA bandı gözlenmesinin nedeni olarak da yine aynı şekilde spesifik olmayan bağlanmalar olabileceği düşünülmüştür.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Charentais kantaloop kavunu (*Cucumis melo L., var cantalupensis Naud*) çok iyi aromatik özelliği ve tadı ile karakterize edilmektedir. Raf ömrü oldukça kısadır. Bu sebeple ıslahçılar çalışmalarını raf ömrünün uzatılması, verimin arttırılması, bir örneklilik ve zararlılara dayanıklılık karakterlerinin kazandırılması yönünde yoğunlaştırmışlardır. Bu tür karakterlerin kazandırılması da aynı zamanda meyve tadının kaybolmasına neden olmuştur. Etilen üretiminin baskılanması, *Charentais* kantaloop kavunundaki aroma maddelerinin kuvvetli bir şekilde engellenmesi ile sonuçlanmıştır

Charentais kantaloop kavunundaki aroma maddeleri; esterler, doymuş ve doymamış aldehytler, alkoller ve sülfür bulunduran molekülleri içeren kompleks yapılardan oluşmaktadır. Bu moleküller arasındaki uçucu esterler miktar olarak önemli ve aroma konusunda anahtar rolü oynayan bir moleküldür. Kavunun aromatik kompozisyonu hakkında tam bir bilgiye sahip olunsa da, metabolik reaksiyonlarda rol oynayan enzimlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu hakkında çok az veri bulunmaktadır

Bu tez çalışmasında kavunda aroma sentezinden sorumlu olan ADH genleri, ticari rekombinant RNAi pFGC5941 plasmidi içeren *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla Vedrantaıs kavun genotipine aktarılmıştır.

Transformasyon çalışması için uygun rejenerasyon ortamı Ayub ve ark., (1996)'nın rejenerasyon protokolü modifiye edilerek, 4.4 gr/l MS Bazal ortamı, 30 g/l sukroz, 1 g/l MES, 2.2 µM BAP, 0.5 µM NAA, 8.0 g/l agar olarak belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular ışığında ileride yapılması gereken çalışmalardan bazıları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1. Rejenerasyon ve transformasyon kapasitesi, farklı hormon ve hormon konsantrasyonları denenerek araştırılmalıdır.

2. Transgenik olduğu tespit edilen bitkilerin sera koşullarına adaptasyonu sağlanmalı, Basta herbisiti uygulaması yapılmalı ve transgenik kavun hatları elde edilmelidir.

Transgenik bitkilere aktarılan ADH antisens genlerinin Real-Time (eş zamanlı) PZR ile ifadelerinin ne kadar baskılandığına bakılmalıdır.

3. Elde edilen transgenik kavun hatlarından elde edilecek meyvelerden aroma analizleri yapılmalıdır.

4. ADH gen ailesinin susturulmasıyla kavunda aromanın nasıl değiştiği buna bağlı olarak da aromanın muhafaza ve raf ömrü arasındaki ilişki araştırılmalıdır.

5. Bu çalışma kavunda raf ömrünün ve muhafaza süresinin uzatılmasına yönelik diğer derim sonrası biyoteknolojisi çalışmalarına ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- ABAK, K., DUMAS de VAULX, R., 1980.** *In Vitro* Callus and Shoot Induction from Hypocotyl and Peduncle of Muskmelon (*Cucumis melo*). Cucurbit Genetic Cooperative Rep., 3: 27-28.
- AHARONI, A., KEIZER, L.C.P., BOUWMEESTER, H.J., SUN, Z., ALVAREZ-HUERTA, M., VERHOEVEN, H.A., BLAAS, J., VANHOUEWELINGEN, A.M.M.L., DEVOS, R.C.H., VANDERVOET, H., JANSEN, R.C., GUIJIS, M., MOL, J., DAVIS, R.W., SCHENA, M., VANTUNEN, A.J. and O'CONNEL, A.P., 2000.** Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays, *Plant Cell* 12 (2000), pp. 647–661.
- ANONİM, 2006.** E-cadherin Genini RNAi ile Sustumak. www.genbilim.com
- ANONİM, 2007.** siRNA ve İşlevsel Genomik Uygulamalar. www.gmbae.tubitak.gov.tr/tur/populer/.
- ANONİM, 2008,** Vedrantaıs, <http://www.amazon.com/Vedrantaıs-Charentais-Melon-Seeds-ADDITIONAL/dp/B000WJBREW>.
- AYUB, R., GUIJIS, M., BEN AMOR, M., GILLOT, L., ROUSTAN, J.P., LATCHE', A., BOUZAYEN, M., PECH, J.C., 1996.** Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat Biotech* 14:862–866.
- BAULCOMBE, D., 2004.** RNA Silencing in Plants. *Nature* 431: 356–363.
- BAUMBERGER, N., BAULCOMBE, D. C., 2005.** *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that Selectively Recruits microRNAs and Short Interfering RNAs. *Proceedings of National Academy of Science of USA* 102: 11928–11933.
- BEEKWILDER J., ALVAREZ-HUERTA, M., NEEF, E., VERSTAPPEN, F.W., BOUWMEESTER, H.J. and AHARONI, A., 2004.** Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana, *Plant Physiol.* 135 pp. 1865–1878.

- BERNSTEIN, E., CAUDY, A.A., HAMMOND, S.M., HANNON, G.J., 2001.** Role for a Bidentate Ribonuclease in the Initiation Step of RNA Interference. *Nature* 409: 363–366.
- BORDAS, M., MONTESINOS, C., DABUZA, M., SALVADOR, A., ROIG, A.L., SERRANO, R., MORENO, V., 1997.** Transfer of the Yeast Salt Tolerance Gene *HAL1 Cucumis melo* L. *In vitro* Evaluation of Salt Tolerance Transgenic Research., 6: 41-45.
- CARTHEW, R.W. 2001.** Gene Silencing by Double-Stranded RNA. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 244–248.
- CHUANG, C.F., MEYEROWITZ, E.M., 2000.** Specific and Heritable Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 4985–4990.
- COLIJN-HOOYMANS, C.M., HAKKERT, J. C., JANSEN, J., CUSTER, J. B. M., 1994.** Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific development stages. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 39, p.211-217.
- COMPTON, M.E., GRAY, D.J., ELMSTROM, G.W., 1993.** A Simple Protocol for Micropropagating Diploid and Tetraploid Watermelon Using Shoot-Tip Explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 211-217.
- ÇETİNER, S., 1993.** Hastalıklara Dayanıklı Bitki Islahında Genetik Mühendisliği. *Doğa Tr.J.of.Agriculture and Forestry*. 17, 1121-1131.
- ÇÜRÜK, S., ELMAN, C., SCHLARMAN, E., SAGEE, O., ÇETİNER, S., GRAY, D.J., GABA, V., 1998.** Direct Shoot Regeneration From the Top of the Hypocotyl of Melon is Distinct From Direct Regeneration From Melon Cotyledons.
- ÇÜRÜK, S., 1999.** Bazı Kavun (*Cucumis melo* L.) Çeşitlerinde *In vitro* Rejenerasyon ve Genetik Transformasyon Üzerine Araştırmalar. *Ç.Ü.Fen Bilimleri Enstit. Doktora Tezi, Adana, 271s.*

- DE LA RIVA, G.A., GONZALES-CABRERA, J., VAZQUEZ-PADRON, R., AYRA-PARDO, C., 1998.** *Agrobacterium* : a Natural Tool for Plant Transformation. *Elect. J. Biotech.*, 1: 2-16.
- DIRKS, R., VAN BUGGENUM, M., 1989.** In Vitro Plant Regeneration from Leaf and Cotyledon Explant of *Cucumis melo* L.
- EL-SHARKAWY, I., MANRIQUEZ, D., FLORES, F.B., REGAD, F., BOUZAYEN, M., LATCHÉ, A. and PECH, J.C., 2005.** Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Mol. Biol.* 59: 343-360.
- EZURA, H., 1999.** How Biotechnology Can Contribute to Conventional Breeding in Melon *Acta Horticulture*, 492: 135-147.
- FAO, 2006.** <http://www.fao.org>
- FANG, G., GOURMET, R., 1990.** *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation and Regeneration of Muskmelon Plants. *Plant Cell Reports*, v. 9, p. 160-164,
- FANG, G. and GRUMET, R., 1993.** Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the zucchinellow mosaic virus coat protein gene. *Molec. Plant Microbe Interact.* 6: 358-367,
- FASSULIOTIS, G., 1990.** Somaclonal Variants of Muskmelon Regenerated from Cotyledon. *Acta Horticulture*, 287:163-169.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER S. E., MELLO, C.C. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.*; **391**:806–11.
- FLORES, F., BEN AMOR, M., JONES, B., PECH, J.C., BOUZAYEN, M., LATCHÉ, A., ROMOJARO, F., 2001.** The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in cantaloupe melons. *Physiol Plant* 113: 128–133

- FLORES, F., EL YAHYAOU, F., BILLERBECK, G., ROMOJARO, F., LATCHÉ, A., BOUZAYEN, M., PECH, J.C., AMBID, C. 2002.** "Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons" *J. Exp. Bot.* 53: 201-206
- GABA, V., SCHLARMAN, E., ELMAN, C., SAGEE, O., WATAD, A. A., GRAY, D.J., 1999.** *Biology-Plant*, 35, 1-7. In *Vitro Studies on the Anatomy and Morphology of Bud Rejuvenation in Melon Cotyledons. In Vitro Cellular and Developmental*
- GAMBLEY, R.L., DODD, W.A., 1990.** An *In Vitro* Technique for the Production de Novo of Multiple in Cotyledon Explants of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20: 177-183.
- GONSALVES, C., XUE, B., YEPES, M., FUCHS, M., LING, K., NAMBA, S., CHEE, P., SLINGTOM, J.L., GONSALVES, D., 1994.** Transferring Cucumber Mosaic Virus- White Leaf strain Coat protein Gene into *Cucumis melo* L. and Evaluating Transgenic Plants for Protection Against Infections. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119(2):345-355.
- GUIS, M., AMOR, M.B., LATCHE, PECH, J.C., ROUSTAIN, J.P., 2000.** A Reliable System for the Transformation of Cantaloupe Charentais Melon (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) Leading to a Majority of Diploid Rejuvenants. *Scientia Horticulturae*, 84(1/2): 91-99.
- GUPTA, S., SCHOER, R.A., EGAN, J.E., 2004.** Inducible, Reversible, and Stable RNA Interference in Mammalian Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 1927-32.
- GÜNAY, A. 1993.** *Vegetable production V. A.Ü. Ziraat Fak. Ankara.* 117 s.
- GÜRDİLEK, R., 2006.** Nobel Ödülleri. *Bilim ve Teknik Dergisi.* Kasım 2006, 12-13.
- HAMMOND, S.M., BERNSTEIN, E., BEACH, D., HANNON, G.J., 2000.** An RNA-Directed Nuclease Mediates Post-Transcriptional Gene Silencing in *Drosophila* Cells. *Nature* 404: 293– 296.

- HAMMOND, S. M., BOETTCHER, S., CAUDY, A.A., KOBAYASHI, R., and HANNON, G.J., 2001.** Argonaute, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293,1146-1150.
- HANNON, G.J. 2002.** RNA interference. *Nature*. 2002;418:244–51.
- HOFFMANN, T., KALINOWSKI, G., SCHWAB, W., 2006.** RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *The Plant Journal*, 48: 818–826.
- JEFFREY, C. 1980.** A Review of Cucurbitaceae. *J. Linn. Soc., Bot.* 81: 233-247.
- KARABOZ, İ., ÇOLAK, C., 2007.** Antisens Teknolojisi Orta On-Line Mikrobiyoloji Dergisi Yıl: 2007 Cilt: 05 Sayı: 2 Sayfa: 14-37 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070203.pdf.
- KATHAL, R., BHATNAGAR, S., BHOJWANI, S.S., 1988.** Regeneration of Plants From Leaf Explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. *Plant Cell Rep.*, 7:449-451.
- KARAKURT, Y., ÖZDAMAR ÜNLÜ, H., ÜNLÜ, H., 2007.** Bitkiler RNAi' nin Çalışma mekanizması ve Kullanım Alanları, *Alatarım*, 6(1):39-46.
- KIRKBRIDE, J.H., 1993.** *Biosystematics monograph of the genus Cucumis(Cucurbitaceae)*. Botanical Identification of Cucumbers and Melon. Parkway Publisher Inc., Bone, North Carolina.
- LESHEM, B., SHALEY, D.P., IZHAR, S., 1988.** Cytokinin as an Inducer of Vitrification in Melon . *Annals of Botany*, 61: 255 - 260.
- LESHEM, B., 1989.** Polarity and Responsive Reagions for Regeneration in the Cultured Melon Cotyledon . *J. Plant Physiol.*, 135:237-239.
- LEESMANS, 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.
- MANRIQUEZ, D., EL-SHARKAWY, I., FLORES, F.B., REGAD, F., BOUZAYEN, M., LATCHÉ, A., PECH, J.C., 2006.** Fruit-specific gene expression and biochemical characteristics of two highly

divergent alcohol dehydrogenases of melon . *Plant Mol. Biol* 61:675-685

- MARTIN, B, 2003.** Blokage of Stylet Tips as Mechanizm of Resistance to Virus Transmission by *Aphis gossypii* in Melon Bearing the Vat gene, *Annals of Applied Biology* Volume 142, Number 2, 1, 245-250 (6)
- MOREL, J.B., GODON, C., MOURRAIN, P., BECLIN, C., BOUTET, S., FEUERBACH, F., PROUX, F., VAUCHERET, H., 2002.** Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (ago1) Mutants Impaired in Post Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance. *Plant Cell*. 14: 629–639.
- MORENO, V., GARCIA-SOGO, M., GRANELL, I., GARCIA-SOGO, B., and ROIG, L.A., 1985.** Plant Regeneration from Cali of Melon (*Cucumis melo* L.,cv.'Amarillo Oro'). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 5: 139-146.
- MUNGER, H.M. and R.W. ROBINSON, 1991.** Nomenclature of *Cucumis melo* L. *Cucurbit Genetics Cooperative*, 14: 43 - 44.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue Culture.*Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- NIEDZ, R.P., SHITH, S.S., DUNBAR, K.B., STEPHENS, C.T., MURAKISHI, H.H., 1989.** Factors Influencing Shoot Regeneration from Cotyledonary Eksplants of *Cucumis melo* .*Plant Cell, Tissue and Organ Culture* , 18:313-319
- NORA FABIANA R., PETRES, JOSE, A., SCHUCH, MARCIA, W., LUCCHETTA., LUCIANO., MARINI, LEONOR, SILVA, JORGE A., ROMBALDI, CESAR, V., 2001.** Melon Regeneration And Transformation Using An Apple ACC Oxidase Antisense Gene. *Rev.Bras. de AGROCIENCIA*, v.7 n 3, p.201-204, set-dez, 2
- ORIDATE, T., OOSAWA, K. 1986.** Somatic embryogenesis and plant generation from suspension callus culture in melon (*Cucumis melo* L.). *Japan. J.Breed.* 36: 424 - 428.

- ORTS, M.C., GARICA-SOGO, ROCHE, M.V., ROIG, L.A., MORENO,V., 1987.** Morphogenetic Response of Cali Derived From Primary Eksplant of Diverse Cultivars of Melon. *HortScience*, 22(4): 666.
- ÖZCAN, S., ÖZGEN, M., 1996.** Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükrem Dergisi*, 1: 69-65.
- ORZAEZ, D., MIRABEL, S., WIELAND, W.H. and GRANELL, A. 2006.** Agroinfiltration of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol.* 140, 3–11.
- PECH, J.C., BERNADAC, A., BOUZAYEN, M., LATCHE, A., DOGIMONT, C., PITRAT, M., 2007.** Melon biotechnology. *In Transgenic crops V (Biotechnology in Agriculture and Forestry)*, (Pua EC, Davey MR, eds), Springer, Berlin-Heidelberg (DE), pp 209 – 240.
- PITRAT, M., HANEL, T.P., HAMMER, K., 2000.** Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. *In N Katzir, H Paris, eds, Cucurbitaceae 2000, Seventh EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. Ma'ale Hahamisha, Israel. Acta Hortic* 510: 29-36.
- QI, Y., DENLI, A.M., HANNON, G.J., 2005.** Biochemical Specialization within Arabidopsis RNA Silencing Pathways. *Molecular Cell.* 19: 421–428.
- QI, Y., HE, X., WANG, X.J., KOHANY, O., JURKA, J. and HANNON, G.J. 2006.** Distinct catalytic and non-catalytic roles of argonaute4 in rna-directed DNA methylation. *Nature* 443: 1008 -1012.
- ROBINSON, R.W., DECKER-WALTERS, D.S., 1997.** Cucurbits. CABI., Wallingford, UK.ISNB:0 85199 1335.
- SARI, N., SOLMAZ, İ., ÜNLÜ, H., 2008.** Dihaploidizasyon Yöntemiyle Geliştirilen Hibrit Kavun Genotiplerinin Cam Sera Koşullarında Verim ve Bazı Agronomik Özelliklerinin Saptanması. *Alatarım* 2008, 7 (1): 21-28.
- SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., 1983.** The Plasmids as Natural and as Practical Gene Vectors for Plants. *Bio/Technol.*, 1:75.

- ŞENSOY, S., TÜRKMEN, O., KABAY, T., ERDİNÇ, C., TURAN, M. ve YILDIZ, M., 2005.** Determination of Salinity Tolerance Levels of Melon Genotypes Collected from Lake Van Basin, *Journal of Biological Sciences* 5(5), 637-642.
- TANER K.Y., YANMAZ R., YAZAR E., A. ALPER K., 2004.** Kavunda (*Cucumis melo L.*) Farklı Bitki Parçalarında *In Vitro* Oluşumuna Ortamın Şeker ve pH Düzeylerinin Etkileri. *Alatarım*, Cilt 3 Sayı:1 Sayfa: 11.
- TANG, GUILIANG, REINHART, BRENDA J., BARTEL, DAVID P. AND ZAMORE, PHILLIP D. 2003.** A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes and Development*, January, vol. 17, no. 1, p. 49-63.
- ÜNEK, 2008.** Kırkağaç 637 ve Vedrantaıs Kavun Genotiplerine VAT Geninin Aktarılması ve Transformasyon Etkinliklerinin Araştırılması. Çukurova Üniv. Fen Bilimleri Enst. Yüksek lisans Tezi.
- VALLES, M.P. and LASAJ, M., 1994.** Agrobacterium-Mediated Transformation of Commercial Melon (*Cucumis melo L. cv. Amarillo Oro*) *Plant Cell Reports*, 13:145-148.
- VERDEL, A., JIA, S., GERBER, S., SUGIYAMA, T., GYGI, S., GREWAL, S.I. and MOAZED, D. 2004.** Rnai-mediated targeting of heterochromatin by the rits complex. *Science* 303: 672-676.
- WATERHOUSE, P. M., WANG, M. B., LOUGH, T., 2001.** Gene Silencing as An Adaptive Defence Against Viruses. *Nature* 411: 834–842.
- WATERHOUSE, P.M., HELLIWELL, C.A., 2003.** Exploring Plant Genomes by RNA-induced Gene Silencing. *Nature Reviews Genetics* 4: 29–38.
- WESLEY, S.V., HELLIWELL, C.A., SMITH, N.A., WANG, M.B., ROUSE, D.T., LIU, Q., GOODING, P.S., SINGH, S.P., ABBOTT, D., STOUTJESDIJK, P.A., ROBINSON, S.P., GLEAVE, A.P., GREN, A.G., WATERHOUSE, P.M., 2001.** Construct Design for Efficient, Effective and High- Throughput Gene Silencing in Plants. *Plant Journal*, 27: 581–590.

- WHITAKER, T.W., DAVIS, G.N., 1962.** *CUCURBITS*: Botany, Cultivation and Utilization, Leonard Hill, London, UK..
- WITZENS, B., BRETTELL, R.I.S., MURRAY, F.R., MCELROY, D., LI, Z. AND DENNIS, E. S., AUS. J. PLANT PHYSIOL., 1998,** 25, 39–44.
- YAHYAOU, F., WONGS-AREE, C., LATCHÉ, A., HACKETT, R., GRIERSON, D. & PECH, J.C., 2002.** Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl transferase involved in the generation of aroma volatiles esters during melon ripening. *Eur. J. Biochem.* 269, 2359 - 2366.
- YALÇIN-MENDİ Y., İPEK M., SERBEST-KOBANER S., ÇÜRÜK S., AKA KAÇAR Y., ÇETİNER S., GABA V., GRUMET R., 2004a.** *Agrobacterium*-Mediated Transformation of ‘Kırkagac 637’ a Recalcitrant Melon (*Cucumis melo* L.) Cultivar with ZYMV Coat Protein Encoding Gene. *Europ. J. Hort. Sci.* 6.
- YALÇIN-MENDİ, Y., İPEK M., SERBEST-KOBANER S., KÜKÜRT E., 2004b.** Kırkağaç 637 Kavun (*Cucumis melo* L.) Çeşidinde Rejenerasyonun Optimizasyonu. *Alatarım*, Cilt 3 sayı:1 Sayfa 33.
- YOKO, A.K., TOMITA, K., EZURA, H., 2003.** Efficient Plant Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via Somatic Embryogenesis in Melon (*Cucumis melo* L.) *Plant Sciences* Volume 166 Issue 3 Pages : 763 – 769.
- 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.
- ZHUKOVSKY, P. 1951.** *Agricultural Structure of Turkey (Anatolia)*. Türkiye Şeker Fab. AŞ. (1951) Yay. No:20. 887 p. (in Turkish).

ÖZGEÇMİŞ

1983 Karabük doğumlu. İlk, orta ve lise öğrenimimi Safranbolu'da 2001 yılında tamamladı. 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Bölümünde lisans eğitime başladı. Lisans dönemimin 7. ders yarıyılında erasmus öğrencisi olarak Macaristan'ın Corvinus Üniversitesi'nde eğitim aldı. 2008 yılında 'Ziraat Mühendisi' ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Ders dönemimi tamamladıktan sonra erasmus staj hareketliliği programını kazandı ve 3 ay süre ile Hollanda'nın Wageningen Üniversitesi'nde staj yaptı. Şu anda Yüksek Lisans programına devam etmekte.

EKLER

Ek.1 BESİ YERLERİ

Ek 1.1. MS (Murashige ve Skoog, 1962) Besi Yeri

MS Bazal besi yerinde bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları aşağıdaki çizelgedeki gibidir (Murashige ve Skoog, 1962).

Makro Elementler	(MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (mg/l)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂	332.2
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	(MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (mg/l)
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	36.72
Vitaminler ve Amino asitler	(MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (mg/l)
Myo-inostol	100.0
Pyridoxine-HCl	50
Nicotinik Asit	50
Thiamin – HCl	10
Glycine	2.0
Diğer	
Sakkaroz (g/l)	30
Agar (g/l)	7
pH	5.7

Ek 1.2. LB (Leuria Bertani) Besi Yeri

a) Sıvı (1 litre için)

10 gr tripton

10 gr NaCl

5 gr Yeast ekstrakt

Yukarıda verilen miktarlar 1 litre için olup, farklı hacimde LB besiyeri hazırlanacaksa bu miktarlar o hacime göre orantılanarak tartılmalıdır. Tartılan kimyasallar manyetik karıştırıcı üzerinde toplam hacimden biraz az saf su ile çözülerek pH'sı 0.1 M NaOH ile 7'ye ayarlanır. Hacim saf su ile tamamlanarak erlene dökülür. Erlenin ağzı alüminyum folya ve streç film ile sıkıca sarılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. Hazırlanan besi yeri oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir.

b) Katı

Hazırlanan sıvı besi yerine % 1.5 w/v agar ilave edilerek otoklavlanır. Otoklav sonrası elle tutulabilecek sıcaklığa (yaklaşık 48 °C) kadar soğuduktan sonra petri kaplarına steril kabin içerisinde paylaştırılır. Donduktan sonra streç filmle sarılarak +4 °C'de muhafaza edilir. Antibiyotik ilave edileceği zaman, son konsantrasyon dikkate alınarak, besi yeri petri kaplarına paylaştırılmadan hemen önce ilave edilerek karıştırılır ve beklemeden paylaşırma yapılır.

Ek 1.3. M1 (Rejenerasyon Ortamı)

4.4 gr/l MS Bazal ortamı,

30 g/l sukroz,

1 g/l MES,

2.2 µM BAP,

0.5 µM NAA,

8.0 g/l agar

Ek 1.4. M2 (Geliştirme ve Seçici Seleksiyon Ortamı)

M1 ile birlikte,

750 mg/l sefuroksim sodyum

Ek 1.5. MSG (Sürgün Geliştirme Ortamı)

4.4 gr/l MS Bazal ortamı,

30 g/l sukroz,

1 g/l MES,

1 µM BAP

0.2 µM GA₃

750 mg/l sefuroksim sodyum

Ek 2. SOLÜSYONLAR

Ek 2.1. Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol (25:24:1)

Stok fenolden bir pipet yardımıyla dikkatlice 25 ml çekilir. Üzerine 24 ml kloroform ve 1 ml izoamil alkol ilave edilerek toplam hacim 50 ml'ye tamamlanır. Kullanmadan önce iyice çalkalanarak homojenize edilmelidir. İçinde bulunduğu şişe alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmalı ve +4 °C'de saklanmalıdır. Kullanım süresi 1 ayı geçmemelidir.

Ek 2.2. TE Solüsyonu

10 mM Tris (pH 8.0)

0.1 M EDTA (pH 8.0)

Hazırlanacak hacim için gerekli Tris ve EDTA hesaplanarak stokdan alınır ve saf su ile istenilen hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra kullanılır.

Ek 2.3. 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5 M olacak şekilde Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözülür, pH'sı NaOH ile 8.0'a ayarlanarak saf su ile hacme tamamlanır. 121 °C'de 15

dk otoklav yapılarak +4 °C'de saklanır

Ek 2.4. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5 M olacak şekilde EDTA tartılarak bir miktar suda çözülür, pH'sı NaOH ile 8.0'a ayarlanarak saf su ile hacme tamamlanır. 121 °C'de 15 dk otoklav yapılarak +4 °C'de saklanır.

Ek 2.5. 5X TAE Tamponu

Bir litre için; 24,2 gr Tris baz, 5,71 mL Glasiyel asetik asit, 0.5 M EDTA (pH 8.0) kullanılır. Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre orantılanarak alınır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülerek pH NaOH ile 8.0'a ayarlanarak otoklav yapılır.

Kullanım konsantrasyonu olan 1X yapmak için 1 hacim 5X TAE alınarak üzerine 4 hacim saf su ilave edilir.

EK 3. PROTOKOLLER

Ek 3.1. Agaroz Jel'in Hazırlanması

Belirlenen hacim için gerekli agaroz tartılarak bir erlen içerisine konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TAE tamponu konarak mikrodalga fırında eriyinceye kadar tutulur. Elle tutulacak sıcaklığa kadar (45-50 °C) soğuduktan sonra son konsantrasyonu 0.5 µg/ml stok EtBr solüsyonu ilave edilir. Jel kabına dikkatli bir şekilde dökülerek jel tarağı yerleştirilir ve donması için yaklaşık 40 dakika beklenir. Jel elektroforez tankına alınarak üzeri örtülene kadar 1X TAE tamponu ilave edilir. Tarak çıkarılarak oluşan kuyulara DNA örneği yerleştirilir.