

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tolga İZGÜ

**KAVUN' DA (*Cucumis melo* L., var *cantalupensis* Naud) AROMA
SENTEZİNDEN SORUMLU Cm-AAT GENLERİNİN (1, 3 ve 4)
TRANSFORMASYON ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAVUN' DA (*Cucumis melo L., var cantalupensis Naud*) AROMA
SENTEZİNDEN SORUMLU Cm-AAT GENLERİNİN (1, 3 ve 4)
TRANSFORMASYON ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

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

.....
Doç. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR Doç. Dr. Nihal BUZKAN
Danışman Üye Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Ç.Ü.Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: ZF2009YL35

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-AAT GENLERİNİN (1, 3 ve 4)
TRANSFORMASYON ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tolga İZGÜ

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

Danışman : Doç.Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Yıl : 2010, Sayfa : 84
Jüri : Doç.Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Doç.Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Doç.Dr. Nihal BUZKAN

Yapılan bu çalışma ile kavunda aroma sentezinden sorumlu (*Cucumis melo* L., var *cantalupensis* Naud) olan Cm-AAT genlerinin antisensleri *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla Vedrantaıs kavun çeşidine aktarılmıştır. *Escherichia coli* (DH5 α)' den *Agrobacterium tumefaciens*' e aktarılmış ticari rekombinant RNAi - pFGC5941 plazmidi kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda transformasyonda kullanılan 1200 tohumdan AAT1 geni için 60 aday transgenik bitki, AAT3 geni için 39 aday transgenik bitki, AAT 4 geni için ise 28 adet aday transgenik bitki PCR analizleriyle doğrulanmıştır. Yapılan analizler sonucunda transformasyon etkinlik oranları AAT1 antisens geni için %2,5, AAT3 antisens geni için %1,7 ve AAT4 antisens geni için %1,25 bulunmuştur. Transformasyonlar sonrasında kavun genotipine ait tohumların kotiledon ve proksimal kısımları kültüre alınmış ve bu eksplantlardan elde edilen rejenerantlar her üç gen içinde proksimal eksplantlarda istatistiksel olarak daha önemli çıkmıştır. Rejenere olan eksplantların sürgüne dönüşme oranları incelendiğinde ise yine her üç gen içinde proksimal eksplantlardan daha fazla sürgün elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Agrobacterium tumefaciens*, RNAi, *Cucumis melo*, Cm-AAT, transformasyon

ABSTRACT

MSc. THESIS

**RESEARCH of TRANSFORMATION EFFICIENTS of Cm-AAT GENES
(1, 3 ve 4) RESPONSIBLE for AROMA SYNTHESIS in MELON (*Cucumis
melo L., var cantalupensis Naud*)**

Tolga İZGÜ

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

Supervisor : Assoc. Prof. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Year : 2010, Page : 84
Jury : Assoc. Prof. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Assoc. Prof. Yıldız AKA KAÇAR
Assoc. Prof. Nihal BUZKAN

In this research, Cm-AAT antisense genes responsible for synthesis of aroma volatiles in melon (*Cucumis melo L., var cantalupensis Naud*) were transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. Commercial recombinant RNAi - pFGC5941 plasmid transformed from *Escherichia coli* (DH5 α) to *Agrobacterium tumefaciens*, was used.

Based on the results, from the 1200 seeds used in the thesis 60 putative transgenic plants for AAT 1 gene, 39 putative transgenic plants for AAT3, 28 putative transgenic plants for AAT4 were obtained. These results were confirmed by PCR analysis. Transformation efficiency of antisens genes was found %2,5 for AAT1, %1,7 for AAT3 and %1,25 for AAT4 Cotyledone and proximal explants from the seeds were cultured on the selective medium. Proximal explants gave better results in view of regeneration and shoot rates for all genes. These results were confirmed by statistical analysis.

Key Words: *Agrobacterium tumefaciens*, RNAi, *Cucumis melo*, Cm-AAT, transformation,

TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarım esnasında Moleküler Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndaki her türlü imkanları sağlayan, her zaman desteğini gördüğüm hocam sayın Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmamda kullandığım genlerin ve kavun tohumlarının temininde yardımcı olan Prof. Dr. Jean Claude PECH'e ve Dr. Islam EL-SHARKAWY teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında desteklerini gördüğüm dostlarım, yakın çalışma arkadaşlarım, Biyolog Özhan ŞİMŞEK, Biyolog Melda BONCUK, Biyolog Fatma ASLAN, Ziraat Yüksek Mühendisi Esra KOCAMAN, Biyolog Esra BOZ, Biyolog Ali COŞKUN, Ziraat Mühendisi Pınar ORUÇ, Biyolog Kübra KENDİRLİ, Biyolog Dicle DÖNMEZ, Biyolog Ceren ÜNEK, Ziraat Mühendisi Metin KOÇAK, Biyolog Dilek TEKDAL, Ziraat Yüksek Mühendisi Pembe ÇÜRÜK'e, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Lisans öğrencileri Sinem KALFA ve Gülbeyaz DERİN'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan en değerli varlığım aileme, çalışmam boyunca gösterdikleri destek için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Rejenerasyon ve Transformasyonda Kullanılan Bitki Materyalleri .	23
3.1.1.1. Vedrantaïs (<i>Cucumis melo L. var cantalupensis</i> Naud).....	23
3.1.2. Transformasyonda Kullanılan Plazmid ve Bakteri İrkaları.....	23
3.2. Metod.....	26
3.2.1. Doku Kültürü Koşulları.....	26
3.2.2. Rejenerasyon ve Transformasyon Denemeleri için Sterilizasyon Uygulamaları.....	27
3.2.3. Tohumların <i>In vitro</i> Ortamda Çimlendirilmesi.....	28
3.2.4. <i>In vitro</i> Rejenerasyon ve Transformasyon Besi Yeri (M1 Ortamı)...	28
3.2.5. <i>In vitro</i> Rejenerasyon Besi Yeri (M2 Ortamı).....	29
3.2.6. <i>In vitro</i> Sürgün Geliştirme Besi Yeri (M3 Ortamı).....	29
3.2.7. Transformasyon Çalışmaları.....	29
3.2.7.1. Transformasyonda Kullanılan Bakteri Çözeltilisinin Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	29
3.2.7.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ve İnokülasyon Solüsyonunun Hazırlanması.....	30
3.2.7.3. Proksimal ve Kotiledon Eksplantların <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> ile İnokülasyonu ve Rejenerasyon.....	31

3.2.8. Moleküler Uygulamalar	32
3.2.8.1. DNA İzolasyonu.....	32
3.2.8.1.(1). DNA İzolasyon Aşamaları.....	33
3.2.8.2. DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi.....	35
3.2.8.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pFGC5941-CmAAT (1, 3 ve 4) Ticari Rekombinant Bakterisinde Plazmid DNA İzolasyonu ...	35
3.2.8.4. PCR Protokolünün Optimizasyonu ve Uygulanması	36
3.2.8.5. Elektroforez Koşulları	37
3.2.8.6. İstatistik Analizler ve Sonuçların Değerlendirilmesi	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. BULGULAR.....	39
4.1.1. Tohumların Sterilizasyonu	39
4.1.2. Tohumların Çimlendirilmesi	39
4.1.3. Rejenerasyon Ortamının Optimizasyonu	39
4.1.4. Transformasyon ve Rejenerasyon Çalışmaları.....	39
4.1.4.1. Cm-AAT1 Antisens Geni İçin Transformasyon ve Rejenerasyon Denemesi Bulguları.....	39
4.1.4.2. Cm-AAT3 Antisens Geni için Transformasyon ve Rejenerasyon Denemesi Bulguları.....	41
4.1.4.3. Cm-AAT4 Antisens Geni için Transformasyon ve Rejenerasyon Denemesi Bulguları.....	42
4.1.5. Moleküler Çalışmalar	49
4.1.5.1. DNA İzolasyonu.....	49
4.1.5.2. Cm-AAT1 Antisens Geni PCR Bulguları.....	54
4.1.5.3. Cm-AAT3 Antisens Geni PCR Bulguları.....	57
4.1.5.4. AAT4 Antisens Geni PCR Bulguları	60
4.2. TARTIŞMA	63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ	79
EKLER.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik Asit
BAP	: 6-Benzylamino Purin
BAR	: BASTA
bç	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
CTAB	: Cetyltrimethylamoniumbromide
DNA	: Deoksiribonükleik asit
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
NptII	: Neomycin fosfotransferaz (Kanamaycine)
O.D.	: Optik Yoğunluk

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R.O.	: Replikasyon Orijini
Rpm	: revolution per minute
RNAi	: Ribonükleik asit interferans
RNAaz	: Ribonükleaz
siRNA	: Küçük interferans Ribonükleik asit
TAE	: Tris/ acetate/ EDTA (Buffer)
TE	: Tris-EDTA
UV	: Mor ötesi
V	: Volt
μ M	: Mikromolar
μ l	: Mikrolitre
v/v	: Hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. <i>Agrobacterium</i> bakterisinde bulunan plazmid DNA' nın özellikleri	25
Çizelge 3.2. MS Bazal besi yerinde bulunan mineral maddeleri ve konsantrasyonları.	27
Çizelge 3.3. <i>In vitro</i> 'da kullanılan ortamlar ve içerikleri.....	29
Çizelge 3.4. LB bakteri besi ortamı içeriği	31
Çizelge 3.5. DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği	33
Çizelge 3.6. PCR'de kullanılan primer setleri.....	36
Çizelge 3.7. PCR reaksiyonlarında uygulanan protokol.....	37
Çizelge 3.8. PCR döngü koşulları.....	37
Çizelge 4.1. Cm-AAT (1, 3 ve 4) genleri için eksplantlardan elde edilen sürgün, kallus ve rejenerasyonların ortalama değerleri.....	44
Çizelge 4.2. AAT1 aday transgenik bitkilerden elde edilen DNA'ların miktar ve kaliteleri.....	50
Çizelge 4.3. AAT3 aday transgenik bitkilerden elde edilen DNA'ların miktar ve kaliteleri	51
Çizelge 4.4. AAT4 aday transgenik bitkilerden elde edilen DNA'ların miktar ve kaliteleri	53

- 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 endogenik 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) 8
- Şekil 3.1. *Escherichia coli* (DH5α)'den *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılmış ticari rekombinant RNAi - pFGC5941 plazmidi 24
- Şekil 3.2. (A) Pens ile tohum kabuklarının çıkarılması; (B) Yüzey 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..... 28
- Şekil 3.3. (A) Öze yardımı ile katı LB ortamından tek koloni seçimi; (B) Katı LB ortamından seçilen tek koloni *A. tumefaciens*'in sıvı LB ortamına inokülasyonu 30
- Şekil 3.4. A: Proksimal eksplant, B: Kotiledon eksplant 32
- Şekil 3.5. (A) M3 Sürgün ortamındaki aday transgenik bitkiler (B), (C), (D), DNA izolasyonu için bitki örneklerinin alınması 34
- Şekil 3.6. (A) Eksplantların öğütülmesi, (B) Öğütülen eksplantların ependorf tüplerine alınması (C), (D) Ependorf tüplerdeki örneklerin üzerlerine CTAB çözeltisinin eklenmesi 35
- Şekil 3.7. Agaroz Jel Elektroforezde PCR Ürünlerinin Koşulması 38
- Şekil 4.1. AAT1 antisens geni için proksimal ve kotiledon eksplantlardan gelişen rejenerasyon, sürgün ve kallus ortalamaları..... 41

Şekil 4.2. AAT3 antisens geni için proksimal ve kotiledon eksplantlardan gelişen rejenerasyon, sürgün ve kallus ortalamaları.....	42
Şekil 4.3. AAT4 antisens geni için proksimal ve kotiledon eksplantlardan gelişen rejenerasyon, sürgün ve kallus ortalamaları.....	44
Şekil 4.4. A, B: Kotiledon eksplantın rejenerasyon görünümü (7. gün), C, D, E: Kotiledon eksplanttan gelişen sürgünler (15.gün), F: Kotiledon eksplanttan gelişen sürgün (21. gün).....	45
Şekil 4.5. A: Proksimal eksplantların rejenerasyonlarının 7. gündeki görünümleri B, C: Proksimal eksplanttan gelişen sürgünler, D, E: Proksimal eksplantlardan gelişen sürgünlerin 15. günündeki görünümleri, F: Proksimal eksplanttan gelişen sürgünün 21. günündeki görünümü.....	46
Şekil 4.6. A, B: Kotiledon eksplantlardan gelişen organize olmamış yapılar C, D: Proksimal eksplantlardan gelişen organize olmamış yapılar	47
Şekil 4.7. A: M2 rejenerasyon ortamında gelişen proksimal eksplantlar, B: Proksimal eksplanttan gelişen sürgün, C, D, E: M3 sürgün geliştirme ortamında uzayan bitkicikler	48
Şekil 4.8. A, B: Proksimal eksplantın rejenerasyon görünümü (7. gün), C, D, E, F: Proksimal eksplanttan gelişen sürgünler (15.gün),.....	49
Şekil 4.9. Cm-AAT1 antisens geni aktarılan bitkilerdeki CaMV 35S promotor bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Markır (100 bç),P: CaMV 35S promotor bölgesini içeren plazmid DNA'sı(Pozitif kontrol, 195 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-38: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 39-60: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları	55
Şekil 4.10. Cm-AAT1 antisens geni aktarılan bitkilerdeki ekzon/intron bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Markır (100 bç), P: Ekzon/intron bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 454 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-38: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 39-60: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları	56

- Şekil 4.11. Cm-AAT3 antisens geni aktarılan bitkilerdeki CaMV 35S promotor bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Markır (100 bç), P: CaMV 35S promotor bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 195 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-25: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 26-41: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları 58
- Şekil 4.12. Cm-AAT3 antisens geni aktarılan bitkilerdeki ekzon/intron bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Markır (100 bç) P: Ekzon/intron bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 460 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-25: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 26-41: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları 59
- Şekil 4.13. Cm-AAT4 antisens geni aktarılan bitkilerdeki CaMV 35S promotor bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Markır (100 bç), P: CaMV 35S promotor bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 195 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-16: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 17-30: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları 61
- Şekil 4.14. Cm-AAT4 antisens geni aktarılan bitkilerdeki ekzon/intron bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Markır (100 bç), P: Ekzon/intron bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 460 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-16: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 17-30: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları 62

1. GİRİŞ

Kavun Cucurbitaceae familyasının kültüre alınmış en önemli türlerinden birisidir. Ülkemiz, 1 749 935 ton kavun üretimi ile dünyada Çin'den sonra ikinci sırada gelmektedir (Anonim, 2008). Kavunun gen merkezi konusunda kesin bir bilgi olmamakla beraber, Afrika olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber; Türkiye, İran, Hindistan, Afganistan, Çin gibi Asya kıtasında bulunan ülkeler kavunun ikincil gen merkezidir. Özellikle ülkemizde, Doğu Anadolu bölgesinin ve Van yöresinin önemli bir mikro gen merkezi olduğu bildirilmiştir (Robinson ve Decker-Walters, 1997).

Cucumis cinsi içerisinde yer alan kavun, çok fazla çeşitlilik gösteren bir tür olup (Whitaker ve 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* olmak üzere 7 alt gruba ayrılmaktadır (Munger ve Robinson, 1991).

Kavunun 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 ve ark., 2005; Sarı ve Solmaz, 2008).

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.

Cucumis cinsi içerisinde yer alan kavun, besin değeri açısından oldukça önemli bir sebze türüdür. Kavunun içerdiği en önemli besin maddeleri protein (0,6-1,2 mg/100 g), karbonhidrat (6-15 g/100 g), A vitamini (500 IU-4200 IU/ 100 g), C vitamini (6-60 mg/100 g), potasyum (130 mg-330 mg/100 g)'dur (Anonim, 2006).

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. Kavunda muhafaza süresini kısıtlayan en önemli faktörlerden biri yumuşama, unlulaşma 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 gerçekleştiği görülmüş, bunun yanında birçok olgunlaşma süreci etilen tarafından düzenlenirken etilenden bağımsız olduğu durumların da olduğu görülmüştür.

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 rejenere olması ve bunlardan bitki elde edilmesi son derece önemlidir. Farklı genotiplerin ve farklı eksplantların farklı düzeylerde rejenere olduğu kavunda bu konu özellikle dikkat çekecek düzeydedir (Çürük, 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 aktarıma 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 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 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 sınırlandığı 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 antagonisti 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

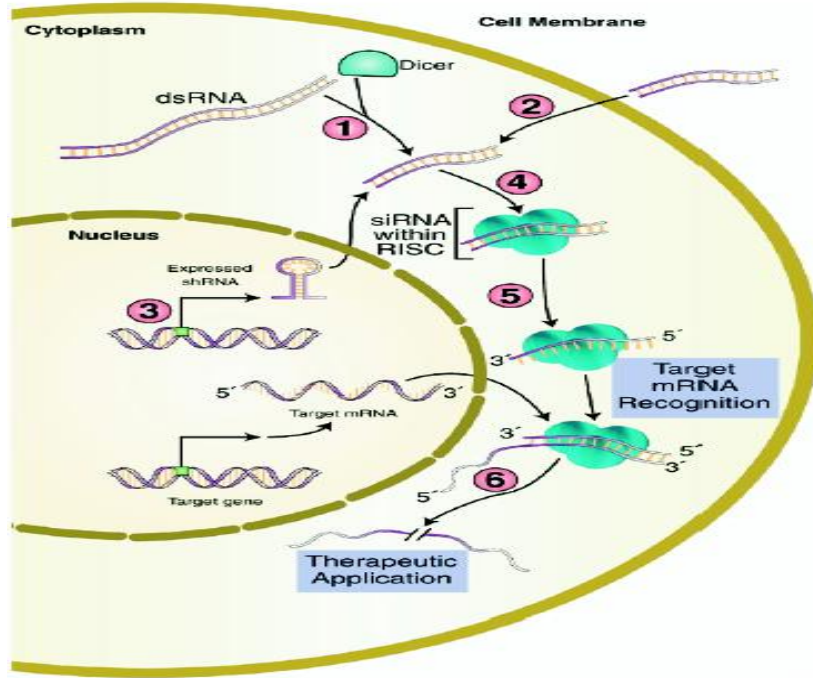
keskin substrat artışları ile ölçülmüştür. Bu çalışmada sunulan bu veriler, çoklu AAT genlerinin kavunda ester formlarının büyük bir çeşitliliği olduğunu göstermektedir (El-Sharkawy ve ark., 2005).

Alkol dehidrogenaz (ADH), aldehitleri alkollere çevirerek ve ester oluşumları için substrat sağlayarak meyvelerde uçucu aroma moleküllerinin sentezine katılmaktadır. Charentais kantalop kavunu (*Cucumis melo* L., var *cantalupensis* Naud)'ndan aminoasit 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 ark., (1998)'de 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 RNAi' lerin 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 oluşturmadığı 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'lerden 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 aroma biyosentezinden sorumlu olan Cm-AAT (alkol açıl transferaz) genlerinin fonksiyonları şimdiye kadar sadece rekombinant mayalardaki gen ifadesiyle açıklanmış, *in vivo*'da kavun meyvelerinde açıklanamamıştır. Spesifik aromatik bölgelerdeki genlerin her birinin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışması kapsamında *A. tumefaciens* aracılığıyla RNAi yapısının oluşturulması ile Vedrantais kavun genotipine Cm-AAT antisens genlerinin aktararak susturulması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Abak ve Dumas de Vaulx, (1980), 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 $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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 morfogenesis 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)'ları 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 sitokin 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 gözleendiği

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 olduğu öne sürülmüştür.

Leshem, (1989) kavun kotiledon yapraklarında organ uyartım zamanı ile organogenesisin olduğu 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 rejenere 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 bulduran ayrıca sürgün apeksine sahip bitkicikleri de 'sürgün' olarak isimlendirmişlerdir.

Fassuliotis, (1990), farklı yazarlara dayanarak gerçek yaprak dokusu (Kathal 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) bitki rejenerasyonunun gerçekleştiğini belirtmekle birlikte, çok az sayıda genotipin *in vitro* koşullarda başarıyla rejenere edilebildiğini (Orts ve ark., 1987) bildirmiştir.

Fang ve Grumet, (1990), 4-5 günlük *in vitro* kavun fidelerinin 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)'da 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 direkt organogenesis yoluyla rejenere olan Galia kavun çeşidinde gözlenen göz (tomurcuk) rejenerasyonunun anatomisi ve morfolojisinin araştırılması 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 bölgesinin 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 olduğu saptanmıştır 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 rejenere olan 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 (2003), yapmış olduğu çalışmada, Vat geni taşıyan kavun hatlarında *A.gossypii* tarafından oluşturulan virus taşınımına 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 anlaşılammıştır. 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.

Yoko ve ark., (2003), Vedranta (*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

Vedrantais ve 148.6 Earl's Favourite Fuyu olarak tespit edilmiştir. İki haftanın sonunda çimlenme oranı sıvı MS ortamlarında %80 (Vedrantais) 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, Vedrantais 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.

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'sı 5.6 olan besi ortamından elde edilmiştir.

Yalçın-Mendi ve ark., (2004 a), yürütmüş oldukları çalışmada 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 abaksial veya adaksial 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.

Çürük ve ark., (2005)'de yaptıkları çalışmada rejenerasyon yetenekleri çok düşük olan Kırkağaç 637 ve Noi Yarok kavun genotiplerinin *A. tumefaciens* aracılığıyla transformasyonunu kotiledon eksplantlarının yara dokularının oluşturulması ve carborundum ile vortekslenmesi sonucu başarıyla gerçekleştirmişlerdir. Ek olarak rejenerasyon seleksiyon ortamına AgNO₃ ilave edilmesiyle transformasyon etkinliği azalmış, eksplantların aday transgenik kalluslara ve rejenerasyon tomurcuklarına dönüşümü az sayıda olmuş ve herhangi bir transgenik sürgün elde edilememiştir. Çalışmada aday transgenik kallusların rejenerasyonundan sonra kimerik transgenik bitkiler seçici ortam içerisinde kanamisin ile seçilmiştir. Transgenik bitkilerin üretimi için ortama koyma işleminden 30-40 gün sonra sürgün ya da tomurcuk eldesi en başarılı dönem olmuştur. Yalnızca carborundum kullanılarak transformasyonu yapılan eksplantlar transgenik kavun sürgünleri vermiştir. Her 18-20 günde bir 50 mg/l kanamisin içeren seçici ortamlarda altkültüre almışlardır. Bu teknikler kavunda ZYMV ve CMV virüsleri için dayanıklı kavun hatlarının elde edilmesindeki ıslah programlarında kullanılmıştır.

Wu ve ark., (2009)'a göre, kavunun dünya genelindeki üretimi ZYMV'den dolayı sıklıkla kısıtlanmaktadır. ZYMV'ye dirençli kavun hatlarının genetik mühendisliği ile üretilmesi için virüsün aktarılamayan bir bölgesi, diğer bölgesinde ise aktarılabilir bir kılıf proteini içeren bir yapısı üretilmiş ve Oryantal kavun genotiplerine *A. tumefaciens* kullanılarak transformasyonları sağlanmıştır. Bu çalışmada geliştirilmiş bir kotiledon kesim tekniği kullanılmıştır. Kotiledonların üst

kısımlarındaki proksimal kısımlarının sonlarından 1 mm'lik kısımlarının çıkarılması transgenik rejenerantların büyük ölçüde artmasına neden olmuştur. Transgenik hatların sera çalışmalarında ZYMV ile bulaştırmış ve dirençlilikleri farklı seviyelerde tespit edilmiştir. Kavun genomunda transgenlerin rastgele yerleşmesi ve yerleşme sayısı southern hibridizasyonu ile belirlenmiştir. Ayrıca northern hibridizasyon çalışmaları ile aktarılmış genlerin ifadelerinin kontrolü gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen transgenik kavun hatları yüksek oranda ZYMV'ye dirençli oldukları tespit edilmiş ve Orta Asya'da ZYMV'nin kontrolü için önemli bir potansiyele sahip oldukları belirtilmiştir.

Kocaman, (2009) yaptığı çalışmada Vedrantais kavun genotipine aroma sentezinden sorumlu olan ADH (Alkol dehidrogenaz) antisens genlerini *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla aktarmıştır. Transformasyon ve rejenerasyon çalışmalarında Vedrantais tohumlarının proksimal ve kotiledon kısımlarını eksplant kaynağı olarak kullanmıştır. Çalışmanın sonucunda proksimal eksplantlardan gelişen rejenerasyon ve sürgün oranları, kotiledon eksplanttan gelişenlere göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Elde edilen aday transgenik bitkilerin kontrolünü PCR ile doğrulamıştır.

3. MATERYAL ve METOD

Tez çalışması 2008-2009 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Rejenerasyon ve Transformasyonda Kullanılan Bitki Materyalleri

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

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

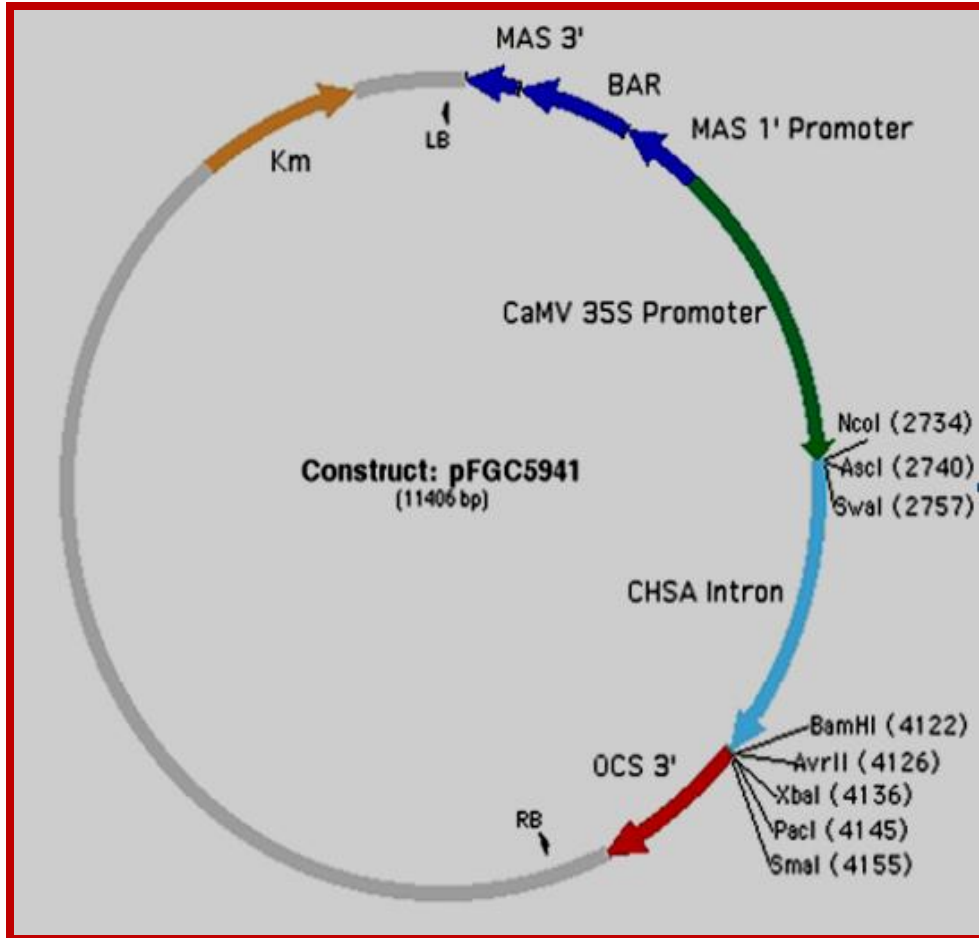
Orijini İtalya olan bu kavun genotipi kantolop grubundandır. Meyve kabuğu tek renk olup, meyve aroması tatlı ve güzel kokuludur (Anonim, 2008).

3.1.2. Transformasyonda Kullanılan Plazmid ve Bakteri Irkları

Transformasyonda *E. coli* (DH5 α) suşu içerisinde *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılan ve Cm-AAT (1, 3 ve 4) antisens genlerini içeren rekombinant RNAi-pFGC5941 ticari plazmidini kullanılmıştır (Şekil 3.1). *Agrobacterium tumefaciens*'in plazmid DNA'sı üzerinde bulunan genler ve özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Çalışmada kullanılan antisens genlerin ve ticari plazmidin DNA dizileri EK.1 ve EK.2' de belirtilmiştir.

RNAi yapısı: AAT genlerinin sekansları 5' ucundaki XbaI ve AscI kesim bölgeleri ve 3' ucundaki BamHI ve SmaI kesim bölgesini bulunduran tam olgunlaşmamış kavun meyvesinin cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri önce AscI ve SmaI ile kesilmiş ve bitki transformasyon vektörü olan pFGC5941 ile bağlanmış ve *E. coli* (DH5 α) içerisine yerleştirilmiştir.

Meydana gelen uygun sekansa sahip olan plazmid pFGC5941-S olarak isimlendirilmiştir. Önceden bahsedilen iki genin antisens olarak sıralanmış kısımlarını elde etmek için PCR ürünleri BamHI ve XbaI ile kesilmiş ilgili vektöre bağlanmış ve tekrar *E. coli* içerisinde yerleştirilmiştir (Yahyaoui ve ark., 2002; El Sharkawy ve ark., 2005).



Şekil 3.1. *Escherichia coli* (DH5α)' den *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılmış ticari rekombinant RNAi - pFGC5941 plazmid

Çizelge 3.1. *Agrobacterium* bakterisinde bulunan plazmid DNA' nın özellikleri

PLAZMİDİN ÖZELLİKLERİ	
Plazmid adı	pFGC5941-(11406 bç)
ABRC stok numarası	CD3-447
Bakteri seleksiyonu	Kanamycin 50mg/l
Bitki seleksiyonu	Basta herbisiti
Promotor büyüklüğü (bç)	1400
Intron fragmenti	ChsA intron
Km (Kan^R)	Bakteriyel kanamisin 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 mozaik virüsü 35S viral promotoru
LB	T-DNA sol bölge
RB	T-DNA sağ bölge
ChsA Intron(1353 bç)	Petunia chalcone sentaz A geni

3.2. Metod

3.2.1. Doku Kültürü Koşulları

Doku kültürü ve transformasyon çalışmalarının tümü Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, steril koşulların sağlanması için steril kabinler kullanılmıştır. Rejenerasyon ve transformasyonda kullanılan tüm malzemeler (bistüri bıçağı, pensler, kurutma kağıtları, cam malzemeler, pipet uçları, kullanılan saf su) 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süresince ve 1.05 atmosfer basınç altında, otoklavda sterilizasyon edilmiştir. Steril kabin içerisinde, steril koşulların sağlanması için bistüri 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 %0.3 agar ilave edilerek pH 5.7'ye ayarlanmıştır. Antibiyotik ilavesi gereken çalışmalarda, antibiyotik sterilizasyonu 0.2 mikron çapta por genişliğine sahip filtreler kullanılarak yapılmış ve daha sonra otoklav ile steril edilen besin ortamlarına ilave edilmiştir. Otoklav şartları altında antibiyotiklerin protein yapısı bozulacağından besin ortamlarına sonradan eklenmiştir. MS Bazal ortamında bulunan mineral tuzların ve vitaminlerin isim ve konsantrasyonları Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. MS bazal besi yerinde bulunan mineral maddeleri ve konsantrasyonları (Murashige ve Skoog, 1962).

Makro Elementler	(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	(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	(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

3.2.2. Rejenerasyon ve Transformasyon Denemeleri için Sterilizasyon Uygulamaları

Sterilizasyonda, kavun tohumlarının kabukları soyulmuş, %15 'lik sodyum hipoklorit çözeltisine %2'lik tween-20'den 2 damla damlatılmış ve ara sıra çalkalanarak 10 dakika bekletilmiştir. Steril saf su ile 3-5 kez yıkanan tohumlar kültür ortamına aktarılmaya hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.2).



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

3.2.3. Tohumların *In vitro* Ortamda Çimlendirilmesi

Tohumlar sterilizasyon işlemlerinden sonra kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuş ve bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS bazal besi ortamı içeren petrilerde 16 saat fotoperiyotta 25-26 °C de 3 gün karanlıkta kültüre alınmıştır.

3.2.4. *In vitro* Rejenerasyon ve Transformasyon Besi Yeri (M1 Ortamı)

Rejenerasyon ve transformasyon çalışmalarında, Ayub ve ark., (1996)'nın kullandıkları rejenerasyon ortamı (4.4 g/l MS Bazal ortamı, 2.2 µM BAP, 0.5 µM NAA, 30 g/l sukroz, 200 µM asetosiringon, 1 g/l MES, 7.0 g/l agar) modifiye

edilerek kullanılmıştır. Yapılan modifikasyonlar, besi yerine 1g/l MES ve 200 µM asetosiringon ilavesi yapılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

3.2.5. *In vitro* Rejenerasyon Besi Yeri (M2 Ortamı)

Rejenerasyon çalışmalarında M1 ortamına 750 mg/l sefuroksim sodyum antibiyotiği eklenerek hazırlanmış olan M2 Besi ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

3.2.6. *In vitro* Sürgün Geliştirme Besi Yeri (M3 Ortamı)

Guis ve ark., (2000)' nın kullandıkları sürgün geliştirme ortamı (4.4 gr/l MS Bazal ortamı, 1 µM BAP, 0.2 µM GA₃, 30 g/l sukroz, 1 g/l MES, 750 mg/l sefuroksim sodyum, 7.0 g/l agar) modifiye edilerek, M2 ortamında gelişen rejenerantlar, M3 besi yeri içeren cam kavanozlara aktarılmışlardır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. *In vitro*'da kullanılan ortamlar ve içerikleri

M1 Ortamı (Ayub ve ark., 1996)	M2 Ortamı (Ayub ve ark., 1996)	M3 Ortamı (Guis ve ark., 2000)
4.4 g/l MS Bazal ortamı	4.4 g/l MS Bazal ortamı,	4.4 g/l MS Bazal ortamı
2.2 µM BAP	2.2 µM BAP	1 µM BAP
0.5 µM NAA	0.5 µM NAA	0.2 µM GA ₃
30 g/l sukroz	30 g/l sukroz	30 g/l sukroz
*200 µM asetosiringon	*200 µM asetosiringon	*1 g/l MES
*1 g/l MES	*1 g/l MES	*750 mg/l sefuroksim sodyum
7.0 g/l agar	*750 mg/l sefuroksim sodyum	7.0 g/l agar
	7.0 g/l agar	

*Ortamlarda yapılmış olan modifikasyonlar

3.2.7. Transformasyon Çalışmaları

3.2.7.1. Transformasyonda Kullanılan Bakteri Çözeltilisinin Yoğunluğunun Belirlenmesi

Bakteri çözeltilisinin yoğunluğunu belirlemek amacı ile spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. -80°C'de muhafaza edilen *Agrobacterium* ırkları 20 ml sıvı LB

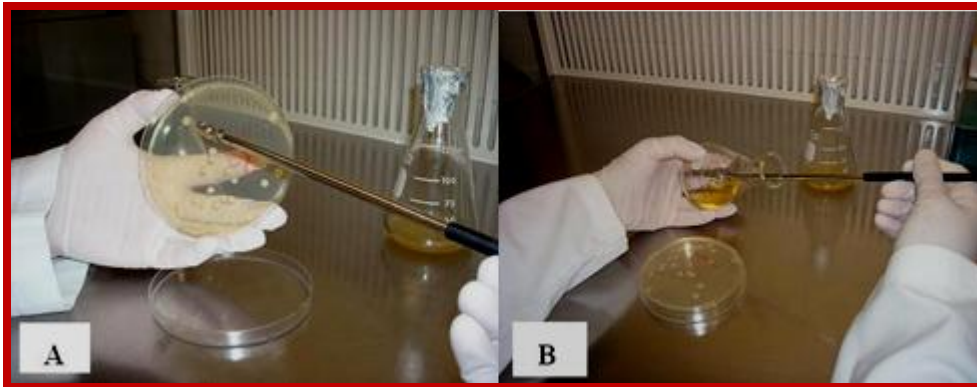
ortamı + 50 mg/L kanamisin içeren ortama inoküle edilmiştir. Bir gece 28°C ve 200 rpm' de inkübasyona bırakılan LB bakteri solüsyonunun spektrofotometrede O.D. 600 nm Lamda (λ) ölçümü yapılmış ve transformasyon çalışmaları için uygun absorbans değeri (0,3-0,4) belirlenmiştir. Spektrofotometrede okunan değerler sonucunda transformasyonda kullanılacak optimum miktarın 20 ml sıvı LB ortamında bir gece gelişen bakteri solüsyonun olduğu belirlenmiştir.

3.2.7.2. *Agrobacterium tumefaciens* ve İnokülasyon Solüsyonunun Hazırlanması

Agrobacterium bakteri ırklarını transformasyon çalışmalarında kullanmak ve, çoğaltmak için katı ve sıvı LB ortamları (Luria-Bertani, 1964) hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Agrobacterium tumefaciens'in üç farklı RNAi yapısı taşıyan Cm-AAT (1, 3 ve 4) ırkları, LB ortamı (Luria-Bertani, 1964) içerisine agar eklenerek hazırlanan katı ortamlarda öze yardımı ile çizilerek 28°C'de 1-2 gün etüvde inkübe edilerek geliştirilmişlerdir. Bütün *Agrobacterium* ırkları için LB ortamı + 50 mg/l kanamisin kullanılmıştır. Petrilere gelişen bakteri kolonileri 4°C' de dolapta muhafaza edilmiştir. 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 sıvı LB ortamı + 50 mg/l kanamisin içeren 200 ml'lik erlenlere aktarılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. (A) Öze yardımı ile katı LB ortamından tek koloni seçimi; (B) Katı LB ortamından seçilen tek koloni *A. tumefaciens*'in sıvı LB ortamına inokülasyonu

Hazırlanan sıvı bakteri kültürü 200 rpm’de 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 20 ml sıvı LB ortamı içerisinde 200 rpm’de 3-4 saat kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.4. LB Bakteri Besi Ortamı İçeriği (Luria-Bertani, 1964)

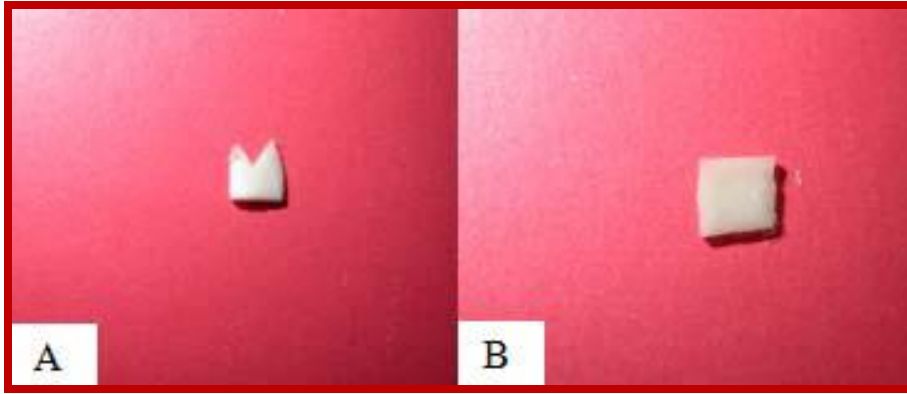
LB Besiyeri (1 L)	g/L
Tripton	10
Yeast ekstrakt	5
NaCl	10
Agar	14

3.2.7.3. Proksimal ve Kotiledon Eksplantların *Agrobacterium tumefaciens* ile İnokülasyonu ve Rejenerasyon

Üç gün karanlıkta *in vitro*’da çimlendirilen kavun tohumları sıvı bakteri solüsyonu içerisinde testası ve apikal meristemi bistüri yardımıyla kesilerek çıkarılmıştır. Tohum ikiye ayrıldıktan sonra yara dokusu oluşturmak amacı ile kenarlarından kesilmiştir. Oluşturulan parçaların proksimal kısmı V şeklinde kesilmiş (apikal meristemi uzaklaştırılmış kısım), kotiledon kısmı bisturi 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. Tüm transformasyon çalışmalarında toplam 1200 tohum, her üç *Agrobacterium* ırkı (AAT1, 3 ve 4) için ise 400’er tohum transformasyonda kullanılmıştır. Bir adet tohumdan 2 proksimal kısım ve 4 kotiledon kısım olmak üzere toplam 6 eksplant elde edilmiş, her gen için 2400 adet eksplant transformasyon ve rejenerasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Bakteri solüsyonuna 200 µM asetosiringon ilave edilmiştir. Bakteri solüsyonu içerisinde kesilen tohumlar antibiyotik içermeyen M1 (4.4 g/l MS Bazal ortamı, 2.2 µM BAP, 0.5 µM NAA, 30 g/l sukroz, 200 µM asetosiringon, 1 g/l MES, 7.0 g/l agar) ortamlarında (alüminyum folyo kullanılarak petriyer sarılmıştır) iklim odası

koşullarında 3 gün karanlıkta 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 için M2 (M1 + 750 mg/l sefuroksim sodyum) ortamlarına aktarılmıştır. M2 ortamlarında rejenerasyon olan eksplantlardan oluşan sürgünler M3 (4.4 g/l MS Bazal ortamı, 30 g/l sukroz, 1 g/l MES, 1 µM BAP, 0.2 µM GA₃, 750 mg/l sefuroksim sodyum, 7.0 g/l agar) sürgün geliştirme ortamına aktarılmıştır. *In vitro*' da gelişen sürgünler 2-3 hafta aralıklarla toplam bir alt kültüre alınmışlardır.



Şekil 3.4. A: Proksimal eksplant, B: Kotiledon eksplant

3.2.8. Moleküler Uygulamalar

Transformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen aday transgenik kavun bitkilerinde Cm-AAT antisens genlerinin varlığını tespit etmek için moleküler çalışmalar yapılmıştır. Moleküler uygulamalara ait analizler Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.1. DNA İzolasyonu

Transformasyon çalışmaları sonucunda M3 ortamı içerisinde kavun eksplantlarında meydana gelen sürgünlerden yaprak örnekleri alınmış ve bu materyallerden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5.). Tez çalışmasında

MiniPrep-CTAB DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır (Johnstone ve Thompson, 1991). DNA izolasyonu aşamasında kullanılan tampon çözeltinin içeriği Çizelge 3.5’te sunulmuştur. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltiler dışında kloroform:izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1 M pH:8, 0.5 M EDTA, pH:8), RNase A (10 mg/ml) solüsyonu, izopropanol ve etil alkol (%99) kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği

Kimyasallar	Konsantrasyon
CTAB	%2
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

3.2.8.1.(1). DNA İzolasyon Aşamaları

DNA izolasyon aşamaları Şekil 3.6’da gösterilmiştir.

- Hazırlanmış olan ekstraksiyon solüsyonundan her tüpe 396µl ve 4µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.
- Bir pipet aracılığıyla tüpler homojenlik sağlanana kadar karıştırılmış ve daha sonra tüpler 65°C’de 20 dakika bekletilmiştir ve iki defa karıştırılmıştır.
- Her tüpe 400µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenerek 15 dakika vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.
- Tüpler 5 dakika 13.000 rpm santrifüj edilmiştir. Bekleme sırasında her örnek için yeni temiz bir santrifüj tüpü hazırlanıp etiketlenmiştir ve tüplerin içine 400 µl soğuk (-20°C) izopropanol eklenmiştir.
- 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.
- 5 dakika 13.000 rpm/dk santrifüj edilmiştir.

- Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Pelletin kuruması için tüpler ters bırakılarak bekletilmiştir
- Kuruyan Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür. Her tüpe 4 µl RNase A eklenmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında tüpler bekletilmiştir.
- Her tüpe 500 µl soğuk EtOH (%100) (buzluktan çıkmış) eklenmiştir ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle -20°C 'de bekletilmiştir.
- 5 dakika 13.000 devirde santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüş ve pelletin kuruması için tüpler ters çevrilmiştir
- Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür.
- Örnekler -20°C 'de saklanmıştır.



Şekil 3.5. (A) M3 Sürgün ortamındaki aday transgenik bitkiler (B), (C), (D), DNA izolasyonu için bitki örneklerinin alınması



Şekil 3.6. (A)Eksplantların öğütülmesi, (B) Öğütülen eksplantların ependorf tüplerine alınması (C), (D) Ependorf tüplerdeki örneklerin üzerlerine CTAB çözeltisinin eklenmesi

3.2.8.2. DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

Tez kapsamında transformasyonlar sonucu elde edilen bitkilerden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş, DNA'ların kalite ve miktarlarına spektrofotometre aracılığıyla bakılmıştır. Spektrofotometre olarak NanoDrop 100 cihazı kullanılmıştır. Kalite kriteri olarak 260/280 nm' deki absorbans değeri göz önünde tutulmuştur.

3.2.8.3. *Agrobacterium tumefaciens* pFGC5941-CmAAT (1, 3 ve 4) 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 ependorf tüpü 90°C'de 10 dk.

bekletilmiştir. 10 dk. sonunda elde edilen örnekten 3 µl PCR analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.8.4. PCR Protokolünün Optimizasyonu ve Uygulanması

Aday transgenik bitkilerin moleküler olarak kontrol edilmesi için PCR analizleri yapılmıştır. PCR analizlerinde transformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bitkilerin transgenik olup olmadığının belirlenmesi amacıyla çalışmada kullanılan AAT 1, 3, 4 genlerine ait intron/ekzon bölgeleri ve CaMV 35S promotor bölgeleri çoğaltılmış ve agaroz jelde görüntülenmeleri yapılmıştır. Her gen için ekzon (forward) primerleri farklı olmakla birlikte intron (reverse) primeri ortak olarak kullanılmıştır. CaMV 35S promotor bölgesi için ise her gen için aynı forward ve reverse primer çifti kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarında kullanılan primer çiftleri Çizelge 3.6’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. PCR’ de kullanılan primer setleri

Primer	Sekans (5'-3')	Uzunluk (bp)
Cm-AAT1 (forward)	AGTCTAGAGGCGCGCCTGTGTTCTTAGCTGCGGCATTT	454
Chs-Intron (reverse)	CTTACTTACACTTGCCTTGGA	
Cm-AAT3 (forward)	AGTCTAGAGGCGCGCCTTGGACATGGAAGAAGAGAGG	460
Chs-Intron (reverse)	CTTACTTACACTTGCCTTGGA	
Cm-AAT4 (forward)	AGTCTAGAGGCGCGCCCCTTTTCATCAAAGTCTGATCA	466
Chs-Intron (reverse)	CTTACTTACACTTGCCTTGGA	
CaMV 35S promotor (forward)	GCTCCTACAAATGCCATCA	195
CaMV 35S promotor (reverse)	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	

*CaMV 35S promotor primeri NCBI accession no:V00141

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 ve PCR döngü koşulları Çizelge 3.7. ve Çizelge 3.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. PCR reaksiyonlarında uygulanan protokol

Kullanılan Materyal	Konsantrasyon	Miktar
Master Mix	2X	16.25 µl
Primer (Forward)	20 µM	1.25 µl
Primer (Reverse)	20 µM	1.25 µl
MgCl ₂	25 mM	1.25 µl
H ₂ O		3 µl
Taq Polimeraz	500 ünite	0.125 µl
DNA	50 ng	3 µl

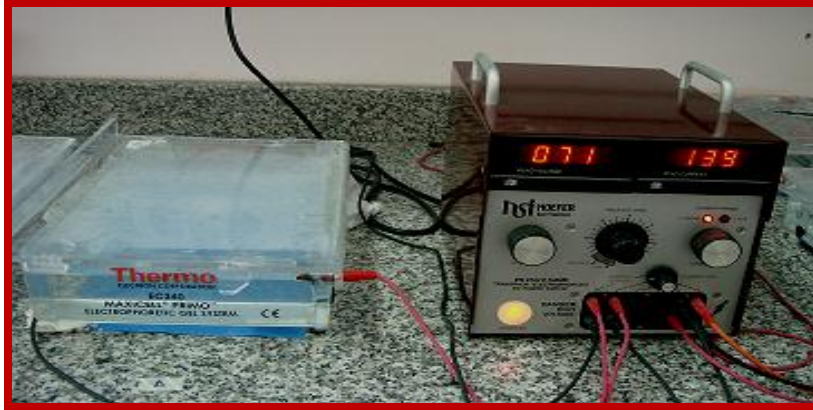
Çizelge 3.8. PCR döngü koşulları

95 °C 2 dk	ön denatürasyon	35 döngü
95 °C 30 sn	DNA'nın denatürasyonu	
58-65* °C 1dk	primerlerin bağlanması	
72 °C 2 dk	yeni iplikçiğin yazılımı	
72 °C 10 dk	son yazılım	
+4 °C	∞	

*Her primer için farklı bağlanma sıcaklıkları uygulanmıştır.

3.2.8.5. Elektroforez Koşulları

Elde edilen PCR ürünlerine 4 µl 6x yükleme boyası eklenmiş ve %1.5'lük agaroz jelde Şekil 3.8.'de görüldüğü gibi, 1x TAE solüsyonu eklenerek koşulmuştur. Jel, % 0.1 oranındaki EtBr solüsyonu ile boyanmıştır. İşlem sona erdikten sonra UV ışığı altında agaroz jellerin fotoğrafları çekilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 3.7. Agaroz jel elektroforezde PCR ürünlerinin koşulması

3.2.8.6. İstatistik Analizler ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Tez çalışmasında transformasyon uygulamaları için kullanılan kavun tohumlarının kotiledon ve proksimal kısımları aynı ortam koşullarında farklı petrilere kültüre alınmıştır. Deneme sonunda *in vitro*'da proksimal ve kotiledon eksplantlarından elde edilen bulgular SPSS bilgisayar paket programı kullanılarak T testi analizine tabi tutulmuştur.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Tohumların Sterilizasyonu

Tez çalışmasında tohumların sterilizasyonu için uygulanmış olan metod olumlu sonuçlar vermiş olup, kontaminasyon sorunu ile karşılaşmadığı için yüzey sterilizasyonu yeterli bulunmuştur. 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 karanlık ortamda 25-26°C de 3 gün kültüre alınmıştır. Bu süre sonunda tohumlarda çimlenme başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir.

4.1.3. Rejenerasyon Ortamının Optimizasyonu

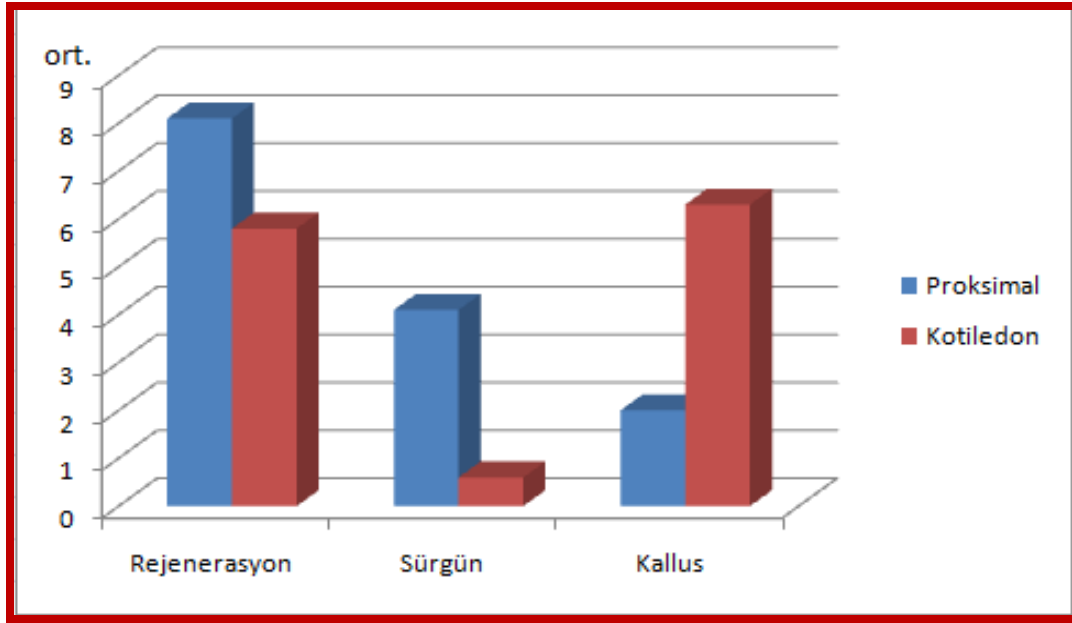
Bu çalışmada Vedrantais kavun tohumlarının rejenerasyonunu sağlamak amacıyla Ayub ve ark., (1996) tarafından önerilen protokol modifiye edilerek denenmiştir. Bu amaçla kurulan ön denemede, Ayub ve ark., (1996)'nın protokolü modifiye edilmiş ve bu protokolün rejenerasyonda iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.

4.1.4. Transformasyon ve Rejenerasyon Çalışmaları

4.1.4.1. Cm-AAT1 Antisens Geni için Transformasyon ve Rejenerasyon Denemesi Bulguları

Tez çalışmasında AAT antisens genlerinin transformasyonlarında kullanılan tohumlar 3 gün karanlık ortam koşullarında çimlendirilmiş ve bu tohumlar transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Tohumların proksimal ve kotiledon

kısımları transformasyon sonrasında M2 rejenerasyon ortamında kültüre alınmışlardır. M2 ortamlarında yapılan gözlemler sonucunda 7. günden itibaren rejenerasyonun başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). AAT1 antisens geninin rejenerasyon ve transformasyon denemelerinde toplam olarak 400 adet kavun tohumu kullanılmıştır. Her bir tohumdan 6 adet eksplant (2 proksimal, 4 kotiledon) olmak üzere toplamda 2400 eksplant kullanılmış ve *in vitro*'ya alınmıştır. Bu eksplantlardan 38'i proksimal, 22'si kotiledon kısımdan olmak üzere toplamda 60 adet aday transgenik kavun bitkisi elde edilmiştir. 2400 adet tohum materyalinin 41 adetinin transgenik bitkilere dönüşmesi ile transformasyon etkinliği AAT1 antisens geni için %2,5 bulunmuştur. Proksimal eksplantlardan gelişen rejenerantların ortalaması 8,1 iken, kotiledon eksplantlarından gelişen rejenerantların ortalaması 5,8 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizi sonucunda da proksimal eksplantlardan gelişen rejenerantların %5 önem seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. M2 ortamlarına yerleştirilen proksimal ve kotiledon eksplantlarının bazılarında ise rejenerasyonla beraber kallus oluşumu da gözlenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda proksimal eksplantlardan elde edilen kallus miktarlarının ortalaması 2,0 olarak tespit edilirken kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların ortalaması 6,3 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizi sonucunda da kotiledon eksplantlardan gelişen kallusların %5 hata payıyla önemli olduğu görülmüştür. M2 ortamlarında gelişen rejenerantların bir kısmı sürgün yapılarına dönüşürken diğer bir kısmı ise organize olmamış yapılara dönüşmüştür (Şekil 4.6). Yapılan gözlemler sonucunda proksimal eksplantlardan elde edilen sürgün sayılarının ortalaması 4,1 iken kotiledon eksplantlarından gelişen sürgünlerin ortalaması 0,6 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizi sonucunda da proksimal eksplantlardan gelişen sürgünlerin %5 hata payıyla istatistiki olarak kotiledon eksplantlarından gelişen sürgün sayılarının ortalamasından daha önemli olduğu görülmüştür. Proksimal ve kotiledon eksplantlardan elde edilen rejenerasyon, sürgün ve kallus ortalamalarını gösteren grafik Şekil 4.1'de sunulmuştur.

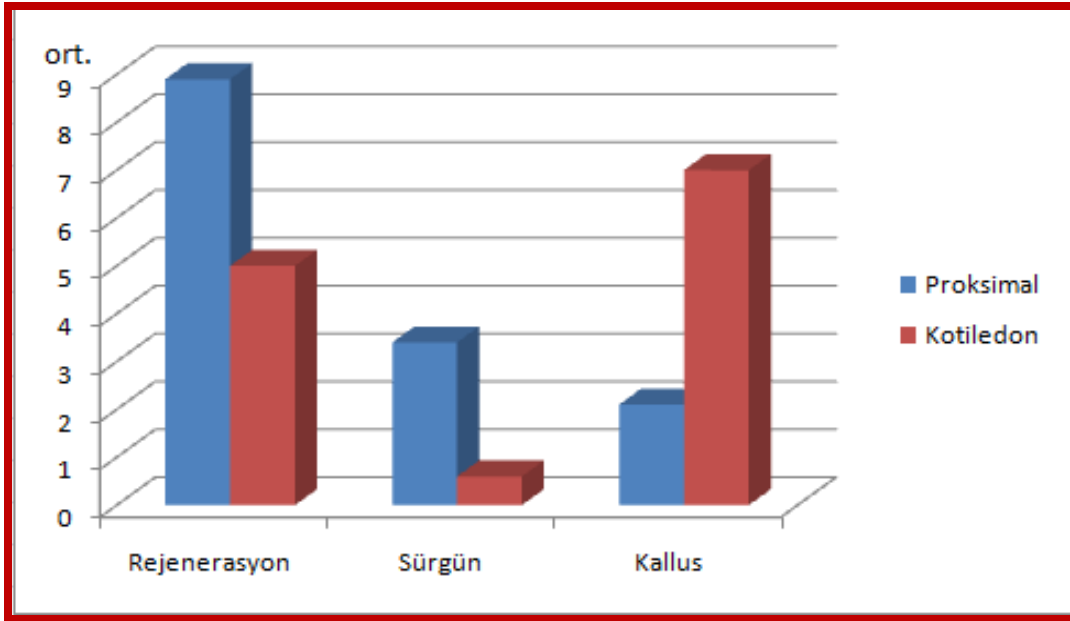


Şekil 4.1. AAT1 antisens geni için proksimal ve kotiledon eksplantlardan gelişen rejenerasyon, sürgün ve kallus ortalamaları

4.1.4.2. Cm-AAT3 Antisens Geni için Transformasyon ve Rejenerasyon Denemesi Bulguları

AAT3 antisens genini içeren *Agrobacterium tumefaciens* plazmidi ile yapılan gen aktarma çalışmalarında kullanılan proksimal eksplantlardan gelişen rejenerantların ortalaması 8,9 iken, kotiledon eksplantlarından gelişen rejenerantların ortalaması 5,0 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizi sonucunda da proksimal eksplantlardan gelişen rejenerantların %5 önem seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. M2 ortamlarına yerleştirilen proksimal ve kotiledon eksplantlarının bazılarında ise rejenerasyonla beraber kallus oluşumu da gözlenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda proksimal eksplantlardan elde edilen kallus miktarlarının ortalaması 2,1 olarak tespit edilirken kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların ortalaması 7,0 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizi sonucunda da kotiledon eksplantlardan gelişen kallusların %5 hata payıyla önemli olduğu görülmüştür. M2 ortamlarında gelişen rejenerantların bir kısmı sürgün yapılarına dönüşürken diğer bir kısmı ise organize olmamış yapılara dönüşmüştür (Şekil 4.6). Yapılan gözlemler sonucunda proksimal eksplantlardan elde edilen sürgün sayılarının ortalaması 3,4 iken kotiledon eksplantlarından gelişen sürgünlerin ortalaması 0,6 olarak

bulunmuştur. Yapılan istatistik analizi sonucunda da proksimal eksplantlardan gelişen sürgünlerin %5 hata payıyla istatistiki olarak kotiledon eksplantlarından gelişen sürgün sayılarının ortalamasından daha önemli olduğu görülmüştür. Proksimal ve kotiledon eksplantlardan elde edilen rejenerasyon, sürgün ve kallus ortalamalarını gösteren grafik Şekil 4.2’de sunulmuştur. Rejenerasyon ve transformasyon denemelerinde toplam olarak 400 adet kavun tohumu kullanılmıştır. Her bir tohumdan 6 adet eksplant (2 proksimal, 4 kotiledon) olmak üzere toplamda 2400 eksplant kullanılmış ve *in vitro*’ya alınmıştır. Bu eksplantlardan 25’i proksimal, 16’sı kotiledon kısımdan olmak üzere toplamda 41 adet aday transgenik kavun bitkisi elde edilmiştir. 2400 adet tohum materyalinin 41 adetinin transgenik bitkilere dönüşmesi ile transformasyon etkinliği AAT3 antisens geni için % 1,7 bulunmuştur.

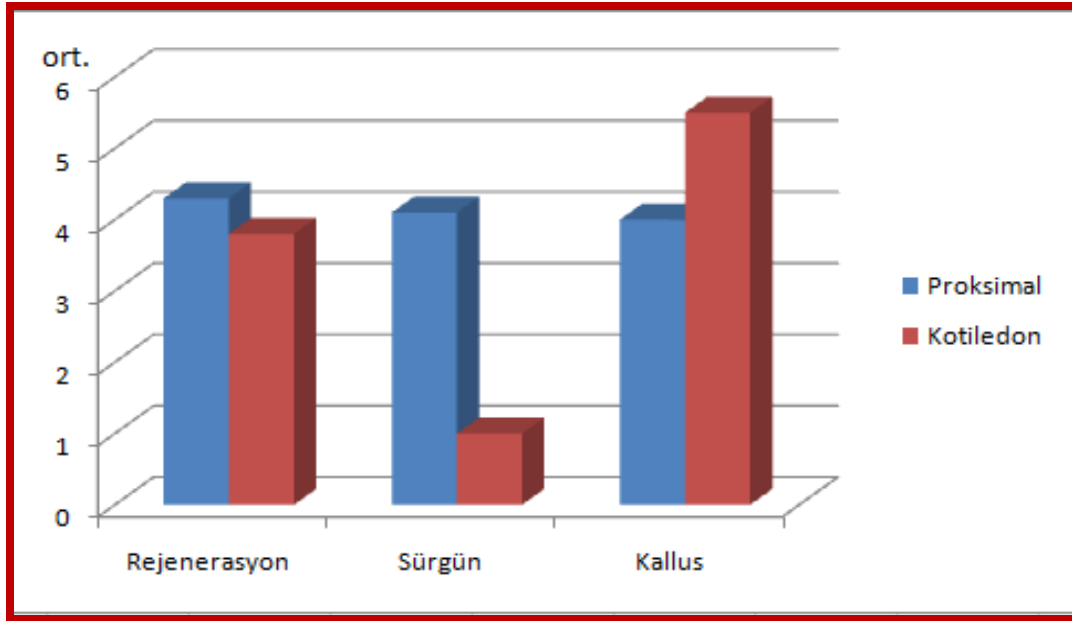


Şekil 4.2. AAT3 antisens geni için proksimal ve kotiledon eksplantlardan gelişen rejenerasyon, sürgün ve kallus ortalamaları

4.1.4.3. Cm-AAT4 Antisens Geni için Transformasyon ve Rejenerasyon Denemesi Bulguları

AAT4 antisens genini içeren *Agrobacterium tumefaciens* ile yapılan gen aktarma çalışmalarında kullanılan proksimal eksplantlardan gelişen rejenerantların ortalaması 4,3 iken, kotiledon eksplantlarından gelişen rejenerantların ortalaması 3,8

olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizi sonucunda da proksimal eksplantlardan gelişen rejenerantların %5 önem seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. M2 ortamlarına yerleştirilen proksimal ve kotiledon eksplantlarının bazılarında ise rejenerasyonla beraber kallus oluşumu da gözlenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda proksimal eksplantlardan elde edilen kallus miktarlarının ortalaması 4,0 olarak tespit edilirken kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların ortalaması 5,5 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizi sonucunda da kotiledon eksplantlardan gelişen kallusların %5 hata payıyla önemli olduğu görülmüştür. M2 ortamlarında gelişen rejenerantların bir kısmı sürgün yapılarına dönüşürken, diğer bir kısmı ise organize olmamış yapılara dönüşmüştür. Yapılan gözlemler sonucunda proksimal eksplantlardan elde edilen sürgün sayılarının ortalaması 4,1 iken, kotiledon eksplantlarından gelişen sürgünlerin ortalaması 1,0 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizi sonucunda da proksimal eksplantlardan gelişen sürgünlerin %5 hata payıyla istatistiki olarak kotiledon eksplantlarından gelişen sürgün sayılarının ortalamasından daha önemli olduğu görülmüştür. Proksimal ve kotiledon eksplantlardan elde edilen rejenerasyon, sürgün ve kallus ortalamalarını gösteren grafik Şekil 4.3'de sunulmuştur. AAT4 antisens geni için yapılan rejenerasyon ve transformasyon denemelerinde toplam olarak 400 adet kavun tohumu kullanılmıştır. Her bir tohumdan 6 adet eksplant (2 proksimal, 4 kotiledon) olmak üzere toplamda 2400 eksplant kullanılmış ve tohumlara ait kısımlar *in vitro*'ya alınmıştır. Bu eksplantlardan 16'sı proksimal, 14'ü kotiledon kısımdan olmak üzere toplamda 30 adet aday transgenik kavun bitkisi elde edilmiştir. 2400 adet tohum materyalinin 30 adetinin transgenik bitkilere dönüşmesi ile transformasyon etkinliği AAT4 antisens geni için %1,25 bulunmuştur.

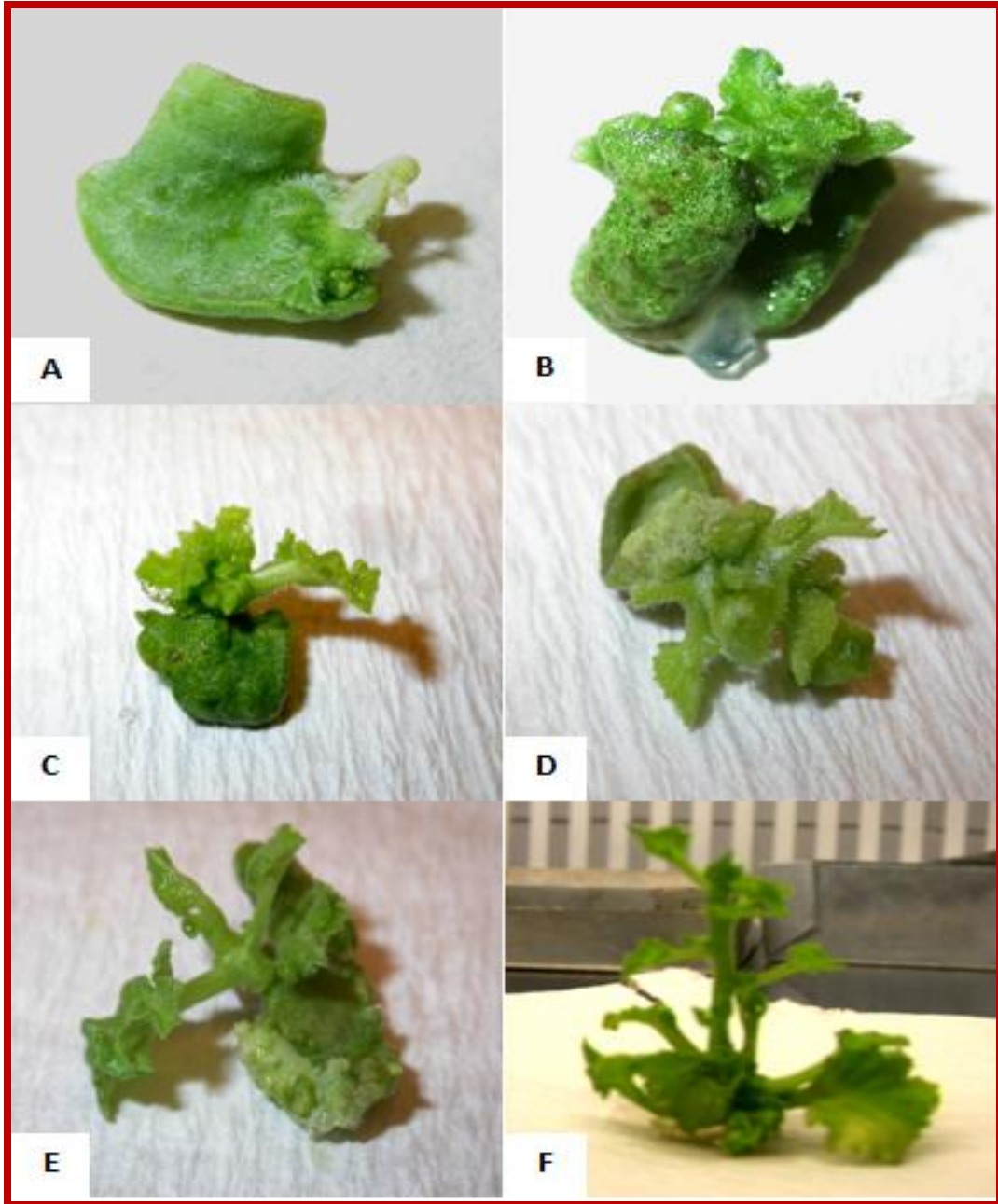


Şekil 4.3. AAT4 antisens geni için proksimal ve kotiledon eksplantlardan gelişen rejenerasyon, sürgün ve kallus ortalamaları

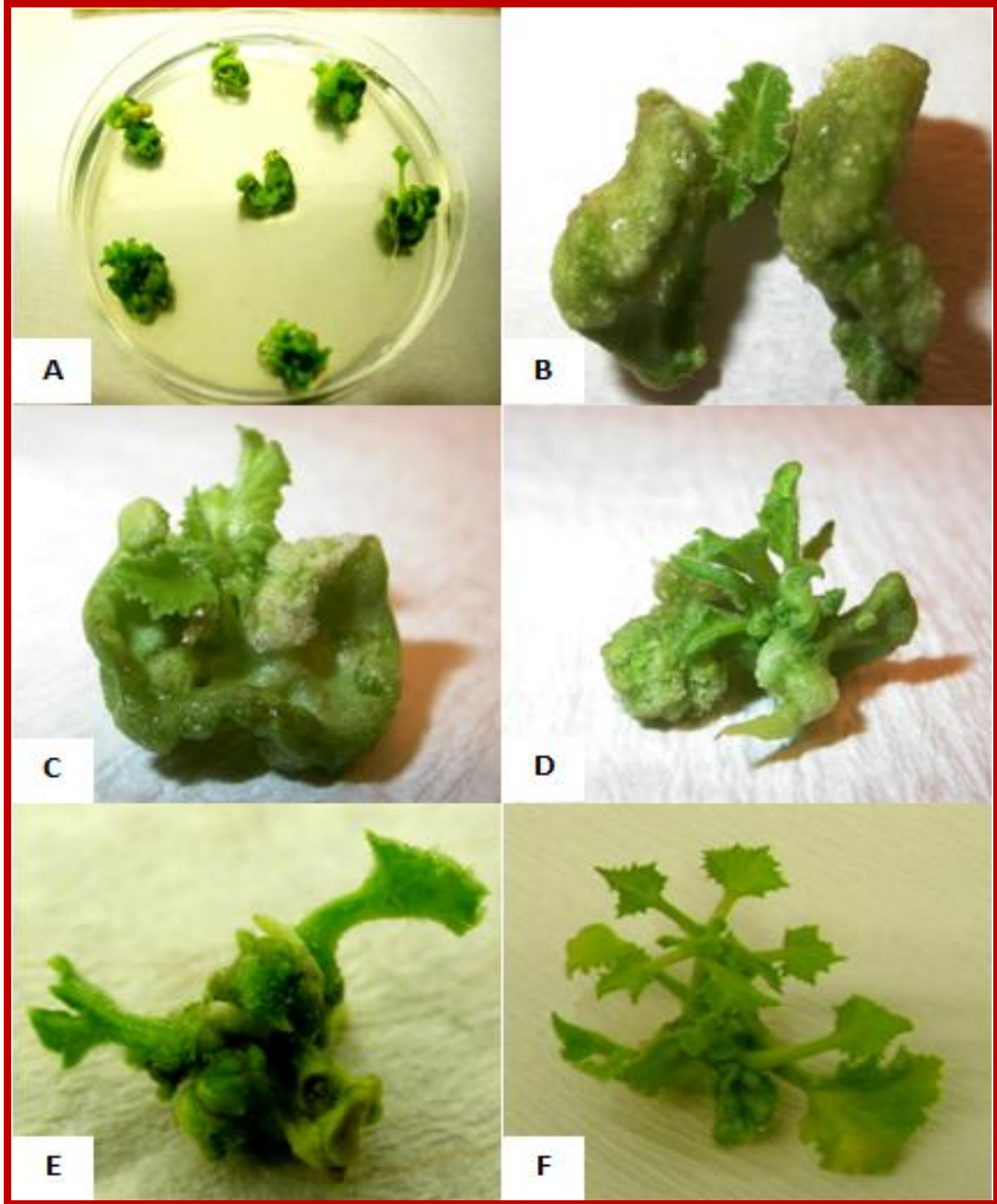
Çizelge 4.1. Cm-AAT (1, 3 ve 4) genleri için eksplantlardan elde edilen sürgün, kallus ve rejenerasyonların ortalama değerleri

Eksplant \ Gözlem	Cm-AAT1		Cm-AAT3		Cm-AAT4	
	Proksimal Ortalama	Kotiledon Ortalama	Proksimal Ortalama	Kotiledon Ortalama	Proksimal Ortalama	Kotiledon Ortalama
Rejenerasyon	8,1*	5,8	8,9*	5,0	4,3*	3,8
Sürgün	4,1*	0,6	3,4*	0,6	4,1*	1,0
Kallus	2,0	6,3*	2,1	7,0*	4	5,5*

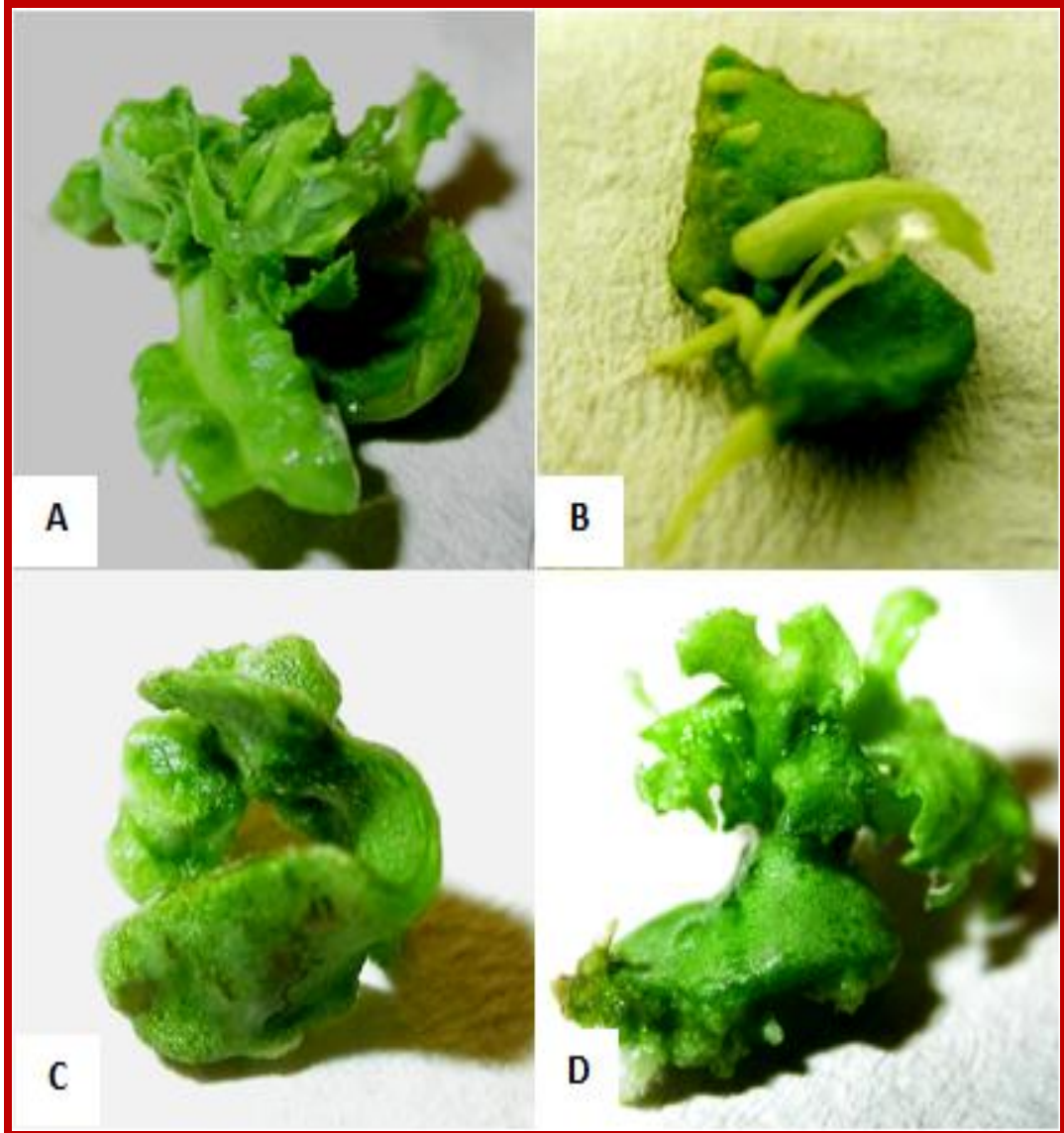
*İstatistiksel olarak %5 hata payıyla daha önemli



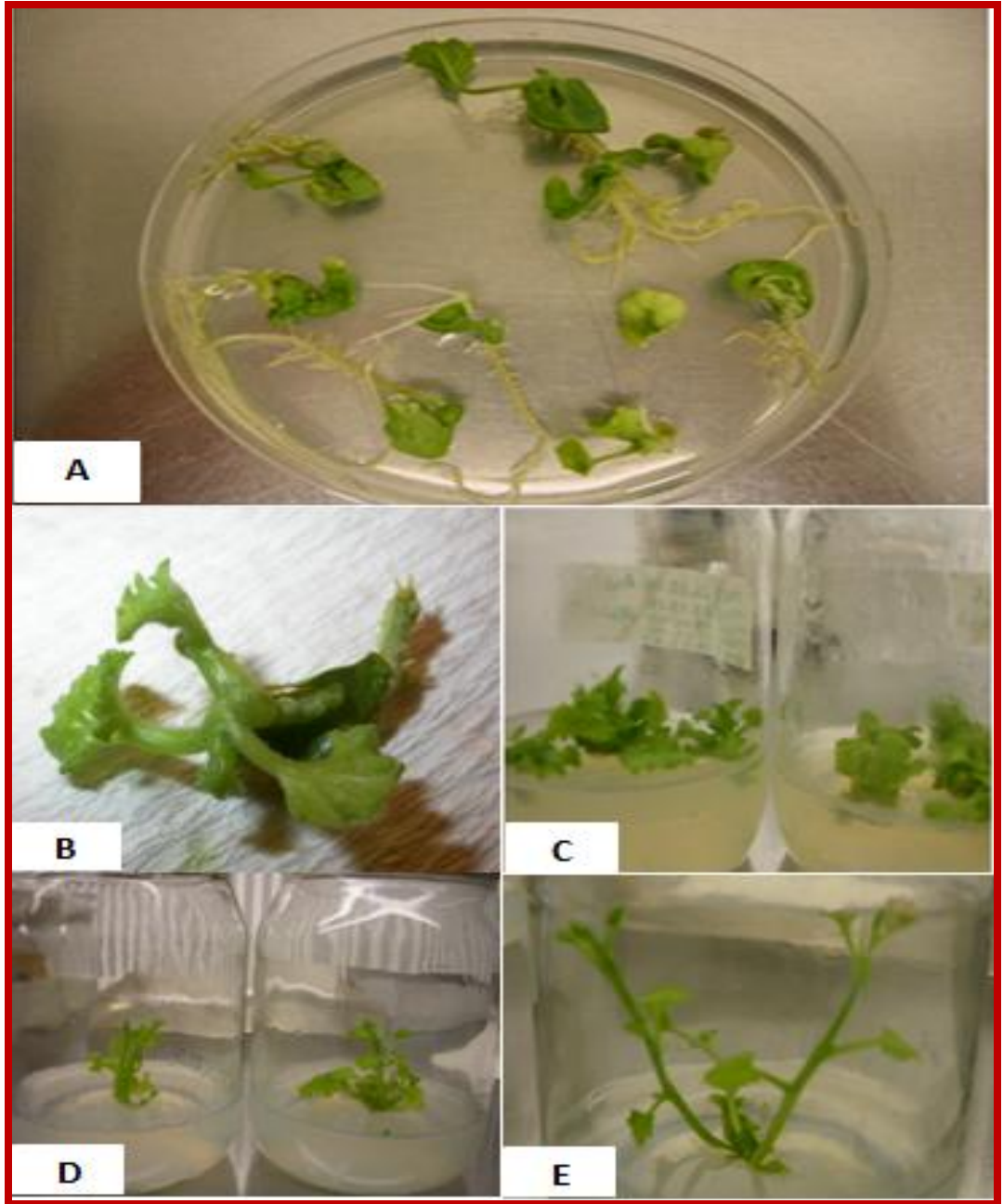
Şekil 4.4. A, B: Kotiledon eksplantının rejenerasyon görünümü (7. gün), C, D, E:Kotiledon eksplanttan gelişen sürgünler (15.gün), F: Kotiledon eksplanttan gelişen sürgün (21. gün)



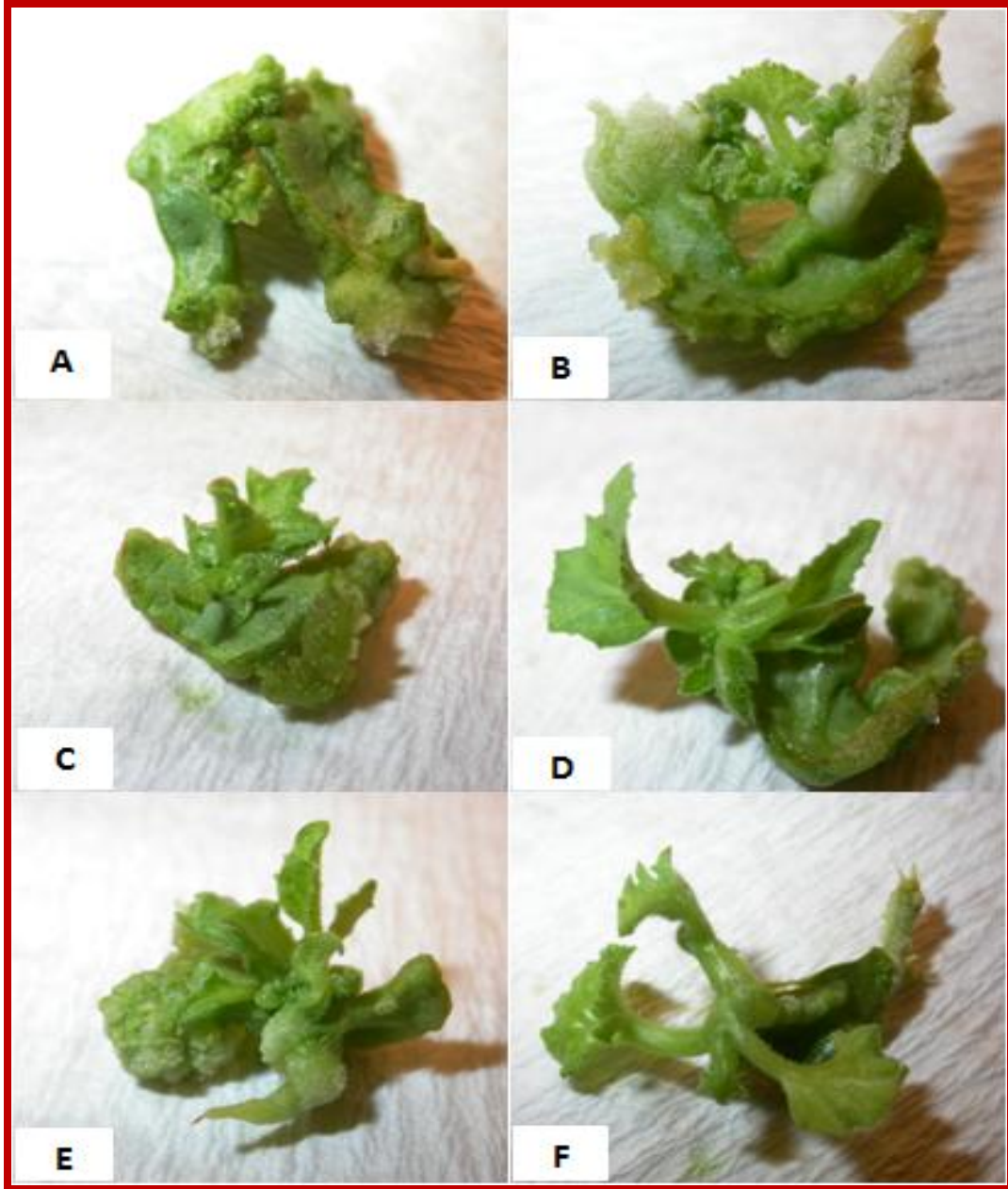
Şekil 4.5. A: Proksimal eksplantların rejenerasyonlarının 7. günündeki görünüşleri B, C: Proksimal eksplanttan gelişen sürgünler, D, E: Proksimal eksplantlardan gelişen sürgünlerin 15. günündeki görünüşleri, F: Proksimal eksplanttan gelişen sürgünün 21. günündeki görünüşü



Şekil 4.6. A, B: Kotiledon eksplantlardan gelişen organize olmamış yapılar C, D: Proksimal eksplantlardan gelişen organize olmamış yapılar



Şekil 4.7. A: M2 rejenerasyon ortamında gelişen proksimal eksplantlar, B: Proksimal eksplanttan gelişen sürgün, C, D, E: M3 sürgün geliştirme ortamında uzayan bitkicikler



Şekil 4.8. A, B: Proksimal eksplantın rejenerasyon görünümü (7. gün), C, D, E, F: Proksimal eksplanttan gelişen sürgünler (15.gün)

4.1.5. Moleküler Çalışmalar

4.1.5.1. DNA İzolasyonu

AAT antisens genlerinin transformasyonlarının ardından elde edilen aday transgenik bitkilerden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve izolasyonları

gerçekleştirilen DNA'ların miktar ve kalitelerine spektrofotometre aracılığıyla bakılmıştır. DNA'ların miktar ve kaliteleri Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. AAT1 Aday transgenik bitkilerden elde edilen DNA'ların miktar ve kaliteleri

Örnek No	DNA Miktarı (ng DNA ul ⁻¹)	DNA Saflığı (A260/A280)
1	156.73	1.82
2	967.99	1.71
3	924.27	1.80
4	682.87	1.68
5	695.62	1.83
6	637.21	1.89
7	635.64	1.86
8	418.98	1.86
9	427.77	1.81
10	494.38	1.82
11	505.45	1.65
12	610.59	1.82
13	622.62	1.85
14	547.37	1.86
15	533.76	1.85
16	268.93	1.90
17	270.68	1.92
18	566.12	1.74
19	557.02	1.59
20	311.26	1.74
21	315.97	1.71
22	371.08	1.76
23	367.15	1.82
24	607.45	1.91
25	608.27	1.74
26	332.58	1.71
27	318.15	1.76
28	408.85	1.80
29	399.96	1.84
30	512.95	1.82
31	528.94	1.78
32	613.64	1.69

Çizelge 4.2. Devamı

33	611.77	1.63
34	529.32	1.63
35	524.59	1.93
36	523.37	1.89
37	525.88	1.92
38	326.18	1.95
39	327.67	1.94
40	636.55	1.94
41	677.73	1.69
42	434.84	1.74
43	425.29	1.77
44	326.47	1.80
45	338.07	1.80
46	351.98	1.86
47	345.9	1.84
48	356.98	1.61
49	359.23	1.80
50	508.44	1.62
51	502.79	1.58
52	313.71	1.58
53	314.63	1.91
54	364.39	1.74
55	370.74	1.71
56	489.12	1.76
57	493.21	1.80
58	345.06	1.84
59	349.21	1.85
60	1077.1	1.90

Çizelge 4.3. AAT3 aday transgenik bitkilerden elde edilen DNA'ların miktar ve kaliteleri

Örnek No	DNA Miktarı (ng DNA ul ⁻¹)	DNA Saflığı (A260/A280)
1	138,41	1.81
2	142,45	1.82
3	155,36	1.65
4	160,51	1.82
5	109,8	1.85
6	112,55	1.69

Çizelge 4.3. Devamı

7	33,97	1.76
8	31,92	1.80
9	513,79	1.84
10	526,57	1.82
11	505.45	1.78
12	610.59	1.69
13	622.62	1.89
14	547.37	1.86
15	533.76	1.85
16	268.93	1.90
17	270.68	1.92
18	566.12	1.74
19	430,81	1.84
20	426,42	1.82
21	144,54	1.78
22	144,32	1.69
23	58,9	1.82
24	58,95	1.91
25	41,13	1.74
26	34,03	1.71
27	36,15	1.76
28	168,87	1.82
29	166,61	1.71
30	631,94	1.80
31	713,27	1.68
32	695,77	1.83
33	508.44	1.89
34	502.79	1.86
35	313.71	1.86
36	314.63	1.81
37	364.39	1.82
38	326.18	1.65
39	327.67	1.82
40	636.55	1.85
41	677.73	1.69

Çizelge 4.4. AAT4 aday transgenik bitkilerden elde edilen DNA'ların miktar ve kaliteleri

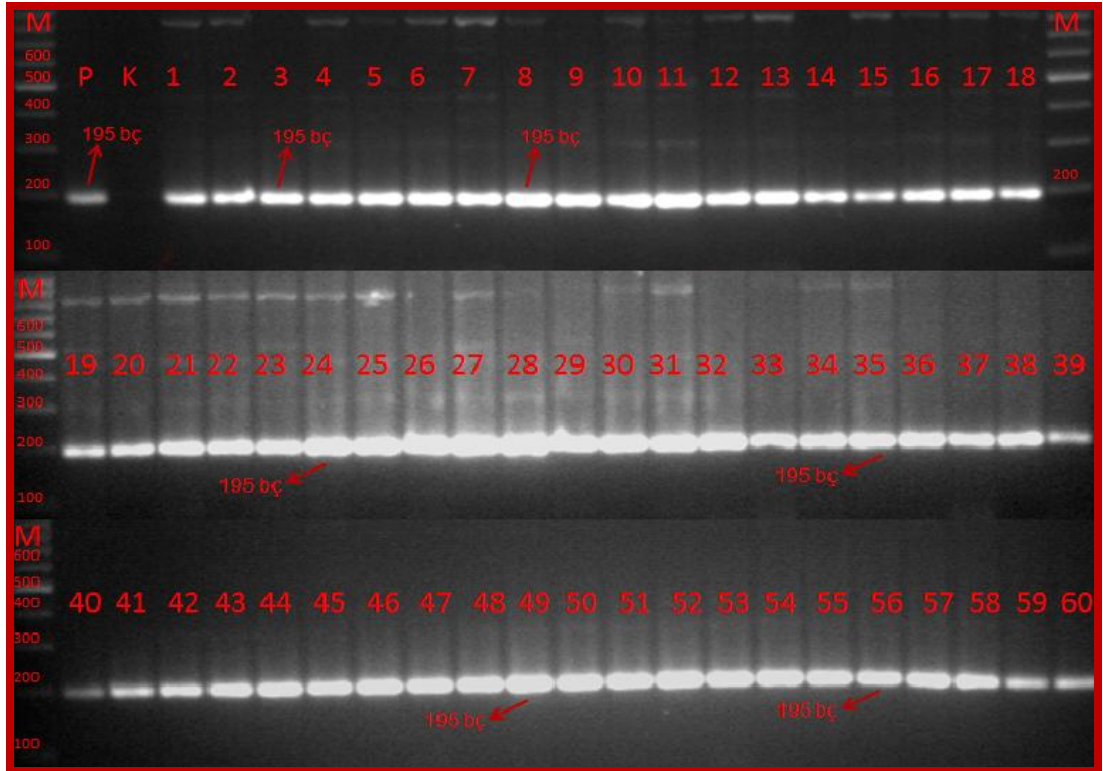
Örnek No	DNA Miktarı (ng DNA ul ⁻¹)	DNA Saflığı (A260/A280)
1	92,72	1.82
2	163,97	1.78
3	166,93	1.69
4	255,59	1.63
5	243,85	1.63
6	415,88	1.93
7	413,06	1.89
8	163,97	1.92
9	161,15	1.95
10	414,65	1.94
11	422,78	1.94
12	149,85	1.69
13	622.62	1.74
14	547.37	1.86
15	533.76	1.85
16	268.93	1.90
17	270.68	1.92
18	566.12	1.74
19	430,81	1.81
20	426,42	1.82
21	138,41	1.65
22	142,45	1.82
23	155,36	1.85
24	160,51	1.69
25	109,8	1.76
26	112,55	1.80
27	33,97	1.84
28	31,92	1.82
29	513,79	1.78
30	526,57	1.69

Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında DNA izolasyon aşaması son derece önemlidir. PCR uygulamalarında ise DNA'nın miktar ve özellikle saflığı amplifikasyon açısından daha da önem kazanmaktadır (Ergül, 2000). Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir DNA izolasyonu başarıyı önemli ölçüde

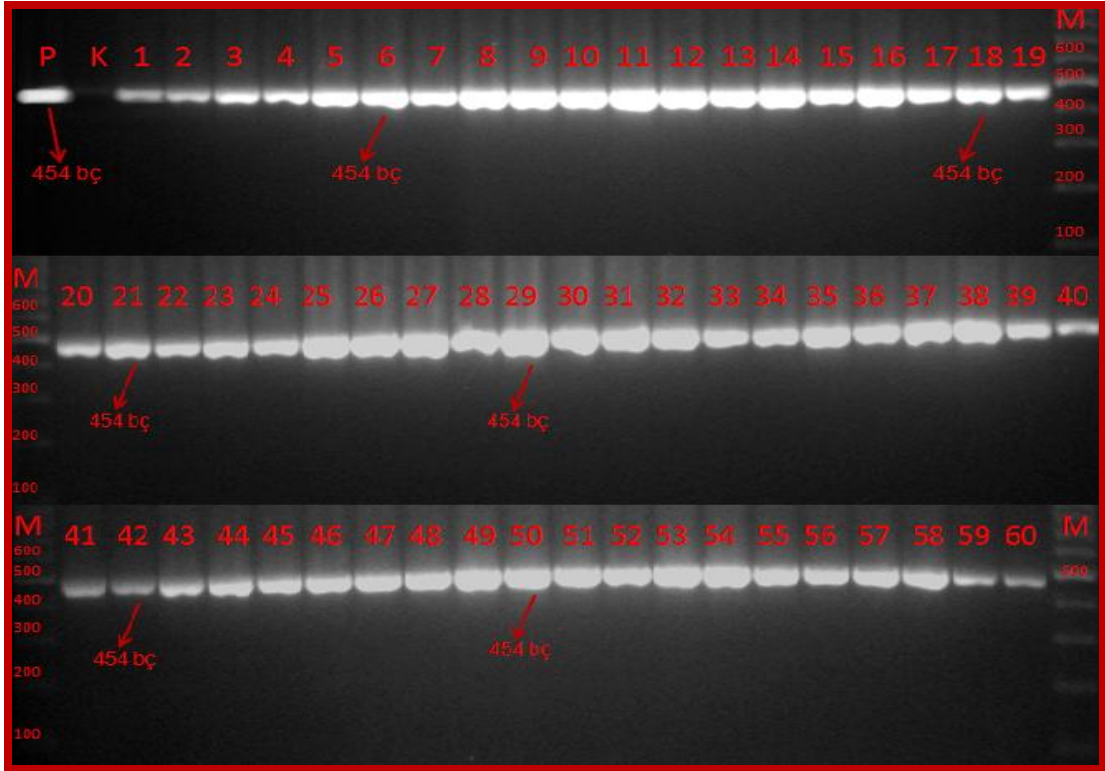
etkilemektedir. Çalışmada kullanılan kavun örneklerine ait DNA'lar incelendiğinde DNA miktarları oldukça yüksek bulunmuştur. DNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli DNA'larda saflığın A260/A280 oranının yaklaşık 2,0 civarında bulunması beklenmektedir. Elde edilen değer 2,0'den yüksek olması; örneğin RNA, kloroform ya da fenol ile kirli olduğunu ve 1,6 değerinden düşük olması ise örnek içerisinde proteinler ya da fenolik (polifenol) bileşikler bulunduğunun göstergesidir (Hoisington, 1992). Tez kapsamında izolasyonları gerçekleştirilen DNA'ların saflık oranları 1,61-1,94 arasında değişmiştir (Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4)

4.1.5.2 Cm-AAT1 Antisens Geni PCR Bulguları

Cm-AAT1 antisens geninin transformasyonu için kurulan deneme sonucunda toplam olarak 60 aday transgenik kavun bitkisi elde edilmiştir. Bu bitkilere ait DNA materyalleri ve transformasyonda kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinde bulunan plazmid içerisinde mevcut CaMV 35S promotor bölgesini çoğaltan ve antisens genin ekzon/intron bölgelerini çoğaltan sentetik PCR primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1,5'lük agaroz jelde koşularak görüntüleri UV ışığı altında çekilmiştir. AAT1 antisens geninin transformasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit amacıyla CaMV 35S promotor bölgesi için elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 4.9'da ekzon/intron bölgesi için elde edilen agaroz jel görüntüleri de Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil. 4.9. Cm-AAT1 antisens geni aktarılan bitkilerdeki CaMV 35S promotor bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Marker (100 bç), P: CaMV 35S promotor bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 195 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-38: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 39-60: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları



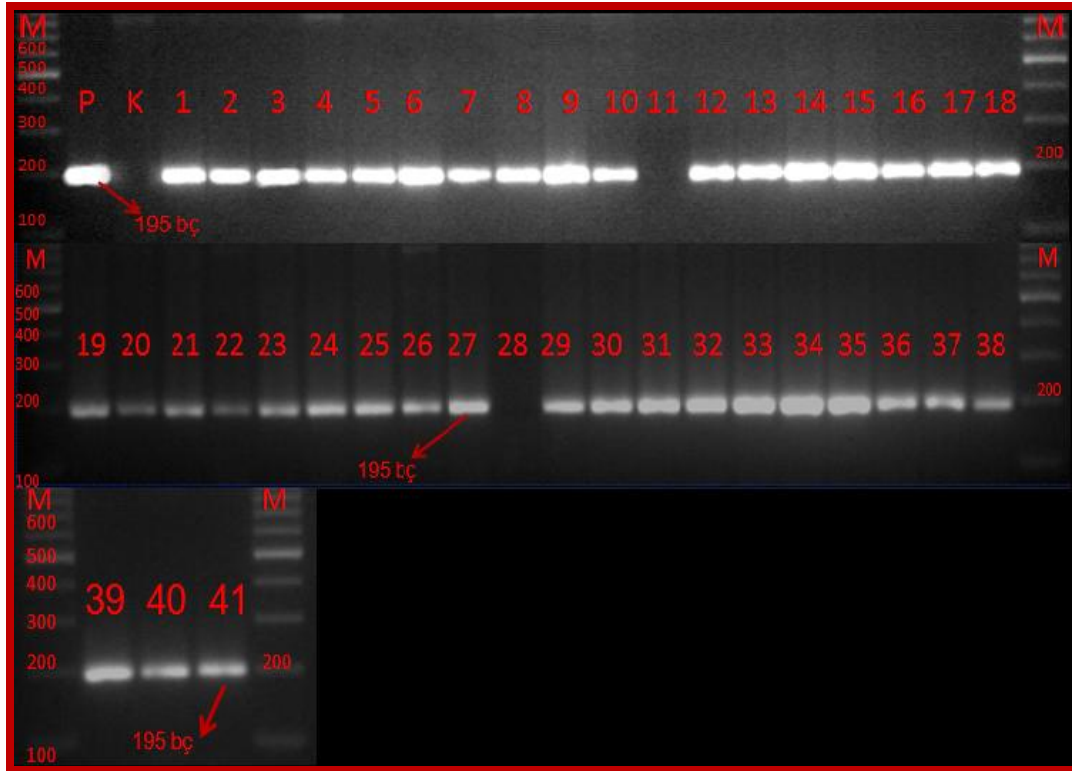
Şekil 4.10. Cm-AAT1 antisens geni aktarılan bitkilerdeki ekzon/intron bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Marker (100 bç), P: Ekzon/intron bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 454 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-38: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 39-60: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları

AAT 1 antisens geni için yapılan transformasyon çalışmalarından elde edilen aday transgenik bitkilere ait DNA profilleri incelendiğinde CaMV 35S promotor bölgesi için beklenen DNA bant büyüklüğü 195 bç'dir. Agaroz jel görüntüleri incelendiğinde jel üzerinde P şeklinde kodlanmış olan bakteriye ait plazmid DNA'dan elde edilen bant büyüklüğü 195 bç'dir. Bu örnek, denemenin pozitif kontrolü olarak alınmıştır. Öte yandan transformasyon çalışması yapılmamış ancak *in vitro*'da transformasyon çalışması yapılmış olan diğer materyaller gibi kültüre alınmış kavun materyalleri kontrol olarak kullanılmıştır. Agaroz jel üzerinde K harfi şeklinde gösterilmiştir. Jel görüntüleri incelendiğinde kontrol DNA'sına ait herhangi bir DNA bant profili gözlenmemiştir. Bu sonuç transformasyonu gerçekleşmemiş olan bu materyalde beklenen bir sonuçtur. Ancak diğer örneklerde beklenen DNA bant büyüklüğü olan 195 bç'inde DNA bant profilleri belirlenmiştir. Bu bulgular

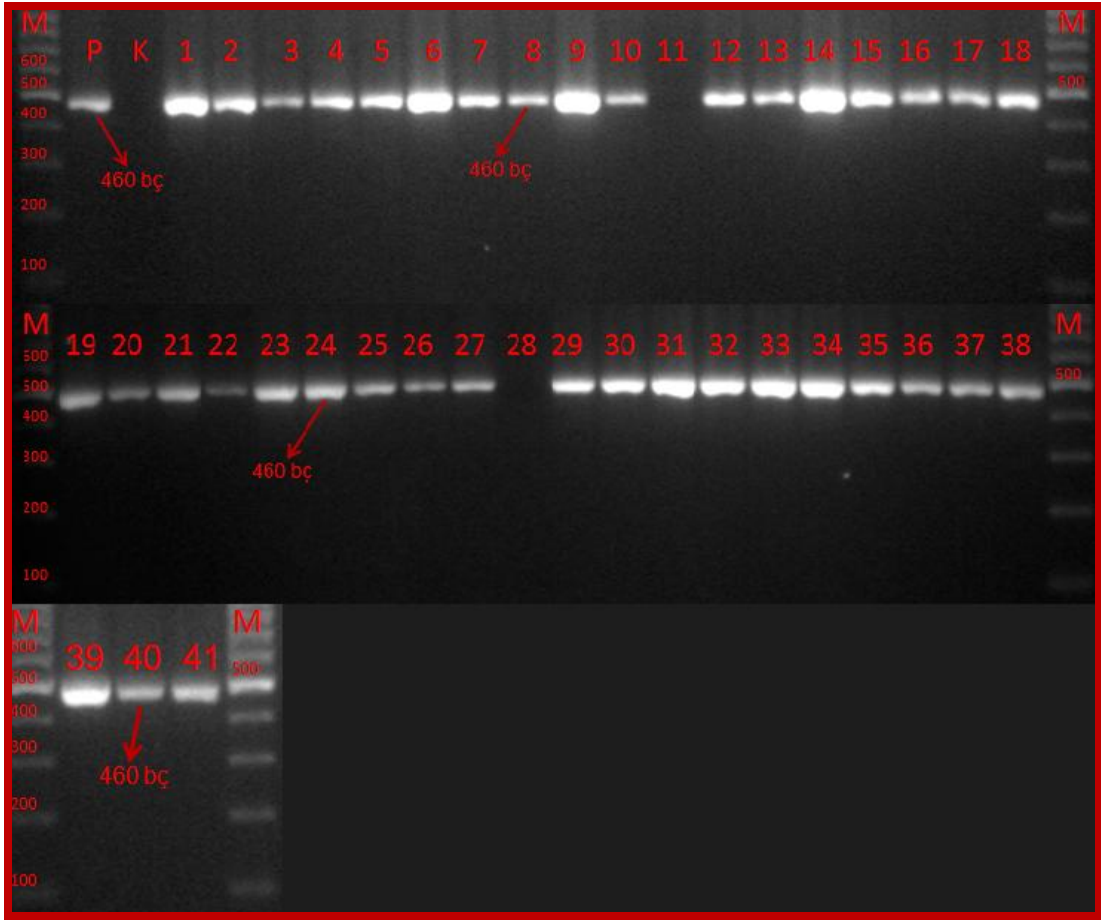
AAT1 antisens geni için yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda kültüre alınmış ve yaşamına devam etmiş olan kavun bitkilerinin tamamında CaMV 35S promotor bölgesinin aktarılmış olduğunu göstermektedir. AAT1 antisens geninin varlığını tespit etmek amacıyla aday transgenik bitkiler ile bu antisens geninin ekzon/intron bölgelerinin çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntülerinde jel üzerinde P harfi ile gösterilmiş olan Plazmid DNA'sı beklenen bant büyüklüğü olan 454 bp'inde DNA bantı vermiştir. Transformasyonu yapılmamış kontrol bitkisi ise beklenildiği üzere herhangi bir DNA bant profili vermemiştir. Çalışmada AAT1 antisens geninin transformasyonu sonucunda elde edilen 60 adet kavun örneğinde 454 bp olan beklenen DNA bant profilleri elde edilmiştir. AAT1 antisens geninin transformasyonu sonucu elde edilmiş olan 60 adet aday transgenik örneklerinde hem CaMV 35S promotor bölgesinin hem de antisens gene ait ekzon/intron bölgesinin varlığı PCR analizleri sonucunda başarıyla tespit edilmiştir. Bu sonuç örneklerimizin transgenik bitkiler olduğunu ispatlamaktadır.

4.1.5.3. Cm-AAT3 Antisens Geni PCR Bulguları

Cm-AAT3 antisens geninin transformasyonu için kurulan deneme sonucunda toplam olarak 41 adet aday transgenik kavun bitkisi elde edilmiştir. Bu bitkilere ait DNA materyalleri ve transformasyonda kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinde bulunan plazmid içerisinde mevcut CaMV 35S promotor bölgesini çoğaltan ve antisens genin ekzon/intron bölgelerini çoğaltan sentetik PCR primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1,5'lük agaroz jelde koşularak görüntüleri UV ışığı altında çekilmiştir. AAT3 antisens geninin transformasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit etmek amacıyla CaMV 35S promotor bölgesi için elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 4.11'de ekzon/intron bölgesi için elde edilen agaroz jel görüntüleri de Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Cm-AAT3 antisens geni aktarılan bitkilerdeki CaMV 35S promotor bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Marker (100 bç), P: CaMV 35S promotor bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 195 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-25: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 26-41: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları



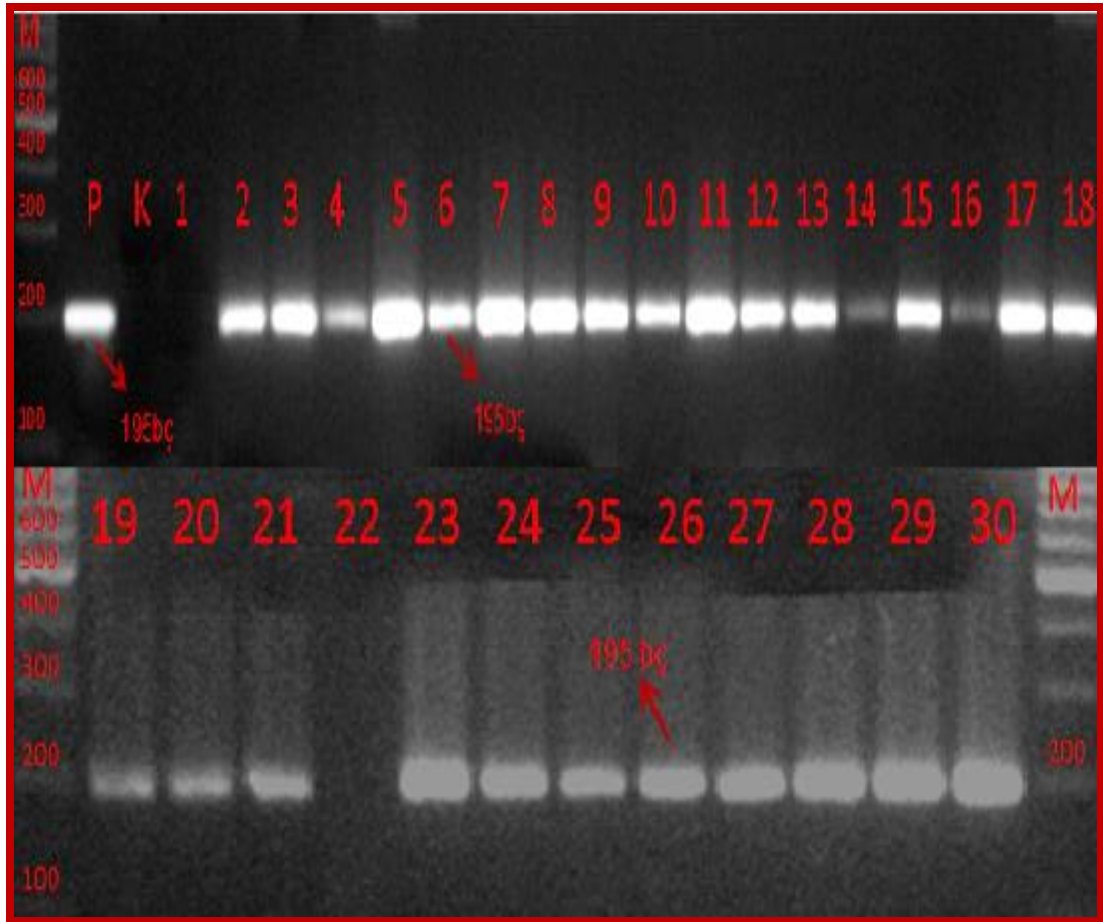
Şekil 4.12. Cm-AAT3 antisens geni aktarılan bitkilerdeki ekzon/intron bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Marker (100 bç) P: Ekzon/intron bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 460 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-25: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 26-41: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları

AAT3 antisens geni için yapılan denemede CaMV 35S promotor bölgesinin kontrol edildiği agaroz jel görüntüleri incelendiğinde jel üzerinde P şeklinde kodlanmış olan bakteriye ait Plazmid DNA'dan elde edilen bant büyüklüğü 195 bç'dir. Jel görüntüleri incelendiğinde K harfi ile gösterilmiş kontrol DNA'sına ait herhangi bir DNA bant profili gözlenmemiştir. Bu sonuç transformasyonu gerçekleşmemiş olan bu materyalde beklenen bir sonuçtur. Ancak diğer örneklerde beklenen DNA bant büyüklüğü olan 195 bç'inde DNA bant profilleri belirlenmiştir. Yalnızca 11 ve 28 numaralı örneklerde DNA bant profilleri gözlenmemiştir. Bu bulgular AAT3 antisens geni için yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda kültüre alınmış ve yaşamına devam etmiş olan 11 ve 28 numaralı örnekler dışındaki

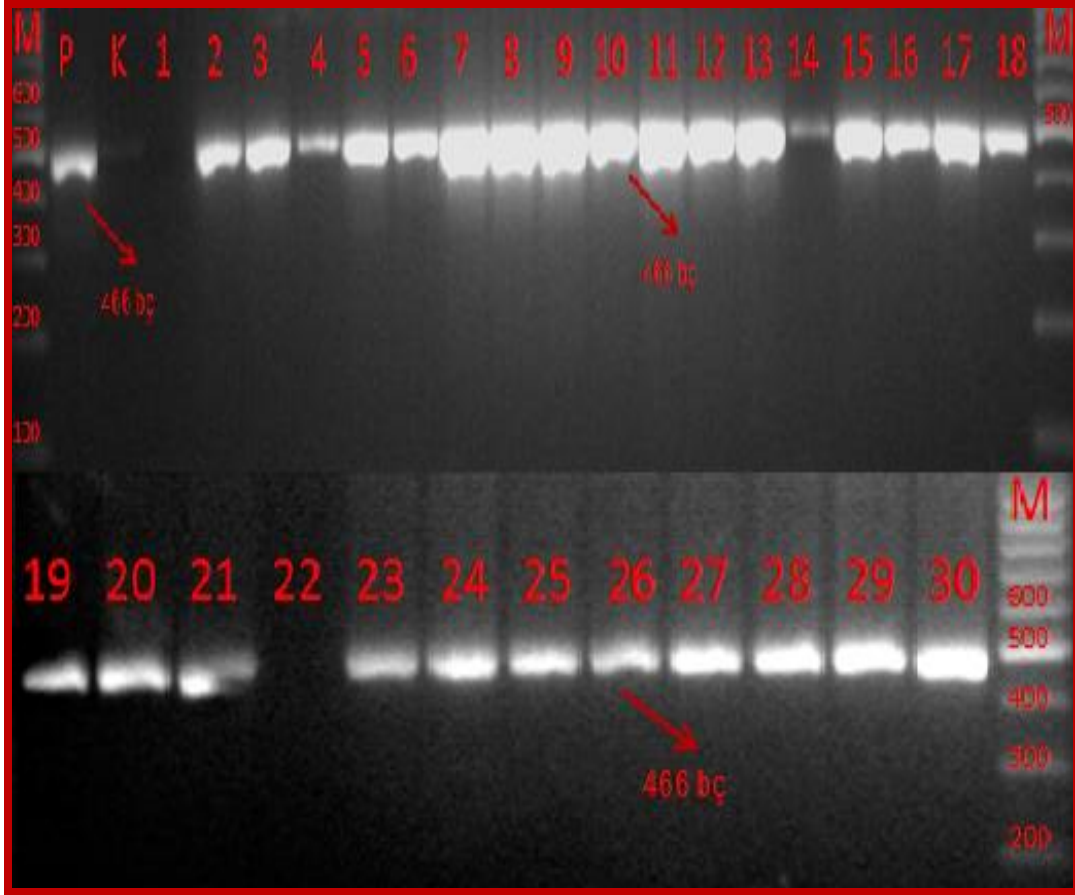
kavun bitkilerinin tamamında CaMV 35S promotor bölgesinin aktarılmış olduğunu göstermektedir. AAT3 antisens geninin varlığını tespit etmek amacıyla aday transgenik bitkiler ile bu antisens geninin ekzon/intron bölgelerinin çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntülerinde jel üzerinde P harfi ile gösterilmiş olan Plazmid DNA'sı beklenen bant büyüklüğü olan 460 bp'inde DNA bantı vermiştir. Transformasyonu yapılmamış kontrol bitkisi ise beklenildiği üzere herhangi bir DNA bant profili vermemiştir. Çalışmada AAT3 antisens geninin transformasyonu sonucunda elde edilen 41 adet kavun örneğinin 39'unda 460 bp olan beklenen DNA bant profili elde edilmiştir. AAT3 antisens geninin transformasyonu sonucu elde edilmiş olan 41 adet aday transgenik örneklerinin 39'unda hem CaMV 35S promotor bölgesinin hem de antisens gene ait ekzon/intron bölgesinin varlığı PCR analizleri sonucunda başarıyla tespit edilmiştir. Bu sonuç örneklerimizin transgenik bitkiler olduğunu göstermektedir.

4.1.5.4. AAT4 Antisens Geni PCR Bulguları

AAT4 antisens geninin transformasyonu için kurulan deneme sonucunda toplam olarak 30 adet aday transgenik kavun bitkisi elde edilmiştir. Bu bitkilere ait DNA materyalleri ve transformasyonda kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinde bulunan plazmid içerisinde mevcut CaMV 35S promotor bölgesini çoğaltan ve antisens genin ekzon/intron bölgelerini çoğaltan sentetik PCR primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1,5'lük agaroz jelde koşularak görüntüleri UV ışığı altında çekilmiştir. AAT4 antisens geninin transformasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit etmek amacıyla CaMV 35S promotor bölgesi için elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 4.13'de ekzon/intron bölgesi için elde edilen agaroz jel görüntüleri de Şekil 4.14.'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Cm-AAT4 antisens geni aktarılan bitkilerdeki CaMV 35S promotor bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Marker (100 bç), P: CaMV 35S promotor bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 195 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-16: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 17-30: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları



Şekil 4.14. Cm-AAT4 antisens geni aktarılan bitkilerdeki ekzon/intron bölgesinin DNA'larının PCR profilleri, M: Marker (100 bç) ,P: Ekzon/intron bölgesini içeren plazmid DNA'sı (Pozitif kontrol, 466 bç), K: Transforme edilmemiş kavun DNA'sı (Kontrol), 1-16: Aday transgenik kavun proksimal DNA'ları, 17-30: Aday transgenik kavun kotiledon DNA'ları

AAT4 antisens geni için yapılan denemede CaMV 35S promotor bölgesinin kontrol edildiği agaroz jel görüntüleri incelendiğinde jel üzerinde P şeklinde kodlanmış olan bakteriye ait plazmid DNA'dan elde edilen bant büyüklüğü 195 bç'dir. Jel görüntüleri incelendiğinde K harfi ile gösterilmiş kontrol DNA'sına ait herhangi bir DNA bant profili gözlenmemiştir. Bu sonuç transformasyonu gerçekleşmemiş olan bu materyalde beklenen bir sonuçtur. Ancak 1 ve 22 numaralı örnekler dışındaki diğer tüm örneklerde beklenen DNA bant büyüklüğü olan 195 bç'inde DNA bant profilleri belirlenmiştir. Yalnızca 1 ve 22 numaralı örneklerde DNA bant profilleri gözlenememiştir. Bu bulgular AAT4 antisens geni için yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda kültüre alınmış ve yaşamına devam etmiş olan

1 ve 22 numaralı örnekler dışındaki kavun bitkilerinin tamamında CaMV 35S promotor bölgesinin aktarılmış olduğunu göstermektedir. AAT4 antisens geninin varlığını tespit etmek amacıyla aday transgenik bitkiler ile bu antisens geninin ekzon/intron bölgelerinin çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntülerinde jel üzerinde P harfi ile gösterilmiş olan plazmid DNA'sı beklenen bant büyüklüğü olan 466 bp'inde DNA bantı vermiştir. Transformasyonu yapılmamış kontrol bitkisi ise beklenildiği üzere herhangi bir DNA bant profili vermemiştir. Çalışmada AAT4 antisens geninin transformasyonu sonucunda elde edilen 30 adet kavun örneğinin 28'inde 466 bp olan beklenen DNA bant profili elde edilmiştir. AAT4 antisens geninin transformasyonu sonucu elde edilmiş olan 30 adet aday transgenik örneklerinin 28'inde hem CaMV 35S promotor bölgesinin hem de antisens gene ait ekzon/intron bölgesinin varlığı PCR analizleri sonucunda başarıyla tespit edilmiştir. Bu sonuç örneklerimizin transgenik bitkiler olduğunu doğrulamaktadır.

4.2. Tartışma

Kavunda farklı aroma özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla yapılan bu tez çalışmasında AAT (1, 3 ve 4) antisens genlerinin *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla Vedrantaıs kavun genotipine genetik transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Genetik transformasyon öncesi ve sonrasında bitki doku kültürü işlemlerinden yararlanılmıştır. Bu amaçla kavun tohumlarının çimlendirilmesi, çimlenen tohumların transformasyonda kullanılması, transformasyon sonrasında tohumların proksimal ve kotiledon kısımlarının kültüre alınması, kültüre alınan materyallerden rejenerasyon eldesi, elde edilen rejenerantlardan da sürgün oluşumu gerçekleştirilmiştir. Her üç gen içinde rejenerasyon bulguları incelendiğinde rejenerasyon oranlarının proksimal eksplantlarda daha yüksek olduğu görülmüştür. Proksimal ve kotiledon eksplantlardan kallus oluşumuna bakıldığında ise her üç gen için de kotiledon eksplantlardan elde edilen kallus değerlerinin daha önemli olduğu tespit edilmiştir. Rejenerantlardan sürgün eldesine bakıldığında ise her üç gen içinde proksimal eksplantların başarılı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar SPSS bilgisayar paket programı ile istatistiksel olarak doğrulanmıştır. Transformasyon çalışmalarında

materyal olarak kavun tohumlarının apikal meristemi uzaklaştırılmış proksimal ve kotiledon kısmı olmak üzere iki eksplant kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Deneme sonucunda her üç gen içinde transgenik bitkiler elde edilmiştir. Transformasyon için tohum uygulanabilirliği kolay bir materyal olmasına rağmen bazı çalışmalarda gen aktarımı için farklı bitki dokularıda kullanılmıştır. Guis ve ark., (2000)' de yaptıkları gen aktarımı çalışmasında bitkisel materyal olarak kotiledon yapraklarını kullanarak ACC oksidaz antisens genini aktarmışlardır. Bu sonuç tohum materyallerine ek olarak farklı eksplant kaynaklarıyla da çalışılabileceğini göstermektedir. Bordas ve ark., (1997)'de yaptıkları transformasyon çalışmasında Pharo kavun çeşidinin hem gerçek yapraklarından hem de kotiledon yapraklarından, *Amarillo canario* çeşidinin ise yalnızca gerçek yapraklarından aldıkları parçaları 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 kullanıldığında ise transformasyon oranının %13 olarak gerçekleştiğini bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında ise transformasyon sonrası elde edilen bitkilerin %100' e yakını transgenik olarak bulunmuştur. Yoko ve ark., (2003)'de, 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 %80 oranında Vedrantais genotipinde başarı elde etmişler. *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım çalışmalarında doku kültürü koşullarının ve farklı besi ortamlarının ve yöntemlerinin kullanılmasının *in vitro*'da bitki elde etmede çok önemli olduğu görülmüştür. Bu tezde Vedrantais genotipinden organogenesis ile başarılı bir şekilde yeni bitkiler elde edilmiştir.

Rejenerasyon ve transformasyon esnasında Ayub ve ark., (1996)'larının 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 rejenerasyon ve transformasyon gelişimleri arttırılmıştır. Bordas ve ark., (1997)'de *Amarillo canario*

çeşidinin gerçek yapraklarının eksplant olarak kullanıldığı ve 200 µM asetosiringon kokültivasyon ortamına ilave edildiğinde veya hem bakteri çoğaltma ortamında hem de kokültivasyon süresi boyunca ortama eklendiğinde ya da asetosiringon eklenmediğinde elde ettikleri transformasyon oranının sırasıyla % 0.7, % 13 ve % 0 olduğunu bildirmektedirler. Transformasyon çalışmaları esnasında asetosiringon kullanılmasının transformasyon etkinliğini arttırdığı birçok araştırmacı tarafından da belirtilmiştir.

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.

AAT (1, 3 ve 4) antisens genlerinin tespiti için aday transgenik bitkilerde gerçekleştirilen moleküler çalışmalarda CaMV 35S promotor bölgesi ve ekzon/intron bölgeleri sentetik primerlerle başarılı bir şekilde taranmıştır. AAT1 antisens geni için yapılan PCR çalışmaları sonucunda 60 adet aday transgenik kavun bitkisinde CaMV 35S promotor bölgesi için beklenen DNA bantı büyüklüğü olan 195 bp tüm bitkilerde elde edilmiştir. Ekzon/intron bölgesi için yapılan taramalarda beklenen DNA bant büyüklüğü olan 454 bp bant profili bütün bitkilerde görülmüştür. AAT1 antisens geni için bu iki spesifik primerle yapılan taramada bu genin *A. tumefaciens* aracılığıyla kavun bitkilerine plazmid DNA üzerinde bulunan T DNA bölgesinin başarılı bir şekilde aktarıldığı sonucuna varılmıştır. AAT3 antisens geninin aday transgenik bitkilerde varlığını belirlemek amacıyla yine CaMV 35S promotor bölgesini çoğaltan primer çifti ile ekzon/intron bölgesini çoğaltan spesifik primerler kullanılmıştır. 41 adet aday transgenik bitkinin taranmasında kullanılan iki farklı primer setinde sadece 11 ve 28. örneklerde beklenen bant büyüklükleri sırasıyla CaMV 35S promotor için 195 bp ve ekzon/intron bölgesi için 460 bp görülmemiştir (Şekil 4.12., Şekil 4.13.). 11 ve 28. örnekler hariç diğer 39 adet aday transgenik kavun örneklerinde istenilen bantlar elde edilmiştir ve bu örneklerin transgenik oldukları görülmüştür. AAT4 antisens geni içinde transformasyon sonucu elde edilen

30 adet aday transgenik bitki örneğinden sadece 1 ve 22 numaralı örneklerden PCR taraması ile CaMV 35S promotor için 195 bp ve ekzon/intron için 466 bp büyüklüğünde DNA bant profilleri görülememiştir. Diğer 28 örnek için beklenen DNA bant profilleri elde edilmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tez çalışmasında Charentais kantaloop kavunlarına ait tohum örnekleri kullanılarak AAT1, 3 ve 4 genlerinin transformasyonları *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda toplam olarak kullanılan 1200 tohuma ait eksplantlardan gelişen bitkilerden AAT1 geni için 60 transgenik bitki, AAT3 geni için 39 transgenik bitki, AAT4 geni için ise 28 adet transgenik bitki elde edilmiş, elde edilen bu bitkiler PCR analizleriyle doğrulanmıştır. Transformasyon etkinlikleri ise sırasıyla AAT1 antisens geni için %2,5 oranında, AAT3 antisens geni için %1,7 oranında AAT4 antisens geni için ise %1,25 olarak bulunmuştur. Transformasyon sonrasında kavun genotiplerine ait tohumların kotiledon ve proksimal kısımları kültüre alınmış ve bu eksplantlardan elde edilen rejenerantlar her üç gen içinde proksimal eksplantlarda istatistiki olarak daha önemli çıkmıştır. Rejenerantların sürgüne dönüşme oranları incelendiğinde ise yine her üç gen içinde proksimal eksplantlar öne çıkmış ve istatistiki olarak doğrulanması yapılmıştır.

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 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 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 verilerin çok az olması ve *in vivo* çalışmalarda kavunda aroma sentez mekanizmasının tam olarak bilinmemesinden dolayı yapılan bu

çalışmada elde edilen veriler ile ileride elde edilecek transgenik bitkilerden yapılacak analizlerle, kavunda aroma sentez mekanizmasının aydınlatılmasında çok önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında kavunda aroma sentezinden sorumlu olan Cm-AAT genleri, ticari rekombinant RNAi pFGC5941 plazmidi içeren *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla Vedrantais 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. Çalışmanın devamında transformasyonu yapılan AAT (1, 3 ve 4) genleri başarıyla Vedrantais genotipine aktarılmış ve transgenik kavun bitkileri elde edilmiştir.

Elde edilen bulgular ışığında ileride yapılması önerilen çalışmalar;

1. Rejenerasyon ve transformasyon kapasitesi, farklı hormon ve hormon konsantrasyonları denenerek araştırılmalıdır.
2. Transformasyon ve doku kültürü sonucunda elde edilecek transgenik hatların flow sitometri ile ploidi testleri yapılmalıdır.
3. Transgenik olduğu tespit edilen bitkilerin sera koşullarına adaptasyonu sağlanmalı, Basta herbisiti (PPT) uygulaması yapılmalı ve transgenik kavun hatlarının seçimi yapılmalıdır.
4. Kavun bitkilerine aktarılan AAT antisens genlerinin Real-Time (eş zamanlı) PCR ile ifadelerinin ne kadar baskılandığına bakılmalıdır.
5. Elde edilen transgenik kavun hatlarından elde edilecek meyvelerden aroma analizleri yapılmalıdır. Ayrıca alkol açıl transferaz enziminin gaz kromatografisi yöntemiyle kantitatif analizleri de yapılmalıdır.
6. AAT gen ailesinin susturulmasıyla kavunda aromanın nasıl değiştiği buna bağlı olarak da aromanın muhafaza ve raf ömrü arasındaki ilişki araştırılmalıdır.
7. Bu çalışma kavunda raf ömrünün ve muhafaza süresinin uzatılmasına yönelik diğer derim sonrası biyoteknoloji 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., VANHOUWELINGEN, A.M.M.L., DEVOS, R.C.H., VANDERVOET, H., JANSEN, R.C., GUÍS, 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 Susturmak. www.genbilim.com
- _____, 2007. siRNA ve İşlevsel Genomik Uygulamalar. www.gmbae.tubitak.gov.tr/tur/populer/.
- _____, 2008. Vedrantaís, <http://www.amazon.com/Vedrantaís-Charentaís-Melon-Seeds-ADDITIONAL/dp/B000WJBREW>.
- AYUB, R., GUIS, 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.
- _____,1999. Bazı Kavun (*Cucumis melo* L.) Çeşitlerinde *In vitro* Rejenerasyon ve Genetik Transformasyon Üzerine Araştırmalar. *Ç.Ü.Fen Bilimleri Enstit. Doktora Tezi, Adana, 271s.*

- _____, ÇETİNER, S., ELMAN, C., XIA, X., WANG, Y., YEHEKEL, A., ZILBERSTEIN, L., PERL-TREVES, R., WATAD, A.A., GABA, A.A., 2005. Transformation of Recalcitrant Melon (*Cucumis melo L.*) Cultivars is Facilitated by Wounding with Carborundum. Eng. Life Sci. 5, No. 2.
- 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.
- ERGÜL, A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera L. cvs.*) genomik DNA Parmak İzi Analizi ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- 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
- _____, EL YAHYAOUI, 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.
- HOISINGTON, D., 1992. Laboratory protocols. CIMMITY Applied Molecular Genetics Lab. Mexico, D.F. CIMMITY.
- JEFFREY, C. 1980. A Review of Cucurbitaceae. *J. Linn. Soc., Bot.* 81: 233-247.
- KOCAMAN, 2009. Kavun'da (*Cucumis melo L. var cantalupensis Naud*) Aroma Sentezinden Sorumlu Cm-ADH Genlerinin Transformasyon Etkinliklerinin Araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Adana, s:62
- KARABOZ, İ., ÇOLAK, C., 2007. Antisens Teknolojisi Orlab 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 is *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 genaration 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.

- _____, 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.
- 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.
- _____, 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..
- WITRZENS, B., BRETTELL, R.I.S., MURRAY, F.R., MCELROY, D., LI, Z. AND DENNIS, E. S., AUS. J., 1998. *Plant Physiol.* 25, 39–44.
- WU, HUI-WEN., TSONG-ANN, YU., JOSEPH, A., J. RAJA HUI-CHIN WANG SHYI-DONG YEH., 2009. Generation of transgenic oriental melon resistant to Zucchini yellow mosaic virus by an improved cotyledon-cutting method. *Plant Cell Rep.* 28:1053–1064.
- YAHYAOU, F., WONGS-AREE, C., LATCHÉ, A., HACKETT, R., GRIERSON, D. and 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 ‘Kırkağac 637’ a Recalcitrant Melon (*Cucumis melo* L.) Cultivar with ZYMV Coat Protein Encoding Gene. *Europ. J. Hort. Sci.* 6.
- _____, İPEK M., SERBEST-KOBANER S., KÜKÜRT E., 2004b. Kırkağaç 637 Kavun (*Cucumis melo* L.) Çeşidinde Rejenerasyonun Optimizasyonu. *Alatırım*, 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

1982 yılında Adana doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da 2000 yılında tamamladı. 2002 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2006 yılında Biyolog ünvanı ile mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Şu anda Yüksek Lisans programına devam etmektedir.

EKLER

Ek 1. Çalışmada Kullanılan Plazmid DNA Üzerinde Bulunan Antisens Genlerin Dizileri

CM-AAT1

AGAATCACTTTTCGCCACTATGAATACGACCAAGTAGTCGACATGAAGAGCGGCCTCATGCC
AGTCAATAGCAAGATCGATCAATTATTCTTCTTTAGCCAACCTCAAATCTCCACCCTTCGCC
AAACTTTGCCAGCCACCTTCACGATTGCCCTTCCTTCGAGGTCCTCACTGCCTATGTTTGG
CGCCTCCGTACCATAGCCCTTCAATTTAAGCCAGAGGAGGAAGTGCGGTTTCTTTGCGTAAT
GAATCTACGCTCGAAGATCGACATACCATTAGGGTATTATGGTAATGCGGTAGTTGTTCCCTG
CAGTAATCACCACCGCTGCGAAGCTTTGTGGGAACCCACTTGGTTATGCTGTAGAC

CM-AAT3

AAAGTTACATGTCATCATCGCGAGTACGATGAAGTTGTGATACCAAAGGCACTATCATCCC
GCTTGATGACATGGCACATCGGTCCTTTTCTTTGGCCCATCCGAGATCTCTGCTATCCGTA
AGGCCTTACCTAGCCACCTTCGTCACTGCTCTTCCTTTGAGGTCCTCACTGCTTGCCCTG
CGCTTCCGCACTATATCTCTCCAGCCCGATCCCGAAGAGGAAGTGCAGTACTCTGCATCGT
CAACTCTCGCTCCAAGTTCAACCCTCCATTGCCAACCGGATATTACGGTAACGCGTTTGCTT
TTCCAGTAGCACTGACGACTGCAGGGAAGCTTTGTCAAACCCATTAGGGTATGCTTTGGAA

CM-AAT4

CCTTTTCATCAAAGTCTGATCAATAATGATAAAGCAGTTGTACCCCGTCGAGTATTTTCAA
TCGTAAACGTCGTTTTCAAAGATTCGTGTTCCGATCAGAAAGCGATATTAGACCTTAAAGCTA
AAGCAAATCCTGTGATATAACCAAATCCAACATGTGTTGAAACACTAACATGCTTTTATTGG
AAATATCTCATGAAAGTTGCCGATGATGGTGATTCTCAAAGGCCATCAACTTTGTCTCATGT
TGTAACATCAGAAAGATGTTAGAACCATCATTTGGGTGAAGTTTCTTTAGGAAACATTATGT
GGGGCACAGTTGCTCATCATTTTTCAACCACAAGGAATGAAGAATTTGAGGGTTTGGAGCTG
AGTAAA

Ek 2. Çalışmada Kullanılan Ticari Plazmid DNA' nın Dizisi

pFGC5941 (11406 bç)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATA
ACACATTGCGGACGTTTTAATGTACTGAATTAACGCCGAATTAATTCGA
GCTCGGATCTGATAATTTATTTGAAAATTCATAAGAAAAGCAAACGTTAC
ATGAATTGATGAAACAATACAAAGACAGATAAAGCCACGCACATTTAGGA
TATTGGCCGAGATTACTGAATATTGAGTAAGATCACGGAATTTCTGACAG
GAGCATGTCTTCAATTCAGCCCAAATGGCAGTTGAAATACTCAAACCGCC

CCATATGCAGGAGCGGATCATTTCATTGTTTGGTTGCGCTTTGCCAAC
ATGGGAGTCCAAGATTCTGCAGTCAAATCTCGGTGACGGGCAGGACCGGA
CGGGGCGGTACCGGCAGGCTGAAGTCCAGCTGCCAGAAACCCACGTCATG
CCAGTTCCCGTGCTTGAAGCCGGCCCGCCGACGATGCCGCGGGGGGCAT
ATCCGAGCGCCTCGTGCATGCGCACGCTCGGGTTCGTTGGGCAGCCCGATG
ACAGCGACCACGCTCTTGAAGCCCTGTGCCTCCAGGGACTTCAGCAGGTG
GGTGTAGAGCGTGGAGCCCAGTCCCGTCCGCTGGTGGCGGGGGAGACGT
ACACGGTCGACTCGGCCGTCCAGTTCGTAGGCGTTGCGTGCCTTCCAGGG
CCCGCGTAGGCGATGCCGGCGACCTCGCCGTCCACCTCGGCGACGAGCCA
GGGATAGCGCTCCCGCAGACGGACGAGGTCGTCCGTCCACTCCTGCGGTT
CCTGCGGCTCGGTACGGAAGTTGACCGTGCCTTGTCTCGATGTAGTGGTTG
ACGATGGTGCAGACCCCGGCATGTCCGCCTCGGTGGCAGCGCGGATGTC
GGCCGGGCGTTCGTTCTGGGCTCATCGATTTCGATTTGGTGTATCGAGATTG
GTTATGAAATTCAGATGCTAGTGAATGTATTGGTAATTTGGGAAGATAT
AATAGGAAGCAAGGCTATTTATCCATTTCTGAAAAGGCGAAATGGCGTCA
CCGCGAGCGTACGCGCATTCCGTTCTTGCTGTAAAGCGTTGTTTGGTAC
ACTTTTGACTACGCGAGGCTTGGCGTGTGACGATCTATTCAAAGTTCGT
TAATTGGCTGCGGATCAAGAAAAAGTTGGAATAGAAAACAGAATACCCGCGA
AATTCAGGCCCCGTTGCCATGTCTACACGCCGAAAATAAACGACCAAAT
AGTAGAAAAATAAAAACTGACTCGGATACTTACGTCACGTCCTTGCGCACT
GATTTGAAAAATCTCAGAATTTCAATCCACAAAAATCTGAGCTTAACAG
CACAGTTGCTCCTCTCAGAGCAGAATCGGGTATTCAACACCCTCATATCA
ACTACTACGTTGTGTATAACGGTCCACATGCCGGTATATACGATGACTGG
GGTTGTACAAAGGCGGCAACAAACGGCGTTCCCGGAGTTGCACACAAGAA
ATTTGCCACTATTACAGAGGCAAGAGCAGCAGCTGACGCGTACACAACAA
GTCAGCAAACAGACAGGTTGAACTTCATCCCCAAAGGAGAAGCTCAACTC
AAGCCCAAGAGCTTTGCTAAGGCCCTAACAAGCCCACCAAAGCAAAAAGC
CCACTGGCTCACGCTAGGAACCAAAAGGCCACGAGTGATCCAGCCCCAA
AAGAGATCTCCTTTGCCCGGAGATTACAATGGACGATTTCTCTATCTT
TACGATCTAGGAAGGAAGTTTGAAGGTGAAGGTGACGACACTATGTTTAC
CACTGATAATGAGAAGGTTAGCCTCTTCAATTTTCAAGAAAGATGCTGACC
CACAGATGGTTAGAGAGGCCTACGCAGCAGGTCATCAAGACGATCTAC
CCGAGTAAACAATCTCCAGGAGATCAAATACCTTCCCAAGAAGGTTAAAGA
TGCAGTCAAAGATTGAGACTAATTTGCATCAAGAACACAGAGAAAAGACA
TATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAGGCTTG
CTTCATAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAAGGTAGT
TCCTACTGAATCTAAGGCCATGCATGGAGTCTAAGATTCAAATCGAGGAT
CTAACAGAACTCGCCGTGAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTTTT
ACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACA
CTCTGGTCTACTCCAAAAATGTCAAAGATACAGTCTCAGAAAGACCAAAG
GCTATTGAGACTTTTTCAACAAAGGATAATTTCCGGAAACCTCTCGGATT
CCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAG
GTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCATTCAA
GATCTCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAG
CATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCCTCAAAGCAAGTGGATT
GATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCT
TCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTTCAATTTTCAATTTGGAGAGGAC
ACGCTCGAGTATAAGAGCTCTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAA
ACAACAACAACATTACAATTACATTTACAATTACCATGGGGCGCGCCCA
ATCGATGATTTAAATGTGTAAGAATTTCTTATGTTACATTTACATTC
ACGTTTTATCTTAATTGGCTCTTCATTTGATTGAAATTTGACAATTTATTT
CTTGTTTTTTTTTTGTACACTCTTTTTGGGTTGGGGTGGCCGACGAAT
TTTGGGAAGGTAGAAGAGGGGAGGACTTTTTGTTATACTCCATTAGTAAT
TACTGTTTTCCGTTTTCAATTTATGTGACAATATTTCTTTTTTAGTCCGTTT
CAAAAGAAAATGTGAGCATTATAACAATTTAATTTTTGAAATTACAATTT
TGCCATTAATAAAATGATTTACAACCACAAAAGTATCTATGAGCCTGTTT

GGGTGGGCTTATAAGCAGCTTATTTTAAAGTGGCTTATAAGTCAAAAAGTG
ACANTTTTTGAGAAGTTAGAAAATCCTAACTTCTCAAAAAGTAGCTTTTFA
AGCCACTTATGACTTATAAGTCCAAAAATTTTAAAGTTACCAAACATATA
TTAATGGGTTTATAAGCTTATAAGCCACTTTTAAAGCTCACCCAAACGGGT
TCTATGTCTCACTTTAGACTACAAAATTTTAAAAAGTCTTCATTTATTTCTT
AATCTCCGTGGCGAGTNAAACTATAACACATAAAAGTGAAACGGAGGGAAT
AAGATGGAGTCATAAACTAATCCAAATCTATACTCTCTCCGTTAATTTGT
TTTTTAGTTTGATTTGGTACATTAATAAAAACAGATTTTTTCGAAGGTTATA
AACACAGACAGATGTTTCCCAGCGAGCTAGCAAAAATCCAAGATTTCTGT
CGAAAATTCGTGTGTTTCTAGCTAGTACTTGATGTTATCTTTAACCTTTT
AGTAATTTTTTGTCCTTTTCTTTCTATTTTTTCATCTTACAATGAATTATG
AGCAAGTTCCTTAAAGTAGCATCACACGTGAGATGTTTTTTATGATATGA
CTAAATCCAATCTTTACCATTCTTAACTAGTAAAATACAACACATGTTA
ATTGATACATTGCTTAACTGAGGTTAGAAAATTTTAGAAAATTAGTTGT
CCAAATGCTTTGAAATTAGAAAATCTTTAATCCCTTATTTTTTTTTAAAAAT
GTTTTTCTCACTCCAAAGAAAGAGAACTGACATGAAAGCTCAAAAAGAT
CATGAATCTTACTAACTTTGTGGAATAAATGTACATCAGAATGTTTCTG
ACATGTGAAAATGAAAGCTCTTAATTTTCTTCTTTTATTTATTGAGGGTT
TTTGCATGCTATGCATTCATTTGAGTACTTTAAAGCACCTATAAAACACT
TACTTACACTTGCCTTGGAGTTTATGTTTTAGTGTTCCTTCACATCTTT
TTTGGTCAATTTGCAGGTATTTGGATCCTAGGTGAGTCTAGAGAGTTAAT
TAAGACCCGGGACTAGTCCCTAGAGTCTGCTTTAATGAGATATGCGAGA
CGCCTATGATCGCATGATATTTGCTTTCAATTCTGTTGTGCACGTTGTAA
AAAACCTGAGCATGTGTAGCTCAGATCCTTACCGCCGGTTTCGGTTCATT
CTAATGAATATATCACCCGTTACTATCGTATTTTTATGAATAATATTTCTC
CGTTCAATTTACTGATTGTACCCTACTACTTATATGTACAATATTTAAAAT
GAAAACAATATATTGTGCTGAATAGGTTTATAGCGACATCTATGATAGAG
CGCCACAATAACAAACAATTGCGTTTTATTATTACAAATCCAATTTTAAA
AAAAGCGGCAGAACCGGTCAAACCTAAAAGACTGATTACATAAAATCTTAT
TCAAATTTCAAAAAGTGCCCCAGGGGCTAGTATCTACGACACACCGAGCGG
CGAACTAATAACGCTCACTGAAGGGAATCCTCGGTTCCCCCGCCGGCGCGCA
TGGGTGAGATTCTTGAAGTTGAGTATTGGCCGTCCGCTCTACCGAAAAGT
TACGGGCACCATCAACCCGGTCCAGCACGGCGCCGGGTAACCGACTTG
CTGCCCCGAGAATTATGCAGCATTTTTTTGGTGTATGTGGGCCCCAAATG
AAGTGCAGGTTCAAACCTTGACAGTGACGACAAAATCGTTGGGCGGGTCCAG
GGCGAATTTTGCAGCAACATGTCGAGGCTCAGCAGGACCTGCAGGCATGC
AAGCTTGGCACTGGCCGTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTTG
GCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGG
CGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTT
CCCGCCTTCAGTTTAACTATCAGTGTGTTGACAGGATATATTGGCGGGTA
AACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTTATTAGAATAACGGATATTTAAAAGGGCG
TGAAAAGGTTTTATCCGTTTCGTCCATTTGTATGTGCATGCCAACACAGGG
TTCCCCTCGGGATCAAAGTACTTTGATCCAACCCCTCCGCTGCTATAGTG
CAGTCGGCTTCTGACGTTTCAAGTGCAGCCGTCTTCTGAAAACGACATGTCG
CACAAGTCTAAGTTACGCGACAGGCTGCCGCCCTGCCCTTTTCTTGCCG
TTTTCTTGTGCGGTGTTTTAGTGCATATAAAGTAGAATACTTGGCGACTAGA
ACCGGAGACATTACGCCATGAACAAGAGCGCCGCGCTGGCCTGCTGGGC
TATGCCCGCGTCAACCGACGACAGGACTTGACCAACCAACGGGCCGA
ACTGCACGCGGCCGGCTGCACCAAGCTGTTTTCCGAGAAGATCACCGGCA
CCAGGCGCGACCGCCCGGAGCTGGCCAGGATGCTTGACCACCTACGCCCT
GGCAGCTTGTGACAGTGACCAGGCTAGACCGCCTGGCCCGCAGCACCCG
CGACCTACTGGACATTTGCCGAGCGCATCCAGGAGGCCGGCGCGGGCCTGC
GTAGCCTGGCAGAGCCGTGGGCCGACACCACCACGCCGGCCGGCCGCATG
GTGTTGACCGTGTTCGCCGGCATTGCCGAGTTTCGAGCGTTCCCTAATCAT
CGACCGCACCCGGAGCGGGCGGAGGCCGCCAAGGCCCGAGGCGTGAAGT

TTGGCCCCCGCCCTACCCCTCACCCCGGCACAGATCGCGCACGCCCGCGAG
CTGATCGACCAGGAAGGCCCGCACCGTGAAAGAGGCGGCTGCACTGCTTGG
CGTGCATCGCTCGACCCTGTACCGCGCACTTGAGCGCAGCGAGGAAGTGA
CGCCACCCGAGGCCAGGCGGGCGGTTCCCGTGAGGACGCATTGACC
GAGGCCGACGCCCTGGCGGCCCGGAGAATGAACGCCAAGAGGAACAAGC
ATGAAACCGCACACCAGGACGGCCAGGACGAACCGTTTTTCATTACCGAAGA
GATCGAGGCGGAGATGATCGCGGCCGGTACGTGTTTCGAGCCGCCCGCGC
ACGTCTCAACCGTGCGGCTGCATGAAATCCTGGCCGGTTTTGTCTGATGCC
AAGCTGGCGGCCCTGGCCGGCCAGCTTGGCCGCTGAAGAAAACCGAGCGCCG
CCGTCTAAAAAGGTGATGTGTATTTGAGTAAAACAGCTTGCGTCATGCGG
TCGCTGCGTATATGATGCGATGAGTAAATAAAACAAATACGCAAGGGGAAC
GCATGAAGGTTATCGCTGTACTTAACCAGAAAAGGCGGGTCAGGCAAGACC
ACCATCGCAACCCATCTAGCCCGCGCCCTGCAACTCGCCGGGGCCGATGT
TCTGTTAGTCGATTCCGATCCCCAGGGCAGTGCCCCGCGATTGGGCGGCCG
TGCGGGAAGATCAACCGCTAACCGTTGTCCGCATCGACCCGCCGACGATT
GACCGCGACGTGAAGGCCATCGGCCGGCGCGACTTCGTAGTGATCGACGG
AGCGCCCCAGGCGGGCGGACTTGGCTGTGTCCGCGATCAAGGCAGCCGACT
TCCGTCTGATTCCGGTGCAGCCAAGCCCTTACGACATATGGGCCACCGCC
GACCTGGTGAGACTGGTTAAGCAGCGCATTGAGGTCACGGATGGAAGGCT
ACAAGCGGCCTTTGTGCTGTCCGCGGCGATCAAAGGCACGCGCATCGCGG
GTGAGGTTGCCGAGGCGCTGGCCGGGTACGAGCTGCCCATTCCTTGAGTCC
CGTATCACGCAGCGCGTGAGCTACCCAGGCACTGCCGCCCGCCGGCACAAC
CGTTCTTGAATCAGAACCCGAGGGCGACGCTGCCCGGAGGTCAGGCGC
TGGCCGCTGAAATTAATCAAACTCATTGAGTTAATGAGGTAAGAGA
AAATGAGCAAAAGCACAAACACGCTAAGTGCCGGCCGTCGAGCGCACGC
AGCAGCAAGGCTGCAACGTTGGCCAGCCTGGCAGACACGCCAGCCATGAA
GCGGGTCAACTTTTCAGTTGCCGGCGGAGGATCACACCAAGCTGAAGATGT
ACGCGGTACGCCAAGGCAAGACCATTACCGAGCTGCTATCTGAATACATC
GCGCAGCTACCAGAGTAAATGAGCAAATGAATAAATGAGTAGATGAATTT
TAGCGGCTAAAGGAGGCGGCATGGAAAATCAAGAAACAACCAGGCACCGAC
GCCGTGGAATGCCCATGTGTGGAGGAACGGGCGGTTGGCCAGGCGTAAG
CGGCTGGGTTGTCTGCCGGCCCTGCAATGGCACTGGAAACCCCAAGCCCG
AGGAATCGGCGTGACGGTCCGAAACCATCCGGCCCGGTACAAATCGGCGC
GGCGTGGGTGATGACCTGGTGGAGAAGTTGAAGGCCGCGCAGGCCGCC
AGCGGCAACGCATCGAGGCAGAACACGCCCCGGTGAATCGTGCAAGCG
GCCGCTGATCGAATCCGCAAGAATCCCGGCAACCGCCGGCAGCCGTTGC
GCCGTGATTAGGAAGCCGCCAAGGGCGACGAGCAACCAGATTTTTTCG
TTCCGATGCTCTATGACGTGGGCACCCGCGATAGTCGCAGCATCATGGAC
GTGGCCGTTTTTCCGTCTGTGAAAGCGTGACCGACGAGCTGGCGAGGTGAT
CCGCTACGAGCTTCCAGACGGGCACGTAGAGGTTTCCGAGGGCCGGCCG
GCATGGCCAGTGTGTGGGATTACGACCTGGTACTGATGGCGGTTTTCCCAT
CTAACCGAATCCATGAACCGATAACCGGAAGGGAAGGGAGACAAGCCCG
CCGCGTGTTCGCTCCACACGTTGCCGACGTAACAAGTTCTGCCGGCGAG
CCGATGGCGGAAAGCAGAAAGACGACCTGGTAGAAAACCTGCATTCGGTTA
AACACCACGCACGTTGCCATGCAGCGTACGAAGAAGGCCAAGAACGGCCG
CCTGGTGACGGTATCCGAGGGTGAAGCCTTGATTAGCCGCTACAAGATCG
TAAAGAGCGAAACCGGGCGGCCGGAGTACATCGAGATCGAGCTAGCTGAT
TGGATGTACCGGAGATCACAGAAGGCAAGAACCCGGACGTGCTGACGGT
TCACCCCGATTACTTTTTGATCGATCCCGGCATCGGCCGTTTTCTCTACC
GCCTGGCACGCCCGCGCCGAGGCAAGGCAGAAGCCAGATGGTTGTTCAAG
ACGATCTACGAACGCAGTGGCAGCGCCGGAGAGTTCAAGAAGTTCTGTTT
CACCGTGGCGCAAGCTGATCGGGTCAAATGACCTGCCGGAGTACGATTTGA
AGGAGGAGCGGGGCGAGGCTGGCCCGATCCTAGTCATGCGCTACCGCAAC
CTGATCGAGGGCGAAGCATCCGCCGGTTCCCTAATGTACGGAGCAGATGCT
AGGGCAAATTGCCCTAGCAGGGGAAAAAGGTGAAAAGGTCTCTTTCTG
TGGATAGCACGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCGGAAC

CCGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCGGTACACATGTA
AGTGACTGATATAAAAGAGAAAAAGGCGATTTTTCCGCCTAAAACTCTT
TAAAACTTATTAAAACTCTTAAAAACCCGCCTGGCCTGTGCATAACTGTCT
GGCCAGCGCACAGCCGAAGAGCTGCAAAAAGCGCTACCCCTTCGGTTCGCT
GCGCTCCCTACGCCCCGCCCTTCGCGTTCGGCTTATCGCGGCCGCTGGCC
GCTCAAAAATGGCTGGCCTACGGCCAGGCAATCTACCAGGGCGCGGACAA
GCCGCGCCGTGCGCACTCGACCGCCGGCGCCACATCAAGGCACCCTGCC
TCGCGCGTTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCC
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCG
TCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCC
AGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAG
AGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGA
TGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCAC
TGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGGGAGCGGTATCAGCTCACT
CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA
AACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC
GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAA
ATCGACGCTCAGAGTCAGAGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATAC
CAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCC
GCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC
TTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTTCGTTCCG
TCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGC
CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTTAT
CGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAA
AAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGT
GGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA
AGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
ACTCACGTTAAGGGATTTTTGGTCATGCATTTCTAGGTAATAAAACAATTCA
TCCAGTAAAAATATAATATTTTTATTTTTCTCCCAATCAGGCTTGATCCCCAG
TAAGTCAAAAATAGCTCGACATACTGTTCTTCCCGGATATCTCCCTGA
TCGACCGGACGCAGAAGGCAATGTCATAACCACTTGTCCGCCCTGCCGCTT
CTCCCAAGATCAATAAAGCCACTTACTTTGCCATCTTTCACAAAGATGTT
GCTGTCTCCCAGGTCGCGGTGGGAAAAGACAAGTTCTCTTCGGGCTTTT
CCGTCTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCGCGGATCTTTAAATGGAGTGTCT
TCTTCCCAGTTTTTCGCAATCCACATCGGCCAGATCGTTATTCAGTAAGTA
ATCCAATTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAGCTATTTCGTATAGGGACAATCCG
ATATGTGATGGAGTGAAGAGCCTGATGCACTCCGCATACAGCTCGATA
ATCTTTTTCAGGGCTTTGTTTCATCTTTCATACTCTTCCGAGCAAAGGACGCC
ATCGGCCTCACTCATGAGCAGATTGCTCCAGCCATCATGCCGTTCAAAGT
GCAGGACCTTTGGAACAGGCAGCTTTCTTCCAGCCATAGCATCATGTCC
TTTTCCCCTTCCACATCATAGGTGGTCCCTTTTATACCGGCTGTCCGTCAT
TTTTAAATATAGGTTTTTCATTTTTCTCCCACCAGCTTATATACCTTAGCAG
GAGACATTCCTTCCGTATCTTTTTACGCAGCGGTATTTTTTCGATCAGTTTT
TTCAATTCGGTGATATTCTCATTTTTAGCCATTTATTATTTCTTCTCTCT
TTTTCTACAGTATTTAAAGATACCCCAAGAAGCTAATTATAACAAGACGAA
CTCCAATTCAGTTCCTTGCATTTCTAAAACTTAAATACCAGAAAAACAG
CTTTTTCAAAGTTGTTTTCAAAGTTGGCGTATAACATAGTATCGACGGAG
CCGATTTTGAACCCGCGGTGATCACAGGCAGCAACGCTCTGTTCATCGTTA
CAATCAACATGCTACCCCTCCGCGAGATCATCCGTGTTTCAAACCCGGCAG
CTTAGTTGCCGTTCTTCCGAATAGCATCGGTAACATGAGCAAAGTCTGCC
GCCTTACAACGGCTCTCCCGCTGACGCCGTCGCCGACTGATGGGCTGCCCT
GTATCGAGTGGTGATTTTTGTGCCGAGCTGCCGGTCCGGGAGCTGTTGGCT
GGCTGG