

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



HIYARDA (*CUCUMIS SATIVUS* L.) ELONGATION FACTOR *eIF(iso) 4E*  
GENİNİN TRANSFORMASYONU VE BİTKİ REJENERASYONU

Yasemin ÖZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HIYARDA (*CUCUMIS SATIVUS* L.) ELONGATION FACTOR *eIF(iso) 4E*  
GENİNİN TRANSFORMASYONU VE BİTKİ REJENERASYONU**

**Yasemin ÖZ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ**

**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEMMUZ 2021**

**ANTALYA**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HIYARDA (*CUCUMIS SATIVUS* L.) ELONGATION FACTOR *eIF(iso) 4E*  
GENİNİN TRANSFORMASYONU VE BİTKİ REJENERASYONU

Yasemin ÖZ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) ve AD-ROSSEN  
Tarım A.Ş. tarafından TAGEM/ 18 / AR-GE / 03 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2021

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HIYARDA (*CUCUMIS SATIVUS* L.) ELONGATION FACTOR *eIF(iso) 4E*  
GENİNİN TRANSFORMASYONU VE BİTKİ REJENERASYONU**

**Yasemin ÖZ**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ**

**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez 02/07/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Esin ARI (Danışman)

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

## ÖZET

### HIYARDA (*CUCUMIS SATIVUS* L.) ELONGATION FACTOR *eIF(iso) 4E* GENİNİN TRANSFORMASYONU VE BİTKİ REJENERASYONU

Yasemin ÖZ

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Esin ARI

Temmuz 2021; 97 sayfa

Hıyar (*Cucumis sativus* L.) domatesten sonra ülkemizde en çok üretimi yapılan sebzelerden biridir. Ancak biyotik ve abiyotik stresler hıyarın yaşam döngüsünü olumsuz yönde etkileyerek verim ve kalitenin düşmesine neden olmaktadır. Viral bitki patojenlerinin ökaryotik çeviri başlatma faktörlerinden biri olan *eIF (iso) 4E* ile etkileşim mekanizmaları *C. sativus* dahil bazı türlerde yapılan çalışmalar ile aydınlatılmıştır. Ancak elde edilen transgenik bitkilerin rejenerasyon frekansları düşüktür. Yüksek transformasyon verimi bitki rejenerasyon kapasitesi ile yakından ilgili olmakla beraber, çalışılacak farklı genotiplerde etkili bir transformasyon verimi için hem bitki rejenerasyonu hem de transformasyon için optimizasyonlar gereklidir.

Bu çalışmada, CRISPR/Cas9 gen düzenleme teknolojisi kullanarak iki hıyar genotipinde (G27 ve G247) *eIF (iso) 4E*'nin susturulması planlanmıştır. Bunun için öncelikle transformasyon öncesi genotiplerde bitki rejenerasyon optimizasyonu yapılarak, adventif sürgün organogenesisi için en uygun eksplant (3 eksplant arasından) ve kültür ortamı (kontrol dahil 50 ortam arasından) içeriği tespit edilmiştir. Daha sonra transformasyonu etkileyebilecek önemli faktörler (genotip, bakteri ırkı, fide yaşı, eksplant tipi, pre-inkübasyon, antibiyotik tipi ve markası) optimize edilmeye çalışılarak, tasarlanan rehber RNA (sgRNA1 ve sgRNA2)'lar ve Cas9 *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile her iki genotipin eksplantlarına aktarılmıştır. Hem bitki rejenerasyonu hem de transformasyon için yapılan optimizasyon çalışmalarının ardından, eşit koşullarda gerçekleştirilen 8 transformasyonda elde edilen sürgün sayısı / 100 eksplant ortalaması G27 ve G247 için sırasıyla 13.6 ve 18 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen *ex vitro* aday transgenik bitkilerden (T0) rastgele seçilen bazı hıyar hatları, aktarılan genleri taşımaları bakımından PCR analizi ile test edilmiştir. TAGEM/18 /AR-GE/03 nolu proje kapsamında yürütülen bu çalışmada, test sonucu pozitif çıkan bitkilerde sera koşullarında devam eden yetiştiricilik ve melezleme çalışmaları ile elde edilecek olan T1 bitkilerinde daha sonra sekans analizleri yapılacaktır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Bitki biyoteknolojisi, CRISPR/Cas9, *eIF (iso) 4E*, Gen düzenleme, Islah, Hıyar, Rejenerasyon

**JÜRİ:** Doç. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

## ABSTRACT

### TRANSFORMATION OF THE ELONGATION FACTOR *eIF(iso) 4E* GENE AND PLANT REGENERATION IN CUCUMBER (*CUCUMIS SATIVUS* L.)

Yasemin ÖZ

MScThesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Esin ARI

July 2021; 97 pages

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is one of the most produced vegetables in Turkey after tomato. However, biotic and abiotic stresses affect the life cycle of the cucumber negatively and cause a decrease in yield and quality. The interaction mechanisms with *eIF (iso) 4E*, one of the eukaryotic translation initiation factors of viral plant pathogens, have been elucidated by studies in some species, including *C. sativus*. However, the regeneration frequencies of the obtained transgenic plants are low. Although high transformation efficiency is closely related to plant regeneration capacity, optimizations for both plant regeneration and transformation are required for an effective transformation efficiency in different genotypes to be studied.

In this study, silencing of *eIF (iso) 4E* in two cucumber genotypes (G27 and G247) was planned using CRISPR/Cas9 gene editing technology. For this, first of all, plant regeneration optimization was performed in genotypes before transformation, and the most suitable explant (out of 3 explants) and culture medium (out of 50 media including control) content were determined for adventitious shoot organogenesis. Then, by trying to optimize the important factors (genotype, bacterial strain, seedling age, explant type, pre-incubation, and antibiotic type and brand) that may affect the transformation efficiency, the designed guide RNAs (sgRNA1 and sgRNA2) and Cas9 were transferred to the explants of both genotypes through *Agrobacterium tumefaciens*. After the optimization studies for both plant regeneration and transformation, the average number of shoots / 100 explants obtained in 8 transformations under equal conditions was determined as 13.6 and 18 for G27 and G247, respectively. Some randomly selected cucumber lines from the obtained *ex vitro* candidate transgenic plants (T0) were tested by PCR analysis in terms of carrying the transferred genes. In this study carried out within the scope of the project numbered TAGEM/18/AR-GE/03, sequence analyzes will be performed on the T1 plants that will be obtained by the ongoing cultivation and hybridization studies in greenhouse conditions in the plants with positive PCR test results.

**KEYWORDS:** Breeding, CRISPR/Cas9, *eIF (iso) 4E*, Cucumber, Gene editing, Plant biotechnology, Regeneration

**COMMITTEE:** Assoc. Prof. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Assoc. Prof. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

## ÖNSÖZ

Küresel nüfusta meydana gelen hızlı artış beraberinde gıda üretimine olan talebi de arttırmıştır. Ancak öngörülemeyen iklim koşulları, abiyotik ve biyotik stres etmenleri gibi faktörler ürün ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Günümüzde genomun yeniden düzenlenmesi ürünlerin biyotik ve abiyotik stres koşulları altında yüksek verimde üretilmesine olanak sağlamıştır. Yeni nesil bitki ıslah yöntemlerinden biri olan CRISPR/Cas9 teknolojisi, hedef genlerin mutasyona uğratılarak ya da genomdan kesilerek gen ifadesinin susturulmasını, arttırılmasını ve genlerde istenilen nükleotidlerin değiştirilmesini mümkün kılmıştır. Klasik ıslah yöntemlerinin tek başına yeterli olmadığı ve yeni nesil bitki ıslah yöntemleri ile bir arada kullanılması ile istenilen üründe ve verimde iyileştirmeler sağlayacağı yönündeki çalışmalar son zamanda önemli bir ivme kazanmıştır. Bu tez çalışmasında hiyarda, virüs dayanımında etkili olan elongation faktör 4 ailesinin bir üyesi olan *eIF (iso) 4E* geninde hedeflenmiş mutasyon oluşturulması ve bu bitki dokularından çeşitli optimizasyon çalışmaları ile rejenere bitkilerin üretilmesi amaçlanmıştır.

Tezimin planlanmasından tamamlanmasına kadar, bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana önderlik eden, gerekli her türlü imkanı sağlayan ve her sorumu büyük bir sabır ve özveri ile yanıtlayan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Esin ARI' ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürimde yer alarak değerli yorum ve tavsiyelerini paylaşan Prof. Dr. Nedim MUTLU ve Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY hocalarıma teşekkür ederim. Ayrıca TAGEM ve AD-ROSSEN Tarım A.Ş. tarafından desteklenen TAGEM/ 18 / AR-GE / 03 nolu proje kapsamında gerçekleştirilen tezime verdikleri destekler için proje yürütücüsü Doç. Dr. Hakan FİDAN ve proje ekibinden Doç. Dr. Özer ÇALIŞ ile Dr. Aydın ATASAYAR'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardım ve desteklerini esirgemeyen Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü doktora öğrencisi Ahmet İZMİRLİ ve Bitki Koruma Bölümü doktora öğrencisi Pelin SARIKAYA'ya teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol arkadaşlığı yapan ve ihtiyaç duyduğum her an özveri ile yanımda olan bölüm arkadaşlarım Tuğçe YAYLA, Seval ŞENÇOPUR ve Gizem HAVUTCU'ya sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca, aldığım her kararda varlıklarını her an yanımda hissettiğim, gösterdikleri sevgi ve verdikleri emekle beni her koşulda destekleyen çok sevgili annem Zehra KOYU, babam Nuri KOYU'ya sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimine başlamamda beni teşvik eden, her türlü fedakarlığı gösteren, bana olan inancımı daima hissettiren sevgili eşim Fatih ÖZ'e her zaman yanımda olduğu için teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bitki Genom Düzenleme İçin Cas9 / sgRNA Sistemi.....	5
1.2. eIF4 Çeviri Başlatma Faktörlerinin Virüs Direnci ile İlişkisi.....	6
2. KAYNAK TARAMASI.....	10
2.1. Hıyar Bitkisinde ( <i>Cucumis sativus</i> L.) Yapılan Bitki Rejenerasyon Çalışmaları.....	10
2.2. Hıyar Bitkisinde ( <i>Cucumis sativus</i> L.) <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Yapılan Gen Transformasyon Çalışmaları.....	26
3. MATERYAL VE METOT.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Çalışmada kullanılan bitki materyalleri ve doku kültürü ortamlarının hazırlanması.....	31
3.1.2. Transformasyonda kullanılan bakteri suşları (izolatları) ve plazmidler.....	31
3.1.3. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.....	32
3.2. Metot.....	34
3.2.1. <i>In vitro</i> rejenerasyon optimizasyon denemeleri.....	34
3.2.2. Transformasyon çalışmaları.....	39
3.2.2.1. Transformasyon optimizasyon denemeleri.....	39
3.2.2.2. Optimize koşullarda <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen transferi ve doku kültürü çalışmaları.....	40
3.2.2.3. Bitki rejenerasyonu ve aklimatizasyon çalışmaları.....	42
3.2.2.4. Transgenik mutant adayı (T0) hıyar bitkilerinin moleküler analizi.....	43

3.2.2.5. T0 hıyar bitkilerinden total nükleik asit izolasyonu.....	43
3.2.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction) .....	43
3.2.2.7. Elektroforez koşulları.....	44
3.2.3. İncelenen deneme verileri.....	44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	46
4.1. <i>In Vitro</i> Rejenerasyon Optimizasyonu Bulguları .....	46
4.1.1. Genotip 27 (G27) rejenerasyon optimizasyonu deneme bulguları.....	47
4.1.1.1. G27’de kallus bulguları.....	47
4.1.1.2. G27’de tomurcuk ve sürgün oluşum bulguları.....	49
4.1.1.3. G27’de kök oluşum bulguları.....	54
4.1.2. Genotip 247 (G247) rejenerasyon optimizasyonu deneme bulguları.....	59
4.1.2.1. G247’de kallus bulguları.....	59
4.1.2.2. G247’de tomurcuk ve sürgün oluşum bulguları.....	61
4.1.2.3. G247’de kök oluşum bulguları.....	64
4.2. Transformasyon çalışmaları bulguları.....	69
4.2.1. Transformasyon optimizasyon denemeleri bulguları .....	69
4.2.1.1. Genotipin etkisi .....	72
4.2.1.2. Bakteri ırkının etkisi.....	72
4.2.1.3. Fide yaşının etkisi.....	74
4.2.1.4. Eksplant tipinin etkisi.....	75
4.2.1.5. Önkültür uygulamasının etkisi .....	76
4.2.1.6. Antibiyotiğin etkisi.....	78
4.2.1.7. Antibiyotik (Timentin) markasının etkisi.....	80
4.2.2. Optimize edilmiş koşullardaki transformasyon sonuçları .....	81
4.2.3. Bitki rejenerasyonu ve aklimatizasyon bulguları .....	81
4.2.4. Transgenik mutant adayı (T0) hıyar bitkilerinin moleküler analiz bulguları.....	85

5. SONUÇLAR.....	87
6. KAYNAKLAR .....	89
ÖZGEÇMİŞ	



## AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Hıyarda (*Cucumis Sativus* L.) Elongation Factor *eIF(iso) 4e* Geninin Transformasyonu ve Bitki Rejenerasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

02/07/2021

Yasemin ÖZ



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
AgNO <sub>3</sub>	: Gümüş nitrat
cm	: Santimetre
g	: Gram
ha	: Hektar
kb	: Kilobaz
l	: Litre
mg	: Miligram
mg/l	: Miligram/Litre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
pH	: Asitlik veya bazlık derecesini nitelendiren ölçü birimi (Power of Hydrogen)

### Kısaltmalar

2iP	: İzopentil adenin
ABA	: Absisik Asit
BAP	: 6-Benzyl amino pürin
BGD	: Bitki gelişim düzenleyicisi
CRISPR	: Düzenli aralıklarla tekrarlanmış kısa palandromik tekrarlar
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit

FAO	: Food and Agriculture Organization
GA <sub>3</sub>	: Gibberellik asit
HR	: Homolog rekombinasyon
IAA	: Indol-3-asetik asit
IBA	: Indol bütirik asit
MS ortamı	: Murashige ve Skoog (1962) ortamı
NHEJ	: Homolog olmayan uçların birleşimi
NN ortamı	: Nitsch ve Nitsch (1969) ortamı
PCR	: Poliimeraz zincir reaksiyonu (polimeraz chain reaction)
RNA	: Ribonükleik Asit
TALEN	: Transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleazlar
TDZ	: Thidiazuron
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
ZFN	: Çinko parmak nükleazları

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye’de 2010-2019 yılları arası hıyar üretim miktarları.....	1
Şekil 1.2. Türkiye’de 2010-2019 yılları arası hıyar üretim alanları.....	2
Şekil 1.3. Transgen içermeyen genetik olarak düzenlenmiş (GE) bitkilerin üretimi (Khatodia vd. 2016).....	4
Şekil 1.4. CRISPR/Cas9 sistemi (Liu vd. 2019).....	5
Şekil 1.5. Potyvirus enfeksiyonu sırasında ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4E'nin ( <i>eIF4E</i> ) rolleri (Wang ve Krishnaswamy 2012).....	7
Şekil 3.1. pFGC-pcoCas9 plazmid haritası.....	32
Şekil 3.2. 5 günlük <i>in vitro</i> fideciklerin görüntüsü.....	34
Şekil 3.3. Tohum sterilizasyonu ve sterilizasyonu tamamlanmış tohumlar.....	35
Şekil 3.4. Bitki rejenerasyon ortamı optimizasyonu denemelerinde kullanılan 27 ve 247 nolu genotiplerin 5 günlük (a) kotiledon ve (b) hipokotil eksplantları.....	37
Şekil 3.5. Transformasyon çalışmalarında kullanılan tohumların 1 günlük fide görüntüsü.....	41
Şekil 3.6. Eksplantların transformasyonu ve ko-kültür ortamına alınması.....	42
Şekil 4.1. Kotiledon+hipokotil eksplantlarının gelişimi.....	47
Şekil 4.2. G27 ye ait hipokotil ve kotiledon eksplantlarından oluşan kallus görüntüleri.....	50
Şekil 4.3. G27 eksplantlarında oluşan tomurcuk ve sürgünlere ait görüntüler.....	52
Şekil 4.4. G27 de kotiledon eksplantlarından oluşan uzun normal köklere ait görüntüler.....	54
Şekil 4.5. G247 ye ait kotiledon ve hipokotil eksplantlarından oluşan kallus görüntüleri.....	61
Şekil 4.6. G247’de kök oluşumuna ait görüntüler.....	65
Şekil 4.7. Kotiledon eksplantının proksimal kısımlarından elde edilen sürgünler .....	76
Şekil 4.8. Seleksiyon ortamındaki bazı eksplantların görüntüsü.....	79

<b>Şekil 4.9.</b> G27 ye ait sürgün gelişiminin ilerleyen aşamasında oluşan sararmalar.....	82
<b>Şekil 4.10.</b> G247' ye ait kök oluşumu gerçekleşen sürgünler.....	83
<b>Şekil 4.11.</b> G27 de aklimatizasyonu yapılan bitkilere ait görüntüler.....	84
<b>Şekil 4.12.</b> G247 de aklimatizasyonu yapılan bitkilere ait görüntüler.....	84
<b>Şekil 4.13.</b> 7 potansiyel transgenik hıyar bitkisinin jel elektroforez görüntüsü.....	85



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Hıyarda yapılan rejenerasyon çalışmaları ve ayrıntıları.....	18
<b>Çizelge 2.2.</b> Virüs direnci için yapılan CRISPR / Cas9 uygulamaları (Borrelli vd. 2018).....	24
<b>Çizelge 3.1.</b> Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları.....	32
<b>Çizelge 3.2.</b> MS bazal besin ortamının yapısında bulunan bileşikler ve konsantrasyonları (Murashige ve Skoog, 1962).....	36
<b>Çizelge 3.3.</b> 27. ve 247. genotiplere ait kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kültüre alındığı rejenerasyon ortamlarının numaraları ve BGD içerikleri.....	37
<b>Çizelge 3. 4.</b> PCR yapımında kullanılan malzemeler.....	44
<b>Çizelge 3. 5.</b> PCR döngü programı.....	44
<b>Çizelge 4.1.</b> 27. ve 247. genotiplere ait tohumların çimlenme oranları.....	46
<b>Çizelge 4.2.</b> G27 rejenerasyon optimizasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen kallus oluşumu ve kallus yoğunluklarına ait varyans analiz sonuçları.....	47
<b>Çizelge 4.3.</b> G27 rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen tomurcuk oluşumu, sürgün oluşumu ve sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları.....	49
<b>Çizelge 4.4.</b> G27 rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde eksplant ve besin ortamından oluşan tekli bağımsız değişkenlerin ve bunların interaksyonunun kök oluşumu (%) ve çeşitli kök tiplerinin miktarı üzerine etkileri .....	56
<b>Çizelge 4.5.</b> G247 rejenerasyon optimizasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen kallus oluşumu ve kallus yoğunluklarına ait varyans analiz sonuçları.....	59
<b>Çizelge 4.6.</b> G247 rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen tomurcuk oluşumu, sürgün oluşumu ve sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları.....	62
<b>Çizelge 4.7.</b> G247 rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde eksplant ve besin ortamından oluşan tekli bağımsız değişkenlerin ve bunların interaksyonunun kök oluşumu (%) ve çeşitli kök tiplerinin miktarı üzerine etkileri .....	66
<b>Çizelge 4.8.</b> Transformasyon optimizasyon denemelerinin ayrıntıları ve sonuçları.....	70
<b>Çizelge 4.9.</b> Genotipin transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi...	72

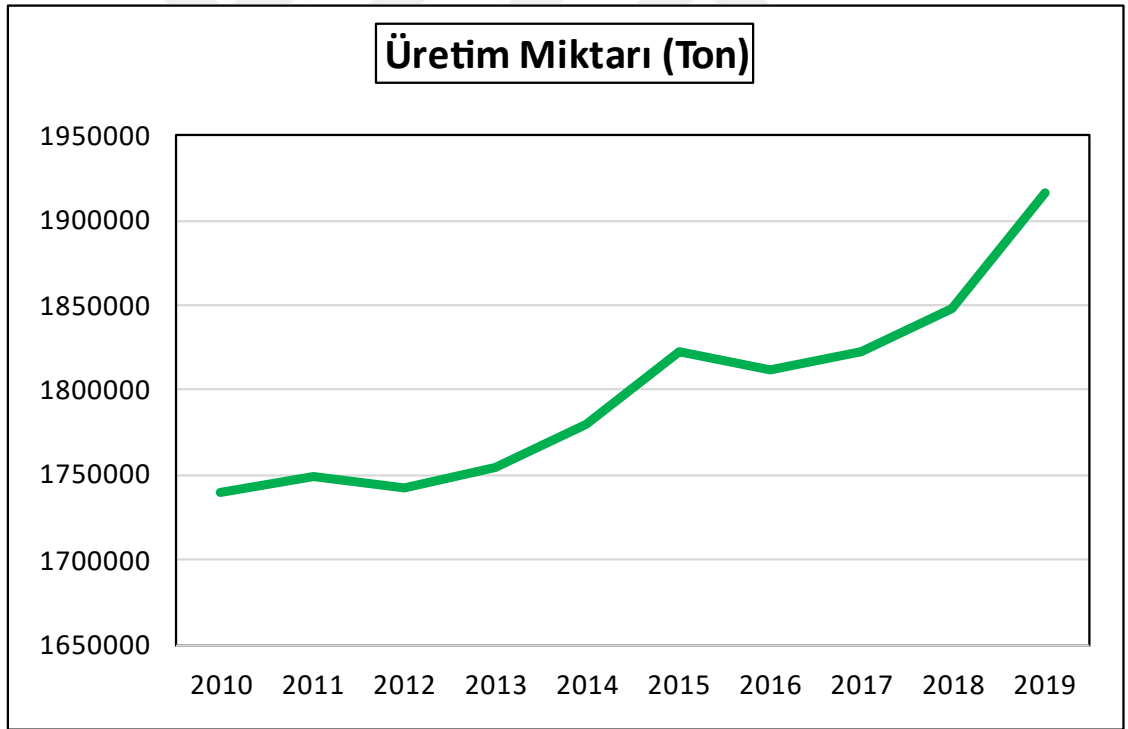
<b>Çizelge 4.10.</b> Kullanılan bakteri ırkının kotiledon eksplantlarında yapılan transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	73
<b>Çizelge 4.11.</b> Kullanılan bakteri ırkının hipokotil eksplantlarında yapılan transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	73
<b>Çizelge 4.12.</b> Fide yaşının transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	74
<b>Çizelge 4.13.</b> Eksplant tipinin transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	75
<b>Çizelge 4.14.</b> Önkültür uygulamasının kotildeon eksplantlarında transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	76
<b>Çizelge 4.15.</b> Önkültür uygulamasının hipokotil eksplantlarında transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	77
<b>Çizelge 4.16.</b> Antibiyotik farklılığının kotildeon eksplantlarında transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	78
<b>Çizelge 4.17.</b> Antibiyotik farklılığının hipokotil eksplantlarında transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	78
<b>Çizelge 4.18.</b> Kullanılan timentin antibiyotiği markasının transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	80
<b>Çizelge 4.19.</b> Optimize edilmiş koşullar sonucu elde edilen toplam sürgün ve 100 eksplant başına elde edilen sürgün sayıları.....	81

## 1. GİRİŞ

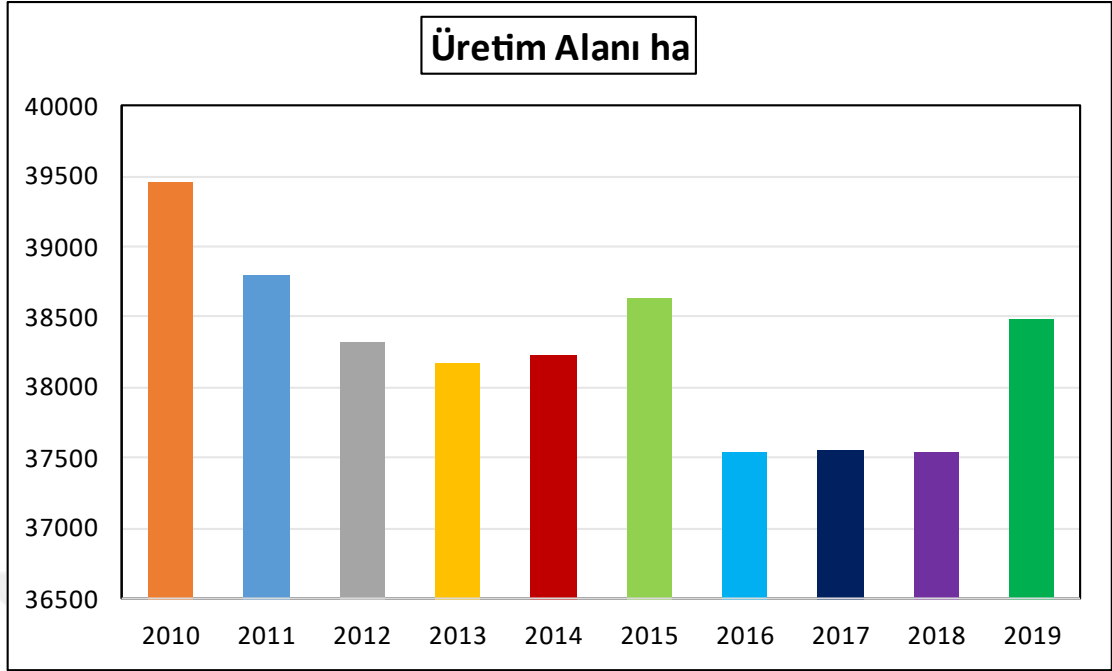
Cucurbitacea familyası türlerinden olan hıyar (*Cucumis sativus* L.), hem tropikal hem de subtropikal bölgelerde yetişen önemli bir sebzedir. Besin olarak, nispeten yüksek mineral içeriğine sahip olmasının yanı sıra, geliştirilmiş ilaç detoksifikasyon etkisi ve antioksidan aktivitesi nedeniyle fonksiyonel bir gıda olarak bilinmektedir (Milner 2000; Chu vd. 2002). Bu çok yönlü kullanım olanakları nedeniyle dünya çapında hıyara karşı artan bir ilgi mevcuttur.

Dünyada hıyar üretim alanı 2.231.402 ha olup, bu alanda 87.805.086 ton üretim yapılmaktadır. Çin 70.338.971 ton ile en büyük hıyar üreticisi konumundadır (FAO 2019). Ülkemiz örtü altı sebze üretiminde ise hıyar (1.886.239 ton) domatesten (13.204.015 ton) sonra ikinci sırada yer almaktadır (TÜİK, 2020). Ülkemizdeki hıyar üretimi ve üretim alanı yıllara göre dalgalanmalar göstermektedir.

FAO'dan alınan 2019 verileri dahilinde Şekil 1.1. ve Şekil 1.2.'de son 10 yılın üretim miktarları (ton) ile üretim alanları (ha) olarak verilmiştir.



**Şekil 1.1.** Türkiye’de 2010-2019 yılları arası hıyar üretim miktarları (FAO 2019)



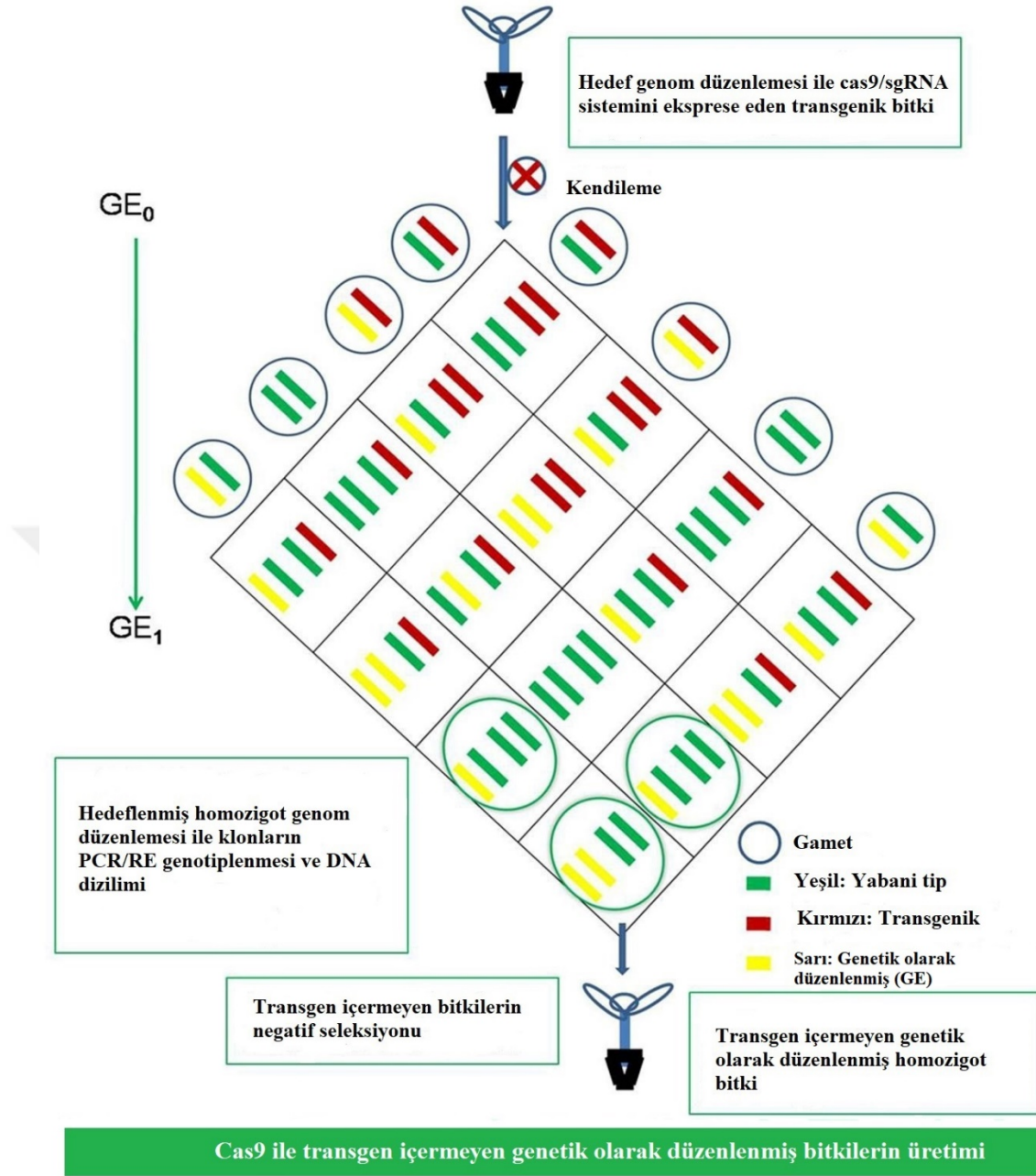
**Şekil 1.2.** Türkiye’de 2010-2019 yılları arası hıyar üretim alanları (FAO 2019)

*C. sativus* ortalama ürün verimini sınırlayan çeşitli viral ve bakteriyel hastalıklara oldukça duyarlı bir üründür. Dünyada kabakgillerde (Cucurbitaceae) birçok virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni tanımlanmıştır. Bunlar arasında, Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virus, CMV), Karpuz mozaik potyvürsü II (Watermelon mosaic virus II, WMV II) Papaya halkalı leke virüsü (Papaya ringspot virus, PRS-W), Kabak mozaik virüsü (Squash mosaic virus, SqMV), Kavun nekrotik spot karmovirüs (MNSV) en yaygın olanlardır (Lovisolo 1979).

Viral bitki patojenlerinin bilinen en geniş familyası olan Potyviridae ailesi bitki virüslerinin %30’unu içerdiği ve yaklaşık 100 farklı üyesi olduğu tanımlanmıştır. Potyvürsü, 91 tür ve tam olarak kimliği belirlenemeyen 88 tür ile potyviridae familyasının en önemli cinsidir (Matthews ve Hull 2002). Kimyasal mücadelesi olmayan hastalıklar grubunda yer alan potyvürsü, bitki gelişimi ve elde edilen üründe nitelik ve nicelik bakımından olumsuz etkiler yapmakta ve ürün kayıplarında artışa neden olmaktadır. Verimi yüksek, hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde genellikle klasik ıslah yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Fakat bitkiler arasındaki melezleme uyumsuzlukları, istenmeyen özelliklerin de bitkiye aktarılma riski ve ıslahın uzun zaman alması gibi nedenlerden dolayı istenilen bitkinin elde edilmesinde sınırlayıcı faktörlerdir. Bu nedenle, somaklonal varyantların, somatik hibritlerin ve transgenik hatların gelişimi, hıyar mahsulünün iyileştirilmesi için kullanışlı bitki doku kültürü uygulamaları olarak karşımıza çıkmaktadır (Joyia ve Khan 2013; Grozeva ve Velkov 2014). Ancak transgenik teknikler kullanılarak organizmaya aktarılan transgenin konak genoma girişi rastgeledir

ve elde edilen GDO (Genetiği Değiştirilmiş Organizma) çeşitli riskleri nedeniyle doğaya salınımı ve tüketiminde dünyada pek çok düzenleme mevcuttur.

Son zamanlarda, genom düzenlenmesinde sık kullanılan güncel teknikler olan ZFN (Çinko parmak nükleazları), TALEN (Transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleazlar) ve CRISPR (Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrarlar) yöntemleri ile genlerin DNA (Deoksiribonükleik asit)'da hedef bölgeye bağlanılabilme avantajı sayesinde, hedef genlerin mutasyona uğratarak ya da genomdan çıkartılarak susturulabilmesine ya da genlerde hedeflenen nükleotidlerin değiştirilmesine olanak sağlanmıştır. Bu teknolojiler, biyotik ve abiyotik stres koşulları altında ürünlerin yüksek verimde üretilmesine yardımcı olma potansiyeline sahiptir. Yeni nesil bu bitki ıslahı yöntemlerinin bir bölümünün temel hedefleri, istenilen özellikleri transformasyon yoluyla aktarmak, fakat kendisi transgenik olmayan hat veya çeşitler geliştirmektir. Bu bağlamda karşımıza öncelikle CRISPR/Cas9 (CRISPR ile birleşmiş nükleaz 9 proteini) teknolojisi çıkmaktadır. Cas9 ve sgRNA'nın hücre içerisine gönderiminin protein ve RNA (Ribonükleik asit) şeklinde olması sayesinde genoma entegre olabilecek rekombinant bir DNA kullanılmadığı için elde edilen bitkiler genetik olarak değiştirilmiş ürünlere ilişkin mevcut düzenlemelerden muaf tutulabilir (Jones 2015). CRISPR/Cas9 sistemi bitki genomunda hassas modifikasyonlar meydana getirebilmekte ve stabil olarak miras kalan transgen bölgesi hedef gen düzenlenmesinden hemen sonra uzaklaştırılarak ürün çeşitliliğinin iyileştirilmesi sırasında transgen içermeyen bitkiler elde edilebilmektedir (Mahfouz vd. 2014; Gao ve Zhao 2014; Kanchiswamy vd. 2015; Xu vd. 2015) (Şekil 1.3.).



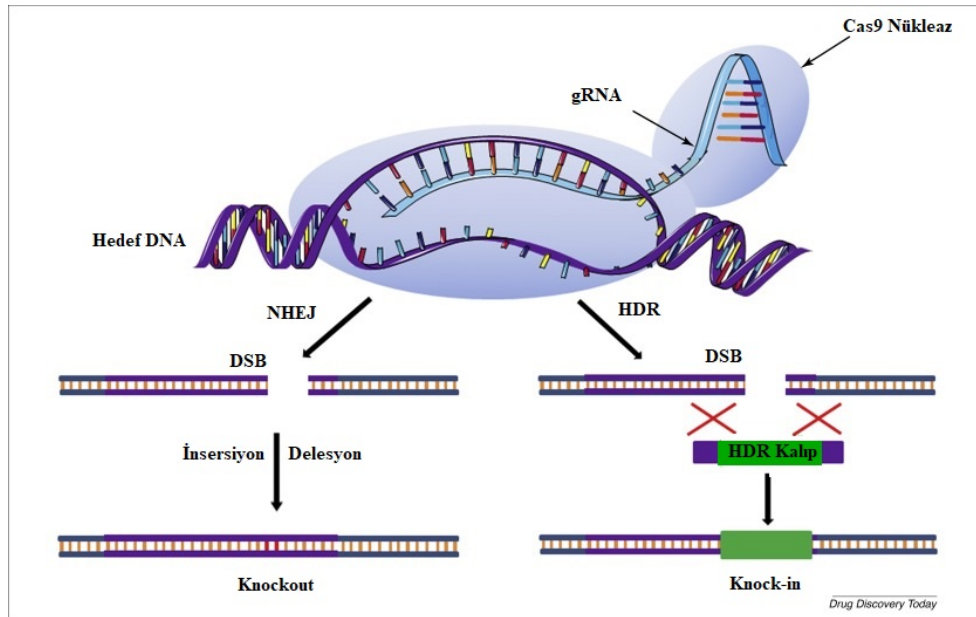
**Şekil 1.3.** Transjen içermeyen genetik olarak düzenlenmiş (GE = Gene Edited) bitkilerin üretimi (Khatodia vd. 2016)

Bu çalışmada hıyarda meydana gelen ürün kayıpları ve kalitesinin önüne geçilebilmesi için bitki virüs direnci ile ilişkili olduğu bilinen ökaryotik çeviri başlatma faktörlerinden biri olan *eIF (iso) 4E*, CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılarak susturulmaya çalışılmıştır. Konuya ilişkin genel bilgiler, Bölüm 1.1. ve 1.2. de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

### 1.1. Bitki Genom Düzenleme İçin Cas9 / sgRNA Sistemi

CRISPR sistemi, bakterilerin bakteriyofaj gibi yabancı DNA'ya karşı korunması için geliştirdiği kazanılmış bağışıklık sistemidir. Bu sistem, genomdaki CRISPR lokusları Cas9 proteinini kodlayan bir operon ve tekrarlanan diziler dizisinden oluşmaktadır. CRISPR lokusları, Cas9 proteinine rehberlik eden; CRISPR RNA (crRNA) ve trans-aktif edici RNA (tracrRNA) olmak üzere iki CRISPR RNA kombinasyonunu içerir. CRISPR tabanlı genom düzenleme sisteminde ise crRNA'nın 3' bölgesi ile tracrRNA'nın 5' ucunun birleştirilmesiyle meydana getirilen sgRNA (single guide RNA) olarak adlandırılan tek bir RNA söz konusudur (Bortesi ve Fischer 2015). CRISPR/Cas9 sisteminden yararlanmak için, genomda hangi bölge hedeflenecekse ona göre dizayn edilen 20 nükleotidlik bir RNA dizisinin varlığı (sgRNA), Cas9 olarak adlandırılan DNA endonükleaz ve Cas9/sgRNA kompleksinin DNA üzerinde kesim yapabilmesi için hedef bölgenin 3' ucunda PAM (Protospacer Adjacent Motif,) dizileri gereklidir. Cas9/sgRNA kompleksi, hedef bölgeye bağlanarak çift zincir kırıkları (DSB) meydana getirir (Fichtner vd. 2014; Schaeffer ve Nakata 2015).

Oluşan çift zincir kırıkları, homoloji destekli onarım (HDR) veya homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ile onarılır (Şekil 1.4.). HDR, kusurlu genin sağlam alleli ile değiştirilebilmesi ya da yeni bir genin genoma eklenebilmesi için tercih edilmektedir (Puchta 2005). Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ise genellikle hataya eğilimli bir onarım mekanizması olduğundan delesyonlara veya insersiyonlara yol açmaktadır. Bitki genomundaki Cas9 ile indüklenen çift zincir kırıkları esas olarak homolog olmayan uç birleştirme ile onarılır (Li vd. 2013; Nekrasov vd. 2013). Sonuç olarak hedef bölgede çift zincir kırıkları oluşturulduktan sonra, hücrenin doğal DNA onarım mekanizmalarından faydalanarak, genomda istenilen değişiklik yapılabilmektedir.



Şekil 1.4. CRISPR/Cas9 sistemi (Liu vd. 2019).

Cas9/sgRNA düzenlemesi, ilk olarak 2013 yılında bildirildiğinden bu yana (Li vd. 2013; Nekrasov vd. 2013) Cruciferae, Solanaceae, Poaceae ve Fabaceae gibi bitki familyalarının çeşitli türlerinde başarılı çalışmalar yapılmıştır (Belhaj vd. 2013; Bortesi ve Fischer 2015; Jacobs vd. 2015; Xie vd. 2014).

## 1.2. eIF4 Çeviri Başlatma Faktörlerinin Virüs Direnci ile İlişkisi

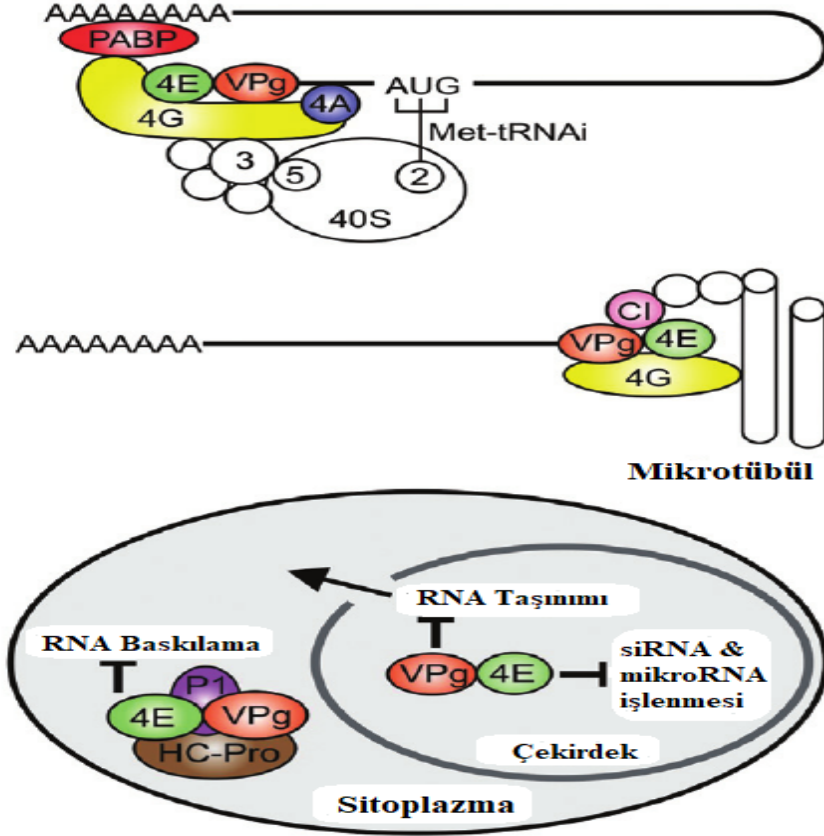
Virüsler, sınırlı sayıda proteini kodlayan küçük genomlara sahiptir. Tarımsal açıdan önemli birçok virüsü içeren en büyük bitki virüsü grubu olan potyvirusler, viral proteaz tarafından parçalanmış ve yaklaşık 10 kb'lik (3' poliA kuyruğuna sahip) tek sarmallı bir RNA genomuna sahiptir (Revers ve Garcia 2015). Bu nedenle, virüslerin enfeksiyon döngülerini tamamlaması için konak faktörlerine bağlı olması gerekmektedir. Virüsün gerektirdiği önemli bir konak faktörünün kaybı veya mutasyonu, bu virüse karşı resesif direnç indükleyebilir (Diaz-Pendon vd. 2004).

Son zamanlarda, farklı bitki türlerinden resesif direnç genlerinin klonlanması ve karakterizasyonu, birçok farklı virüsün çoğalması için gerekli faktörler olarak 4E ailesinin ökaryotik çeviri başlatma faktörlerine (eIF) işaret etmiştir. Virüslere direnç kazandıran, ökaryotik çeviri başlatma faktörleri *eIF4E* ve *eIF (iso) 4E* dahil (Lellis vd. 2002; Nicaise vd. 2003; Ruffel vd. 2006) birçok gen resesiftir (Kang vd. 2005; Truniger ve Aranda 2009). *eIF4F* kompleksi [*eIF4E* ve *eIF4G* (veya bunların izoformları) ve *eIF4A*] ve poliA-bağlayıcı protein (PABP) gibi diğer konakçı faktörler, potiviral 5' m<sup>7</sup>G kep yapısına ve 3' poliA mRNA kuyruğuna translasyon için bağlanır (Şekil 1.5.).

Potivirüsler, genomik RNA'nın 5' ucuna kovalent olarak bağlanan genom bağlantılı bir viral proteini (VPg) kodlamaktadır (Murphy vd. 1996). VPg, poliprotein çevirisinde, virüs yaşam döngüsünde ve diğer fonksiyonlarda rol oynar. VPg genindeki mutasyonların, bir dizi virüs tarafından doğal direncin kırılması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ayme vd. 2006; Hebrard vd. 2006; Moury vd. 2004). *eIF4E* ve *eIF (iso) 4E*, farklı konakçılarda (Jiang ve Laliberte 2011; Leonard vd. 2000; Sanfaçon, 2015) VPg ile etkileşime girdiği ve mutajenez veya susturma ile bu bağlantının bozulması virüs infektivitesini önlediği belirtilmiştir (Duprat vd. 2002; Lellis vd. 2002; Rodriguez-Hernandez vd. 2012; Sato vd. 2005).

Cas9/sgRNA'nın, virüs direnci geliştirmek için bitki DNA virüslerini hedefleyebildiği gösterilmiştir (Ali vd. 2015; Baltés vd. 2015). Geniş bir ürün yelpazesinde önemli kayıplara neden olan potyviruslerin, *eIF4E* ve *eIF (iso) 4E* genlerindeki doğal mutasyonların potyvirus direnci ile ilişkisi, çeşitli mahsulde gözlenmiştir (Gomez vd. 2009). Chandrasekaran vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, hıyar da ilk kez hedeflenen gen susturulması ile, mutasyona uğramış *eIF4E* ve sonuçta ortaya çıkan hatların, potyvirusler Zucchini sarı mozaik virüsü ve Papaya ringspot potyvirus-W'e karşı direnç, Hıyar sarı damar virüsüne karşı da bağışıklık gösterdiği rapor edilmiştir. Benzer bir bulgu, Arabidopsiste eIF (iso) 4E susturulduğunda Turnip mozaik virüs (TuMV)'e yüksek direnç gösterdiği bildirilmiştir (Pyott vd. 2016).

Macovei vd. (2018) tarafından Pirinç tungro küresel virüs (RTSV)'e dirençli pirinç eIF4G'yi hedefleyerek üretilmiştir. Ayrıca cassava (*Manihot esculenta* Crantz) türünde nCBP-1 ve nCBP-2 genlerinin eş zamanlı mutasyonu, Cassava kahverengi çizgi virüsüne (CBSV) karşı toleransa yol açtığı rapor edilmiştir (Gomez vd. 2019).



**Şekil 1.5.** Potiyvirüs enfeksiyonu sırasında ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4E'nin (*eIF4E*) rolleri (Wang ve Krishnaswamy 2012).

Bu örnekler, CRISPR düzenlemesi ile duyarlılık genlerinin devre dışı bırakılmasının, bitki RNA virüslerine karşı güçlü ve geniş spektrumlu antiviral bağışıklık için oldukça verimli bir yaklaşım olduğunu açıkça göstermektedir.

Islah çalışmaları için transforme hücreler üretildikten sonra, bu hücrelerin bitkilere dönüştürülmesi zorunludur. Kültüre alınmış hücrelerden veya dokulardan yüksek bitki rejenerasyon sıklığı, doku kültürü teknolojisinin bitki ıslahına başarılı bir şekilde uygulanması için önemlidir. CRISPR/Cas9 teknolojisi ile modifiye edilen bitkilerin rejenerasyonunda, yaygın olarak sürgün rejenerasyonu kullanılmaktadır. Sürgün elde edilmesi yoluyla rejenere edilen transgenik bitkiler arasında *Solanum lycopersicum* (Nekrasov vd. 2017; Brooks vd. 2014; Wang vd. 2017), *Solanum*

*tuberosum* (Wang vd. 2015), *Cucumis sativus* (Chandrasekaran vd. 2016), *Malus prunifolia* × *Malus pumila* (Nishitani vd. 2016), *Petunya hybrida* (Zhang vd. 2016), *Brassica napus* (Braatz vd. 2017) ve *Citrus sinensis* (Peng vd. 2017) sayılabilir.

Bitkilerde totipotensi özelliğinden faydalanarak protoplastların, hücrelerin, dokuların ve organların kültürleri yapılmakta ve *in vitro* bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılan adventif sürgün rejenerasyonu organogenesis kapsamında gerçekleştirilirken, diğer bir rejenerasyon tipi somatik embriyogenesisdir. Gen transformasyonu sonrası rejenere bitkiler elde edebilmek için her iki sistemde de eksplant kaynağı olarak bitkilerin farklı dokularından yararlanılmakta ve her bitki türü için kullanılacak eksplant türü ve bunların kültüre alınacakları besin ortamları farklılık gösterebilmektedir. Trulson ve Shahin (1986)'nın hıyarda somatik embriyo oluşumunu bildirmesinden sonra bu türde somatik embriyogenesis ile çok sayıda rejenerasyon çalışması yapılmıştır. Usman vd. (2011) kotiledon eksplantından, Avaş (2013) hipokotil eksplantından, Ugandhar vd. (2013) ise hem kotiledon hem de hipokotil eksplantından somatik embriyogenesis ile bitki elde etmeye çalışmışlardır.

Organogenesisde ise eksplantlardaki hücrelerin bölünmeleri sonucunda ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direkt organogenesis) ya da hücreler yığını olan kallus oluşumu ve bu kallustan ise sürgün veya kök meydana gelmektedir (indirekt organogenesis). Novak (1982) kotiledon eksplantından, Selvaraj vd. (2006) hipokotil eksplantından, Grozeva ve Velkov (2014) ise hem kotiledon hem de hipokotil eksplantından organogenik kalluslar elde etmişler ve bu kalluslardan sürgün çoğaltımı meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Rejenerasyon kapasitesi; genotip, besin ortamı, bitki gelişim düzenleyicisi ve kültür koşulları gibi faktörlerden önemli ölçüde etkilenmektedir. Aynı zamanda, eksplant olarak kullanılacak fidenin gelişim aşaması, kullanılan eksplant tipi, eksplantın ortamdaki konumu, yine rejenerasyon kapasitesi bakımından önemlidir. Kim vd. (2000) ile Köse ve Koç (2003) tarafından hıyarda yapılan çalışmalarda en yüksek sürgün rejenerasyonun 2mg/l zeatin içeren ortamda gerçekleştiği, ancak elde edilen sürgün sayılarında farklılık olduğu, ve bunun genetik materyal farklılığından olabileceği bildirilmiştir. Bitki rejenerasyonu, aynı tür içinde bir diğer çeşitten farklı olabilmektedir (Selvaraj vd. 2007). Bu nedenle, her çeşit için verimli bitki rejenerasyon protokolü geliştirilmesi gerekli olabilmektedir (Walden ve Wingender 1995).

Farklı araştırmacılar, hıyar bitkisinde çeşitli eksplantlardan rejenerasyon elde etmek amacıyla farklı oksinler (IAA ve NAA), sitokininler (BAP, Zeatin, 2iP, TDZ) ve yardımcı maddelerin etkinliğini test etmişlerdir. Venkatachalam vd. (2018) 1.5 mg/l BAP ve 4.5 mg/l AgNO<sub>3</sub> ile takviye edilen MS ortamının maksimum sürgün oluşumuyla sonuçlandığını rapor etmişlerdir. Ahmad ve Anis (2005) ise 1 mg/l BAP ile 200 mg/l kazein hidrozilat içeren MS ortamında sürgün sayısının arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca,

hem genotip etkisinin hem de kullanılan hormon konsantrasyonları ve ortama eklenen yardımcı maddelerin sürgün rejenerasyon frekansını etkileyen ana faktörlerden biri olduğu ve farklı genotiplerden bitki gelişimi için çeşitli büyüme düzenleyici kombinasyonlarına gerek olduğu ifade edilmiştir.

Günümüzdeki transformasyon çalışmalarında, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı çok kullanılan bir yöntem olup, doğrudan gen aktarım yöntemlerine göre daha kolay, ekonomik ve başarı şansının yüksek olması nedeniyle daha avantajlıdır. Rhizobiaceae familyasının bir türü olan *A. tumefaciens* bakterisi; gram negatif (-) bir bakteridir. Bu bakteri bitkilerin kök boğazında oluşan yaralardan bitkiyi enfekte ederek kök boğazı uruna neden olmaktadır. Ti (Tumor inducing) plazmidinde bulunan, hareketli bir DNA parçası olan T-DNA (Transfer DNA) ve virülens (vir) bölgeleri tümör oluşumunda rol oynamaktadırlar (De la Riva vd. 1998; Zaenen vd. 1974). Yapılan çalışmalarda, T-DNA sınırları içerisine yerleştirilen herhangi bir DNA parçasının kolaylıkla bitki hücresine aktarılacağı gösterilmiştir (Leemans vd. 1982; Schell ve Montagu 1983).

İki aşamalı bu çalışmada, CRISPR/Cas9 yapılarını içeren *A. tumefaciens* aracılığıyla hıyar bitkisinde *eIF(iso)4E* geninde mutasyonlar oluşturulması hedeflenerek, potyviruslere karşı dayanıklılık yanıtının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmanın birinci aşamasında kurulan rejenerasyon optimizasyon denemelerinde; iki genotipin kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılarak transformasyon için en uygun ekplant kaynağı ile farklı konsantrasyonda bitki gelişim düzenleyicileri (BGD) içeren 50 adet (kontrol dahil) MS besin ortamı arasından en uygun besin ortamı belirlenerek, sürgün oluşum kapasitesinin arttırılmasına yönelik etkili bir rejenerasyon protokolü oluşturulmaya çalışılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında hedef geni içeren *A. tumefaciens* aracılığı ile her iki genotipin eksplantlarına yapılan gen transformasyon ve onu takip eden seleksiyon çalışmaları ile önce sağlıklı sürgünler elde edilmeye, daha sonra da bu sürgünlerin bitkiciğe dönüştürülmesine çalışılmıştır.

Henüz oldukça yeni bir teknoloji olmasına rağmen, klasik ıslah yöntemleri ve günümüzde kullanılan biyoteknolojik yöntemlere göre daha hızlı, ucuz ve güvenli bir seçenek sunması nedeniyle bugüne kadar farklı türlerin genomu CRISPR teknolojisi kullanılarak modifiye edilmiştir. TAGEM/18 /AR-GE/03 nolu proje kapsamında yürütülen bu çalışmada, CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak elde edilecek bitkiler direkt olarak bir ıslah programında kullanılacaktır. Bu çalışmada elde edilen transgenik hıyar hatlarında daha sonra yapılacak çeşitli melezleme, testleme ve transgenik mutantların eliminasyonu ile transgenik olmayan hıyar hatlarından rekabet gücü yüksek ticari çeşitlerin geliştirilmesi mümkündür. Böylece, hıyar üreticilerinin üretimde karşılaştıkları önemli sorun olan viral etmenlerin genetik olarak kontrol edilmesi sonucu, daha sağlıklı ve verimli ürün elde edilebilecektir. Ayrıca rejenerasyon optimizasyonu çalışmaları sırasında elde edilen adventif köklenme bulgularının özellikle hıyarda yapılabilecek sekonder metabolit üretim çalışmalarına da katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

## 2. KAYNAK TARAMASI

### 2.1. Hıyar Bitkisinde (*Cucumis sativus* L.) Yapılan Bitki Rejenerasyon Çalışmaları

Hıyar rejenerasyonu ile ilgili ilk çalışmalardan biri Wehner ve Locy (1981) tarafından yapılmış ve *in vitro* adventif sürgün ve kök oluşumu araştırılmıştır. 85 çeşide ait 7 günlük fidelerin kotiledon ve hipokotil dokusu eksplant olarak kullanılmış, 1 mg/L BA, 1 mg/L NAA ve %3 sukroz içeren MS ortamında 45 gün kültüre alınmıştır. Hipokotil dokusundan sürgün oluşumunun gözlenmediği, kotiledon dokusundan ise %33 oranında sürgün gelişimi gözlemlendiği bildirilmiştir. En yüksek sürgün oluşumu %53'lük oranla PI 279463 ve %40'lık oranla PI 401732 hatlarının kotiledonlarından elde edildiği kaydedilmiştir.

Trulson ve Shain (1986) tarafından yapılan çalışmada hıyar bitkisinde *in vitro* rejenerasyon araştırılmıştır. Straight Eight çeşidine ait 5 günlük fidelerin kotiledonları ve kökleri eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve kotiledon diskleri ve kök parçaları embriyo gelişimini uyarmak amacı ile 1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L NAA ve 0.5 mg/L BAP içeren yarı katı MS ortamında kültüre alınmıştır. Kotiledon eksplantlarında sarımsı yeşil embriyoların oluştuğu ve kök dokusunda embriyo uyarımının ise 3-4 hafta sonra belirlendiği bildirilmiştir. Hem kotiledon hem de kökten elde edilen embriyoların 1mg/l NAA ve 0,5 mg/l BAP içeren MS ortamına aktarıldığında genişlediği, yeşile döndüğü ve görülebilen yaprak yapılarını oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca embriyoların hormonsuz MS ortamına aktarıldığında bitki rejenerasyonunun gerçekleştiği bildirilmiştir.

Gambley ve Dodd (1990) tarafından Crystal Salad hıyar çeşidinde kotiledon eksplantlarından çoklu sürgün rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmada, tüm sitokininlerden (BAP, kinetin, izopentil adenin ) sürgün elde edilmesine rağmen en uygun sitokininin Kinetin (2 mg/l) olduğu belirlenmiş ve eksplant büyüklüğü denemesinde de bu hormon kullanılmıştır. Oksin varlığında, kallus oluşumunun gözlemlendiği ancak sürgün gelişimi meydana gelmemiştir. Eksplantlar küçük parçalara kesilerek kültüre alındığında, eksplant üzerinde gelişen sürgün sayısının arttığı (kotiledon başına 23 sürgünden 50 sürgüne) belirlenmiştir.

Msikita vd. (1990) rejenerasyon ve çiçeklenme üzerine yaptıkları çalışmada Burbless hybrid hıyar tohumlarının kabukları soyularak steril edildikten sonra kotiledonları 2 parçaya ayrılarak, BAP (2, 3, 4 ve 5 mg/L) ve NAA (0.0, 0.1, 0.2, 0.3 mg/l)'in 16 farklı kombinasyonunda kültüre almışlardır. 8 hafta sonunda NAA ve BAP arasında sürgün rejenerasyonu bakımından önemli bir ilişki gözlenmediği ve en iyi sürgün gelişiminin ve dişi çiçek oluşumunun 2 mg/L BA ve 0,3 mg/L NAA içeren ortamdaki elde edildiği rapor edilmiştir. Sürgün gelişiminin BAP konsantrasyonunun arttırılması ile (2'den 5 mg/L'ye) önemli bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir.

Cade vd. (1990) Sumter ve Straight 8 adlı 2 hıyar çeşidinde yaptıkları çalışmada, ortamdaki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarını manipüle ederek ve rejenerasyon için

optimum kotiledon yaşını belirleyerek kotiledon eksplantlardan sürgün üretiminin verimliliğini arttırmayı amaçlamıştır. Yüze sterilizasyonu yapılan tohumlar, %1 Bacto agar içeren petri kaplarında 30 °C'de çimlendirme amacı ile 2, 4, 6, 8 veya 10 gün süresince kültüre alınmıştır. Daha sonra kotiledon yaprakları kesilerek 10 farklı kombinasyonda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Sumter çeşidinin 4 günlük; Straight 8 çeşidinin ise 5 günlük fidelerinden alınan eksplantlarda 3-4 hafta sonunda sürgün oluşumu gözlenmiş, 8 ve 10 günlük çimlendirme süresi uygulamasında ise sürgün gelişim oranının düştüğü bildirilmiştir. En yüksek oranın (%60) 6 günlük fidelerin kotiledonlarından alındığı rapor edilmiştir.

Ali vd. (1991a)'nin 6 çeşide ait hıyar tohumları kullanılarak yapılan çalışmada kotiledonlar BAP ve NAA'in farklı kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda aynı konsantrasyon ve kombinasyonlarda büyüme düzenleyicilerine karşı; Marketer, Marketmore, Wisconsin SMR-18, Tablegreen, Spotfree ve China çeşitlerinin farklı tepkiler verdiği, bir kısmının hiç sürgün oluşturmadığı bazı çeşitlerin ise yüksek oranda sürgün oluşturduğu bildirilmiştir. Sürgün oluşumu üzerine genotip farklılığının etkisi olduğu rapor edilmiştir.

Ali vd. (1991b)'nin Burbless Hibridi hıyar çeşidi ile yapmış oldukları çalışmada, tohumlar %70'lik etanolde 1 dk. bekletilip ardından %0.5 sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 dk. bekletildikten sonra 3 kez steril distile su ile durulanmıştır. Yüze sterilizasyonunu takiben kotiledon eksplantları, 4 mg/L BA ve 0.2 mg/L NAA içeren modifiye edilmiş MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Gelişen sürgünler, 1.5 mg/L NAA içeren MS ortamında kültüre alarak köklendirilmiştir. Kotiledonunun sapa bağlanan (proksimal) kısımları ile uç kısımlarından (distal) rejenere olan bitki sayısı arasında önemli bir fark olduğunu tespit etmişlerdir. Eksplant büyüklüğünün rejenerasyon kapasitesi üzerine etkisinin de incelendiği çalışmada, kotiledonlar 24 parçaya ayrıldığında 2 sürgün geliştiği, 6 parçaya ayrıldığında %47 oranında bir artış ile 54 sürgünün rejenere olduğu; 4 parçaya ayrıldığında 17 bitki, 2 parçaya ayrıldığında ise 28 bitki elde edildiği belirlenmiş ve kotiledonlar tüm olarak kültüre alındığında ise çok az sayıda sürgün gelişiminin olduğu rapor edilmiştir.

Hooymans vd. (1994)'nin Hokus, Salty, Sporu ve IBPGR çeşitlerine ait hıyar kotiledonlarının rejenerasyonunun belirli gelişim aşamalarında sınırlı olduğunu, 7 gün veya daha yaşlı kotiledonlarda sürgün oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir. Kotiledon eksplantlarından bitki rejenerasyonu için, tomurcukların uyarılmasından bitkilere dönüşümünü içeren optimum sürenin 6 hafta olduğunu belirtmişlerdir. 3-5 günlük fidelerinin kotiledonlarından oluşan sürgün sayısının diğer uygulamalara oranla %100 arttığı bildirilmiştir. Rejenere olan bitkilerin normal görünüşlü ve sağlıklı çiçek oluşumu göstererek tohum oluşturduğu rapor edilmiştir.

Lou ve Kako (1994) tarafından yapılan çalışmada, yedi hıyar (*Cucumis sativus* L.) çeşidinin somatik embriyogenesis kapasitesi kotiledon, genç yaprak, ilk yaprak ve

internod olmak üzere farklı tipte eksplantlar kullanılarak *in vitro* ortamda incelenmiştir. Test edilen çeşitler arasında somatik embriyo gelişimi önemli farklılıklar göstermiş ve Fushinarimidori çeşidinde hem kotiledondan hem de ilk yapraklardan yüksek oranda embriyo üretildiği bildirilmiştir. Aonaya F1 çeşidinin internodlarından somatik embriyoların geliştiği, fakat kotiledon ve ilk yapraklardan internodlara kıyasla daha çok embriyogenik kallus oluşturduğu belirtilmiştir. Sürgün geliştirme ortamındaki sukroz oranının nispeten yüksek seviyeleri (%6 ve %9) ile, Fushinarimidori kotiledon eksplantlarından embriyojenik kallus oluşum sıklığının %90 oranında arttığı, kültür ortamında sukroz oranının %12 olduğu durumda ise kallus oluşumu ve gelişiminin engellendiği belirtilmiştir. Somatik embriyolar %0.5 aktif kömür, %1.5 sukroz ve %1.5 glikoz ile takviye edilmiş bazal sıvı MS ortamında kültüre alınmış ve 1-2 hafta sonra kotiledon aşamasındaki embriyoların iyi şekilli ve sağlıklı bitkiciklere dönüştüğü rapor edilmiştir.

Burza ve Malepszy (1995), Borszczagowski, SH 15, Skierniewicki hıyar çeşitleri ile *C. anguria* türünün yaprak eksplantlarını kullanarak, hızlı ve verimli bir bitki rejenerasyonu için yeni bir sürgün geliştirme protokolü hazırlamışlardır. Bu protokolde, bitki indüksiyon ortamındaki NO<sub>3</sub>: NH<sub>4</sub> oranının genç yapraklardaki bitki rejenerasyon kapasitesine etkisi, eksplant boyutu, büyüme düzenleyicilerin kombinasyonu ve oranlarının etkisi incelenmiştir. En yüksek bitki rejenerasyonu, 1.7x NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> içeren fakat KNO<sub>3</sub> içermeyen genç yaprak eksplantlarından elde edilmiştir (%46). 1.7x NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> içeren fakat KNO<sub>3</sub> içermeyen olgun yaprak eksplantlarından ise düşük rejenerasyon oranı (%2) meydana gelmiştir. Optimal büyüme koşulları altında yaklaşık 4 haftalık kültürden sonra eksplantlarda, %10-100 arasında rejenerasyon meydana geldiği bildirmiştir. Köklü bitkiler elde etmek için 6-7 haftanın gerekli olduğu ve köklü bitkilerin toprağa aktarıldıktan sonra hayatta kaldıkları rapor edilmiştir. *C. sativus* cv. Borszczagowski çeşidinde ait tek yapraktan 135 bitki rejenere olduğu belirtilmiştir. Seraya aktarılan tüm bitkilerin normal gelişim gösterdiği, çiçek açtığı ve meyve verdiği gözlenmiştir. Analiz edilen R0 bitkilerinde hiçbir genetik varyasyon görülmezken, R1'de iki yeni fenotip gözlemlendiği ancak bu varyasyonun R2 de görülmediği rapor edilmiştir.

Mohiuddin vd. (1997) yapmış oldukları çalışmada, gümüş nitrat (etilen inhibitörünün), ilavesinin 5 farklı hıyar çeşidinde kotiledon (proksimal ve distal) ve hipokotil eksplantlarının organogenesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ortama farklı konsantrasyonlarda AgNO<sub>3</sub> (10, 30 ve 50 µm) ilavesinin, Suyo Long çeşidi hariç distal kotiledonlarda sürgün gelişimini arttırdığı ve bütün çeşitlerde proximal kotiledon ve hipokotil bitki doku parçalarında eksplant başına sürgün sayısını arttırdığı rapor edilmiştir.

Kim vd. (2000) yapmış oldukları çalışmada Chongjang hıyar çeşidinde ait 3-5 günlük fidelerden kotiledonumsu hipokotil olarak adlandırılan eksplantlar 2 mg/L Zeatin içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültüre alındığında hipokotil parçaları üzerinden en fazla sayıda adventif sürgün gelişimi meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca

kotiledon büyüklüğü ve hipokotil uzunluğunun sürgün organogenezi üzerindeki etkilerini de incelemek amacıyla '1 kotiledon + 2 mm hipokotil' ve 'yarım kotiledon + 2 mm hipokotil' eksplantlarından %80-90 oranı ile en yüksek rejenerasyon oranı elde edilmiştir. Hipokotili 2 mm'den uzun veya 2 kotiledonlu eksplantlarda rejenerasyon oranı düşmüştür. Bitki rejenerasyonun, kotiledon yapraklarının sapa bağlanan kısımlarından daha fazla olduğu, yaprağın uç kısımlarından ise daha az sayıda bitki oluşumu gerçekleştiği rapor edilmiştir. Elde edilen sürgünler, 1 mg/L IAA içeren MS ortamında köklenmeye alınmış ve köklenen bitkiler normal bitkilere dönüştüğü rapor edilmiştir.

Seo vd. (2000) tarafından Shinhukjinju ve Chungjang çeşidinin yaprak eksplantları, yüksek frekanslı sürgün rejenerasyonu için çeşitli konsantrasyonlardaki BAP ve NAA içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün oluşumu sıklığı %80, NAA/BAP (5 µM/ 2.5µM) ile takviye edilmiş MS ortamında meydana gelmiş ve eksplantlar 3-7 sürgün oluşturmuştur. Sürgün oluşumu 3 ila 4 hafta içinde meydana gelmiştir. Shinhukjinju için elde edilen en yüksek rejenerasyon oranı %77 olduğu ve 3-7 sürgün elde edildiği, Chungjang için ise %43 olduğu ve 1-3 sürgün elde edildiği rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçların sürgün rejenerasyonundaki başarının genotip bağımlı olduğunu gösteren önceki bulgularla tutarlı olduğu rapor edilmiştir (Wehner ve Locy, 1981; Kim ve ark., 1988). Her iki genotip içinde, 4-5 haftalık kültürden sonra iyi gelişmiş sürgünler, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına transfer edilerek normal yaprak ve kök gelişimi göstermişlerdir.

Vasudevan vd. (2001) tarafından yapılan çalışmada, Poinsett 76 çeşidinin 5-7 günlük fidelerinin sürgün uçları eksplant olarak kullanılarak sürgün ucu eksplantlarından çoklu sürgün indüksiyonu araştırılmıştır. 5 mm uzunluğundaki sürgün uçları, farklı oksin (2,4-D, NAA ve IAA) ve sitokin (BAP ve Kinetin) kombinasyonu ve konsantrasyonları ile %3 sukroz içeren MS ortamı üzerine kültüre alınmıştır. Uzayan sürgünler daha sonra aynı ortam üzerinde alt kültüre alınmıştır. Sürgün tomurcukları, 10 günlük kültürden sonra BAP (0.5-1 mg/L) veya Kinetin (1-2 mg/L) içeren ortamda eksplantların meristematik bölgelerinden uyarılmıştır. 1 mg/L BAP ile desteklenmiş besiyerinde 4 haftalık kültürden sonra, sürgün tomurcuklarından maksimum sürgün elde edilmiştir. Bununla birlikte, düşük BAP ve Kinetin konsantrasyonları (0.5 mg/L'nin altında), tomurcuk/sürgün indüksiyonunu desteklememiştir. Eksplantların, daha yüksek konsantrasyonlardaki BAP, 2,4-D, NAA veya IAA ile desteklenmiş ortamlarda kallus üretme eğiliminde olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma, BAP veya Kinetinin bireysel uygulamalarının sürgün ucu eksplantlarından sürgünler ürettiğini, ancak eksplant başına sürgün sayısının düşük olduğunu ortaya koymuştur. Optimum BAP (1 mg/L) ile düşük bir NAA (0.1 mg/L) konsantrasyonu, sürgün tomurcukların uyarılmasında ve daha sonra sürgün ucu eksplantlarından çoklu sürgünlerin üretilmesinde temel bulunmuştur. BAP (1 mg/L) ve NAA (0.2 mg /L) içeren ortamlarda tek bir sürgün ucu eksplantından 22 kadar bitki üretildiği ve eksplant başına maksimum sürgün üretmek için en az 3 alt kültürün gerekli olduğu bildirilmiştir.

Mendi (2003) tarafından, kotiledon yaşı (6, 15, 21 saat ve 3 gün), kotiledon pozisyonu (proksimal ve distal) ve büyüme düzenleyicileri (BAP ve Zeatin)'nin *Cucumis Sativus*'un rejenerasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Suda bekletme zamanlarının şişkinleşme üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir. 6-15 ve 21 saatlik kotiledonların proksimal bölgelerinden benzer sonuçlar alınırken (2-2.7 sürgün/eksplant), distal kısımlardan daha az sayıda sürgün elde edilmiştir (0.75-1.5 sürgün/eksplant). Ayrıca 3 günlük kotiledonların proksimal kısımları (0.75 sürgün / eksplant), distal kısımlara göre (0.25 sürgün/ eksplant) daha fazla sürgün üretmiştir. BA veya Zeatin kullanımının sürgün oluşumu üzerine etkisinin istatistiksel açıdan önemsiz olduğu da bu çalışmada rapor edilmiştir.

Ahmad ve Anis (2005) tarafından *Cucumis sativus* L.'nin *in vitro* çoğaltımı için etkili ve tekrarlanabilir bir protokol nodal eksplantlardan geliştirilmiştir. Yapılan ilk denemede 1 µM BA ve 200 mg/l kazein hidrozilat içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında optimum sayıda sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. 1 µM NAA içeren 1/2 MS ortamında ise köklenme kolayca sağlanmıştır. 4-5 hafta sonra, rejenere bitkiler sera koşullarında toprağa aktarılmış ve morfolojik olarak bir değişiklik gözlenmediği rapor edilmiştir.

Selvaraj vd. (2006) *Cucumis sativus* L.'nin Poinsett 76 çeşidinde, *in vitro* organogenesis oluşumunu incelemiş ve hipokotil eksplantından organogenesis başarılmıştır. 7 günlük hipokotil eksplantları, 87.64 µM sukroz, %0.8 agar, 2,4-D (3.62 µM) ve BAP (2.22 µM) içeren MS ortamında kallus oluşumu başarılmıştır. Kallustan gelen sürgün tomurcukların rejenerasyonu, 30 gün aralıklarla, aynı besi ortamında iki alt kültürden sonra 8.88 µM BA, 2.5 µM Zeatin ve %10 hindistan cevizi suyu ile takviye edilmiş MS ortamında gerçekleştirilmiştir. Gibberellik asit (1.75 uM) içeren ortamda kültüre alındığında rejenere filizlerin (1.5 cm uzunluğunda) üç hafta içinde uzadığı (5.3 cm) ve (7.36 uM) IBA ile takviye edilmiş MS ortamına aktarıldığında kökler ürettiği bildirilmiştir. Oluşturulan bu protokolün, dört aylık bir süre boyunca hipokotil eksplantından, eksplant başına yaklaşık 25 bitki verdiği rapor edilmiştir.

Selvaraj vd. (2007) tarafından, organojenik kallus indüksiyonu ve yüksek frekanslı sürgün rejenerasyonu hıyar kotiledon eksplantlarından elde edilmiştir. 5 günlük *in vitro* yetiştirilmiş fidelerden elde edilen kotiledon eksplantlarının yaklaşık %86.2'si, 20 günlük aralıklarla iki ardışık transferden sonra NAA (2.69 µM) ve BA (4.44 µM) içeren MS ortamında yeşil, kompakt nodüler organojenik kalluslar elde edilmiştir. Adventif sürgün oluşumu için organojenik kalluslar NAA (1.34 µM), BAP (8.88 µM), Zeatin (0.91 µM) ve L-glutamin ile takviye edilmiş MS ortamında 20 gün aralıklarla transfer edilmiş ve %75.6 oranında sürgün çoğaltımı meydana geldiği rapor edilmiştir. Kallustan ayrılan sürgünler (1cm), GA<sub>3</sub> (1.44 µM) ve BA (4.44 µM) ile takviye edilmiş MS ortamında uzatılmış ve bu sürgünler, IBA (3.42 µM) ve BA (4.44 µM) ile takviye edilmiş MS ortamında köklendirilmiştir. Köklü bitkiler serada aklimatize edildikten sonra %80 hayatta kalma oranı göstermiştir.

Mohammadi ve Sivritepe (2007) yaptıkları bir çalışmada güvenilir bir klonal çoğaltım protokolü geliştirmek amacıyla, farklı oksin ve sitokinin konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının, sürgün ucu eksplantlarından hıyarın *in vitro* morfogenezisi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Telegraph 314, Pepinex 69 ve Rebella çeşitlerinin *in vitro* yetiştirilen 13 günlük fidelerinden sürgün ucu eksplantları (3 ila 5 mm uzunluk), farklı BA ve NAA konsantrasyonları (0.0, 0.3, 0.4 ve 0.6  $\mu\text{M}$ ) ve bunların kombinasyonları ile takviye edilmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamında 32 gün boyunca kültürlenmiştir. Proliferasyon oranı, sürgün kalitesi ve incelenen diğer parametreler, optimal ortamın 0.4  $\mu\text{M}$  BA olduğunu ve BGD içermeyen MS ortamında en iyi köklenme sağlanmasına rağmen, diğer uygulamalarda da (%45-100) köklenme meydana geldiği bildirilmiştir.

Usman vd. (2011), farklı oksin ve sitokininler kullanarak çeşitli somatik dokulardan, somatik embriyogenez ve sürgün rejenerasyonu başlatmışlardır. MS ortamına sırasıyla 2,4-D (2 mg/L) ve her biri 1.5 mg/L olan NAA ve BAP eklenerek yaprak disklerinde maksimum kallus başlangıcı sırasıyla %94.16 ve %76 oranında gözlemlenmiştir. Kotiledon eksplantında maksimum kallus, %77 oranında 4 mg/L BAP + 0.75 mg/L NAA ilavesi ile başarılmıştır. 5mg/L 2,4-D yaprak disklerinden elde edilen en yüksek embriyo oluşumunu (%23) verirken, BAP ile indüklenen kalluslar (%14) ve BAP + NAA (5 mg/L+ 1 mg/L) ile indüklenen kalluslar ise (%12) sürgün rejenerasyonu meydana getirmiştir.

Avaş (2013), hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinin somatik embriyogenez ve organogenesis yöntemleri ile üretimi konulu çalışmasında, NAA ve 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamında hipokotil eksplantından embriyogenik kallus elde edilmiştir. BAP, IAA ve NAA ile desteklenmiş ortamlarda yaprak, hipokotil ve kotiledondan öncelikle organogenik kallus elde edilmiştir. Somatik embriyogenez çalışmaları için en iyi sonuçlar, 1-2 mg/L NAA ile desteklenmiş MS ortamında hipokotil eksplantından elde edilirken, organogenez için ise en iyi sonuçlar 0.5 mg/L BAP ve IAA ile desteklenmiş MS ortamında kotiledon eksplantından elde edilmiştir. Embriyogenik kalluslar sıvı ortamlara transfer edilerek proembriyo, globular, kalp ve torpedo şekillerindeki embriyo öncülleri ve daha sonra olgun embriyolar elde edilmiştir. 1mg/L BAP ve NAA'de hipokotil eksplantında %100 oranında kallus gelişimi gözlenmiştir. Sürgün gelişimi için en iyi sonucu 1mg/L BAP ile desteklenmiş ortam verirken, kök gelişimi için en iyi sonucu ise 1mg/L IAA ile desteklenmiş ortamın verdiği bildirilmiştir.

Grozeva ve Velkov (2014) tarafından yapılan çalışmada, 15B ve Gergana hıyar genotiplerinde kültür ortamının ve kullanılan eksplant tipinin *in vitro* kallogenesis ve organogenesis üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bitki rejenerasyon hızının genotip, eksplant tipi ve kültür ortamına bağlı olduğu tespit edilmiştir. Hipokotillerin organogenesisde kotiledonlardan daha duyarlı olduğu bulunmuştur. En yüksek rejenerasyon, Gergana çeşidinde 1 mg/L BA (%73.3) içeren ortamda hipokotil eksplantında ve 3.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA (% 61.7) içeren kotiledonlarda gözlenmiştir.

Ayrıca 15B ve Gergana genotipinin, kotiledon eksplantlarında, 3 mg/L BA ile desteklenmiş kültür ortamında sırasıyla (% 41.7 ve % 76.7) en yüksek frekansa sahip organogenesis gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Ugandhar vd. (2013) *Cucumis sativus* L. yaprak eksplantlarından kallus indüksiyonu ve somatik embriyogenesis üzerine yaptıkları çalışmada yapraklar, %0.8 bacto agar içeren MS ortamında 26°C de karanlık koşullarda inkübe edilmiş ve 6 cm lik bir yüksekliğe ulaştıktan sonra steril koşullarda 6-8 mm olacak şekilde kesitlere ayrılmıştır. Yaprak eksplantları daha sonra kallus indüksiyonu için çeşitli konsantrasyonlarda 2,4-D (0.75 mg/L) ve %3 sukroz içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. İki haftalık kallus kültürü, çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonlarda 2,4-D (1-2 mg/L) ve TDZ (0.25-1 mg/L) ile takviye edilmiş MS ortamında alt kültüre alınmıştır. Verimli somatik embriyogenesis, üç hafta içinde TDZ (0.25mg/L) ile birlikte 2,4-D (1 mg/L) ile takviye edilmiş MS ortamında gözlenmiştir. Kallus tomurcuklarının, sekiz gün içinde küresel embriyoidlere daha sonraki on günlük inkübasyonda ise kalp şeklindeki embriyoidlere dönüştüğü rapor edilmiştir.

Alam vd. (2015), *Cucumis sativus* L. 'nin nodal eksplantlarını kullanarak hızlı ve etkili bir *in vitro* çoğaltma ve rejenerasyon sistemi gerçekleştirmişlerdir. Nodal eksplantlar, proksimal bölge yukarı bakacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki BAP (0.5-3 mg/L) ve Kinetin (0.5-3 mg/L)'in bireysel uygulamalarında ayrıca IAA (0.5 mg/L) + BAP (1-5.0 mg/L) ve IAA (0.5 mg/L) + KN (1-5 mg/L) kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. 3 hafta sonra toplam sürgün sayısı belirlenmiş ve izole edilen sürgünler (5 cm'lik) köklendirme için NAA (0.1-1 mg/L) ile takviye edilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmada, 1.5 mg/L konsantrasyonda BAP (%87), Kinetinden (%53) daha fazla sayıda sürgün rejenerasyon frekansını göstermiştir. Ayrıca kombinasyon uygulamalarında, IAA (0.5 mg /L) + BAP (3 mg /L) 'de frekans (% 70) iken, KN (3 mg/L) + IAA (0.5 mg/L)' de frekans (%67) bulunmuştur. Maksimum kök oluşumu sıklığı (%83) ise, *in vitro* sürgünlerin 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamında kültüre alındığında rapor edilmiştir.

Jesmin ve Mian (2016) yaptıkları çalışmada, sterilize edilmiş hıyar tohumlarını MS ortamı üzerinde 7 gün süre ile inkübe etmişler ve çimlenen fidelerin yaprak, kotiledon ve kök gibi kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplantlar, farklı konsantrasyonlarında 2,4-D (2, 3, 5 mg/L) ve BAP (0.5, 1, 1.5 mg/L) içeren MS ortamı üzerinde tek tek ve NAA ve BAP kombinasyonları ile takviye edilmiş MS ortamı üzerinde kültürlenmiştir. 4 hafta sonunda kök, yaprak ve kotiledon eksplantlarından kallus başlangıcı gözlenmiştir. Kallus indüksiyonu için optimum ortam kök (89 ±% 0.75) ve kotiledon (74.43 ± 1.30) eksplantlarının, 1 mg /L NAA ve 0.5 mg /L BAP ile desteklenmiş MS ortamı olduğu bildirilmiştir. Kök eksplantlarının sürgün indüksiyonu için daha rejeneratif olduğu ve 2,4-D içeren ortamda indüklenen kallusun gevrek ve sarı renkte olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma ile, *Cucumis sativus*'un mikroçoğaltımı ve kallus indüksiyonu için oluşturulan protokolün, eksplant seçimi, yüzey sterilizasyonu, büyüme

düzenleyicileri ve bunların farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonları gibi çeşitli anahtar faktörlere bağlı olduğunu göstermiştir.

Venkatachalam vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada, sitokininlerin, gümüş nitratın ( $AgNO_3$ ) ve oksinlerin hıyarda bitki rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. Kotiledon nod eksplantları, sürgün tomurcuğu indüksiyonu için çeşitli konsantrasyonlarda BAP (0.5-2.5 mg/L) ve Kinetin (0.5-2.5 mg/L) takviye edilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. 1.5 mg/L BAP, çoklu sürgünlerin (% 98.4) yüksek frekansının indüksiyonu için en iyi konsantrasyon olarak bulunmuştur. Ayrıca, BAP ile birlikte  $AgNO_3$  eklenmesinin, hıyarda sürgün tomurcuğunun uzamasının yanı sıra çoklu sürgün tomurcuğu (%100) gelişimini büyük ölçüde desteklediği öne sürülmüştür. Köklenmenin en yüksek yüzdesi (%96.2), IBA (1.5 mg/L) ve Kinetin (0.5 mg/L) kombinasyonunu içeren bir ortamda gerçekleşmiştir. Ayrıca aklimatize bitkilerin, hayatta kalma oranının %72 olduğu gözlenmiştir. Gümüş nitratın, sadece çoklu filiz tomurcuk rejenerasyonunun artırılması için değil, aynı zamanda filiz tomurcuğunun uzamasını teşvik etmesi üzerinde de olumlu etki gösterdiği kanıtlanmıştır. *In vitro* rejenere bitkilerin RAPD analizi sonucu ana bitki ile oldukça monomorfik ve özdeş bantlama paterni gösterdiği bulunmuştur. Bu nedenle, kotiledon nod eksplantlarının gelecekte transgenik hıyar bitkilerinin üretimi için başarıyla kullanılabilceği rapor edilmiştir.

Joyia vd. (2019)'nin yaptıkları çalışmada, *Cucumis sativus* L. in vitro rejenerasyonu için sürgün ucu eksplantlarını kullanmıştır. 7, 8 ve 9 günlük fideler kullanılarak, rejenerasyon hızının fide gelişim aşamasındaki önemi araştırılmış ve 7 günlük çimlenmeden sonra kullanılan hıyar fidelerinden alınan sürgün uçlarının, rejenerasyon için en uygun olduğu bildirilmiştir. Bu sürgün uçları, farklı konsantrasyonlarda BAP (0.5-2.5 mg/L) ve Zeatin (2 mg/L) ile takviye edilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. 1.5 mg/L BAP ve 2 mg/L Zeatin ile takviye MS ortamının, maksimum sürgün oluşumu ile sonuçlandığı gözlenmiştir. BAP konsantrasyonunun 1.5 mg/L'nin üzerine çıkarılması sonucunda ise sürgün oluşumunun azaldığı bildirilmiştir. Köklendirme amacıyla IBA (0.5-2.5mg / L) kullanılmış ve en iyi kök gelişimi 1mg/L IBA'ya sahip MS ortamında meydana geldiği bildirilmiştir.

Hıyarda yapılan rejenerasyon çalışmalarının ayrıntıları Çizelge 2.1.'de, hıyar dahil farklı türlerde virüs direnci için yapılan çalışmaların ayrıntıları ise Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Hıyarda yapılan rejenerasyon çalışmaları ve ayrıntıları

Sıra No	Genotip	Eksplant Türü	Fide Yaşı	Temel Besin Ortamı	Karbonhidrat	Bitki Gelişim Düzenleyicisi (BGD)	Diğer Katkı Maddeleri	Kültür Sonucu (SOO: Sürgün oluşum oranı KOO: Kallus oluşum oranı ROO: Kök oluşum oranı SS: Sürgün sayısı/ eksplant EOO: Embriyo oluşum oranı)	Referans
1	85 farklı çeşit	Kotiledon Hipokotil	7 gün	MS	Sukroz: %3	BA (1 mg/l) + NAA (1 mg/l)	-	PI 279463: %53 SOO PI 401732: %40 SOO	Wehner ve Locy (1981)
2	Choungyongsam chok Chungang Hukchinju Karak Karak-banbaek Manchoonchoun gjang Pungmi Sayup Seoul Yorum-samchok	Kotileon	10 gün	MS	Sukroz: 30 g/l	2,4-D (0.5 µM) + BAP (5 µM)	Myo-inositol: (100mg/l) Thia- mine HCl: (0.8 mg/l) Nicotinic acid: (2.0 mg/l) Pyridoxine HCl: (0.8 mg/l) Bacto-agar : (0.8 g/l)	Hukchinju: 45 SS, %100 ROO Manchoonchoun gjang: 276 SS, %100 ROO Seoul: 12 SS, %100 ROO	Kim vd. (1988)
3	Crystal Salad	Kotiledon	5-7 gün	MS	Sukroz: %2	Kinetin (2 mg/l)	Agar: %0,8	50 SS	Gambley ve Dodd (1990)

Çizelge 2.1.'in devamı

4	Burbless Hibrit	Kotiledon	5-7 gün	Mod MS	-	BAP (2 mg/l) + NAA (0.3 mg/l)	Staba vitamin (1969): (10 ml) Bacto-agar: %7	%50 SOO	Msikita vd. (1990)
5	Sumter Straight 8	Kotiledon	Sumter: 4 gün Straight 8: 5gün	MS	Sukroz: %3	NAA (1 mg/l) + BA (1 mg/l)	Agar: %1 Bacto agar	Sumter: %20 SOO Straight 8: %60 SOO	Cade vd. (1990)
6	Marketer Marketmore Wisconsin SMR- 18 Tablegreen Spotfree China	Kotiledon	10 gün	MS	-	BAP (4 mg/l) +NAA (0.2 mg/l)	Agar:8 g/l	Marketer: 0 KOO, 3 SS Marketmore: 0 KOO, 0 SS Wisconsin SMR- 18: %10 KOO, 0 SS Tablegreen: %0 KOO, 0 SS Spotfree: %40 KOO, 1 SS China: %77 KOO, 19 SS	Ali vd. (1991a)
7	Burbless Hibrit	Kotiledon	-	Mod MS	-	BAP (4 mg/l) +NAA (0.2 mg/l)	-	% 47 SOO, 54 SS	Ali vd. (1991b)
8	Hokus Salty Sporu IBPGR	Kotiledon	3-5 gün	MS	Sukroz: 40 g/l	Kinetin (50 µM) + IAA (0.1µM)	Tryptone L42 (Oxoid 500 mg/l) Imperial agar: 6 g/l	IBPGR: %3.1 SOO	Hooymans vd. (1994)

Çizelge 2.1.'in devamı

9	Shimoshirazu Fushinarimidori Aonaga F1 Aonagajibai Chikanarishiyou Yoshinari Hokushin	Kotiledon	6-7 gün	MS+ Gamborg's B5 vitaminleri	Sukroz: %3, %6, %9, %12	2,4-D (9.0 µM) + NAA (2.7 µM) + BAP (2.2 µM)	Gelrite: % 0.25 Aktif kömür: % 0.5	Fushinarimidori: %72 EOO	Lou ve Kako (1994)
10	Borszczagowski SH 15 Skierniewicki C. anguria	Yaprak	3-4 hafta	1/2 MS	Sukroz: %3	2iP:2,4-D (0.8/0.8 mg/l) 2iP: NAA (0.4/0.8 mg/l)	Difco agar: 0.7% Edamine: 250 mg/l	Borszczagowski: %85 SOO Skierniewicki: %10 SOO C. anguria: %35 SOO	Burza ve Malepszy (1995)
11	Spring Swallow (SS) Tasty Green(TG) Suyo Long (SL) Suyo Cross (SC) Tasty Glory (TL)	Hipokotil Kotiledon (Proximal, Distal)	8 gün	MS	Sukroz: %3	BA (1.0 mg/l) BA (2.0 mg/l)	Phytigel: 2 g/l AgNO <sub>3</sub> : 30 µM	SS Proksimal Kotiledon: 79 SS TG Proksimal Kotiledon: 75 SS SL Proksimal Kotiledon: 69 SS SC Proksimal Kotiledon: 75 SS TL Proksimal Kotiledon: 81 SS	Mohiuddin vd. (1997)
12	Shinhukjinju Chungjang	Yaprak	4 gün	MS	Sukroz: 30 g/l	NAA (5.0µM) +BAP (2.5µM)	Myo-inositol: 100 mg/l Bacto-agar: 0.8 g/l	Shinhukjinju: %77 SOO, 3-7 SS Chungjang: %43 SOO, 1-3 SS	Seo vd. (2000)
13	Chongjang	Kotiledonumsu hipokotil	3-5 gün	MS	-	Zeatin (2 mg/l)	-	%80-90 SOO	Kim vd. (2000)

Çizelge 2.1.'in devamı

14	Poinsett 76	Sürgün uçları	5-7 gün	MS	Sukroz: %3	BAP (1.0 mg /l) + NAA (0.1 mg/l)	-	22 SS	Vasudevan vd. (2001)
15	Çengelköy	Kotiledon Hipokotil	3,5,10 gün	MS	Sukroz: %30	Zeatin (2 mg /L)	Phytigel: %0.2	Kotiledon: %20.6 SOO Hipokotil: %0.6 SOO	Kose ve Koç (2002)
16	STR-8	Kotiledon	6,15 ve 21 saat, 3 gün	MS	Sukroz: 30g/l	BA (2.0 mg/l) + ABA (1.0 mg/l) Zeatin (2.0 mg/l) + ABA (1.0 mg/l)	Phytigel: 2.5 mg/l	6, 15, 21 saat: Proximal Kotiledon: 2-2.7 SS Distal Kotiledon: 0.75- 1.5 SS 3 gün: Proximal Kotiledon: 0.75 SS Distal Kotiledon: 0.25 SS	Mendi (2003)
17	Barsati	Nodal segment	15 gün	MS	Sukroz: %3	BA (1.0 µM)	Kazein hidrolizat: 200 mg/l Bakteriyolojik agar: % 0.8	%100 SOO, 8.80 ± 0.27 SS	Ahmad ve Anis (2005)
18	Beit Alfa	Kotiledon Flamingo bill	4 gün	MS	Sakkaroz: % 3	BAP (2 mg/l) +IAA (1 mg/l)	Agar: %0.8 Phytigel: % 3	Kotiledon: %84 SOO Flamingo bill: %17 SOO	Kobaner (2006)

Çizelge 2.1.'in devamı

19	Poinsett 76	Hipokotil	7 gün	MS	Sukroz: 87.64 $\mu$ M	2,4-D (3.62 $\mu$ M) + BAP (2.22 $\mu$ M) BA (8.88 $\mu$ m) + Zeatin (2.5 $\mu$ M)	Agar: %0.8 Hindistan cevizi suyu: %10	25 SS, %90.3 KOO	Selvaraj vd. (2006)
20	Poinsett 76	Kotiledon	5 gün	MS	Sukroz: %3	NAA (2.69 $\mu$ M) + BA (4.44 $\mu$ M) NAA (1.34 $\mu$ M) + BA (8.88 $\mu$ M) + Zeatin (0.91 $\mu$ M) + L- glutamine (136.85 $\mu$ M)	Agar: %0.8	36.2 SS, %75.6 SOO	Selvaraj vd. (2007)
21	Telegraph 314 Pepinex 69 Rebella	Sürgün uçları	13 gün	MS	Sukroz: %3	BA (0,4 $\mu$ M)	Agar: %0.7	Telegraph 314: %96 KOO, %90 ROO Pepinex 69: %93 KOO, %100 ROO Rebella: %100 KOO, %100 ROO	Mohammadi ve Sivritepe (2007)
22	Bethalpa Marketmore	Kotiledon Yaprak Yaprak diski	12-15 gün	MS	-	2,4-D (2 mg/l) NAA (1.5 mg/l) + BAP (1.5 mg/l)	-	%94.16 KOO, %23 EOO	Usman vd. (2011)
23	<i>Cucumis sativus</i> . L	Kotiledon Hipokotil	Belirtilmemiş	MS	Sukroz: 30 g/l	2,4-D (0.75 mg/l) TDZ (0.25 mg/l) +2,4-D (1.0 mg/l)	Agar: %0.8	%90 EOO	Ugandhar vd. (2013)

Çizelge 2.1.'in devamı

24	F.18345	Kotiledon Hipokotil Yaprak Yaprak sapı	Belirtilmemiş	MS SH B5	Sukroz: % 3	BAP (1.0 mg/l)	Agar: % 0.6	Hipokotil: %100 SOO, %100 ROO, %100 KOO Yaprak: %47 SOO, %70 ROO, %53 KOO Yaprak sapı: %12 SOO, %76 ROO, %28 KOO Kotiledon: %23 SOO, %68 ROO, %44 KOO	Avaş (2013)
25	15B Gergana	Kotiledon Hipokotil	5-7 gün	MS	Sukroz: % 3	BA (1.0 mg/l) BA (3.0 mg/l) + IAA (0.5 mg/l)	Agar: % 0.7	15 B: %100 KOO, %13.3 SOO, 0.13 SS Gergana: %100 COO, %73 SOO, 0.90 SS	Grozeva ve Velkov (2014)
26	<i>Cucumis sativus.</i> L	Nodal segment	21-28 gün	MS	Sukroz: % 3	BAP (1.5 mg/l)	Agar: % 0.8	%87 SOO, %83 ROO	Alam vd. (2015)
27	Hatiyakira	Yaprak Kök Kotiledon	7 gün	MS	Sukroz:30 g/l	BAP (0.5 mg/l) + NAA (1.0 mg/l)	Agar: 8 g/l	%89.0±0.75 KOO	Jesmin ve Mian (2016)

**Çizelge 2.2.** Virüs direnci için yapılan CRISPR / Cas9 uygulamaları (Borrelli vd. 2018)

Bitki türü	Virüs	Hedef gen	Gen fonksiyonu	Strateji	Referans
<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Nicotiana benthamiana</i> ve <i>Arabidopsis thaliana</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>BSCTV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CP,Rep ve IR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RCA mekanizması (Rolling Circle Amplification)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cas9 / gRNA ekspresyon plazmid vektörleri ile yaprakların <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ji vd. 2015</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Nicotiana benthamiana</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>BeYDV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LIR ve Rep/RepA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RCA mekanizması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cas9 / gRNA ekspresyon plazmid vektörleri ile yaprakların <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Baltes vd. 2015</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Nicotiana benthamiana</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>TYLCV</li> <li>BCTV</li> <li>MeMV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CP,Rep ve IR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RCA mekanizması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cas9 ekspresyon TRV vektörü ile yaprakların <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ali vd. 2015</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Nicotiana benthamiana</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CLCuK oV</li> <li>MeMV</li> <li>TYLCV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CP,Rep ve IR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RCA mekanizması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cas9 ekspresyon TRV vektörü ile yaprakların <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ali vd. 2016</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Nicotiana benthamiana</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>TuMV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>GFP1</li> <li>GFP2</li> <li>HC-Pro ve CP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Replikasyon mekanizması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cas13a ekspresyon TRV vektörü ile yaprakların <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aman vd. 2018</li> </ul>

Çizelge 2.2.'nin devamı

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Nicotiana benthamiana</i> ve <i>Arabidopsis thaliana</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CMV</li> <li>• TMV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ORF1,2,3</li> <li>• CP</li> <li>• 3'UTR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Replikasyon mekanizması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FnCas9 / gRNA ekspresyon ikili vektörleri ile yaprakların <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonu (çiçek daldırma)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zhang vd. 2018</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Cucumis sativus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CVYV</li> <li>• ZYMV</li> <li>• PRSV-W</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>eIF4E</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA virüslerinin translasyonu için konak faktörü</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kotiledonların (embriyo olmadan) Cas9 / gRNA ikili vektörleri ile <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chandrasekeran vd. 2016</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Arabidopsis thaliana</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TuMV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>eIF(iso)4E</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA virüslerinin translasyonu için konak faktörü</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cas9 / gRNA rekombinant plazmid ikili vektörleri ile <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyon (çiçek daldırma)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pyott vd. 2016</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Oryza sativa</i> L. <i>japonica</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RTSV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>eIF4G</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA virüslerinin translasyonu için konak faktörü</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Olgunlaşmamış embriyoların Cas9 / gRNA ekspresyon plazmid vektörleri ile <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Macovei vd. 2018</li> </ul>

## 2.2. Hıyar Bitkisinde (*Cucumis sativus* L.) *Agrobacterium* Aracılığıyla Yapılan Gen Transformasyon Çalışmaları

Trulson vd. (1986), *C. sativus* cv. Straight Eight çeşidinin hipokotil eksplantlarını *Agrobacterium rhizogenes*'in pARC8 plazmidini taşıyan A4 ırkı ile ko-kültüre almış ve elde ettikleri transgenik hatlarda kök gelişimini gözlemiştir. Bitkiye aktarılan neomycin phosphotranferase geni aracılığıyla ile southern blot analizi yapılmış ve kanamisinli ortamda sağlıklı sürgün oluşturan bitkilerin npt II açısından pozitif sonuç verdiği, bu sebeple bunların transgenik olduğu düşünülmüş ancak transgenik bitkilerin çoğunun vektör DNA'sını taşıdığı fakat bazılarının Ri plazmid DNA'sını taşımadıkları gözlenmiştir.

Chee (1990) tarafından yapılan bir çalışmada, Poinsett 76 çeşidinin kotiledonları *A. tumefaciens*'in npt II genini içeren C58Z707 suşu ile gen transformasyonu yapılmıştır. Bakterinin kotiledonlarla muamelesinden sonra 2 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L Kinetin içeren MS ortamında kültüre alınarak, eksplantlardan gelişen transgenik bitkilerin 100 mg/L Kanamisin içeren ortamda seçimi yapılmıştır. Somatik embriyogenesis yoluyla yüksek sayıda normal morfolojiye sahip transgenik bitki elde edilmiştir. Transgenik olduğu düşünülen bitkilerden genomik DNA izole edilerek, npt II gen bölgesini içeren 2.0 kb'lık bölgenin hibridizasyon verdiği rapor edilmiştir.

Sarmento vd. (1992)'nin yapmış oldukları bir çalışmada, 2 turşuluk genotipin yaprak ve petiyol segmentleri, pBIN ve pCGN binari plazmidlerini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in oktopin tipi olan LBA4404 ile transforme edilmiştir. Seçici markör olarak fosfotransferaz (npt II) kullanılmıştır. 75 mg/L Kanamisin içeren ortamda kallus oluşum frekansının; eksplant büyüklüğü, bakteri yoğunluğu, bakteri ile muamele edilme, kokültivasyon süresi, asetosiringon varlığı gibi faktörlerden etkilendiği belirtilmiştir. 20 µM asetosiringon içeren 10<sup>8</sup> hücre/ml yoğunluktaki bakteri süspansiyonu ile 5 dk muamele edilen 4-6 mm büyüklüğünde petiyol segmentleri veya 0,5 cm<sup>2</sup> büyüklüğünde yaprak segmentlerinin 48 saat kokültivasyon süresini takiben bu eksplantlar 500 mg/L karbenisilin, 75 mg/L kanamisin, NAA/BA (5 / 2.5 µM) veya 2,4 D / BA (5 / 5 µM) içeren ortamda kültüre alınmıştır. Transforme olmuş kallus oranının %20-50, transforme olmuş kallustan gelişen bitkicik rejenerasyon oranının ise % 8-15 olduğu rapor edilmiştir.

Raharjo vd. (1996) yapmış oldukları bir çalışmada, petunya, tütün ve soyadan izole edilen kitinase genlerini içeren *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA 105 (lökopin tipi), MOG 101 (oktopin tipi) ve MOG 301 (nopalın tipi) olmak üzere 3 suşu ile Endavour çeşidi turşuluk hıyar kullanarak transforme bitki elde etmişlerdir. Tüm vektörlerin npt II markör geni ile CAMV 35S promotörünü taşıdığı bildirilmektedir. 10-21 günlük fideden alınan petiyol eksplantları, bakteri süspansiyonu (10<sup>8</sup> hücre/ml) ile 5 dk bekletilmiş ve 2,4-D (5µM), BA (5µM) içeren Murashige ve Skoog (MS) kokültivasyon ortamında 2-4 gün karanlıkta 27 C°de inkübe edilmiştir. Ardından eksplantlar, 500 mg/L

amfisilin içeren MS ortamında 3 kez durulanmış ve steril kağıt üzerinde kurutulmuş 50 mg/L kanamisin ve 500 mg/L karbenisilin içeren ortamda 4-5 hafta 24-26 °C'de kültüre alınmıştır. Kokültivasyondan 8 hafta sonra embriyogenik kallus oluşumunun kullanılan suşlara, vektörlere ve kokültivasyon süresinin uzunluğuna bağlı olarak değişmekte olduğu bildirilmiştir. En yüksek frekansın %12 ile EHA105 (lökopin tipi) kullanıldığında elde edildiği belirlenmiştir. Bitki rejenerasyon frekansını arttırmak için, bir veya iki alt kültürden sonra çoğalan embriyogenik kalluslar, 2,4-D/BA (1/1 µM) ve 50 mg/L kanamisin içeren sıvı süspansiyon kültürüne aktarılmış ve 120 rpm de 24-28 °C de sürekli çalkalanmıştır. Süspansiyon kültüründeki çeşitli boyutlardaki embriyonik kalluslar 2,4-D/BA (1/1 µM) veya NAA/BA (1/1 µM) ve 50 mg/L kanamisin içeren katı MS ortamına aktarılmıştır. Southern blot ve PCR analizleri ile npt II geninin bitkilere aktarıldığı ve Western analizi ile de aktarılmış olan asidik kitinase geninin varlığı rapor edilmiştir.

Nisbiyashi vd. (1996) transgenik hıyar bitkisi elde etmek için 7-10 günlük hipokotil eksplantları *Agrobacterium tumefaciens*'in NOS-nptII, CaMV 35S-I-gus ve CaMV 35S-hph genlerini içeren ırkı ile inoküle edildikten sonra IAA (4 mg/L), 2İP (1 mg/L) ve 50 veya 100 µM asetosiringon içeren ortamda 5 gün boyunca kültüre alınmıştır. Daha sonra kokültive hipokotil eksplantları 2,4-D (1.1 mg/L), BAP (0.23 mg/L), %1 kazein hidrolizat, 500 mg/L karbenisilin, 50 ve 100 mg/L kanamisin veya 20, 25 ve 30 mg/L higromisin B ile desteklenmiş MS rejenerasyon ortamına aktarılmış ve 4-6 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Asetosiringon ilavesi yapılan ortamlar üzerindeki hipokotil eksplantlarının kesilmiş yüzey hücrelerinde, GUS ekspresyonlarının gözlemlendiği ve transformasyon sıklığını arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca kanamisin ve higromisin B kullanılarak yapılan seçimde ise transgenik doku parçalarının 50-100 mg/L kanamisin içeren ortamdan, 20-30 mg/L higromisin B içeren ortamda daha etkili bir şekilde seçim gerçekleştirildiği bildirilmiştir.

Tabei vd. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, *Botrytis cinerea* (Gri küf) ya karşı dayanıklılığı artırıcı bir gen olan çeltik bitkisinden izole edilen kitinase geni (RCC2), *Agrobacterium tumefaciens* vasıtası ile hıyar bitkisine aktarılmıştır. 200'den fazla transgenik olduğu varsayılan hıyar sürgünlerinin 100 mg/L kanamisinle desteklenmiş MS ortamında rejenere olduğu bildirilmiştir. 60 gelişmiş sürgün, RCC2 geninin varlığı açısından incelenmiş ve bu genin varlığı doğrulanmıştır. Bu sürgünlerden 20 tanesi *Botrytis cinerea* (Gri küf) ile enfekte edildiğinde 15 tane sürgünün kontrole yani transgenik olmayana göre daha yüksek direnç gösterdiği bildirilmiştir. CR29, CR32 ve CR33 transgenik hıyar hatlarının *B. cinerea*'ya karşı en yüksek direnç gösterdiği ve bu hatlarda hastalık yayılmasının tamamen inhibe edildiği belirlenmiştir. Gen aktarımı yapılan yüksek dirençli (CR32 ve CR33) hatlar, kontrol bitkilerle karşılaştırıldığında hastalık direncine ait farklı tepkiler alındığı, CR33 de patojenin hüflerin penetrasyonunu engellediği, CR32 de ise hüflerin penetrasyonuna izin verirken hastalığın gelişmesini engellediğini bildirmişlerdir. CR32'nin ebeveynlerinin 3:1 (dayanıklı:duyarlı) oranında bir ayırım gösterdiği ve gri küfe dayanıklılığın kalıtılabilir olduğu tespit edilmiştir.

Ganapathi ve Perl-Treves (2000) yapmış oldukları bir çalışmada Poinsett 76 hıyar çeşidinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen aktararak kotiledon eksplantlarından direk organogenesis olanaklarını araştırmışlardır. Kotiledon parçaları, neomisin fosfotransferaz II (npt II),  $\beta$ -glukuronidaz (uidA) ve bar genlerini içeren *Agrobacterium*'un pME 524 (pGA 492 Gr-Bar (-)) plazmidini taşıyan EHA105 ırkı ile kokültüre alınmıştır. Transforme sürgünlerin 6 mg/L PPT ile etkili olarak seçildiği ve 4 haftada sürgün rejenerasyonunun meydana geldiği bildirilmiştir.

Kose ve Koç (2003)'un yapmış oldukları bir çalışmada, *in vitro* yetiştirilen fidelerin kotiledon ve hipokotil eksplantları, optimum sürgün rejenerasyon koşullarını belirlemek için farklı hormon kombinasyonları ve konsantrasyonları içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu, 2 mg/L zeatin içeren MS ortamında ortadan enine ikiye kesilen kotiledon yapraklarının proksimal bölgesinden elde edilmiştir. Transformasyon için doku parçaları, 100  $\mu$ M asetosiringon içeren bakteri süspansiyonunda 15-20 dk bekletilmiş ve Zeatin (2 mg/L) +MES (0.5 g/L) içeren MS ortamında karanlıkta 2 gün süre ile ko-kültüre alınmıştır. 50 mg/L kanamisin içeren MS ortamında seçilen doku parçaları histokimyasal GUS analizi ile test edilmiş ve dokularda meydana gelen mavi renk değişimleri gözlenmiştir. Transgenik dokulardan gelişen sürgünler kök gelişimi için bazal MS ortamında 4 ila 6 hafta boyunca kültüre alınmıştır. 10 cm yüksekliğindeki köklü bitkiler, doğal koşullara adaptasyonları için toprağa aktarılmış ve bu bitkilerin normal çiçek ve meyve oluşturdukları gözlenmiştir. Aktarılan npt II ve GUS genlerini belirlemek için, transgenik bitkilerden DNA izolasyonu yapılarak, PCR ile test edilmiş ve bitkilerin transgenik olduğu rapor edilmiştir.

Vengadesan vd. (2005) yaptıkları bir çalışmada eksplant kaynağı olarak, Greenlong çeşidinin karanlıkta 2 gün çimlendirilmiş tohumların kotiledon eksplantlarını kullanmışlardır. Embriyonik bölgeleri kesilen kotiledonlar BA (4.4  $\mu$ M) + ABA (3.8  $\mu$ M) + Adenin sülfat (108.5  $\mu$ M) içeren MS ortamında 10 gün kültüre alınmıştır. 10 günlük ön kültürden sonra kotiledon eksplantlarının proksimal bölgesi steril iğne ile yaklaşık 10 defa delinerek 10 dakika boyunca 50  $\mu$ m asetosiringon içeren bakteri süspansiyonunda bekletilmiştir. Rejenerasyon ortamında karanlıkta 3 gün bekletilen eksplantlar 2 mg/L PPT veya 100 mg/L kanamisin ve 300 mg/L sefotaksim içeren seleksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Bar geninin varlığı, basta herbisidi ile yaprak boyama testi ile tespit edilirken, kokültive 431 eksplanttan %7.2'si sürgün oluşturarak PPT üzerinde büyüdüğü ve 5 farklı bitkinin (%1.1) sothern hibridizasyonu ile transgenik olduğu belirtilmiştir.

Gal-On vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada, CFMMV'nin varsayılan pCAMSV54-kDa geni *Agrobacterium tumefaciens* ikili vektörüne klonlanmış ve bir partenokarpik hıyar çeşidinin kotiledon eksplantlarında transformasyon gerçekleştirilmiştir. İlan çeşidinin tohumları 1-2 gün karanlıkta çimlendirildikten sonra kotiledon eksplantları BAP (2 mg/l) + ABA (1 mg/l) + %3 sukroz, %0.8 oksid agar ve 200  $\mu$ M asetosiringon içeren MS ortamında 1-2 gün kültüre alınmıştır. Daha sonra kotiledon parçaları *Agrobacterium* süspansiyonu ile 5 dk muamele edilmiştir. 2 günlük

ko-kültivasyonu takiben eksplantlar, 500 mg/l sefotaksim ve 100 mg/l kanamisin içeren seleksiyon ortamında iki haftalık alt kültürle alınmıştır. R1 fideleri CFMMV direncine karşı ELISA ile taranmış ve toplamda 14 replikaz geni içeren R1 hattından 8 tanesi dirençli hat olarak belirlenmiştir. Toprak kaynaklı viral bir patojen olan tobamoviruse karşı duyarlı 144 çeşidi, bu transgenik anaç üzerine aşılandığında enfeksiyondan korunduğu rapor edilmiştir.

Kobaner (2006) tarafından yapılan çalışmada, 4 günlük fidelerin kotiledon eksplantlarına, *Agrobacterium tumefaciens*'in, CaMV 35S promotorü kontrolünde npt II (seçici markör geni) ve yeşil floresan proteinini kodlayan mGFP5ER genlerini taşıyan pBin-mGFP5-ER binari vektör plazmidi içeren AGL-1 ırkı kullanılarak, rejenerasyon ve gen aktarımı araştırılmıştır. 4 günlük fidelerden hazırlanan kotiledon eksplantları 0.5 g/l MES, %3 sakkaroz, 1 mg/l BA, 1mg/l IAA, 200 µM asetosiringon ve %3'lük phytigel içeren ortamda 2 gün 25-26 °C de ön kültüre alınmıştır. 2. günün sonunda eksplantlar *Agrobacterium* solüsyonunda 10 dk bekletilmiş ve aynı içerikli ortamda 2 gün karanlıkta 25-26°C de ko-kültüre alınmıştır. Eksplantlar, kanamisin ve karbenesilin içeren seleksiyon ortamı üzerinde 16 saatlik fotoperiyotta 25-26 °C'de 4 haftada bir yenilenmek üzere 8 haftalık kültüre alınmıştır. Gen transformasyon çalışmalarında 100 mg/l kanamisin konsantrasyonunun en uygun seçici ajan olduğu ancak tomurcuktan sürgün oluşumunun teşvik edilmesi için eksplantların seleksiyon ortamında iki hafta kültüre alınmasını takiben kanamisin konsantrasyonunun azaltılmasının uygun olacağı rapor edilmiştir.

Vasudevan vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada, Poinset 76 hıyar çeşidine ait 5 günlük kotiledon eksplantları, transformasyon için kullanılmıştır. Embriyonik aksenleri uzaklaştırılmış kotiledon eksplantları, *Agrobacterium tumefaciens*'in npt II, bar ve gus genlerini taşıyan EHA105 ırkı ile 10 dk boyunca muamele edilmiş ve enfekte olmuş eksplantlar BA (1 mg/l) + ABA (0.5 mg/l) içeren MS ortamında kokültivasyon için 2 gün inkübe edilmiştir. 300 mg/l sefotaksim ve 2 mg/l PPT içeren MS ortamında seçilen doku parçaları histokimyasal GUS analizi ile tespit edilmiştir. Ayrıca transgenik olduğu düşünülen bitkiler PCR ile test edilmiş ve bitkilerin transgenik olduğu bildirilmiştir. *Agrobacterium* yoğunluğunu, asetosiringon konsantrasyonunu ve ko-kültivasyon süresini optimize etmek için yapılan transformasyon deneylerinde en etkili yoğunluğun O.D:1 optimal olduğu, 20 µM asetosiringon kullanımının ko-kültivasyon sırasında enfeksiyon verimliliğini artırdığı ve 2 günlük ko-kültivasyon süresinin yüksek oranda GUS ekspresyonu ile sonuçlandığı rapor edilmiştir.

Selvaraj vd. (2010) yaptıkları çalışmada eksplant kaynağı olarak, Poinset 76 hıyar çeşidinin karanlıkta 2 gün çimlendirilmiş tohumlarının kotiledon segmenti kullanılmış ve embriyonik bölgeleri kesilip uzaklaştırılarak oluşturulmuş eksplantlar önkültür için BA (1 mg/L) + L-glutamine (20 mg/L) içeren MS ortamında 5 gün süre ile kültüre alınmıştır. Önkültürden sonra genişleyen kotiledonların proksimal bölgesi steril iğne ile (0.56x25 mm, eksplant başına yaklaşık 10 delik) delinerek 50 µM asetosiringon içeren

*Agrobacterium* süspansiyonunda 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Rejenerasyon ortamında karanlıkta 2-5 gün bekletilen eksplantlar 1-4 mg/L PPT veya 50-100 mg/L kanamisin ve 300 mg/L sefotaksim içeren seleksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Rejenere edilmiş sürgünler, GFP ekspresyonu için elde tutulan uzun dalga UV lambası kullanılarak *in vivo* olarak incelenmiş ve kotiledon eksplantlarında transforme sürgünlerin büyümesini arttırmak için düzenli aralıklarla kaçışların ve kimerik sürgünlerin belirlenmesine yardımcı olduğu olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca 2 mg/L PPT'nin seçim ajanı olarak kullanılması ile, PPT'nin transforme olmayan tüm tomurcukları öldürdüğü ve sadece transforme sürgün tomurcuklarının eksplantlardan daha fazla büyümesine izin verdiği bildirilmiştir.

Nanasato vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada, Shinhokusei No. 1 hıyar çeşidinin kotiledonları eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve *A. Tumefaciens*'in pIG121-Hm, pIG-sGFP ve pGFP-S65C binari vektörünü taşıyan EHA105 ırkı ile 10 dk muamele edilmiştir. *Agrobacterium* süspansiyonu ile vakum infiltrasyonu uygulanması, eksplantların proksimal bölgelerinde *Agrobacterium* enfeksiyonunun etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca filtre kağıdı ile ko-kültivasyon, eksplantların nekrozunu baskılayarak rejenerasyon verimliliğinin artmasına neden olmuştur. Varsayılan transgenik bitkiler kanamisin direnci ve yeşil floresan protein (GFP) ile taranmış ve transgenin hıyar genomuna entegrasyonu genomik PCR ve southern blot ile teyit edilmiştir. Bu transgenik bitkilerin normal olarak büyüdüğü ve T1 tohumlarının 7 hattan elde edildiği rapor edilmiştir. Hıyar üretimi için ortalama transgenik etkinliğin %11.9±3.5 olduğu ve kanamisinin seçici bir ajan olarak kullanıldığında bildirilen en yüksek değerler arasında olduğu rapor edilmiştir.

Li vd. (2017) hıyar kotiledon eksplantlarının *Agrobacterium* aracılı transformasyonu için vakum infiltrasyonu yöntemini kullanmışlardır. Kabukları soyularak sterilize edilen tohumlar, 2 gün karanlık koşullarda çimlenmeye bırakılmıştır. Distal kısımları uzaklaştırılan kotiledonlar, transformasyon için ön hazırlık aşamasında MS sıvı ortamında biriktirilmiştir. 5 dakika süreyle 2 seans vakum infiltrasyonu uygulandıktan sonra, eksplantlar *Agrobacterium*'da 5 dakika daha bırakılmış ve 30 g/L sukroz, 2 mg/ml BAP (750 µl) ve 2 mg/ml ABA (500 µl) ile desteklenmiş MS bazal ortamında 2 gün karanlık koşullarda ko-kültivasyona bırakılmıştır. Kanamisin ve karbenisilin içeren seleksiyon ortamında kültüre alınan rejenere bitkilerin transformasyon verimliliği %54 ve pozitif bitkicik transformasyon verimliliği ise enfekte olmuş eksplantların toplam sayısının yaklaşık %26'sı olarak bulunmuştur.

### 3. MATERYAL VE METOT

Çalışma, 2018-2021 yılları arasında çoğunlukla Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Doku Kültürü ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarları ile bunun yanında Bitki Koruma Viroloji ve Bakterioloji Laboratuvarları olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan bitki materyalleri ve doku kültürü ortamlarının hazırlanması

Bitki materyalleri olarak; 27 ve 247 nolu iki hıyar (*Cucumis sativus* L.) saf hattına ait tohumların *in vitro* şartlarda çimlendirilmesi ile elde edilen fideciklerin kotiledon, hipokotil ve kotiledon + hipokotil (filamingo-bill) eksplantları rejenerasyon optimizasyonu çalışmalarında, transformasyon çalışmalarında ise kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Transformasyonda kullanılan bakteri suşları (izolatları) ve plazmidler

Çalışmada *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin LBA4404 ve EHA105 suşları (ırkları) kullanılmıştır. Klavuz RNA ların (sgRNA1 + sgRNA2+ 52256) aktarılması için “*pFGC-pcoCas9*” plazmiti (AddGene Plasmid #52256) kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Çizelge 3.1.'in devamı

Fosfinotrisin (PPT)	Goldbio	Bitki seleksiyonu
Asetosiringon	Sigma	vir geni uyarıcısı
MS ortamı	Duchefa	Makro, mikro vitamin ve mineral kaynağı bazal besin ortamı
NN ortamı vitamini	Duchefa	Vitamin kaynağı
Agar	Duchefa	Katılaştırıcı ajan
Sukroz	Duchefa	Karbonhidrat kaynağı
MES	Duchefa	pH sabitleyici
BAP	Duchefa	Sitokinin (BGD)
Zeatin	Duchefa	Sitokinin (BGD)
2İP	Duchefa	Sitokinin (BGD)
TDZ	Duchefa	Sitokinin (BGD)
NAA	Duchefa	Oksin (BGD)
IAA	Duchefa	Oksin (BGD)
IBA	Duchefa	Oksin (BGD)
ABA	Duchefa	Dormant (BGD)
GA <sub>3</sub>	Duchefa	Gövde uzatma (BGD)
LB Broth	Merck	Bakteri büyütme
Etanol (%96)	Isolab	Sterilizasyon
Sodyum Hidroksit	Duchefa	pH ayarlama
HCl	Duchefa	pH ayarlama
DNA Ladder 100bp	Thermo Scientific	Jel görüntülme
Ethidium bromide	Merck	Jel görüntülme
EDTA	Merck	Total nükleik asit izolasyonu

## Çizelge 3.1.'in devamı

SDS	Merck	Total nükleik asit izolasyonu
Tris	Merck	Total nükleik asit izolasyonu
Potasyum Asetat	Merck	Total nükleik asit izolasyonu
TAE	Merck	Jel elektroforezi
Sodyum Klorür	Duchefa	Mikrobiyolojik ve moleküler çalışmalar

## 3.2. Metot

3.2.1. *In vitro* rejenerasyon optimizasyon denemeleri

Bitki rejenerasyon ortamı optimizasyonu denemelerinde 27 ve 247 genotiplerine ait tohumların *in vitro* kültrür şartlarında geliştirilen 5 günlük *in vitro* fideciklerden elde edilen kotiledon, hipokotil ve kotiledon + hipokotil eksplantları kullanılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. 5 günlük *in vitro* fideciklerin görüntüsü

Rejenerasyon optimizasyonu denemeleri için öncelikle *in vitro* stok fidecikler elde edilmiştir. Bu amaçla, 27 ve 247 nolu 2 hıyar saf hattına ait tohumlar yüzey sterilizasyonu için steril kabin içinde %70 lik etil alkol de 1 dk bekletilerek ardından 1 kez durulama yapılmıştır. Ardından, %15 lik hipo çözeltisinde 20 dk bekletildikten sonra steril saf su ile 3 kez ardışık durulamalar yapılarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.3.).



**Şekil 3.3.** Tohum sterilizasyonu ve sterilizasyonu tamamlanmış tohumlar

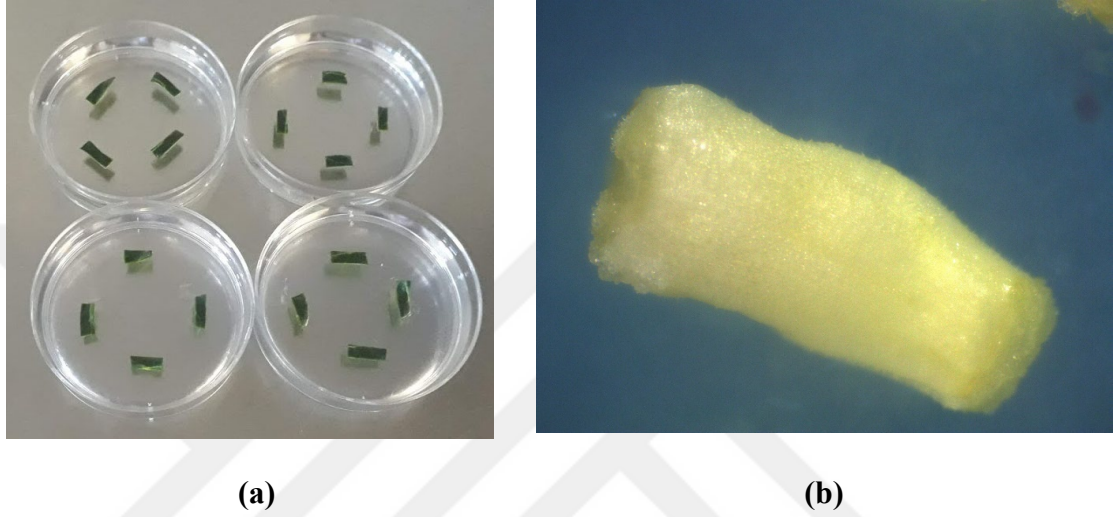
Tohumlar yüzey sterilizasyonundan sonra, BGD içermeyen MS (Murashige and Skoog 1962) besin ortamı tuzları ve NN (Nitsch ve Nitsch 1969) besin ortamı vitaminleri ile %3 sukroz ve %0.7 agar içeren pH'sı 5.8'e ayarlanmış ve otoklavlanarak sterilize edilmiş çimlendirme ortamına ekilerek, ilk 2 gün 25-26 °C'de karanlıkta, ardından 3 gün 16/8 saatlik fotoperyot koşullarına sahip iklim odasında kültüre alınmıştır.

Steril koşulların sağlanması için rejenerasyon ve transformasyonda kullanılan tüm malzemeler (pens, bistüri, kurutma kağıtları, saf su, pipet uçları) 1.2 atmosfer basınç altında, 121°C sıcaklıkta 20 dakika süre ile otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuştur. Steril kabin içerisinde kullanılan pens ve bistüriler kesim işlemleri sırasında ise %96'lık etil alkole daldırıldıktan sonra cam boncuklu sterilizatörde sterilize edilmiştir. BGD içermeyen MS bazal besin ortamlarının sterilizasyonu da otoklavda gerçekleştirilmiş, gerektiğinde ise 0.2 µm lik filtre ile sterilize edilmiş BGD ve antibiyotikler steril kabin içerisinde bazal besin ortamlarına ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan besin ortamları daha sonra farklı kullanım amaçları için 90x15 mm lik steril petri, 100 ml lik steril cam kavanoz veya 25x100 mm lik steril kültür tüplerinin her birisine steril kabin içerisinde sırasıyla 20 ml, 30 ml ve 10 ml olacak şekilde dağıtım yapılmıştır. MS bazal ortamının içeriğinde yer alan mineral tuz ve vitamin bileşikleri ile bunların konsantrasyonları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** MS bazal besin ortamının yapısında bulunan bileşikler ve konsantrasyonları (Murashige ve Skoog, 1962).

Bileşikler	mg/L
<b>Makro Elementler</b>	
CaCl <sub>2</sub>	332.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub>	180.54
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
<b>Mikro Elementler</b>	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
FeNaEDTA	36.70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
KI	0.83
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60
<b>Vitaminler</b>	
Glycine	2.0
Myo-inostol	100
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10

Eksplantlar (Şekil 3.4.), tohum çimlendirme ortamı ile aynı içeriğe sahip bazal besin ortamına Çizelge 3.3’de konsantrasyonları ve ortam numaraları belirtilen çeşitli oksin (IAA ve NAA), sitokinin (BA, Zeatin, 2-İP ve TDZ) ve ABA kombinasyonlarından oluşan kontrol dahil toplam 50 farklı kültür ortamı içeren petrielerde kültüre alınmıştır. Ortam denemelerinin her bir uygulamasında 6 cm çaplı 10’ar ml besin ortamı içeren 4 petri, her petri içerisinde 4’er adet eksplant kullanılmıştır.



**Şekil 3.4.** Bitki rejenerasyon ortamı optimizasyonu denemelerinde kullanılan 27 ve 247 nolu genotiplerin 5 günlük (a) kotiledon ve (b) hipokotil eksplantları

**Çizelge 3.3.** 27. ve 247. genotiplere ait kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kültüre alındığı rejenerasyon ortamlarının numaraları ve BGD içerikleri

Besin Ortamı No	SİTOKİNİN				OKSİN		
	BA (mg/L)	Zeatin (mg/L)	2İP (mg/L)	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	IAA (mg/L)	ABA (mg/L)
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-
1					0.75		
2					1.50		
3						0.75	
4						1.50	
5	0.75						
6	0.75				0.75		
7	0.75				1.5		
8	0.75					0.75	

Çizelge 3.3.'ün devamı

9	0.75					1.5	
10	1.5						
11	1.5				0.75		
12	1.5				1.5		
13	1.5					0.75	
14	1.5					1.5	
15		0.75					
16		0.75			0.75		
17		0.75			1.50		
18		0.75				0.75	
19		0.75				1.50	
20		1.5					
21		1.5			0.75		
22		1.5			1.50		
23		1.5				0.75	
24		1.5				1.50	
25			0.75				
26			0.75		0.75		
27			0.75		1.50		
28			0.75			0.75	
29			0.75			1.50	
30			1.5				
31			1.5		0.75		
32			1.5		1.50		
33			1.5			0.75	
34			1.5			1.50	
35				0.75			
36				0.75	0.75		
37				0.75	1.50		
38				0.75		0.75	
39				0.75		1.50	
40				1.5			
41				1.5	0.75		
42				1.5	1.50		
43				1.5		0.75	
44				1.5		1.50	
45			1				
46			2				

Çizelge 3.3.'ün devamı

47	1						1
48	1.5						1.5
49	2						1

Böylece, bitki rejenerasyon ortamı optimizasyon denemelerinde gerçekleştirilen her bir ortam uygulamasında, her 2 genotipin kotiledon ve hipokotil eksplantları toplam 50 ortamın her birisinde kültüre alınarak ayrı ayrı test edilmiştir. Rejenerasyon denemelerinde eksplantlar kültüre alındıktan sonra ilk 2 hafta 25 °C lik karanlık ortamda, daha sonra yine 25 °C lik, ancak bu kez 16/8 sa fotoperiyot koşullarında inkübe edilmiştir.

### 3.2.2. Transformasyon çalışmaları

#### 3.2.2.1. Transformasyon optimizasyon denemeleri

Çalışmada toplam 30 transformasyon yapılmıştır. En başarılı transformasyon etkinliğini sağlayıncaya kadar transformasyon etkinliği için son derece önemli olan genotip, bakteri ırkı, fide yaşı, eksplant tipi, önkültür, antibiyotik tipi ve markasından oluşan faktörler optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu nedenle başlangıçtan itibaren farklı transformasyonlarda farklı faktörlerin etkisi araştırılmaya başlanmıştır.

Optimize edilen faktörler aşağıda belirtilmiştir.

**Genotip:** Transformasyonda 27 ve 247 nolu genotiplerin etkisi incelenmiştir. Toplam 30 transformasyonun hepsinde her iki genotip kullanılmıştır.

**Bakteri ırkı:** Transformasyonda LBA4404 ve EHA105 ırklarının etkisi incelenmiştir. LBA4404 ırkı ilk 5 transformasyonda, EHA105 ırkı ise daha sonraki toplam 25 transformasyonda kullanılmıştır.

**Fide yaşı:** Transformasyonda 5 ve 1 günlük fidelere ait eksplantların etkisi araştırılmıştır. 5 günlük fideler ilk 22 transformasyonda, 1 günlük fideler ise daha sonraki toplam 8 transformasyonda kullanılmıştır.

**Eksplant tipi:** Transformasyonda kotiledon ve hipokotil eksplantlarının etkileri incelenmiştir. Kotiledon eksplantları 30 transformasyonun hepsinde, hipokotil eksplantları ise ilk 19 transformasyonda kullanılmış olup, son 11 transformasyonda kullanılmamıştır.

**Önkültür:** Kotiledon ve hipokotillere, 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l ABA + 200 µM/L asetosiringon içeren sıvı MS ortamında 150 devir/dk'da çalışan çalkalayıcıda 1 gece önkültür uygulamasının, transformasyondaki etkisi araştırılmıştır. Bu uygulama ilk 11 transformasyonda kullanılmış, bundan sonraki transformasyonlarda bu uygulamaya yer verilmemiştir.

**Antibiyotik tipi:** Transformasyonda bakteri gelişimini baskılama amacıyla seleksiyon ajanı olarak kullanılan antibiyotiğin etkisi sefotaksim ve timentin antibiyotikleri kullanılarak araştırılmıştır. Sefotaksim sadece ilk 7 transformasyonda, timentin ise bundan sonraki toplam 23 transformasyonda kullanılmıştır.

**Antibiyotik markası:** Transformasyonda timentin antibiyotiğinin tesadüfen fark edilen marka farklılık etkisi, Duchefa ve Goldbio markalarının ürünleri kullanılarak araştırılmıştır. Duchefa markasına ait timentin antibiyotiği 8.transformasyondan itibaren toplam 12 transformasyonda, Goldbio markasına ait timentin ise bundan sonraki son 11 transformasyonda kullanılmıştır.

### 3.2.2.2. Optimize koşullarda *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen transferi ve doku kültürü çalışmaları

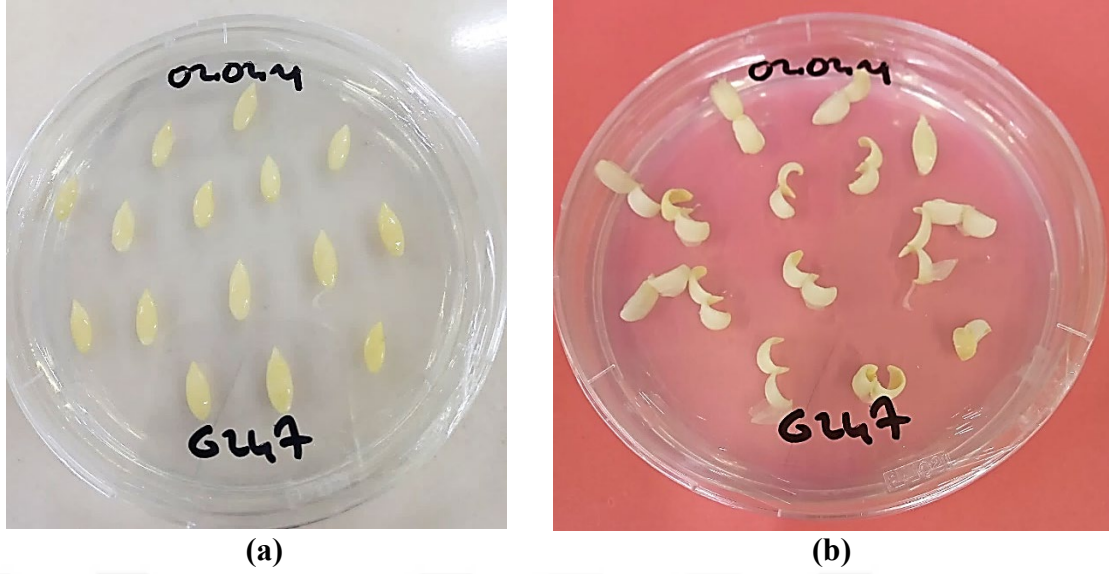
*A. tumefaciens*'in pFGC-pcoCas9 plazmidini taşıyan LBA4404 ve EHA105 ırkına ait bakteri koloni kültürlerini oluşturmak için bakteriler 1 mg/l kanamisin, 10 g/l NaCl, 5 g/l yeast ekstrakt, 10 g/l triptofan ve 10 g/l agar içeren katı LB ortamı üzerine öze ile çizilerek 28 °C'de 1 gece kültüre alınmıştır.

Sıvı bakteri kültürünü çoğaltmak için geliştirilen bakteri kültüründen bir koloni öze ile alınarak, tüp içerisinde 50 mg/l kanamisin içeren 50 ml sıvı LB ortamı karışımına aktarılmıştır. Hazırlanan bu sıvı bakteri kültürü çoğaltılmak için 200 devir/dk'da çalışan çalkalayıcıda bir gece 28 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübe edilmiş bakteri solüsyonunun yoğunluğu spektrofotometrede okunarak, transformasyon için gerekli olan bakteri miktarı 550-600 nm'de optik yoğunluk (OD = optical density) 0.5'e ayarlanmıştır. Daha sonra LB ortamı içerisindeki bakteri solüsyonuna 200 µM/L asetosiringon (Sigma Aldrich, ABD) ilave edilerek 200 rpm'de 3-4 saat kültüre alınmıştır.

Transformasyonlara gelince, transformasyon optimizasyon denemeleri sonucu etkisi daha yüksek bulunan faktörlerin dikkate alındığı optimize edilmiş eşit koşullarda gerçekleştirilen son 8 transformasyonda takip edilen aşamalar aşağıda belirtilmiştir:

İlk 22 transformasyonda 5 günlük eksplantlar kullanılırken, son 8 transformasyonda ise 1 günlük eksplantlar kullanılmıştır. Beş günlük eksplantları elde edebilmek için yapılan tohum ekiminde tohum kabuğu soyulmazken, bir günlük eksplantları elde edebilmek için tohumların dış kabuklarının soyulması gerekmiştir. Kabukları soyulan tohumlar steril kabin içine alınarak %70 lik etil alkolde 45 sn, %15 lik hipoda ise 15 dk bekletildikten sonra steril saf su ile ardışık durulamalar yapılarak sterilizasyon işlemleri tamamlanmıştır.

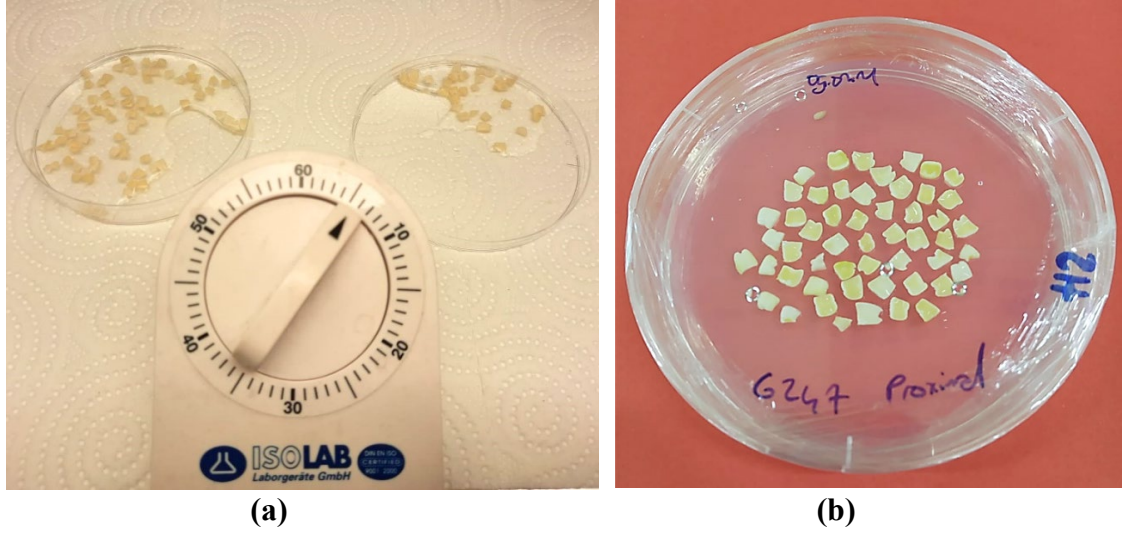
Sterilize edilen tohumlar; MS tuzları, NN vitaminleri, %3 sukroz ve %0.7 agar içeren pH'sı 5.8'e ayarlanmış ve otoklavlanarak sterilize edilmiş çimlendirme ortamında, 28 °C'de 1 gün karanlıkta kültüre alınmıştır (Şekil 3.5a.).



**Şekil 3.5.** Transformasyon çalışmalarında kullanılan tohumların 1 günlük fide görüntüsü

Transformasyon denemelerinde çimlendirme ortamında geliştirilen 27. ve 247. hıyar genotiplerine ait *in vitro* fideciklerin kotiledonları tohum ekiminden sonraki 1. günde kullanılmıştır (Şekil 3.5b.). Fideciklerin kotiledonları ikiye ayrılarak, yara dokusu oluşturmak için kenarlarından kesilmiştir. Parçaların proksimal kısmı V şeklinde kesilerek (apikal meristemi uzaklaştırılmış kısım) transformasyon aşamasında kullanılacak eksplantlar elde edilmiştir.

*In vitro* koşullarda çimlendirilmiş 1 günlük fidelerden eksplantlar hazırlanırken eksplantlar sıvı MS rejenerasyon ortamı içinde kesilmiş ve transformasyona kadar burada bekletilmiştir. Böylece eksplantların kuruması engellenmiştir. Transformasyon için 1 günlük fidelerin kotiledon eksplantları (proksimal kısımları) yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri solüsyonunda 9 cm lik petri kapları içinde 20 dakika bekletilmiştir (Şekil 3.6a.). Süre sonunda eksplantlar, pens yardımı ile alınmış ve üzerindeki fazla bakteri solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla steril filtre kağıtları üzerinde bekletilmiştir. Eksplantlar daha sonra, 30 g/l sukroz, 1g/l MES, 1.5 mg/l BA, 1.5 mg/l ABA, 200 µM asetosiringon ve 7 g/l plant agar içeren MS ortamı (ko-kültür ortamı) üzerinde karanlık ortamda 28 °C'de 3 gün kültüre alınmıştır (Şekil 3.6b.). Bu süre içerisinde eksplantlarda açılan yara dokularından bakteri girişinin sağlanması amaçlanmıştır.



**Şekil 3.6.** Eksplantların transformasyonu ve ko-kültür ortamına alınması

Üç günlük ko-kültürün sonunda eksplantlar buldukları besin ortamından alınarak steril saf su ve antibiyotik solüsyonu ile yıkanarak, bakteri artıkları ve solüsyonun fazlası filtre kağıdı ile uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Eksplantlar bundan sonra 4.4 g/l MS, 1.5 mg/l BA, 1.5 mg/l ABA, 300 mg/l timentin (Goldbio, ABD), 1 mg/l PPT, 30 g/l sukroz ve 7 g/l agardan oluşan seleksiyon ortamı içeren 90x15 mm lik petrilere aktarılmış ve 25-26 °C de 16/8 saatlik fotoperiyot koşullarında kültüre alınarak sürgün gelişimleri düzenli olarak takip edilmiştir.

### 3.2.2.3. Bitki rejenerasyonu ve aklimatizasyon çalışmaları

Seleksiyon ortamında oluşan sürgünler daha sonra büyümeleri için bağlı buldukları eksplantlarından ayrılarak, 4.4 g/l MS, 1 mg/l GA<sub>3</sub>, 100 mg/l timentin (Goldbio, ABD), 0.25 mg/l PPT, 30 g/l sukroz ve 7 g/l agardan oluşan sürgün geliştirme ortamı içeren tüp veya kavanozlara aktararak 25-26 °C de 16/8 saatlik fotoperiyot koşullarında kültüre alınmış ve gelişimleri düzenli olarak takip edilmiştir.

Elde edilen sürgünler köklenmeleri için 0.5 mg/l NN vitamini, 5 ml FeNAEDTA, 1 mg/l IBA, 50 mg/l timentin, 30 g/l sukroz ve 7 g/l plant agar içeren ½ MS ortamında kültüre alınmıştır.

Yaklaşık bir ay sonra sürgün ve kök oluşumu tamamlanan *in vitro* bitkicikleri dış koşullara alıştırmak için aklimatizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla bitkicikler, köklerine zarar vermeden besin ortamından dikkatlice çıkarılmış, agarlı ortam bitkiciklerden uzaklaştırıldıktan sonra 2:1:1 oranında torf, perlit ve vermikulit içeren plastik saksılara aktarılmış ve üzerleri plastik bardaklarla kapatılmıştır. Bu bitkicikler başlangıçta daha fazla ve giderek daha az oranda olmak üzere su spreylemesi ile nemlendirilerek dışarısının nem koşullarına alıştırmış ve yaklaşık 1 hafta sonunda

sonunda üzerlerindeki bardaklar tamamen kaldırılmıştır. Bitkiler bu süre boyunca 25°C sıcaklığa sahip 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında bitki büyütme odasında tutulmuşlardır.

#### 3.2.2.4. Transgenik mutant adayı (T0) hıyar bitkilerinin moleküler analizi

Tasarlanan rehber RNA (sgRNA1 ve sgRNA2)'ların hıyarda virüs direnci ile ilişkisi olduğu bilinen elongation factor (iso) 4e genini hedeflediklerinin doğrulanması için aday transgenik hıyar bitkilerine moleküler analiz yapılmıştır.

#### 3.2.2.5. T0 hıyar bitkilerinden total nükleik asit izolasyonu

Aday T0 hıyar bitkilerinde elongation factor (iso) 4e geninin mutasyona uğradığını doğrulamak amacıyla yapılacak PCR analizinde kullanmak üzere total nükleik asit izolasyonu için Presting vd. (1995)'in önerdiği orijinal Dellaporta mini nucleic acid extraction yöntemi aşağıdaki gibi modifiye edilerek kullanılmıştır (Fidan 2010). Bu protokolün aşamaları aşağıda sıralanmıştır:

- 100 mg yaprak örneği 600 µl extraction buffer (100 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol) da ezilmiştir.
- 600 µl ezilmiş örnekten alınıp 1.5 ml lik ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine %10 luk SDS den 70 µl eklenip çalkalayıcı kuru blok cihazında 65 °C de 15 dk bekletilmiştir.
- Daha sonra tüpe 200 µl 5M potasyum asetat eklenerek buzda 30 dakika bekletilmiştir. Buzdan alınan örnek 10 dk 14.000 rpm de santrifüj edilmiş, sıvı kısımdan 600 µl alınarak 1.5 ml lik yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- -20 °C de muhafaza edilen soğuk %70'lik etanol den 600 µl pellete eklenip hafifçe karıştırılarak, bir gece -20 °C'de dondurucuda bekletilmiştir.
- Ertesi gün dondurucudan alınan örneğe 5 dk 10.000 rpm santrifüj uygulanmıştır.
- Süpernatant tüpten dikkatlice uzaklaştırılmış ve 15 sn lik kısa bir santrifüj daha yapıldıktan sonra alkol pipetle çekilmiştir.
- Pellet 10 dk kurutulmuş ve üzerine 200 µl steril distile su eklenerek karıştırıldıktan sonra 37 °C de 15 dk inkübe edilmiş ve inkübasyon sırasında bir iki kez hafifçe karıştırılmıştır.
- Elde edilen total nükleik asitten 5-10 µl alınarak elektroforezde sonuç kontrolü yapıldıktan sonra -20 °C'de saklanmıştır.

#### 3.2.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Doku kültürü çalışmaları sonucu elde edilen aklimatizasyonu tamamlanmış aday transgenik hıyar bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak yukarıda belirtildiği gibi total nükleik asit izolasyonu yapılmış ve daha sonra bunlarla PCR gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmaları sırasında hedef nükleik asitlerin çoğaltılması amacıyla DreamTaq Green PCR

Mastermix (2x) (Thermo Fisher Scientific, ABD) hazır kiti ve spesifik tasarlanan primerler kullanılmıştır. PCR için kullanılan kimyasallar (Çizelge 3. 4.) ve PCR döngü programı (Çizelge 3. 5.) aşağıda belirtilmiştir.

**Çizelge 3. 4.** PCR yapımında kullanılan malzemeler

İçerik	Miktar
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	25 µL
Forward primer	0.1-1.0 µM
Reverse primer	0.1-1.0 µM
Kalıp DNA	10 pg- 1 µg
Distile su	50 µL'ye kadar
<b>Toplam Hacim</b>	<b>50 µL</b>

**Çizelge 3. 5.** PCR döngü programı

İşlem	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	3dk	1 döngü
Denatürasyon (Ayrılma)	95°C	30sn	39 döngü
Annealing (Bağlanma)	58°C	1dk	
Extension (Uzama)	72°C	1dk	
Final Uzama	72°C	10dk	1 döngü

### 3.2.2.7. Elektroforez koşulları

PCR çalışmalarının sonuçlarının değerlendirilmesi ve elde edilen DNA parçalarının görüntülenmesi için agaroz jel elektroforez çalışmaları yürütülmüştür. PCR ürünleri %1.5 luk agaroz TAE jelde 100V elektrik ortamında 1.5- 2 saat yürütülmüştür. İşlem tamamlandıktan sonra jel oda sıcaklığındaki 0.5 µg/ml konsantrasyona sahip Ethidium bromide ile boyanarak, elde edilen bantlar UV-transilluminatörde görüntülenmiş ve sonuçlar buna göre değerlendirilmiştir.

### 3.2.3. İncelenen deneme verileri

Transformasyon için en uygun bitki rejenerasyon ortamının belirlenmesi amacıyla 27. ve 247. genotiplerin *in vitro* şartlarda çimlendirilen 5 günlük fidelerinden elde edilen kotiledon ve hipokotil eksplantları rejenerasyon ortam optimizasyonu denemelerinde kültüre alındıktan sonra eksplantların tepki ve gelişimleri stereo mikroskop altında haftalık olarak gözlenmiş, deneme sonuçları 6.hafta sonunda değerlendirilmiştir. Yapılan gözlemler; kallus oluşumu (%), kallus yoğunluğu, tomurcuk oluşumu (%), sürgün

oluşumu (%), sürgün sayısı, kök oluşumu (%), kısa ve uzun köklerin her birisine ait ince ve normal kök sayısından oluşmuştur. Bu gözlemlerin nasıl alındığına ait detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

**Kallus oluşturma (%):** Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan kallus oluşturanların, petrideki toplam eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

**Kallus yoğunluğu:** Her bir eksplanttaki kallus gelişimi için; az, orta ve çok şeklinde bir görsel değerlendirme skalası (0-3) kullanılmıştır.

- Kallus yok : 0
- Kallus az : 1 (0.1-0.75 cm çaplı kalluslar)
- Kallus orta : 2 (0.75-1.5 cm çaplı kalluslar)
- Kallus çok : 3 (1.5 cm  $\leq$  çaplı kalluslar)

**Tomurcuk oluşumu (%):** Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan tomurcuk oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

**Sürgün oluşumu (%):** Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan sürgün oluşturanların, petrideki toplam eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

**Sürgün sayısı:** Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan oluşan sürgünlerin sayısı olarak ifade edilmiştir.

**Kök oluşumu (%):** Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan kök oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

**Kısa-ince kök sayısı:** Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan kısa ince kök oluşturanların sayısı olarak ifade edilmiştir.

**Kısa-normal kök sayısı:** Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan kısa normal kök oluşturanların sayısı olarak ifade edilmiştir.

**Uzun-ince kök sayısı:** Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan uzun ince kök oluşturanların sayısı olarak ifade edilmiştir.

**Uzun-normal kök sayısı:** Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan uzun normal kök oluşturanların sayısı olarak ifade edilmiştir.

Gözlem verilerine dayalı olarak elde edilen deneme desenine göre her bir eksplant tipi için her bir uygulama dört tekerrürlü olacak şekilde kurulmuş ve her tekerrürde dört eksplant kullanılmıştır. Elde edilen verilerinin istatistiksel analizleri JMP (v8.00, SAS Institute Inc., USA) programı ile yapılmıştır. Eksplant ve rejenerasyon ortamları arasındaki farklılıkların tespiti için LSD testi ve %5 önem seviyesi kullanılmıştır.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 4.1. *In Vitro* Rejenerasyon Optimizasyonu Bulguları

27. ve 247. genotiplerde yapılan tohum çimlendirmelerinde, tohum çimlenme yüzdesi ve çimlenme süresi yönünden genotipler arasında farklılıklar belirlenmiştir. Buna göre Genotip 247'nin çimlenme oranının daha yüksek (%91.1) olduğu ve daha kısa sürede çimlendikleri tespit edilmiştir. 27. ve 247. genotiplerde farklı zamanlarda yapılan tohum ekimleri sonucu gerçekleşen çimlenme oranları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** 27. ve 247. genotiplere ait tohumların çimlenme oranları

<b>Genotip 27</b>				
<b>Tohum Ekim Sıra No</b>	<b>Tohum Ekim Tarihi</b>	<b>Tohum Sayısı</b>	<b>Çimlenen Tohum Sayısı</b>	<b>Çimlenme Oranı (%)</b>
1.	25.12.2018	100	93	93
2.	31.12.2018	59	56	94.90
3.	08.02.2019	66	35	53.03
4.	21.02.2019	13	10	76.90
5.	27.02.2019	24	24	100
6.	25.03.2019	48	41	85.40
<b>Toplamlar ve Ortalama</b>		<b>310</b>	<b>259</b>	<b>83.87</b>
<b>Genotip 247</b>				
<b>Tohum Ekim Sıra No</b>	<b>Tohum Ekim Tarihi</b>	<b>Tohum Sayısı</b>	<b>Çimlenen Tohum Sayısı</b>	<b>Çimlenme Oranı (%)</b>
1.	25.12.2018	100	86	86
2.	31.12.2018	57	56	98.25
3.	08.02.2019	54	44	81.48
4.	21.02.2019	18	18	100
5.	27.02.2019	18	16	88.80
6.	25.03.2019	49	45	91.84
<b>Toplamlar ve Ortalama</b>		<b>296</b>	<b>265</b>	<b>91.06</b>

Rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde tohumdan çimlenen fidelerin kotiledon, hipokotil ve kotiledon+hipokotil eksplantları kullanılmış, ancak kotiledon+hipokotil eksplantlarından beklenen tomurcuk gelişimi gözlenmemiştir. Daha doğrusu bu eksplantlardaki gelişim; kotiledon yaprakları arasından süren sürgünlerin ve ayrıca köklerin hızlı şekilde gelişerek, buldukları petrileri gözlem yapılmayacak kadar kaplamaları (Şekil 4.1.) yönünde olduğu için sürgünlerin varlığı net olarak gözlemlenmemiştir. Bu nedenle her iki genotipte de rejenerasyon optimizasyonu denemelerine sadece kotiledon ve hipokotil eksplantları ile devam edilmiştir.



**Şekil 4.1.** Kotiledon+hipokotil eksplantlarının gelişimi

#### 4.1.1. Genotip 27 (G27) rejenerasyon optimizasyonu deneme bulguları

##### 4.1.1.1. G27’de kallus bulguları

Rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde başlangıçta 2 hafta karanlık, daha sonra fotoperiyot koşullarında kontrol dahil 50 farklı besin ortamında kültüre alınan 27.genotipe ait kotiledon ve hipokotil eksplantları kallus oluşturma ve kallus yoğunluğu açısından değerlendirilmiş, bunlara ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2’ye göre rejenerasyon ortamlarının etkisine bakılmaksızın G27 ye ait kotiledon ve hipokotil eksplantları arasında kallus oluşumu yönünden herhangi bir fark olmadığı ve her iki eksplantın da %100 kallus oluşturduğu belirlenmiştir. Kallus yoğunluğu yönünden ise ortamlardan bağımsız olarak  $p < 0.001$  düzeyinde istatistiksel fark bulunmuştur. Hipokotil ekplantlarının (1.67), kotiledon eksplantlarından (1.49) daha fazla miktarda kallus oluşturduğu tespit edilmiştir.

Eksplantın etkisi göz önüne alınmadığında, besin ortamlarının kallus oluşumu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı ve kontrol dahil tüm ortamlarda %100 oranında kallus oluştuğu belirlenmiştir. Kallus yoğunluğu yönünden ise ortamlar  $p < 0.001$  seviyesinde önemli fark oluşturmuş ve 27. ortamın (MS + 1.5 mg/l NAA + 0.75 mg/l 2İP) en fazla kallus miktarını (2.41) oluşturduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2’ye göre eksplant x ortam interaksiyonları incelendiğinde ise kallus yoğunluğu  $p < 0.001$  seviyesinde farklılıklar ortaya koymuştur.

G27’de yapılan rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde elde edilen bazı kallus görüntüleri Şekil 4.2.’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** G27 rejenerasyon optimizasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen kallus oluşumu ve kallus yoğunluklarına ait varyans analiz sonuçları

İncelenen Özellikler						
Faktörler	Kallus Oluşumu (%)			Kallus Yoğunluğu (0/1/2/3) (Yok/Az/Orta/Çok)		
	Ortalama	±	SH*	Ortalama	±	SH*
<b>Eksplant (E)</b>						
Kotiledon	100.00	±	0.00	1.49	±	0.04 b
Hipokotil	100.00	±	0.00	<b>1.67</b>	±	0.04 <b>a</b>
LSD (%5)	0			0.06		
<i>P</i>	-			<0.0001 ***		
<b>Besin Ortamları (BO)</b>						
0 (Kontrol)	100.00	±	0.00	1.69	±	0.09 h-m
1	100.00	±	0.00	1.59	±	0.27 k-p
2	100.00	±	0.00	2.22	±	0.17 a-c
3	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00 t
4	100.00	±	0.00	1.06	±	1.06 s-t
5	100.00	±	0.00	1.25	±	0.16 q-t
6	100.00	±	0.00	2.22	±	0.30 a-c
7	100.00	±	0.00	2.00	±	0.16 b-g
8	100.00	±	0.00	1.69	±	0.16 h-m
9	100.00	±	0.00	2.13	±	0.35 a-d
10	100.00	±	0.00	1.50	±	0.25 m-q
11	100.00	±	0.00	1.66	±	0.12 r-n
12	100.00	±	0.00	1.81	±	0.13 e-l
13	100.00	±	0.00	1.72	±	0.16 g-m
14	100.00	±	0.00	1.63	±	0.18 j-o
15	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00 T
16	100.00	±	0.00	2.00	±	0.24 b-g
17	100.00	±	0.00	1.72	±	0.14 g-m
18	100.00	±	0.00	1.75	±	0.13 g-m
19	100.00	±	0.00	2.00	±	0.17 b-g
20	100.00	±	0.00	1.31	±	0.13 p-s
21	100.00	±	0.00	1.72	±	0.07 g-m
22	100.00	±	0.00	1.53	±	0.11 l-q
23	100.00	±	0.00	1.97	±	0.03 b-h
24	100.00	±	0.00	2.06	±	0.06 b-f
25	100.00	±	0.00	1.16	±	0.12 r-t
26	100.00	±	0.00	1.91	±	0.07 d-j
27	100.00	±	0.00	<b>2.41</b>	±	0.26 <b>a</b>

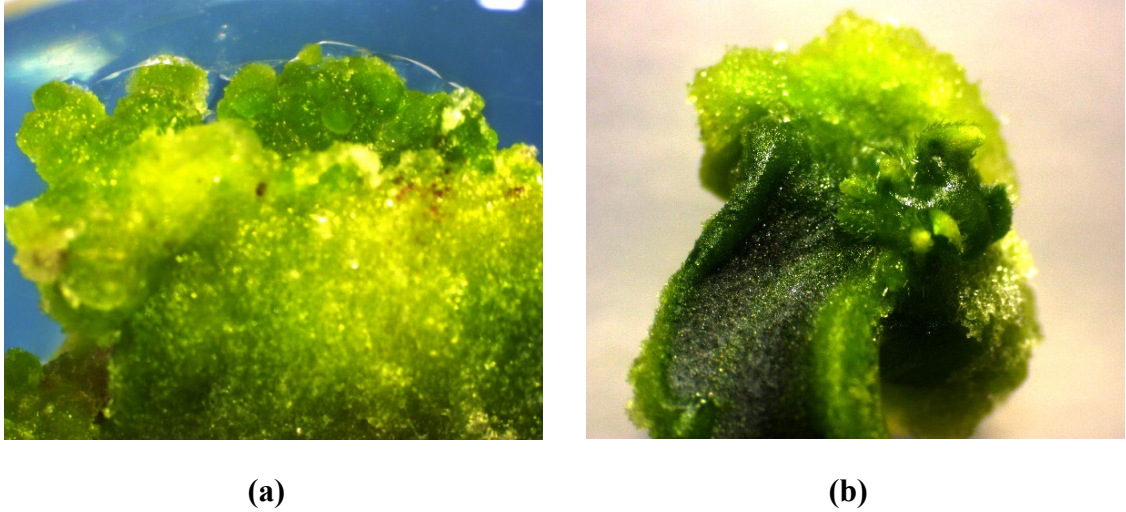
Çizelge 4.2.'nin devamı

28	100.00	±	0.00	1.78	±	0.28	f-m
29	100.00	±	0.00	1.81	±	0.13	e-l
30	100.00	±	0.00	1.53	±	0.21	l-q
31	100.00	±	0.00	1.13	±	0.09	r-t
32	100.00	±	0.00	1.94	±	0.06	c-1
33	100.00	±	0.00	1.88	±	0.13	d-k
34	100.00	±	0.00	2.25	±	0.13	ab
35	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00	t
36	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00	t
37	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00	t
38	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00	t
39	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00	t
40	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00	t
41	100.00	±	0.00	1.38	±	0.18	n-r
42	100.00	±	0.00	1.38	±	0.18	n-r
43	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00	t
44	100.00	±	0.00	1.00	±	0.00	t
45	100.00	±	0.00	1.63	±	0.13	j-o
46	100.00	±	0.00	1.34	±	0.16	o-s
47	100.00	±	0.00	1.53	±	0.13	l-q
48	100.00	±	0.00	1.72	±	0.10	g-m
49	100.00	±	0.00	2.09	±	0.19	b-e
LSD (%5)	0			0.28			
<i>P</i>	-			<0.0001 ***			
<b>İnteraksiyon (E x BO)</b>							
LSD (%5)	0			0.40			
<i>P</i>	-			<0.0001 ***			

\* SH: Standart hata

**4.1.1.2. G27'de tomurcuk ve sürgün oluşum bulguları**

Genotip 27 eksplantlarının kültüre alındığı 50 besin ortamından elde edilen tomurcuk oluşumu, sürgün oluşumu ve oluşan sürgün miktarları üzerine eksplant ve besin ortamlarının bağımsız tekli değişken olarak etkileri ve interaksiyonları Çizelge 4.3'de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** G27 ye ait hipokotil ve kotiledon eksplantlarından oluşan kallus görüntüleri; **a)** 5 nolu rejenerasyon ortamında hipokotil eksplantından gelişen kallus görüntüsü; **b)** 25 nolu rejenerasyon ortamında kotiledon eksplantından gelişen kallus görüntüsü

Çizelge 4.3'e göre, besin ortamlarının etkisinden bağımsız olarak, kültüre alınan G27 eksplantlarının tomurcuk oluşumu üzerine olan etkisi incelendiğinde  $p < 0.01$  seviyesinde farklılık olduğu görülmektedir. Hipokotil eksplantı ortalama %12.63 oranında tomurcuk oluştururken, kotiledon eksplantı %9.38 oranında tomurcuk oluşturmuştur. Eksplantlardan bağımsız olarak ortamların etkisi incelendiğinde, tomurcuk oluşumu bakımından  $p < 0.001$  seviyesinde farklılıklar oluşmuştur. En fazla tomurcuk oluşumu %59.38 oran ile 48. (MS + 1.5 mg/l BA + 1.5 mg/l ABA) ve 49. (MS + 2 mg/l BA + 1 mg/l ABA) ortamlarda gerçekleşmiştir. Bu ortamların ortak özelliği, her ikisinde de BA ve ABA kullanılmış olmasıdır (Çizelge 3.2). Öte yandan eksplant x ortam interaksyonu göz önüne alındığında, tomurcuk oluşturma kapasitesi üzerinde  $p < 0.001$  seviyesinde istatistiksel fark bulunmuştur.

**Çizelge 4.3.** G27 rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen tomurcuk oluşumu, sürgün oluşumu ve sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

İncelenen Özellikler							
Faktörler	Tomurcuk Oluşumu (%)			Sürgün Oluşumu %		Sürgün Sayısı/Petri	
	Ortalama	SH*		Ort.	SH*	Ort.	SH*
<b>Eksplant (E)</b>							
Kotiledon	9,38	± 1,69	b	<b>0,88</b>	± 0,88	<b>a</b>	<b>0,08</b> ± 0,03 <b>a</b>
Hipokotil	<b>12,63</b>	± 1,80	<b>a</b>	0,00	± 0,00	b	0,00 ± 0,00 b

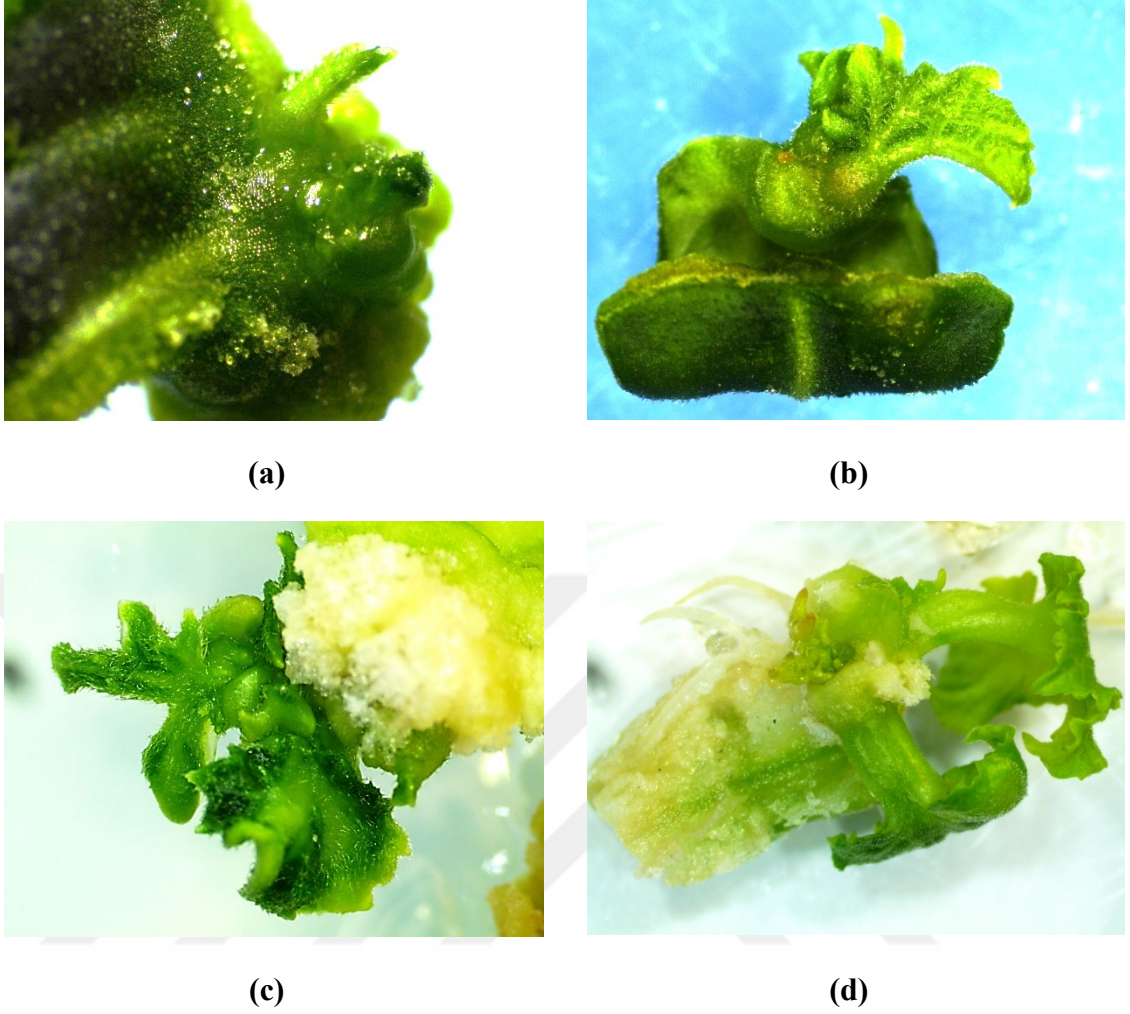
Çizelge 4.3'ün devamı

LSD (%5)	1.95			0.45			0.05					
<i>P</i>	0.0016 **			<0.0001 ***			0.0019 **					
<b>Besin Ortamları (BO)</b>												
0 (Kontrol)	25.00	±	9.45	f-h	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
1	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
2	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
3	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
4	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
5	28.13	±	11.99	f-h	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
6	3.13	±	3.13	k-l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
7	9.38	±	4.57	I-k	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
8	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
9	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
10	31.25	±	13.15	e-g	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
11	18.75	±	6.25	g-1	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
12	31.25	±	6.25	e-f	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
13	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
14	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
15	21.88	±	12.88	g-1	3.13	±	3.13	c	0.50	±	0.50	b
16	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
17	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
18	3.13	±	3.13	kl	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
19	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
20	9.38	±	4.57	I-k	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
21	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
22	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
23	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
24	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
25	53.13	±	9.95	a-c	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
26	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
27	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
28	40.63	±	17.64	c-e	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
29	50.00	±	18.90	b-d	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
30	9.38	±	4.57	r-k	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
31	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
32	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
33	0.00	±	0.00	l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
34	9.38	±	4.57	r-k	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c
35	6.25	±	4.09	j-l	0.00	±	0.00	d	0.00	±	0.00	c

Çizelge 4.3.'ün devamı

36	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
37	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
38	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
39	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
40	12.50 ± 4.72	h-j	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
41	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
42	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
43	3.13 ± 3.13	kl	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
44	3.13 ± 3.13	kl	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
45	37.50 ± 9.45	de	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
46	18.75 ± 7.83	g-i	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
47	6.25 ± 4.09	j-l	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	c
48	<b>59.38</b> ± 15.63	<b>a</b>	<b>12.50</b> ± 4.72	<b>a</b>	<b>0.88</b> ± 0.35	<b>a</b>
49	<b>59.38</b> ± 16.32	<b>ab</b>	6.25 ± 4.09	b	0.63 ± 0.42	ab
LSD (%5)	9.76		2.25		0.25	
<i>P</i>	<0.0001 ***		<0.0001 ***		<0.001 ***	
İnteraksiyon (E x BO)						
LSD (%5)	13.80		3.19		0.35	
<i>P</i>	<0.0001 ***		<0.0001 ***		<0.001 ***	

Sürgün oluşumu yönünden eksplantın bağımsız etkisi değerlendirildiğinde  $p < 0.001$  düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Kotiledon eksplantı ortalama %0.88 oranında sürgün oluşturmuştur. Şekil 4.3'de G27 eksplantlarının oluşturduğu tomurcuk ve sürgünler görülmektedir. Eksplantların etkisinden bağımsız şekilde ortamların sürgün oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde  $p < 0.001$  düzeyinde istatistiksel fark bulunmuştur. En yüksek sürgün oluşumu (%12.50) 48. (MS + 1.5 mg/l BA + 1.5 mg/l ABA) ortamda oluşmuş, bunu yaklaşık ½ oranında daha az sürgün (%6.25) oluşturan 49. (MS + 2 mg/l BA + 1 mg/l ABA) ortam takip etmiştir. Gal-On vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada da BAP (2 mg/l) + ABA (1 mg/l) birlikte kullanıldığında sürgün oluşumu gerçekleştiği bildirilmiştir.



**Ŗekil 4.3.** G27 eksplantlarında oluŖan tomurcuk ve sürgünlere ait görüntüler; **a)** kotiledon eksplantından oluŖan tomurcuk görüntüsü **b)** ve **c)** kotiledon eksplantından oluŖan sürgün görüntüsü **d)** hipokotil eksplantından oluŖan sürgün görüntüsü

Yine Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi eksplant x ortam interaksyonunun sürgün oluŖumu üzerindeki etkisi  $p < 0.001$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuŖtur.

G27 de sürgün sayısı bakımından eksplantın bağımsız etkisi incelendiğinde  $p < 0.01$  seviyesinde istatistiksel farklılık bulunmuŖ ve eksplantlardan sadece kotiledon eksplantı (0.08) sürgün oluŖturmuŖtur. Eksplantın etkisinden bağımsız olarak, ortamların sürgün sayısı üzerine etkisi incelendiğinde  $p < 0.001$  seviyesinde farklılıklar tespit edilmiŖtir. Ayrıca, eksplant x ortam interaksyonunun da sürgün sayısı üzerine etkisi  $p < 0.001$  değerinde farklı bulunmuŖtur.

#### 4.1.1.3. G27’de kök oluşum bulguları

Kök oluşumu (%), kısa-ince, kısa-normal, uzun-ince ve uzun-normal kök sayılarının incelendiği G27’de kotiledon ve hipokotil eksplantlarıyla 50 besin ortamında kurulan denemelerde eksplant ve besin ortamından oluşan tekli bağımsız değişkenlerin ve bunların interaksiyonlarının etkileri Çizelge 4.4’ de verilmiştir.

Çizelge 4.4’e göre eksplant tipinin, besin ortamlarının etkisinden bağımsız olarak, kotiledon ve hipokotil eksplantları arasında kök oluşum yüzdesi, kısa-ince ve kısa-normal kök sayısı yönünden önemli bir fark oluşturmazken, uzun-ince kök oluşumu  $p < 0.001$  seviyesinde, uzun-normal kök oluşumu ise  $p < 0.01$  seviyesinde farklılıklar ortaya koyduğu belirlenmiştir. Çalışmada hipokotil eksplantları (%29.3) az farkla da olsa kotiledon eksplantlarından (%26.9) daha fazla kök oluşturmuştur. Oluşan köklerin sayısı ise incelenen tüm kök tipleri yönünden, özellikle de uzun köklenme açısından, kotiledon eksplantlarında daha fazla bulunmuştur. Wehner (1981) tarafından hıyarda yapılan rejenerasyon çalışmasında da kök oluşumları açısından kotiledon ve hipokotil eksplantları arasında istatistiksel bir fark olmadığı belirtilmiştir. Şekil 4.4 de kotiledon eksplantlarından oluşan köklere ait görüntüler görülmektedir.



**Şekil 4.4.** G27 de kotiledon eksplantlarından oluşan uzun-normal köklere ait görüntüler

Besin ortamları (BO) eksplantların etkisinden bağımsız olarak; kök oluşumu bakımından  $p < 0.001$  seviyesinde önemli farklılık oluşturmuştur. En fazla kök oluşumu %93.75 ile 2. ortamda (MS + 1.5 mg/l NAA) gerçekleşmiş ve bunu 4.ortam (MS + 1.5 mg/l IAA) (%87.50) takip etmiştir. Kök oluşumunun en yüksek oranda gerçekleştiği ortamların sitokinin içermeyen sadece oksinli ortamlar olduğu belirlenmiştir. Kısa-ince kök sayısı yönünden besin ortamları  $p < 0.05$  seviyesinde farklılık oluşturmuş ve en yüksek kısa-ince kök sayısı (2.63) 26. ortamda (MS + 0.75 mg/l 2IP + 0.75 mg/l NAA) meydana gelmiştir. Kısa-normal kök yönünden ise  $p < 0.001$  seviyesinde farklılıklar oluşturmuş ve en yüksek kısa-normal kök sayısı (4.38) 2. ortamda (MS + 1.5 mg/l NAA)

meydana gelmiştir. Uzun-ince kök oluşumu incelendiğinde, besin ortamları  $p < 0.001$  seviyesinde önemli farklılık ortaya koyarken en yüksek uzun-ince kök sayısı (5.00) 4. ortamda (MS + 1.5 mg/l IAA) oluşmuştur. Besin ortamlarının uzun-normal kök sayısı üzerine etkisi ise  $p < 0.01$  seviyesinde farklılık oluşturmuş ve en yüksek uzun-normal kök sayısı (5.00) 16. ortamda (MS + 0.75 mg/l Zeatin + 0.75 mg/l NAA) gerçekleşmiştir. Eksplant ve besin ortamının ikili interaksiyonları incelendiğinde ise; bu interaksiyonun kök oluşumu ve tüm kök tiplerinin sayısı üzerine önemli farklılık oluşturduğu tespit edilmiştir. Normal, sağlıklı kökler olarak kabul edilebilecek uzun-normal köklerin sayısının en fazla olduğu ortamlar 16. (ort. 5/petri) (MS + 0.75 mg/l NAA + 0.75 mg/l Zeatin) ve 17. (ort. 4.5/petri) ortamlar (MS + 1.5 mg/l NAA + 0.75 mg/l Zeatin) olarak tespit edilmiştir.

Cucurbitaceae familyası tıbbi açıdan değerli sekonder metabolitleri içeren büyük bir bitki grubunu içermektedir (Dhiman vd. 2012). Bitkiler, biyotik ve abiyotik faktörlere karşı bir savunma mekanizması oluşturmak için sekonder metabolit olarak adlandırılan organik bileşikler üretirler. Üretilen organik bileşiklerin birçoğu gıda ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır. Sürgün, kallus, hücre ve süspansiyon kültürleri ile de sekonder metabolitler *in vitro* koşullar altında üretilebildiği gibi, son zamanlarda hızlı ve fazla miktarda üretime olanak vermesi nedeniyle kök kültürleri ile sekonder metabolit üretimi daha çok tercih edilmektedir. Bu amaçla Rhizobiaceae familyasından gram negatif bir bakteri olan *Agrobacterium rhizogenes*'in transforme edildiği bitki eksplantlarında, büyüme ve gelişimin etkilenecek saçaklı köklerin oluştuğu ve bu köklerde transkripsiyon savunma genlerinin etkinleştirilmesi sonucu sekonder metabolit sentezininin daha fazla indüklendiği düşünülmektedir (Shkryl vd. 2008). Literatürde *C. sativus* da *A. rhizogenes* ile yapılan transformasyon çalışmaları mevcuttur (McInnes vd. 1991; Anuar vd. 2001). Örneğin oksin biyosentezinde görev aldığı bilinen *aux1* ve *aux2* ORF (açık okuma çerçevesi) bölgesi bulunan TR-DNA ve TL-DNA'lara sahip Ri plazmidi taşıyan *A. rhizogenes* suşları ile transforme edilen hıyar kotiledon eksplantlarının saçsı kök oluşumu sergilediği bildirilmiştir (McInnes vd. 1991).

Bu nedenle, çalışmada elde edilen ayrıntılı köklenme bulgularının hıyarda yapılabilecek hem mikroçoğaltım, hem de *in vitro* sekonder metabolit üretim çalışmaları için önemli olduğu düşünülmektedir.

**Çizelge 4.4.** G27 rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde eksplant ve besin ortamından oluşan tekli bağımsız değişkenlerin ve bunların interaksiyonunun kök oluşumu (%) ve çeşitli kök tiplerinin miktarı üzerine etkileri

İncelenen Özellikler										
Faktörler	Kök Oluşumu (%)		Kısa-İnce Kök Sayısı / Petri		Kısa-Normal Kök Sayısı / Petri		Uzun-İnce Kök Sayısı / Petri		Uzun-Normal Kök Sayısı / Petri	
	Ort. ± SH		Ort. ± SH		Ort. ± SH		Ort. ± SH		Ort. ± SH	
<b>Eksplant (E)</b>										
Kotiledon	26.88 ± 2.85		0.46 ± 0.13		0.76 ± 0.17		<b>0.90</b> ± 0.19	a	<b>0.81</b> ± 0.20	a
Hipokotil	29.25 ± 3.10		0.40 ± 0.10		0.73 ± 0.15		0.64 ± 0.17	b	0.29 ± 0.08	b
LSD (%5)	Ö.D.		Ö.D.		Ö.D.		0.06		0.35	
<i>P</i>	0.3391		0.7191		0.8620		<0.0001 ***		0.0035 **	
<b>Besin Ortamları (BO)</b>										
0 (Kontrol)	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	a	0.00 ± 0.00	d
1	34.38 ± 14.89	d-j	0.00 ± 0.00	e	1.50 ± 1.50	c-f	2.38 ± 1.18	b	0.00 ± 0.00	d
2	<b>93.75</b> ± 4.09	a	1.00 ± 0.63	b-e	<b>4.38</b> ± 2.43	a	2.63 ± 1.45	b	0.00 ± 0.00	d
3	56.25 ± 17.52	b-e	1.25 ± 0.90	a-e	0.63 ± 0.32	d-f	3.38 ± 1.95	c	0.00 ± 0.00	d
4	87.50 ± 8.18	a	1.25 ± 1.11	a-e	3.63 ± 1.40	ab	<b>5.00</b> ± 2.44	d	0.00 ± 0.00	d
5	40.63 ± 17.64	b-h	0.50 ± 0.50	de	0.25 ± 0.16	f	4.13 ± 2.19	e	0.00 ± 0.00	d
6	15.63 ± 12.44	j-n	1.13 ± 1.13	a-e	1.25 ± 1.25	c-f	0.00 ± 0.00	f	2.00 ± 1.86	bc
7	50.00 ± 18.90	b-f	0.63 ± 0.42	c-e	2.25 ± 1.29	b-e	0.00 ± 0.00	g	0.63 ± 0.63	c-d
8	12.50 ± 12.50	l-n	0.00 ± 0.00	e	0.38 ± 0.38	ef	0.00 ± 0.00	g	0.00 ± 0.00	d
9	12.50 ± 12.50	l-n	0.00 ± 0.00	e	0.13 ± 0.13	f	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	d
10	31.25 ± 15.49	f-l	1.50 ± 1.50	a-e	0.00 ± 0.00	f	2.50 ± 1.60	h	0.00 ± 0.00	d
11	25.00 ± 8.18	g-m	0.63 ± 0.42	c-e	1.50 ± 0.89	c-f	0.00 ± 0.00	i	0.50 ± 0.50	c-d

Çizelge 4.4.'ün devamı

12	18.75 ± 7.83	h-n	0.38 ± 0.26	de	1.13 ± 0.58	c-f	0.00 ± 0.00	ı	0.00 ± 0.00	d
13	12.50 ± 12.50	l-n	0.00 ± 0.00	e	0.13 ± 0.13	f	0.00 ± 0.00	ı	0.00 ± 0.00	d
14	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	j	0.00 ± 0.00	d
15	15.63 ± 6.58	ı-n	0.13 ± 0.13	de	0.00 ± 0.00	f	0.75 ± 0.31	j	0.00 ± 0.00	d
16	43.75 ± 17.52	b-g	0.00 ± 0.00	e	0.50 ± 0.50	ef	0.00 ± 0.00	j	<b>5.00</b> ± 2.50	<b>a</b>
17	50.00 ± 18.90	b-f	0.00 ± 0.00	e	2.50 ± 1.64	a-d	0.00 ± 0.00	j	<b>4.50</b> ± 2.04	<b>a</b>
18	50.00 ± 18.90	b-f	0.75 ± 0.53	c-e	1.38 ± 0.78	c-f	0.00 ± 0.00	k	1.25 ± 1.00	b-d
19	50.00 ± 18.90	b-f	0.13 ± 0.13	de	1.75 ± 0.86	b-f	0.25 ± 0.16	k	0.00 ± 0.00	d
20	21.88 ± 14.51	h-n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	1.88 ± 1.32	k	0.00 ± 0.00	d
21	50.00 ± 18.90	b-f	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	3.63 ± 1.87	l	0.00 ± 0.00	d
22	50.00 ± 18.90	b-f	2.13 ± 1.42	a-c	1.63 ± 1.63	c-f	1.38 ± 1.38	l	1.00 ± 0.65	b-d
23	50.00 ± 18.90	b-f	0.75 ± 0.62	c-e	0.38 ± 0.38	ef	0.00 ± 0.00	l	1.13 ± 0.58	b-d
24	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	l	0.00 ± 0.00	d
25	34.38 ± 13.31	e-k	0.50 ± 0.38	de	0.00 ± 0.00	f	1.13 ± 0.67	m	1.25 ± 0.90	b-d
26	43.75 ± 16.87	bh	<b>2.63</b> ± 1.78	<b>a</b>	0.00 ± 0.00	f	1.63 ± 1.10	m	0.00 ± 0.00	d
27	50.00 ± 18.90	b-f	0.00 ± 0.00	e	2.63 ± 1.29	a-c	3.00 ± 1.70	m	0.00 ± 0.00	d
28	50.00 ± 18.90	b-f	0.00 ± 0.00	e	1.25 ± 1.00	c-f	0.63 ± 0.63	n	1.00 ± 0.76	b-d
29	56.25 ± 16.87	b-d	0.13 ± 0.13	de	0.00 ± 0.00	f	0.63 ± 0.42	n	1.75 ± 0.98	bc
30	37.50 ± 14.94	cı	2.38 ± 1.15	ab	1.75 ± 1.28	b-f	0.00 ± 0.00	n	2.50 ± 1.80	b
31	62.50 ± 16.37	b	0.13 ± 0.13	de	1.38 ± 0.94	c-f	1.63 ± 0.82	n	0.50 ± 0.50	c-d
32	50.00 ± 18.90	b-f	1.63 ± 1.10	a-d	0.63 ± 0.63	d-f	0.00 ± 0.00	n	2.63 ± 1.40	b
33	59.38 ± 16.32	bc	0.63 ± 0.63	c-e	0.88 ± 0.52	c-f	0.63 ± 0.42	n	0.38 ± 0.38	c-d
34	15.63 ± 12.44	j-n	0.00 ± 0.00	e	0.38 ± 0.38	ef	0.00 ± 0.00	n	1.25 ± 1.25	b-d
35	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
36	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
37	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
38	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
39	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
40	37.50 ± 18.30	d-j	0.00 ± 0.00	e	1.88 ± 0.93	b-f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d

Çizelge 4.4.'ün devamı

41	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
42	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
43	3.13 ± 3.13	n	0.00 ± 0.00	e	0.13 ± 0.13	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
44	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
45	6.25 ± 4.09	mn	0.38 ± 0.26	de	0.25 ± 0.25	f	0.38 ± 0.38	n	0.00 ± 0.00	d
46	9.38 ± 6.58	mn	0.25 ± 0.25	de	0.00 ± 0.00	f	0.50 ± 0.50	n	0.00 ± 0.00	d
47	15.63 ± 10.50	k-n	0.63 ± 0.42	c-e	0.75 ± 0.49	c-f	0.25 ± 0.25	n	0.00 ± 0.00	d
48	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
49	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	e	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	n	0.00 ± 0.00	d
LSD (%5)	19.27		1.50		1.98		0.29		1.74	
<i>P</i>	<0.0001 ***		0.0191*		0.0002 ***		<0.0001 ***		<0.001 **	
İnteraksiyon (E x BO)										
LSD (%5)	27.25		2.13		2.80		0.41		2.46	
<i>P</i>	<0.001 **		0.0060**		<0.0001 ***		<0.0001 ***		<0.001 **	

#### 4.1.2. Genotip 247 (G247) rejenerasyon optimizasyonu deneme bulguları

##### 4.1.2.1. G247’de kallus bulguları

Rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde başlangıçta 2 hafta karanlık, daha sonra fotoperiyot koşullarında kontrol dahil toplam 50 farklı besin ortamında kültüre alınan 247.genotipe ait kotiledon ve hipokotil eksplantları kallus oluşturma ve kallus yoğunluğu açısından değerlendirilmiş, bunlara ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.5. de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** G247 rejenerasyon optimizasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen kallus oluşumu ve kallus yoğunluklarına ait varyans analiz sonuçları

İncelenen Özellikler					
Faktörler	Kallus Oluşumu (%)			Kallus Yoğunluğu	
	Ortalama	±	SH	Ortalama	± SH
<b>Eksplant (E)</b>					
Kotiledon	98.88	±	0.51	b	1.61 ± 0.04 b
Hipokotil	<b>100.00</b>	±	0.00	<b>a</b>	<b>1.89</b> ± 0.04 <b>a</b>
LSD (%5)	0.85			0.07	
<i>P</i>	0.0095 **			<0.0001 ***	
<b>Besin Ortamları (BO)</b>					
0 (Kontrol)	100.00	±	0.00	a	1.31 ± 0.11
1	100.00	±	0.00	a	2.53 ± 0.22
2	100.00	±	0.00	a	<b>2.56</b> ± 0.23
3	100.00	±	0.00	a	1.47 ± 0.15
4	100.00	±	0.00	a	2.19 ± 0.08
5	96.88	±	3.13	a	1.34 ± 0.16
6	100.00	±	0.00	a	1.94 ± 0.12
7	100.00	±	0.00	a	1.97 ± 0.14
8	100.00	±	0.00	a	2.34 ± 0.27
9	100.00	±	0.00	a	2.00 ± 0.21
10	100.00	±	0.00	a	2.16 ± 0.31
11	100.00	±	0.00	a	1.78 ± 0.17
12	100.00	±	0.00	a	1.97 ± 0.17
13	100.00	±	0.00	a	1.97 ± 0.24
14	100.00	±	0.00	a	2.00 ± 0.18
15	96.88	±	3.13	a	1.22 ± 0.15
16	100.00	±	0.00	a	1.84 ± 0.13
17	100.00	±	0.00	a	1.94 ± 0.14

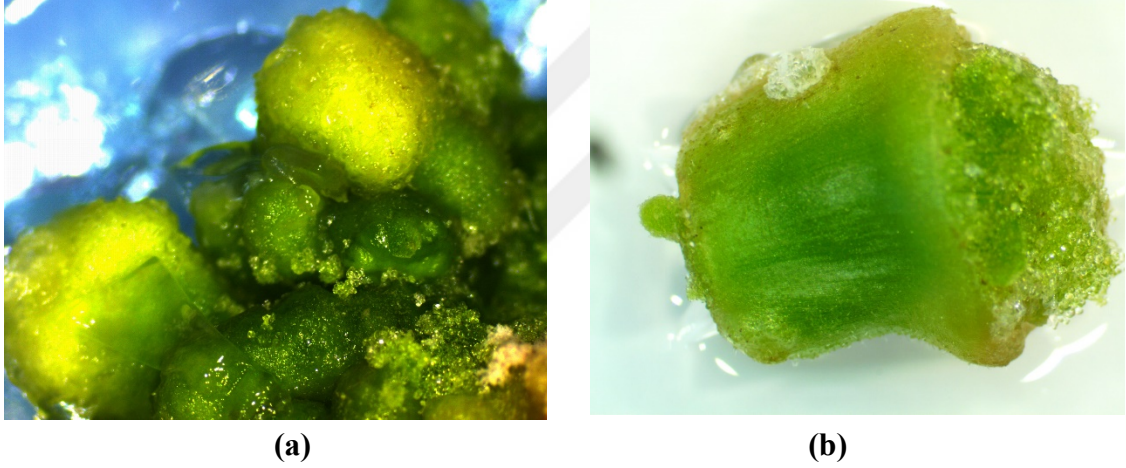
Çizelge 4.5.' in devamı

18	100.00 ± 0.00	a	2.06 ± 0.20
19	100.00 ± 0.00	a	2.44 ± 0.32
20	96.88 ± 3.13	a	1.47 ± 0.18
21	100.00 ± 0.00	a	1.84 ± 0.12
22	100.00 ± 0.00	a	1.81 ± 0.14
23	100.00 ± 0.00	a	2.22 ± 0.26
24	100.00 ± 0.00	a	2.22 ± 0.19
25	84.38 ± 10.50	b	1.06 ± 0.20
26	100.00 ± 0.00	a	1.63 ± 0.16
27	100.00 ± 0.00	a	1.63 ± 0.13
28	100.00 ± 0.00	a	1.50 ± 0.19
29	100.00 ± 0.00	a	2.06 ± 0.22
30	96.88 ± 3.13	a	1.22 ± 0.15
31	100.00 ± 0.00	a	1.66 ± 0.22
32	100.00 ± 0.00	a	1.53 ± 0.14
33	100.00 ± 0.00	a	1.66 ± 0.10
34	100.00 ± 0.00	a	1.91 ± 0.26
35	100.00 ± 0.00	a	1.59 ± 0.16
36	100.00 ± 0.00	a	1.28 ± 0.14
37	100.00 ± 0.00	a	1.00 ± 0.00
38	100.00 ± 0.00	a	1.88 ± 0.26
39	100.00 ± 0.00	a	1.78 ± 0.27
40	100.00 ± 0.00	a	1.50 ± 0.19
41	100.00 ± 0.00	a	1.00 ± 0.00
42	100.00 ± 0.00	a	1.00 ± 0.00
43	100.00 ± 0.00	a	1.91 ± 0.29
44	100.00 ± 0.00	a	1.00 ± 0.00
45	100.00 ± 0.00	a	1.63 ± 0.13
46	100.00 ± 0.00	a	2.00 ± 0.16
47	100.00 ± 0.00	a	1.94 ± 0.13
48	100.00 ± 0.00	a	1.59 ± 0.12
49	100.00 ± 0.00	a	1.88 ± 0.15
LSD (%5)	4.24		Ö.D.
<i>P</i>	0.0009***		1.000
İnteraksiyon (E x BO)			
LSD (%5)	Ö.D.		Ö.D.
<i>P</i>	1.000		1.000

Çizelge 4.5'e göre besin ortamlarının etkisinden bağımsız olarak eksplantlar kallus oluşumu üzerinde  $p < 0.01$  seviyesinde farklılık oluşturmuş ve hipokotil eksplantlarının (%100) kotiledon eksplantlarından (98.88) daha fazla kallus oluşturduğu tespit edilmiştir. Kallus yoğunluğu yönünden ise hipokotil eksplantlarının (1.89) az da olsa kotiledon eksplantlarından (1.61) daha fazla miktarda kallus oluşturduğu belirlenmiştir.

Eksplantın etkisine bakılmaksızın besin ortamlarının kallus oluşumunda  $p < 0.001$  seviyesinde istatistiksel fark oluşturduğu belirlenmiştir. Kallus yoğunluğu yönünden ise ortamların istatistiksel olarak önemli bir etkisi bulunmamakla birlikte, 2. ortamın (MS + 1.5 mg/l NAA) en fazla kallus miktarını (2.56) oluşturduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5'e göre eksplant x ortam interaksiyonları incelendiğinde ise kallus oluşumu ve yoğunluğu yönünden önemli bir fark belirlenmemiştir. G247'de yapılan rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde elde edilen bazı kallus görüntüleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



**Şekil 4.5.** G247 ye ait kotiledon ve hipokotil eksplantlarından oluşan kallus görüntüleri; **a)** 5 nolu rejenerasyon ortamında kotiledon eksplantından gelişen kallus görüntüsü; **b)** 25 nolu rejenerasyon ortamında hipokotil eksplantından gelişen kallus görüntüsü

#### 4.1.2.2. G247'de tomurcuk ve sürgün oluşum bulguları

Genotip 247 ye ait eksplantların kültüre alındığı 50 besin ortamından elde edilen tomurcuk oluşumu, sürgün oluşumu ve oluşan sürgün miktarları üzerine eksplant ve besin ortamlarının bağımsız tekli değişken olarak etkileri ve interaksiyonları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6'ya göre besin ortamlarının etkisine bakılmaksızın kültüre alınan G247 eksplantlarının tomurcuk oluşumu üzerine olan etkisi incelendiğinde istatistiksel olarak  $p < 0.001$  düzeyinde fark oluşturmuştur. Hipokotil eksplantlarının (%33.63), kotiledon eksplantlarından (%26.88) daha fazla oranda tomurcuk oluşturduğu görülmektedir.

Eksplantlardan bağımsız olarak ortamların etkisi incelendiğinde tomurcuk oluşumu bakımından  $p < 0.001$  seviyesinde farklılık olduğu görülmektedir. En fazla tomurcuk oluşumu %93.75 ile 19. (MS+ 0.75 mg/l Zeatin + 1.5 mg/l IAA) ortam da gerçekleşmiş ve bu oluşumu 23. (MS+ 1.5 mg/l Zeatin+ 0.75 mg/l IAA) ve 24. (MS+ 1.5 mg/l Zeatin+ 1.5 mg/l IAA) ortamlar (%87.50) takip etmiştir. Bu ortamların ortak özelliğine bakıldığında (Çizelge 3.2.) Zeatin ve IAA'nın farklı kombinasyonlarının kullanıldığı ortamlar olduğu görülmektedir. Eksplant x ortam interaksyonu incelendiğinde; bu interaksyonun tomurcuk oluşturma kapasitesi üzerinde  $p < 0.001$  seviyesinde istatistiksel fark oluşturduğu belirlenmiştir.

Sürgün oluşumu üzerine eksplantın bağımsız etkisi incelendiğinde istatistiksel olarak önemli bir etki bulunmazken, kotiledon eksplantı (%0.63) hipokotil eksplantından (%0.13) daha fazla sürgün oluşturmuştur. Eksplantlardan bağımsız olarak ortamın sürgün oluşumu üzerindeki etkisi incelendiğinde  $p < 0.05$  seviyesinde farklılık bulunmakla birlikte, en fazla sürgün oluşumunu (%6.25) 15. (MS+ 0.75 mg/l Zeatin) ve 47. (MS+1 mg/l BA + 1 mg/l ABA) ortamların verdiği görülmektedir.

Eksplant x ortam interaksyonunun sürgün oluşumu üzerinde etkisi  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Sürgün sayısı bakımından eksplantın bağımsız etkisi incelendiğinde her iki eksplantın da aynı miktarda sürgün oluşturduğu belirlenmiştir. Eksplantın etkisine bakılmaksızın ortamların sürgün sayısı üzerinde etkisi incelendiğinde istatistiksel olarak önemli bir etkisi bulunmazken, 20. (MS+1.5 mg/l Zeatin) ortam en fazla sürgün sayısını (0.88) vermiştir. Yine Çizelge 4.6.'da görüldüğü gibi eksplant x ortam interaksyonunun sürgün sayısı üzerinde istatistiksel olarak bir etkisi bulunmamıştır.

**Çizelge 4.6.** G247 rejenerasyon denemelerinde kotiledon ve hipokotillerde meydana gelen tomurcuk oluşumu, sürgün oluşumu ve sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

İncelenen Özellikler			
Faktörler	Tomurcuk Oluşumu (%)	Sürgün Oluşumu %	Sürgün Sayısı/Petri
	Ort. ± SH	Ort. ± SH	Ort. ± SH
<b>Eksplant (E)</b>			
Kotiledon	26.88 ± 2.47	<b>0.63</b> ± 0.33	0.04 ± 0.02
Hipokotil	<b>33.63</b> ± 2.88	0.13 ± 0.13	0.04 ± 0.04
LSD (%5)	2.94	Ö.D	Ö.D
<i>P</i>	<0.0001 ***	0.1396	0.9001
<b>Besin Ortamları (BO)</b>			

Çizelge 4.6.' nın devamı

0 (Kontrol)	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
1	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
2	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
3	25.00 ± 16.37	m-o	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
4	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
5	46.88 ± 7.38	g-k	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
6	21.88 ± 5.66	mn	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
7	12.50 ± 6.68	n-r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
8	6.25 ± 4.09	pr	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
9	56.25 ± 16.87	e-i	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
10	34.38 ± 15.63	k-m	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
11	12.50 ± 6.68	n-r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
12	9.38 ± 6.58	o-r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
13	53.13 ± 17.95	e-i	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
14	75.00 ± 9.45	b-d	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
15	68.75 ± 7.83	c-e	6.25 ± 6.25	ab	0.25 ± 0.25
16	18.75 ± 9.15	n-q	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
17	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
18	78.13 ± 8.76	a-c	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
19	<b>93.75</b> ± 4.09	<b>a</b>	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
20	43.75 ± 7.83	h-k	3.13 ± 3.13	b	<b>0.88</b> ± 0.88
21	18.75 ± 6.25	m-p	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
22	62.50 ± 14.94	c-f	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
23	87.50 ± 8.18	ab	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
24	87.50 ± 8.18	ab	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
25	50.00 ± 13.36	e-j	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
26	25.00 ± 9.45	m-o	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
27	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
28	3.13 ± 3.13	q-r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
29	59.38 ± 15.63	c-g	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
30	53.13 ± 15.26	e-i	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
31	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
32	21.88 ± 7.38	m-o	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
33	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
34	28.13 ± 15.98	l-n	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
35	43.75 ± 17.52	l-l	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
36	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
37	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00

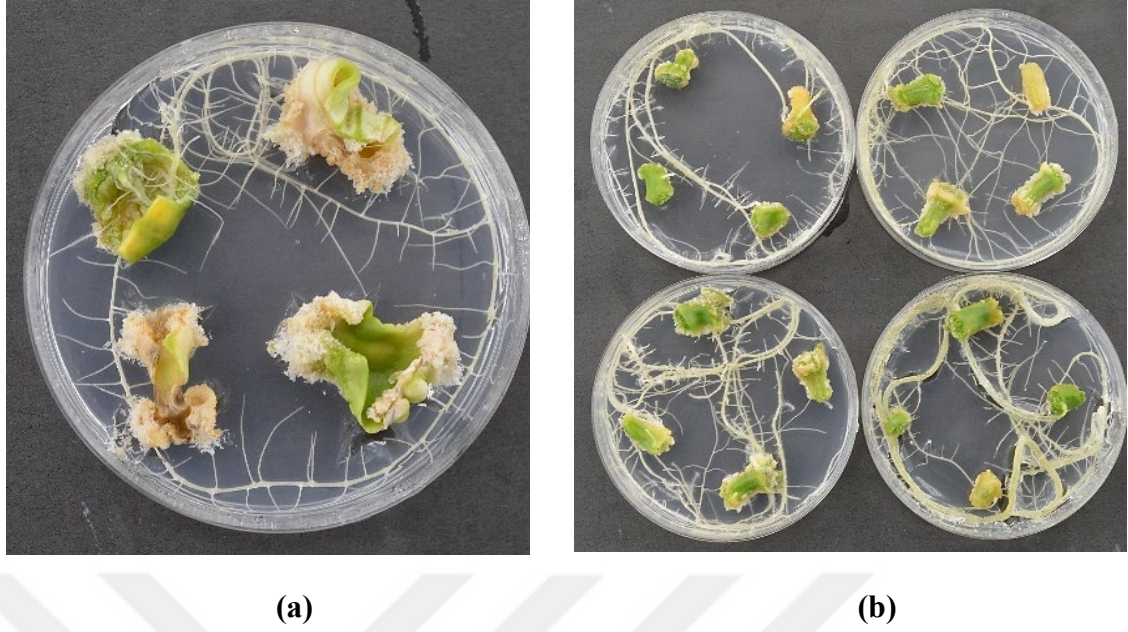
Çizelge 4.6.'nın devamı

38	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
39	3.13 ± 3.13	q-r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
40	62.50 ± 4.72	e-ı	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
41	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
42	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
43	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
44	0.00 ± 0.00	r	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
45	34.38 ± 6.58	j-m	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
46	50.00 ± 6.68	f-k	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
47	59.38 ± 16.32	d-h	<b>6.25</b> ± 4.09	<b>a</b>	0.63 ± 0.42
48	59.38 ± 15.63	c-g	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00
49	46.88 ± 15.26	h-k	3.13 ± 3.13	b	0.13 ± 0.13
LSD (%5)	14.72		3.49		Ö.D
<i>P</i>	<0.0001 ***		0.0499 *		0.1757
İnteraksiyon (E x BO)					
LSD (%5)	20.81		4.93		Ö.D
<i>P</i>	<0.0001 ***		0.0304 *		0.1125

#### 4.1.2.3. G247'de kök oluşum bulguları

G247'de kotiledon ve hipokotil eksplantlarının her birisinde 50 besin ortamında kurulan rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde, eksplant ve besin ortamından oluşan tekli bağımsız değişkenlerin ve bunların interaksiyonlarının kök oluşumu (%), kısa-ince, kısa-normal, uzun-ince ve uzun-normal kök sayıları üzerindeki etkileri Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7'ye göre eksplant tipinin, besin ortamlarının etkisine bakılmaksızın kök oluşumu ve uzun ince kök sayısı yönünden önemli bir fark oluşturmadığı, kısa-ince kök sayısı üzerinde  $p < 0.001$ , kısa-normal sayısı üzerinde  $p < 0.01$  ve uzun-normal kök sayısı üzerinde ise  $p < 0.05$  seviyesinde farklılıklar ortaya koyduğu belirlenmiştir. Hipokotil eksplantlarının (%30.63), kotiledon eksplantları (%29.88) ile hemen hemen aynı oranda kök oluşturduğu tespit edilmiştir. Oluşan köklerin sayısı bakımından eksplantlar incelendiğinde, hipokotil eksplantı kök oluşumu, uzun-ince ve uzun-normal kök oluşumu yönünden daha fazla miktarda kök oluştururken, kotiledon eksplantı ise daha fazla miktarda kısa-ince ve kısa-normal kök oluşturmuştur. Şekil 4.6'da G247 eksplantlarında gelişen kök oluşumları görülmektedir.



**Şekil 4.6.** G247’de kök oluşumuna ait görüntüler; **a)** Kotiledon eksplantından gelişen uzun ince kök oluşumları; **b)** Hipokotil eksplantından gelişen uzun ince ve uzun normal kök oluşumları

Çizelge 4.7’ye göre eksplantların etkisinden bağımsız olarak besin ortamlarının etkisi incelendiğinde, tüm köklenme parametreleri açısından  $p < 0.001$  seviyesinde önemli farklılıklar bulunmuştur. En fazla kök oluşumu %100 ile 1. (MS + 0.75 mg/l NAA) ve 4. (MS + 1.5 mg/l IAA) ortamda gerçekleşmiştir. En yüksek kısa-ince kök sayısı (8.75) 1. ortamda meydana gelirken, en yüksek kısa-normal kök sayısını (10.25) 27. (MS+ 0.75 mg/l 2İP + 1.5 mg/l NAA) ortam oluşturmuştur. En yüksek uzun-ince kök sayısı (7.75) 3. (MS + 0.75 mg/l IAA) ortamda, en yüksek uzun-normal kök sayısını (2.13) ise 28. (MS+ 0.75 mg/l 2İP+ 0.75 mg/l IAA) ve 32. (MS+ 1.5 mg/l 2İP+ 1.5 mg/l NAA) ortamlar vermiştir. Normal, sağlıklı kökler olarak kabul edilebilecek uzun-normal köklerin sayısının en fazla olduğu (ortalama 2.13/petri) ortamlar 28. (MS + 0.75 mg/l IAA + 0.75 mg/l 2IP) ve 32. MS + 1.5 mg/l NAA + 1.5 mg/l 2IP) ortamlar olarak belirlenmiştir.

Eksplant x ortam ikili interaksiyonu incelendiğinde bu interaksiyonun kök oluşum yüzdesi ile kısa-normal ve uzun-ince kök sayıları üzerine etkisi  $p < 0.001$ , kısa-ince ve uzun-normal kök sayıları üzerinde ise  $p < 0.01$  seviyesinde farklılık oluşturduğu görülmektedir (Çizelge 4.7).

Ayrıntılı şekilde incelenen köklenme bulgularının, ileride yapılabilecek sekonder metabolit üretim çalışmalarına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

**Çizelge 4.7.** G247 rejenerasyon optimizasyonu denemelerinde eksplant ve besin ortamından oluşan tekli bağımsız değişkenlerin ve bunların interaksiyonunun kök oluşumu (%) ve çeşitli kök tiplerinin miktarı üzerine etkileri

İncelenen Özellikler																				
Faktörler	Kök Oluşumu (%)			Kısa-İnce Kök Sayısı / Petri		Kısa-Normal Kök Sayısı / Petri		Uzun-İnce Kök Sayısı / Petri		Uzun-Normal Kök Sayısı / Petri										
	Ort.	±	SH	Ort.	±	SH	Ort.	±	SH	Ort.	±	SH								
<b>Eksplant (E)</b>																				
Kotiledon	29.88	±	2.92	1.11	±	0.21	1.41	±	0.30	0.77	±	0.15	0.22	±	0.07					
Hipokotil	30.63	±	3.20	0.42	±	0.12	0.80	±	0.17	0.93	±	0.20	0.49	±	0.11					
LSD (%5)	Ö.D			0.35		0.41		Ö.D		0.23										
<i>P</i>	0.8054 öd			0.0002 ***		0.0038 **		0.3207		0.0187 *										
<b>Besin Ortamları (BO)</b>																				
0 (Kontrol)	50.00	±	18.90	bc	1.13	±	0.61	ef	1.13	±	0.58	d-h	0.00	±	0.00	1	0.00	±	0.00	d
1	100.00	±	0.00	a	8.75	±	1.79	a	2.63	±	1.38	de	3.38	±	1.56	b-d	1.00	±	1.00	d
2	56.25	±	17.52	bc	5.00	±	2.06	b	1.25	±	1.25	d-h	0.63	±	0.42	gı	0.13	±	0.13	c-d
3	87.50	±	12.50	a	3.13	±	1.55	c-d	0.00	±	0.00	h	7.75	±	2.62	a	1.13	±	1.13	a-d
4	100.00	±	0.00	a	3.50	±	1.31	bc	0.75	±	0.75	e-h	7.00	±	1.45	a	1.88	±	1.32	ab
5	40.63	±	12.44	c-d	1.00	±	0.27	ef	0.25	±	0.16	g-h	1.00	±	0.57	f-ı	0.13	±	0.13	c-d
6	18.75	±	10.30	e-h	0.00	±	0.00	f	1.25	±	0.84	d-h	0.25	±	0.25	ı	0.00	±	0.00	d
7	37.50	±	15.67	c-e	0.00	±	0.00	f	0.50	±	0.50	f-h	3.63	±	2.00	bc	0.00	±	0.00	d
8	3.13	±	3.13	g-h	0.13	±	0.13	ef	0.00	±	0.00	h	0.00	±	0.00	ı	0.00	±	0.00	d
9	50.00	±	18.90	bc	0.00	±	0.00	f	2.50	±	1.09	d-f	0.00	±	0.00	ı	0.50	±	0.33	c-d
10	50.00	±	15.67	bc	0.63	±	0.63	ef	0.75	±	0.75	e-h	2.50	±	1.25	b-f	0.63	±	0.42	c-d
11	21.88	±	8.76	d-g	0.75	±	0.31	ef	0.75	±	0.49	e-h	0.25	±	0.25	ı	0.00	±	0.00	d
12	40.63	±	14.89	c-d	0.38	±	0.26	ef	1.75	±	0.86	d-h	0.50	±	0.50	hı	0.00	±	0.00	d
13	0.00	±	0.00	h	0.00	±	0.00	f	0.00	±	0.00	h	0.00	±	0.00	ı	0.00	±	0.00	d

Çizelge 4.7.'nin devamı

14	12.50 ± 12.50	f-h	0.00 ± 0.00	f	0.38 ± 0.38	g-h	1.00 ± 1.00	1	0.63 ± 0.63	c-d
15	12.50 ± 6.68	f-h	0.00 ± 0.00	f	0.13 ± 0.13	g-h	0.25 ± 0.16	1	0.13 ± 0.13	c-d
16	21.88 ± 12.88	d-g	0.50 ± 0.50	ef	0.63 ± 0.50	e-h	0.88 ± 0.88	g-1	0.38 ± 0.38	c-d
17	50.00 ± 18.90	bc	1.88 ± 1.32	c-e	6.63 ± 2.73	b	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d
18	25.00 ± 16.37	d-f	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	1	0.25 ± 0.16	c-d
19	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d
20	6.25 ± 4.09	f-h	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	h	0.38 ± 0.38	1	0.13 ± 0.13	c-d
21	37.50 ± 15.67	c-e	0.50 ± 0.50	ef	2.13 ± 1.41	d-g	0.00 ± 0.00	1	0.50 ± 0.50	c-d
22	50.00 ± 18.90	bc	1.63 ± 0.91	d-f	3.13 ± 1.32	c-d	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d
23	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d
24	50.00 ± 18.90	bc	0.25 ± 0.25	ef	5.13 ± 2.14	bc	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d
25	53.13 ± 17.95	bc	0.13 ± 0.13	ef	0.50 ± 0.50	f-h	2.13 ± 0.88	c-g	1.00 ± 0.68	a-d
26	<b>90.63</b> ± 9.38	<b>a</b>	1.25 ± 1.00	ef	1.63 ± 1.49	d-h	2.00 ± 0.80	d-h	0.00 ± 0.00	d
27	62.50 ± 18.30	b	0.00 ± 0.00	f	<b>10.25</b> ± 4.51	<b>a</b>	2.88 ± 1.43	b-e	0.88 ± 0.88	b-d
28	53.13 ± 17.95	bc	0.00 ± 0.00	f	2.13 ± 1.42	d-g	1.38 ± 0.91	e-1	<b>2.13</b> ± 0.77	<b>a</b>
29	53.13 ± 17.95	bc	0.38 ± 0.26	ef	0.50 ± 0.33	f-h	0.75 ± 0.53	g-1	1.00 ± 0.50	a-d
30	65.63 ± 14.89	b	1.75 ± 1.05	c-f	0.13 ± 0.13	g-h	3.75 ± 1.08	b	1.25 ± 1.25	a-c
31	53.13 ± 16.66	bc	3.50 ± 2.22	bc	0.88 ± 0.88	e-h	1.13 ± 0.79	f-1	0.63 ± 0.50	c-d
32	65.63 ± 14.89	b	1.63 ± 1.25	d-f	5.00 ± 2.05	bc	0.00 ± 0.00	1	<b>2.13</b> ± 0.79	<b>a</b>
33	65.63 ± 15.63	b	0.38 ± 0.38	ef	2.13 ± 1.39	d-g	0.00 ± 0.00	1	1.25 ± 0.56	a-c
34	25.00 ± 16.37	d-f	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	1	1.00 ± 0.65	a-d
35	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d
36	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	f	0.00 ± 0.00	h	0.00 ± 0.00	1	0.00 ± 0.00	d

Çizelge 4.7.'nin devamı

37	3.13 ± 3.13 g-h	0.00 ± 0.00 f	0.25 ± 0.25 g-h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
38	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
39	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
40	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
41	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
42	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
43	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
44	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
45	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
46	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
47	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
48	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
49	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 1	0.00 ± 0.00 d
LSD (%5)	17.96	1.77	2.06	1.53	1.14
<i>P</i>	<0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***	0.0003 ***
İnteraksiyon (E x BO)					
LSD (%5)	25.40	2.50	2.91	2.17	1.62
<i>P</i>	<0.0001 ***	0.0013 **	<0.0001 ***	<0.0001 ***	0.0042 **

## 4.2. Transformasyon çalışmaları bulguları

### 4.2.1. Transformasyon optimizasyon denemeleri bulguları

Çalışmada toplam 30 transformasyon yapılmıştır. Başlangıçtan itibaren en uygun transformasyon koşullarını ve en yüksek transformasyon etkinliğini sağlayıncaya kadar transformasyon üzerinde son derece önemli etkiye sahip olan genotip, bakteri ırkı, fide yaşı, eksplant tipi, önkültür (pre-inkübasyon) ile antibiyotik tipi ve markasından oluşan faktörler optimize edilmeye çalışılmıştır. Transformasyon denemelerinin ayrıntıları ve sonuçları önce toplu halde Çizelge 4.8. de, daha sonra da optimize edilen faktörlere ait detaylar ayrı ayrı aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.8. Transformasyon denemelerinin ayrıntıları ve sonuçları

Trans- formas- yon No	Ekilen Tohum Sayısı		Fide Yaşı (gün)	Kullanılan Eksplant Sayısı				Ön Kültür	Kullanılan Bakteri İrki	Kullanılan Seleksiyon Ajanları			Elde Edilen Sürgün				Elde Edilen Sürgün / 100 Eksplant			
	G27	G247		G27		G247				Bakteri Dayanımı İçin		Bitki Dayanımı İçin***	G27		G247		G27		G247	
				K*	H**	K	H			Kullanılan Antibiyotik	Antibiyotik Markası		K	H	K	H	K	H	K	H
	T1	40		40	5	120	40			140	40	+	LBA4404	Sefotaksim	Duchefa	PPT	0	1	0	0
T2	27	29	5	81	27	87	29	+	LBA4404	Sefotaksim	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T3	29	29	5	85	29	86	29	+	LBA4404	Sefotaksim	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T4	30	30	5	90	30	95	30	+	LBA4404	Sefotaksim	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T5	39	40	5	117	39	120	40	+	LBA4404	Sefotaksim	Duchefa	PPT	5	0	2	0	4.27	0.00	1.67	0.00
T6	39	38	5	115	39	120	38	+	EHA105	Sefotaksim	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T7	50	50	5	150	50	160	50	+	EHA105	Sefotaksim	Duchefa	PPT	0	0	4	1	0.00	0.00	2.50	2.00
T8	50	50	5	140	50	155	50	+	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	3	0	0.00	0.00	1.94	0.00
T9	70	70	5	200	70	210	70	+	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	1	0	0	0.00	1.43	0.00	0.00
T10	75	75	5	220	75	225	75	+	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T11	70	70	5	200	70	220	70	+	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T12	75	75	5	322	75	276	75	-	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	2	2	1	7	0.62	2.67	0.36	9.33
T13	70	70	5	180	70	154	70	-	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	1	5	0.00	0.00	0.65	7.14
T14	68	70	5	191	68	160	70	-	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T15	70	69	5	169	70	178	69	-	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T16	70	60	5	211	70	220	60	-	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T17	58	59	5	179	58	191	59	-	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T18	55	60	5	169	55	219	60	-	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T19	60	60	5	103	60	167	60	-	EHA105	Timentin	Duchefa	PPT	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
T20	72	72	5	258	-	230	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	8	-	19	-	3.10	-	8.26	-
T21	80	80	5	193	-	291	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	0	-	23	-	0.00	-	7.90	-
T22	50	55	5	174	-	162	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	0	-	20	-	0.00	-	12.35	-

Çizelge 4.8.'in devamı

T23	50	50	1	102	-	107	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	6	-	21	-	5.88	-	19.63	-
T24	50	50	1	92	-	130	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	20	-	14	-	21.74	-	10.77	-
T25	50	50	1	83	-	97	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	5	-	16	-	6.02	-	16.49	-
T26	75	75	1	134	-	141	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	10	-	16	-	7.46	-	11.35	-
T27	60	54	1	105	-	148	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	5	-	22	-	4.76	-	14.86	-
T28	100	100	1	178	-	196	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	8	-	43	-	4.49	-	21.94	-
T29	50	50	1	103	-	95	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	34	-	32	-	33.01	-	33.68	-
T30	150	50	1	267	-	97	-	-	EHA105	Timentin	Goldbio	PPT	68	-	15	-	25.47	-	15.46	-
<b>Toplam</b>	<b>1.832</b>	<b>1.730</b>		<b>4.731</b>	<b>1.045</b>	<b>4.877</b>	<b>1.044</b>						<b>171</b>	<b>4</b>	<b>252</b>	<b>13</b>				
<b>Orta-lama</b>	<b>61.1</b>	<b>57.7</b>		<b>157.7</b>	<b>55.0</b>	<b>162.6</b>	<b>54.9</b>						<b>5.7</b>	<b>0.2</b>	<b>8.4</b>	<b>0.7</b>	<b>3.9</b>	<b>0.3</b>	<b>6.0</b>	<b>1.0</b>

\* Kotiledon

\*\* Hipokotil

\*\*\* PPT = Fosfinotrisin (Glufosinate ammonium) (Basta herbisitinin etken maddesi)

#### 4.2.1.1. Genotipin etkisi

Genotipin transformasyon üzerindeki etkisi 27 ve 247 nolu genotipler ile incelenmiştir. Gerçekleştirilen toplam 30 transformasyon farklı koşullarda yapılmış olsa da, hepsinde G27 ve G247 için tüm transformasyon koşulları aynıdır. Bu çalışmada ortaya konulan genotipin transformasyon üzerindeki etkisi Çizelge 4.9'da sunulmuştur.

**Çizelge 4.9.** Genotipin transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

Genotip	Kullanıldığı Transformasyon Sayısı	Eksplant Sayısı Ortalaması*/ Transformasyon	Elde Edilen Sürgün Sayısı Ortalaması / Transformasyon	Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant
G27	30 (T1-T30)	157.7	5.6	3.55
G247	30 (T1-T30)	162.6	8.5	5.23

\* Sadece kotiledon eksplantları dikkate alınmıştır.

Çizelge 4.9 incelendiğinde G247'den elde edilen sürgün sayısı / 100 eksplant ortalamasının (5.23), G27'den elde edilen orandan (3.55) yaklaşık 1.5 kat fazla olduğu görülmektedir. Genotipin transformasyon verimi üzerindeki etkisi farklı türlerde yapılan birçok çalışmada olduğu gibi, hıyarda (Sarmiento vd. 1992) da daha önce ortaya konulmuştur.

#### 4.2.1.2. Bakteri ırkının etkisi

Transformasyonda LBA4404 ve EHA105 ırklarının etkisi incelenmiştir. LBA4404 ırkı ilk 5 transformasyonda, EHA105 ırkı ise daha sonraki toplam 25 transformasyonda kullanılmıştır. Bunun nedeni ise LBA4404 bakterisi ırkının besi ortamında iyi gelişmemesi ve eksplantları iyi enfekte edememesidir. Bakteri ırkının her iki genotipin kotiledon (Çizelge 4.10) ve hipokotil eksplantlarında (Çizelge 4.11) yapılan transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerindeki etkisi aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Kullanılan bakteri ırkının kotiledon eksplantlarında yapılan transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

Bakteri Irkı	Kullanıldığı Transformasyon Sayısı	Eksplant Sayısı Ortalaması*/ Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
		G27	G247	G27	G247	G27	G247
LBA4404	5 (T1-T5)	98.6	105.6	0.4	1	0.41	0.95
EHA105	2 (T6-T7)	132.5	140.0	0.0	2	0.00	1.43

\* Sadece kotiledon eksplantları dikkate alınmıştır.

**Çizelge 4.11.** Kullanılan bakteri ırkının hipokotil eksplantlarında yapılan transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

Bakteri Irkı	Kullanıldığı Transformasyon Sayısı	Eksplant Sayısı Ortalaması*/ Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
		G27	G247	G27	G247	G27	G247
LBA4404	5 (T1-T5)	33.0	33.6	0.0	0.2	0.00	0.60
EHA105	2 (T6-T7)	44.5	44.0	0.0	0.5	0.00	1.14

Çizelge 4.10. ve Çizelge 4.11’de belirtilen transformasyonların hepsi için ortak özellikler; fide yaşı 5 günlük fidelerin, eksplant olarak kotiledon ve hipokotil eksplantlarının, bakteriye dayanıklılık antibiyotigi olarak sefotaksim kullanılması ve önkültür uygulamasının yapılmış olmasıdır.

Çizelgelere göre LBA4404 ırkı Genotip 27 için kotiledon eksplantında ortalama %0.41 oranında sürgün oluşumu meydana getirirken, hipokotillerde sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir. Yine LBA4404 ırkı Genotip 247’de kotiledon eksplantında %0.95, hipokotil eksplantında ise %0.60 oranında sürgün oluşumu meydana getirmiştir. EHA105 ırkı incelendiğinde ise G27’de hem kotiledon hem de hipokotil eksplantında herhangi bir sürgün oluşumuna rastlanmamıştır. Genotip 247’de ise kotiledon eksplantı %1.43, hipokotil eksplantı %1.14 oranında sürgün oluşturmuştur. Bu sonuçlara göre hıyar transformasyon çalışmalarında EHA105 ırkının daha başarılı olduğu sonucuna

varılmıştır. Bakteri ırkının transformasyon üzerindeki etkisi hıyarda daha önce Raharjo vd. (1996) tarafından da ortaya konulmuştur. En yüksek transformasyon frekansının %12 ile EHA105 ırkı kullanıldığında elde edildiğini belirlemişlerdir.

#### 4.2.1.3. Fide yaşının etkisi

Transformasyonlarda 5 ve 1 günlük fidelere ait eksplantların etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın ilk etabında 5 günlük fidelerin kotiledon ve hipokotil kısımları kullanıldığında tomurcuk oluşumunun gerçekleştiği ancak sürgün oluşumunun çok az olduğu tespit edilmiştir. Hem 5 günlük fidelere ait eksplantlardan yeterince iyi tepki alınmaması, hem de literatürdeki hıyar transformasyon çalışmalarında genel olarak 1 günlük fidelerin eksplantlarının daha yaygın kullanılması nedeniyle T23 den itibaren son 8 transformasyon denemesinde sadece 1 günlük fidelerin eksplantları kullanılmıştır. Fide yaşının her iki genotipte yapılan transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi Çizelge 4.12’de belirtilmiştir.

**Çizelge 4.12.** Fide yaşının transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

Fide Yaşı	Kullanıldığı Transformasyon Sayısı	Eksplant Sayısı Ortalaması*/ Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
		G27	G247	G27	G247	G27	G247
5 günlük	3 (T20-T22)	208.3	227.7	2.7	20.7	1.30	9.10
1 günlük	8 (T23-T30)	133.0	126.4	19.5	22.4	14.66	17.72

\* Sadece kotiledon eksplantları dikkate alınmıştır.

Çizelge 4.12’de belirtilen transformasyonların hepsi için ortak özellikler; ırk olarak *A. tumafaciens*’in EHA105 ırkının, eksplant olarak sadece kotiledon eksplantlarının, bakteriye dayanıklılık antibiyotiği olarak timentinin ve timentin markası olarak Goldbio markasının kullanılmış olması ve hiçbirisinde önkültür uygulamasının yapılmamış olmasıdır.

Çizelge 4.12 incelendiğinde 5 günlük fidelerin eksplantları kullanıldığında ortalama sürgün oluşumu; G27’de %1.30 ve G247’de %9.10 oranında, 1 günlük fidelerin eksplantları kullanıldığında ise ortalama sürgün oluşumu G27’de %14.66 ve G247 de ise %17.72 oranında gerçekleşmiştir. Bu sonuçlara göre 1 günlük fide kullanımı 5 günlük fide kullanımına göre G27’de 11 ve G247 de ise 2 kat artış sağlamıştır.

Literatür incelendiğinde rejenerasyon çalışmalarında 3-5 günlük *in vitro* çimlendirilmiş fideler kullanıldığında rejenerasyon kapasitesinin yüksek olduğu çalışmalar mevcuttur (Trulson ve Shain 1986; Hooymans vd. 1994; Kim vd. 2000; Selvaraj vd. 2007; Vasudevan vd. 2007). Ancak daha yaşlı fideler kullanıldığında ise rejenerasyon kapasitesinin düştüğü çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Hooymans vd. 1994; Kim vd. 2000). Literatür taramaları sonucu 1-2 günlük karanlıkta çimlendirilen fideler kullanıldığında yüksek rejenerasyon kapasitesi ile sonuçlandığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Gal-On vd. 2005; Vengadesan vd. 2005; Selvaraj vd. 2010; Li vd. 2017). Literatürde bulunan pek çok çalışma ile de desteklenmesi sebebi ile hıyar transformasyon çalışmalarında 1 günlük fidelerin kotiledonlarının özellikle proksimal kısmının kullanılması önerilebilir.

#### 4.2.1.4. Eksplant tipinin etkisi

Rejenerasyon optimizasyonu çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda transformasyon denemesinde hem hipokotil hem de kotiledon eksplantları kullanılmıştır. Kotiledon eksplantları tüm denemelerde hipokotil eksplantları ise ilk 19 transformasyonda kültüre alınmıştır. Hem hipokotil eksplantından yeterince iyi tepki alınmaması, hem de literatürdeki hıyar transformasyon çalışmalarında genel olarak kotiledon eksplantının daha yaygın kullanılması nedeniyle T20 den itibaren transformasyon denemelerine sadece kotiledon eksplantıyla devam edilmiştir. Çizelge 4.13’de kullanılan eksplant tipinin transformasyonlardaki sürgün oluşumuna etkisi gösterilmiştir.

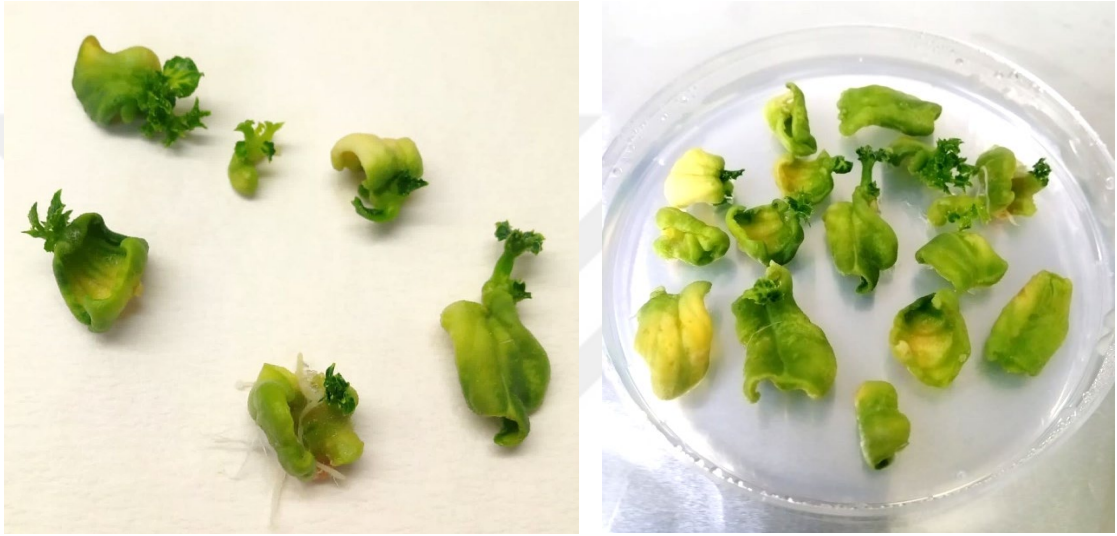
**Çizelge 4.13.** Eksplant tipinin transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

Kullanılan Eksplant	Kullanıldığı Transformasyon Sayısı	Eksplant Sayısı Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
		G27	G247	G27	G247	G27	G247
Hipokotil	19 (T1-T19)	55.0	54.9	0.2	0.7	0.36	1.28
Kotiledon	30 (T1-T30)	157.7	162.6	5.6	8.5	3.56	5.28

Çizelge 4.13 incelendiğinde G27 de hipokotil eksplantı %0.36, kotiledon eksplantı ise %3.56 oranında sürgün oluşumu meydana getirmiştir. G247 ye baktığımızda hipokotil eksplantı %1.28, kotiledon eksplantı ise %5.28 oranında sürgün oluşturmuştur. Bu sonuçlara göre kotiledon eksplantları G27 ve G247’de hipokotil eksplantlarına göre sırasıyla yaklaşık 10 ve 4 kat daha fazla sürgün oluşumu sağlamıştır. Hıyar

transformasyonunda kotiledonun hipokotile göre üstünlüğü daha önce Wehner ve Locy 1981, Gambley ve Dodd 1990 ile Köse ve Koç (2003) tarafından da ortaya konulmuştur.

Yine kotiledon eksplantının kullanıldığı çalışmalarda kotiledonun sapa bağlanan kısımları (proksimal) ile uç kısımların (distal) rejenere olan bitki sayısı arasında önemli bir fark olduğu tespit edilmiştir (Yalcin-Mendi 2003; Ali vd. 1991b). Hem çalışmamızdaki bulgular hem de literatüre dayanarak, hıyar gen transformasyonunda eksplant kaynağı olarak kotiledonların proksimal kısımlarının (Şekil 4.7.) kullanılması önerilmektedir.



**Şekil 4.7.** Kotiledon eksplantının proksimal kısımlarından elde edilen sürgünler

#### 4.2.1.5. Önkültür uygulamasının etkisi

Önkültür (pre-inkübasyon) uygulamasının transformasyondaki etkisi ilk 10 transformasyonda araştırılmış, sonraki transformasyonlarda bu uygulamaya yer verilmemiştir. Önkültür uygulamasının kotildeon ve hipokotil eksplantlarında yapılan transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15’de verilmiştir.

**Çizelge 4.14.** Önkültür uygulamasının kotiledon eksplantlarındaki transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

Önkültür	Kullanıldığı Transformasyon Sayı ve Numarası	Eksplant Sayısı Ortalaması*/ Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
		G27	G247	G27	G247	G27	G247
Var	4 (T8-T11)	190	202.5	0.0	0.8	0.00	0.40
Yok	4 (T12-T15)	215.5	192.0	0.5	0.5	0.23	0.26

\* Sadece kotiledon eksplantları dikkate alınmıştır.

**Çizelge 4.15.** Önkültür uygulamasının hipokotil eksplantlarındaki transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

Önkültür	Kullanıldığı Transformasyon Sayısı	Eksplant Sayısı Ortalaması*/ Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
		G27	G247	G27	G247	G27	G247
Var	4 (T8-T11)	66.3	66.3	0.3	0.0	0.45	0.00
Yok	4 (T12-T15)	70.8	71	0.5	3.0	0.71	0.42

\* Sadece hipokotil eksplantları dikkate alınmıştır.

Çizelge 4.14. ve Çizelge 4.15.'de belirtilen transformasyonların hepsi için ortak özellikler; bakteri ırkı olarak *A. tumefaciens*'in EHA105 ırkının, fide yaşı 5 günlük fidelerin, eksplant olarak kotiledon ve hipokotil eksplantlarının, bakteriye dayanıklılık antibiyotiği olarak timentinin ve timentin markası olarak Duchefa ürününün kullanılmış olmasıdır.

Çizelge 4.14. incelendiğinde önkültür uygulamasının G27'de kotiledon eksplantlarında sürgün oluşturmadığı, G247 kotiledon eksplantlarında ise %0.40 oranında sürgün oluşturduğu belirlenmiştir. Önkültür uygulanmayan G27 kotiledon eksplantları %0.23, G247 kotiledon eksplantları ise %0.26 oranında sürgün oluşturmuştur.

Çizelge 4.15. incelendiğinde, önkültür uygulamasının hipokotil eksplantı üzerinde G27’de %0.45 oranında sürgün oluşturduğu, G247’de ise sürgün oluşturmadığı belirlenmiştir. Önkültür uygulanmasının yapılmadığı G27 eksplantlarında %0.71, G247’de ise %0.42 oranında sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. Önkültür uygulamasının olmadığı hipokotil eksplantları her iki genotipte de artan sürgün oluşumu ile sonuçlanmıştır. Dolayısıyla, önkültür uygulamasının her iki eksplant tipi için de transformasyon başarısı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

#### 4.2.1.6. Antibiyotığın etkisi

Transformasyonda bakteri gelişimini baskılama amaçlı seleksiyon ajanı olarak kullanılan antibiyotığın etkisi, sefotaksim ve timentin kullanılarak araştırılmıştır. Sefotaksim ilk 7 transformasyonda, timentin ise daha sonraki toplam 24 transformasyonda kullanılmıştır. Antibiyotik farklılığının kotildeon ve hipokotil eksplantlarında eşit koşullarda gerçekleştirilen transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17’de verilmiştir.

**Çizelge 4.16.** Antibiyotik farklılığının kotildeon eksplantlarındaki transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

Kullanılan Antibiyotik Tipi	Kullanıldığı Transformasyon Sayısı	Eksplant Sayısı Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
		G27	G247	G27	G247	G27	G247
Sefotaksim	2 (T6-T7)	132.5	140.0	0	2	0.00	1.43
Timentin	2 (T12-T13)	251.0	215.0	1	1	0.40	0.47

**Çizelge 4.17.** Antibiyotik farklılığının hipokotil eksplantlarındaki transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

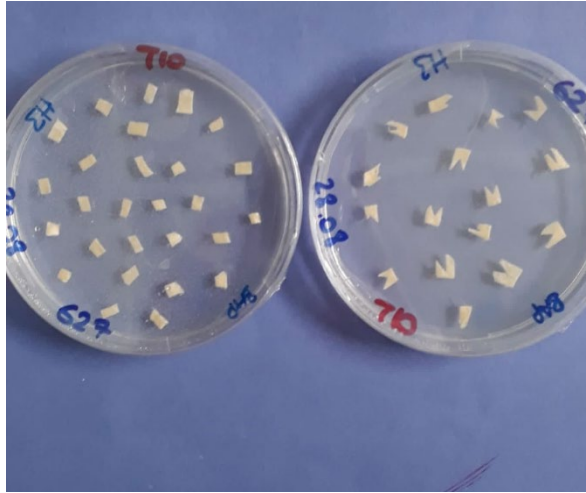
Kullanılan Antibiyotik Tipi	Kullanıldığı Transformasyon Sayısı	Eksplant Sayısı Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
		G27	G247	G27	G247	G27	G247
Sefotaksim	2 (T6-T7)	44.5	44.0	0	0.5	0.00	1.14
Timentin	2 (T12-T13)	72.5	72.5	1	6	1.38	8.28

Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17’de belirtilen transformasyonların hepsi için ortak özellikler; bakteri ırkı olarak *A. tumefaciens*’in EHA105 ırkının, fide yaşı 5 günlük fidelerin, eksplant olarak kotiledon ve hipokotil eksplantlarının ve her iki antibiyotiğin de Duchefa markası olarak kullanılmış olmasıdır.

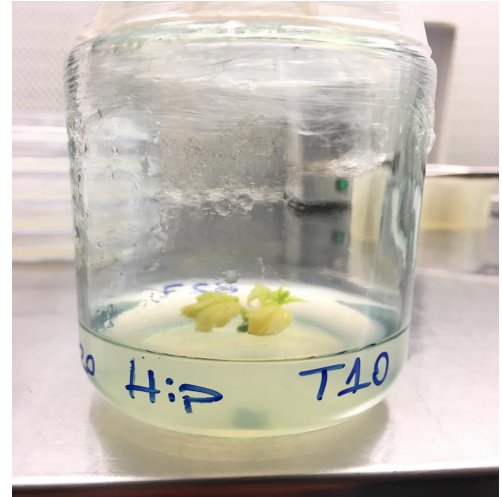
Çizelge 4.16’ya göre, sefotaksim antibiyotiğinin G27’de kotiledon eksplantında sürgün oluşturmadığı, G247’de ise %1.43 oranında sürgün oluşturduğu belirlenmiştir. Timentin antibiyotiği kullanımı ise G27’de sürgün oluşumunu arttırmış (%0.40) ve G247’de %0.47 sürgün oluşumu ile sonuçlanmıştır.

Çizelge 4.17’de sefotaksim antibiyotiği kullanımının hipokotil eksplantında G27 de sürgün oluşturmadığı, G247 de ise %1.14 oranında sürgün oluşturduğu görülmektedir. Timentin antibiyotiğinin hipokotil eksplantlarında kullanımının G27’de %1.38 oranında, G247’de ise %8.28 oranında sürgün oluşturduğu görülmektedir.

Bu sonuçlara göre, hipokotil eksplantlarında sefotaksim antibiyotiği yerine timentin kullanımı sonucu sürgün sayısındaki artış dikkat çekmektedir. Yine sefotaksim antibiyotiğinin ortamdaki bakteriyi kontrol altında tutamaması sonucu *Agrobacterium*’un petrinin tüm yüzeyini kapladığı ve nihayetinde eksplantların canlılığını yitirmesine neden olduğu belirlenmiştir. Timentin (Duchefa) kullanımının ise genel olarak sürgün sayısında artışa neden olduğu, ancak seleksiyon ortamına alınan bazı eksplantların beyazlaşarak canlılığını yitirmesine, ayrıca petride oluşan aşırı bakteri yoğunluğunu baskılayamadığı belirlenmiştir. Şekil 4.8.’de eksplantlardaki beyazlaşmalar görülmektedir.



(a)



(b)

**Şekil 4.8.** Seleksiyon ortamındaki bazı eksplantların görüntüsü; **a)** kotiledon eksplantlarındaki beyazlaşmalar **b)** sürgünlerdeki beyazlaşmalar

#### 4.2.1.7. Antibiyotik (Timentin) markasının etkisi

Transformasyonda sefotaksime göre daha başarılı bulunan timentin antibiyotiğinin marka farklılık etkisi, Duchefa ve Goldbio markalarının ürünleri kullanılarak araştırılmıştır. Duchefa markasına ait timentin antibiyotiği 8.transformasyondan itibaren toplam 13 transformasyonda, Goldbio markasına ait timentin ise son 11 transformasyonda kullanılmıştır. Timentin marka farklılığının eşit koşullarda gerçekleştirilen transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi Çizelge 4.18’de verilmiştir.

**Çizelge 4.18.** Kullanılan timentin antibiyotiği markasının transformasyonlarda elde edilen sürgün sayısı üzerine etkisi

Kullanılan Timentin Markası	Kullanıldığı Transformasyon Sayısı	Eksplant Sayısı Ortalaması*/ Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı Ortalaması / Transformasyon		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
		G27	G247	G27	G247	G27	G247
Duchefa	8 (T12-T19)	190.5	195.6	0.3	0.3	0.16	0.15
Goldbio	3 (T20-T22)	208.3	227.7	2.7	20.7	1.30	9.10

\* Sadece kotiledon eksplantları dikkate alınmıştır.

Duchefa marka timentinin bitmesi üzerine yeni sipariş verilmesi gerektiğinde, daha önceden deneme amaçlı kullanılan GoldBio marka timentin sayesinde tesadüfen fark edilen olumlu bir farklılık üzerine, antibiyotik markasında değişikliğe gidilmiş ve GoldBio marka ürün satın alınarak 20. transformasyondan itibaren yapılan denemelerde bu marka timentin kullanılmıştır. Bu uygulama sonucu, Bölüm 4.2.1.6. da bahsedilen eksplantlardaki ve sürgünlerdeki beyazlaşmalar 20. transformasyondan itibaren ortadan kalkmış ve nihayet sağlıklı sürgün oluşumları gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.18’de belirtilen transformasyonların hepsi için ortak özellikler; bakteri ırkı olarak *A. tumafaciens*’in EHA105 ırkının, fide yaşı 5 günlük fidelerin, eksplant olarak sadece kotiledon eksplantlarının, bakteriye dayanıklılık antibiyotiği olarak timentinin kullanılmış olması ve hiçbirisinde önkültür uygulamasının yapılmamış olmasıdır.

Çizelge 4.18 incelendiğinde Duchefa markasına ait timentin kullanımı G27’de %0.16 oranında, G247’de ise %0.15 oranında sürgün oluşumu vermiştir. Goldbio markasına ait timentin kullanımı G27’de %1.30, G247’de ise %9.10 oranında sürgün oluşumu gerçekleştirmiştir.

*A. tumefaciens* ile gen aktarımı sonrasında, 1-3 günlük kokültivasyon aşamasında eksplantların bakteri ile enfeksiyonu sağlanmaktadır. Kokültivasyon aşamasından sonra *A. tumefaciens* enfeksiyonunu, transforme olmuş bitki hücrelerinin büyüme ve gelişimini baskılamaması için sonlandırmak gerekmektedir. Karbenisilin ve sefotaksim bu amaçla en sık kullanılan antibiyotiklerdir (Cheng vd. 1998). Bununla birlikte, bakteriyel baskılamayı sürdürmek için eksplantların antibiyotik içeren ortamda en az 2-3 kez alt kültürlenmesi gerekmektedir ve genellikle *Agrobacterium*'u bazı türlerin dokularından tamamen ortadan kaldırmak çok zordur (Hammerschlag vd.1995; Shackelford ve Chlan 1996). Timentinin, sefotaksim ve karbenisilin rejenerasyon potansiyelini olumsuz etkilediği türler için alternatif bir antibiyotik olabileceği belirlenmiştir (Cheng vd. 1998).

Sonuç olarak, çalışmamızda da sefotaksim antibiyotiğinin bakteriyel baskılamayı sağlayamadığı ve rejenerasyon kapasitesini olumsuz etkilediği, ancak timentin antibiyotiğinin de etkisinin markalara göre değiştiği ve GoldBio marka timentinin kullanılması ile daha önce yaşanan sorunların üstesinden geldiği belirlenmiştir.

#### 4.2.2. Optimize edilmiş koşullardaki transformasyon sonuçları

Transformasyon optimizasyon çalışmaları sonucu transformasyon için optimum bulunan koşullara göre gerçekleştirilen toplam 8 transformasyon sonucu elde edilen sürgün ve buna bağlı olarak 100 eksplant başına elde edilen sürgün sayılarına ait bulgular Çizelge 4.19.' da verilmiştir.

Çizelge 4.19 incelendiğinde, 1.064 adet eksplantın kullıldığı G27'deki transformasyonlar sonucu toplam 156 adet sürgün oluştuğu ve %13.6 oranında sürgün elde edildiği görülmektedir. 1.011 eksplantın kullanıldığı G247'deki transformasyonlar sonucu ise 179 adet sürgün oluşumunun gerçekleştiği ve %18 oranında sürgün meydana geldiği tespit edilmiştir. Vangadesan vd. (2005) benzer bitki gelişim düzenleyicisi (BA ve ABA) kullanılarak yaptıkları çalışmada 431 eksplanttan %7.2 sinin sürgün oluşturduğunu bildirmişlerdir.

#### 4.2.3. Bitki rejenerasyonu ve aklimatizasyon bulguları

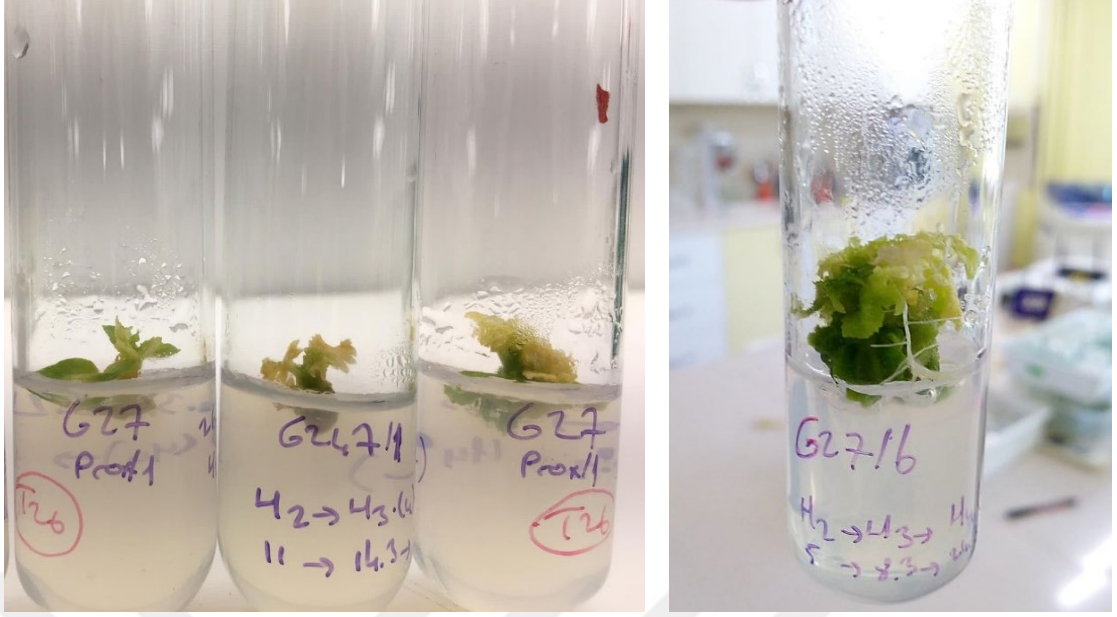
Genotip 27'nin gelişimi tohum çimlendirme aşamasından itibaren diğer aşamalarda da daha zayıf olarak gözlenmiştir. İlk seleksiyon ortamında iyi bir şekilde gelişmeye başlayan bu genotipe ait sürgünler, sürgün geliştirme ortamına aktarıldıktan sonra, kültürün ilerleyen günlerinde genellikle daha erken sararmaya başlamaktadır. Dayanıklılığı daha zayıf olan bu genotipte oluşan sürgünler seleksiyonun ilerleyen aşamalarındaki baskıya karşı daha hassas olmasından dolayı canlılıklarını daha erken kaybetmişlerdir. Bu genotipteki söz konusu sararmalar Şekil 4.9.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.19.** Optimize edilmiş koşullarda gerçekleştirilen transformasyonlarda elde edilen toplam sürgün ve 100 eksplant başına elde edilen sürgün sayıları

Transformasyon No	Ekilen Tohum Sayısı		Kullanılan Eksplant Sayısı*		Elde Edilen Sürgün Sayısı**		Elde Edilen Sürgün Sayısı / 100 Eksplant	
	G27	G247	G27	G247	G27	G247	G27	G247
<b>T23</b>	50	50	102	107	6	21	5.88	19.63
<b>T24</b>	50	50	92	130	20	14	21.74	10.77
<b>T25</b>	50	50	83	97	5	16	6.02	16.49
<b>T26</b>	75	75	134	141	10	16	7.46	11.35
<b>T27</b>	60	54	105	148	5	22	4.76	14.86
<b>T28</b>	100	100	178	196	8	43	4.49	21.94
<b>T29</b>	50	50	103	95	34	32	33.01	33.68
<b>T30</b>	150	50	267	97	68	15	25.47	15.46
<b>Ortalama</b>	<b>73.1</b>	<b>59.9</b>	<b>133.0</b>	<b>126.4</b>	<b>19.5</b>	<b>22.4</b>	<b>13.6</b>	<b>18.0</b>
<b>Toplam</b>	<b>585</b>	<b>479</b>	<b>1064</b>	<b>1011</b>	<b>156</b>	<b>179</b>	-	-

\* Eksplant olarak kotiledonların proksimal kısımları kullanılmıştır.

\*\* Elde edilen sürgün sayısı ile aktarılan sürgün sayısı eşittir.



**Şekil 4.9.** G27 ye ait sürgün gelişiminin ilerleyen aşamasında oluşan sararmalar

Öte yandan diğer genotip olan Genotip 247 başlangıçtan itibaren Genotip 27'den daha iyi çimlenmiş, sürgün oluşturma yönünden daha iyi tepki ve daha yüksek oranda sürgün oluşturmuş ve nihayet oluşan sürgünlerinin gelişimi de daha güçlü olmuştur. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi daha güçlü kök oluşturabilir hale gelmişlerdir.

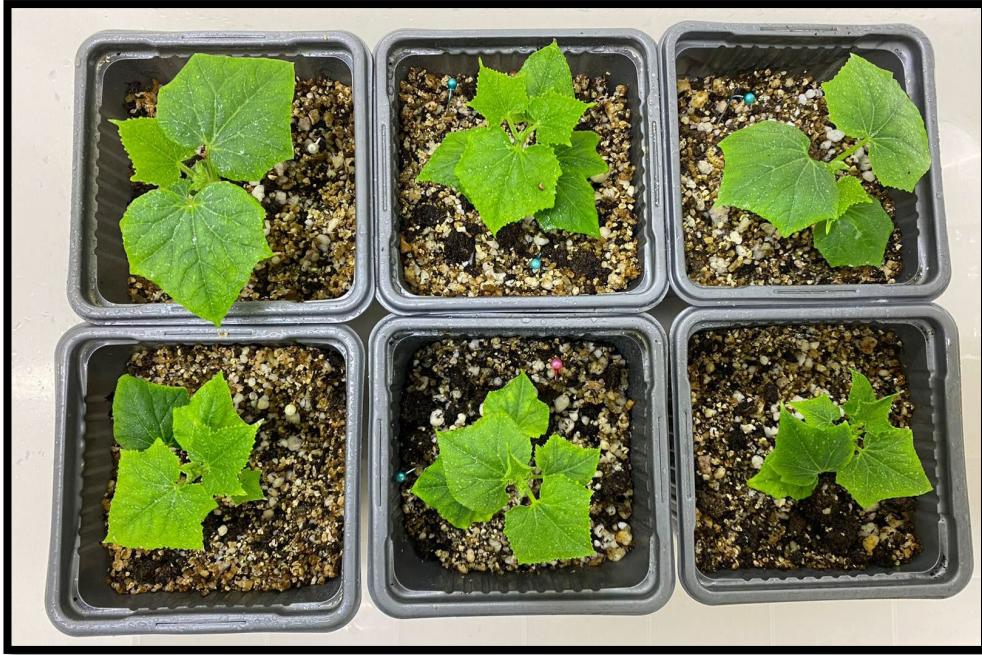


**Şekil 4.10.** G247' ye ait kök oluşumu gerçekleşen sürgünler

Köklendirme ortamlarında sağlıklı sürgün ve kök oluşumu gözlenen bitkiciklerde aklimatizasyon işlemleri yapılmıştır. Çalışmada elde edilen sürgünlerin aklimatizasyon işlemi devam ettiği için aklimatizasyon sonuçları verilmemiştir. Şekil 4.11 ve 4.12’de aklimatizasyonu yapılan bitkilere ait bazı görüntüler verilmiştir.



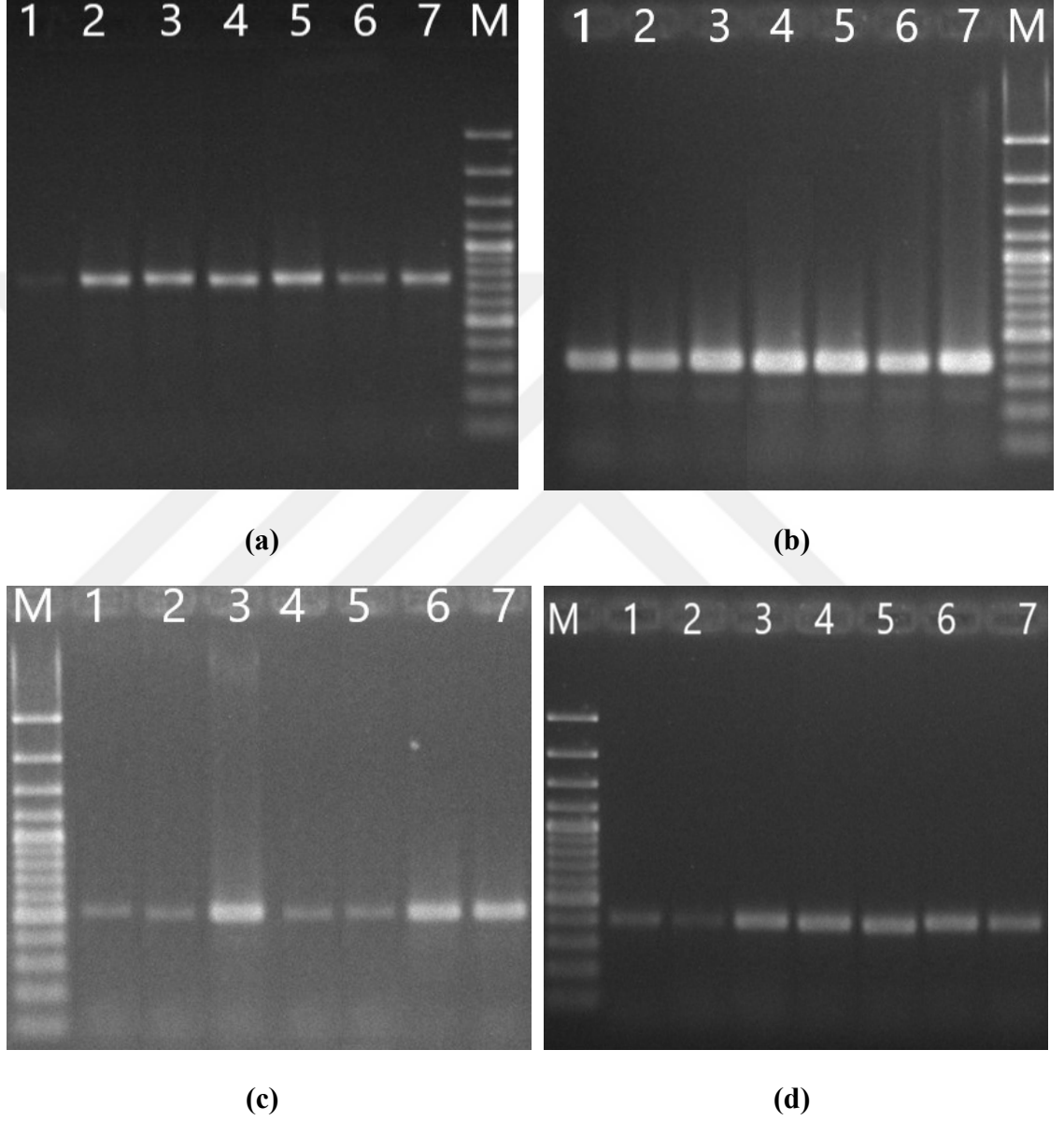
Şekil 4.11. G27 de aklimatizasyonu yapılan bitkilere ait görüntüler



Şekil 4.12. G247 de aklimatizasyonu yapılan bitkilere ait görüntüler

#### 4.2.4. Transgenik mutant adayı (T0) hıyar bitkilerinin moleküler analiz bulguları

Rastgele seçilmiş 7 farklı aklimatize edilmiş aday transgenik bitki *Agrobacterium*, plazmit ve rehber RNA'ları (sgRNA1 ve sgRNA2) taşımaları bakımından PCR ile test edilmiştir. Bu teste ilişkin elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.13'de verilmiştir.



**Şekil 4.13.** 7 potansiyel transgenik hıyar bitkisinin jel elektroforez görüntüsü; **a)** *Agrobacterium* **b)** plazmit **c)** sgRNA1 **d)** sgRNA2 (M: 100bp DNA Ladder Thermo Scientific)

Elde edilen PCR rnlerinin jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu test edilen *Agrobacterium*, plazmit ve rehber RNA'lar bakımından pozitif oldukları görülmüştür.

pFGC-pcoCas9 plazmidinin *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşu aracılılığıyla başarılı bir şekilde 7 farklı aday transgenik hıyar bitkilerine aktarıldığı görülmektedir. Aynı şekilde rehber RNA olan sgRNA1 ve sgRNA2'ninde başarılı bir şekilde aktarıldığı belirlenmiştir.



## 5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında öncelikle iki adet hıyar genotipinde (G27 ve G247) etkili bir *in vitro* rejenerasyon ve gen transformasyonu protokolünün oluşturulması, daha sonra da optimize edilmiş koşullarda CRISPR/Cas9 gen düzenleme teknolojisi kullanarak G27 ve G247 hıyar genotiplerinde *eIF* (iso) *4E*'nin susturulması amaçlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

Rejenerasyon ve transformasyon çalışmalarında kullanılacak olan en uygun BGD kombinasyonu ve konsantrasyonundan oluşan kültür ortamını (kontrol dahil 50 ortam arasından) ve en uygun eksplant tipini belirlemek amacı ile yapılan rejenerasyon optimizasyonu çalışmalarında başlangıçta her iki genotip için kotiledon, hipokotil ve kotiledon + hipokotil olmak üzere üç farklı eksplant tipi denenmiştir. Ancak kotiledon + hipokotil eksplantları çok hızlı şekilde sürgün ve kök oluşturmuş ve buldukları petri kabını gözlem yapılamayacak şekilde kaplamaları rejenerasyon çalışmalarında kullanımından vazgeçilmiştir. Rejenerasyon optimizasyonu çalışmalarının sonucuna göre kotiledon ve hipokotil eksplantlarının transformasyon optimizasyon çalışmalarında da kullanılmasına karar verilmiştir. Yapılan transformasyon optimizasyonu çalışmalarında ise hipokotil eksplantından beklenen sayıda sürgün oluşumu elde edilememiştir. Bu yüzden daha rejeneratif olduğu için daha sonra yapılan optimize edilmiş koşullardaki transformasyon çalışmalarında sadece kotiledon eksplantı kullanılmıştır.

Rejenerasyon optimizasyonu çalışmalarında, G27 ve G247'ye ait kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kontrol grubu dahil toplam 50 besin ortamının tümünde kallus oluşturduğu belirlenmiştir. Kalluslardan meydana gelen tomurcuk oluşumu yönünden her iki genotipte de hipokotil eksplantları kotiledon eksplantlarına göre daha fazla tomurcuk oluşturmuştur. En yüksek sürgün oluşumu G27'de (%59.4) 48. (MS + 1.5 mg/l BA + 1.5 mg/l ABA) ve 49. (MS + 2 mg/l BA + 1 mg/l ABA) ortamlarda, G247'de (%93.7) ise 19. (MS + 0.75 mg/l Zeatin + 1.5 mg/l IAA) ortamda gerçekleşmiştir. Ancak oluşan tomurcukların sürgüne dönüşme potansiyeli genel olarak düşük bulunmuştur.

En yüksek sürgün oluşumu G27'de (%12.5) 48. ortamda (MS + 1.5 mg/l BA + 1.5 mg/l ABA), G247'de (%6.25) ise 15. (MS + 0.75 mg/l Zeatin) ve 47. (MS + 1 mg/l BA + 1 mg/l ABA) ortamlarda meydana gelmiştir. Genel olarak BA ve ABA kombinasyonlarının birlikte kullanıldığı ortamlarda G27'de sürgün oluşum tepkisi daha yüksek bulunmuştur. Ancak, Genotip 27'nin Genotip 247'ye göre daha geç gelişim göstermesi üzerine, yapılacak olan transformasyon çalışmalarının tamamında G27'nin maksimum sürgün oluşturduğu 48. (MS + 1.5 mg/l BA + 1.5 mg/l ABA) ortamın kullanılmasına karar verilmiştir.

Kültüre alınan eksplantların kök oluşturma kapasitesi değerlendirildiğinde G27'de en fazla kök oluşumu %93.75 ile 2. ortamda (MS + 1.5 mg/l NAA) gerçekleşmiştir. G247'de ise en fazla kök oluşumu %100 ile 1. (MS + 0.75 mg/l NAA) ve 4. (MS + 1.5 mg/l IAA) ortamda meydana gelmiştir. Kökler 4 farklı tipte (kısa-ince, kısa-normal, uzun-ince, uzun-normal) oluşmuştur. Normal, sağlıklı kökler olarak kabul edilebilecek uzun-normal köklerin sayısının en fazla olduğu ortamlar G27'de (ort. 5/petri) 16. (MS + 0.75 mg/l NAA + 0.75 mg/l Zeatin) ve 17. ortamlar (MS + 1.5 mg/l NAA + 0.75 mg/l Zeatin), G247'de (ortalama 2.13/petri) ise 28. (MS + 0.75 mg/l IAA +

0.75 mg/l 2IP) ve 32. MS + 1.5 mg/l NAA + 1.5 mg/l 2IP) ortamlar olarak tespit edilmiştir. Ayrıntılı şekilde incelenen köklenme bulgularının, ileride yapılabilecek sekonder metabolit üretimi ve mikroçoğaltım çalışmalarına katkı sağlaması umulmaktadır.

Transformasyon çalışmalarına gelince, toplam 30 transformasyon yapılmıştır. Bu transformasyonlarda başlangıçtan itibaren, en başarılı transformasyon etkinliği sağlanıncaya kadar transformasyon başarısı üzerinde son derece önemli etkileri olan genotip, bakteri ırkı, fide yaşı, eksplant tipi, önkültür (pre-inkübasyon), antibiyotik tipi ve markasından oluşan faktörler optimize edilmeye çalışılmıştır.

Transformasyon optimizasyonu çalışmaları sonucu; bakteri ırkı olarak *A. tumefaciens*'in EHA105 ırkının, fide yaşı olarak 1 günlük fidelerin, eksplant olarak kotiledon eksplantlarının proksimal bölgelerinin, önkültür olarak herhangi bir önkültür uygulamasının yapılmadığı, bakteri gelişimini baskılama amaçlı kullanılan antibiyotik olarak timentinin ve timentin markası olarak da Goldbio markasının kullanıldığı transformasyon koşulları hıyar transformasyonu için en optimum koşullar olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, hıyar transformasyonunda genotip etkisinin sürgün oluşum frekansı üzerinde çok önemli etkisi olduğu hem yaptığımız çalışmada hem de literatür çalışmalarıyla desteklenmiştir. Nitekim bu çalışmada, Genotip 247'nin transformasyon etkinliği Genotip 27'den daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, çalışılacak her yeni hıyar genotipi için rejenerasyon ve transformasyon optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra gen transformasyonu çalışmalarına başlanması tavsiye edilmektedir.

Hem bitki rejenerasyonu hem de transformasyon için yapılan optimizasyon çalışmalarının ardından, eşit koşullarda gerçekleştirilen 8 transformasyonda elde edilen ortalama sürgün sayısı G27 ve G247 için sırasıyla 13.6 sürgün / 100 eksplant ve 18 sürgün / 100 eksplant olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen *ex vitro* aday transgenik bitkilerden (T0) rastgele seçilen bazı hıyar hatları, aktarılan genleri taşımaları bakımından PCR analizi ile test edilmiştir. TAGEM/18 /AR-GE/03 nolu proje kapsamında yürütülen bu çalışmada, test sonucu pozitif çıkan bitkilerde sera koşullarında devam eden yetiştiricilik ve melezleme çalışmaları ile elde edilecek olan T1 bitkilerinde daha sonra sekans analizleri yapılacaktır.

Hıyarda virüs direnci ile ilişkisi olduğu bilinen ökaryotik çeviri başlatma faktörlerinden olan *eIF (iso) 4E* geninin önemi her geçen gün daha da iyi anlaşılmaktadır. Çalışmamızın, *eIF (iso) 4E* geninin devre dışı bırakılması için ileride yapılabilecek çalışmalara katkı sağlaması umulmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Alam, M. F., Amin, R., Uddin, M. E., Biswas, S. K., & Islam, M. M. 2015. Regeneration of Shoot from Nodal eksplants of Cucumis sativus considering different Hormonal concentration. *International Research Journal of Biological Sciences*, 4(7), 48-52.
- Ali, Z., Abulfaraj, A., Idris, A., Ali, S., Tashkandi, M., & Mahfouz, M. M. 2015. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome biology*, 16(1), 238.
- Ali, Z., Ali, S., Tashkandi, M., Zaidi, S. S. E. A., & Mahfouz, M. M. 2016. CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: differential interference and evasion. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Ali, N., Skirvin, R., Splittstoesser, W. E., & George, W. L. 1991a. Germination and regeneration of plants from old cucumber seed. *HortScience*, 26(7), 917-918.
- Ali, N., Skirvin, R. M., & Splittstoesser, W. E. 1991b. Regeneration of Cucumis sativus from cotyledons of small eksplants. *HortScience*, 26(7).
- Aman, R., Ali, Z., Butt, H., Mahas, A., Aljedaani, F., Khan, M. Z., ... & Mahfouz, M. 2018. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome biology*, 19(1), 1.
- Anuar, M. R., Ismail, I., & Zainal, Z. 2011. Expression analysis of the 35S CaMV promoter and its derivatives in transgenic hairy root cultures of cucumber (Cucumis sativus) generated by Agrobacterium rhizogenes infection. *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8236-8244.
- Avaş, B. 2013. Hıyar (Cucumis sativus L.) bitkisinin doku kültüründe somatik embriyogenez ve organogenez yöntemleri ile üretimi. Yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, 61s.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadœuf, J., Palloix, A., & Moury, B. 2006. Different mutations in the genome-linked protein VPg of Potato virus Y confer virulence on the pvr23 resistance in pepper. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(5), 557-563.
- Baltes, N. J., Hummel, A. W., Konecna, E., Cegan, R., Bruns, A. N., Bisaro, D. M., & Voytas, D. F. 2015. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants*, 1(10), 1-4.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., & Nekrasov, V. 2013. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant methods*, 9(1), 39.
- Bortesi, L., & Fischer, R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.
- Braatz, J., Harloff, H. J., Mascher, M., Stein, N., Himmelbach, A., & Jung, C. 2017. CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (Brassica napus). *Plant Physiology*, 174(2), 935-942.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. 2014. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short

- palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology*, 166(3), 1292-1297.
- Burza, W., & Malepszy, S. 1995. Direct plant regeneration from leaf eksplants in cucumber (*Cucumis sativus* L.) is free of stable genetic variation. *Plant Breeding*, 114(4), 341-345.
- Cade, R. M., Wehner, T. C., & Blazich, F. A. 1990. Effect of eksplant age and growth regulator concentration on adventitious shoot formation from cucumber cotyledonary tissue. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (13), 14-17.
- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., ... & Gal-On, A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular plant pathology*, 17(7), 1140-1153.
- Chee, P. P. 1990. Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Reports*, 9(5), 245-248.
- Cheng, Z. M., Schnurr, J. A., & Kapaun, J. A. 1998. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports*, 17(8), 646-649.
- Chu, Y. F., Sun, J. I. E., Wu, X., & Liu, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6910-6916.
- Colijn-Hooymans, C. M., Hakkert, J. C., Jansen, J., & Custers, J. B. M. 1994. Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(3), 211-217.
- De La Riva, G. A., González-Cabrera, J., Vázquez-Padrón, R., & Ayra-Pardo, C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic journal of Biotechnology*, 1(3), 24-25.
- Dhiman, K., Gupta, A., Sharma, D. K., Gill, N. S., & Goyal, A. 2012. A review on the medicinally important plants of the family Cucurbitaceae. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, 4(1), 16-26.
- DIAZ-PENDON, J. A., Truniger, V., NIETO, C., GARCIA-MAS, J. O. R. D. I., Bendahmane, A., & Aranda, M. A. 2004. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular plant pathology*, 5(3), 223-233.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S., & Robaglia, C. 2002. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso) 4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *The Plant Journal*, 32(6), 927-934.
- Fichtner, F., Castellanos, R. U., & Ülker, B. 2014. Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement. *Planta*, 239(4), 921-939.
- Fidan, H. (2010). Sarımsak, Soğan ve Pırasadaki Virüs Hastalıklarının Saptanması ve Taşköprü 56 Sarımsak Tipinin En Yaygın Virüse Karşı Reaksiyonunun Belirlenmesi. *Cukurova University, Institute of Natural and Applied Sciences, Doctoral dissertation*.

- Gal-On, A., Wolf, D., Antignus, Y., Patlis, L., Ryu, K. H., Min, B. E., ... & Shibolet, Y. M. 2005. Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. *Transgenic research*, 14(1), 81-93.
- Gambley, R. L., & Dodd, W. A. 1990. An in vitro technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon eksplants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 20(3), 177-183.
- Ganapathi, A., & Perl-Treves, R. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation in *Cucumis sativus* via direct organogenesis. In *VII Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding 510* (pp. 405-408).
- Gao, Y., & Zhao, Y. 2014. Specific and heritable gene editing in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), 4357-4358.
- Gómez, P., Rodríguez-Hernández, A. M., Moury, B., & Aranda, M. A. 2009. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. *European journal of plant pathology*, 125(1), 1-22.
- Gomez, M. A., Lin, Z. D., Moll, T., Chauhan, R. D., Hayden, L., Renninger, K., ... & Bart, R. S. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF 4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant biotechnology journal*, 17(2), 421-434.
- Grozeva, S., & Velkov, N. 2014. In vitro plant regeneration of two cucumber (*Cucumis sativum* L.) genotypes: effects of eksplant types and culture medium. *Genetika*, 46(2), 485-493.
- Hammerschlag, F. A., Zimmerman, R. H., Yadava, U. L., Hunsucker, S., & Gercheva, P. 1995. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf eksplants in vitro and for the effect on regeneration. *HortScience*, 30(4), 876C-876.
- Hébrard, E., Pinel-Galzi, A., Bersoult, A., Siré, C., & Fargette, D. 2006. Emergence of a resistance breaking isolate of Rice yellow mottle virus during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg.
- Jacobs, T. B., LaFayette, P. R., Schmitz, R. J., & Parrott, W. A. 2015. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC biotechnology*, 15(1), 16.
- Jesmin, R., & Mian, M. A. K. 2016. Callus induction and efficient plant regeneration in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, 9, 796-803.
- Ji, X., Zhang, H., Zhang, Y., Wang, Y., & Gao, C. 2015. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants*, 1(10), 1-4.
- Jiang, J., & Laliberté, J. F. 2011. The genome-linked protein VPg of plant viruses—a protein with many partners. *Current opinion in virology*, 1(5), 347-354.
- Jones, H. D. 2015. Regulatory uncertainty over genome editing. *Nature plants*, 1(1), 1-3.
- Joyia, F. A., & Khan, M. S. 2013. In vitro micropropagation studies of elite Pakistani rice varieties. *Int J Agri Biol*, 15, 27-33.

- Joyia, F. A., Mustafa, G., Zahra, R., Munawar, S., Anjum, M. N., & Khan, M. S. 2019. 80. Exploiting shoot tips as an efficient eksplant for in vitro regeneration of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Pure and Applied Biology (PAB)*, 8(2), 1824-1829.
- Kanchiswamy, C. N., Sargent, D. J., Velasco, R., Maffei, M. E., & Malnoy, M. 2015. Looking forward to genetically edited fruit crops. *Trends in biotechnology*, 33(2), 62-64.
- Kang, B. C., Yeam, I., & Jahn, M. M. 2005. Genetics of plant virus resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 581-621.
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. P., & Tuteja, N. 2016. The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops. *Frontiers in plant science*, 7, 506.
- Kim, S. G., Chang, J. R., Cha, H. C., & Lee, K. W. 1988. Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12(1), 67-74.
- Kim, J. W., Han, S. K., Kwon, S. Y., Lee, H. S., Lim, Y. P., Liu, J. R., & Kwak, S. S. 2000. High frequency shoot induction and plant regeneration from cotyledonary hypocotyl eksplants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Journal of plant physiology*, 157(1), 136-139.
- Kobaner, S.S. 2006. Hıyar bitkisinde (*cucumis sativus* l.) rejenerasyonun optimizasyonu ve agrobacterium aracılığıyla gfp (yeşil floresan protein) geninin aktarılması. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 98 s.
- Kose, E., & Koç, N. K. 2003. Agrobacterium-Mediated Transformation of Cucumber (*Cucumis Sativus* L.) and Plant Regeneration. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17(2), 56-62.
- Leemans, J., Langenakens, J., De Greve, H., Deblaere, R., Van Montagu, M., & Schell, J. (1982). Broad-host-range cloning vectors derived from the W-plasmid Sa. *Gene*, 19(3), 361-364.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., & Carrington, J. C. 2002. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection. *Current Biology*, 12(12), 1046-1051.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., & Laliberté, J. F. 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of virology*, 74(17), 7730-7737.
- Li, J. F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., ... & Sheen, J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, 31(8), 688-691.
- Li, X., Ma, S., Shan, N., Zhang, X., & Sui, X. 2017. A protocol for Agrobacterium-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) from cotyledon eksplants.
- Liu, B., Saber, A., & Haisma, H. J. 2019. CRISPR/Cas9: a powerful tool for identification

- of new targets for cancer treatment. *Drug discovery today*.
- Lou, H., & Kako, S. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. *HortScience*, 29(8), 906-909.
- Lovisollo, O. 1979. Virus and viroid diseases of cucurbits. In *III Conference on Epidemiology and Control of Virus Diseases of Vegetables 88* (pp. 33-82).
- Macovei, A., Sevilla, N. R., Cantos, C., Jonson, G. B., Slamet-Loedin, I., Čermák, T., ... & Chadha-Mohanty, P. 2018. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus. *Plant biotechnology journal*, 16(11), 1918-1927.
- Mahfouz, M. M., Piatek, A., & Stewart Jr, C. N. 2014. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant biotechnology journal*, 12(8), 1006-1014.
- Matthews, R. E. F., & Hull, R. 2002. *Matthews' plant virology*. Gulf professional publishing.
- McInnes, E., Morgan, A. J., Mulligan, B. J., & Davey, M. R. 1991. Roots induced on cucumber cotyledons by the agropine Ri plasmid TR-DNA exhibit the transformed phenotype. *Plant cell reports*, 9(11), 647-650.
- Milner, J. A. 2000. Functional foods: the US perspective. *The American journal of clinical nutrition*, 71(6), 1654S-1659S.
- Mohammadi, J., & Sivritepe, N. 2007. In vitro clonal propagation of *Cucumis sativus* L. by shoot tip culture. *J Biol Sci*, 7, 653-657.
- Mohiuddin, A. K. M., Chowdhury, M. K. U., Abdullah, Z. C., & Napis, S. 1997. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. *Plant cell, tissue and organ culture*, 51(1), 75-78.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., ... & Jacquemond, M. 2004. Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(3), 322-329.
- Msikita, W., Skirvin, R. M., Juvik, J. A., Splittstoesser, W. E., & Ali, N. 1990. Regeneration and Flowering in Vitro of Burpleless Hybrid Cucumber Cultured from Excised Seed. *HortScience*, 25(4), 474-477.
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murphy, J. F., Klein, P. G., Hunt, A. G., & Shaw, J. G. 1996. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology*, 220(2), 535-538.
- Nanasato, Y., Konagaya, K. I., Okuzaki, A., Tsuda, M., & Tabei, Y. 2013. Improvement of Agrobacterium-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. *Plant biotechnology reports*, 7(3), 267-276.
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J. D., & Kamoun, S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided

- endonuclease. *Nature biotechnology*, 31(8), 691.
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., & Kamoun, S. 2017. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific reports*, 7(1), 1-6.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuán, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., ... & LeGall, O. 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant physiology*, 132(3), 1272-1282.
- Nishibayashi, S., Kaneko, H., & Hayakawa, T. 1996. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl eksplants. *Plant cell reports*, 15(11), 809-814.
- Nishitani, C., Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K., Osakabe, K., ... & Osakabe, Y. 2016. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.
- Novak, F. J. (1982). Hormone control of growth and differentiation in the in vitro cultured tissue of cucumber (*Cucumis sativus* L.).
- Peng, A., Chen, S., Lei, T., Xu, L., He, Y., Wu, L., ... & Zou, X. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene Cs LOB 1 promoter in citrus. *Plant biotechnology journal*, 15(12), 1509-1519.
- Presting, G.G., Smith, O.P., And Brown, C.R. 1995. Resistance to potato leafroll virus in potato plants transformed with the coat protein gene or with vector control constructs. *Phytopathology* 85:436-442.
- Puchta, H. 2005. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of experimental botany*, 56(409), 1-14.
- Pyott, D. E., Sheehan, E., & Molnar, A. 2016. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1276-1288.
- Raharjo, S. H. T., Hernandez, M. O., Zhang, Y. Y., & Punja, Z. K. 1996. Transformation of pickling cucumber with chitinase-encoding genes using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant cell reports*, 15(8), 591-596.
- Revers, F., & García, J. A. 2015. Molecular biology of potyviruses. In *Advances in virus research* (Vol. 92, pp. 101-199). *Academic Press*.
- Rodríguez-Hernández, A. M., Gosalvez, B., Sempere, R. N., Burgos, L., Aranda, M. A., & Truniger, V. 2012. Melon RNA interference (RNAi) lines silenced for Cm-eIF4E show broad virus resistance. *Molecular plant pathology*, 13(7), 755-763.
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A., & Caranta, C. 2006. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF (iso) 4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper. *Journal of General Virology*, 87(7), 2089-2098.
- Sanfaçon, H. 2015. Plant translation factors and virus resistance. *Viruses*, 7(7), 3392-

3419.

- Sarmiento, G. G., Alpert, K., Tang, F. A., & Punja, Z. K. 1992. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. *Plant cell, tissue and organ culture*, 31(3), 185-193.
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M., & Uyeda, I. 2005. Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS letters*, 579(5), 1167-1171.
- Schaeffer, S. M., & Nakata, P. A. 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: transitioning from lab to field. *Plant Science*, 240, 130-142.
- Schell, J., & Van Montagu, M. (1983). The Ti plasmids as natural and as practical gene vectors for plants. *Bio/technology*, 1(2), 175-180.
- Selvaraj, N., Vasudevan, A., Manickavasagam, M., & Ganapathi, A. 2006. In vitro organogenesis and plant formation in cucumber. *Biologia plantarum*, 50(1), 123-126.
- Selvaraj, N., Vasudevan, A., Manickavasagam, M., Kasthuriengan, S., & Ganapathi, A. 2007. High frequency shoot regeneration from cotyledon eksplants of cucumber via organogenesis. *Scientia Horticulturae*, 112(1), 2-8.
- Selvaraj, N., Kasthuriengan, S., Vasudevan, A., Manickavasagam, M., Choi, C. W., & Ganapathi, A. 2010. Evaluation of green fluorescent protein as a reporter gene and phosphinothricin as the selective agent for achieving a higher recovery of transformants in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Poinsett76) via *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(4), 329-337.
- Seo, S. H., Bai, D. G., & Park, H. Y. 2000. High frequency shoot regeneration from leaf eksplants of cucumber. *Journal of Plant Biotechnology*, 2(1), 51-54.
- Shackelford, N. J., & Chlan, C. A. 1996. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14(1), 50-57.
- Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. 2008. Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and bioengineering*, 100(1), 118-125.
- Tabei, Y., Kitade, S., Nishizawa, Y., Kikuchi, N., Kayano, T., Hibi, T., & Akutsu, K. 1998. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports*, 17(3), 159-164.
- Trulson, A. J., & Shahin, E. A. 1986. In vitro plant regeneration in the genus *Cucumis*. *Plant Science*, 47(1), 35-43.
- Trulson, A. J., Simpson, R. B., & Shahin, E. A. 1986. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. *Theoretical and applied genetics*, 73(1), 11-15.

- Truniger, V., & Aranda, M. A. 2009. Recessive resistance to plant viruses. *In Advances in virus research* (Vol. 75, pp. 119-231). *Academic Press*.
- Ugandhar, T., Srilatha, T., & Imran, M. A. 2013. Callus induction and somatic embryogenesis from leaf eksplants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Integrative Sciences, Innovation and Technology (IJIT)*, 2(2), 29-33.
- Usman, M., Hussain, Z., & Fatima, B. 2011. Somatic embryogenesis and shoot regeneration induced in cucumber leaves. *Pak. J. Bot.*, 43(2), 1283-1293.
- Vasudevan, A., Selvaraj, N., Kumar, P. S., & Ganapathi, A. 2001. Multiple shoot induction from shoot tip eksplants of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Report-Cucurbit Genetics Cooperative*, 24, 8-12.
- Vasudevan, A., Selvaraj, N., Ganapathi, A., & Choi, C. W. 2007. Agrobacterium-mediated genetic transformation in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Am J Biochem Biotechnol*, 3(1), 24-32.
- Vengadesan, G., Anand, R. P., Selvaraj, N., Perl-Treves, R., & Ganapathi, A. 2005. Transfer and expression of nptII and bar genes in cucumber (*Cucumis satavus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(1), 17-21.
- Venkatachalam, P., Jinu, U., Sangeetha, P., Geetha, N., & Sahi, S. V. 2018. High frequency plant regeneration from cotyledonary node eksplants of *Cucumis sativus* L. cultivar 'Green Long' via adventitious shoot organogenesis and assessment of genetic fidelity by RAPD-PCR technology. *3 Biotech*, 8(1), 60.
- Walden, R., & Wingender, R. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration (techniques). *Trends in biotechnology*, 13(9), 324-331.
- Wang, A., & Krishnaswamy, S. 2012. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Molecular plant pathology*, 13(7), 795-803.
- Wang, S., Zhang, S., Wang, W., Xiong, X., Meng, F., & Cui, X. 2015. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant cell reports*, 34(9), 1473-1476.
- Wang, L., Chen, L., Li, R., Zhao, R., Yang, M., Sheng, J., & Shen, L. 2017. Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated SIMAPK3 mutagenesis in tomato plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(39), 8674-8682.
- Wehner, T. C. 1981. In vitro adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus* L. *HortScience*, 16, 759-760.
- Wehner, T. C., & Locy, R. D. 1981. Tissue culture propagation of field-grown cucumber selections. *Cucurbit Genetics Cooperative*, 8.
- Xie, K., Zhang, J., & Yang, Y. 2014. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Molecular plant*, 7(5), 923-926.
- Xu, R. F., Li, H., Qin, R. Y., Li, J., Qiu, C. H., Yang, Y. C., ... & Yang, J. B. 2015. Generation of inheritable and "transgene clean" targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*, 5, 11491.

- Yalcin-Mendi, N. Y. 2003. Effect of cotyledon age and eksplant location on regeneration of *Cucumis sativus*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17(1), 38-43.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M., & Schell, J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of molecular biology*, 86(1), 109-127.
- Zhang, B., Yang, X., Yang, C., Li, M., & Guo, Y. 2016. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia. *Scientific reports*, 6, 20315.
- Zhang, Y. Z., Shi, M., & Holmes, E. C. 2018. Using metagenomics to characterize an expanding virosphere. *Cell*, 172(6), 1168-1172.



## ÖZGEÇMİŞ

YASEMİN ÖZ

### ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2010-2014	Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilecik

### MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Moleküler Biyolog Nisan 2021 – Devam Ediyor	Dost Ziraat Hayvancılık A.Ş.
Moleküler Biyolog Nisan 2020 – Eylül 2020	Vitro High Technology A.Ş.