



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

KABAK SARI MOZAYİK VİRÜSÜ KILIF PROTEİN (ZYMV-CP)
GENİ AKTARILAN KARPUZ HATTININ KAYNAK ÇEŞİTLE
KARŞILAŞTIRILMASI

EBRU MEŞE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

HAZİRAN-2010

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABAK SARI MOZAYİK VİRÜSÜ KILIF PROTEİN (ZYMV-CP)
GENİ AKTARILAN KARPUZ HATTININ KAYNAK ÇEŞİTLE
KARŞILAŞTIRILMASI

EBRU MEŞE
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Sebahattin ÇÜRÜK'ün danışmanlığında hazırlanan bu tez 29/ 06 /2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sebahattin ÇÜRÜK Doç.Dr. Yeşim YALÇIN-MENDİ Yrd. Doç. Dr. Tamer SERMENLİ
Başkan Üye Üye

Bu tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

.....
Enstitü Müdürü V.
Doç. Dr. Erdal YILMAZ

Bu çalışma M.K.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.

Proje No: **09M012**

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	10
2.1. Virüslerin Kabakgillerde Oluşturduğu Zararlar ve Çapraz Koruma.....	10
2.2. Gen Aktarma Çalışmaları.....	12
2.3. Gen Aktarılmış Bitkiler İle Kaynak Çeşitlerin Karşılaştırılması...	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. ‘Crimson Sweet’.....	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. ZYMV-CP Geni Aktarılmış ve Kaynak Genotip Tohumlarının Ekilmesi ve Elde Edilen Bitkilerden DNA İzolasyonu.....	18
3.2.2. ZYMV-CP Genini Almış Transgenik ve Almamış Kaynak Bitkilerin PCR İle Belirlenmesi	19
3.2.3. Denemelerin Kurulması.....	19
3.2.4. Gen Aktarılmış ve Kaynak Genotiplerin ZYMV Bulaştırılmadan Karşılaştırılması.....	21
3.2.5. Southern Blot Testi İle ZYMV-CP Geni Varlığının Teyit Edilmesi.....	22
3.2.5.1. Proben Elde Edilmesi.....	22
3.2.5.2. Çok Miktarda Genomik DNA’nın Ekstraksiyonu ve Enzimlerle Kesilmesi.....	26
3.2.5.3. Enzimle Kesilen Genomik DNA’nın Pozitif Yüklü Naylon Membrana Aktarılması.....	28
3.2.5.4. Hibridizasyon.....	28

3.2.6. Morfolojik, Pomolojik, Büyüme ve Verim Özelliklerinin İncelenmesi.....	28
3.2.7. ZYMV-CP Geni Aktarılmış ve Aktarılmamış Crimson Sweet Genotiplerinin ZYMV İle İnokule Edilerek Karşılaştırılması	39
3.2.8. İstatistiksel Analizler.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	40
4.1. Kontrol ve ZYMV-CP Geni Aktarılmış Bitkilerin PCR ile Seçilmesi ve Southern Blot ile Teyit Edilmesi.....	40
4.2. Gen Aktarılmış ve Kaynak Genotiplerin ZYMV Buluşturılmadan Karşılaştırılması.....	43
4.3. ZYMV-CP Geni Aktarılmış ve Aktarılmamış Crimson Sweet Genotiplerinin ZYMV İle İnokule Edilerek Kıyaslanması.....	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR.....	59
TEŞEKKÜR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64
EKLER.....	65
Ek 1. Karpuzda az miktarda (miniprep) genomik DNA izolasyon protokolü.....	65
Ek 2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'ten plazmit izolasyon protokolü.....	67
Ek 3. Agaroz jelden DNA izolasyon protokolü.....	69
Ek 4. Agaroz jelden izole edilen plazmit DNA'sının DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II (Roche, 11585614910) ile non-radyoaktif olarak işaretlenmesi protokolü.....	71
Ek 5. DIG ile işaretlenmiş DNA'nın işaretleme etkinliğini belirleme protokolü.....	73
Ek 6. Karpuzda çok miktarda genomik DNA izolasyon protokolü.....	75
Ek 7. Çok miktarda genomik DNA'nın enzimlerle kesilmesi protokolü.....	77
Ek 8. Vacuum blotter ile membrana DNA transferi ve hibridizasyon işlemleri protokolü.....	78

ÖZET

**KABAK SARI MOZAYİK VİRÜSÜ KILIF PROTEİN (ZYMV-CP)
GENİ AKTARILAN KARPUZ HATTININ KAYNAK ÇEŞİTLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin bitkilerde verim düşüklüğüne neden olduğu bilinmektedir. Biyotik stres faktörleri içerisinde, bitki virüs hastalıkları önemli olanlardan bir tanesidir. Virüs hastalıklarından Kabak sarı mozayik virüsü (ZYMV), kabakgil yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda ürün kayıplarına yol açan en önemli hastalıklardandır. Bu tez kapsamında yürütülen iki ayrı çalışmada, ZYMV kılıf protein (ZYMV-CP) geni aktarılarak elde edilen Crimson Sweet karpuz çeşidinin T1 ve T2 bitkilerinde genin varlığı PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile tespit edilmiş ve Southern blot ile bu sonuç teyit edilmiştir. İlk çalışmada, ZYMV-CP geni aktarılan T1 ve T2 bitkileri, gen aktarılmamış aynı çeşidin bitkileriyle morfolojik, pomolojik, büyüme ve verim özellikleri (toplam 88 özellik) açısından kıyaslanmıştır. Bu çalışmada, iki farklı tarihte T1 ve T2 bitkileriyle deneme gerçekleştirilmiştir. T1 bitkileriyle gerçekleştirilen ilk denemede, kotiledon genişliği ve kotiledon uzunluğu bakımından transgenik bitkilerin (1.47 cm, 2.23 cm) kaynak bitkilere (1.77 cm, 2.67 cm) göre sırasıyla %16.95 ve %16.48 daha düşük olduğu belirlenmiştir. Transgenik bitkilerin yaprak ayası genişliğinin (14.57 cm), kaynak bitkilerden (13.52 cm) %7.2 daha geniş olduğu saptanmıştır. Birinci ve ikinci denemede, transgenik olan bitkilerin hipokotil uzunluğunun (6.59 ve 5.35 cm), kaynak bitkilere (5.40 ve 4.94 cm) kıyasla sırasıyla %18 ve %7.6 daha uzun olduğu saptanmıştır. T2 bitkileriyle kurulan ikinci denemede ise, meyve eti sertliği ve meyve mühür büyüklüğü açısından kaynak bitki meyvelerinin (7.26 Newton, 6.50 mm) transgenik bitki meyvelerinden (7.75 Newton, 7.26 mm) sırasıyla %6.3 ve %10.4 daha düşük değere sahip olduğu saptanmıştır. Kabuk kalınlığı ve meyve sapı uzunluğu özelliklerinde, kaynak bitkiler (7.79 mm, 2.39 cm) transgenik bitkilere (7.17 mm, 2.13 cm) oranla %7.9 ve %10.8 daha yüksek değer almıştır. Transgenik bitkilerin meyvelerine (19.49) ait meyve et rengi a^* değerinin kaynak bitki meyvelerine (18.02) göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kaynak bitki meyvelerinin (-16.39) kabuğundaki koyu yeşil şerit rengi a^* değeri transgenik bitkilerin meyvelerine (-17.82) kıyasla yüksek bulunmuştur. Yürütülen ikinci çalışmada, yapay inokulasyonla ZYMV bulaştırılan ZYMV-CP genini taşıyan ve taşımayan bitkiler, bazı kalite ve verim özellikleri açısından karşılaştırılmıştır. Bu denemede, meyve et rengi, titre edilebilir asit içeriği, meyve suyu pH değeri, SÇKM ve toplam verim ile ilgili özellikler açısından, kaynak ve gen aktarılmış bitkiler arasında istatistiksel açıdan önemli farklar bulunmamıştır.

2010, 82 sayfa

Anahtar kelimeler: Crimson Sweet, ZYMV-CP, transgenik, kaynak çeşit ve karpuz

ABSTRACT

**COMPARISON OF TRANSGENIC WATERMELON LINE WITH
TRANSGENE ZUCCHINI YELLOW MOZAIC VIRUS COAT PROTEIN
(ZYMV-CP) WITH ORIGIN CULTIVAR**

It is known that biotic and abiotic stress factors result in yield decrease in plants. Among the biotic stress factors, plant virus diseases are one of the important ones. *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) is one of the most important virus diseases causing crop losses in cucurbit production. In the two studies that have been carried out for this thesis the presence of the zucchini yellow mosaic virus coat protein (ZYMV-CP) gene in the potative transgenic T1 and T2 plants of the Crimson Sweet watermelon cultivar were determined by polymerase chain reaction (PCR) and then the results were confirmed by Southern blot. In the first study, T1 and T2 plants having ZYMV-CP gene were compared with untransformed plants from the same cultivar for morphological, pomological, growth and yield characteristics (totally 88 traits). In this study, two experiments were conducted with the T1 and T2 plants in two different dates. In the first experiment that has been conducted with T1 plants, cotyledon width and cotyledon length of transgenic plants were 16.95% (1.47 vs. 1.77 cm) and 16.48% (2.23 vs. 2.67 cm) lower than those of origin cultivar. It was determined that the leaf blade width of the transgenic plants were 7.2% wider than the origin plants (14.57 vs. 13.52 cm). It was determined that compared to origin cultivar, the transgenic plants have 18% and 7.6% higher hypocotyl length in the first (6.59 vs. 5.40 cm) and in the second (5.35 vs. 4.94 cm) experiments, respectively. In the second experiment with the T2 plants, fruit flesh firmness and fruit scar size of the origin plants were 6.3% (7.26 vs. 7.75 Newton) and 10.4% (6.50 vs. 7.26 mm) lower than the transgenic plants. For the fruit rind width (7.79 vs. 7.17 mm) and fruit stalk length (2.39 vs. 2.13 cm), the origin plants had 7.9% and 10.8% higher values than those of transgenic plants. The a* value of the fruit flesh of the transgenic plants (19.49) was higher than that of the origin plants (18.02). Fruit rind strip color a* value of non-transgenic plants (-16.39) was greater than transgenic ones (-17.82). In the second study, the plants with and without ZYMV-CP genes were inoculated with ZYMV and some of their quality and yield characteristics were compared. In this experiment, no statistically significant differences were recorded for the fruit flesh color, titratable acidity, fruit juice pH, the total soluble solid and the total yield.

2010, 82 pages

Key Words: Crimson Sweet, ZYMV-CP, transgenic, origin cultivar, and watermelon

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
µj	Mikrojoule
µL	Mikro litre
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Kalsiyum nitrat tetra hidrat
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
CMV	Hıyar mozayik virüsü (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CTAB	N-Cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid
da	Dekar
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Ethylenedinitrilotetra acetic acid
g	Gram
GTE	Glikoz-Tris-EDTA
H ₃ BO ₃	Borik asit
ha	Hektar
HCl	Hidroklorik asit
K ₂ O	Potasyum dioksit
Kg	Kilogram
KNO ₃	Potasyum nitrat
L	Litre
m	Metre
M	Molar
mg	Miligram
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat hepta hidrat
ml	Mililitre
mm	Milimetre
N	Azot
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
P ₂ O ₅	Difosfor penta oksit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PVP (çözünmez)	Poly (vinylpolypyrrolidone)
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RCF	Oransal santrifüj kuvveti (Relative centrifugal force)
RPM	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
SB	2 g NaOH 600 ml steril saf suda çözüldükten sonra, pH borik asit ile 8.5'e ayarlanmış ve 1 litreye tamamlanmıştır.
SÇKM	Suda çözünebilir kuru madde miktarı
SDS	Sodyumdodesilsülfat (Sodium dodecyl sulfate)
TAE (5X)	24.2 g Tris base 700 ml steril saf suda çözüldükten sonra, 5.71 ml glacial asetik asit ve 10 ml 0.5M Na ₂ EDTA.2H ₂ O (pH:8) eklenerek 1 litreye tamamlanmıştır.
TE	Tris-EDTA

TSWV	Domates benekli solgunluk virüsü (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)
UV	Ultraviyole
WMV	Karpuz mozayik virüsü (<i>Watermelon mosaic virus</i>)
ZYMV	Kabak sarı mozayik virüsü (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>)
ZYMV-CP	Kabak sarı mozayik virüsü kılıf proteini (<i>Zucchini yellow mosaic virus coat protein</i>)

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 1.1.	Türkiye’de 2002-2006 yılları arası karpuz üretim değerlerinin (ton) bölgelere göre dağılımı.....	5
Çizelge 1.2.	Dünya karpuz üretim ve verimi açısından söz sahibi olan ülkelerin durumları.....	6
Çizelge 3.1.	Denemelerin gerçekleştirildiği 2009 yılına ait bazı meteorolojik değerlerin aylık ortalamaları.....	21
Çizelge 3.2.	ZYMV-CP geninin PCR ile çoğaltılması için kullanılan spesifik primerler ve baz dizilimleri.....	24
Çizelge 3.3.	PCR reaksiyon karışımında bulunan kimyasal maddeler ve bir karışım için gerekli stok miktarı ile reaksiyon çözeltisindeki konsantrasyonları	25
Çizelge 3.4.	PCR döngü programı.....	25
Çizelge 4.1.	İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin fide ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	44
Çizelge 4.2.	İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin gövde ve kol ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	44
Çizelge 4.3.	İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin yaprakla ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	45
Çizelge 4.4.	İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin çiçeklerle ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	45
Çizelge 4.5.	İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin kuru ve yaş ağırlıkla ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	46
Çizelge 4.6.	İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin fide ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	47

VIII

Çizelge 4.7.	İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin gövde ve kol ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	48
Çizelge 4.8.	İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin yaprakla ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	48
Çizelge 4.9.	İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin çiçekleriyle ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	49
Çizelge 4.10.	İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin olgunluk ve meyveler ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	51
Çizelge 4.11.	İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin kuru ve yaş ağırlık ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri.....	52
Çizelge 4.12.	İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin toplam verim ortalama değerleri.....	53
Çizelge 4.13.	ZYMV inokule edilen Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin, meyve et rengi, titre edilebilir asit içeriği, meyve suyu pH değeri, SÇKM ve toplam verim ile ilgili parametrelerine ait ortalama değerleri.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

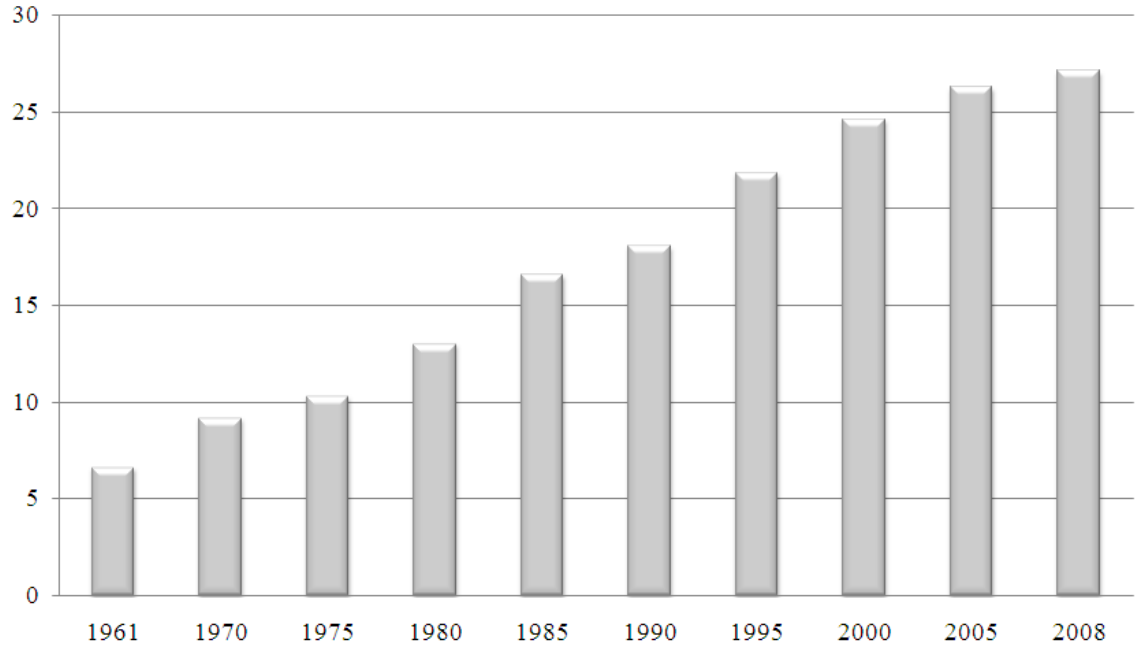
	Sayfa
Şekil 1.1. Türkiye’de yıllara göre sebze üretim değerleri (milyon ton).....	1
Şekil 1.2. Türkiye nüfusunun (milyon) yıllara göre değişimi (sadece 2025 yılı nüfusu tahminidir).....	2
Şekil 1.3. 2009 yılı itibariyle dünyada transgenik bitki üretiminde öne çıkan ülkeler.....	3
Şekil 1.4. ZYMV ile bulaşık karpuz bitkisi yaprağında oluşan kloklar, deformasyon ve kabarcıklar.....	7
Şekil 1.5. ZYMV inokule edilmiş kabak bitkisi yapraklarında oluşan kloklar, deformasyon ve iplikçikleşme	8
Şekil 3.1. Crimson Sweet karpuz çeşidi meyvesinin dış görünümü.....	17
Şekil 3.2. Kaynak çeşitten izole edilen DNA konsantrasyon jeli örneği (CSK: Crimson Sweet Kaynak).....	19
Şekil 3.3. Gen aktarılmış T2 generasyonu bitkilerinden izole edilen DNA konsantrasyon jeli örneği (CST: Crimson Sweet Transgenik).....	19
Şekil 3.4. Crimson Sweet kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış Crimson Sweet bitkilerinin genel görünümü.....	22
Şekil 3.5. Elde edilen pCIB10 plazmidinin elektroforez jel görüntüsü.....	23
Şekil 3.6. Kit ile gelen işaretli kontrol DNA’sı ve Kit kullanılarak işaretlenen ZYMV-CP probunun X-Ray filmindeki görüntüsü.....	26
Şekil 3.7. Kaynak (CSK) ve gen aktarılmış T2 (CST) generasyonu bitkilerden izole edilen genomik DNA’nın konsantrasyon jeli.....	27
Şekil 3.8. Crimson Sweet’te monoik çiçek oluşumu.....	29
Şekil 3.9. Zerzuri’de andromonoik çiçek oluşumu	29
Şekil 3.10. Kotiledon şekli.....	30
Şekil 3.11. <i>Citrullus lanatus</i> ’ta yaprak ayası şekli.....	31
Şekil 3.12. <i>Citrullus lanatus</i> ’ta meyve şekli.....	33

Şekil 3.13.	<i>Citrullus lanatus</i> 'ta meyve kabuk kalınlığı.....	35
Şekil 3.14.	Minolta Renk Ölçer cihazının renk skalası.....	37
Şekil 4.1.	Crimson Sweet Kaynak (CSK) çeşidinde ZYMV-CP geninin bulunmadığını gösteren PCR ürününe ait jel görüntüsü (54: pozitif karpuz hattı DNA'sı, PLAZ: Plazmit DNA'sı).....	40
Şekil 4.2.	Gen aktarılmış Crimson Sweet hattının T1 bitkilerinde (CST) ZYMV-CP geninin PCR ile çoğaltılmasına ait jel görüntüsü (54: pozitif karpuz hattı DNA'sı, PLAZ: Plazmit DNA'sı, ZER. KONT: Zerezuri kontrol DNA'sı).....	41
Şekil 4.3.	Gen aktarılmış Crimson Sweet hattının T2 (CST) bitkilerinde ZYMV-CP genin PCR ile çoğaltılmasına ait jel görüntüsü (54: pozitif karpuz hattı DNA'sı, PLAZ: Plazmit DNA'sı ve CST 81 ile CTS 79 negatif, diğerleri pozitif).....	41
Şekil 4.4.	Kaynak (CSK) ve gen aktarılmış T2 (CST) generasyonu bitkilerinden elde edilen genomik DNA'nın <i>XbaI</i> ve <i>BclI</i> enzimleriyle kesildikten sonra %1'lik agaroz jelindeki görüntüsü.....	42
Şekil 4.5.	Kaynak (CSK) ve gen aktarılmış T2 (CST) bitki DNA'sı ile yapılan Southern blot testinin X-Ray filmindeki görüntüsü.....	43

1. GİRİŞ

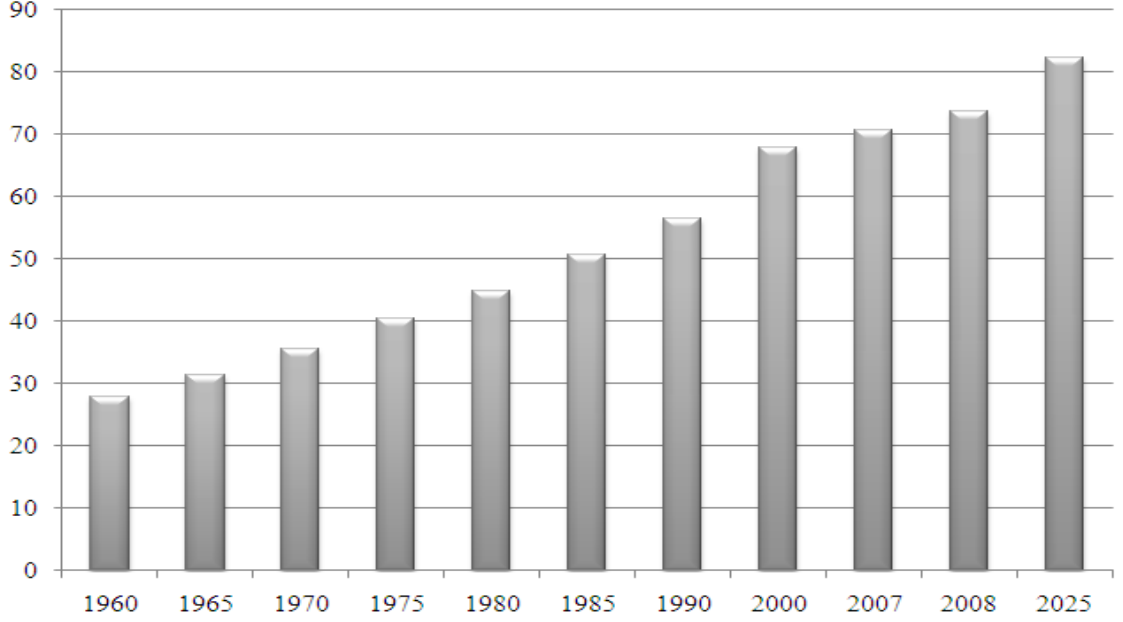
İnsanoğlu, nüfusun artışına paralel olarak beslenebilmek için geçmişten günümüze kadar farklı teknolojileri kullanmıştır. Avcı-toplayıcı kültürde 1 km² 1 insanı besleyebiliyorken, günümüzde 1000 kişiyi besleyebilmektedir (Trewavas (2008)'ın bildirdiğine göre Smil (2000)).

Yoğun tarımsal faaliyetlerin dikkatsizce gerçekleştirilmesi çevre üzerinde olumsuz etkiler yaratmış olmakla birlikte; tarımda kimyasal ilaç, ıslah edilmiş yeni çeşit, gübre, sulama, mekanizasyon vb. uygulama ve tekniklerin kullanılması demek olan yeşil devrim sayesinde, 1950'li yıllardan 1985'li yıllara kadar üretim ve verim bütün yetiştiricilik alanlarında artmıştır (Çetiner, 2004). Türkiye'de sebze üretim değerleri incelendiğinde, 1988 yılından 1998 yılına kadar %39'luk artış sağlandığını, ancak 1998 yılından 2008 yılına kadar %16'luk artışın gerçekleştiğini, dolayısıyla da üretimdeki artışın azalma eğiliminde olduğunu görmekteyiz (FAO, 2010). Türkiye'de sebze üretim değerleri Şekil 1.1'de sunulmuştur.



Şekil 1.1. Türkiye'de yıllara göre sebze üretim değerleri (milyon ton) (FAO, 2010)

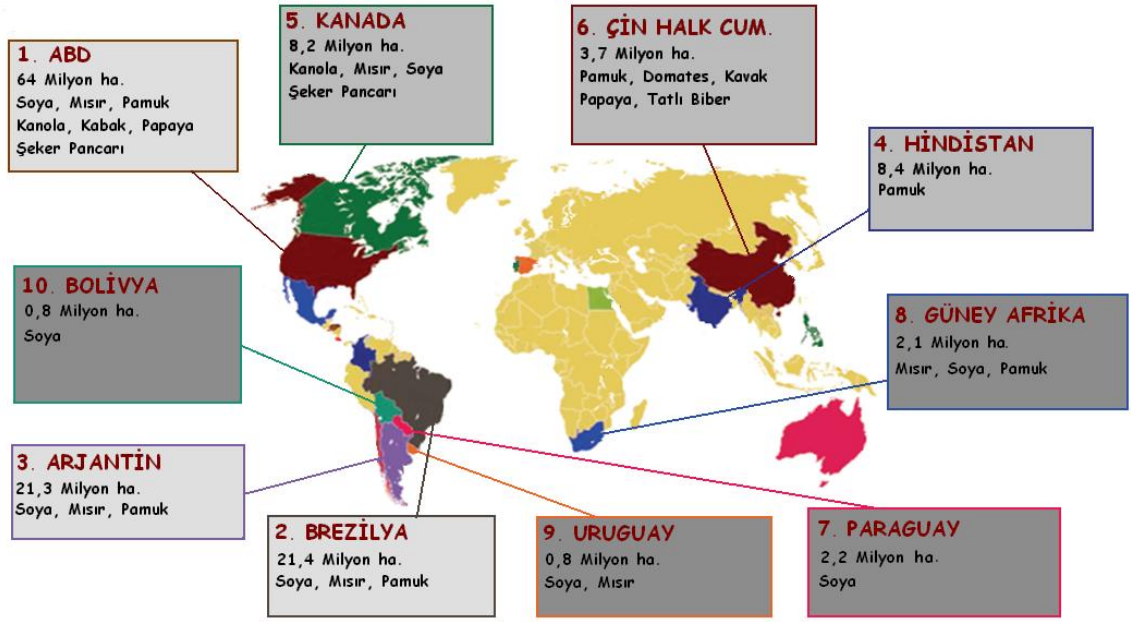
Türkiye nüfusu 1960 yılında 27.7 milyon iken, 2008 yılında 73.5 milyona ulaşmıştır. Bu artışın devam edeceği ve 2025 yılında, bu oranın 80 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Türkiye nüfusunun (milyon) yıllara göre değişimi (sadece 2025 yılı nüfusu tahminidir) (TUİK, 2010; Anonim, 2010)

Yukarıda verilen değerler incelendiğinde, Türkiye’de 2008 yılı itibariyle kişi başına üretilen sebze miktarının 340 kg civarında olduğu görülecektir. Dünyada kişi başına üretilen sebze miktarının ise yaklaşık 132 kg olduğu bilinmektedir (FAO, 2010). Sağlıklı bir insanın günde 0.5-1 kg civarında sebze tüketmesi gerektiği (Günay, 2005) göz önünde bulundurulursa, günümüzde sebze üretiminin Türkiye’de yeterli ancak dünyada yetersiz olduğu görülmektedir. Dünyada ve Türkiye’de nüfus artışının devam edeceği, ancak tarımsal üretimin nüfus artışına paralel olarak artmayacağı tahmin edildiğinden, gelecekte gıda sıkıntısının yaşanabileceği gözardı edilmemelidir. Yeşil devrimin etkisiyle 1960-2000 yılları arasında sebze üretim değerlerinde gözlenen yaklaşık 4 katlık yükselişe rağmen (FAO, 2010), dünya nüfusunun hızla artışına karşılık üretimin son 10 yılda yeterli ölçüde artmaması, klasik bitki ıslahında var olan dar boğazları aşmak amacıyla bitki biyoteknolojisinden yararlanmanın gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisi, tüm dünyada özellikle gelişmiş ülkelerde, tarımsal ürünlerin geliştirilmesinde gün geçtikçe artan bir hızla kullanılmaktadır. Dünyada transgenik bitki yetiştiriciliğinde ABD (64 milyon hektar alanla soya, mısır, pamuk, kanola, kabak, vb.), Brezilya (21.4 milyon hektar alanla soya, mısır, pamuk), Arjantin (21.3 milyon hektar alanla soya, mısır, pamuk), Hindistan (8.4 milyon hektar alanla pamuk), Kanada (8.2 milyon hektar alanla kanola, mısır, soya, şeker pancarı) ve Çin (3.7 milyon hektar alanla pamuk, domates vb.) başı çeken ülkelerdir (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. 2009 yılı itibariyle dünyada transgenik bitki üretiminde öne çıkan ülkeler (James, 2009)

Transgenik soyanın üretimi, 90 milyon hektarlık toplam soya ekim alanı içinde %75'lik bir pay alırken, transgenik pamuk üretimi toplam 33 milyon hektarlık ekim alanı içerisinde %50'lik bir paya sahiptir. Transgenik mısırın payı, 158 milyon hektarlık toplam ekim alanı içerisinde %33'lük bir pay alırken, transgenik kanola toplam 31 milyon hektarlık ekim alanı içerisinde %20'lik bir paya ulaşmıştır (James, 2009).

Ülkemizde 26 Mart 2010 tarihli resmi gazetede yayınlanan Biyogüvenlik Yasasına (5977) göre Türkiye'de transgenik bitki yetiştiriciliğinin yapılmasının mümkün olmadığı, ancak ithalatının izne bağlı olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte yurt dışından ithal edilen işlenmiş ürünlerde, rekombinant DNA teknolojisi ile

aktarılmış genler bulunduğu belirtilmektedir (Ertuğrul, 2008). Yani transgenik bitkiler ülkemiz için çok uzakta yer alan bir olay değildir. Birçok kurumda tarımsal biyoteknoloji ile ilgili çalışmalar yapılmakla birlikte, henüz transgenik çeşit geliştirme aşamasına gelinememiştir. Bu nedenle, Türkiye transgenik çeşit geliştiren değil, bu çeşitleri kullanma potansiyeli olan ülke konumunda görünmektedir (Özgen ve ark., 2005). Sonuç olarak, modern biyoteknolojinin sağladığı imkânlardan yararlanamadığımız ve kendi genotiplerimizi üretmediğimiz durumda, yabancı ülkelerin ürünlerini pazarladıkları bir ülke olmayı kabullenmekten başka seçenek kalmayacaktır. Bu nedenle; gen aktarım teknolojisini geliştirmek, her türlü risk analizlerini ve değerlendirmelerini yapabilir niteliğe kavuşmak, öncelik taşıyan konuların başında gelmektedir.

Yazlık bir sebze olan karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai) meyvesi, iştah açıcı, lezzetli, özellikle de yaz aylarında ferahlatıcı bir etkiye sahiptir. Karpuz meyvesinin su içeriği yüksektir. Bu yönü ile karpuz, özellikle çöllerde (Kalahari çölü) ve sıcak iklimlerde (Afrika'da) su kaynağı ve serinletici-ferahlatıcı olarak yüzyıllar boyunca kullanılmaktadır (Robinson ve Deckers-Walters, 1997). Karpuzun, içeriğinde oldukça fazla bulunan likopenin etkili bir antioksidan olmasından dolayı insanda pankreas, prostat ve mide kanseri riskini azalttığı ve deriyi ultraviyole (UV) zararından koruduğu bildirilmektedir (Garster, 1997; Anonymous, 2003; Perkins, 2005). Bütün *Citrullus* türlerinin gen merkezi Afrika'dır. Fakat bazı yabanileri aynı zamanda Hindistan'da da bulunmaktadır (Robinson ve Deckers-Walters, 1997).

Beş yıllık ortalama verilere göre (2002–2006), Türkiye'de karpuz üretiminin yaklaşık %28'i Akdeniz, %25'i Ege ve %18'i ise Güneydoğu Anadolu Bölgesinde gerçekleşmektedir. Türkiye'de karpuz üretiminin yaklaşık %40'ı, kurak olan İç Anadolu ve kısmen kuraklık görülen Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde gerçekleşmektedir (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Türkiye’de 2002-2006 yılları arası karpuz üretim değerlerinin (ton) bölgelere göre dağılımı (TUİK, 2002-2006)

Tarım Bölgeleri	2002	2003	2004	2005	2006	Ortalama
Akdeniz Bölgesi	1.484.313	1.193.060	981.964	1.035.466	1.098.299	1.158.620
Ege Bölgesi	1.100.753	1.093.086	1.007.292	1.043.020	930.007	1.034.831
Güney Doğu Anadolu Bölgesi	766.551	746.038	697.605	706.686	712.691	725.914
Marmara Bölgesi	439.781	378.637	405.552	443.061	388.184	411.043
Kuzey Orta Anadolu Bölgesi	280.675	269.207	258.611	260.063	232.760	260.263
Orta Doğu Anadolu Bölgesi	175.289	212.214	167.290	162.072	142.640	171.901
Karadeniz Bölgesi	154.652	146.747	141.701	139.473	142.912	145.097
Orta Güney Anadolu Bölgesi	136.017	138.952	113.517	117.722	115.232	124.288
Doğu Anadolu Bölgesi	36.969	37.059	51.468	62.437	42.581	46.102
Türkiye	4.575.000	4.215.000	3.825.000	3.970.000	3.805.306	4.078.061

Türkiye, 4 milyon ton civarındaki karpuz üretimiyle dünya üretiminin (88 milyon ton) yaklaşık %4.5’ini oluşturmakta ve dünyada Çin’den sonra ikinci büyük üretici ülke konumundadır (FAO, 2010). Ancak, FAO’nun 1990-95 yılı verilerine (Çizelge 1.2.) göre Türkiye’de ortalama karpuz verimi (2792 kg/da), dünya ortalamasından (1684 kg/da) ve karpuz tarımında söz sahibi olan Çin (1984 kg/da) ve tarımı gelişmiş olan ABD (1807 kg/da) gibi ülkelerden daha yüksek iken, günümüzde daha düşüktür. Türkiye, Çin ve ABD’nin 2001-2006 yılları ortalama verimleri sırasıyla; 2775, 3330 ve 2990 kg/da’dır (Çizelge 1.2.) (FAO, 2010). Başka bir ifadeyle Türkiye, dünyada en fazla karpuz üreten ikinci ülke olmasına rağmen, verim artışı gelişmiş ülkelerde olduğundan daha az olduğu için verim açısından söz konusu ülkelerden geride kalmıştır.

Çizelge 1.2. Dünya karpuz üretim ve verimi açısından söz sahibi olan ülkelerin durumları (FAO, 2010)

Ülkeler	1990–95		2001–2006	
	Üretim (ton)	Verim (kg/da)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
Çin	15.102.887	1.984	59.779.078	3.330
Türkiye	3.541.667	2.792	4.074.218	2.775
ABD	1.514.667	1.807	1.782.700	2.990
İran	1.681.432	1.349	2.308.086	2.115
İspanya	677.100	2.698	714.487	4.334
Dünya	37.253.424	1.684	88.759.728	2.681

Verim düşüklüğünün nedenlerinden birisi, ülkemizde açıkta karpuz yetiştiriciliğinde kullanılan çeşitlerin modern ıslah yöntemleri kullanılarak verim, biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanım açısından yeterince ıslah edilmemiş olmasıdır. Nitekim örtü altı karpuz yetiştiriciliği dışındaki alanlarda kullanılan çeşitlerin önemli bir bölümü hala standart çeşittir. Bu nedenle, biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin ülkemizde ürün kaybına ve verim düşüklüğüne neden olabileceği göz ardı edilmemelidir (Çürük ve Meşe, 2009).

Karpuz üretim miktarı açısından iyi durumda olan ülkemiz, tohum üretiminde ne yazık ki iddialı bir konumda değildir. Özellikle örtü altı karpuz üretiminde kullandığımız çeşitlerin tohumları, büyük oranda yurt dışından döviz ödenerek karşılanmaktadır. Ülkemiz tarımı ve sebzeçiliği için önemli ürünlerin başında gelen karpuzda rekabet gücü yüksek kendi tohumumuzu üretebilmemiz için mevcut çeşitlerimizi, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanım ve ürün kalitesi gibi çeşitli özellikler bakımından ıslah etmemiz, bu amaçla klasik ıslah yöntemleriyle birlikte biyoteknolojik yöntemlerden yararlanmamız gerekmektedir (Çürük ve Meşe, 2009).

Bitki virüs hastalıkları, biyotik stres faktörleri içerisinde yer alan ve önemli düzeyde ürün kayıplarına neden olan hastalıklardandır. Bitki virüs hastalıkları diğer hastalık etmenlerinden farklı olarak kimyasal mücadelesi olmamaları nedeni ile kabakgil yetiştiriciliğini tehdit eden en önemli problemlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalık etmenleri bitkilerin normal gelişme düzenini bozmakta,

anormal meyve oluşumuna neden olarak pazarlanabilir ürün miktarını düşürmekte veya meyve oluşumunu tamamen engelleyerek ekonomik anlamda büyük kayıplar meydana getirmektedir (Çalışkan, 2007).

Virüs hastalıkları içerisinde Hıyar mozayik virüsü (*Cucumber mosaic virus: CMV*) ve Kabak sarı mozayik virüsü (*Zucchini yellow mosaic virus: ZYMV*) kabakgil yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda ürün kayıplarına yol açan en önemli virüslerdir (Karamanlı, 2007). ZYMV, yapraklarda belirli mozayikler oluşturan, yaprak kenarlarının dişli bir yapı almasına neden olan, yaprakta kloklar, sararma, deformasyonlar, damar açılmaları, boğum aralarının kısalması ile çeşide ve patotiplere göre öldürücü semptomlara da neden olabilen bir virüs olup yaprak biti (*Aphis gossypii* ve *Myzus persicae*) ile taşınmaktadır (Karamanlı, 2007). Kabak sarı mozayik virüsünün karpuz ve kabakta meydana getirdiği semptomlar Şekil 1.4 ve Şekil 1.5’de sunulmuştur.



Şekil 1.4. ZYMV ile bulaşık karpuz bitkisi yaprağında oluşan kloklar, deformasyon ve kabarcıklar



Şekil 1.5. ZYMV inokule edilmiş kabak bitkisi yapraklarında oluşan klokklar, deformasyon ve iplikçikleşme

Günümüzde birçok yeni çeşit geliştirilmiş olmasına rağmen, hastalık ve zararlılara dayanıklılığın oluşturulması konusunda çalışmaların devam etmesi gerekmektedir. Bitkilerde hastalık ve zararlılara karşı dirençliliği sağlamak, tarımsal üretim maliyetlerini azaltmak, ürün kalitesini yükseltmek (elde edilecek ürünün görünüşü, besin değeri, işleme veya muhafazaya ilişkin özelliklerini iyileştirmek) amacıyla genetiği değiştirilmiş bitkiler geliştirilmektedir (Eldoğan, 2008). Virüslere dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde izlenen yol, bakteri ve funguslara karşı dayanıklılıkta izlenen yoldan oldukça farklıdır. Virüs kılıf proteinlerini şifreleyen genler saptanıp gerekli konstraksiyon işlemlerinden sonra bitkilere aktarıldığında, yeterli çapraz korunmanın sağlandığı görülmüştür (Powel-Abel ve ark., 1986).

Dünyada ve ülkemizde akademik olmayan tartışmalar sonucu, transgenik ürünlerin kullanımına karşı tüketicilerde bir takım endişeler oluşmuştur. Avrupa Birliği ülkelerinde 400 kamu araştırma enstitüsünün katıldığı, 70 milyon euronun harcandığı ve 15 yıl (1985-2000) boyunca süren çalışmalar sonunda "...şu ana kadar geliştirilen gen aktarılmış bitkilerden elde edilen ürünlerin çevre ve insan sağlığı açısından risk taşımadığı... hatta bu bitki ve ürünlerin geleneksel yöntemlerle elde edilen bitki ve ürünlerden daha güvenli olduğu..." bildirilmektedir (EC, 2001; Romessar ve ark., 2007). İnsan sağlığı ve toksisitesi hakkında ve de potansiyel yan etkileri konusunda

1990-2006 yılları arasında Medline veri tabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>) yer alan bilimsel dergiler (hakemli) taranmış ve toplam 29 adet yayına ulaşılmıştır. Genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin çeşitli hayvan türleri için besin olarak kullanılması ile ilgili yapılan araştırmalarda, söz konusu deney hayvanlarının sağlığı üzerine ciddi etkiler belirlenmediği bildirilmektedir (Domingo, 2007). Diğer yandan, genetiği değiştirilmiş bitkilerin biyogüvenliği ile ilgili endişeler, söz konusu transgenik bitkiler ile geleneksel yolla elde edilen çeşitlerin (kaynak veya diğer çeşitler) içerikleri, performansları (açıkta ve sera koşullarında) ve gen profili açısından karşılaştırılmaları konusundaki araştırmaların daha ayrıntılı bir şekilde gerçekleştirilmesine neden olmuştur (Shewry ve ark., 2007; Batista ve ark., 2008).

Bu araştırmada, Çürük ve ark. (2007) tarafından ZYMV-CP (Kabak sarı mozayik virüsü kılıf protein) geni aktararak elde edilen Crimson Sweet karpuz çeşidine ait 61 nolu genotipin T1 veya T2 generasyon (CST) bitkileri ile gen aktarılmamış aynı çeşidin (CSK) bitkileri, ZYMV bulaştırılmadan, bazı fenolojik, morfolojik, büyüme, kalite ve verim özellikleri açısından kıyaslanmıştır. Ayrıca kurulan ikinci bir çalışmayla, ZYMV-CP genini taşıyan ve taşımayan bitkilere yapay inokulasyonla ZYMV bulaştırmak suretiyle, bazı kalite ve verim özellikleri incelenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Virüslerin Kabakgillerde Oluşturduğu Zararlar ve Çapraz Koruma

Fuchs ve Gonsalves (1995)'in yaptıkları çalışmaya göre; ZYMV, kabak bitkisinde ortalama meyve ağırlığını %27.2 azaltmaktadır.

Summers ve ark. (1995) ile Clought ve Hamm (1995), ZYMV ile mücadele etmek için, vektörlere karşı kimyasal mücadele uygulanmasının, arazinin malç veya plastik örtülerle kaplanması şeklindeki uygulamaların ve transgenik bitki hatları kullanılmasının, enfeksiyonu belirli oranlarda azaltabildiğini ve bir miktar pazarlanabilir kalitede meyve üretildiğini bildirmişlerdir.

Yardımcı ve ark. (2004), Isparta ilinde kabakgil tarlalarında ZYMV hastalığının simptomlarını gösteren yaprak ve meyve örneklerini toplamışlar ve mekanik inokulasyon yöntemi ile test bitkilerine aşlamışlardır. Kabak bitkileri üzerinde sistemik simptomlar gözlenmiş ve bu bitkilerden double-stranded RNA (dsRNA)'lar, CF-11 selüloz kromatografi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Aynı araştırmacılar, ZYMV'nin hastalık oranını, Isparta'da gezdikleri 20 kabakgil tarlasında hastalık simptome gösteren bitkiler üzerinden hesaplamışlar ve kabakgil tarlalarında %62.70 oranında, ZYMV enfeksiyonu saptamışlardır.

Biyotik ve abiyotik çevresel stres faktörleri, bitkilerin potansiyel verimini %70 oranında düşürebilmektedir (Agarwal ve ark., 2006).

Değirmenci ve Güldür (2006)'ün yaptıkları bir çalışmada, Kabak sarı mozayik virüsünün zayıf ırkını (ZYMV-WK), şiddetli ırkının hıyar bitkisinde oluşturacağı zarara karşı çapraz koruma elde etmek amacıyla sera şartlarında denemişlerdir. Denemede kullanılan ZYMV-WK İsrail (Viroloji Bölümü, Volcani Center)'den getirilmiştir. Sera koşullarında yetiştirilen bitkiler ZYMV-WK ile mekanik olarak inokule edilmiş, sonra seradaki parsellere şaşırtılmıştır. Yapılan uygulamadan 20 gün sonra ZYMV-WK üzerine yaprak bitleri ile ZYMV infekte edilmiştir. Sera çalışması; a) ZYMV-WK inokule edilen uygulama, b) ZYMV-WK üzerine ZYMV inokule edilen uygulama, c) sadece ZYMV inokule edilen uygulama, d) kontrol bitkilerinin olduğu uygulama olarak planlanmıştır. Çapraz koruma yönteminin toplam verim, pazarlanabilir verim ve virüs

hastalıkları simptomları üzerine etkileri araştırılmıştır. Çapraz korumanın uygulandığı parsellerde simptom şiddeti 0-5 arasında yoğunlaşırken, uygulamanın yapılmadığı parsellerde 4-9 arasında yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Çapraz koruma, pazarlanabilir üründe 5 katlık bir artışa sebep olurken, ZYMV-WK'nın herhangi bir ürün azalmasına neden olmadığı belirlenmiştir.

Katis ve ark. (2006) laboratuvar koşullarında yaptıkları çalışmada, kabak bitkilerine ZYMV taşıyabilme yeteneğinde olan 19 tür yaprak biti kullanmışlar ve bunlardan 16 türü ZYMV'nin yeni vektörü olarak saptamışlardır (*Aphis craccae*, *Aphis fabae*, *Aphis nerii*, *Aulacorthum solani*, *Brachycaudus cardui*, *Brevicoryne brassicae*, *Hyalopterus pruni complex*, *Hyperomyzus lactucae*, *Macrosiphoniella sanborni*, *Macrosiphum rosae*, *Metopolophium dirhodum*, *Myzus cerasi*, *Rhopalosiphum maidis*, *R. padi*, *Semiaphis dauci* ve *Sipha maydis*). Bu virüsün taşınmasında bir yaprak biti bireyi bile etkilidir, fakat genelde taşınma oranı düşüktür (%0.1-4.2). Araştırmacıların yaptıkları bu çalışmada, *Myzus persicae* kontrol olarak kullanılmış ve bu virüsün en etkili vektörü olduğu belirlenmiştir (bitki başına bir yaprak biti, %41.1). *Hayhurstia atriplicis*, *Myzus ascalonicus* ve *Sitobion avenae* türleri ise, bu virüsü taşımamıştır. Altı yeni vektör dışında dördü açık alanda testlenmiş ve etkilerinden daha yüksek eğilimde bulunmuşlardır. Kuzey Yunanistan'daki kabak yetiştirilen alanlarda yapılan deneme sonuçları, vektör türleri ile ZYMV'nin yayılımı arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. İki yıllık deneme boyunca *M. persicae*, *A. gossypii* ve *A. spiraecola* en etkili yaprak biti vektörleri olmuştur. ZYMV epidemiyolojisinde daha önceden bilinen türler ile yeni 16 tür yaprak biti vektörlerinin kombinasyonlarının taşınmada etkili olduğu saptanmıştır.

Biyotik stres faktörleri içerisinde bitki virüs hastalıkları, diğer hastalık etmenlerinden farklı olarak kimyasal mücadeleleri olmaması nedeniyle kabakgil yetiştiriciliğini tehdit eden en önemli problemlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalık etmenleri bitkilerin normal gelişme düzenini bozmakta, anormal meyve oluşumuna neden olarak pazarlanabilir ürün miktarını düşürmekte veya meyve oluşumunu tamamen engelleyerek ekonomik anlamda büyük kayıplar meydana getirmektedirler (Çalışkan, 2007).

2.2. Gen Aktarma Çalışmaları

Sebzeler, insan sağlığı ve beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Yetiştirilen sebzeler, pek çok gelişmekte olan ülkelerin tarımsal ekonomisinin ayrılmaz bir parçasıdır. Biyotik ve abiyotik faktörler, bitkisel ürün verimliliğini ve kalitesini ciddi bir şekilde etkileyerek, çoğu ülkelerin kırsal ekonomilerinin istikrarında gerilemelere neden olmaktadır. Ayrıca, gelişmekte olan ülkelerde düzenli hasat sonrası depolama ve sebze işleme faaliyetlerinin olmaması nedeniyle, ürün miktarı ve kalitesinde kayıplar meydana gelmektedir. Son kırk yıl içinde geleneksel ıslah; sebze verimi ve kalitesinin artırılması, hasat sonrası kayıpların azaltılması, biyotik ve abiyotik stres direncinin yükseltilmesi açısından önemli katkılarda bulunmuştur (Dalal ve ark., 2006). Ancak, klasik ıslahta bulunan birçok dar boğaz nedeniyle, klasik ıslahın dünya nüfusunda meydana gelecek artışın ihtiyaç duyduğu üretim artışını karşılamaktan uzak olduğu görülmektedir. Klasik ıslahta üretim artışını sınırlayan darboğazlar, ancak modern biyoteknolojideki gelişmelerle aşılabilir. Tarımsal biyoteknoloji kullanılarak, biyotik stres faktörlerine dayanıklılık, kalite ve depo ömrü gibi birçok özellik başarıyla bitkilere aktarılmış ve bunların bazıları da ticarileşmiştir. Her ne kadar transgenik sebzelerin ticarileşmesi yavaş olsa da, insan beslenmesi (Fe ve Zn başta olmak üzere besin değerinin artırılması) ve eczacılıkla ilgili özelliklerin sebzelere aktarılmasıyla oluşacak ürünlerin (yenilebilir aşular, enzim üretimi vb) tarıma önemli değerler katacağı beklenmektedir (Dalal ve ark., 2006).

Çürük ve ark. (2007) tarafından yürütülen bir projede, Crimson Sweet çeşidi ve Zerzuri karpuz populasyonuna ZYMV-CP geni aktarılacak amacıyla, NPT II işaret geni ile ZYMV-CP genine sahip pCIB10 plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA 105 suşu kullanılmıştır. Ancak, insan sağlığına olumsuz bir etkisi saptanmamış olmasına rağmen, antibiyotiğe dayanıklılık sağlayan işaret gen/genlerini taşıyan transgenik bitkilerin ve ürünlerin kullanılmasına karşı Avrupa Birliği ülkelerinde tüketicilerin bu konuya daha temkinli yaklaşımları nedeniyle, NPT II işaret geni yerine Bar işaret geni ile ZYMV-CP genini taşıyan yeni bir plazmit oluşturulmuştur. Bu amaçla; ZYMV-CP geni pCIB10 plazmidinden PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılmış ve aynı zamanda spesifik primerler düzenlenerek söz konusu genin bir ucuna *Xba*I ve diğer ucuna da *Sac*I enzimleri için kesim yeri eklenmiştir. Plazmit, *Xba*I

ve *SacI* ile kesildikten sonra jelden izole edilmiştir. Daha sonra çoğaltılan ZYMV-CP geniyle *XbaI* ve *SacI* ile kesilen plazmit birleştirilmiştir. Oluşan yeni plazmit, *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılmıştır. Bar işaret geni ile ZYMV-CP genini taşıyan bu plazmit karpuz çeşitlerimizin transformasyonunda kullanılmıştır.

ABD'de CMV, ZYMV ve Karpuz mozayik virüsü (*Watermelon mosaic virus: WMV*)'ne dayanıklı genetiği değiştirilmiş yaz kabağı hatlarından ZW-20 ve CZW-3, başarıyla geliştirilip elde edilmişlerdir. ZW-20 genetiği değiştirilmiş kabak hattı, ZYMV ve WMV'nin kılıf protein genlerini içermekte ve bu iki virüse karşı direnç göstermektedir. CZW-3 genetiği değiştirilmiş kabak hattı ise CMV, ZYMV ve WMV'nin kılıf protein genlerini içermekte ve bu üç virüse karşı direnç göstermektedir. Elde edilen CZW-3 kabak çeşidi 10 yıldan fazla bir sürede ticari sürümü belli bir istikrar içerisinde devam etmiştir. Ayrıca bu kabakların dayanıklılığı konusunda da bir problem yaşanmamıştır. Virüse dayanıklı genetiği değiştirilmiş yaz kabağı çeşitleri yetiştiriciler tarafından benimsenmiş, dolayısıyla iyi bir ticarileşme oranına sahip olmuştur (Fuchs ve Gonsalves, 2007). ABD'de 2006 yılında yetiştirilen transgenik yazlık kabaklar, yetiştirilen toplam yazlık kabakların %13'ünü (31 bin dekar) oluşturmaktadır (Johnson ve ark., 2007).

2.3. Gen Aktarılmış Bitkiler İle Kaynak Çeşitlerin Karşılaştırılması

ZYMV, CMV ve WMV'ye dayanıklılık genleri aktarılan kavun bitkileri ile gen aktarılmamış kavun bitkileri, açıkta bazı özellikler bakımından karşılaştırılmıştır. Her üç virüsün bulunduğu ortamda, transgenik bitkilere kıyasla gen aktarılmamış bitkilerde sürgün uzunluğunda %44 azalma ve verimde %62 oranında kayıp meydana geldiği bildirilmiştir (Fuchs ve ark., 1997).

Accotto ve ark. (2005)'nin domates bitkisinde yaptıkları bir çalışmada, Domates benekli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus: TSWV*) direnç geni aktararak elde edilen domates bitkisi ile transgenik olmayan kaynak domates bitkileri, TSWV ile inokule edilmiş ve iki ayrı yerde tarla koşullarında test edilmiştir. Transgenik olmayan kaynak bitkilerinin meyve üretiminde %33-50 oranında gözle görülebilir şiddette bir azalmayla infekte oldukları bildirilmiştir.

Genetiği değiştirilmiş ürünlerin güvenilirliği konusundaki kaygılardan dolayı, genetiği değiştirilmiş buğday ve geleneksel ışlahla yetiştirilen buğday genotiplerinin, bütün ayrıntılarıyla kompozisyon ve performanslarının karşılaştırılması amacıyla arazi ve sera koşullarında çalışmalar yapılmıştır. Transgenik ve kontrol hatları farklı alanlarda ve yıllarda yetiştirildiğinde, dane fonksiyonel özelliği ve agronomik performansında benzer özellik gösterdiği saptanmıştır. Transgenik ve kontrol hatlarının dane gelişimindeki gen ekspresyon profilinin ebeveyn hattına benzerliği, geleneksel bitki ışlahıyla üretilen hatların ebeveyn hatlarına benzerliğinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çeşitli şartlar altında yetiştirilen transgenik hatların metabolik faaliyetleri ile aynı çeşidin kontrol hatlarının metabolik faaliyetlerinde gözlemlenen varyasyon aralığının benzer olduğu saptanmıştır. Buğdayda yapılan bu çalışma, geleneksel yetiştirilen buğday çeşitlerine eşdeğer genetiği değiştirilmiş buğday hatlarının geliştirilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu bilginin, genetiği değiştirilmiş ürünlerin gelecekteki kullanımını üzerine önemli katkı sağlayacağı belirtilmiştir (Shewry ve ark., 2007).

Batista ve ark. (2008)'nın genetik yapısı değiştirilmiş bitkiler ile mutasyonla ışlah edilmiş bitkilerin farklarını belirlemek amacıyla, transgenik pirinç ile mutasyon ışlahıyla elde edilen pirinci incelemişlerdir. Pirinçte 4 farklı özelliğe sahip genotipin gen havuzunda transkriptomik farklılıklarını belirlemek amacıyla microarray tekniği kullanılmıştır. Kullanılan genotipler; 1) Radyasyona uğratılmış stabil mutant hat ve kontrolü, 2) radyasyona uğratılmış genotipin M1 generasyonu ve kontrolü, 3) anti kanser antikoru oluşturulan bir gen aktarılmasıyla elde edilen stabil transgenik bitkiler ve kontrolü ve 4) abiyotik strese karşı geliştirilmiş T1 generasyonu ve kontrolü olan bitkilerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda, her iki yöntemle (gen aktarma ve mutasyon) elde edilen çeşitlerde hedef olmayan gen ekspresyonu gerçekte bitkilerde stres meydana geldiği belirtilmiştir. Ayrıca mutasyonla elde edilen bitkilerde transgenik bitkilere göre daha yoğun transkriptomik değişmeler gözlendiği bildirilmiştir. Bu çalışma, mutasyonla elde edilen çeşitlerin genetiğinin, gen aktarma ile elde edilen çeşitlerin genetiğinden daha fazla değiştiğini göstermektedir.

ZYMV'ye karşı dayanıklı transgenik Kırkağaç 637 kavun çeşidinin ve kontrol bitkilerinin tel sera koşulları içerisinde gen kaçışları ve meyve kalite özellikleri incelenmiştir (Yalçın-Mendi ve ark., 2009). İstatistik analizler sonucunda, transgenik ve

transgenik x kontrol melezlemesi sonucu elde edilen meyvelerdeki kabuk kalınlığı, çekirdek evi yüksekliği, çekirdek evi çapı, suda çözünebilir kuru madde, mühür çapı ve meyve sapının boyu bakımından fark bulunmadığı tespit edilirken; meyve ağırlığı, meyve çapı, meyve yüksekliği, meyve eti kalınlığı, meyve sapının çapı açısından ise fark bulunmuştur. Sonuç olarak, melez genotipe ait meyvelerin, transgenik genotiplerin meyvelerine (T4 ve T20) göre meyve ağırlığı, meyve çapı, meyve yüksekliği, meyve eti kalınlığı ve meyve sapı çapı bakımından daha yüksek değerler aldığı belirlenmiştir. Transgenik (T4 ve T20), kontrol ve melez (transgenik × kontrol) genotiplerde L-askorbik asit, malik asit, sitrik asit, sakkaroz, glikoz ve fruktoz açısından istatistiki olarak fark bulunmazken, toplam asitlik bakımından farklılıklar tespit edilmiştir. Denemede öngörülen aroma bileşikleri analizleri sonucunda esterler, alkoller ve laktonlar saptanmış olup, uygulamalar arasında fark bulunmamıştır. Araştırma sonucunda, tel sera koşullarında transgenik bitkilerden yaklaşık 10 m uzaklıkta bulunan kontrol bitkilerinde %100 gen kaçıışı görülürken; 12.5, 15 ve 17.5 m uzaklıktaki bitkilerde ise %70 oranında gen kaçıışı belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma, Mustafa Kemal Üniversitesi (MKÜ), Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümüne ait ısıtmalı ve böcek girişi kontrol altında olan cam sera ve laboratuvarlarında yürütülmüştür. Cam seranın tipi wide span cam sera olup, 100 m²'lik bir alana sahiptir. Tabanı betondur. Bitkiler saksılarda bitki yetiştirme masalarının üzerinde yetiştirilmiştir. Seranın oluk altı yüksekliği 4 metredir. Aktif havalandırması iki adet egzoz fanı ile sağlanmaktadır. Serada çatı havalandırması, 2x10 metre ebatlarında iki taraflı havalandırma açıklığıyla sağlanmaktadır. Sera üst havalandırması 50 mesh'lik tül ile kapalıdır. Sera içi ısıtma elektrik yardımıyla kaloriferle yapılmaktadır. Sera, ışığı %46 oranında engelleyen ısı-ışık perdesine sahiptir. Yaz aylarında sera içi sıcaklığını düşürmek amacıyla bu perde kullanılmıştır.

3.1. Materyal

Denemede bitkisel materyal olarak Crimson Sweet (Bursa tohumculuk A.Ş., Şekil 3.1.) çeşidi ile bu çeşide ZYMV-CP geni aktarılmasıyla elde edilen 61 nolu hattın T1 ve T2 generasyon tohumları kullanılmıştır. Gen aktarılmış ve aktarılmamış bitkilerin ZYMV'ye karşı tepkilerini belirlemek için yürütülen ikinci çalışmada ise, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU'dan temin edilen ZYMV izolatu kullanılmıştır.

3.1.1. 'Crimson Sweet'

Crimson Sweet çeşidi, 1963 yılında Kansas Devlet Üniversitesi tarafından (Miles x Peacock) x Charleston Gray melezlemeleriyle geliştirilen, antraknoz (anthracnose) ve fusarium solgunluğuna dayanıklı standart bir çeşit olup, günümüzde dünyanın birçok yerinde yetiştirilmektedir (Şekil 3.1.). Çeşidin meyve dış rengi açık yeşil üzerine koyu yeşil şeritli (pijamalı), meyve eti tekstürü iyi, şeker içeriği yüksek, yola dayanımı çok iyi ve tohumları küçük olup koyu renklidir (Anonymous, 2010). Meyve eti koyu pembe renkli ve tatlıdır. Çukurova koşullarında sera, yüksek plastik

tünel, alçak plastik tünel ve açık arazi koşullarında yetiştirildiklerinde meyve ağırlığı 3.2-6 kg arasında değişmiştir (Onsinejad, 1993).



Şekil 3.1. Crimson Sweet karpuz çeşidi meyvesinin dış görünümü

3.2. Yöntem

Bitkilerin ZYMV ile bulaşması önlenmek suretiyle, ZYMV-CP geni aktarılmış (T1 ve T2 generasyonları) ve aktarılmamış Crimson Sweet genotiplerinin bazı özellikler bakımından karşılaştırılması amacıyla, 10 Ocak 2009 ve 18 Temmuz 2009 tarihlerinde iki deneme kurularak yürütülmüştür. Bu amaçla, 10 Ocak 2009 tarihinde kurulan ilk denemede T1 generasyonu ile kaynak çeşit kullanılmıştır. Bu denemenin belirli bir aşamasından sonra gübrelemenin yapıldığı gün serada elektriğin kesilmesiyle birlikte, aktif havalandırma fanlarının çalışmaması nedeniyle sera içi sıcaklığı yükselmiş ve bitkiler zarar görmüştür. Bitkiler belirtilen şekilde zarar görene kadar; kotiledonda beneklenme, yaprak ayasında kabarcıklık, yaprak ayasında beneklilik, hipokotil uzunluğu, kotiledon şekli, kotiledon genişliği, kotiledon uzunluğu, gövde kalınlığı, gövde boğum sayısı, kol sayısı, gövde uzunluğu, yaprak ayasında ikincil loblanma derecesi, yaprak ayası uzunluğu, yaprak ayası genişliği, yaprak alanı, yaprak sapı

uzunluğu, ilk erkek çiçeğin oluşum süresi, ilk erkek çiçeğin oluştuğu boğum sayısı, ilk dişi çiçeğin oluşum süresi, ilk dişi çiçeğin oluştuğu boğum sayısı, dişi çiçek taç yaprak yüksekliği, dişi çiçeğin taç yaprağının uç şekli, erkek çiçek taç yaprak genişliği, çiçek tozu canlılığı, çiçek tozu çimlenme oranı, yumurtalık uzunluğu, yumurtalık genişliği, yumurtalıkta tüylülük, kök yaş ağırlığı, yaprak yaş ağırlığı, yaprak hariç sürgün yaş ağırlığı, kök kuru ağırlığı, yaprak kuru ağırlığı, yaprak hariç sürgün kuru ağırlığı, toplam bitki kuru ağırlığı ve toplam bitki yaş ağırlığı gözlem ve ölçümleri sağlıklı bir şekilde yapılmış ve veriler kaydedilmiştir. Birinci denemede yaşanan aksaklık nedeniyle 18 Temmuz 2009 tarihinde T2 generasyonu ve kaynak çeşit kullanılarak deneme tekrar kurulmuş ve yürütülmüştür. Tekrar edilen bu denemede (ikinci) hedeflenen gözlem ve analizlerin tamamı gerçekleştirilmiştir.

ZYMV-CP geni aktarılmış ve aktarılmamış Crimson Sweet bitkilerinin ZYMV ile inokule edilerek kıyaslanması amacıyla kurulan denemeler de 10 Ocak 2009 ve 18 Temmuz 2009 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir. Birinci dönem denemesindeki bitkilerin sıcaklığın yükselmesiyle beraber gübreden zarar görmesi nedeniyle sadece ikinci dönem kurulan denemede belirtilen gözlem ve analizlerin tamamı yapılmıştır.

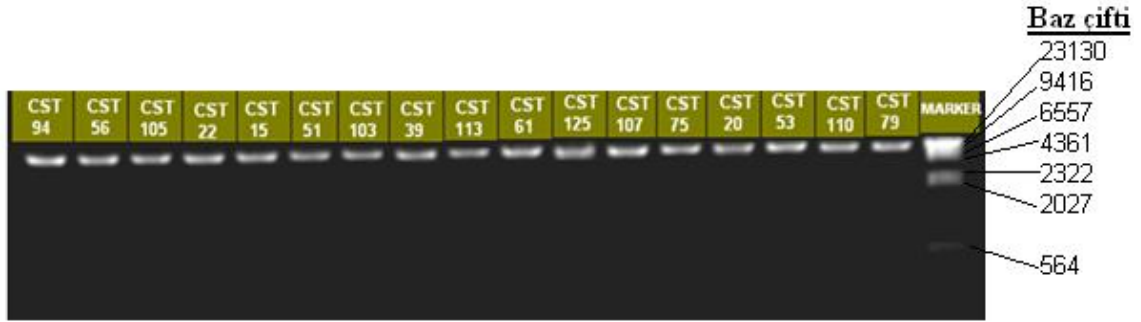
3.2.1. ZYMV-CP Geni Aktarılmış ve Kaynak Genotip Tohumlarının Ekilmesi ve Elde Edilen Bitkilerden DNA İzolasyonu

Kanamycine içeren *in vitro* ortamda büyüeyebilen ve PCR sonucu pozitif olduğu saptanan 61 nolu Crimson Sweet hattının kendilenmesi ile elde edilen T1 ve T1'in kendilenmesi sonucu oluşan T2 generasyon tohumları ile kaynak çeşit tohumları, 2:1 oranında hazırlanan torf ve perlitten oluşan ortamlara, yukarıda belirtilen tarihlerde viyollere ekilmiştir. Elde edilen bitkilerde kotiledon ile ilgili gözlem ve ölçümlerin yapılmasından sonra, kotiledon yapraklarından 100'er mg örnek alınmış, sıvı azotta öğütülmüş ve -86°C'de muhafaza edilmiştir. Kaynak ve gen aktarılmış genotipin yaprak örnekleri, Ek 1'de belirtilen protokole (Gusmini ve Wehner, 2010) göre yapılan DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Elde edilen DNA'ların saflığını ve tahmini konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, %0.8'lik agaroz jel elektroforez, SB (sodyum hidroksit-borik asit) (1X) çözeltisi kullanılmıştır. Crimson Sweet kaynak ve transgenik

bitkilerin tahmini DNA konsantrasyonunu belirlemek için koşulan elektroforez jel görüntüleri Şekil 3.2. ve 3.3' de sunulmuştur.



Şekil 3.2. Kaynak çeşitten izole edilen DNA konsantrasyon jeli örneği (CSK: Crimson Sweet Kaynak)



Şekil 3.3. Gen aktarılmış T2 generasyonu bitkilerinden izole edilen DNA konsantrasyon jeli örneği (CST: Crimson Sweet Transgenik)

3.2.2. ZYMV-CP Genini Almış Transgenik ve Almamış Kaynak Bitkilerin PCR İle Belirlenmesi

Kaynak çeşitte ZYMV-CP geninin bulunmadığı ve gen aktarılmış çeşidin bitkilerinde ZYMV-CP geninin varlığı PCR ile tespit edilmiş ve denemeye alınacak bitkiler seçilmiştir.

3.2.3. Denemelerin Kurulması

PCR sonucu ZYMV-CP pozitif çıkan T1 veya T2 bitkileri ile ZYMV-CP geninin bulunmadığı PCR ile teyit edilen kaynak çeşit bitkileri, 16 litrelik harç (2:1 oranında torf ve perlit) ile dolu saksılara alınarak cam serada yetiştirilmiştir. Bitkiler,

tesadüf parselleri deneme desenine göre sıra arası 1.5 m ve sıra üzeri 0.5 m olacak şekilde yerleştirilmiştir. Saksı toprağı kurumadan bitkiler hortum ile sulanmış ve yetiştirme sezonu boyunca toplam 20 kg/da N, 12 kg/da P₂O₅, 30 kg/da K₂O verilmiştir (Splittstoesser, 1990; Anonim, 2002; Proietti ve ark., 2008). Dikim öncesi fosforun tamamı, azot ve potasyumun 1/3'ü verilmiştir. Azot ve potasyumun 1/3'lük ikinci kısmı üçe bölünmüş ve kol atma döneminden başlayarak 7 gün arayla suda çözüldükten sonra bitkilere verilmiştir. Diğer 1/3'lük kısmı ise meyveler ceviz büyüklüğünü almaya başladığı dönemden itibaren üçe bölünerek 7 gün arayla benzer şekilde uygulanmıştır. Hastalık ve zararlılar konusunda, simptomlar görülmesi halinde gerekli bitki koruma önlemleri alınmıştır. Yetiştirme sezonu boyunca galeri sineği, beyaz sinek, kırmızı örümcek ve külleme görülmüş, önerilen dozlarda ilaçlamaları yapılmıştır. Sera üst havalandırmasının 50 mesh'lik tül ile kapalı olmasına bağlı olarak sera içinde arı faaliyetinin çok düşük olması nedeniyle, meyve oluşumunu sağlamak ve bir sonraki generasyonun tohumlarını elde etmek için kendileme yapılmıştır. Her parselde kendilemede kullanılacak erkek ve dişi çiçekler, kendilemenin bir gün öncesinde diğer parsellerdeki bitkilerin polenleriyle bulaşmayı önlemek amacıyla bir maşa yardımıyla akşam serin saatlerde kapatılmıştır. Ertesi günün erken ve serin saatinde erkek çiçeklerden sulu boya fırçası (Martol, Çin) yardımıyla alınan polenler dişi çiçeklerin stigmalarına dökülerek kendileme yapılmıştır. Kendilenen çiçekler, bulaşmayı önlemek amacıyla bir maşa yardımıyla hemen kapatılmıştır.

Birinci (Ocak) ve ikinci (Temmuz) denemelerde, sera içi maksimum ve minimum sıcaklık değerleri kaydedilmiştir. Birinci deneme döneminde kaydedilen minimum ve maksimum sıcaklık değerlerinin aylık ortalaması, sırasıyla Ocak'ta 15.67°C ve 30.56°C; Şubat'ta 18.24°C ve 30.33°C; Mart'ta 19.48°C ve 32.10°C; Nisan'da 21.33°C ve 37.33°C'dir. İkinci deneme döneminde ise minimum ve maksimum sıcaklık değerlerinin aylık ortalaması sırasıyla Temmuz'da 28.08°C ve 41.08°C; Ağustos'ta 26.84°C ve 38.48°C; Eylül'de 22.61°C ve 35.39°C; Ekim'de 20.03°C ve 35.19°C; Kasım'da 20.00°C ve 27.20°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca, denemelerin yürütüldüğü 2009 yılında kaydedilen bazı meteorolojik değerlerin aylık ortalamaları, Hatay meteoroloji müdürlüğünden temin edilmiş ve Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Denemelerin gerçekleştirildiği 2009 yılına ait bazı meteorolojik değerlerin aylık ortalamaları (Hatay Meteoroloji Müdürlüğü)

Aylar	Ortalama maksimum sıcaklık (°C)	Ortalama minimum sıcaklık (°C)	Ortalama sıcaklık (°C)	Ortalama nem (%)	Ortalama rüzgar hızı (m/s)	Maksimum rüzgar hızı (m/s)	Toplam yağış (mm)
Ocak	11.5	4.0	7.5	69.6	1.4	8.5	165.8
Şubat	14.0	7.5	10.5	78.2	1.4	11.1	272.0
Mart	17.3	8.8	12.8	69.2	2.0	18.5	182.8
Nisan	23.2	11.9	17.1	67.4	2.1	14.0	294.0
Mayıs	26.6	16.1	21.1	63.1	2.8	19.5	51.4
Haziran	31.1	22.0	26.3	62.4	3.5	14.0	0.0
Temmuz	31.9	24.6	27.9	68.5	4.3	15.0	5.3
Ağustos	32.6	24.9	28.4	65.6	3.9	14.0	0.0
Eylül	30.2	20.4	24.8	64.3	2.5	12.9	17.3
Ekim	29.5	17.5	22.8	55.1	1.6	12.1	15.4
Kasım	20.2	10.1	14.4	73.0	1.2	9.0	170.0
Aralık	15.4	9.3	12.2	80.5	1.5	16.1	194.0

3.2.4. Gen Aktarılmış ve Kaynak Genotiplerin ZYMV Bulaştırılmadan Karşılaştırılması

Gen aktarılmış ve kaynak genotiplerin ZYMV bulaştırılmadan karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilen denemelerde, her uygulamada 3 tekerrür ve her tekerrürde 10 bitki kullanılmıştır. Deneme alanının genel görünümü Şekil 3.4’de sunulmuştur.



Şekil 3.4. Crimson Sweet kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış Crimson Sweet bitkilerinin genel görünümü

3.2.5. Southern Blot Testi İle ZYMV-CP Geni Varlığının Teyit Edilmesi

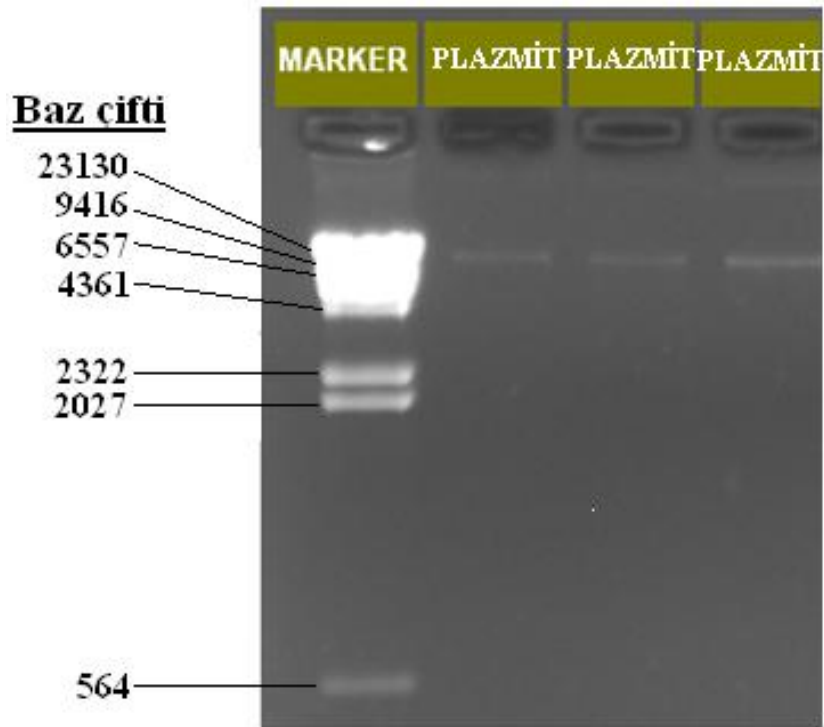
Elde edilen kaynak ve gen aktarılmış çeşidin T2 generasyonu bitkilerinde söz konusu genin varlığı Southern blot testi ile de teyit edilmiştir. Bu yöntem için öncelikle incelenecek ZYMV-CP genine özgü radyoaktif olmayan bir prob hazırlanmıştır.

3.2.5.1. Proben Elde Edilmesi

ZYMV-CP genine (1260 baz çifti) sahip pCIB10 plazmidini (Fang ve Grumet, 1993; Rothstein ve ark., 1987) taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA 105 suşunu çoğaltabilmek için LB-Agar (Merck, VM587483618) ortamı hazırlanarak 120°C'de 15 dakika süreyle 1.05 kgf/cm² basınçta otoklav edildikten sonra 50 mg/L steril kanamycine (filtre sterilizasyonu) eklenmiş ve steril petri kaplarına (90x15 mm) dökülmüştür. Derin dondurucuda, -86°C'de muhafaza edilen EHA 105 suşu, steril bir tahta çubuk (5-6 mm çapında) yardımıyla petri kaplarına çizilerek bakteri aşılması

yapılmıştır. Bakteri ile çizilen petri kapları 28°C’de yaklaşık 2 gün süreyle bekletilerek tek bakteri kolonilerinin oluşumu sağlanmıştır.

Çoğaltılan bakteri kültürünü büyütmek için, LB-Bouillon (Sıvı) (Merck, VM491085542) ortamı hazırlanarak, cam tüplere (150x25 mm) 5 ml olacak şekilde dökülmüş ve yukarıda belirtildiği gibi sterilize edilmiştir. Steril kabinde, 50 mg/L kanamycine eklenmiş ve öze yardımıyla petri kaplarından alınan 1 veya 2 bakteri kolonisi, yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan steril cam tüplere aktarılmıştır. Tüpler 20-24 saat süreyle, 28°C’de 200 rpm’de (dakikadaki devir sayısı) çalkalanarak bakteri kültürü büyütülmüştür. Bakteri kültürünün yoğunluğu OD₆₀₀: 1-1.6 olduğunda (Wise ve ark., 2006; Li ve ark., 1995) bakteri kültüründen Ek 2’de verilen protokole göre plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir (protokol Helms, 1990 ve Fermantasın K0502 nolu kitinin kolonları kullanılarak düzenlenmiştir). Elde edilen plazmit konsantrasyonu, Biophotometer (Eppendorf) ve %0.8’lik agaroz jel elektroforez yardımıyla belirlenmiştir (Şekil 3.5.). OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı 1.8 civarında olduğunda DNA saf olarak kabul edilmiştir (Wise ve ark., 2006).



Şekil 3.5. Elde edilen pCIB10 plazmidinin elektroforez jel görüntüsü

Elde edilen plazmitden ZYMV-CP geni, spesifik primerler (Çizelge 3.2.) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Primerler ticari olarak sentezletirilmiş ve firmanın (Thermo Electron, Almanya) bildirdiği konsantrasyonlar dikkate alınarak önce 250 µM depolama stoğu ve daha sonra 5 µM çalışma stok konsantrasyonu olacak şekilde steril saf su ile seyreltilmiştir.

Çizelge 3.2. ZYMV-CP geninin PCR ile çoğaltılması için kullanılan spesifik primerler ve baz dizilimleri

Primer 1	5'-AAGTCTAGAAAATAACAAATCTCAACA-3'
Primer 2	5'-AATGAGCTCTTTTTTTTAGGCTTG-3'

PCR, 1980'li yıllardan itibaren *in vitro* ortamda spesifik bir DNA parçasının kopyalarının kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımıyla yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanmaktadır. PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır.

PCR reaksiyon hacim, bir örnek için toplam 25 µl olacak şekilde düzenlenmiştir (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. PCR reaksiyon karışımında bulunan kimyasal maddeler ve bir karışım için gerekli stok miktarı ile reaksiyon çözeltisindeki konsantrasyonları

PCR reaksiyon karışımında bulunan kimyasal maddeler ve stok konsantrasyonları	Bir PCR reaksiyonu (1 örnek) için gerekli stok miktarı (µl)	PCR reaksiyon çözeltisindeki (25 µl) konsantrasyon
Steril ultra saf H ₂ O	17.3*	
PCR buffer (10X)	2.5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	0.5	200 µM (her dNTP)
Primer 1 (5 µM)	1	0.2 µM
Primer 2 (5 µM)	1	0.2 µM
Taq polimeraz (5 u/µl)	0.2	1 u
DNA	1*	30 ng/25µl

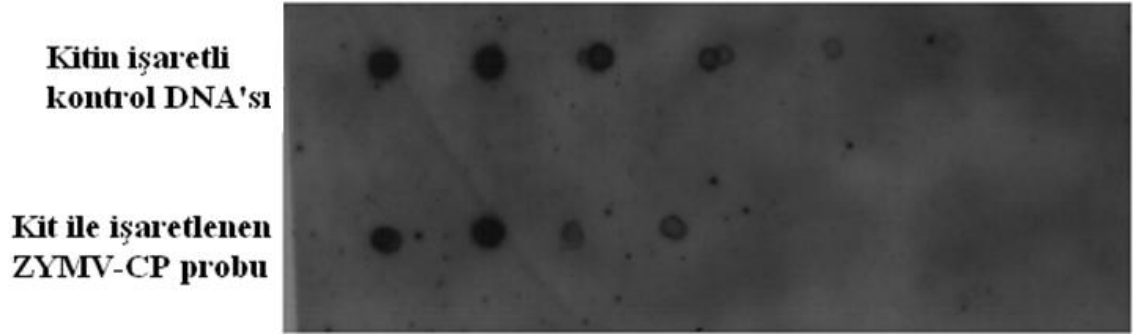
*: Genomik DNA için yapılan PCR işleminde genomik DNA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak genelde 4 µl (100 ng) kullanılmıştır. Buna bağlı olarak steril ultra saf su miktarı toplam PCR reaksiyon hacmi 25 µl (1 örnek için) olacak şekilde azaltılmıştır.

ZYMV-CP geninin pCIB10 plazmidinden çoğaltılması için gerekli olan PCR programı Çizelge 3.4'te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. PCR döngü programı

Döngü	Sıcaklık derecesi ve süresi	İşlem
1	95°C'de 120 Saniye	Ön denaturasyon
2 (30 defa)	95°C'de 45 Saniye	DNA'nın çift ipliğinin ayrılması (denaturasyon)
	50°C'de 60 Saniye	Primerlerin bağlanması (annealing)
	72°C'de 90 Saniye	Yeni DNA iplikçığının sentezlenmesi (uzama)
3	72°C'de 5 Dakika	Son uzama
4	4°C'de	Muhafaza

PCR sonucu oluşan ürün, %0.8'lik elektroforez jelde koşturularak UV altında incelenmiş ve yaklaşık 1260 baz çifti uzunluğunda bant gözlenmiştir. Jelden ZYMV-CP genini izole etmek için DNA ekstraksiyon kiti (Fermantas, K0513) kullanılmıştır (Ek 3). Agaroz jelden izole edilen ZYMV-CP DNA'sı, DIG (Dioksijenin) High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, 11585614910) ile Ek 4'te verilen yöntemle non-radyoaktif olarak işaretlenmiştir. İşaretlenmiş DNA Ek 5'te verilen protokol takip edilerek pozitif yüklü naylon membrana (NP0HY00010, GE Nylon, Reprobing Charged Transfer Membrane, GE Water&Process Technologies) Vacuum Blotter (BIO-RAD, model 785) ile aktarılmıştır. İşaretlemenin etkinliğini belirlemek için membrana aktarılan işaretlenmiş prob DNA'sı ile kitle gelen işaretlenmiş DNA, X-Ray filmine aktarılarak karşılaştırılmıştır (Şekil 3.6.). Böylece incelenecek ZYMV-CP genine özgü işaretlenmiş prob elde edilmiştir.

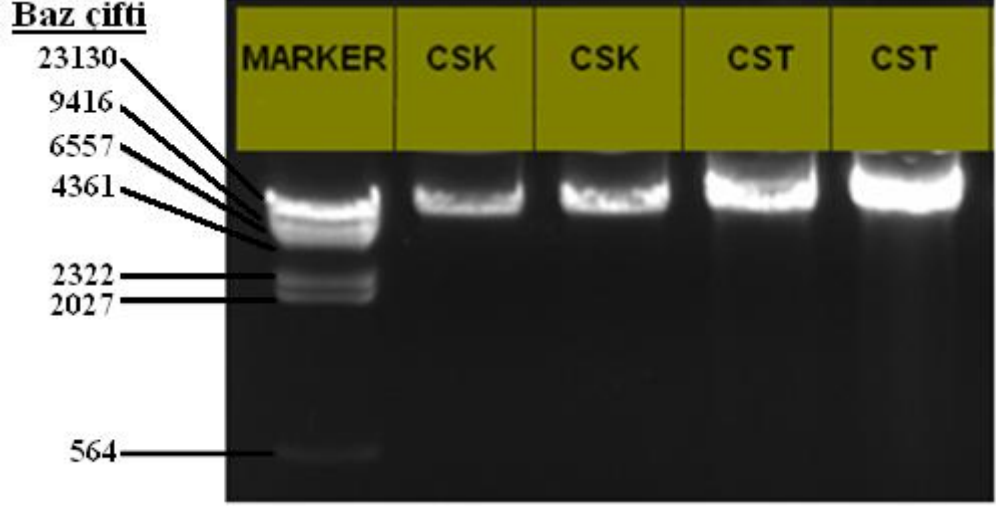


Şekil 3.6. Kit ile gelen işaretli kontrol DNA'sı ve Kit kullanılarak işaretlenen ZYMV-CP probunun X-Ray filmindeki görüntüsü

3.2.5.2. Çok Miktarda Genomik DNA'nın Ekstraksiyonu ve Enzimlerle Kesilmesi

Denemede kullanılan ZYMV-CP geni aktarılmış ve kaynak karpuz bitkilerinin genç yaprak örnekleri (5 g) alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri sıvı azotla öğütülmüş ve -86°C'de muhafaza edilmiştir. Bu yaprak örneklerinden Ek 6'da verilen yöntemle DNA izole edilmiştir (Levi ve Thomas, 1999). Elde edilen genomik DNA'nın konsantrasyonu hakkında fikir sahibi olmak için agaroz jel elektroforez yapılmıştır

(Şekil 3.7.). DNA konsantrasyonunu ve saflığını belirlemek için ayrıca Biophotometer (Eppendorf) de kullanılmıştır.



Şekil 3.7. Kaynak (CSK) ve gen aktarılmış T2 (CST) generasyonu bitkilerden izole edilen genomik DNA'nın konsantrasyon jeli

Ek 6'da verilen protokole göre izole edilen DNA, uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek belirli sayı ve uzunlukta DNA oluşumu sağlanmıştır. Genomik DNA'nın kesiminde *BclI* ve *XbaI* enzimleri kullanılmıştır. *BclI* enzimi ZYMV-CP genini bir yerden keserken, *XbaI* enzimi ise söz konusu geni kesmemektedir. Kaynak ve gen aktarılmış bitkilerden elde edilen genomik DNA, söz konusu enzimler ile kesmek için enzimlerle beraber 8 saat boyunca 37°C'de bekletilmiştir (Ek 7). Ardından söz konusu kesme işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla, TAE (1X) (5X TAE'den seyreltilerek kullanılmıştır) içeren kontrol jeli hazırlanmıştır. Belirtilen enzimlerle kesilen 4-5 µg genomik DNA, %1'lik agaroz jelde 30 voltta 8 saat süreyle koşturulmuştur. Koşma işlemi bitince, jel 30 dakika süreyle 0.5 µg/ml'lik ethidium bromide ile muamele edilerek görüntüsü alınmış ve incelenmiştir. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile DNA'nın jel üzerinde büyüklüklerine göre birbirinden ayrılmasını sağlayan enzimler belirlenmiştir.

3.2.5.3. Enzimle Kesilen Genomik DNA'nın Pozitif Yüklü Naylon Membrana Aktarılması

Yukarıda belirtildiği gibi *XbaI* enzimi ile kesilen 9-12 µg genomik DNA'nın, pozitif yüklü naylon membrana aktarılması için öncelikle elektroforez yapılmıştır. Bu amaçla TAE (1X TAE) solüsyonu ile %1'lik agaroz jel hazırlanmış ve 30 voltta 8 saat süreyle koşturulmuştur. Jelde büyüklüğüne göre ayrışan genomik DNA, Ek 8'de verilen protokole göre Vacuum Blotter yardımıyla pozitif yüklü membrana aktarılmıştır.

3.2.5.4. Hibridizasyon

DIG ile işaretlenmiş ZYMV-CP probu ile *XbaI* enzimiyle kesildikten sonra pozitif yüklü naylon membrana aktarılan genomik DNA, Ek 8'de verilen protokole göre hibridize edilmiştir. Prob yalnızca kendisiyle eşleşen bazları içeren DNA ile hibridize olacak ve ışımaya yapacaktır. Ayrıca protokol gereği yanlış eşleşen DNA'lar da yıkanmıştır.

3.2.6. Morfolojik, Pomolojik, Büyüme ve Verim Özelliklerinin İncelenmesi

Kurulan denemelerde, bitkiler aşağıda belirtilmiş olan analizlere tabi tutulmuştur. Yaprak ve çiçek gözlemlerinde, her yinelemede 8 bitki ve her bitkide 2 yaprak ve çiçek kullanılmıştır. Pomolojik analizler ise her yinelemede 8 meyvede yapılmıştır. Büyüme ile ilgili özellikler (yaş ağırlık, kuru ağırlık, yaprak alanı), her yinelemede 2 bitkide gerçekleştirilmiştir. Yürütülen denemelerde incelenen özellikler aşağıda kısaca belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Ploidi düzeyi: Tez çalışmaları başlamadan önce gen aktarılmış T0 ve kaynak Crimson Sweet genotiplerinin ploidi düzeyi Flow Cytometry yöntemi ile belirlenmiştir.¹ Tez kapsamında kurulan denemelerde, yetiştirme sezonu boyunca elde edilen kaynak ile T1 ve T2 bitkilerinde ploidi düzeyi morfolojik (çiçek iriliği, çiçek tozu canlılığı ve çimlenme oranları, yaprak, gövde vb.) gözlemler yapılarak (diploid, triploid, tetraploid şeklinde) belirlenmiştir.

¹: Sebahattin Çürük, Metin Tuna (Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü); Yayınlanmamış bireysel çalışma

Bitkinin çiçeklenme durumu: Yetiştirme sezonu boyunca elde edilen bitkiler incelenmiş ve çiçeklenme durumu monoik (Şekil 3.8) veya andromonoik (Şekil 3.9) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.8. Crimson Sweet'te monoik çiçek oluşumu

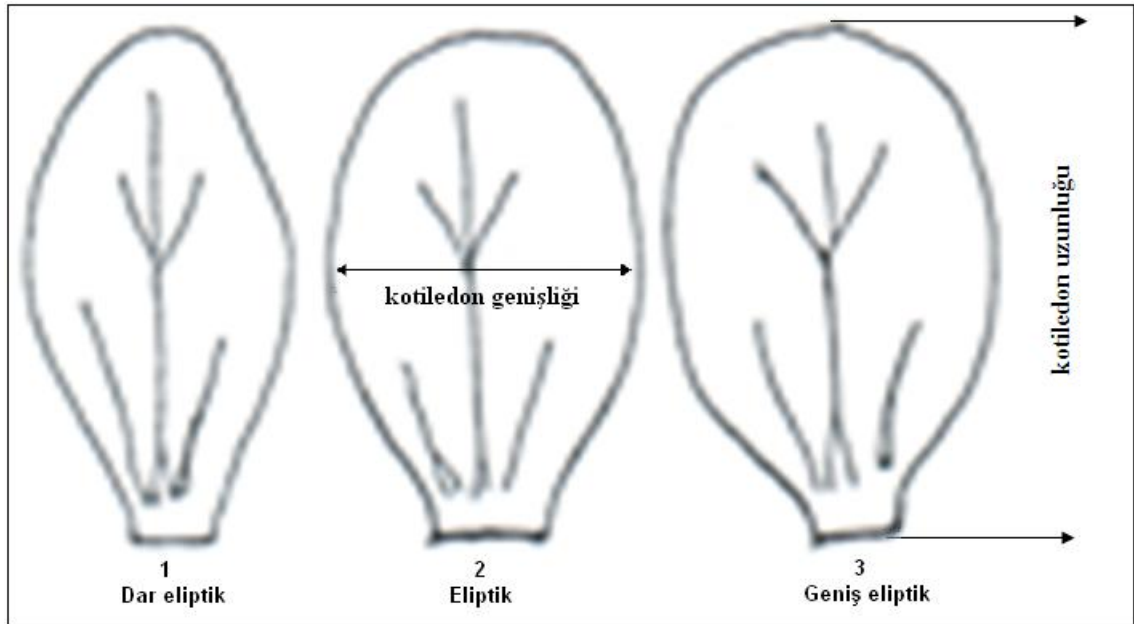


Şekil 3.9. Zerzuri'de andromonoik çiçek oluşumu

Hipokotil uzunluğu, kotiledon şekli, kotiledon genişliği, kotiledon uzunluğu ve kotiledonda beneklenme gözlemleri birinci ve ikinci denemelerde sırasıyla 26 Ocak 2009 ve 26 Temmuz 2009 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir.

Hipokotil uzunluğu (cm): Fidelerin hipokotil uzunluğu, toprak üstünden kotiledon yaprağının çıkış gösterdiği mesafeye kadar olan kısmın dijital kumpas yardımıyla ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Kotiledon şekli: Fidelerin kotiledon şekli, gözlem yapılarak dar eliptik, eliptik veya geniş (sırasıyla 1, 2 ve 3 skala değerleri verilmiştir) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Kotiledon şekli (Anonim, 1998)

Kotiledon genişliği (cm): Fidelerde kotiledon genişliği, Şekil 3.10'da gösterildiği gibi belirtilen mesafe dijital kumpas yardımıyla ölçülerek belirlenmiştir.

Kotiledon uzunluğu (cm): Fidelerin kotiledon uzunluğu, şekil 3.10'da gösterildiği gibi belirtilen mesafe dijital kumpas yardımıyla ölçülerek belirlenmiştir.

Kotiledonda beneklenme: Fidelerin kotiledonda beneklenme durumları, gözlem yapılarak var veya yok olarak kaydedilmiştir.

Bitkinin gelişme tabiatı: Denemedeki bitkilerin gelişme tabiatı, yetiştirme sezonu boyunca gözlem yapılarak, bitkilerin çalı veya kol atarak büyüdüğü saptanmıştır.

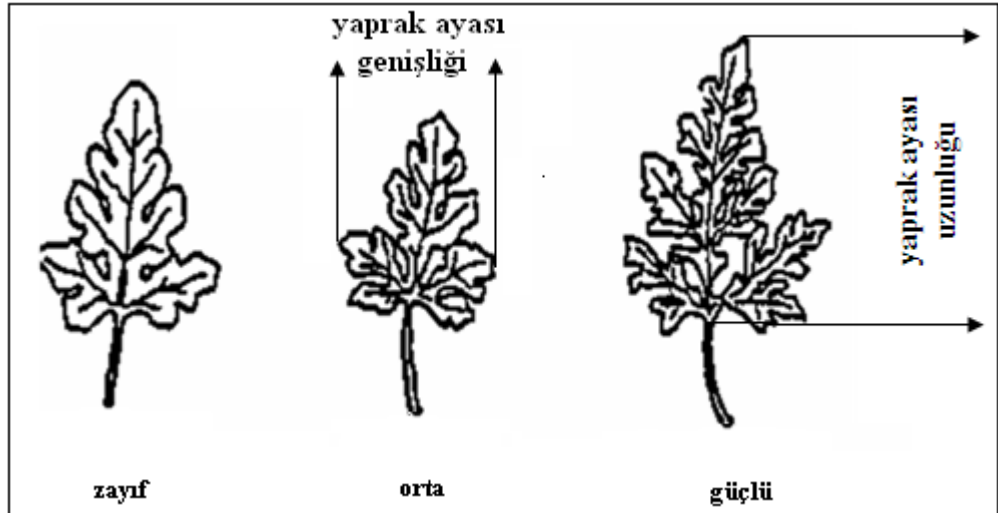
Gövde kalınlığı (mm): Bitkiler hasat edilmeden üç hafta önce, bitkilerin gövde kalınlıkları, toprak seviyesinin hemen üstündeki mesafeden dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

Gövde uzunluğu (cm): Bitkiler hasat edilmeden üç hafta önce, bitkilerin gövde uzunlukları, en uzun olan kolun, bitkinin kök başlangıç bölgesinden sürgün ucuna kadar olan mesafesinin metre yardımıyla ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Gövdede boğum sayısı (adet): Bitkiler hasat edilmeden üç hafta önce, ana gövde üzerindeki boğumlar sayılmıştır.

Kol sayısı (adet): Bitkiler hasat edilmeden üç hafta önce, bitkinin gövdesi olarak tanımlanan kısımdan çıkan sürgünler sayılarak kaydedilmiştir.

Yaprak ayasında ikincil loblanma derecesi (yaprak parçalılığı): Denemedeki bitkilerin en uzun sürgününde, sürgün ucundan saymaya başlayarak 9 ve 10. yapraklarındaki ikincil loblanma derecesi zayıf, orta veya güçlü (sırasıyla 1, 2 ve 3 skala değerleri verilmiştir) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. *Citrullus lanatus*'ta yaprak ayası şekli (Anonymous, 2008)

Yaprak ayası uzunluğu ve genişliği (cm): Denemedeki bitkilerin yaprak ayası uzunluk ve genişlikleri, Şekil 3.11'de gösterilmiş olduğu gibi belirtilen mesafelerin, dijital kumpas yardımıyla ölçülmesiyle saptanmıştır.

Yaprak ayası rengi: Bitkinin en uzun sürgününde, sürgün ucundan itibaren sayılarak belirlenen 9 ve 10. yapraklarında, Minolta CR-300 kromometre (Konica, Amerika) cihazı ile renk ölçümleri yapılmıştır.

Yaprak alanı (cm²/bitki): Bitkilerin ilk çiçeklenme döneminde, her bitkinin (her yinelemede 2 bitki) bütün yaprakları alınarak LiCOR (Licor 3100, Amerika) cihazı ile ölçülmüş ve bitki başına toplam yaprak alanı belirlenmiştir.

Yaprak ayasında kabarcıklık: Bitkilerin en uzun sürgününde, sürgün ucundan sayılarak belirlenen 9 ve 10. yaprak ayaları incelenerek, yaprak ayasında kabarcıklık var veya yok şeklinde kaydedilmiştir.

Yaprak ayasında beneklilik: Denemedeki bitkilerin en uzun sürgününde, sürgün ucundan sayılarak belirlenen 9 ve 10. yaprak ayaları gözlenerek, yaprak ayasında beneklilik var veya yok olarak saptanmıştır.

Yaprak sapı uzunluğu (cm): Bitkinin en uzun sürgününde, sürgün ucundan sayılarak belirlenen 9 ve 10. yaprakların sap uzunluğu dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

İlk erkek çiçeğin oluşum süresi (gün): Tohum ekiminden gövde üzerinde ilk erkek çiçeğin açıldığı zamana kadar geçen gün sayısıdır.

İlk erkek çiçeğin oluştuğu boğum sayısı (adet): Gövde üzerinde kotiledon yapraklarının bulunduğu boğumdan, ilk erkek çiçeğin açtığı boğuma kadar oluşan boğumlar sayılmıştır.

Erkek çiçek taç yaprak genişliği (mm): Erkek çiçek taç yaprak genişliği, ilk oluşan 3 ve 4. erkek çiçekte, karşılıklı iki taç yaprak ucu arasındaki mesafenin dijital kumpas yardımıyla ölçülmesiyle belirlenmiştir.

İlk dişi çiçeğin oluşum süresi (gün): Tohum ekiminden gövde üzerinde ilk dişi çiçeğin açıldığı zamana kadar geçen süredir.

İlk dişi çiçeğin oluştuğu boğum sayısı (adet): Gövde üzerinde kotiledon yapraklarının bulunduğu boğumdan başlayarak, ilk dişi çiçeğin açıldığı boğuma kadar oluşan boğumlar sayılarak kaydedilmiştir.

Dişi çiçek taç yaprak yüksekliği (mm): Gövde üzerinde ilk oluşan 3 ve 4. çiçekte, taç yaprağın uç kısmından yumurtalığa kadar olan mesafe dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

Dişi çiçeğin taç yaprağının uç şekli: Taç yaprağın uç şekli, ilk oluşan 3 ve 4. çiçekte gözlem yaparak keskin, yuvarlak veya geniş (sırasıyla 1, 2 ve 3 skala değerleri verilmiştir) olarak belirlenmiştir.

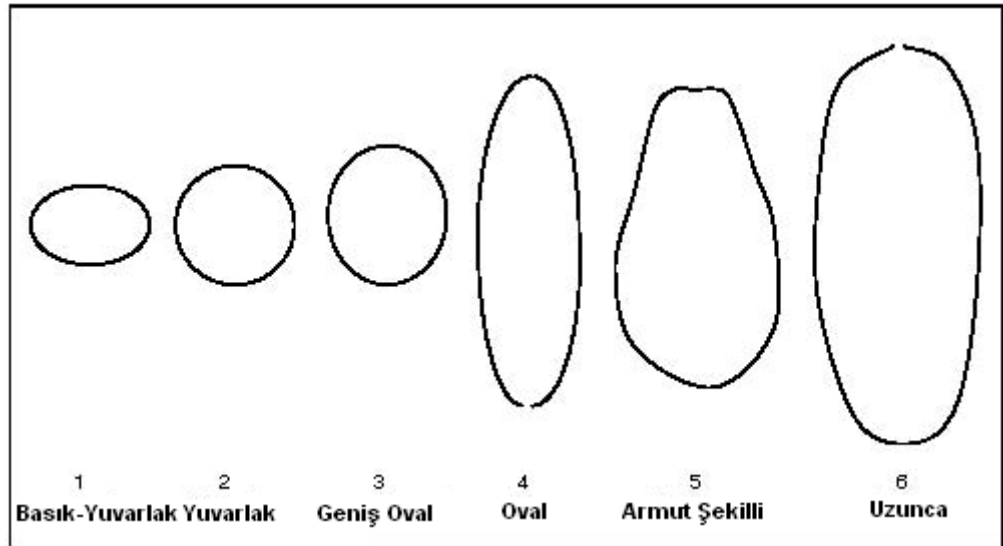
Yumurtalık uzunluğu (mm): Dişi çiçeğin yumurtalık yüksekliği, ilk oluşan 3 ve 4. çiçekte dijital kumpas kullanılarak belirlenmiştir.

Yumurtalık genişliği (mm): İlk oluşan 3 ve 4. çiçekte yumurtalığın en geniş olduğu yer, dijital kumpas kullanılarak ölçülmüştür.

Yumurtalıkta tüylülük: İlk oluşan 3 ve 4. çiçek incelenerek, dişi çiçeğin tüylülük durumu seyrek, orta veya yoğun (sırasıyla 1, 2 ve 3 skala değerleri verilmiştir) olarak belirlenmiştir.

Dikim-meyve olgunluk süresi: Fide dikiminden hasada kadar geçen süre (gün) belirlenmiştir.

Meyve şekli: Denemeden elde edilen karpuz meyveleri incelenerek meyve şekli; basık-yuvarlak, yuvarlak, geniş oval, oval, armut şekilli veya uzunca (sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 skala değerleri verilmiştir) olmak üzere değerlendirilmiştir (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. *Citrullus lanatus*'ta meyve şekli (Anonymous, 2008)

Meyve eni (cm): Meyvelerin çiçek çukuru ile sap çukuru arasındaki orta eksene dik olan en geniş mesafe metre ile ölçülerek belirlenmiştir.

Meyve boyu (cm): Meyvelerin çiçek çukuru ile sap çukuru arasındaki mesafenin metre ile ölçülmesiyle saptanmıştır.

Meyve ağırlığı (kg): Olgunluk döneminde her meyvenin ağırlığı terazi yardımıyla tartılarak kaydedilmiştir.

Meyve kaide kısmının şekli: Meyve kaide kısmının (çiçek çukuru tarafı) şekli düz, düz-yuvarlak, yuvarlak, yuvarlak-konik veya konik (sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5 skala değerleri verilmiştir) olarak saptanmıştır.

Meyvenin meyve sapına yakın kısmının şekli: Meyvenin, meyve sapına yakın kısmının şekli düz, düz-yuvarlak, yuvarlak, yuvarlak-konik veya konik (sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5 skala değerleri verilmiştir) olarak belirlenmiştir.

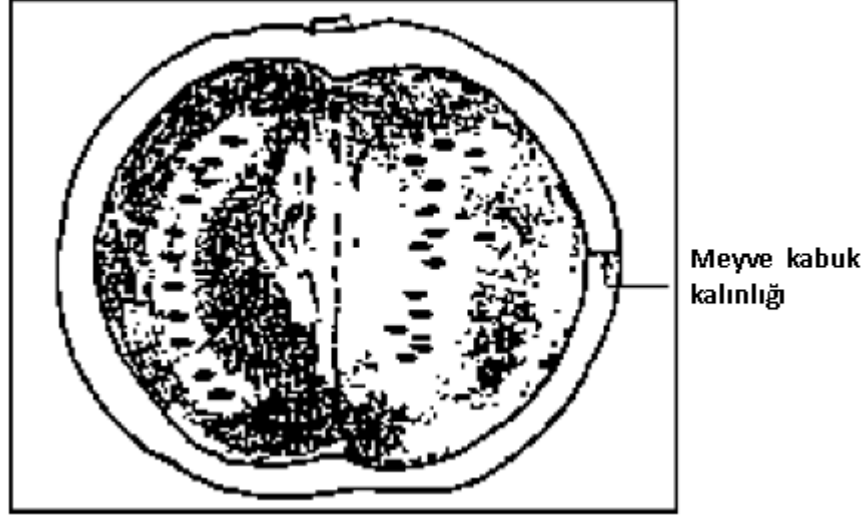
Meyvenin meyve sapına bağlandığı yerin şekli: Meyvenin meyve sapına bağlandığı yerin şekli yüzeysel, orta veya derin olarak saptanmıştır.

Meyve kabuğunda yivlilik: Meyve kabuğunun yivlilik durumu; yok, taban yarısında, uç yarısında veya bütün meyvede olmak üzere var veya yok olarak belirlenmiştir.

Meyve kabuğunda çizgililik: Meyvelerinin kabuğundaki çizgiler; var veya yok olarak saptanmıştır.

Meyve kabuğunda damarlılık: Meyvenin kabuğundaki damarlılık durumu var veya yok şeklinde belirlenmiştir.

Meyve kabuk kalınlığı (mm): Olgunluk döneminde meyve kabuk kalınlığı her meyvede 3 yerden olmak üzere dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. *Citrullus lanatus*'ta meyve kabuk kalınlığı (Anonymous, 2008)

Derim olumunda meyve eti sertliği (Newton): Bir bıçak yardımıyla meyve dört parçaya bölündükten sonra meyve etinin sertliği, her 4 parçada, 5 mm uçlu penetrometre (Nippon Optical Works Ca, L.T.D; Tokyo, Japan) yardımıyla ölçülmüştür.

Meyvede tohum sayısı (adet): Her meyvede bulunan toplam tohum sayısı sayılarak kaydedilmiştir.

Meyve sapı uzunluğu (cm): Denemedeki bitkilerden elde edilen meyvelerde, meyve sapı uzunluğu, meyveler hasat edilmeden önce dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

Meyve sapı kalınlığı (mm): Denemedeki bitkilerden oluşan meyvelerde, meyve sapı kalınlığı, meyveler hasat edilmeden önce dijital kumpas yardımıyla belirlenmiştir.

Meyve sapının meyveye bağlandığı yerin büyüklüğü (mm): Meyve sapının meyveye bağlandığı yerin büyüklüğü, meyveler hasat edilmeden önce dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

Meyve mühür büyüklüğü (mm): Elde edilen meyvelerde, meyve mühür büyüklüğü, meyveler hasat edildikten sonra dijital kumpas yardımıyla ölçülerek belirlenmiştir.

Tohum ağırlığı (g): Meyvelerden elde edilen 10 adet kurumuş tohum ağırlığı, tartılarak kaydedilmiştir.

Ortalama tohum ağırlığı (mg): Denemeden elde edilen meyvelerde her meyvenin toplam tohum ağırlığının, toplam tohum sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır.

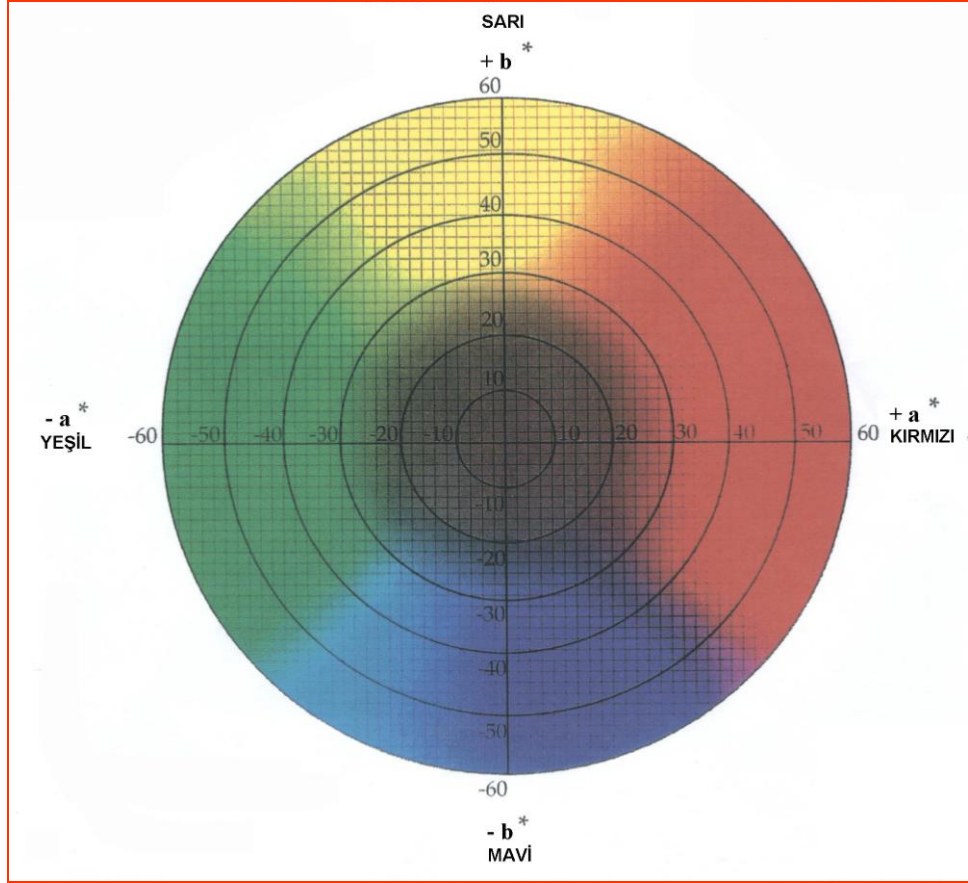
Tohum kabuğunun zemin rengi: Tohum kabuk zemin rengi; kahverengi, beyaz, krem, yeşil, kırmızı, kızıl kahve veya siyah vb. olmak üzere değerlendirilmiştir.

Tohum kabuğunda ikincil renk: Tohum kabuğunda ikincil renk var veya yok şeklinde belirlenmiştir.

Tohum hilumda leke: Tohum hilumunda leke durumu; var veya yok olarak kaydedilmiştir.

Tohum kenarında leke: Tohum kenarında leke durumu; var veya yok şeklinde değerlendirilmiştir.

Meyve kabuk ve et rengi: Meyvelerin kabuk rengi ölçümleri her meyvede, meyve kabuk açık yeşil (zemin) ve meyve kabuk koyu yeşil rengi olmak üzere 2'şer defa okuma yapılmıştır. Meyve et rengi ise, meyvenin ekvator bölgesinde her iki taraftan olmak üzere okuma yapılmıştır. Renk ölçümleri C.I.E.L*a*b* metoduna göre Minolta CR-300 kromometre ile yapılmıştır (McGuire, 1992). Minolta Renk Ölçer ile L*, a*, b*, C* ve h° değerleri ölçülmüştür. Burada, L* rengin parlaklığındaki değişimi (L; 0 siyah, 100 beyaz), a* değeri yeşilden kırmızıya renk değişimini (pozitif değerler kırmızı, negatif değerler yeşil), b* değeri ise sarıdan maviye renk değişimini (pozitif değerler sarı, negatif değerler mavi), C* rengin yoğunluğunu ve h° rengin açı değerini (0; kırmızı-mor, 90°; sarı, 180°; mavimsi-yeşil, 270°; mavi) göstermektedir. L*, a*, b* renklerini gösteren skala Şekil 3.14'te verilmiştir.



Şekil 3.14. Minolta Renk Ölçer cihazının renk skalası

Titre edilebilir asit içeriği (%): Her analiz döneminde sıkılarak elde edilen meyve suyunun titre edilebilir asit oranı, potansiyometrik yöntem (Sadler, 1994) ile ölçülmüş olup, elde edilen meyve suyundan alınan 5 ml örnek, distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak, dijital pH metrede 8.1 değeri okunana kadar 0.1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Sonuçlar malik asit (asitlik sabiti: 0.0067) cinsinden % olarak hesaplanmıştır.

Suda çözünebilir kuru madde (SÇKM) miktarı (%): Meyvelerin tohumları çıkarıldıktan sonra, meyve etinin sıkılmasıyla elde edilen meyve suyu kullanılarak, SÇKM miktarı el refraktometresi (Nippon Optical Works Ca, L.T.D; Tokyo, Japan) ile okumalar yapılarak belirlenmiştir.

Meyve suyu pH değeri: Meyvelerin tohumları çıkarıldıktan sonra, meyve etinin sıkılmasıyla elde edilen meyve suyu örneğinde 3 defa dijital pH metre okuması yapılarak saptanmıştır.

Yaprak yaş ağırlığı (g/bitki): Bitkinin ilk çiçeklendiği devrede, her bitkinin bütün yaprakları alındıktan sonra tartılarak ağırlıkları tespit edilmiştir (her yinelemede 2 bitki).

Yaprak hariç sürgün yaş ağırlığı (g/bitki): Bitkinin ilk çiçeklendiği devrede, her bitkinin yaprakları hariç, toprak üstü aksamı sabah serin saatlerde hasas terazi ile tartılmıştır (her yinelemede 2 bitki).

Kök yaş ağırlığı (g/bitki): Bitkinin ilk çiçeklendiği devrede her bitkiden sökülerek çıkarılan bitki kökleri yıkanmış, suları süzildükten sonra tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir (her yinelemede 2 bitki).

Yaprak kuru ağırlığı (g/bitki): Yaş ağırlıkları saptanan yapraklar, kese kağıtlarına yerleştirilip, 65°C sıcaklıktaki etüvde en az 48 saat bekletildikten sonra, kuru ağırlıkları tartılarak tespit edilmiştir.

Yaprak hariç sürgün kuru ağırlığı (g/bitki): Yaş ağırlıkları saptanan sürgünler, kese kağıtlarına yerleştirilip, 65°C sıcaklıktaki etüvde en az 48 saat bekletildikten sonra, yaprak hariç toprak üstü aksamının kuru ağırlıkları tartılarak tespit edilmiştir.

Kök kuru ağırlığı (g/bitki): Yaş ağırlıkları saptanan kökler, kese kağıtlarına yerleştirilip, 65°C sıcaklıktaki etüvde en az 48 saat bekletildikten sonra, kuru ağırlıkları tartılarak tespit edilmiştir.

Toplam bitki yaş ağırlığı (g/bitki): Yukarıda belirtildiği gibi her bitki için tartılan yaprak, yaprak hariç sürgün ve kök yaş ağırlıkları toplanarak bitkinin toplam yaş ağırlığı belirlenmiştir.

Toplam bitki kuru ağırlığı (g/bitki): Her bitki için yukarıda belirtildiği gibi tartılan yaprak, yaprak hariç sürgün ve kök kuru ağırlıkları toplanarak bitkinin toplam kuru ağırlığı saptanmıştır.

Çiçek tozu canlılığı (%): Her parseldeki bitkilerden bir gün öncesinde pens yardımıyla kapatılan erkek çiçeklerden çiçek tozu elde edilmiştir. Her yineleme için 4 defa çiçek tozu canlılığı testi yapılmış ve bu test sonuçlarının ortalaması alınmıştır. Çiçek tozu canlılığı, %1'lik Triphenyl Tetrazolium Chlorid (TTC) yöntemine göre yapılmıştır (Şensoy ve ark. (2003)'nın bildirdiğine göre Stanley ve Linskens (1974)).

Çiçek tozu çimlenme oranı (%): Denemede bulunan her yinelemeden alınan çiçek tozları %20 sakaroz, 100 mg/L H₃BO₃, 300 mg/L Ca(NO₃)₂.4H₂O, 200 mg/L

MgSO₄.7H₂O, 100 mg/L KNO₃ ve %0.2'lik agar (Şensoy ve ark. (2003)'nın bildirdiğine göre Brewbaker ve Kwack (1963)) içeren ortamda her tekerrür için 3 petri oluşturularak çimlendirme testi yapılmıştır. Daha sonra, her parsel için belirlenen üç petride oluşan çimlenme yüzdelerinin ortalaması alınarak çiçek tozu çimlenme oranı tespit edilmiştir.

Toplam verim (kg/m² ve kg/bitki olarak): Her hasatta alınan meyve ağırlıkları toplanarak parselden elde edilen meyve miktarı tespit edilmiştir. Parseldeki toplam meyve ağırlığı (kg) parsel büyüklüğüne bölünerek m²'ye verim, bitki sayısına bölünerek bitki başına verim hesaplanmıştır.

3.2.7. ZYMV-CP Geni Aktarılmış ve Aktarılmamış Crimson Sweet Genotiplerinin ZYMV İle İnokule Edilerek Karşılaştırılması

ZYMV-CP geni aktarılmış T2 ve aktarılmamış Crimson Sweet bitkilerinin ZYMV ile inokule edilerek kıyaslanması amacıyla, ZYMV izolatu PCR pozitif ve kaynak çeşide ait 15'er bitkiye 1M sodyum fosfat tamponu (358.1 g/L Na₂HPO₄.12H₂O, 138 g/L Na₂H₂PO₄.H₂O (pH:7) ve %0.1 β-mercaptoethanol) kullanılarak mekanik yolla (Fuchs ve Gonsalves, 1995) inokule edilmiştir. Bu denemede yukarıda belirtilen analizlerden meyve eti rengi, SÇKM, pH, asitlik, toplam verim özellikleri incelenmiştir.

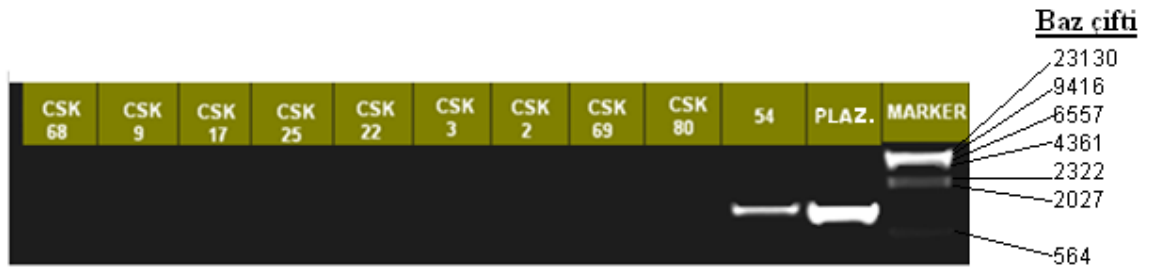
3.2.8. İstatistiksel Analizler

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre, 3 yinelemeli olarak ve her yinelemede 10 bitki olacak şekilde kurulmuştur. ZYMV inokulasyon denemesi ise her yinelemede 5 bitki olacak şekilde kurulmuştur. Denemelerdeki her parselde yapılan gözlem, ölçüm ve analizlerden elde edilen verilerin ortalamaları alınarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Varyans analizi SAS istatistik program ve prosedürleri kullanılarak yapılmıştır. İncelenen özelliklere ait ortalamalar, %5 önem seviyesinde Asgari Önemli Fark (LSD: Least Significant Difference) testi ile karşılaştırılmıştır (Bek ve Efe, 1989).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

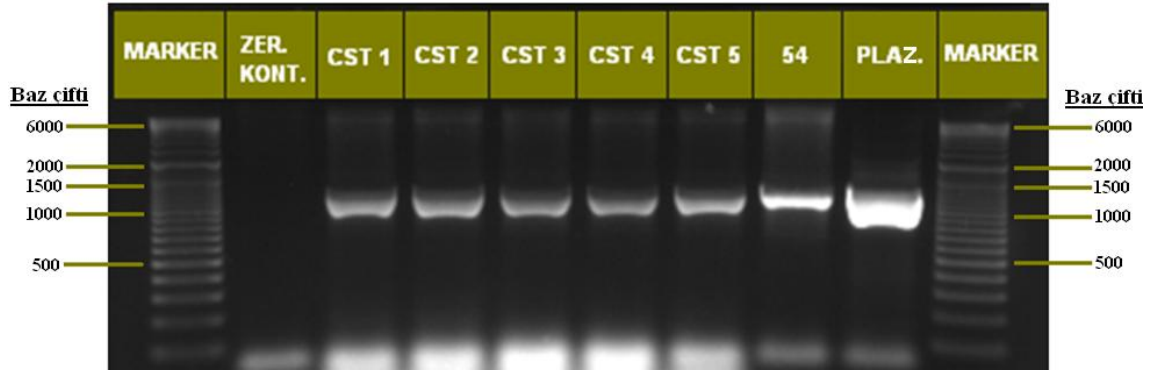
4.1. Kontrol ve ZYMV-CP Geni Aktarılmış Bitkilerin PCR ile Seçilmesi ve Southern Blot ile Teyit Edilmesi

Crimson Sweet kaynak bitkilerinden elde edilen genomik DNA kullanılarak yapılan PCR testi, bitkilerin hiç birinde ZYMV-CP genin çoğaltılmadığını, ancak plazmitden ve pozitif olduğu bilinen 54 nolu karpuz hattı DNA'sından çoğaldığını göstermektedir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Crimson Sweet Kaynak (CSK) çeşidinde ZYMV-CP geninin bulunmadığını gösteren PCR ürününe ait jel görüntüsü (54: pozitif karpuz hattı DNA'sı, PLAZ: Plazmit DNA'sı)

Crimson Sweet transgenik T1 ve T2 bitkilerinden izole edilen DNA ile yapılan PCR sonucunda, bazı bitkilerde ZYMV-CP geninin var olduğu bazılarında ise bulunmadığı saptanmıştır (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3.). PCR pozitif olan bitkiler seçilmiş ve gen aktarılmış bitki olarak kullanılmıştır. T1 generasyonuna ait toplam 80 bitki testlenmiş ve bu bitkilerin 57 tanesi pozitif, 23 tanesi negatif olarak bulunmuştur. T1 bitkileri arasında 1260 baz çifti uzunluğunda bant oluşturan bitkilerin oranının %71.25 olduğu belirlenmiştir. Ki-kare testi sonucuna göre, aktarılan genin 3:1 oranında açılım gösterdiği saptanmıştır ($P_{0.05}=0.438$). T2 generasyonuna ait toplam 60 bitki testlenmiş ve bu bitkilerin 50 tanesi pozitif, 10 tanesi negatif olarak bulunmuştur. T2 bitkileri arasında 1260 baz çifti uzunluğunda bant oluşturan bitkilerin oranının ise %83.33 olduğu belirlenmiştir.

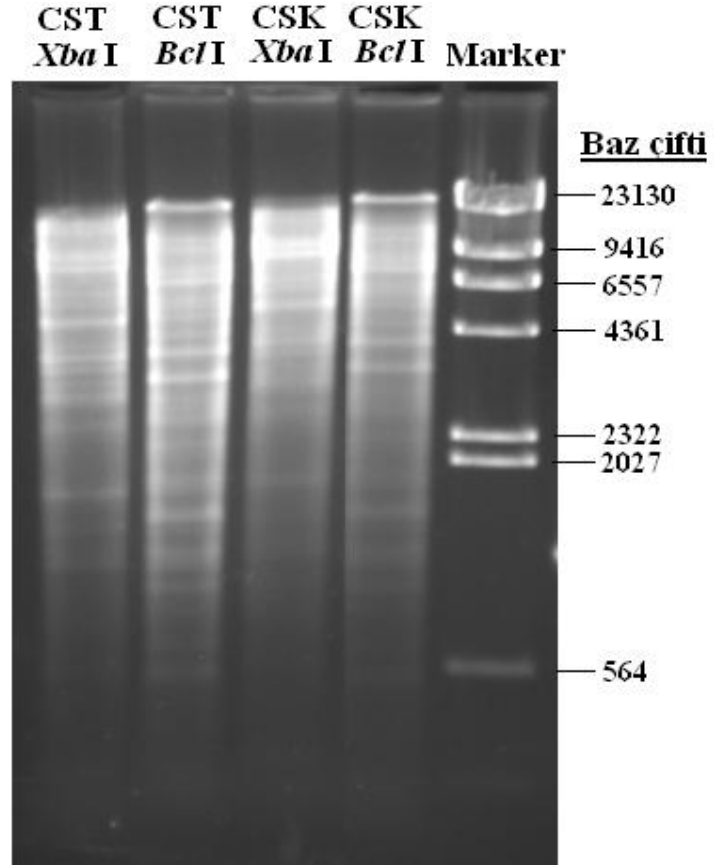


Şekil 4.2. Gen aktarılmış Crimson Sweet hattının T1 bitkilerinde (CST) ZYMV-CP geninin PCR ile çoğaltılmasına ait jel görüntüsü (54: pozitif karpuz hattı DNA'sı, PLAZ: Plazmit DNA'sı, ZER. KONT: Zerzuri kontrol DNA'sı)



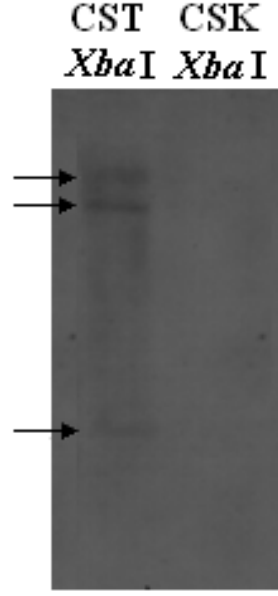
Şekil 4.3. Gen aktarılmış Crimson Sweet hattının T2 (CST) bitkilerinde ZYMV-CP geninin PCR ile çoğaltılmasına ait jel görüntüsü (54: pozitif karpuz hattı DNA'sı, PLAZ: Plazmit DNA'sı ve CST 81 ile CST 79 negatif, diğerleri pozitif)

Denenen enzimlerden *XbaI* enziminin, Ek 6'ya göre izole edilen karpuz DNA'sını amaca uygun olarak kestiği için bu enzimin Southern blot testinde kullanılmasına karar verilmiştir. Genomik DNA'nın enzimlerle kesilmesi sonucu yapılan elektroforez jel görüntüsü Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Kaynak (CSK) ve gen aktarılmış T2 (CST) generasyonu bitkilerinden elde edilen genomik DNA'nın *Xba*I ve *Bcl*I enzimleriyle kesildikten sonra %1'lik agaroz jelindeki görüntüsü

Gerçekleştirilen Southern blot testi sonucunda, Crimson Sweet kaynak çeşit DNA'sının ZYMV-CP probu ile hibridize olmadığı, ZYMV-CP geni aktarılan transgenik Crimson Sweet T2 DNA'sının ise 3 farklı yerde hibridize olduğu, dolayısıyla ZYMV-CP genini farklı lokuslarda 3 kopya olarak taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Kaynak (CSK) ve gen aktarılmış T2 (CST) bitki DNA'sı ile yapılan Southern blot testinin X-Ray filmindeki görüntüsü

4.2. Gen Aktarılmış ve Kaynak Genotiplerin ZYMV Bulaştırılmadan Karşılaştırılması

Bu çalışma kapsamında 2 farklı dönemde deneme kurulmuştur. Yürütülen ilk denemede, denemenin belirli bir aşamasından sonra gübrelemenin yapıldığı gün serada elektriğin kesilmesiyle birlikte, aktif havalandırma fanlarının çalışmaması nedeniyle sera içi sıcaklığı yükselmiş ve bitkiler zarar görmüştür. Bu nedenle deneme daha sonra tekrar edilmiştir.

İlk denemede elde edilen verilerden sadece sağlıklı olanlar istatistiksel analizlere tabi tutulmuş ve sonuçları verilmiştir. Gen aktarılmış T1 ve aktarılmamış kaynak bitki kotiledonunda beneklenme, yaprak ayasında kabarcıklık ve beneklilik olmadığı gözlemlenmiştir. Fideyle ilgili yapılan istatistiksel analizlere göre, transgenik (6.59 cm) olan bitki hipokotillerinin kaynak (5.40 cm) bitkilere kıyasla %18 daha uzun olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1.). Kotiledon şekli bakımından ise genotipler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Transgenik olan bitkilerin (1.47 cm), kaynak bitkilere (1.77 cm) oranla %16.95 daha düşük kotiledon genişliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, kaynak bitkiler (2.67 cm), transgenik bitkilere (2.23 cm)

kıyasla %16.48 daha yüksek kotiledon uzunluğu göstermişlerdir (Çizelge 4.1.). Onsinejad (1993), cam serada yaptığı çalışmada Crimson Swwet çeşidinin kotiledon uzunluğunun 3.67 cm olduğunu saptamıştır. Bu iki çalışma arasında kotiledon uzunluğu arasındaki fark, gözlemlerin tohum ekiminden sonra farklı tarihlerde yapılmış olmasından kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 4.1. İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin fide ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Hipokotil uzunluğu (cm)	5.40 b	6.59 a	0.708
Kotiledon şekli	1.75	1.58	ÖD
Kotiledon genişliği (cm)	1.77 a	1.47 b	0.140
Kotiledon uzunluğu (cm)	2.67 a	2.23 b	0.334

Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemlidir. ÖD: ortalamalar arasındaki fark önemli değil.

Gövde kalınlığı, gövde uzunluğu, gövde boğum sayısı ve kol sayısı bakımından genotipler arasındaki farkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin gövde ve kol ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Gövde kalınlığı (mm)	10.71	11.22	ÖD
Gövde uzunluğu (cm)	420.79	413.54	ÖD
Gövde boğum sayısı (adet)	31.27	29.79	ÖD
Kol sayısı (adet)	6.36	6.88	ÖD

ÖD: ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemli değil.

İlk denemede yaprakla ilgili yapılan incelemede (Çizelge 4.3.), yaprak ayasında ikincil loblanma derecesi, yaprak ayası uzunluğu, yaprak alanı, yaprak sapı uzunluğu bakımından genotipler arasında istatistiksel açıdan önemli farklar bulunmamıştır. Transgenik bitkilerin yaprak ayası genişliği (14.57 cm), kaynak (13.52 cm) bitkilerden %7.2 daha geniş olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin yaprakla ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Yaprak ayasında ikincil loblanma derecesi	2.21	1.71	ÖD
Yaprak ayası uzunluğu (cm)	12.41	12.99	ÖD
Yaprak ayası genişliği (cm)	13.52 b	14.57 a	0.835
Yaprak alanı (cm ² /bitki)	4762.70	2999.00	ÖD
Yaprak sapı uzunluğu (cm)	8.88	8.67	ÖD

Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemlidir. ÖD: ortalamalar arasındaki fark önemli değil.

Bitkilerde çiçek ve yumurtalıkla ilgili özellikler incelendiğinde (Çizelge 4.4.), ilk erkek çiçeğin oluşum süresi, ilk erkek çiçeğin oluştuğu boğum sayısı, ilk dişi çiçeğin oluşum süresi, ilk dişi çiçeğin oluştuğu boğum sayısı, dişi çiçek taç yaprak yüksekliği, dişi çiçeğin taç yaprağının uç şekli, erkek çiçek taç yaprak genişliği, çiçek tozu canlılığı, çiçek tozu çimlenmesi, yumurtalık uzunluğu, genişliği ve tüylülük durumları bakımından genotipler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.4. İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin çiçeklerle ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
İlk erkek çiçeğin oluşum süresi (gün)	91.17	92.54	ÖD
İlk erkek çiçeğin oluştuğu boğum sayısı (adet)	12.00	11.33	ÖD

Çizelge 4.4. (Devam) İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin çiçeklerle ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

İlk dişi çiçeğin oluşum süresi (gün)	92.33	94.33	ÖD
İlk dişi çiçeğin oluştuğu boğum sayısı (adet)	15.67	15.00	ÖD
Dişi çiçek taç yaprak yüksekliği (mm)	10.80	11.18	ÖD
Dişi çiçeğin taç yaprağının uç şekli	2.42	2.15	ÖD
Erkek çiçek taç yaprak genişliği (mm)	24.83	25.24	ÖD
Çiçek tozu canlılığı (%)	93.37	95.30	ÖD
Çiçek tozu çimlenme (%)	75.05	76.42	ÖD
Yumurtalık uzunluğu (mm)	3.25	3.44	ÖD
Yumurtalık genişliği (mm)	3.50	3.35	ÖD
Yumurtalıkta tüylülük	1.81	2.06	ÖD

ÖD: ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemli değil.

Denemeye ait bitkilerde yaş ağırlık ve kuru ağırlıkla ilgili ölçümlerin istatistiksel analiz sonuçlarına göre kaynak ve gen aktarılmış bitkiler arasında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. İlk denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 (CST) genotiplerinin kuru ve yaş ağırlıkla ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Kök yaş ağırlığı (g/bitki)	32.61	22.45	ÖD
Yaprak yaş ağırlığı (g/bitki)	154.04	92.07	ÖD
Yaprak hariç sürgün yaş ağırlığı (g/bitki)	107.33	64.92	ÖD
Kök kuru ağırlığı (g/bitki)	3.16	1.08	ÖD
Yaprak kuru ağırlığı (g/bitki)	13.83	9.02	ÖD
Yaprak hariç sürgün kuru ağırlığı (g/bitki)	8.33	5.16	ÖD
Toplam yaş ağırlık (g/bitki)	293.98	179.44	ÖD
Toplam kuru ağırlık (g/bitki)	25.31	15.26	ÖD

ÖD: ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemli değil.

İkinci dönem tekrar kurulan denemeye ait istatistiksel veriler aşağıda sunulmuştur. Kaynak çeşit ile gen aktarılmış hattın T2 bitkilerinde; kotiledonda beneklenme, yaprak ayasında kabarcıklık, yaprak ayasında beneklilik, meyve kabuğunda yivlilik, meyve kabuğunda çizgililik, meyve kabuğunda damarlılık, tohum kabuğunda ikincil renk, tohum hilumda leke, tohum kenarında leke olmadığı saptanmıştır. Meyvenin meyve sapına bağlandığı yerin şekli yüzeysel, tohum kabuğunun zemin rengi kahverengi, ploidi düzeyi diploid, bitkinin çiçek yapısı monoik, bitkinin gelişme tabiatı kol atarak olduğu gözlem yapılarak belirlenmiş ve kaynak çeşit ile gen aktarılmış hattın T2 bitkileri arasında fark olmadığı saptanmıştır.

İkinci denemede, transgenik (5.35 cm) olan bitkilerin kaynak (4.94 cm) bitkilere göre %7.6 daha fazla hipokotil uzunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6.). Onsinejad (1993), cam serada yaptığı çalışmada, Crimson Sweet çeşidinin hipokotil uzunluğunun 4.49 cm olduğunu belirlemiştir.

Kotiledon şekli, genişliği ve uzunluğu bakımından kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 genotipleri arasındaki farkın, istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin fide ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Hipokotil uzunluğu (cm)	4.94 b	5.35 a	0.308
Kotiledon şekli	1.42	1.50	ÖD
Kotiledon genişliği (cm)	1.71	1.77	ÖD
Kotiledon uzunluğu (cm)	2.14	2.38	ÖD

Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemlidir. ÖD: ortalamalar arasındaki fark önemli değil.

Gövde kalınlığı, gövde uzunluğu, gövde boğum sayısı ve kol sayısı bakımından, kaynak ve gen aktarılmış genotipler arasında istatistiksel açıdan önemli farklar bulunmamıştır (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin gövde ve kol ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Gövde kalınlığı (mm)	8.49	8.75	ÖD
Gövde uzunluğu (cm)	218.17	219.92	ÖD
Gövde boğum sayısı (adet)	30.50	30.46	ÖD
Kol sayısı (adet)	11.38	10.92	ÖD

ÖD: ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemli değil.

Yaprak ile ilgili yapılan gözlemlerden (Çizelge 4.8.) elde edilen sonuçlara göre; yaprak ayasında ikincil loblanma derecesi, yaprak ayası uzunluğu, yaprak ayası genişliği, yaprak ayası rengi L^* , a^* , b^* , C^* , h^o değerleri, yaprak alanı, yaprak sapı uzunluğu bakımından kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış genotipler arasında istatistiksel açıdan önemli farklar tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.8. İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin yaprakla ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Yaprak ayasında ikincil loblanma derecesi	2.40	2.48	ÖD
Yaprak ayası uzunluğu (cm)	11.18	11.18	ÖD
Yaprak ayası genişliği (cm)	10.85	10.92	ÖD
Yaprak ayası rengi L^* değeri	42.42	42.16	ÖD
Yaprak ayası rengi a^* değeri	-16.94	-17.18	ÖD
Yaprak ayası rengi b^* değeri	19.18	19.41	ÖD
Yaprak ayası rengi C^* değeri	25.62	25.94	ÖD
Yaprak ayası rengi h^o değeri	131.88	132.04	ÖD
Yaprak alanı (cm ² /bitki)	7500	4516	ÖD
Yaprak sapı uzunluğu (cm)	6.96	7.04	ÖD

ÖD: ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemli değil.

Kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış genotip bitkilerinde çiçekle ilgili özellikler (Çizelge 4.9.) incelendiğinde; ilk erkek çiçeğin oluşum süresi, ilk erkek çiçeğin oluştuğu boğum sayısı, ilk dişi çiçeğin oluşum süresi, ilk dişi çiçeğin oluştuğu boğum sayısı, dişi çiçek taç yaprak yüksekliği, dişi çiçeğin taç yaprağının uç şekli, erkek çiçek taç yaprak genişliği, çiçek tozu canlılığı, çiçek tozu çimlenme oranı, yumurtalık uzunluğu, yumurtalık genişliği ve yumurtalıkta tüylülük durumu bakımından söz konusu genotipler arasında farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.9. İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin çiçekleriyle ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
İlk erkek çiçeğin oluşum süresi (gün)	32.25	32.29	ÖD
İlk erkek çiçeğin oluştuğu boğum sayısı (adet)	10.33	11.00	ÖD
İlk dişi çiçeğin oluşum süresi (gün)	32.96	33.21	ÖD
İlk dişi çiçeğin oluştuğu boğum sayısı (adet)	14.67	15.00	ÖD
Dişi çiçek taç yaprak yüksekliği (mm)	10.70	10.90	ÖD
Dişi çiçeğin taç yaprağının uç şekli	2.35	2.21	ÖD
Erkek çiçek taç yaprak genişliği (mm)	19.60	19.04	ÖD
Çiçek tozu canlılığı (%)	92.60	93.53	ÖD
Çiçek tozu çimlenme oranı (%)	68.12	78.57	ÖD
Yumurtalık uzunluğu (mm)	2.95	2.97	ÖD
Yumurtalık genişliği (mm)	3.40	3.43	ÖD
Yumurtalık tüylülüğü	2.08	2.13	ÖD

ÖD: ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemli değil.

Meyvelerle ilgili özelliklerden (Çizelge 4.10.) meyve kabuk kalınlığında yapılan ölçümlerin istatistiksel analizi sonucunda, kaynak (7.79 mm) bitki meyvelerinin transgenik bitki meyvelerine (7.17 mm) oranla %7.9 daha kalın kabuklu olduğu belirlenmiştir. Derim olumunda meyve eti sertliği bakımından söz konusu genotipler karşılaştırıldığında, kaynak (7.26 Newton) çeşitte meyve eti sertliğinin transgenik (7.75

Newton) olan meyvelere göre %6.3 oranında düşük olduğu saptanmıştır. Ancak, kaynak (2.39 cm) bitki meyvelerinin transgenik bitki meyvelerine (2.13 cm) nazaran %10.8 daha uzun saplı olduğu bulunmuştur. Kaynak bitki meyvelerinin (6.50 mm), transgenik bitki meyvelerinden (7.26 mm) %10.4 oranında daha küçük mühür büyüklüğüne sahip olduğu belirlenmiştir. Transgenik bitkilerin meyvelerine (19.49) ait meyve et rengi a^* değerinin kaynak bitkilerin meyvelerine (18.02) göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum transgenik bitkilerin meyve et renginin daha kırmızı rekli olduğunu göstermektedir. Kaynak bitkilerin meyvelerinin kabuğundaki koyu yeşil şerit rengi (-16.39) a^* değeri transgenik bitkilerin meyvelerine (-17.82) kıyasla yüksek bulunmuştur. Bu durum meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi h° değeri ile beraber yorumlandığında kaynak bitkilerin meyve kabuk renginin daha yeşil olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.10.). Yalçın-Mendi ve ark. (2009), transgenik Kırkağaç 637 kavun çeşidi ve kontrol bitkilerinde yapmış oldukları çalışmada, kabuk kalınlığı, meyve sapının boyu ve mühür çapı bakımından fark saptamamışlardır.

Dikim-meyve olgunluk süresi, meyve şekli, meyve eni, meyve boyu, meyve ağırlığı, meyve kaide kısmının şekli, meyvenin meyve sapına yakın kısmının şekli, meyvede tohum sayısı, meyve sapı kalınlığı, meyve sapının meyveye bağlandığı yerin büyüklüğü, tohum ağırlığı, ortalama tohum ağırlığı, meyve kabuk açık yeşil şerit rengi L^* , a^* , b^* , C^* , h° değerleri, meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi L^* , b^* , C^* , h° değerleri ve meyve et rengi L^* , b^* , C^* , h° değerleri, titre edilebilir asit içeriği, SÇKM ve meyve suyu pH değeri bakımından genotipler istatistiksel açıdan farklı bulunmamıştır (Çizelge 4.10.). Fukuoka ve ark. (2009), karpuz meyvesinde 3 farklı film (polietilen, kızıl ötesi ışıkları bloklayan ve siyah naylon tül) ile yaptıkları çalışmada, meyve sıcaklığı arttıkça meyve büyümesinin hızlandığını ancak şeker içeriğinin düştüğünü saptamışlardır. Yürüttüğümüz çalışmada benzer şekilde SÇKM miktarının düşük çıkmasının nedeni, meyve olgunluk ve hasat döneminde sera sıcaklığının yüksek oluşundan kaynaklanmış olabilir.

Yalçın-Mendi ve ark. (2009), transgenik Kırkağaç 637 kavun çeşidi ile yapmış oldukları çalışma sonucunda, meyve ağırlığı, meyve çapı, meyve yüksekliği ve toplam asitlik bakımından farklılık tespit ederken, suda çözünebilir kuru madde, L-askorbik asit, malik asit, sitrik asit, sakkaroz, glikoz ve fruktoz açısından istatistiki olarak fark bulmadıklarını bildirmektedirler.

Çizelge 4.10. İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin olgunluk ve meyveler ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Dikim- meyve olgunluk süresi (gün)	90.55	92.00	ÖD
Meyve şekli	2.52	2.65	ÖD
Meyve eni (cm)	13.24	13.24	ÖD
Meyve boyu (cm)	14.52	13.32	ÖD
Meyve ağırlığı (kg)	1.42	1.24	ÖD
Meyve kaide kısmının şekli	3.67	3.77	ÖD
Meyvenin meyve sapına yakın kısmının şekli	3.54	3.69	ÖD
Meyve kabuk kalınlığı (mm)	7.79 a	7.17 b	0.523
Derim olumunda meyve eti sertliği (Newton)	7.26 b	7.75 a	0.037
Meyvede tohum sayısı (adet)	66.86	46.02	ÖD
Meyve sapı uzunluğu (cm)	2.39 a	2.13 b	0.182
Meyve sapı kalınlığı (mm)	7.44	7.65	ÖD
Meyve sapının meyveye bağlandığı yerin büyüklüğü (mm)	15.82	16.07	ÖD
Meyve mühür büyüklüğü (mm)	6.50 b	7.26 a	0.724
Tohum ağırlığı (g)	0.30	0.31	ÖD
Ortalama tohum ağırlığı (mg)	29.57	28.32	ÖD
Meyve kabuk açık yeşil şerit rengi L* değeri	66.04	64.87	ÖD
Meyve kabuk açık yeşil şerit rengi a* değeri	-16.27	-18.07	ÖD
Meyve kabuk açık yeşil şerit rengi b* değeri	26.06	28.27	ÖD
Meyve kabuk açık yeşil şerit rengi C* değeri	30.78	33.23	ÖD
Meyve kabuk açık yeşil şerit rengi h° değeri	122.00	122.62	ÖD
Meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi L* değeri	41.65	41.23	ÖD
Meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi a* değeri	-16.39 a	-17.82 b	1.385
Meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi b* değeri	20.90	23.25	ÖD
Meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi C* değeri	26.58	29.30	ÖD

Çizelge 4.10. (Devam) İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin olgunluk ve meyveler ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi h° değeri	128.49	127.67	ÖD
Meyve et rengi L^* değeri	42.70	42.46	ÖD
Meyve et rengi a^* değeri	18.02 b	19.49 a	0.672
Meyve et rengi b^* değeri	14.94	16.00	ÖD
Meyve et rengi C^* değeri	23.45	25.24	ÖD
Meyve et rengi h° değeri	39.44	39.20	ÖD
Titre edilebilir asit içeriği (%)	0.15	0.15	ÖD
SÇKM (%)	7.17	7.62	ÖD
Meyve suyu pH değeri	5.14	5.16	ÖD

Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemlidir. ÖD: ortalamalar arasındaki fark önemli değil.

Kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış genotip bitkilerinde yaş ağırlık ve kuru ağırlıkla ilgili ölçümlerin istatistiksel analiz sonuçlarına göre genotiplerin farksız oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin kuru ve yaş ağırlık ile ilgili parametrelere ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Kök yaş ağırlığı (g/bitki)	29.70	33.45	ÖD
Yaprak yaş ağırlığı (g/bitki)	157.36	135.55	ÖD
Yaprak hariç sürgün yaş ağırlığı (g/bitki)	225.95	219.32	ÖD
Kök kuru ağırlığı (g/bitki)	1.60	1.37	ÖD
Yaprak kuru ağırlığı (g/bitki)	13.17	12.64	ÖD
Yaprak hariç sürgün kuru ağırlığı (g/bitki)	13.47	12.20	ÖD
Toplam yaş ağırlık (g/bitki)	413.01	388.31	ÖD
Toplam kuru ağırlık (g/bitki)	28.24	26.22	ÖD

ÖD: ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemli değil.

Toplam verim (kg/m² ve kg/bitki) bakımından kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 genotipleri arasındaki fark, istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.12.).

Çizelge 4.12. İkinci denemede, Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin toplam verim ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Toplam verim (kg/m ²)	1.90	1.68	ÖD
Toplam verim (kg/bitki)	1.42	1.26	ÖD

ÖD: ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemli değil.

Kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 genotipleri ile yürütülen ilk denemede toplam 36 özellik incelenmiştir. Hipokotil uzunluğu, kotiledon genişliği, kotiledon uzunluğu ve yaprak ayası genişliği olmak üzere 4 tane özellik bakımından istatistik analiz sonucunda genotipler arasında farklılık tespit edilmiştir.

Kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 genotipleri ile yürütülen ikinci deneme kapsamında toplam 88 özellik incelenmiştir. Hipokotil uzunluğu, meyve kabuk kalınlığı, derim olumunda meyve eti sertliği, meyve sapı uzunluğu, meyve mühür büyüklüğü, meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi a* değeri ve meyve et rengi a* değeri olmak üzere 7 tane özellik açısından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Shewry ve ark. (2007), genetiği değiştirilmiş buğday ve geleneksel yetiştirilen buğday genotiplerinin kompozisyon ve performanslarının karşılaştırılması amacıyla yürüttükleri çalışmada, transgenik ve kontrol hatların benzer özellik gösterdiğini belirlemişlerdir. Geleneksel yetiştirilen buğday çeşitlerine eşdeğer genetiği değiştirilmiş buğday hatlarının geliştirilmesinin mümkün olduğunu saptamışlardır.

4.3. ZYMV-CP Geni Aktarılmış ve Aktarılmamış Crimson Sweet Genotiplerinin ZYMV İle İnokule Edilerek Kıyaslanması

Kurulan başka bir denemeye ZYMV-CP genini taşıyan (PCR pozitif) bitkilerin ZYMV Türkiye izolatına karşı dayanıklılığını belirlemek amaçlanmıştır. ZYMV inokule edilen kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış genotiplerde, yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, meyve et rengi L*, a*, b*, C* ve h° değerleri, titre edilebilir asit içeriği, meyve suyu pH değeri, SÇKM ve toplam verim ile ilgili özellikler açısından, kaynak ve gen aktarılmış bitkiler arasında istatistiksel açıdan genotipler arasında farklılık saptanmamıştır (Çizelge 4.13.).

Çizelge 4.13. ZYMV inokule edilen Crimson Sweet kaynak (CSK) ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 (CST) genotiplerinin, meyve et rengi, titre edilebilir asit içeriği, meyve suyu pH değeri, SÇKM ve toplam verim ile ilgili parametrelerine ait ortalama değerleri

Özellikler	Genotipler		LSD (%5)
	CSK	CST	
Meyve et rengi L* değeri	40.35	36.30	ÖD
Meyve et rengi a* değeri	19.59	18.68	ÖD
Meyve et rengi b* değeri	16.54	15.92	ÖD
Meyve et rengi C* değeri	25.67	24.62	ÖD
Meyve et rengi h° değeri	40.16	37.81	ÖD
Titre edilebilir asit içeriği (%)	0.16	0.16	ÖD
Meyve suyu pH değeri	5.09	5.10	ÖD
Suda çözülebilir kuru madde miktarı (%)	6.99	7.19	ÖD
Toplam verim (kg/m)	2.13	1.66	ÖD
Toplam verim (kg/bitki)	1.60	1.24	ÖD

ÖD: ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde LSD testine göre önemli değil.

PCR ve Southern Blot testlerine göre T1 ve T2 generasyon bitkilerinin ZYMV-CP genini taşıdığı belirlenmiştir. Ancak yukarıda belirtildiği gibi gen aktarılmış T2 generasyon bitkileri ile kontrol bitkilerinin ZYMV inokulasyonu yapıldıktan sonra benzer semptomları göstermeleri ve incelenen özellikler bakımından aralarında önemli

farklılıkların belirlenmemesi aşağıda belirtilen ihtimalleri olası kılmaktadır. Bu ihtimaller; izolatin saf olmaması, mekanik inokulasyon, Amerika'daki ZYMV orjininin farklılığı ya da genin; 1) Promoturun veya aktarılan T-DNA'nın metilasyonu, 2) T-DNA'nın bitki genomu ile integrasyonu sırasında eksik yerleşmesi, 3) Aktarılan gen ile bitki genomunda bulunan diğer genlerle etkileşim sonucu gen inaktivasyonu gibi nedenlerden bir veya bir kaçına bağlı olarak ekspres olmadığı varsayılabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bilimsel temele dayanmayan ancak son yıllarda tüketicilerde transgenik ürünlere karşı oluşan endişelerin yerinde olup olmadığını belirlemek açısından, rekombinant DNA teknolojisi ile gen aktarma sonucu elde edilen transgenik hat/ların ve gen aktarılmamış aynı çeşitlerin morfolojik, pomolojik, büyüme ve verim özelliklerinin belirlenmesi, aralarında gen profili değişimi bakımından fark olup olmadığının saptanması büyük önem arz etmektedir. Yürüttüğümüz çalışma kapsamında kurulan ilk denemeye, ZYMV-CP geni aktarılarak elde edilen Crimson Sweet karpuz hattının T1 ve T2 (CST) generasyonları ile gen aktarılmamış aynı çeşidin (CSK) bitkileri, ZYMV bulaştırılmadan belirtilen özellikler açısından kıyaslanması ele alınmıştır. Yürütülen deneme kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Kaynak ve transgenik genotiplerden izole edilen DNA ile yapılan PCR sonucunda; kaynak bitkilerin ZYMV-CP genini taşımadığı ve T1 generasyonunda ZYMV-CP genini taşıyan bitkilerin oranının %71.25, T2 generasyonunda ise bu oranın %83.33 olduğu belirlenmiştir.
2. Crimson Sweet kaynak ve transgenik hattın T2 bitkilerinde, ZYMV-CP geninin var olup olmadığı Southern blot testi ile teyit edilmiştir. Yapılan hibridizasyon sonucunda, kaynak bitkilerin DNA'sının hibridize olmadığı, ZYMV-CP geni aktarılan transgenik Crimson Sweet T2 DNA'sının ise 3 farklı yerde hibridize olduğu, dolayısıyla geni 3 kopya olarak taşıdığı belirlenmiştir.
3. Bu çalışmada, iki farklı tarihte T1 ve T2 bitkileriyle deneme gerçekleştirilmiştir. Birinci ve ikinci denemede, transgenik olan bitkilerin hipokotil uzunluğunun kaynak bitkilere kıyasla sırasıyla %18 ve %7.6 daha uzun olduğu saptanmıştır. T1 bitkileriyle gerçekleştirilen denemede, kotiledon genişliği ve kotiledon uzunluğu bakımında transgenik bitkilerin kaynak bitkilere göre sırasıyla %16.95 ve %16.48 daha düşük olduğu belirlenmiştir. Transgenik bitkilerin yaprak ayası genişliğinin, kaynak bitkilerden %7.2 daha geniş olduğu saptanmıştır. T2 bitkileriyle kurulan denemede, meyve eti sertliği ve meyve mühür büyüklüğü açısından kaynak bitki meyvelerinin transgenik bitki meyvelerinden sırasıyla %6.3 ve %10.4 daha düşük değerlere sahip oldukları saptanmıştır. Kabuk

kalınlığı ve meyve sapı uzunluğu özelliklerinde, kaynak bitkiler transgenik bitkilere oranla %7.9 ve %10.8 daha yüksek değerler almışlardır. Transgenik bitkilerin meyvelerine ait meyve et rengi a^* değerinin kaynak bitkilerin meyvelerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum transgenik bitkilerin meyve et renginin daha kırmızı renkli olduğunu göstermektedir. Kaynak bitkilerin meyvelerine ait meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi a^* değeri transgenik bitkilerin meyvelerine kıyasla yüksek bulunmuştur. Bu durum meyve kabuk koyu yeşil şerit rengi h^o değeri ile beraber yorumlandığında kaynak bitkilerin meyve kabuk renginin daha yeşil olduğunu göstermektedir.

4. Kurulan başka bir denemeye, yapay inokulasyonla ZYMV bulaştırılan ZYMV-CP genini taşıyan ve taşımayan bitkiler, bazı kalite ve verim özellikleri açısından karşılaştırılmıştır. Bu denemeden elde edilen verilerin istatistik analiz sonucuna göre, meyve et rengi, titre edilebilir asit içeriği, meyve suyu pH değeri, SÇKM ve toplam verim ile ilgili özellikler açısından, kaynak ve gen aktarılmış bitkiler arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır.

Kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış T1 genotipleri ile yürütülen denemede toplam 36 özellik incelenmiş ve yukarıda belirtilen 4 özellik bakımından istatistiksel açıdan genotipler farklı bulunmuştur. Kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 genotipleri ile yürütülen deneme kapsamında toplam 88 özellik incelenmiş ve yukarıda belirtilen 7 özellik bakımından genotipler arasında farklılık saptanmıştır. Daha sağlıklı sonuç alabilmek amacıyla her iki dönem kurulan denemelerde ortak incelenmeyen özelliklerin daha sonraki çalışmalarda tekrar edilmesi gerekmektedir.

Yürüttüğümüz bu çalışmanın, cam serada saksı denemesi olması ve sera üst havalandırmasının 50 mesh'lik tül ile kapalı olmasına bağlı olarak sera içinde arı faaliyetinin çok düşük olması nedeniyle, meyve oluşumu konusunda sıkıntılar yaşanmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda, böyle bir denemenin tül sera (screenhouse) koşullarında ya da mesafe izolasyonu yapılmış tarla koşullarında yürütülmesinin meyve oluşumundaki sıkıntıyı ortadan kaldırması nedeniyle fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Yapay inokulasyonla ZYMV bulaştırılan ZYMV-CP genini taşıyan ve taşımayan bitkilerle yürütülen denemede, genotipler arasında önemli farklar çıkmaması;

izolatın saf olmaması, mekanik inokulasyon, Amerika'daki ZYMV'nin orjininin farklılığı ya da gen inaktivasyonu gibi nedenlerden kaynaklanabileceği varsayılmaktadır.

Kaynak ve ZYMV-CP geni aktarılmış T2 genotipleri ile yürütülen deneme kapsamında toplam 88 özellik incelenmiş ve 7 özellik bakımından genotipler arasında farklılık belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç literatür bilgileriyle uyum içindedir. Genotipler arasında oluşan farklılıkların bazıları olumlu bazıları olumsuz yönde gerçekleşmiştir. Meyve mühür büyüklüğü bakımından, transgenik bitkiler daha yüksek değer alarak olumsuz yönde özellik göstermiştir. Ancak, transgenik bitki meyveleri daha ince kabuk, sert meyve eti ve yüksek meyve et rengi a* değeri oluşturarak olumlu yönde değişim göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Accotto, G.P., Nervo, G., Acciarri, N., Tavella, L., Vecchiati, M., Schiavi, M., Mason, G., Vaira, A.M., 2005. Field evaluation of tomato hybrids engineered with *Tomato spotted wilt virus* sequences for virus resistance, agronomic performance and pollen-mediated transgene flow. **The American Phytopathological Society**, 95(7):800-7.
- Agarwal, PK., Agarwal, P., Reddy, MK., Sopory, SK., 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, 25(12):1263-1274.
- Anonim, 1998. Karpuz özellik belgesi. **Resmi Gazete**. 23491: 177.
- Anonim, 2002. Tarımsal değerleri ölçme denemeleri teknik talimatı. **Sebze II. tarım ve köy işleri bakanlığı, koruma ve kontrol genel müdürlüğü, tohumluk tescil ve sertifikasyon merkezi müdürlüğü**, 21-24.
- Anonim, 2010. Wikipedia ansiklopedi.
http://tr.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCrkiye_n%C3%BCfusu#Demografi.
Erişim: 28 Mayıs 2010.
- Anonymous, 2003. Lycopene. Erişim: 22 May 2003 <http://www.lycopene.org>.
- Anonymous, 2008. Minimum descriptors for Cucurbita spp., cucumber, melon and watermelon.
www.ecpgr.cgiar.org/Workgroups/Cucurbits/Cucurbits_DescriptorLists.pdf.
Erişim: 03 Haziran 2010.
- Anonymous, 2010. Watermelon Cultivars.
<http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/wmelon/wmcultc.html>. Erişim: 03 Haziran 2010.
- Batista, R., Saibo, N., Lourenc, T., Oliveira, M.M., 2008. Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 105(9):3641.
- Bek, Y., Efe, E., 1989. **Araştırma ve deneme metotları I. Çukurova üniversitesi Ziraat Fakültesi ders kitabı**, no:71. Ç.Ü Ziraat Fakültesi ofset ve teksir atölyesi, 395s, Balcalı/Adana.
- Clough, G. H., and Hamm, P.B., 1995. Coat protein transgenic resistance to watermelon mosaic and *Zucchini yellow mosaic virus* in squash and cantaloupe. **Plant Disease**, 79:1107-1109.
- Çalışkan, AF., 2007. Kabak sarı mozayik virüsü (*Zucchini Yellow Mosaic Virus*, ZYMV)' nün tanısı ve bitki aktivatörleri kullanılarak mücadele olanaklarının araştırılması. ÇÜ Ziraat Fak. Bit. Koruma Anabilim Dalı, **Yüksek Lisans Tezi**, 106s.
- Çetiner, S., 2004. Tarımsal biyoteknoloji ve gıda güvenliği:sorular ve öneriler. **Modern biyoteknoloji, genetiği değiştirilmiş organizmalar ve gıda güvenliği konferans notları (GDO gerçeği)**, 6 Aralık, 144s, İstanbul.
- Çürük, S., Çetiner, S., Gaba, V., Yalçın-Mendi, Y., 2007. Bazı karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) çeşitlerinin *in vitro* regenerasyonu ve genetik transformasyonu ile bitki biyoteknolojisi öğretiminin geliştirilmesi. **DPT Projesi** no: 03K120860. Ara raporları.

- Çürük, S., Meşe, E., 2009. Kabak sarı mozayik virüsü kılıf protein (ZYMV-CP) geni aktarılan karpuz hatlarının kaynak çeşitlerle karşılaştırılması. **Bilimsel Araştırma Projeleri** (proje no: 09M012).
- Dalal, M., Dani, R.G., Kumar, P.A., 2006. Current trends in the genetic engineering of vegetable crops. **Scientia Horticulturae**, 107: 215–225.
- Değirmenci, K., Güldür, M.E., 2006. Hıyarlarda zucchini yellow mosaic virüs (ZYMV)'ün çapraz koruma (cross protection) ile kontrolü. **Bitki Koruma Bülteni**, 46 (1-4): 13-23.
- Domingo, J. L., 2007. Toxicity studies of genetically modified plants: a review of the published literature. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47:721-733.
- EC, 2001, Directive 2001/18/EC of the European parliament and of the council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. **Official Journal of the European Communities**, L106:1–39.
- Eldoğan, S., 2008. Karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum ve Nakai)'a vat (*Aphis gossypii*'ye Dayanıklılık) geninin aktarılması ve transformasyon etkinliğinin araştırılması. ÇÜ Biyoteknoloji Anabilim Dalı, **Yüksek Lisans Tezi**, 69s.
- Ertuğrul, A., 2008. **Türkiye'de GDO'lu ürünlerin mevcut durumu**. III. Tarımsal biyoteknoloji kongresi. 11 Eylül 2008, Sabancı Üniversitesi, Tuzla, İstanbul.
- Fang, G., Grumet, R., 1993. Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene. **The American Phytopathological Society**, 358-367p.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2010. FAOSTAT. Statistics database (Agriculture data). <http://faostat.fao.org>. Erişim: 03 Haziran 2010.
- Fuchs, M., Gonsalves, D., 1995. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Watermelon mosaic virus 2* to mixed infections by both potyviruses. **Bio/technology**, 13:1468-1470.
- Fuchs, M., Gonsalves, D., 2007. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment studies. **Annual Review of Phytopathology**, 45:173-202.
- Fuchs, M., McFerson, JR., Tricoli, DM., McMaster, JR., Deng, RZ., Boeshore, ML., Reynolds, JF., Russel, PF., Quemada, HD., Gonsalves, D., 1997. Cantaloupe line CZW-30 containing coat protein genes of *Cucumber mosaic virus*, *Zucchini yellow mosaic virus*, and *Watermelon mosaic virus-2* is resistant to these three viruses in the field. **Molecular Breeding**, 3(4):279-290.
- Fukuoka, N., Masuda, D., Kanamori, Y., 2009. Effects of temperature around the fruit on sugar accumulation in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) during the latter half of fruit developmental period. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, 78 (1): 97–102.
- Garster, H., 1997. The potential role of lycopene for human health. **Journal of the American College of Nutrition**, 16: 109-126.
- Gusmini, G., Wehner, T.C., 2010. Extraction of DNA from watermelon leaves. Watermelon crops information, cucurbit breeding. <http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/wmelon/wmhndbk/wmgsbdna.html>. Erişim: 03 Haziran 2010.
- Günay, A., 2005. **Sebze yetiştiriciliği, Cilt I**. Meta basım evi, 502s, İzmir.

- Helms, C., 1990. Alkaline lysis minipreps of plasmid or cosmid DNA. http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/plasmid/plsmid05.html. Erişim: 03 Haziran 2010.
- James, C., 2009. Global status of commercialized biotech/GM crops. **International Service For the Acquisition of Agri-biotech Applications**, Briefs No: 41.
- Johnson, S.R., Strom, S., Grillo, K., 2007. Quantification of the impactson us agriculture of biotechnology-derived crops planted in 2006. **National Center For Food and Agricultural Policy**, 1616P street NW Washington, DC 20036.
- Karamanlı, A., 2007. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (KKTC)'nde kabakgil yetiştirilen alanlarda Hıyar mozayik virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV) ve Kabak sarı mozayik virüsü (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)'nün surveyi. ÇÜ Ziraat Fak. Bit. Koruma Anabilim Dalı, **Yüksek Lisans Tezi**, 86s.
- Katis, N.I., Tsitsipıs, J.A., Lykouressıs, D.P., Papapanayotou, A., Margaritopoulos, J.T., Kokımıs, G.M., Perdıkıs, D.CH and Manoussopoulos, I.N., 2006. Transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* by colonizing and non-colonizing aphids in greece and new aphid species vektors of the virus. **Journal of Phytopathology**, 154, 293-302.
- Levi, A., Thomas, C., 1999. An improved procedure for isolation of high quality DNA from watermelon and melon leaves. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, 22:41-42.
- Li, XQ., Stahl, R., Brown, GG., 1995. Rapid micropreps and minipreps of T1 plasmids and binary vectors from agrobacterium-tumefaciens. **Transgenic Research**, 4, 349-351.
- McGuire, R.G., 1992. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, 27(12):1254-1255.
- Onsinejad, R., 1993. Karpuzlarda erkenciliğın kalıtsal yapısı ile minimum gelişme sıcaklığı ve etkili sıcaklık toplamı isteğı üzerine araştırmalar. ÇÜ Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, **Doktora Tezi** (Basılmamış), 376s.
- Özgen, M., Ertunç, F., Kınacı,G., Yıldız, M., Birsin, M., Ulukan, H., Emiroğlu, H., Koyuncu, N., Sancak, C., 2005. Tarım teknolojilerinde yeni yaklaşımlar ve uygulamalar: Bitki biyoteknolojisi. **Türkiye ziraat mühendisleri VI. teknik kongresi**, 1. Cilt, 3-7 Ocak 2005, 315-346.
- Perkins, V.P., 2005. Watermelon and human health. **3rd International Cucurbit Symposium**, 66s, Townsville-Australia.
- Powel-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Beachy, R.N., 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, 232: 738-743.
- Proietti, S., Roupheal, Y., Colla, G., Cardarelli, M., Agazio, MD., Zacchini, M., Rea, E., Moscatello, S., Battistelli, A., 2008. Fruit quality of mini-watermelon as affected by grafting and irrigation regimes. **Journal of Science of Food and Agriculture**, 88:1107-1114.
- Robinson, R.W., Decker-Walters, D.S., 1997. Cucurbits. **CABI International**, 217p.
- Romessar, K., Peremarti, A., Gomez-Galera, S., Naqvi, S., Moralejo, M., Munoz, P., Capell, T., Christou, P., 2007. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. **Transgenic Research**, 16:261-280.

- Rothstein, S. J., Lahners, K. N., Lotstein, R. J., Carozzi, N. B., Jayne, S. M., Rice, D. A., 1987. Promoter cassetts, antibiotic-resistance genes, and vectors for plant transformation. **Gene**, 53: 153-161.
- Sadler, G.O., 1994. Titratable acidity, chapter 6 (Ed: Nielsen SS.Introduction to the Chemical Analysis of Foods), **Jones and Bartlett Publishers**, 81-91s, Borton, USA.
- Shewry, P.R., Baudo, M., Lovegrove, A., Powers, S., Napier, J. A., Ward, J.L., Baker, J.M., Beale, M.H., 2007. Are GM and conventionally bred cereals really different? **Trends in Food Science & Technology**, 18: 201-209.
- Splittstoesser, WA., 1990. Vegetable growing handbook: organic and traditional methods. Third edition, ITP international thomson publishing. 7625 **Empire Drive**, 36s, Florence.
- Summers, C.G., Stapleton, J.J., Newton, A.S., Duncan, R. A., and Hart, D., 1995. Comparison of sprayable and film mulches in delaying the onset of aphid-transmitted virus diseases in zucchini squash. **Plant Disease**, 79:1126-1131.
- Şensoy S, A., Ercan, N., Ayar, F., Temirkaynak, M., 2003. Cucurbitaceae familyasındaki bazı sebze türlerinde çiçek tozlarının bazı morfolojik özellikleri ile canlılıklarının belirlenmesi. **Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 16(1),1-6.
- Trewavas, A., 2008. The cult of the amateur in agriculture threatens food security. **Trends in Biotechnology**, 475-478.
- TUİK, 2002-2006. TUİK (Türkiye İstatistik Kurumu), <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim: 03 Haziran 2010.
- TUİK, 2010. TUİK (Türkiye İstatistik Kurumu), <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim: 03 Haziran 2010.
- Wise, AA., Liu, Z., Binns, AN., 2006. Nucleic acid extraction from *Agrobacterium* strains. **Methods in Molecular Biology**, 343:67-76.
- Yalçın-mendi, Y., Sarı, N., Akyıldız, A., Solmaz, İ., Ünek, C., Özkaya, O., Serçe, S., 2009. Determination of gene escape and fruit quality characteristics in transgenic melon (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*). **Turkish Journal Of Agriculture And Forestry**, 34:135-143.
- Yardımcı, N., Korkmaz, S., 2004. Studies on spread and identification of *Zucchini yellow mosaic virus* disease in the north-west mediterranean region of Turkey by biological indexing and double-stranded RNA analysis. **Plant Pathology Journal**, 3 (1): 1-4.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve yazım aşamasında yönlendirici katkılarıyla desteğini bulduğum danışman hocam, sayın Doç. Dr. Sebahattin ÇÜRÜK'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar, arazi çalışmalarım ve tez yazım aşamasında, kısaca yüksek lisans eğitimim boyunca, her anlamda tam destek aldığım fen bilgisi öğretmeni sayın İsmail HARNUBOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

ZYMV izolatu teminini sağlayan Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümünden sayın Yrd. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

İstatistiksel analizlerim sırasında ilgi ve görüşlerini eksik etmeyen hocam sayın Doç. Dr. Elif ÇANDIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım aşamasında yardımını esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. Sedat SERÇE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım boyunca desteğini gördüğüm sayın hocam Arş. Gör. Ercan YILDIZ'a ve sayın hocam Dr. Oğuzhan ÇALIŞKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

X-Ray filmlerinin görüntülenmesi aşamasında, özveriyle yaklaşan Hatay Devlet Hastanesi Emar Merkezi çalışanlarından radyoloji teknisyeni sayın Kenan GÖRGEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım aşamasında katkılarını esirgemeyen fen bilgisi öğretmeni sayın Fırat DUMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında değerli katkılarını esirgemeyen İngilizce öğretmeni sayın Yeliz SÖNMEZ ÖZYURT'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında görüş ve katkılarını esirgemeyen sayın Öğretim Görevlisi Emre İLHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim sırasında ve hayatımın her aşamasında maddi-manevi destek sağlayan, çok sevdiğim annem Besra MEŞE, babam Çetin MEŞE, kardeşlerim Emre MEŞE ve Beste MEŞE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılı Diyarbakır/Ergani doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Antalya'da tamamladım. 2003 yılında girdiğim Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden, 2007 yılında Ziraat Mühendisi unvanıyla mezun oldum. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim dalında başladığım yüksek lisans öğrenimimi tez yazım aşamasıyla sürdürmekteyim.

EKLER

EK 1: Karpuzda az miktarda (miniprep) genomik DNA izolasyon protokolü

Kullanılan kimyasallar ve hazırlanması:

Ön izolasyon solüsyonu (250 ml): 85 ml steril ultra saf su, 6.25 g CTAB (Merck, 1.02342.0100), 70 ml 5 M NaCl, 25 ml 1 M Tris-Cl (pH: 8.5), 10 ml 0.5 M EDTA (pH: 8) dereceli cam şişede yaklaşık 2 saat boyunca çalkalandıktan sonra, 1.25 g N-Lauroylsarcosine eklenerek tekrar karıştırılmıştır. 250 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanmıştır.

İzolasyon solüsyonu (6 örnek için): Ön izolasyon solüsyonu 10 dakika süreyle 60°C'de bekletilmiştir. 7.5 ml ön izolasyon solüsyonu, 75 mg PVP (Sigma, PVP40) ve 75 mg çözünmez PVP (Sigma, P6755) tüpe eklenip vorteks edilerek iyice çözülmüştür. 10 dakika süreyle 60°C'de bekletilmiş, 37.5 µl β-mercaptoethanol eklenerek 10-15 dakika süreyle 60°C'de bırakılmıştır (her kullanım için taze hazırlanmıştır).

EDTA (0.5 M, pH:8): 186,1 g Na₂EDTA.2H₂O, 900 ml steril saf suda manyetik karıştırıcıda karıştırılırken, pH 8'e gelinceye kadar NaOH (yaklaşık 20g) eklenmiş ve 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklav edilmiştir (EDTA, pH:8 oluncaya kadar tamamen erimeyecektir).

Tris-Cl (1M, pH:8.5): 121.1 g Tris base 800 ml steril saf suda eritilmiştir. pH, konsantre HCl ile 8.5'e ayarlanmış ve sıvının oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. 1 litreye tamamlanarak otoklav edilmiştir.

Protokol:

Karpuz bitkisinde genomik DNA izolasyonu gerçekleştirmek için gerekli olan kimyasallar hazırlandıktan sonra aşağıda sırasıyla belirtilen protokol uygulanmıştır:

1. Denemedeki bitkilerden genç yaprak örnekleri alınarak, -86°C'de muhafaza edilmiştir.

2. -86°C'den çıkarılan yaprak örnekleri, sıvı azotla öğütülmüş ve 100 mg yaprak örneği 1.5 veya 2 mililitrelik steril ependorf tüpe eklenmiştir.
3. Hazırlanan izolasyon solüsyonundan 700 µl çekilip, içinde öğütülmüş yaprak örneği bulunan ependorf tüplerine eklenmiş ve kibarca vorteks edilmiştir.
4. Tüpler, 30 dakika süreyle 60°C'de bekletilerek, her 7 dakikada bir güçlü bir şekilde vorteks edilmiştir.
5. Her tüpe 500 µl kloroform-isoamilalkol (24:1) eklenerek, sıvı homojen oluncaya ve renk açık yeşile dönünceye kadar güçlü bir şekilde vorteks edilmiştir. Hemen ardından tüpün kapağı açılarak tüpteki gazın çıkışı sağlanmış ve tüp tekrar kapatılmıştır.
6. Tüpler, 22°C'de 12500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve çökeltinin üstünde kalan sıvı yeni bir steril tüpe aktarılmıştır (yaklaşık 500-550 µl).
7. Her bir tüpe 500-550 µl (ne kadar sıvı çekildiyse) buz ısısında soğuk isopropanol (-20°C) eklenerek, kibarca karıştırılmıştır. Ardından -20°C'de 20 dakika süreyle bekletilmiştir.
8. Daha sonra tüpler, 22°C'de 12500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Çökeltinin üstünde kalan sıvı drene edilip, DNA yumağına 500 µl %70'lik etanol eklenerek yıkanmıştır.
9. Ardından tüpler, 22°C'de 12500 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Çökeltinin üstünde kalan sıvı drene edilip, DNA yumağı oda sıcaklığında çeker ocakta yaklaşık 15-20 dakika kurutulmuştur. DNA yumağı 50 µl 0.1XTE solüsyonunda çözülmüştür.
10. Ve 22°C'de 12500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilip, çökeltinin üzerinde kalan sıvı yeni bir steril tüpe aktarılmıştır.

EK 2: *Agrobacterium tumefaciens*'ten plazmit izolasyon protokolü

Kullanılan kimyasallar ve hazırlanması:

Lysis Solüsyonu (10 ml): 2.0 ml 1 M NaOH ve 0.5 ml %20 SDS, 10 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanmıştır (her kullanım için taze hazırlanmıştır).

GTE Solüsyonu (100 ml): 2.27 ml %40'lık steril glukoz, 2.0 ml 0.5 M EDTA (pH:8) ve 2.5 ml 1 M Tris-Cl (pH:8), 100 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanmıştır (filtre sterilizasyonu yapılarak +4°C'de muhafaza edilmelidir).

3 M Potasyum Asetat (100 ml): 60 ml 5 M potasyum asetat ve 11.5 ml glacial asetik asit, 100 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanmıştır (pH: 4.8 civarında olması gerekiyor, filtre sterilizasyonu yapılarak +4°C'de muhafaza edilmelidir).

Protokol:

Agrobacterium tumefaciens'ten plazmit izolasyonu gerçekleştirmek için gerekli olan kimyasallar hazırlandıktan sonra aşağıda sırasıyla belirtilen protokol uygulanmıştır:

1. 50 mg/L steril kanamycine içeren LB ortamında, 20-24 saat süreyle 28°C'de ve 200 rpm'de geliştirilmiş bakteri kültüründen 5 ml çekilip falkon tüpüne (50 ml'lik) eklenmiştir.
2. Bakteri kültürü, 22°C'de 10000 rcf'de 3 dakika süreyle santrifüj edilip, üstte kalan sıvı drene edilmiştir.
3. Bakteri çöktisinin üzerine 1 ml buz soğukluğunda GTE solüsyonundan eklenerek, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Daha sonra her tüpe 2 ml Lysis solüsyonu eklenerek kibarca karıştırılıp, 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
5. Ardından 3 ml 3M potasyum asetat (-20°C'de 20 dakika bekletilmiş) eklenerek kibarca karıştırılıp, 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 22°C'de 10000 rcf'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir (bu işlem iki kez tekrar edilmiştir).
6. Üstte kalan sıvı fazı 700'er µl olarak çekilip, Fermantasın K0502 nolu kitinin kolon ve tüpüne eklenmiş ve 22°C'de 12000 rpm'de 1dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Kolon tüpünde biriken sıvı drene edildikten sonra işlem tekrar edilmiştir (Üstte kalan sıvı faz bitene kadar bu aşama tekrar edilmiştir).

7. Fermantas'ın kolon ve tüpüne 700  l wash (yıkama) solüsyonundan eklenerek, 22 C'de 12000 rpm'de 45 saniye süreyle santrifüj edilmiştir (Bu yıkama işlemi iki kez tekrar edilmiştir). Kolon tüpünden çıkarılarak yeni bir steril ependorf tüpü içine yerleştirilmiştir.
8. Kolona 25  l steril ultra saf su eklenerek, 2 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir.
9. Ardından 22 C'de 12000 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj edilip, kolon çıkarılıp atılmıştır. Ependorf tüpte kalan DNA -20  C'de muhafaza edilmiştir.

EK 3: Agaroz jelden DNA izolasyon protokolü

Agaroz jelden DNA izolasyonu gerçekleştirmek için, Fermantas'ın K0513 nolu kiti kullanılmış ve aşağıda sırasıyla belirtilen protokol uygulanmıştır:

1. Jelden ZYMV-CP genini izole etmek için söz konusu gen, PCR ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jel elektroforez yapılmıştır.
2. Jelde oluşan 1260 baz çifti civarındaki bant, UV altında incelenmiş ve bisturi yardımıyla kesilip steril ependorf tüpe alınmıştır.
3. Agaroz jelden kestiğimiz jel dilimi ağırlığının 3 misli kadar binding solüsyonu (bağlama solüsyonu) (kitle gelen) eklenerek, 55°C'de 5 dakika süreyle bekletilmiştir.
4. DNA miktarı 2.5 µg'dan daha az ise her bir µg DNA için kitle gelen 5 µl silica powder süspansiyonu eklenmiştir.
5. 55°C'de 5 dakika süreyle bekletilip, bekleme sırasında her 2 dakikada bir vorteks yapılmıştır.
6. 5 saniye süreyle mini spin yapıp, üstte kalan sıvı otomatik pipetle çekilip atılmıştır.
7. 500 µl buz soğukluğunda (buz üzerinde 20 dakika bekletilmiş) kitle gelen washing (yıkama) solüsyonu eklenmiştir. Kibarca vorteks yapılarak DNA'nın tam olarak çözülmesi sağlanmıştır. 5 saniye süreyle mini spin yapıp, üstte kalan sıvı drene edilmiştir. Burada belirtilen yıkama işlemi 3 kez tekrar edilmiştir.
8. DNA yumağı bulunan tüp 22°C'de 13000 rpm'de 30 saniye süreyle santrifüj edilerek üstte kalan sıvı otomatik pipetle çekilip atılmıştır. DNA yumağı 10-15 dakika süreyle çeker ocakta kurumaya bırakılmıştır.
9. DNA yumağına ne kadar silica powder süspansiyonundan eklediysek o kadar miktarda steril ultra saf su eklenerek çözülmüş, ardından 55°C'de 5 dakika süreyle bekletilmiştir.
10. Daha sonra, 22°C'de 13000 rpm'de 30 saniye süreyle santrifüj edilip, üstte kalan sıvı (DNA) yeni bir steril ependorf tüpe alınmıştır.
11. Az miktarda da olsa DNA yumağının kaldığı tüp, tekrar aynı miktarda steril ultra saf suda çözülüp, 55°C'de 5 dakika süreyle bekletilmiştir. 22°C'de 13000

rpm'de 30 saniye süreyle santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı (DNA) başka bir steril ependorf tüpüne alınmıştır.

12. DNA yumağı olan tüp 30 saniye süreyle santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı bir önceki steril ependorf tüpün üzerine eklenmiştir.
13. 10 numaralı aşamada elde edilen DNA yeterli ise sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Gerektiğinde 11-12 numaralı aşamalarda elde edilen DNA'nın konsantrasyonu yeterli ise kullanılabilir veya 10 numaralı aşamada elde edilen DNA tüpü ile birleştirilerek kullanılabilir.

EK 4: Agaroz jelden izole edilen plazmit DNA'sının DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II (Roche, 11585614910) ile non-radyoaktif olarak işaretlenmesi protokolü

DNA'nın, DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II ile işaretlenmesinde, aşağıda sırasıyla belirtilen protokol uygulanmıştır:

1. DNA miktarı 16 µl'de 1 µg plazmit DNA'sı olacak şekilde steril ultra saf su ile seyreltilmiştir.
2. Bu DNA tüpü 100°C su banyosunda 10 dakika süreyle bekletilmiştir.
3. DNA tüpü hemen ardından buz-su banyosuna alınarak yaklaşık 2 dakika boyunca soğutulup (DNA denatüre edildi), mini spin yapılmıştır.
4. Kitte bulunan 1 numaralı tüp, parmakla hafifçe vurularak iyice karıştırılmış ve denatüre edilen DNA tüpüne 4 µl eklenmiştir. 1 saat ya da gece boyunca 37°C'de bekletilmiştir (ideal bekleme süresi 20 saattir). Daha sonra 37°C'de bekletilmiş olan DNA tüpü, 65°C'de 10 dakika süreyle bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur.

Kit kullanılarak tarafımızdan işaretlenen plazmit DNA'sı ile kitle gelen işaretli kontrol DNA'sından 9 adet tüp DNA aşağıda belirtildiği oranlarda seyreltilerek pozitif yüklü naylon membrana 1 µl olarak damlatılmıştır.

Kitte bulunan kontrol DNA'sı için:

Kontrol tüpü 1 (C1): 2 µl DNA (kitteki 2 numaralı tüp) + 8 µl steril ultra saf su (1 ng-DNA/ µl)

Kontrol tüpü 2 (C2): C1'den 5 µl (DNA) + 495 µl steril ultra saf su (10 pg-DNA/ µl)

Kontrol tüpü 3 (C3): C2'den 15 µl (DNA)+ 35 µl steril ultra saf su (3 pg-DNA/ µl)

Kontrol tüpü 4 (C4): C2'den 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su (1 pg-DNA/ µl)

Kontrol tüpü 5 (C5): C3'den 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su (0.3 pg-DNA/ µl)

Kontrol tüpü 6 (C6): C4'den 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su (0.1 pg-DNA/ µl)

Kontrol tüpü 7 (C7): C5'den 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su (0.03 pg-DNA/ µl)

Kontrol tüpü 8 (C8): C6'dan 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su (0.01 pg-DNA/ µl)

Kontrol tüpü 9 (C9): 50 µl steril ultra saf su (0 pg-DNA/ µl)

Tarafımızdan işaretlenen plazmit DNA'sı için:

Plazmit tüpü 1 (P1): 2 µl işaretlenmiş (yukarıda belirtildiği gibi) DNA + 28 µl steril ultra saf su

Plazmit tüpü 2 (P2): P1'den 5 µl (DNA)+ 495 µl steril ultra saf su

Plazmit tüpü 3 (P3): P2'den 15 µl (DNA)+ 35 µl steril ultra saf su

Plazmit tüpü 4 (P4): P2'den 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su

Plazmit tüpü 5 (P5): P3'den 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su

Plazmit tüpü 6 (P6): P4'den 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su

Plazmit tüpü 7 (P7): P5'den 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su

Plazmit tüpü 8 (P8): P6'dan 5 µl (DNA)+ 45 µl steril ultra saf su

Plazmit tüpü 9 (P9): 50 µl steril ultra saf su

Plazmitten çoğaltılan ve yukarıda belirtildiği gibi işaretlenen DNA'nın işaretlenip işaretlenmediğini EK 5'de verilen protokol ile test edilmiştir.

EK 5: DIG ile işaretlenmiş DNA'nın işaretleme etkinliğini belirleme protokolü

Kullanılan kimyasallar ve hazırlanması:

Maleik Asit Solüsyonu (10X) (600 ml): 69.6 g maleik asit ve 52.56 g NaCl, 400 ml steril ultra saf suda çözülmüştür. NaOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve 600 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanmıştır (stok olarak hazırlanmıştır).

Washing (yıkama) Solüsyonu (1 L): 100 ml Maleik asit solüsyonu (10X) ve 3 ml Twin-20, 1 L olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Dideksiyon Solüsyonu (500 ml): 6.05 g Tris-HCl (0.1 M) ve 2.92 g NaCl (0.1 M), 400 ml steril ultra saf suda çözülmüştür. HCl ile pH: 9.5'e ayarlanmış ve 500 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanmıştır.

Bloklama Solüsyonu (40 ml): Kitte bulunan 6 numaralı blok solüsyonu (10X) tüpünden 4 ml çekilmiş ve üzerine 36 ml maleik asit (1X) solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır (her kullanım için taze hazırlanmıştır).

Antibadi Solüsyonu (20 ml): Kitte bulunan 4 nolu antidioksijeni AP solüsyonundan 2 µl çekilmiş, steril ependorf tüpüne boşaltılmış ve ardından 19.998 µl bloklama solüsyonunu eklenerek hazırlanmıştır (her kullanım için taze hazırlanmıştır).

Protokol:

İşaretlenmiş DNA'nın pozitif yüklü naylon membrana aktarılması için, gerekli olan kimyasallar hazırlandıktan sonra, aşağıda sırasıyla belirtilen protokol uygulanmıştır:

1. 24 X 18 cm ebatlarında pozitif yüklü naylon membran kesilmiştir. Seyreltilmiş kontrol DNA ve bizim işaretlediğimiz plazmit DNA tüplerinin her birinden 1µl çekilerek sırasıyla membrana damlatılmıştır.
2. Membran 80°C'ye ayarlı etüvde 15 dakika süreyle bekletilip, Crosslinker'de 120000 µj/cm² enerji uygulanmıştır.
3. Cam bir kabın içine konulan membrana 20 ml maleik asit solüsyonundan dökülüp, 2 dakika boyunca 15-25°C'ye ayarlı çalkalayıcıda çalkalanmıştır.
4. Ardından, yeni bir kaba alınan membrana 20 ml bloklama solüsyonu dökülüp, 30 dakika boyunca 15-25°C'de çalkalanmıştır.

5. Daha sonra yeni bir kaba alınan membrana 20 ml kitle gelen antibadi solüsyonu dökülüp, 30 dakika boyunca 15–25°C’de çalkalanmıştır.
6. Ve yeni bir kaba alınan membrana 10 ml washing (yıkama) solüsyonu eklenip, 15 dakika boyunca 15–25°C’de çalkalanmıştır (Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir).
7. Ardından yeni bir kaba alınan membrana 20 ml dideksiyon solüsyonu eklenip, 3.5 dakika boyunca 15–25°C’de çalkalanmıştır.
8. Kesilen naylon membrandan daha büyük ebatta plastik dosya kesilerek, naylon membran plastik dosyanın arasına yerleştirilmiştir. Burada DNA, üst tarafa gelecek şekilde membrana yerleştirilmiştir. Kitte bulunan 5 nolu şişeden 200 µl çekilip, membranın üzerine eşit bir şekilde damlatılmıştır. Hemen ardından plastik dosya kapatılıp, hava kabarcıkları ve fazla sıvı dışarıya çıkarılmıştır. Membran 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
9. İçinde membranın bulunduğu plastik dosyanın etrafı hava almayacak şekilde bantlanmıştır. İşaretlenmiş DNA’nın membrandaki görüntüsü X-Ray filmine aktarılmıştır.

EK 6: Karpuzda çok miktarda genomik DNA izolasyon protokolü

Kullanılan kimyasallar ve hazırlanması:

Ön izolasyon solüsyonu (250 ml): 6.25 g CTAB, 70 ml 5 M NaCl, 25 ml 1 M Tris (pH: 8.5), 10 ml 0.5 M EDTA'yı dereceli cam şişede yaklaşık 2 saat çalkalandıktan sonra, 1.25 g N-Lauroylsarcosine eklenmiş ve tekrar çalkalanmıştır. 250 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanmıştır.

İzolasyon solüsyonu (2 örnek için): Ön izolasyon solüsyonu 10 dakika süreyle 60°C'de bekletilmiştir. 50 ml ön izolasyon solüsyonu, 500 mg PVP ve 500 mg çözünmez PVP steril bir tüpe eklenerek çözülmüştür. Ardından 250 µl β-mercaptoethanol eklenerek karıştırılmış ve 10 dakika süreyle 60°C'de bekletilmiştir (her kullanım için taze hazırlanmıştır).

Protokol:

Karpuz bitkisinde çok miktarda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirmek için, gerekli olan kimyasallar hazırlandıktan sonra, aşağıda sırasıyla belirtilen protokol uygulanmıştır:

1. Denemedeki bitkilerden genç yaprak örnekleri alınmış ve -86°C'de muhafaza edilmiştir.
2. -86°C'den çıkarılan yaprak örneklerinden 5 g tartılmış ve porselen havanda sıvı azotla öğütülüp, falkon tüpüne konulmuştur.
3. Hazırlanan izolasyon solüsyonundan 25 ml çekilip, falkon tüpüne eklenmiş ve çok güçlü bir şekilde iyice homojen oluncaya kadar vorteks edilmiştir.
4. 60°C su banyosunda 10 dakikada bir çalkalanarak, 30 dakika süreyle bekletilmiştir.
5. Ardından 25 ml kloroform eklenerek güçlü bir şekilde vorteks edilmiş ve kloroformun gazının çıkması için tüpün ağzı açılıp, daha sonra tekrar kapatılmıştır.
6. Ve 4°C'de 1200 rcf'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.
7. Tüpler buzun üzerine yerleştirilmiş ve üstte kalan sıvı yeni bir falkon tüpüne alınmıştır. Tüplere 20 ml soğuk isopropanol (-20°C) eklenerek kibarca ama iyi

bir şekilde karıştırılmıştır. Hemen ardından -20°C 'de 20 dakika süreyle tüpler bekletilmiştir.

8. Daha sonra, 4°C 'de 2200 rpm'de 15 dakika boyunca tüpler santrifüj edilmiştir.
9. Tüpler kibarca drene edilip, DNA yumağı 2000 μl TE solüsyonunda kibarca çözülmüştür (çözülmez ise 15-20 dakika süreyle 37°C 'de bekletilebilir). Her bir mililitresi yeni bir steril ependorf tüpüne aktarılmış ve her bir tüpe 10 μl RNaseA eklenerek, çok kibarca karıştırılmıştır. Ardından 37°C 'de 1 saat süreyle bekletilmiştir.
10. Ve tüpler 22°C 'de 12000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı yeni bir steril ependorf tüpüne alınmıştır.
11. Her tüpe 500 μl kloroform eklenerek tüp tam olarak karıştırılmıştır.
12. Ardından 22°C 'de 12000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı fazı yeni bir steril ependorf tüpe alınmıştır.
13. Her tüpe çektiğimiz üst fazın miktarının %10'u kadar 5 M NaCl eklenmiştir. Çektiğimiz üst fazın miktarının %40'ı kadar isopropanol eklenmiş ve otomatik pipetle kibarca karıştırıldıktan sonra 22°C 'de (laboratuvar sıcaklığında) 20 dakika bekletilmiştir.
14. Tüpler, 22°C 'de 12000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı drene edilmiştir.
15. Çökelen DNA yumağına 1000 μl %100'lük soğuk etanol (-20°C) eklenerek DNA yıkanmıştır.
16. Ve 22°C 'de 12000 rpm'de 3-4 dakika süreyle santrifüj edilerek üstte kalan sıvı tekrar drene edilmiştir.
17. DNA tüpleri çeker ocakta 20 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. DNA 200 μl 0.1X TE solüsyonunda çözülmüştür (çözünmez ise 100'er μl eklenerek en fazla 500 μl 'ye çıkarılabilir).

EK 7: Çok miktarda genomik DNA'nın enzimlerle kesilmesi protokolü

Kaynak ve gen aktarılmış bitkilerden elde edilen 13-17 µg genomik DNA, *XbaI* ve *SacI* enzimleriyle kesilmiştir. Ependorf tüpüne alınan 13-17 µg DNA'ya aşağıda belirtilen şekilde hazırlanan master mix solüsyonu eklenerek otomatik pipetle hafifçe karıştırılmış ve ardından 5 saniye süreyle mini spin yapılmıştır. Enzim eklenen DNA tüpleri 37°C'de 8 saat süreyle bekletilmiştir. Kesme işlemi ürünlerinden 7 µl kesilmiş DNA (4-5 µg) 1X TAE solüsyonu ile 8 saat süreyle 30 voltta koşturularak elektroforez kontrol jeli gerçekleştirilmiştir. Kesme işleminden kalan miktar (9-12 µg DNA) ise, DNA'nın jelden pozitif yüklü membrana aktarılmasında kullanılmıştır.

Master Mix Solüsyonu (22.5 µl) hazırlama (1 tüp için)

15.75 µl Steril ultra saf su

4.5 µl Buffer (enzimin)

2.25 µl Enzim

EK 8: Vacuum blotter ile membrana DNA transferi ve hibridizasyon işlemleri protokolü

Kullanılan kimyasallar ve hazırlanması:

0.5 N NaOH (1L): 20 g NaOH, 1 L olacak şekilde steril ultra saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

0.25 N HCl (1L): 21 ml HCl (%37'lik), 1 L olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır (taze hazırlanmalıdır).

SSC (20X) (1L): 175.3 g NaCl ve 88.2 g sodyum sitrat, 800-900 ml steril ultra saf su içinde çözülmüş ve pH: 7'ye 10 M HCl asitle ayarlanmıştır. Ardından 1 L'ye tamamlanmış ve otoklav edilmiştir.

Protokol:

Blotlama ve hibridizasyon işlemleri için gerekli olan kimyasal çözeltiler hazırlandıktan sonra, DNA transferi vacuum blotter ile aşağıda sırasıyla belirtilen işlemler yapılarak gerçekleştirilmiştir:

1. Enzimlerle kesilen 9-12 µg DNA, 1X TAE solüsyonu ile hazırlanan %1'lik agaroz jelde 8 saat süreyle 30 voltta koşturularak elektroforez yapılmıştır.
2. Koşma işlemi biten jel, cam bir kabın içinde üzeri kaplanacak miktarda steril saf suda, 40-50 rpm'de 10 dakika süreyle çalkalanmıştır.
3. Agoroz jel hazırlanarak, jelde bulunan tarak boşlukları kapatılmıştır.
4. 0.25 N HCl asit, jelin üzerine dökülerek jel yıkanmıştır.
5. Cam bir kabın içinde jel, üzeri kaplanacak miktarda 0.25 N HCl asitte 40-50 rpm'de çalkalayıcıda 15 dakika süreyle çalkalanmıştır.
6. Jel steril saf sudan 2 kez geçirilerek yıkanmıştır.
7. Daha sonra jel cam bir kabın içinde üzeri kaplanacak kadar 0.5 N NaOH eklenmiş ve 40-50 rpm'de 30 dakika süreyle çalkalanmıştır.
8. Jelin ebatlarından 1 cm daha geniş pozitif yüklü naylon membran ve steril filtre kağıdı kesilmiştir.
9. Cam bir kaba steril ultra saf su dökülerek, membran 45°'lik bir açıyla yavaşça suya bırakılarak ıslatılmıştır.
10. SSC (10X) solüsyonu ile hem membran hemde steril filtre kağıdı ıslatılmıştır.

11. Islatılmış olan filtre kağıdı, delikli vakum plakanın tam ortasına (ortası kesilmiş plastik contanın hizasına gelecek şekilde) yerleştirilmiştir.
12. Filtre kağıdının tam üzerine ıslatılmış membran yerleştirilmiştir. Filtre kağıdı ile membranın arasında oluşan hava kabarcıkları steril cam pipet yardımıyla membranın üzerinde gezdirilerek alınmıştır.
13. Rezarvar yüzüğü ıslatılmış peçete ile nemlendirilmiştir.
14. Ortası kesilmiş plastik conta, membran/filtre kağıdının üzerine kenarları en az 0.5 cm kapatacak şekilde yerleştirilmiştir. Oluşan hava kabarcıkları steril cam pipet yardımıyla contanın üzerinde gezdirilerek alınmıştır.
15. Jel, ortası kesilmiş plastik contayı kapatacak şekilde kibarca yerleştirilmiş (kuyular üst tarafa yönelmiş bir şekilde) ve oluşan hava kabarcıkları steril cam pipet yardımıyla jelin üzerinde gezdirilerek alınmıştır.
16. Cihazdaki vakum vanası 5 inç'e ayarlanmıştır (Basınç 10 dakikada stabil duruma geçtiği için 10 dakika süreyle boşken çalıştırılmıştır).
17. 1-1.5 L civarında SSC (10X) transfer solüsyonu kibarca üst rezarvardan jel kapanana kadar dökülmüştür. Transfer işlemi 90 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir.

Transfer işlemi gerçekleştikten sonra jel, 0.5 µg/ml'lik ethidium bromide çözeltisinde 30 dakika bekletilmiş ve görüntüsü alınmıştır. Jelde DNA bandının görülmemesi transferin gerçekleştiğinin göstergesidir. Pozitif yüklü naylon membran SSC (2X) solüsyonunda 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Pozitif yüklü naylon membran 2 adet steril filtre kağıdı arasında 80°C'ye ayarlı etüvde 20 dakika boyunca bekletilmiş ve hemen ardından crosslinker'de 120000 µj/cm² enerji uygulanmıştır. Söz konusu işlemler gerçekleştirildikten sonra aşağıda sırasıyla belirtilen hibridizasyon işlemine geçilmiştir:

1. Kitte (Roche, 11585614910) bulunan 7 numaralı dig hyb solüsyonundan 15 ml çekilip falkon tüpüne eklenmiştir. 40°C su banyosunda 12 dakika süreyle bekletilerek ön hibridizasyon solüsyonu hazırlanmıştır.
2. Membran rulo halinde fırınlama şişesine yerleştirilmiştir. Hazırlanan ön hibridizasyon solüsyonundan 10 ml alınarak, fırınlama şişesinde bulunan membranın üzerine dökülerek, 30 dakika süreyle 44°C'ye ayarlı hibridizasyon

fırınında 14 rpm'de fırınlanarak ön hibridizasyon gerçekleştirilmiştir (100 cm² membran için 10 ml ön hibridizasyon solüsyonu yeterlidir).

3. Daha önceden hazırlanan ve -20°C'de muhafaza edilen DIG ile işaretli DNA probu, 100°C su banyosunda 5 dakika bekletilip, hemen ardından buz-su banyosuna alınarak 2 dakika süreyle soğutulularak prob denatüre edilmiştir.
4. Ön hibridizasyon solüsyonundan 3.5 ml alınarak falkon tüpüne eklenmiştir. Üzerine denatüre edilen DNA probu eklenerek kibarca karıştırılmıştır (100 cm² membran için 3.5 ml ön hibridizasyon solüsyonu yeterlidir).
5. Fırınlama şişesinde membran üzerinde bulunan solüsyon drene edilmiştir. Hazırlanan DIG ile işaretli prob ve DIG hyb karışımı fırınlama şişesinde bulunan membran üzerine dökülmüştür. 4 saat veya gece boyu 44°C'ye ayarlı hibridizasyon fırınında, 14 rpm'de çevrilerek hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Not: Membrana dökülen DIG ile işaretli prob ve dig hyb karışımı falkon tüpüne alınarak, -15°C ile -25°C'de muhafaza edilerek başka bir hibridizasyon işleminde kullanılabilir. Söz konusu karışım kullanılmadan önce 68°C'ye ayarlı su banyosunda 10 dakika süreyle bekletilip, hemen ardından 2 dakika süreyle buz-su banyosuna alınarak soğutulup tekrar kullanıma hazır hale getirilir.

Hibridizasyon aşamasından sonra, aşağıda belirtilen kimyasal solüsyonlar hazırlanmış ve membran aşağıda belirtilen işlemlere tabi tutularak, X-Ray filmiyle görüntüsü alınmıştır.

Kullanılan kimyasal solüsyonlar ve hazırlanması:

- I. Wash (yıkama) solüsyonu (60 ml): 6 ml SSC (2X) ve 0.3 ml SDS (%0.1), 60 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır (her kullanım için taze hazırlanmıştır).
 - II. Wash (yıkama) solüsyonu (40 ml): 1 ml SSC (0.5X) ve 0.2 ml SDS (%0.1), 40 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır (kullanmadan önce 67°C'ye getirilmiştir) (her kullanım için taze hazırlanmıştır).
- Maleik asit solüsyonu (10X) (600 ml): 69.6 g maleik asit ve 52.56 g NaCl, 400 ml steril ultra saf suda çözülmüştür. NaOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve 600 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanmıştır (stok olarak hazırlanmıştır).

Washing (yıkama) Solüsyonu (1L): 100 ml 10X Maleik asit solüsyonu ve 3 ml Twin-20, 1 L olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Dideksiyon Solüsyonu (500 ml): 6.05 g Tris-HCl (0.1 M) ve 2.92 g NaCl (0.1 M), 400 ml steril ultra saf suda çözülmüştür. HCl ile pH: 9.5'e ayarlanmış ve 500 ml olacak şekilde steril ultra saf su ile tamamlanmıştır.

Bloklama Solüsyonu (190 ml): Kite bulunan 6 numaralı 10X blok solüsyonu tüpünden 19 ml çekilmiş ve üzerine 171 ml maleik asit (1X) solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır (her kullanım için taze hazırlanmıştır).

Antibadi Solüsyonu (40 ml): Kite bulunan 4 nolu antidioksijeni AP solüsyonundan 5 µl çekilmiş (üstten) ve steril ependorfla eklenmiştir. Ardından üzerine 39.995 µl bloklama solüsyonunu eklenerek hazırlanmıştır (her kullanım için taze hazırlanmıştır).

Protokol:

1. Ek 8'de belirtildiği gibi hibridizasyon işlemine tabi tutulan ve cam bir kabın içinde yerleştirilen membrana 30 ml I. yıkama solüsyonundan dökülerek 5 dakika boyunca 15-25°C'ye ayarlı çalkalayıcıda 20-30 rpm'de çalkalanmıştır (Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir).
2. Yeni bir kaba alınan membrana 15 ml II. yıkama solüsyonundan dökülerek 67°C'ye ayarlı çalkalamalı su banyosunda 15 dakika boyunca bekletilmiştir (bu işlem iki kez tekrar edilmiştir).
3. Ardından tekrar yeni bir kabın içine alınan membrana 20 ml washing (yıkama) solüsyonu dökülerek, 30°C'ye ayarlı 40-50 rpm'de çalkalayıcıda 4 dakika boyunca çalkalanmıştır.
4. Ve yeni bir kaba alınan membranın üzerine 150 ml bloklama solüsyonu dökülerek, 30°C'ye ayarlı 40-50 rpm'de çalkalayıcıda 40 dakika boyunca çalkalanmıştır.
5. Daha sonra, yeni bir kaba alınan membrana 40 ml antibadi solüsyonu dökülerek, 30°C'ye ayarlı 40-50 rpm'de çalkalayıcıda 30 dakika boyunca çalkalanmıştır.
6. Ve yeni bir kaba alınan membrana 100 ml washing (yıkama) solüsyonu dökülerek, 30°C'ye ayarlı 40-50 rpm'de çalkalayıcıda 20 dakika boyunca çalkalanmıştır (Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir).

7. Ardından, yeni bir kaba alınan membrana 40 ml dideksiyon solüsyonu dökülerek, 30°C'ye ayarlı 40-50 rpm'de çalkalayıcıda 5 dakika boyunca çalkalanmıştır.
8. EK 5'de belirtildiği gibi daha önce hazırlanmış olan plastik dosyanın içine DNA üst tarafa gelecek şekilde membran yerleştirilmiştir. Kitte bulunan 5 nolu şişeden 1000 µl çekilip, membranın üzerine eşit bir şekilde damlatılmıştır. Hemen ardından plastik dosya kapatılıp, hava kabarcıkları dosyadan dışarıya çıkarılmıştır. Membran 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından plastik dosyanın içinde kalan fazla sıvı dışarıya çıkarılmıştır. İçinde membranın bulunduğu plastik dosyanın etrafı hava almayacak şekilde bantlanmıştır.
9. Plastik dosyanın içinde bulan membran 37°C'de 10 dakika süreyle bekletilmiştir. Membrandaki DNA görüntüsünü alabilmek için X-Ray filmi kullanılmıştır. Karanlık odada, film kasetinin içine önce film üzerinede membran yerleştirilmiş ve 60 dakika bekletildikten sonra X-Ray film banyo cihazında, film yıkanarak görüntüsü alınmıştır.