



FARKLI HIYAR (*Cucumis sativus* L.) GENOTİPLERİNİN TRANSFORMASYON ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Araştırma Makalesi/Research Article

Afif İcin: Aslantaş, Y., Pinar, H. (2025). Farklı Hıyar (*Cucumis Sativus* L.) Genotiplerinin Transformasyon Etkinliklerinin Belirlenmesi. Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi 8(2): 24-32

To Cite: Aslantaş, Y., Pinar, H. (2025). Determination Of Transformation Efficiency Of Different Cucumber (*Cucumis Sativus* L.) Genotypes Journal of Erciyes Agriculture and Animal Science, 8(2): 24-32

Yasemin ASLANTAŞ¹, Hasan PINAR^{2*}

¹Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 38039, Kayseri-Türkiye

² Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 38039, Kayseri-Türkiye

*sorumlu yazar: hpinarka@yahoo.com

Yasemin ASLANTAŞ, ORCID No: 0000-0002-0557-0913, Hasan PINAR, ORCID No: 0000-0002-0811-8228

Yayın Bilgisi

Geliş Tarihi: 07.02.2025

Revizyon Tarihi: 30.05.2025

Kabul Tarihi: 12.06.2025

doi: 10.55257/ethabd.1635420

Anahtar Kelimeler

Hıyar, *Agrobacterium*–Aracılı genetik transformasyon etkinliği

Keywords

Cucumber, *Agrobacterium*–mediated genetic transformation, transformation efficiency

Özet

Verimli, hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde genellikle klasik ıslah yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Fakat genotipler arasındaki melezleme uyumsuzlukları, istenmeyen özelliklerin de bitkiye aktarılma riski ve ıslahın uzun zaman alması gibi nedenler, istenilen bitkinin elde edilmesinde sınırlayıcı faktörlerdir. Bu nedenle modern ıslah metodları olarak da adlandırılacak bitki genetik mühendisliği uygulamalarında içinde yer aldığı biyoteknolojik metodlar sayesinde, geleneksel metodların olumsuzlukları ortadan kaldırılabilen, ıslah süresi kısaltılarak masraf ve zamandan tasarruf edilmekte, melezlemede karşılaşılan sorunlar ve gen havuzundan yararlanmadaki sınırlamaların kolayca üstesinden gelinebilmektedir. Bitki ıslahında kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden birisi de gen transferidir. Ancak hıyarın da içerisinde yer aldığı bir çok türde genetik transformasyon etkinliği genotipe bağlı olarak değişmekte ve genotip etkisi başıyıcı sınırlandırmaktadır. Hıyarda gen transformasyonu ile ilgili bilimsel çalışmalar olmakla birlikte henüz tüm genotipler için optimize edilmiş protokol bulunmamaktadır. Bu çalışmada farklı hıyar genotiplerinin *Agrobacterium*–Aracılı genetik transformasyon etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada farklı kanamisin dozları(50,75,100 mg/L) ve farklı eksplant kaynakları(kotiledon, hipokotil, hipokotil ucu+yaprak sapı) kullanılarak 4 adet Beith Alpha ve 4 adet Kornişon olmak üzere toplam 8 adet hıyar genotipinin transformasyon etkinliği belirlenmiştir. Bu çalışma ile elde edilen bulgulara göre eksplant kaynağı olarak E3(hipokotil ucu+yaprak sapı) kullanıldığında transformasyon etkinliğinin her iki hıyar tipinde de yüksek olduğu, Beith Alpha tipi hıyar genotiplerinin kornişon tipi hıyar genotiplerine göre transformasyon etkinliklerinin yüksek olduğu, Beith Alpha tipinde en yüksek transformasyon etkinliğine sahip genotipin C-337(%21) ve kornişon hıyar tipinde ise GK1F1(%12) olduğu belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular özellikle CRISPR gibi yeni nesil biyoteknoloji uygulamalarının da içinde yer aldığı gen transferi çalışmalarına ışık tutabilecek niteliktedir. Ayrıca çalışmada transformasyon etkinliği belirlenen hıyar genotiplerinin gelecekte yapılacak gen transferi çalışmalarında tercih edilmesi transformasyon başarısını arttırabilecektir.

Determination Of Transformation Efficiency Of Different Cucumber (*Cucumis Sativus* L.) Genotypes

Abstract

Classical breeding methods are the conventional approach taken in the development of high-yielding, disease- and pest-resistant plants. However, crossbreeding incompatibilities, the risk of transferring undesirable traits to the plant, and the lengthy process involved in breeding are all factors that limit the achievement of the desired plant. Consequently, biotechnological methods, otherwise referred to as modern breeding methods, have been employed to circumvent the limitations of traditional methods. These methods have the capacity to eliminate the aforementioned negatives, thereby reducing the financial and temporal demands of the breeding process. Furthermore, they facilitate the overcoming of challenges associated with crossbreeding, genetic linkage problems, and limitations in utilising the gene pool. Another biotechnological method used in plant breeding is gene transfer. However, in many species including cucumber, transformation efficiency varies depending on genotype and genotype effect limits the success. Although there are scientific studies on cucumber transformation, there are no protocols optimized for all genotypes yet. In this study, it was aimed to determine the transformation efficiency of different cucumber genotypes. In this study, transformation efficiency of 8

cucumber genotypes(4 Beith Alpha and 4 Pickled genotypes), were determined by using different kanamycin doses(50,75,100 mg/L) and different explant sources(cotyledon, hypocotyl, hypocotyl tip+petiole) as material. The findings of this study indicate that the transformation efficiency was enhanced in both cucumber types when E3(hypocotyl tip+petiole) was utilised as the explant source. Furthermore, the transformation efficiency of Beith Alpha type cucumber genotypes was observed to be superior to that of Pickled type cucumber genotypes. The genotype demonstrating the highest transformation efficiency was C-337 (21%) in Beith Alpha type and GKIF1 (12%) in Pickled cucumber type. The findings of the study can provide a foundation for gene transfer studies, particularly in next-generation biotechnology applications such as CRISPR. Furthermore, the identification of cucumber genotypes, as outlined in the study, with high transformation efficiency, may be advantageous in future gene transfer studies, potentially enhancing transformation success.

1. GİRİŞ

Cucurbitacea familyasına ait bir sebze türü olan hıyar (*Cucumis sativus* L.), hem tropikal hem de subtropikal bölgelerde yetişen önemli bir sebze türüdür(Milner 2000; Chu ve ark. 2002). Ancak hıyarda anthraknoz, CMV, külleme ve mildiyo gibi hastalıklar üretimini sınırlamaktadır. Söz konusu hastalıklara dayanıklı çeşitler geliştirmek hıyar ıslahı programlarının başlıca amaçları arasında yer almaktadır(King ve ark. 2012). Fakat, türün dar genetik tabanı(genetik varyasyon sadece %3-8'dir) nedeniyle söz konusu hastalıklara neden olan patojenlere karşı dayanımın geleneksel ıslah yoluyla kazandırılması oldukça zordur. Verimi yüksek, hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde genellikle klasik ıslah yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Fakat türler arasındaki melezleme uyumsuzlukları, istenmeyen özelliklerin de bitkiye aktarılma riski ve ıslahın uzun zaman alması gibi nedenler istenilen çeşitlerin geliştirilmesinde sınırlayıcı faktörlerdir(Joyia ve Khan 2013; Grozeva ve Velkov 2014). Bu nedenle modern ıslah metotları olarak da adlandırılabilir biyoteknolojik metotlar veya bitki genetik mühendisliği uygulamaları sayesinde, geleneksel metotların olumsuzlukları ortadan kaldırılabilen, ıslah süresi kısaltılarak masraf ve zamandan tasarruf edilmekte, melezlemede karşılaşılan sorunlar, genetik bağlantı (linkage) sorunlarının kolayca üstesinden gelinebilmektedir(Arslan, 1985; Gönülşen 1991). Bitki ıslahında kullanılan biyoteknolojik

yöntemlerden birisi de gen transferidir. Genetik transformasyon, bir hücrenin dışarıdan çıplak DNA'yı aldığı ve kalıtsal olan genetiği değiştirilmiş bir genotip elde etmek için bunu bünyesine dahil ettiği bir süreçtir (Smith ve ark. 1981). Gen transferi çalışmalarında en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi de Agrobacterium–aracılı genetik transformasyondur. Gram-negatif bakteri *A. tumefaciens*, DNA'yı bitki hücrelerine aktarma ve bu T-DNA'yı nükleer genoma kararlı bir şekilde entegre etme yeteneğine sahiptir (Gelvin, 2017). Bu doğal mühendisten yararlanarak, Agrobacterium aracılı transformasyon hem dikot hem de monokot bitkilerde en yaygın kullanılan genetik transformasyon yaklaşımı haline gelmiştir. Hıyar bitkilerinin Agrobacterium rhizogenes ile başarılı bir şekilde transformasyonu ilk olarak 1986 yılında rapor edilmiştir (Trulson et al. 1986). O zamandan beri, hıyarda Agrobacterium aracılı transformasyonu geliştirmek ve optimize etmek için kapsamlı çalışmalar yürütülmüştür (Wang ve ark. 2015; Tan ve ark. 2022). Agrobacterium aracılı genetik transformasyon süreci, T-DNA plazmid hazırlanmasını, eksplantların seçimi ve hazırlanmasını, eksplantların Agrobacterium ile enfekte edilmesini ve seleksiyon ortamında sürgün rejenerasyonunu, sürgünlerin köklendirilmesini, bitkiciklerin elde edilmesini, transgenik bitkilerde hedef genlerin doğrulanmasını ve son olarak genlerin işlevlerinin karakterizasyonunu kapsamaktadır. Genotip, eksplant kaynakları, Agrobacterium suşları, konsantrasyonları ve enfeksiyon yöntemleri, ko-kültür

sıcaklığı, süresi ve ışık koşulları, kültür ortamındaki kimyasalların bileşenleri ve konsantrasyonları, seçici antibiyotikler ve pozitif transformantlar için raportör genler gibi birçok faktörün transformasyon başarısını etkilediği gösterilmiştir. Transformasyon etkinliğini artırmak için çeşitli parametreleri optimize etmeyi amaçlayan birçok çalışma yürütülmüştür (Derleme (Chai ve ark. 2020; Tan ve ark. 2022)). Bu faktörlerden bazıları farklı çalışmalar arasında tutarlı ve kolayca uygulanabilir görünmektedir. Örneğin, çoğu çalışmada, sürgün rejenerasyonu ve köklenme için Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantları, ana büyüme düzenleyicileri olarak 6-BA (BAP-6-benzilaminopürin), ABA (absisik asit) ve seleksiyon ajanı olarak kanamisin (50-150 mg L⁻¹) kullanılmıştır. Ancak, önerilen 'optimize edilmiş' protokollerde diğer birçok faktör büyük ölçüde değişiklik göstermiştir. Muhtemelen bu çalışmalar arasındaki farklılıklar genotip kaynaklı ve/veya çalışmada takip edilen diğer faktörlerden kaynaklanmaktadır. Rapor edilen genel transformasyon etkinliği farklı hıyar genotipleri arasında değişiklik göstermiştir. ABD slicing hıyar Poinsett 76 (PS76), Changchunmici (CCMC) ve Xintaimici (XTMC) gibi birkaç Kuzey Çin tipi (Chinese Long) hıyar genotipi Agrobacterium aracılı transformasyona daha yatkın olduğu bildirilmekte ve çeşitli transformasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu ve Weng, 2022). Son yıllarda Agrobacterium aracılı hıyar transformasyonunda kaydedilen önemli ilerlemelere rağmen, farklı çalışmalarda bildirilen transformasyon etkinliği (TE) genellikle düşük olmakla birlikte %0,1 ile %5 arasında değişmektedir. Görünüşe göre hıyarda Agrobacterium aracılı transformasyon bir dereceye kadar bir sanat olmaya devam etmektedir.

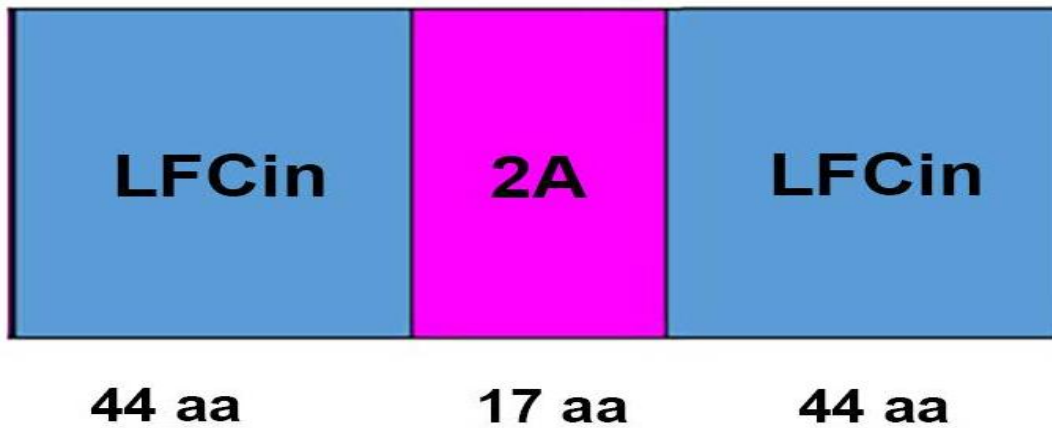
Diğer bitki türlerinde olduğu gibi genetik mühendisliği çalışmalarında hıyarın kullanılarak biyoteknolojideki son teknolojilerin ıslah programlarına entegre edilmesi oldukça önemlidir. Ancak genetik mühendisliği çalışmalarında kullanılacak genotipin transformasyon etkinliğinin olması hatta yüksek olması ön şartlardan birisi olarak görülmektedir. Gen transferini etkileyen bir çok faktör olmakla birlikte en fazla öne çıkan faktörün genotip etkisi olduğu rapor edilmektedir. Hıyar tiplerinde ve çeşitlerinde transformasyon etkinliğinin bilinmesi gen transferinde avantaj sağlayabilmektedir. Dünyada çok farklı tipte hıyar genotipi olmakla birlikte örtüaltında yoğun olarak Beith Alpha, açık alanda ve aynı zamanda sanayi için üretilen kornişon tipi hıyar tipleri ön plana çıkmaktadır. Her iki tipte yapılacak çalışmalar genetik mühendisliği çalışmalarına katkı sunabilecektir. Buradan hareketle;

Bu çalışmada farklı hıyar genotiplerinin transformasyon etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma ile elde edilen bulgular hıyar çeşitlerine yapılacak genetik mühendisliği çalışmalarına ışık tutabilecektir.

2. MATERİYAL VE METOT

2.1. Materyal

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak 4 adet beith alpha ve 4 adet kornişon olmak üzere toplam 8 adet hıyar genotipi kullanılmıştır. Çalışmada Nanasato ve Tabei (2020) tarafından geliştirilen protokol takip edilmiştir. Plazmid olarak ise EHA105 bakteri suşu içerisinde yer alan ve ORF13 konsraktı kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Füzyon litik protein yapısı. ORF13 plazmid 44 amino asit uzunluğunda iki laktoferrisin (LFCin) alanından oluşmaktadır(Biliarsji ve ark. 2020).

2.2. Metot

2.2.1. Tohum Sterilizasyonu

İlk olarak tohumlar 20 ml'lik cam kavanoza yerleştirilmiş, her kavanoza 10 mililitre %10'luk ticari çamaşır suyu (NaOCl) çözeltisi eklenmiştir ve 10 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra kavanozlardaki ticari çamaşır suyu (NaOCl) çözeltisi uzaklaştırılmış ve tohumlar 3 defa steril saf sudan geçirilmiştir. Yıkanmış tohumlar 30 saniye boyunca %70'lik Etanole daldırılmış ve ardından steril saf su ile üç kez yıkanmıştır. Steril saf su kavanozlardan uzaklaştırılmış ve tohumlar 50 ml Murashige-Skoog (MS) katı hormonsuz bitki besiyeri (Murashige-Skoog Bitki Besiyeri) içeren macenta kutulara yerleştirilmiştir. Magenta kutular 24 °C sıcaklıktaki bitki yetiştirme kabineye yerleştirilmiştir. Tohumların MS ortamına yerleştirilmesinden iki gün sonra ilk çimlenme tespit edilmiştir. Çalışmada transformasyon çalışmaları aşağıda belirtildiği gibi 3 farklı aşamada yürütülmüştür.

1. Bitki seleksiyonunda uygun kanamisin dozlarının belirlenmesi,

Çalışmada en uygun bitki seleksiyonunu dozunun belirlenmesi amacıyla 3 farklı kanamisin dozu(50,75,100 mg/L) test edilmiştir.

2. Transfromasyonda uygun eksplantın belirlenmesi.

Çalışmada transformasyon etkinliğinin artırılması için 3 farklı eksplant(kotiledon, hipokotil, hipokotil ucu+yaprak sapı) kullanılmıştır.

3. Farklı hıyar genotiplerinin transformasyon etkinliklerinin belirlenmesi,

Çalışmada farklı hıyar genotiplerinin transformasyon etkinliklerinin belirlenmesi için 4 adet Beith Alpha ve 4 adet Kornişon olmak üzere 8 adet hıyar genotipi kullanılmıştır.

2.2.2. Transfromasyonda Kullanılacak Bitki Parçaları ve Kültür ortamının Hazırlanması

Araştırmada tohum çimlenme başlangıcından(2 gün sonra) kotiledon, hipokotil, hipokotil ucu+yaprak sapı eksplantları transformasyon için kullanılmıştır. Kotiledon yapraklar ortadan enine ve ortadan boyuna ikiye bölünerek kültür ortamına alınmıştır. Hipokotil parçası 1-2 cm uzunluğunda olacak şekilde kesilerek kültür ortamına alınmıştır. Sürgün gelişimini teşvik etmek için MS ortamına 1.0 mg/L BAP, 0.5 mg/L ABA, 30g/L sakkoroz (Nanasato ve Tabei 2020) eklendikten sonra ortamın pH'sı 1N'lik HCL ve 1N'lik KOH kullanılarak 5.8 olarak ayarlanmıştır. Ortamı katılaştırmak için 2.6 g/L fitojel kullanılmış ve hazırlanan ortamlar 121 0C derecede 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika ile sterilizasyona tabi tutulup steril kabin içerisinde 6 cm çapındaki steril petrilere dökülmüştür. Kesilen parçalar hazırlanan bakteri solüsyonunda 15 dakika bekletildikten sonra kurutma kağıdına alınmıştır. Eksplanlar üzerindeki fazla sıvının uzaklaştırılmasından sonra kültür ortamına(co-culture) alınarak 23 0C derece 2 gün gelişim için karanlık ortamda bekletilmiştir.

Araştırmada, 2 gün bekletilen bitki parçaları MS içerisine eklenen 30 g/L sakkaroz ve pH sı 5.8'e ayarlanan otoklavlanmış sıvı ortam ile 3 kez durulama işlemi yapıp kurutma kağıdına alınmıştır. Üzerinde yer alan sıvının uzaklaştırılması sağlanan eksplantlar sürgün geliştirme ortamı olan MS içerisine eklenen 1.0 mg/L BAP(Beith Alpha tipi hıyar genotipleri için), 0.5 mg/L BAP, 0.5 mg/ L (Kornişon tipi hıyar genotipleri için) ABA 200 mg/L timentin ve yöntem 1.1 de belirtilen (50,75,100 mg/L) Kanamaysin dozları ile 2.6 g/L fitojel ve pH'sı 5.8 olarak ayarlanmış (Nanasato ve Tabei, 2020) ortamlara aktarılmıştır. Sürgün geliştirme ortamında farklı kanamisin dozları test edilmiş, gelişim gösteren ve transformasyon etkinliği yüksek dozda (50mg/L kanamisin) çalışmaya devam edilmiştir. Kotiledon ve hipokotil parçalarından gelişen bitkiler MS ortamı içerisine eklenen 30g/L sakkoroz, 25 mg/L kanamisin, 200 mg/L timentin, 2.6 g/L fitojel 5.8 pH içeren kök ortamına aktarılmıştır. İn vitro koşullarda köklen

bitkiler viyole alınıp DNA izolasyonu yapılarak Neomycin phosphotransferase II (NPTII) geninin varlığı için testleme yapılmıştır.

2.2.3. *A. tumefaciens*'in Kültürünün hazırlanması

Transformasyonda kullanılan ORF 13 genini taşıyan *A. tumefaciens*'in EHA 105 suşu 6 cm çapındaki cam petriler içerisinde katı LB(50 mg/L kanamisin, 25 mg/L rifampisin, 10 g/L triptone, 5g/L yeast extract, 10g/L NaCL, 10g/L bakteriyel agar) ortamı üzerine öze ile çizilerek 28 0C derecede 48 saat kültüre alınmıştır. Çoğalan koloni içerisinde öze ile alınan bakteriler 50 ml falcon içerisinde 20 ml sıvı LB, 20 µl kanamisin(50 mg/L stok), 20 µl rifampisin (20 mg/ml stok) eklenerek çalkalayıcı da 180 rpm de 28 0C derecede 1 gün çoğaltmaya bırakılmıştır. OD spektrometrede 0,7 ye ayarlanmıştır. Ölçüm sonrası santrifüj yardımıyla 6000 rpm'de 10 dakika bakteriler dipe çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası üstte kalan antibiyotik kısmı dökülmüştür. Çöken bakteriler ölçüm değerine göre agro seyreltme (4.4 g/L MS, 30 g/L sakkaroz, pH 5.7) solüsyonuna 200 mikromolar aceto syringone eklenerek seyreltilmiştir.

2.2.4. Transgenik bitkilerin moleküler doğrulaması

DNA İzolasyonu

Viyole aktarıldıktan sonra alıştırılan ve 2 gerçek yaprak aşamasına gelen bitkilerden DNA izolasyonu Doyle ve Doyle(1990) tarafından bildirilen CTAB yöntemi kullanılarak yapılmıştır. DNA konsantrasyonları yarı otomatik mikropate (PowerWave HT, BIO-TEK Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) yardımıyla belirlenmiş ve PCR çalışmaları için 10 ng/µl olacak şekilde DNA konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Neomisin fosfotransferaz II (NPTII) seleksiyon markör genini taşıyan ORF13 transgenik bitkiler için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) testi gerçekleştirilmiştir. PCR testinde üretici firmanın

talimatlarına uygun olarak GoTaq® Green Master Mix kullanılmıştır. PCR solüsyonu için her transgenik bitki örneğinden iki µl DNA, 6 µl ddH₂O, 1 µl ileri Primer, 1 µl geri Primer ve 10 µl GoTaq® Green Master Mix içeren 18 µl reaksiyon karışımına eklenmiştir. NPTII markörü için İleri; 5'-GAGGCTATTCGGCTATGAC-3', Geri : 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCG-3' dizilime sahip primerler kullanılmıştır. PCR döngüsü ise 1) 3 dak. 94°C, 2) 30 s. 94°C, 3) 40 s. 55°C, 4) 1 dak. 72°C 40 s., 5) 72°C 7 dak.,. İkinci, üçüncü ve dördüncü adımlar 35 döngüden oluşurken birinci ve beşinci adımlar 1 döngüden oluşmuştur. NPTII geninin varlığı 250 bp'de belirlenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada 4 adet Beith Alpha(Yeşilgöz, C-337, Babilion ve Neon), 4 adet Kornişon(GK1F1, GK5F1, GK6F1 ve GK7F1) tipi hıyar genotiplerinin transformasyon etkinliğinin belirlenmesi için genotiplere ait in vitro kültüre alınan tohum sayısı(adet), çimlenen tohum sayısı(adet), çimlenme oranı(%), bakteriyel enfeksiyon görülen tohum sayısı(adet) ve bakteriyel enfeksiyon oranı(%) Tablo 1'de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre genotiplere ait tohum çimlenme oranı % 65,0-91,3 arasında değişmiş olup en yüksek çimlenme oranına GK5F1 genotipi sahip olurken, en düşük çimlenme oranına GK6F1 genotipi sahip olmuştur. Beith alpha ve Kornişon tipi genotipler arasında tohum çimlenmesi bakımından farklılık meydana gelmemiştir. Bakteriyel enfeksiyon oranı bakımından tipler ve tiplere ait genotipler incelendiğinde ise enfeksiyon oranı %10,0-31,5 arasında gerçekleşmiş ve kornişon tipi hıyar genotiplerinde ortalama bakteriyel enfeksiyon oranı % 27,6 olurken, beith alpha tipi hıyar genotiplerinde % 17,3 olarak gerçekleşmiştir. Özellikle kornişon tipi hıyar genotiplerinde yüksek oranda bakteriyel kontaminasyon görülmesinin nedeni tohumların sahip olduğu pürüzlü yapı olabileceği kanısına varılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan genotiplere ait in vitro kültüre alınan tohum sayısı(adet), çimlenen tohum sayısı(adet), çimlenme oranı(%), bakteriyel enfeksiyon görülen tohum sayısı(adet) ve bakteriyel enfeksiyon oranı(%)

GENOTİP	In Vitro Kültüre Alınan Tohum Sayısı(adet)	Çimlenen Tohum Sayısı(adet)	Çimlenme Oranı(%)	Bakteriyel Enfeksiyon Görülen Tohum Sayısı(adet)	Bakteriyel Enfeksiyon Oranı(%)
YEŞİLGÖZ	70	60	85,7	10	16,7
C-337	76	65	85,5	15	23,1
BABİLİON	50	40	80,0	4	10,0

NEON	75	62	82,7	12	19,4
GK1F1	87	72	82,8	22	30,6
GK5F1	80	73	91,3	23	31,5
GK6F1	100	65	65,0	15	23,1
GK7F1	78	67	85,9	17	25,4

Diğer bitki türlerinde olduğu gibi hıyarda da transformasyon etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerden birisi de seleksiyon markırı olarak kullanılacak gen ve bu gen için kullanılan etken maddenin dozudur. Bu çalışmada ORF13 geni için seleksiyon markırı olarak kullanılan Neomycin phosphotransferase II (NPTII) geni için kullanılan etken madde kanamisin antibiyotiği olup, hıyar genotiplerinin transformasyon etkinliklerinin belirlenmesinden önce farklı kanamisin dozlarında 3 farklı hıyar genotipine ait 3 farklı eksplant tipi test edilmiştir. Çalışmada kullanılan genotiplere ait farklı kanamisin dozlarından elde edilen gelişen sürgün sayısı(adet), bitkiye dönüşen sürgün sayısı(adet) ve kanamisin pozitif bitki sayısı(adet) Tablo 2’de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre; 50 mg/L kanamisin dozunda toplam 12 adet sürgün gelişmiş ve bu sürgünlerden E1 eksplantında 0 sürgün, E2 eksplantında 9 ve E3 eksplantında ise 3 sürgün elde edilmiştir. Bitkiye dönüşen eksplant sayısı ise toplam 9 olup, yine E1 eksplantında hiç bitkiye dönüşüm meydana gelmezken E2 eksplantında 8 adet ve E3 eksplantında ise 1 adet bitkiye dönüşüm meydana gelmiştir. 50 mg/L kanamisin dozunda her iki eksplanttan elde edilen tüm bitkiler kanamisin pozitif olarak belirlenmiştir.

Sürgün gelişimi incelendiğinde, 75 mg/L kanamisin dozunda toplam 8 adet sürgün gelişmiş ve bu sürgünlerden E1 eksplantında 0 sürgün, E2 eksplantında 5 ve E3 eksplantında ise 3 sürgün elde edilmiştir. Bitkiye dönüşen eksplant sayısı ise toplam 9 olup, yine E1 eksplantında hiç bitkiye dönüşüm meydana gelmezken E2 eksplantında 3 adet ve E3 eksplantında ise 1 adet bitkiye dönüşüm meydana gelmiştir. 75 mg/L kanamisin dozunda her iki

eksplanttan elde edilen tüm bitkiler kanamisin pozitif olarak belirlenmiştir.

Çalışmada 100 mg/L kanamisin dozunda toplam 10 adet sürgün gelişmiş ve bu sürgünlerden E1 eksplantında hiç sürgün elde edilemezken, E2 eksplantında 1 ve E3 eksplantında ise 9 sürgün elde edilmiştir. Bitkiye dönüşen eksplant sayısı ise toplam 9 olup, yine E1 eksplantında hiç bitkiye dönüşüm meydana gelmezken E2 eksplantında 0 adet ve E3 eksplantında ise 1 adet bitkiye dönüşüm meydana gelmiştir. Bu çalışmada, 100 mg/L kanamisin dozunda elde edilen 1 adet bitki kanamisin pozitif olarak belirlenmiştir. Farklı hıyar genotipleri farklı eksplant kaynağı ve farklı kanamisin dozları uygulamalarından elde edilen bulgulara ise 50 mg/L kanamisin dozunda en yüksek transformasyon etkinliği(Pozitif bitki sayısı/kültüre alınan eksplant*100) C-304 genotipinde E2 eksplantında(% 25), 75 mg/L dozunda en yüksek etkinliği Virganimax genotipinde E2 eksplantında(%7,7), 100 mg/L dozunda ise en yüksek etkinliği Virganimax genotipinde E2 eksplantında(%2,6) olarak belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre Virganimax genotipinin transformasyon etkinliğinin yüksek olduğu, en başarılı eksplant kaynağının E2 olduğu ve kanamisin dozu arttıkça genotiplerin transformasyon etkinliklerinin düştüğü görülmektedir. Her üç kanamisin dozunda da elde edilen bitkiler kanamisin pozitif olarak belirlendiği için transformasyon etkinliği yüksek olan 50 mg/L kanamisin dozunun kullanılması önerilmektedir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan genotiplere ait farklı kanamisin dozlarından elde edilen gelişen sürgün sayısı(adet), bitkiye dönüşen sürgün sayısı(adet) ve kanamisin pozitif bitki sayısı(adet)

	Kanamisin Dozu(mg/L)	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı(adet)	Gelişmeyen Eksplant Sayısı(adet)	Gelişen Sürgün Sayısı(adet)	Bitkiye Dönüşen Sürgün Sayısı(adet)	Kanamisin Pozitif Bitki Sayısı(adet)	Transformasyon Etkinli
--	----------------------	--------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------	------------------------

																	ği(%)
GENOTİP	Eksplant	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E1	E2
C-304	50 mg/L	11	12	6	0	2	0	0	3	0	0	3	0	3	0	25,0	0,0
C-185		9	13	7	0	4	0	0	2	2	0	1	1	1	1	7,7	14,3
VİRGANİMAX		13	21	6	0	3	0	0	4	1	0	4	0	4	0	19,0	0,0
Min.		9	12	6	0	2	0	0	2	0	0	1	0	1	0	8,3	0,0
Mak.		13	21	7	0	4	0	0	4	2	0	4	1	4	1	19,0	14,3
Ort.		11	15,8	6,4	0	3	0	0	3	1	0	2,6	0,4	2,6	0,4	16,5	6,3
C-304	75 mg/L	17	34	13	0	2	4	0	4	0	0	2	0	2	0	5,9	0,0
C-185		16	32	12	0	7	5	0	1	0	0	1	0	1	0	3,1	0,0
VİRGANİMAX		16	26	13	0	8	3	0	0	3	0	0	1	0	1	0,0	7,7
Min.		16	26	12	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Mak.		17	34	13	0	8	5	0	4	3	0	2	1	2	1	5,9	7,7
Ort.		16,4	30,4	12,6	0	5,4	4	0	1,8	1,2	0	1	0,4	1	0,4	3,3	3,2
C-304	100 mg/L	23	34	10	0	3	10	0	0	3	0	0	0	0	0	0,0	0,0
C-185		14	28	10	0	3	10	0	0	2	0	0	0	0	0	0,0	0,0
VİRGANİMAX		19	38	9	0	2	9	0	1	4	0	1	0	1	0	2,6	0,0
Min.		14	28	9	0	2	9	0	0	2	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Mak.		23	38	10	0	3	10	0	1	4	0	1	0	1	0	2,6	0,0
Ort.		18,6	33,2	9,6	0	2,6	9,6	0	0,4	3	0	0,4	0	0,4	0	1,2	0,0

İlk çalışmada farklı kanamisin dozlarının transformasyon etkinliğine etkileri belirlenmiş ve 50 mg/L kanamisin dozunun en uygun doz olduğu belirlenmiştir. Daha sonra 4 adet Beith Alpha(Yeşilgöz, C-337, Babilion ve Neon) ve 4 adet kornişon tipi(GK1F1, GK5F1, GK6F1 ve GK7F1) hıyar genotipi kullanılarak hıyar genotiplerinin transformasyon etkinlikleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 3'te verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre tüm hıyar genotiplerinin transformasyon etkinliği E2 eksplantında %3-10,5 ve E3 eksplantında %6-21 arasında gerçekleşirken, Beith alpha tipinde E2 eksplantında transformasyon etkinliği %3,5-10,5 E3 eksplantında %7-21 olarak gerçekleşmiştir. Kornişon

tipi sahip hıyar genotiplerinde transformasyon etkinliği E2 eksplantında %3-6 ve E3 eksplantında ise %6-12 olarak gerçekleşmiştir. E3 eksplant tipi her iki hıyar tipinde de daha başarılı sonuç vermiştir. Diğer taraftan E3 eksplant kaynağı kullanılarak yapılan transformasyonda Beith Alpha tipinde en yüksek transformasyon etkinliği C-337(%21) genotipinde, en düşük transformasyon etkinliği ise NEON(%7) genotipinden elde edilmiştir. Kornişon tipi hıyar genotiplerinde ise en yüksek transformasyon etkinliği(E3 eksplant) GK1F1(%12) ve en düşük transformasyon etkinliği GK7F1(%8) genotipinden elde edilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan genotiplere ait kültüre alınan eksplant sayısı(adet), gelişen sürgün sayısı(adet), köklenen bitkicik sayısı(adet), alıştırılan bitki sayısı(adet), kanamisin pozitif bitki sayısı(adet), transformasyon etkinliği(%)

TİP	GENOTİP	Kültüre alınan Eksplant Sayısı(adet)		Gelişen Sürgün Sayısı(adet)		Köklenen Bitkicik Sayısı(adet)		Alıştırılan Bitki Sayısı(adet)		Kanamisin Pozitif Bitki Sayısı(adet)		Transformasyon Etkinliği(%)	
	Eksplant	E2	E3	E2	E3	E2	E3	E2	E3	E2	E3	E2	E3
	YEŞİLGÖZ	200	50	17	31	11	26	8	16	8	16	4,0	8,0
	C-337	200	50	34	12	31	12	21	5	21	5	10,5	21,0
	BABİLİON	144	36	16	6	10	5	6	6	6	6	4,2	11,6
Beith Alpha	NEON	200	50	24	21	10	11	7	6	7	6	3,5	7,0

	Min.	144	36	16	6	10	5	6	5	6	5	3,5	7
	Mak.	200	50	34	31	31	26	21	16	21	16	10,5	21
	Ort.	181,3	45,3	23,5	17,8	17,2	14,2	11,5	9,0	11,5	9,0	6,0	12,6
Kornişon	GK1F1	200	50	12	16	12	11	12	8	12	8	6,0	12,0
	GK5F1	200	50	19	12	18	12	11	10	11	10	5,5	11,0
	GK6F1	200	50	9	14	6	14	6	5	6	5	3,0	6,0
	GK7F1	200	50	20	34	16	26	8	16	8	16	4,0	8,0
	Min.	200	50	9	12	6	11	6	5	6	5	3	6
	Mak.	200	50	20	34	18	26	12	16	12	16	6	12
	Ort.	200,0	50,0	14,8	20,3	12,7	16,7	9,2	10,0	9,2	10,0	4,6	9,2
Tüm Genotipler	Min.	144,0	36,0	9,0	6,0	6,0	5,0	6,0	5,0	6,0	5,0	3,0	6,0
	Mak.	200,0	50,0	34,0	34,0	31,0	26,0	21,0	16,0	21,0	16,0	10,5	21,0
	Ort.	188,8	47,2	19,4	18,6	15,1	14,8	10,6	9,3	10,6	9,3	5,4	11,2

Hıyarda genotip, sürgün rejenerasyon etkinliğini etkileyen ana faktörlerden biri olup farklı genotipler rejenerasyon için farklı büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duymaktadır (Kose ve Koç 2003). Aynı ortamda kültüre alınan farklı genotiplerden hıyar kotiledon eksplantları farklı sürgün rejenerasyon frekansları göstermiştir (Zhang ve ark. 2009). Tüm genotipler arasında en yüksek rejenerasyon frekansını Xintaimici genotipinden elde edilmiştir Yedi hıyar çeşidinden üçünde sürgün gelişimi sağlanmıştır (Kim ve ark. 1988). Punja ve ark. (1990), Cucumis sativus'un altı inbred hattı ve F1 melezi arasından yüksek rejenerasyon frekansına sahip var. hardwickii'yi belirlemişlerdir. Lou ve Kako (1994) Fushinarimidori çeşidinin çalışmada kullanılan diğer beş hıyar çeşidine kıyasla hem kotiledonlardan hem de genç ilk yapraklardan en yüksek sayıda embriyo elde edildiğini rapor etmiştir. Avrupa hologinik hıyar çeşitleri ile yapılan çalışmalarda, altı genotipin sürgün rejenerasyonu sergilediğini rapor edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı cv. S07'de diğer beş çeşide göre daha yüksek bulunmuştur (Zhao ve ark. 2004). Fan ve ark. (2006) tarafından da üç farklı hıyar genotipinde farklı rejenerasyon etkinliği belirlenmiş ve genotipler arasında cv. Nongcheng 3 genotipinde rejenerasyon etkinliği %100 olarak belirlenmiştir. Liu ve ark. (2023) çalışmalarında kullandıkları hıyar genotiplerinin transformasyon etkinliğini %0,2-1,7 arasında olduğunu, Kuzey Çin hıyar genotiplerinin transformasyon etkinliklerinin ABD kornişon hıyar genotiplerinden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. ABD dilimli hıyarı Poinsett 76 (PS76) ve Changchunmici (CCMC) ile Xintaimici (XTMC) gibi birkaç Kuzey Çin tipi (Çin Uzun) hıyar genotipi, Agrobacterium aracılı transformasyona daha yakın

olduğu ve bu özelliklerinden dolayı transformasyon çalışmalarında tercih edildiği bildirilmektedir. Diğer türlerde olduğu gibi hıyar transformasyonunda da yukarıda bahsedilen daha önce yapılan çalışmalarda da transformasyon etkinliğinde en önemli faktörün genotip olduğu görülmektedir. Bu çalışmada ise 4 adet Beith Alpha ve 4 adet kornişon hıyar genotiplerinin transformasyon etkinlikleri belirlenmiş ve Beith Alpha ve kornişon tipleri arasında transformasyon etkinliği bakımından farklılık elde edilmiş ve Beith Alpha tipi hıyar genotiplerinin transformasyon etkinliklerinin kornişon hıyar tipine göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan hıyar tipleri arasında farklılık olmasının yanında tip içinde de farklılıklar belirlenmiştir.

Çalışmada ayrıca transformasyonda seleksiyon markırı olarak kanamisin kullanılmış olup çalışma başlangıcında kanamisin antibiyotik dozu optimize edilmiştir. Çünkü kanamisin dozu diğer türlerde olduğu gibi hıyarda da eksplant yapısına bağlı olarak değişebilmekte ve yüksek antibiyotik dozunda eksplantlarda kayıplar meydana geldiği için transformasyon etkinliği düşmekte veya eksplantlar tamamen ölmektedir. Diğer taraftan düşük antibiyotik dozunda ise antibiyotik seleksiyonundan kaçışlar çok fazla olmakta ve pozitif bitki sayısı düşmekte ve iş gücü artmaktadır. Nitekim Liu ve ark. (2023) tarafından yapılan çalışmada kanamisin dozu olarak 100 mg/L önerilse de bu çalışmada 50, 75 ve 100 mg/L kanamisin dozlarında elde edilen tüm bitkiler pozitif olarak belirlenmiş fakat en yüksek transformasyon etkinliği 50 mg/L dozunda olduğu için hıyar genotiplerinde transformasyon çalışmaları 50 mg/L dozunda devam edilmiştir.

Bu çalışma ile elde edilen bulgular değerlendirildiğinde eksplant kaynağı olarak E3 kullanıldığında transformasyon etkinliğinin her iki hıyar tipinde de yüksek olduğu, Beith Alpha tipi hıyar genotiplerinin kornişon tipi hıyar genotiplerine göre transformasyon etkinliklerinin daha yüksek olduğu, Beith Alpha tipinde en yüksek transformasyon etkinliğine sahip genotipin C-337(%21) ve kornişon hıyar tipinde ise GK1F1(%12) olduğu belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular özellikle CRISPR gibi yeni nesil biyoteknoloji uygulamalarının da içinde yer aldığı gen transferi çalışmalarına ışık tutabilecek niteliktedir. Ayrıca çalışmada transformasyon etkinliği belirlenen hıyar genotiplerinin gelecekte yapılacak gen transferi çalışmalarında tercih edilmesi transformasyon başarısını arttırabilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-2024-14181 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Makalenin planlanması ve yazılması sırasında yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederiz.

KAYNAKLAR

- Arslan, N., 1985. Patates Tohumluğunda ve Çeşitlerin Muhafazasında Doku Kültürlerinden Yararlanma İmkanları. Türkiye Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Simpozyumu, 563-573.
- Biliarsji, G.S., Yertaeva, B. and Mitra, A. (2020) Expression of Fusion Lytic Peptides Promotes Fungal Disease Resistance in Transgenic Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 11, 148-161.
- Chai, L.; Fan, H.F.; Liu, C.; Du, C.X. Progress of transgenic cucumber mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Hortic.* 2020, 3, 93–101.
- Chu, Y. F., Sun, J. I. E., Wu, X., & Liu, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6910-6916.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15
- Fan A L, Sun Y, Xu L F, Liang D, Zou Z R. 2006. Optimum study of in vitro culture and plantlet regeneration system from cotyledonary nodes of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Northwest A&F*

- University (Natural Science), 34, 69–73. (in Chinese)
- Gelvin, S.B. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annu. Rev. Genet.* 2017, 51, 195–217.
- Gönülşen, N., 1991. Germplazm Muhafazasında Kullanılan In Vitro Teknikleri. *Anadolu Dergisi. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yay. s:* 49-68.
- Grozeva S. and, N. Velkov (2014): In vitro plant regeneration of two cucumber (*Cucumis sativum* L.) genotypes: effects of explant types and culture medium-. *Genetika* vol 46, No2, 485-493.
- Joyia, F. A., & Khan, M. S. 2013. In vitro micropropagation studies of elite Pakistani ricevarieties. *Int J Agri Biol*, 15, 27-33.
- Kim S G, Chang J R, Cha H C, Lee K W. 1988. Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 12, 67–74.
- King SR, Davis AR, Wehner TC (2012) Classical genetics and traditional breeding. In: Wang Y, Behera TK, Kole C (eds) *Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits*. CRC Press, pp 61-92
- Kose E, Koç N K. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and plant regeneration. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17, 51–62
- Liu, H.; Weng, Y. *Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Genetic Transformation in Cucumber*. In *The Cucumber Genome; Springer Nature Switzerland AG: Cham, Switzerland*, 2022; pp. 55–69.
- Liu, H.; Zhao, J.; Chen, F.; Wu, Z.; Tan, J.; Nguyen, N.H.; Cheng, Z.; Weng, Y. Improving *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Genetic Transformation for Gene Function Studies and Mutagenesis in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genes* 2023, 14, 601.
- Lou H, Kako S. 1994. Somatic embryogenesis and plant WANG Shun-li et al. *Journal of Integrative Agriculture* 2015, 14(3): 469–482 481 regeneration in cucumber. *HortScience*, 29, 906–909.
- Milner, J. A. 2000. Functional foods: the US perspective. *The American journal of clinical nutrition*, 71(6), 1654S-1659S.
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nanasato, Y.; Tabei, Y. A method of transformation and current progress in transgenic research on cucumbers and *Cucurbita* species. *Plant Biotechnol. (Tokyo Jpn.)* 2020, 37, 141–146.
- Plader W, Burza W, Malepszy S (2007) Cucumber. In: Pua E-C, Davey MR (eds) *Transgenic Crops IV*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 181-199.
- Punja Z K, Abbas N, Sarmiento G G, Tang F A. 1990. Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii*, *C. melo*, and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21, 93–102.
- Smith, H.O.; Danner, D.B.; Deich, R.A. Genetic Transformation. *Annu. Rev. Biochem.* 1981, 50, 41–68.
- Tan, J.; Lin, L.; Luo, H.; Zhou, S.; Zhu, Y.; Wang, X.; Miao, L.; Wang, H.; Zhang, P. Recent progress in the regeneration and genetic transformation system of cucumber. *Appl. Sci.* 2022, 12, 7180.

- Trulson A J, Simpson R B, Shahin E A. 1986. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. *Theoretical and Applied Genetics*, 73, 11–15.
- Wang, S.-L.; Ku, S.S.; Ye, X.-G.; He, C.-F.; Kwon, S.Y.; Choi, P.S. Current status of genetic transformation technology developed in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J. Integr. Agric.* 2015, 14, 469–482.
- Zhang R W, Gu X F, Wang Y, Zhang S P, Zhang B X. 2009. Effects of genotypes and 6-BA on regeneration frequency of cotyledon nodes in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *China Vegetables*, 22, 45–48. (in Chinese)
- Zhang W Z, Wei A M, Du S L, Han Y K, Zhang G H, Liu N. 2009. Transformation technology through *A. tumefaciens* mediation and pollen tube pathway in cucumber. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 18, 217–220. (in Chinese)
- Zhao J, Wang H, Pan J S, Cai R, Wu A Z. 2004. In vitro culture and plantlet regeneration from cotyledonary nodes of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Shanghaijiaotong University (Agricultural Science)*, 22, 43–53. (in Chinese)