

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HAVUÇ (*Daucus carota* L.) ISLAHINDA HAPLOİDİ TEKNİĞİNDEN
YARARLANMA OLANAKLARI**

Leman KOYUTÜRK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

AĞUSTOS 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HAVUÇ (*Daucus carota* L.) ISLAHINDA HAPLOİDİ TEKNİĞİNDEN
YARARLANMA OLANAKLARI**

Leman KOYUTÜRK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

AĞUSTOS 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HAVUÇ (*Daucus carota* L.) ISLAHINDA HAPLOİDİ TEKNİĞİNDEN
YARARLANMA OLANAKLARI**

Leman KOYUTÜRK
BAHÇE BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS

Bu tez/...../2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ

ÖZET

HAVUÇ (*Daucus carota* L.) ISLAHINDA HAPLOİDİ TEKNİĞİNDEN YARARLANMA OLANAKLARI

Leman KOYUTÜRK

Yüksek Lisans, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS

Ağustos 2023; --- 48 sayfa

Apiaceace familyasının en değerli üyelerinden biri olan havuç (*Daucus carota* L.) önemli bir besin kaynağı ve ekonomik açıdan önemli bir sebze türüdür. Havuç yetiştiriciliği tamamen hibrit çeşitlerden yapılmaktadır. Bu nedenle F1 hibrit çeşitlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda hedef, saf hatlar elde etmektir. Klasik ıslah yöntemleri ile tamamen saf hatlar elde etmek zor ve zaman alıcıdır. Androgenesis yöntemlerinden mikrospor ve anter kültürü yoluyla saf hatlar kısa sürede elde edilebilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı beş farklı havuç genotipinde androgenesis yöntemleri ve iki farklı rejenerasyon ortamı kullanılarak haploid bitki eldesini arttırmaktır. Elde edilen embriyoların sağlıklı gelişmesini sağlamak için bu ortamlardan birine, embriyogenesis üzerine olumlu etkisi olduğu bilinen poliaminlerden pütresin ilave edilerek etkisi araştırılmıştır. Çalışmada mikrospor kültüründe hiçbir genotipin gelişim göstermediği saptanmıştır. Anter kültüründe rejenerasyon ortamına bir poliamin olan pütresinin ilavesi androgenesis yanıtı üzerine olumlu bir etkiye sahip olarak androgenesis teşvik ettiği gözlemlenmiştir. Çalışmada, en yüksek embriyo yanıtı HAR-2 ortamında %24.13 ile TTS-2 çeşidinin donör bitkilerinden, en yüksek bitki yanıtı ise HAR-2 ortamında %17.49 orana sahip TTS-1 genotipinden elde edilmiştir. Çalışmada donör olarak kullanılan 5 genotipe ait bitkiden alınan yaprak örnekleri 48 SSR markörüyle analiz yapılmış ve flow sitometri analizi ile karşılaştırılmıştır. TTS-1 genotipine ait bitkilerin haploid (n) yapıda olduğu belirlenmiş ve SSR markör analizi sonuçlarında ise incelenen bant profilleri homozigot olduğu, TTS-2, TTS-3, TTS-4 ve TTS-5 genotiplerine ait bitkilerin ise diploid (2n) olduğu ve SSR markör analizinde bant profilleri homozigot açılım göstermiştir. Sonuç olarak spontane double haploid olduğu anlaşılmıştır. Bu tez çalışmasının sonuçları havuçta androgenesis yöntemleri ile haploid bitki eldesini arttırılabilmenin mümkün hale gelmesine kaynak sağlayacaktır ve elde edilen double haploid bitkilerin ıslah çalışmalarında kullanılması ile ıslahçılara katkı sağlayacaktır.

ANAHTAR KELİMELE: Anter kültürü, Biyoteknoloji, *Daucus carota*, Flow sitometri, Haploid, Mikrospor kültürü, SSR markör

JÜRİ: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ

ABSTRACT

POSSIBILITIES OF USING HAPLOIDY TECHNIQUE IN CARROT (*Daucus carota* L.) BREEDING

Leman KOYUTÜRK

MSc Thesis in Department of Horticultural Science

Supervisor: Prof. Dr. A. Naci ONUS

August 2023; ---- 48 pages

The carrot (*Daucus carota* L.), one of the most valuable members of the *Apiaceace* family and they are an important food source and economically important vegetable species. Carrot cultivation is carried out entirely from hybrid varieties. Development of F1 hybrid varieties by using pure lines is difficult because it is time-consuming by using classical selfing methods. Present study aims to use androgenesis methods in five different carrot genotypes to increase haploid plant production by using two different regeneration media. To ensure the healthy development of obtained embryos putrescine, one of the polyamines known to have a positive effect on embryogenesis, was added to one of these mediums. Studies clearly showed that there was no embryo formation in microspore culture of 5 carrot genotypes. It has been observed that the addition of putrescine to the regeneration medium in another medium combination used in the present study had a positive effect on the androgenesis response and promoted androgenesis. In this study, the highest embryo response was obtained from the donor plants of the TTS-2 genotypes with 24.13% in the HAR-2 medium, and the highest plant response was obtained from the TTS-1 genotype with 17.49% in the HAR-2 medium. Leaf samples taken from 5 genotypes used as donors in the study were analyzed with 48 SSR markers and compared with flow cytometry analysis. It was seen that the plants that belong to the TTS-1 genotype were haploid (n) in structure. In addition, the band profiles examined in the results of the SSR marker analysis were homozygous, while the plants belonging to the TTS-2, TTS-3, TTS-4, and TTS-5 genotypes were diploid (2n) and, the band profiles showed homozygous expansion in SSR marker analysis. As a result, it was understood that it was spontaneous double haploid formation. The results of this thesis study will make it possible to increase the haploid plant production in carrots by using androgenesis methods and the use of the obtained double haploid plants as pure lines in breeding studies will contribute to the breeders.

KEYWORDS: Anther culture, Biotechnology, *Daucus carota*, Flow cytometry, Haploid, Microspore culture, SSR markers

COMMITTEE: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ



ÖNSÖZ

Apiaceae familyasının en iyi bilinen üyelerinden biri olan havuç (*Daucus carota* L.) dünyada en fazla üretimi yapılan 10 bitki arasında yer almaktadır ve çeşitli değerlendirme alternatiflerinden dolayı üretimi ve tüketimi sürekli artış göstermektedir.

Ülkemizde açıkta yetiştiriciliği yapılan bu türün ıslah çalışmalarında kök şekli ve büyüklüğü, deri rengi, floem ve ksilem rengi, deri yüzeyi, karotenoid ve şeker içerikleri özelliklerine yoğunlaşmıştır.

Havuç haploid bitki eldesinde yapılan çalışmalarda androgenesis ile çoğaltım tekniğinde başarı oranı oldukça fazladır. Haploid/katlanmış haploid (DH) teknolojisi tam bir homozigotiyi çok kısa sürede elde etme olanağı sunmaktadır. Diploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmalarında sonuca daha hızlı ulaşılmaktadır. Havuç anter kültürü çalışmalarında başarı frekansı; genotip, protokolün belirlenmesi, uygun mikrospor aşaması ve uygun besi ortamı ve içeriğine göre değişmektedir. Bu tez çalışmasında beş farklı havuç genotipinde androgenesis yöntemler ve iki farklı rejenerasyon ortamı kullanılarak haploid bitki eldesini arttırmak amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasının hayata geçirilmesi sürecinde desteğini esirgemeyen, bana bu araştırma konusunda yüksek lisans yapma imkânı veren, çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini paylaşarak çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin savunulmasındaki katkılarından dolayı değerli jüri üyeleri Prof. Dr. A. Naci ONUS'a, Prof. Dr. Ersin POLAT'a ve Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ'ye,

Çalışmalarımın çeşitli aşamalarında bana her konuda yardımcı olan Arş. Gör. Tuğçe ÖZSAN'a,

Çalışmamın ploidi seviyelerinin belirlenmesi aşamasında yardımcı olan TARLAB BİYOTEKNOLOJİ AR&GE Limited şirketine,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, samimiyetlerini her zaman hissettiren Özgecen TANYOLAÇ'a, Fatma ASLAN'a, Aylin KULALI'ya ve Afet HORZUM'a,

Öğrenim hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, bu hayattaki en büyük şansım olan aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iv
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	7
3. MATERYAL VE METOT.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Bitkisel materyal	12
3.2. Metot.....	12
3.2.1. Donör bitkilerin yetiştirilme koşulları	12
3.2.2. Laboratuvar ekipmanları ve işlemleri.....	12
3.2.3. Çiçek tomurcuklarının toplanması	13
3.2.4. Donör havuç genotiplerinden alınan tomurcukların yüzey sterilizasyonu...13	
3.2.5. Uygun androgenesis aşamasına sahip anterlerin bulunduğu çiçek tomurcuklarının seçilmesi	14
3.2.6. Androgenesis uyartım ortamının oluşturulması	16
3.2.6.1. İzole edilmiş mikrospor kültürü yöntemi	16
3.2.6.2. Anter kültürü yöntemi... ..	16
3.2.7. Rejenerasyon ortamı	18
3.2.8. Embriyo ortamı	18
3.2.9. Androgenik havuç bitkilerinin aklimatizasyonu	19
3.2.10. DH bitkilerde homozigotluğun SSR markörleri ile belirlenmesi	19
3.2.10.1. DNA izolasyonu	19
3.2.10.2. Çalışmada kullanılan SSR markörleri... ..	20
3.2.10.3. PCR reaksiyon aşaması... ..	20
3.2.10.4. PCR ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi... 24	

3.2.11. Androgenik havuç bitkilerinin ploidi seviyelerinin belirlenmesi	24
4. BULGULAR	25
4.1 Androgenesis yanıtı üzerine mikrospor ve anter kültürü karşılaştırılması.....	25
4.2. Androgenesis yanıtı üzerine anter kültürü besi ortamlarının etkisi.....	25
4.3. Androgenesis yanıtı üzerine genotipin etkisi	28
4.4. Androgenik havuç bitkilerinin SSR markörleri ile homozigotluk tespiti.....	30
4.5. Androgenik havuç bitkilerinin flow sitometri ile ploidi seviyesi tespiti	36
5. TARTIşMA.....	38
6. SONUÇLAR.....	41
7. KAYNAKLAR.....	42
ZGEMİř	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi sunduğum “Havuç (*Daucus carota* L.) Islahında Haploidi Tekniğinden Yararlanma Olanakları” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../2023

Leman KOYUTÜRK

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde oranı
°C	: Santigrat derece
M	: Molarite
mM	: Milimolar
μl	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
μm	: Mikrometre
kg	: Kilogram
g	: Gram
mg	: Miligram
L	: Litre
ml	: Mililitre
cm ²	: Santimetrekare
mm	: Milimetre
dm ³	: Desimetreküp
dk	: Dakika
sn	: Saniye

Kısaltmalar

APS	: Amonyumpersülfat
B5	: Gamborg besi ortamı (1968)
BA	: Benzil Adenin

BAC	: Bakteriyel Yapay Kromozomu
CTAB	:Cetyl trimethylamm bromide
DH	: Double haploid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EST	: Expressed Sequence Tag
EtBr	: Etidyum Bromür
FAOSTAT	: Gıda ve Tarım Örgütü
GSSR	: Genomik DNA Kütüphanesi
MS	: Murashige ve Skoog
NAA	: α -Naftalen Asetik Asit
NLN	: Nitsch & Nitsch (1967) tarafından geliştirilen Lichter (1981-1982) tarafından mofiyeye edilen besin ortamı
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rcf	: Relative centrifugal force
RNase	: Ribonükleaz
SSR	: Basit Dizi Tekrarları
TBE	: Tris Borik asit EDTA
TE	: Tris- EDTA
TEMED	: Tetrametil- Etilendiamin
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Havuç çiçek tomurcuklarının yüzey sterilizasyonu	13
Şekil 3.2. Uygun aşamadaki çiçek tomurcuklarının seçilmesi; a); b) 0.7-1.3 mm uzunluktaki açmamış çiçek tomurcuğu; c); d) mikroskop altında tek çekirdekli mikrospor aşamasındaki anterlerin çiçek tomurcuğundan çıkarılması... ..	15
Şekil 3.3. Embriyoların MS ortamına aktarım aşaması; a) Rejenerasyon ortamında gelişim gösteren embriyolar; b) MS ortamı içeren cam tüpe aktarılmış embriyo	18
Şekil 4.1. Embriyonik gelişme gösteren anterler; a) TTS-1 b) TTS-2 donörlerinin embriyo gelişimi görünüşleri	26
Şekil 4.2. TTS-1 donöründen elde edilen DH bitkilerde polimorfik bant profili; a) GSSR111 markörü; b) BSSR89 markörü	33
Şekil 4.3. TTS-2 donöründen elde edilen DH bitkilerde polimorfik bant profili; a) GSSR91 markörü; b) GSSR122 markörü; c) GSSR138 markörü... ..	33
Şekil 4.4. TTS-3 donöründen elde edilen DH bitkilerde polimorfik bant profili; a) GSSR154 markörü; b) GSSR17 markörü; c) GSSR44 markörü; d) ESSR 30 markörü; e) GSSR16 markörü... ..	34
Şekil 4.5. TTS-4 donöründen elde edilen DH bitkilerde polimorfik bant profili; a) GSSR154 markörü; b) ESSR30 markörü... ..	35
Şekil 4.6. TTS-5 donöründen elde edilen DH bitkilerde ESSR103 markörü polimorfik bant profili... ..	35
Şekil 4.7. Haploid (n) yapıya sahip bitkilerin flow sitometri analizi grafiği	37
Şekil 4.8. Diploid (2n) yapıya sahip bitkilerin flow sitometri analizi grafiği.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Havuç (<i>Daucus carota</i> L.) bitkisine ait bitkisel sınıflandırılması	1
Çizelge 1.2. Dünya havuç üretimi (FAOSTAT 2020).....	2
Çizelge 1.3. Ülkelerin havuç üretim miktarı (FAOSTAT 2020).....	2
Çizelge 1.4 Ülkemizde yıllara göre havuç üretimi (TÜİK 2021).....	3
Çizelge 3.1. Keller ve Armstrong (1977) tarafından modifiye edilmiş B5 (Gamborg vd. 1968) besi ortamı bileşenleri	17
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan SSR markör listesi (Yıldız 2009; Jhang vd. 2010; Cavagnaro vd. 2011; Alessandro vd. 2013; Yıldız vd. 2013; Budahn vd. 2014; Викторова 2014; Parsons vd. 2015)	20
Çizelge 3.3. PCR reaksiyon ürünleri	24
Çizelge 3.4. PCR reaksiyon döngüsü.....	24
Çizelge 4.1. Havuç donör genotiplerinin HAR-1 ortamında androgenesis yanıtları	27
Çizelge 4.2. Havuç donör genotiplerinin HAR-2 ortamında androgenesis yanıtları	27
Çizelge 4.3. Havuç donör genotiplerinin rejenerasyon ortamında yüzde androgenesis embriyo yanıtı.....	29
Çizelge 4.4. Havuç donör genotiplerinin rejenerasyon ortamında yüzde androgenesis bitki yanıtı	29
Çizelge 4.5. DH havuç genotiplerine ait örnek listesi	30
Çizelge 4.6. Havuç donör genotiplerinin PCR sonuçları	31

1. GİRİŞ

Ekonomik açıdan önemli olan familyalar arasında yer alan *Apiaceae* (*Umbelliferae*) familyası dünyada yaklaşık olarak 450 cins ve 3700 türe sahiptir (Pimenov ve Leonov 1993). *Apiaceae* familyasının en iyi bilinen üyeleri arasında havuç (*Daucus carota* L.), dünyada en fazla üretimi yapılan 10 bitki arasında yer almaktadır ve çeşitli değerlendirme (taze, pişirilmiş, meyve suyu, tatlandırıcı vb.) alternatiflerinden dolayı üretimi ve tüketimi sürekli artış göstermektedir (Simon vd. 2008).

Serin iklim sebze olan havuç bitkisi, özellikle çimlenme ve sonrasındaki erken dönemde soğuklara karşı toleransının yüksek olması sebebiyle serin bölgelerimizde ilkbahar aylarında, ılıman bölgelerimizde ise kış aylarında rahatça yetiştirilebilmektedir (Kıracı ve Padem 2015). Havuç çiçek yapısı, küçük şemsiyelerin dizilerek büyük bir şemsiye formunu almasıyla oluşmaktadır. Çiçekler 5 çanak yaprak, 5 taç yaprak, 5 erkek organ ve tek parçalı 1 dişi organdan oluşmaktadır. Çoğunlukla çiçekler andromonoik yapıdadırlar. Erkek organların erken olgunlaşmasından (protandri) dolayı bitki yüksek oranda yabancı tozlanmakta ve kendilenme oranı yaklaşık %15 civarındadır (Thompson 1962).

Havuç bitkisi birinci yılda, 60-150 gün içerisinde çevre şartları ve genotip özelliklerine bağlı olarak vejetatif organlarını oluştururken, ikinci yılda generatif organlarını oluşturur (Günay 2005). Düşük sıcaklıklar sonucunda ortaya çıkan erken çiçeklenme eğilimi (sapa kalkma), havuç ıslahçıların seleksiyonda dikkat etmesi gereken en önemli özelliktir (Peterson ve Simon 1986). Havuç bitkisinin çiçeklenmesi 8-10 haftalık vernalizasyon döneminden sonra başlar (Bradeen ve Simon 2007).

Apiaceae (*Umbelliferae*) familyasının en değerli üyelerinden biri olan havucun anavatanı Orta Asya olduğu bilinmektedir (Lucier ve Lin 2007). Çeşitliliğin birincil merkezi olan Afganistan'da kültüre alınmış olup, buradan Avrupa, Akdeniz ve Asya'ya yayılmış ve çeşitliliğin ikincil merkezi olarak Türkiye kabul edilmiştir (Stolarczyk ve Janick 2011). Havuç bitkisinin taksonomisi ve bilimsel sınıflandırılması Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Havuç (*Daucus carota* L.) bitkisine ait bitkisel sınıflandırma

Alem	Plantae (Bitkiler)
Bölüm	Spermatophyta
Alt Bölüm	Angiospermae
Sınıf	Dicotyledoneae
Familya	Umbelliferae (<i>Apiaceae</i>)
Cins	<i>Daucus</i>
Tür	<i>Daucus carota</i> L.

Havuç üretim bakımından incelendiğinde; Çizelge 1.2 ve çizelge 1.3’de 2020 FAOSTAT verilerine göre dünyada yıllık yaklaşık olarak 42 milyon ton havuç üretiminin büyük bir kısmının Asya ülkelerinde olduğu görülmektedir. Dünya havuç üretiminin neredeyse yarısı Çin’de yapılmaktadır ve tek başına toplam üretimin yaklaşık %48’ini oluşturmaktadır. Özbekistan, ABD, Rusya, Polonya, Fransa, Japonya, İngiltere, İtalya, Almanya, Ukrayna, Hollanda ve Türkiye havuç üretiminde önde gelen ülkelerdir. Dünyada 13. sırada yer alan havuç için ikincil çeşitlilik merkezi olarak kabul edilen Türkiye’nin yıllık üretimi yaklaşık 555 bin tondur.

Çizelge 1.2. Dünya havuç üretimi (FAOSTAT 2020)

Kıtalar	Üretim miktarı (ton)
Asya	25,556,627
Avrupa	8,496,009,8
Amerika	3,726,028,8
Afrika	2,244,718,8
Okyanusya	369,702,6

Çizelge 1.3. Ülkelerin havuç üretim miktarı (FAOSTAT 2020)

Ülkeler	Üretim Miktarı (ton)
Çin	18,146,964
Özbekistan	2,876,031
Amerika Birleşik Devletleri	1,582,238
Rusya Federasyonu	1,368,576
Ukrayna	862,46
Almanya	802,23
İngiltere	799,715
Polonya	689,1
Endonezya	675,76
Türkiye	591,377

Çizelge 1.4 Ülkemizde yıllara göre havuç üretimi (TÜİK 2021)

Yıllar	Üretimde Öne Çıkan İller			Türkiye Geneli	
	Şehirler	Üretim Alanı (dekar)	Üretim miktarı (ton)	Üretim Alanı (dekar)	Üretim miktarı (ton)
2018	Konya	68,150	424,636	123,478	642,837
	Ankara	23,500	132,890		
	Hatay	21,550	58,190		
2019	Konya	66,367	425,241	125,772	663,882
	Ankara	27,180	59,991		
	Hatay	22,085	152,718		
2020	Konya	50,373	337,820	109,890	588,778
	Ankara	28,041	154,944		
	Hatay	22,158	68,933		
2021	Konya	49,900	353,700	100,686	590,483
	Ankara	27,952	155,194		
	Hatay	14,606	57,218		

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre çizelge 1.4’de görüldüğü üzere ülkemizde havuç üretim miktarı 2020 yılına kadar artış göstermekte olup 2020 yılında düşüş göstermiştir. 2021 yılında ise 590.483 tona yükselmiştir. Türkiye havuç üretiminin büyük bir kısmını Konya, Hatay ve Ankara illeri oluşturmaktadır. Türkiye’de havuç ekili arazinin % 45.8’i, Türkiye’de üretilen havucun ise % 57.3’ü Konya ili tarafından karşılanmaktadır. Ülkemizde kışlık olarak üretimi yapılan havucun sebze üretiminde önemli bir paya sahip olduğu kaçınılmazdır.

Karotenoid içeriği yüksek olan havucun bazı kanser türlerine, kalp-damar hastalıklarına, katarakt ve görme bozukluğu gibi hastalıklara yakalanma olasılığını azalttığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bilinmektedir (Vaishnava ve Hooper 2011, Abdel-Aal ve ark. 2013, Shebaby ve ark. 2013). Önemli bir A vitamini kaynağı olan havuç, K ve β -karoten bakımından oldukça zengindir ve B1 ve B2 vitamin kaynağıdır (Kasim ve Kasim 2019). Havuç; turuncu, mor, sarı, kırmızı ve beyaz olmak üzere renk çeşitliliği gösterir. Turuncu havuçlarda karotenoidlerden; α ve β -karoten, sarı havuçlarda lutein, kırmızı havuçlarda likopen miktarı yüksek iken mor havuçların köklerinde antosiyoninler ve siyah havuçlarda antosiyeninler ile birlikte feonolik bileşikler bulunmaktadır (Xu vd. 2014). Havuçta ıslah çalışmaları renk, şekil, büyüklük ve karotenoid ve şeker içerikleri özelliklerine yoğunlaşmıştır (Rubatzky vd. 1999; Baranski vd. 2012).

İkincil çeşitlilik merkezi olarak kabul edilen ülkemizde havuç yetiştiriciliği hibrit çeşitlerden yapılmaktadır (Duran 2019). F1 hibrit çeşitler yüksek verimlilik, geniş adaptasyon yeteneği, hastalıklara dayanıklı, tarımsal özellikler bakımından üstün çeşitler olduğundan çok fazla tercih edilmektedir (Kesici 2002). Havuçta kendileme depresyonu görülmektedir. Kendileme yapıldığı takdirde, kök ağırlığı ve tohum verimini de içine alan bazı karakterlerde %24'den %73'e varan şiddetli bir kendileme etkisi meydana gelmektedir. Havuçların "Queen Anne's Lace" olarak tanımlanan "yabani formları" ile kolayca melezlenebildiği de bilinmektedir (Simon 1993). Yüksek oranda yabancı tozlanan havuç gibi bitki türlerinde, hibrit tohumların üretilmesinde zorluklar yaşanmaktadır. Özellikle havuç gibi erselik (Hermafrodit) çiçek yapısına sahip yabancı tozlanan bitkilerde, kontrollü melezleme yapabilmek için emaskülasyon yapılmalıdır (Sarcan 2018). Klasik ıslah yöntemleriyle genetik olarak tamamen saflaştırılmış hatların elde edilmesi 6 yıllık bir süreci kapsamakta ve ancak % 98 oranında homozigot hatlar elde edilmektedir (Stein ve Nothnagel, 1995; Germanà 2006; Ferrie ve Möllers 2010). Biyoteknoloji yöntemlerinden biri olan haploidizasyon ile tamamen homozigot bitkiler üretilmektedir.

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, üreme hücrelerindeki kromozom sayısına eşit olan bitkilere haploid bitkiler adı verilmektedir (Şehirali ve Özgen 2013). Double haploid bitkiler ise, spontan yada kimyasal madde uygulamaları ile kromozom sayısı iki katına çıkmış haploid bitkilerdir (Germanà 2011). Haploid bitkiler; gen haritalamaları, genetik analizler, transformasyon, mutasyon, somatik hibridizasyon, biyokimyasal ve fizyolojik analizler, tohum üretimi olmak üzere çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır (Maraschin SF vd. 2005).

Haploid yolla bitki üretimi 3 yöntemle yapılmaktadır.

- 1) Dişi Gametten Haploid Uyartımı.
- 2) Erkek Gametten Haploid Uyartımı (Androgenesis).
- 3) Eksik veya Yetersiz Polenle Tozlama.

Androgenesis, mikrospor ve anter kültürü yöntemlerinden oluşmaktadır. Sebze ıslahında anter kültürü yaygın kullanılan yöntemler arasındadır. Havuç haploid bitki eldesinde yapılan çalışmalarda androgenesis ile çoğaltım tekniğinde başarı oranı oldukça fazladır. Anter kültüründe androgenesisin etkinliği; genotip, donör bitkinin yetiştirilme koşulları, anterlerin gelişme dönemi, besi ortamının bileşimi ve yapısı, anterlere yapılan ön uygulamalar, inkübasyon koşullarına bağlıdır (Keller ve Armstrong 1977; Bajaj 1990; Andersen vd. 1990; Osolnik vd. 1993; Górecka 1998). Dewi vd. (2004); Chiancone vd. (2006); Hema ve Murthy, (2008) yaptıkları çalışmalarda besi ortamının bileşimi ve yapısının anter kültüründeki embriyogenesisi etkileyen en önemli faktörlerden birisi olduğu tespit edilmiştir. İndüksiyon ortamı bileşiklerinden biri olan poliaminler embriyogenesisin etkisini geliştirmeye yardımcı olan faktörlerdir.

Poliaminler bütün yaşayan organizmalarda vardır. Bitkilerde ise hücre duvarı, kloroplast, mitokondri, vakuoller, çekirdek ve çekirdekçikte yer alırlar (Niklas vd. 1998). Poliaminler birçok bitki fonksiyonlarını içerir (Sińska 1986); bunlar;

- Bitkilerin büyüme ve gelişiminde,
- Çiçek tomurcuklarının farklılaşmasında,
- Tomurcukların açmasında,
- Organogenesiste,
- Meyve oluşumunda
- Polen canlılığında etkilidir.

Poliaminler birçok fizyolojik ve metabolik süreçte de yer alırlar. Örneğin; sitoplazmik zarın bozulmasını önler, aşırı etilen yoğunluğunu önleyerek yaşlanma sürecini geciktirir (Tiburcio vd. 1993), mineral eksikliği durumunda anyonlar ve kationlar arasındaki dengeyi sağlar (Watson ve Malmberg 1996), çekirdek kromatini, hücre iskeleti, lipoprotein zarları üzerine stabilize edici bir etkiye sahip olmasının yanında sitozolik proteinlerin çapraz bağlarına katılarak hücre iskeletini dengede tutar. Poliaminler olmasaydı hücre replikasyon yapamaz ve hücre iskeletindeki mikrotübüller ve aktin filament demetleri yok olurdu (Jabłońska-Trypuć ve Czerpak 2007).

Haploid/katlanmış haploid (DH) teknolojisi tam bir homozigotiyi çok kısa sürede elde etme olanağı sunmaktadır (Kiszczak vd. 2017). DH hatlar ıslah programları için değerlidir. Diploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmalarında sonuca daha hızlı ulaşılmaktadır. Havuç anter kültürü çalışmalarında başarı frekansı; genotip, protokolün belirlenmesi, uygun mikrospor aşaması ve uygun besi ortamı ve içeriğine göre değişmektedir.

Androgenesis uygulamasında uygun haploid bitkiler elde etmek için uygun başlangıç materyali birinci polen mitozu aşamasında olan olgunlaşmamış polenlere sahip tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterlerdir (Andersan vd.1990; Tyukavin vd. 1999). Uygun aşamadaki anterleri bulunduran çiçek tomurcuklarına yüzeysel sterilizasyon işlemi uygulandıktan sonra steril koşullarda tomurcuklar içerisinden çıkarılan anterler indüksiyon ortamına alınırlar. Anterler içerisindeki olgunlaşmamış mikrosporlar hücre bölünmeleri ile gelişerek kallus, embriyo veya bitkicik formunda anter dışına çıkarlar.

Diploid ($2n = 2x = 18$) bir tür olan havuç bitkilerinin totipotensi özelliğinin göstermesi (bir bitkisel hücrenin tüm bir bitkiyi rejenere edebilmesi) açısından önemli bir türdür (Steward 1958; Vogel 2005). Havucun DNA hacmi 0.98 pg/1C içeriğinde ve her bir kromozomu 473 Mbp büyüklüğündedir (Arumuganathan ve Earle 1991). Havuçta homozigotiyi yakalamanın zorluğu ve 2 yıllık bir yetiştirme döngüsüne sahip olmasından dolayı ıslahı zordur. Bundan dolayı haploid çalışmaları büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca DH havuç hatları agronomik özellikleri kontrol eden genlerin haritalanması, genom sekanslarının tespit edilmesi, gen ifadesini kontrol mekanizmalarının ortaya çıkarılmasında ve hatta değişikliğe uğratılması çalışmaları için eşsiz materyallerdir (Iorizzo vd. 2016).

Bu tez çalışmasında beş farklı havuç genotipinde androgenesis yöntemler ve iki farklı rejenerasyon ortamı kullanılarak haploid bitki eldesini arttırmak amaçlanmıştır. Elde edilen embriyoların sağlıklı gelişmesini sağlamak için bu ortamlardan birine, embriyogenesis üzerine olumlu etkisi olduğu bilinen poliaminlerden pütresin ilave edilerek etkisi araştırılmıştır. Daha önce yapılmış olan çalışmalar incelendiği zaman pütresin ilavesi havuçta sadece anter kültürü çalışmalarında kullanılmış olup, mikrospor kültürü çalışmalarında kullanılmamıştır. Bu çalışma ile rejenerasyon ortamına pütresin ilavesi, hem mikrospor kültürü çalışmalarında hem de anter kültürü çalışmalarında ilk defa kullanılmıştır. Biyoteknolojik yöntemlerin başında gelen doku kültürünün uygulamalarından biri olan anter kültürü yöntemi ile elde edilen haploid ve DH havuç bitkilerinin elde edilmesini sağlamak yeni çeşitlerin geliştirilmesinde ıslah sürecinin kısalmasına katkı sağlayacaktır. Bu tez çalışması anter kültürü konusunda gelecekte yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacaktır.



2. KAYNAK TARAMASI

Bitki ıslahı, mevcut bir bitkisel materyalden daha üstün özelliklere sahip çeşitler geliştirmek için yapılan kalıtsal değişimlerdir. Yeni çeşitlerin geliştirilmesi klasik ıslah metodları ile zaman alıcı olması biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Biyoteknoloji; bitkilerin doku ve organlarının kullanılarak yeni bitkilerin elde edilmesini sağlayan bir teknolojidir. Biyoteknolojik yöntemlerden biri olan doku kültürü çalışmaları ile haploid bitkiler elde edilerek ıslah çalışmalarının hızlanması sağlanmıştır.

Dünya nüfusunun artışına paralel olarak bitkisel ürünlerin üretimi daha çok artmıştır. Bitkisel üretimin temelini tohum oluşturmaktadır. F1 hibrit teknolojisi ile ideal tohumların elde edilmesi daha hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Krystyna Górecka vd. (2005), Havuç anter kültüründe çeşit, donör bitki ve kültür yönteminin etkisinin androgenesis üzerine etkilerini tespit etmek için yaptıkları çalışmada yüksek karoten içeriğine sahip CxC 9900 F1, Lucky B F1, HCM, Beta III ve Perfekcja çeşitlerini kullanmışlardır. Çalışmada; iki anter kültürü yöntemi karşılaştırılmıştır. 1) İki hafta karanlık inkübasyon koşullarında tutulan anterler sonrasında aynı bileşenlere sahip temiz ortama transfer edilip devamlı olarak ışığa maruz bırakılmıştır. 2) Anterler embriyo oluşturma kadar karanlık inkübasyon koşullarında tutulmuştur. Fakat anterleri temiz bir ortama aktarma işlemi bu aşamada yapılmamıştır. Her iki yöntemde de inkübasyon sıcaklığı 27 °C olarak ayarlanmıştır. En yüksek androgenesis yanıtı 100 anter başına 5.6 embriyo oluşturarak ve % 13 ile en yüksek anter cevabı veren çeşitin HCM olduğu saptanmıştır. Diğer çeşitlerin HCM çeşitinden oldukça farklı olduğu seyrek bir şekilde embriyo oluşturduğu, Lucky B F1 çeşitinde embriyogenesisin meydana gelmediği gözlemlenmiştir. Anter kültürü yoluyla androgenesis sürecinde genotipin önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir.

Krystyna Górecka vd. (2009), Rejenerasyon sürecinin etkinliği üzerine rejenerasyon ortamının etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada Feria F1', 'Monanta' and 'Splendid F1' (Rijk Zwan; De Lier—Holland), 'Nerac F1', 'Kazan F1' and Narbonne F1' (Bejo Zaden B.V., Warmenhuizen—Holland) and 'HCM' (P.W. Simon, USDA, ARS, Department of Horticulture, University of Wisconsin, Madison) olmak üzere yedi havuç çeşidi kullanmışlardır. Beş farklı rejenerasyon ortamı test edilmiştir: 1) B5-1 (Gamborg vd.1968): 20 g dm⁻³ sukroz ve 20 mg dm⁻³ kinetin 2) B5-2 : 20 g dm⁻³ sukroz ve hormon yok 3) MS-1 (Murashige ve Skoog 1962): 20 g dm⁻³ sukroz ve 0.5 g dm⁻³ aktif kömür 4)MS-2: 20 g dm⁻³ 1mg dm⁻³ BA, 0.001mg dm⁻³ NAA 5) MS-3: g dm⁻³ sukroz ve büyüme düzenleyiciler yok.Çalışmada üç farklı deney yürütülmüştür. 1. Feria F1 çeşidinin androjenetik embriyolarının rejenerasyon ortamında embriyo gelişimleri kültüre alındıktan 6,8 ve 12 hafta sonra gözlemleri yapılmıştır. 2. Bütün çeşitler beş farklı rejenerasyon ortamında 12 hafta sonra gözlemleri yapılmıştır.3. B5-2, MS-1, MS-2 ve MS-3 ortamlarında 'Feria F1', 'Narbonne F1' ve 'HCM', çeşitlerinin oluşturduğu embriyolar gözlemlenmiştir. Birinci deneyden alınan sonuçlar Feria F1 çeşidinin B5-1 ortamında altı hafta sonra öldüğü, B5-2 ortamında sekiz hafta sonra ikincil embriyoların %39'unun bitkiciğe dönüşmeye başladığı, MS-1, MS-3 ortamında bu süreç geciktiği, B5-2, MS-1, MS-2, MS-3 ortamında 12 hafta sonra tam bitkilerin oluştuğu tespit edilmiştir. İkinci deneyde 7 havuç çeşidinin kültüre alınmasından 12 hafta sonra yapılan gözlemlerde B5-2, MS-

1,MS-3 ortamlarının avantajlı olduğu, Feria F1 Narbonne F1 çeşitlerinin embriyolarının %40'dan fazlası HCM ve Monatta çeşitlerinin %20'si tam bitkiye dönüştüğü saptanmıştır. Üçüncü deneyde en fazla oluşan tam bitki sayısının B5-2 ortamında olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada rejenere olan bitkilerin %40'dan fazlasının dış koşullara uyum sağladığı bildirilmiştir.

Krystyna Górecka vd. (2010), Çalışmada Feria F1 çeşitinin mikrosporları 0.1 mg/ L 2,4-D, 0.1 mg/ L NAA, 500 mg/ L L-glutamin,100 mg/ L L-serin ve 100 mg/ L sukroz içeren B5 sıvı ortamına (Gamborg vd.1968) alınmıştır ve mikrosporların gelişim aşamaları gözlemlenmiştir. Gözlem sonucunda çift çekirdekli ve çok ücreli yapıların oluşumları dikkat çekmiştir. Rejenere olan bitkilerde mikrosporogenesisin tetrad aşaması baskın durumda olduğu tespit edilmiştir. Kültüre alındıktan sonra 24 afa boyunca embriyolar oluşmaya devam etmiştir. Toplam 90 bitkiden 42 tanesi rejenerasyon sonucu adapte olmuştur (%46) ve mikrospor kültüründen elde edilen bütün androgenetik bitkilerin diploid olduğu flow-sitometri testinde belirtilmiştir.

Krystyna Górecka vd. (2014), Kazan F1 ve Narbonne F1 çeşitlerinin anter kültüründeki androgenesisin etkinliği üzerine pütresin ve spermidin poliaminlerinin etkilerini ve androgenetik embriyolardan bitki rejenerasyon sürecinin üzerine pütresinin etkisini incelemek için yaptıkları çalışmada sonuç olarak her iki poliamin ayrı ayrı veya kombinasyonlu bir şekilde inkübasyon ortamında kullanılması durumunda Kazan F1 çeşitinde elde edilen embriyoların sayısını arttırdığı, en çok artışın ise pütresinin bulunduğu ortamda gözlemlendiği fakat Narbonne F1 çeşitinde poliamin uygulamasının androgenetik embriyolarda artış göstermediği saptanmıştır. Elde edilen bütün embriyolar B5 rejenerasyon ortamına alınarak gelişimleri devam ettirilmiştir. Bu çalışmada rejenerasyon ortamına 160 mg/L pütresin ilavesi çok sayıda köklenmiş rozet oluşturarak olumlu sonuçlar verdiği fakat pütresin yoğunluğunun arttırılması durumunda elde edilen bitki sayısında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Pütresinin bulunduğu indüksiyon ortamında elde edilen embriyoların 0.5 mg/L pütresin sahip rejenerasyon ortamına transferi elde edilen bitki sayısını arttırmada etkili olduğu belirlenmiştir. Androgenetik bitkilerin büyük çoğunluğu çift kromozom setine sahip olduğu ve spontan diploidizasyon meydana geldiği saptanmıştır. İndüksiyon ortamının elde edilen bitkilerin ploidi üzerine hiçbir etkisi olmadığı bulunmuştur.

Waldemar Kiszczak vd. (2015), donör bitkilere düşük sıcaklık (4°C) uygulamasının optimal süresini belirlemeyi ve bu faktörün androgenesis üzerine etkisini incelemeyi hedeflemişlerdir. Anter kültürü için havuç materyalleri 9, 12 ve 21 günlük düşük sıcaklık uygulaması yapıldıktan uygun mikrospor aşamasındaki çiçek tomurcukları toplanmıştır. Sterilizasyon işlemi yapılan çiçek tomurcuklarından kesilen anterler B5 (Keller ve Armstrong) ortamına alınmıştır. Petriler 27°C sıcaklıkta karanlık koşullarda embriyo oluşumu gözlenene kadar tutulmuştur. Embriyo oluşumundan sonra devamlı ışığa maruz bırakılmıştır. Rejenerasyon ortamı için B5 (hormonsuz, 20 g.L⁻¹ sukroz) ortamı kullanarak yeşil embriyoların aktarımı yapılmıştır. Çalışma sonucunda soğuk uygulaması yapılmayan donör bitkilerden embriyonun 87 gün sonra oluştuğu, 9 gün uygulanan düşük sıcaklık uygulamasında embriyoların 91- 106 gün sonra, 21 gün uygulanan düşük sıcaklıkta embriyoların 72-97 gün sonra ortaya çıkmasına rağmen 12 gün düşük sıcaklık uygulamasının embriyo oluşumunda daha etkili olduğu 100 anter başına 24.3 embriyo ile ortaya koyulmuştur. Donör bitkiye uygulanan düşük sıcaklık androgenesis yönteminde embriyo gelişimini etkilediği saptanmıştır.

Waldemar Kiszczak vd. (2017) yaptıkları çalışmada katlanmış haploid (DH) havuç hatlarını elde etmek için anter kültürü ve mikrospor kültürü metotlarını karşılaştırmak için her iki yöntemde de Kazan F1, Feria F1, ve Narbonne F1 çeşitleri kullanılmak için belirlenmiştir. Androgenesiste indüksiyon aşaması, embriyolardan bitki rejenerasyonu, androgenetik bitkilerin aklimatizasyonu ve karakterizasyonunun karşılaştırılması yapılmıştır. Her iki yöntemde de bitki üretiminin her aşamasında etkili olan en önemli faktörün çeşit olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak anter kültüründe Feria F1, mikrospor kültüründe Kazan F1 en çok embriyo oluşturan çeşitler olduğu saptanmıştır. Anter kültüründen elde edilen bitkilerin aklimatizasyon başarısının mikrospor kültüründen elde edilen bitkilerden daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

Havuç türünde haploid bitkilerin üretimi androgenesis veya partenogenesis uyartımı ile sağlanabilir (Andersen vd. 1990; Matsubara vd. 1995; Adamus ve Michalik 2003; Li vd. 2013; Kielkowska vd. 2014). İndüksiyon ortamına yerleştirilen anterler henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrospora sahiptir. Havucun çiçekleri ve anterleri çok küçük yapılarda olduğu için anter kültürü yönteminin yapılmasının teknik olarak zor olduğu ve androgenetik yanıtın yüksek olmadığı öne sürülmesinden dolayı literatürde çok sayıda çalışma mikrospor kültürü üzerine yapılmıştır.

W. Kiszczak vd. (2017) tarafından üç havuç genotipinde yapılan çalışmada anter ve mikrospor kültürü yöntemlerinin androgenetik cevapları oranlarının benzer olduğu tespit edilmiştir. Havuç çiçeklerinin dışı tepeleri *in situ* ortamında maydanoz (*Petroselinum crispum*) poleniyle tozlanarak haploid embriyo gelişimi teşvik edilmiştir ve 20-22 gün sonra ovüller besi ortamına ekilerek embriyoların gelişimi gözlemlenmiştir. Bu yöntemle elde edilen haploid ve diploid bitkilerin moleküler analizleri sonucunda yaklaşık %70 oranında gametik kökenli olduğu saptanmıştır (Kielkowska vd, 2014).

W. Kiszczak vd. (2018) androgenesis yöntemi kullanarak DH havuç elde etmeği amaçladıkları çalışmada, anter kültüründe DH havuç elde etmede etkili olan genotip, donör bitkinin oluşumu ve bitki büyüme düzenleyicilerin etkisini değerlendirmişlerdir. Feria F1, Kazan F1, Narbonne F1 olmak üzere üç farklı bitki materyali kullanılmıştır. Donör bitkiler Górecka vd. (2005)'nin metoduna göre büyüme odalarında, sera koşullarında ve açık alanda olmak üzere üç farklı metotla büyütülmüştür. İndüksiyon ortamı olarak B5 ortamı (0.1 mg/ L 2,4-D, 0.1 mg/ L NAA, 500 mg/ L L-glutamin, 100 mg/ L L-serin, 100 mg/ L sukroz, 6.5 g/L agar) belirlenerek her petriye 48 anter yerleştirilmiştir. Petriler 27°C' de karanlıkta tutulmuştur. 6 hafta sonra embriyo oluşumu gözlemlendikten sonra devamlı olarak ışığa (30 $\mu\text{mol/m}^2 \text{ s}^{-1}$) maruz bırakılmıştır. Genotipin etkisi incelendiğinde 100 anter başına 305.3 embriyo ile Feria F1 çeşidi en yüksek embriyo sayısını oluşturduğu saptanmıştır. Araştırmada kontrollü koşullarda yetiştirilen donör bitkilerinden daha yüksek oranda embriyo elde edilmiştir. 6.5 g.L⁻¹ agar ve 20 g.L⁻¹ sukroz içeren B5 ve MS ortamına dayalı B5-1 (büyüme düzenleyiciler ve aminoasitler yok), B5-2 (20 mg.L⁻¹ kinetin), MS-1 (0.5 g.L⁻¹ aktif karbon), MS-2 (1 mg.L⁻¹ BA, 0.001 mg.L⁻¹ NAA) dört farklı rejenerasyon ortamı kullanılmıştır. En iyi embriyo gelişimi B5-1 ortamında olduğunu gözlemlenmiştir. Çalışma sonunda rejenere olan bitkilerin %60'dan fazlası aklimatizasyonda başarılı olmuştur. Ploidi analizi sonucunda bitkilerin %92'sinin diploid olduğu tespit edilmiştir.

Redha ve Suleman (2011), buğdayda dışarıdan uygulanan poliaminlerin anter kültürü üzerine yaptıkları çalışmada DH, ICR1, ICR4, ICR17, ICR33, ICR39 donör bitkileri seçilerek tohumları çimlendirme kağıtlarında çimlendirme işlemi yapılmıştır. Gelişen bitkilerden asetokarmin kullanılarak gelişim aşamaları belirlenen orta-geç tek çekirdekli aşamaya sahip mikrosporları bulunduran materyaller seçilmiştir. Anter kültürü çalışmaları için sıvı indüksiyon ortamı (AM), embriyo ortamı (EM), rejenerasyon ortamı (PM) kullanılmış olup EM ve PM ortamına 3g/L phytigel eklenmiştir. Anterler indüksiyon ortamına aktarılmıştır ve 28°C’de, 7 hafta boyunca karanlık koşullarda tutulmuştur. İnkübasyon sonrası embriyonik yapılar sayılmıştır ve PM ortamına aktarımı yapılarak 27°C’de, 16 saat fotoperiyotta gelişmeleri sağlanmış ve 4 hafta sonra rejenere olan bitkilerin sayımı yapılmıştır. Toplam 50 bitki genotipi androgenetik performans ve rejenerasyon kapasitesi bakımından incelenmiştir. DH genotipi için her bir poliamin (pütresin, spermidin ve spermin) birbirinden bağımsız olarak 1mM veya 0.5+0.5 mM olarak her üç poliaminin kombinasyonu şeklinde ön işlem yapılmıştır. Ön işlemlerin süresi 1, 3 ve 6 saat olarak belirlenmiştir. ICR1, ICR4, ICR17, ICR33, ICR39 genotipleri için her bir poliamin (pütresin, spermidin ve spermin) birbirinden bağımsız olarak 1mM veya 0.5 mM olarak her üç poliaminin kombinasyonu şeklinde ön işlemler 1 ve 3 saat olarak belirlenmiştir. Embriyonik yapılara uygulan poliamin uygulamaları ise şu şekildedir; ICR4 ve ICR39 genotiplerine 1mM pütresin, spermidin ve spermin birbirinden bağımsız olarak ve 0,5 mM olarak her üç poliaminin kombinasyonu şeklinde uygulamaları yapılmıştır. Çalışma sonunda genotipler arasında embriyonik yapıların oluşumu ve rejenere olmuş bitkiler arasında farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. 6 genotipten elde edilen embriyonik yapıların % 9-20’sinin rejenere olduğu saptanmıştır. DH genotipine sahip anterlerine yapılan ön uygulamalar incelendiğinde, bütün uygulamalardan yaklaşık 3-4 hafta içerisinde androgenetik yanıtın alındığı tespit edilmiştir. 1 saat 1 mM spermin uygulamasının embriyonik yapıların oluşumunda etkili olduğu ve 1 mM spermidin ve spermin uygulamasının yeşil bitki oluşumunu hızlandırdığı tespit edilmiştir. Pütresin, spermidin ve spermin poliaminlerinin etkilerinin genotipe ve uygulama sürelerine bağlı olarak embriyonik yapıların ve yeşil bitki oluşumuna etki ettiği çalışma ile ortaya koyulmuştur.

Hema ve Murthy (2008) yaptıkları çalışmada *Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass. (niger) bitkisinin *in vitro* androgenesisin gelişimi için poliamin ve aminoasitleri kullanmışlardır. Anter kültüründe embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu üzerine aminoasitlerden arjinin, asparajin, sistein, glutamin, glisin ve prolin, poliaminlerden pütresin ve spermidini kullanarak etkileri incelenmiştir. İndüksiyon ortamına aminoasitlerin tek veya kombinasyonlu bir şekilde eklenmesinin embriyo oluşumunu arttırdığı, B5 ortamına eklenen poliaminlerin ise embriyogenesis oranını arttırdığı saptanmıştır.

B. Chiancone vd. (2006), *in vitro* anter kültüründe poliaminlerin etkisi *Citrus clementina* bitkisi üzerinde araştırılmıştır. Poliaminler serbest, çözünür ve çözünmez konjuge durumdaki seviyelerine dikkat edilerek araştırma yürütülmüştür. Çalışmada pütresin, spermidin ve pütresin+spermidin indüksiyon ortamına eklenmiştir. Kültüre alınmadan önce anterlerde tespit edilen serbest poliaminler arasında en çok bulunan spermidindir. Elde edilen bulgularda pütresin ve spermidinin birbirinden bağımsız veya kombinasyon şeklinde uygulanması poliaminlerin alımını ve birikimini büyük ölçüde etkilediği görülmüştür. Ortama 2 mM spermidin ilavesinin *Citrus clementina* ‘deki

gametik embriyogenesi uyardığı fakat pütresinin embriyo oluşumunu etkilemediği görülmüştür. Rejenere olan bitkilerin çoğu triploid, bir kısmının ise haploid olduğu tespit edilmiş olup haploid bitkilere rastlanılmamıştır.



3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılmış olan bitkisel materyaller Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde yetiştirilmiş olup, doku kültürü çalışmaları da Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü doku kültürü laboratuvarında 2022 yılında yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak; Turuncu havuç tipine ait TTS-1, TTS-2, TTS-3, TTS-4, mor havuç tipine ait TTS-5 olmak üzere beş farklı havuç genotipi kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Donör bitkilerin yetiştirilme koşulları

Beş farklı havuç genotipine ait tohumlar Temmuz ayı sonunda içleri torf ve perlit (2:1) ile doldurulmuş viyollere ekilmişlerdir. Çimlenmeyi takiben bir ay sonra fideler küçük saksılara alınmışlardır. Fidelerin sulama işlemleri bir gün ara ile yapılmıştır. Bir ay sonra kök gelişiminin rahat olması için bitkiler büyük saksılara aktarılmıştır. Bir ay sonra 4°C'de vernalizasyona alınmış olan bitkiler altmış gün sonunda da tam kontrollü seralara transfer edilmişlerdir.

3.2.2. Laboratuvar ekipmanları ve işlemleri

Araştırmada besi ortamlarının hazırlanmasında cam beherler, manyetik karıştırıcı, mezürler ve pH metre kullanılmıştır. Besi ortamlarını muhafaza edebilmek amacı ile sterilizasyonu yapılmış 6 cm çapında steril petri kapları kullanılmıştır. Araştırmada laboratuvar ortamında kullanılmış olan pensler, petriler, bistüriler, kurutma kağıdı, beher ve mikro pipet uçları gibi gerekli olan malzemelerin sterilizasyonunun sağlanması için 20 dakika boyunca 121°C sıcaklıkta ve basıncın 1.2 kg/ cm² olduğu otoklav cihazında gerçekleştirilmiştir. Otoklav cihazında sterilizasyonu gerçekleştirilemeyen streç film, asetat kalem, tomurcukların yer aldığı falcon tüpleri, havlu peçete gibi çalışmada kabinde kullanılması gereken malzemelerin yüzey sterilizasyonu %70 alkol ile sağlanmıştır.

Kültüre alma işlemleri steril kabinler içerisinde yapılmıştır. Kültüre alma işlemi gerçekleşmeden önce steril kabinin içi %70 alkol ile silinip ardından 20 dakika boyunca da UV ışık ile sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Steril kabin içerisinde kullanılacak diğer ekipmanlar içinde UV ışık işlemi gerçekleştirilmiştir.

Mikrospor gelişim aşamalarının belirlenmesinde ışık mikroskobu kullanılmıştır. Uygun mikrospor aşamasındaki anterlerin umbellerin içindeki tomurcuklardan çıkarılması işlemlerinde ise stereo mikroskop kullanılmıştır. Aynı zamanda anter kültürü işleminde tomurcukların içerisinde yer alan anterler sivri uçlu 13 cm uzunluğunda olan pens ve 11 numaralı bistüri ucu yardımıyla izole edilerek kültüre alınmıştır. Bu işlemler boyunca kullanılan bistüri ve penslerin her kullanımından sonra

sterilizasyonu için ısısı yüksek olan cam boncuk sterilizasyonu aletinde bekletilerek sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.2.3. Çiçek tomurcuklarının toplanması

Sabah erken saatlerde seradan beş donör genotipten ayrı ayrı olacak şekilde umbeller toplanmıştır. Genotiplerde karışıklığı önlemek için örnek taşıma poşetleri kullanılmıştır. Umbellerdeki yeşil uzantılar makas yardımı ile kesilmiştir. Havuç donör genotipleri uygun gelişme aşamasını belirlemek için bir ışık mikroskobu altında incelemeye alınmışlardır.

3.2.4. Donör havuç genotiplerinden alınan tomurcukların yüzey sterilizasyonu

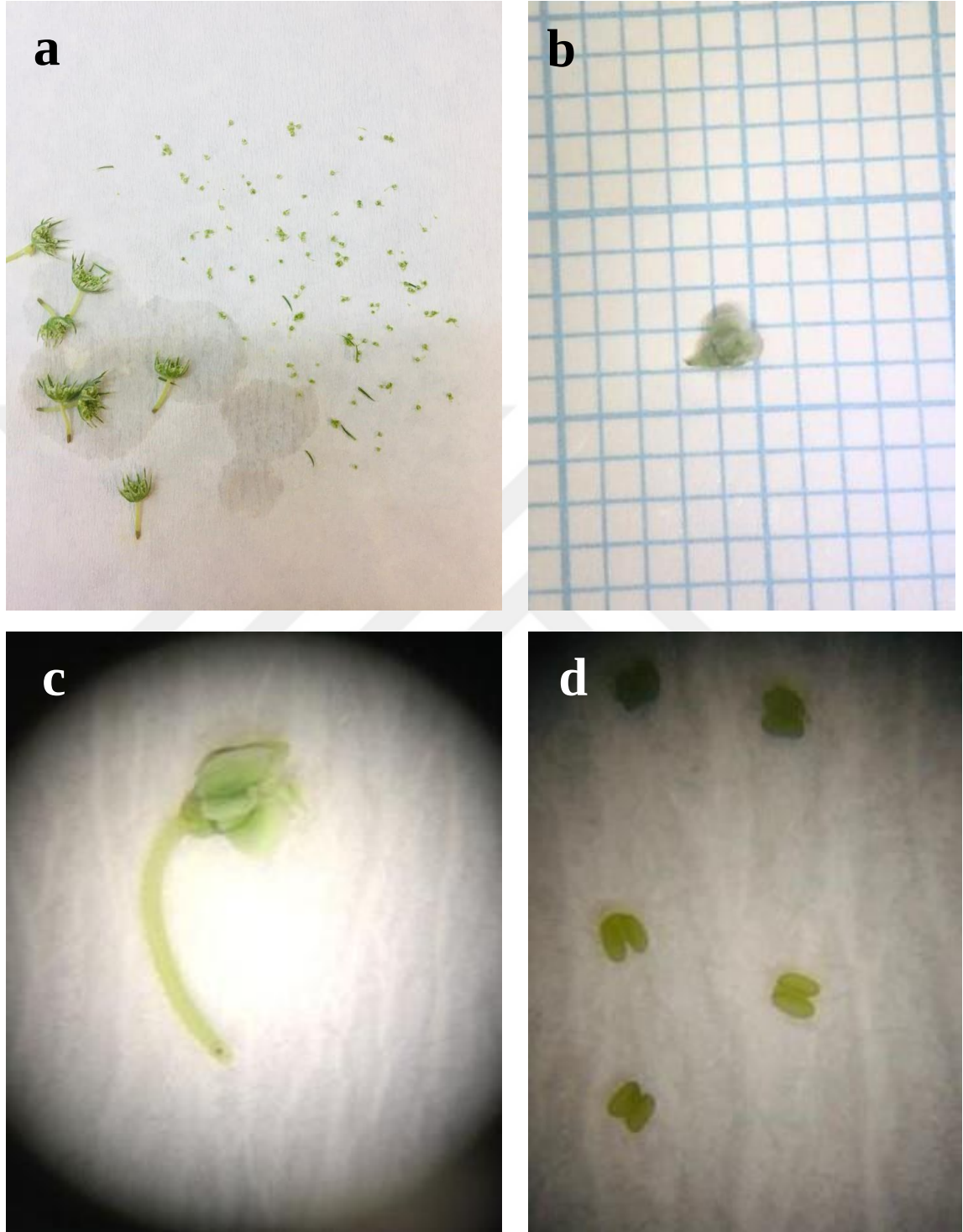
Donör havuç bitkilerinden alınan umbellerde bulunan açmış çiçekler uzaklaştırılıp geriye kalan uygun tomurcuklar makas yardımı ile kesilerek falcon tüplerine doldurulmuştur. Tomurcuklar %70'lik alkol içerisinde 15 dakika tutulduktan sonra steril kabin içerisinde üçer kez steril distile su ile durulanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Havuç çiçek tomurcuklarının yüzey sterilizasyonu

3.2.5. Uygun androgenesis aşamasına sahip anterlerin bulunduğu çiçek tomurcuklarının seçilmesi

Haploid embriyo elde edilmesindeki en önemli faktörlerden biri kültüre alınan anterlerin gelişme aşamasıdır. Havuçta androgenesis için henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrospor aşamasına sahip anterler en uygun çalışma materyalidir. Bu aşama yaklaşık olarak 0.7-1.3 mm arası uzunlukta bulunan açmamış çiçek tomurcuklarında gözlemlenir. Çalışmamızda da mikrosporların tek çekirdekli aşamada olduğu anterleri içeren tomurcuklar toplanmıştır. Yüzey sterilizasyondan işleminden sonra steril olan tomurcuklardan anterler, steril kabin içinde stereo mikroskop altında ayrılmıştır (Şekil 3.2). Anterler bekletilmeden içinde Gamborg B5 ortamı bulunan petrilere sivri uçlu pens yardımıyla aktarılmıştır. Anterler uyartım ortamı içeren petri kaplarına her petride 5 tomurcuk olacak şekilde 25'erli olarak yerleştirilmiştir. Petri kapları streç film ile kapatılarak kontaminasyon önlenmeye çalışılmıştır. Kültürler sürekli olarak 27°C'de karanlık koşullarda sekiz hafta süre ile inkübatörde bekletilmiştir.



Şekil 3.2. Uygun aşamadaki çiçek tomurcuklarının seçilmesi; **a); b)** 0.7-1.3 mm uzunluktaki açmamış çiçek tomurcuğu; **c); d)** mikroskop altında tek çekirdekli mikrospor aşamasındaki anterlerin çiçek tomurcuğundan çıkarılması

3.2.6. Androgenesis uyartım ortamının oluşturulması

3.2.6.1 İzole edilmiş mikrospor kültürü yöntemi

Mikrospor kültürü için Lichter (1982) tarafından geliştirilen 0.2 mg/l 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit), 0.2 mg/l kinetin (6-furfurylaminopurine) ve %13 sukroz içeren sıvı ½ NLN-13 ortamı kullanılmıştır (pH: 6.2-6.4). Beş donör genotipten alınmış 30 adet steril çiçek tomurcukları 6 ml ½ NLN-13 besi ortamı bulunan havanlar içerisinde ezilmiştir. Ezilen çiçek tomurcukları 40 µm'lik filtreden geçirilerek 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır ve üzerine 20 ml daha sıvı ortam eklenerek 120 rcf'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Bu yöntem iki kez tekrarlanmıştır. İnkübasyon ortamının mikrospor yoğunluğu 2×10^5 ml olarak ayarlanarak petrilere aktarılmış olup son olarak 100 µl aktif kömür petrilere dağıtılarak inkübasyona hazırlanmıştır. Kültürler 2 gün 5-6°C'de karanlık koşullarda inkübe edildikten sonra 25°C altında karanlık koşullarda tutulmuştur.

3.2.6.2 Anter kültürü yöntemi

Çalışmada androgenesis uyartım ortamı için Keller ve Armstrong (1977) tarafından modifiye edilmiş B5 (Gamborg vd. 1968) ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Besi ortamı 20 dakika boyunca 121°C sıcaklıkta ve basıncın 1.2 kg/ cm² olduğu otoklavda sterilize edilmiştir. Ortamların steril kabinde 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 65x15 mm petri kaplarına doldurularak steril kabinde soğutulması beklenmiştir.

Çizelge 3.1. Keller ve Armstrong (1977) tarafından modifiye edilmiş B5 (Gamborg vd. 1968) besi ortamı bileşenleri

İçerik	İndüksiyon ortamı (Gamborg B5 (mg/lt))
Makro elementler	
CaCl ₂	113.23
KNO ₃	2500.00
NaH ₂ PO ₄	121.56
(NH ₄) ₂ SO ₄	130.44
MgSO ₄	134.00
Mikro elementler	
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ X 5H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	36.70
H ₃ BO ₃	3.00
KI	0.75
MnSO ₄ X H ₂ O	10.00
Na ₂ SO ₄ MoO ₄ X 2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ X 7H ₂ O	2.00
Vitaminler	
Miyo-inositol	100.00
Nikotinik asit	1.00
Piridoksin-HCL	1.00
Tiamin-HCL	10.00
Aminoasitler	
L-serin	100
L-glutamin	500
Bitki büyüme düzenleyiciler	
NAA (α-naftalenasetik asit)	0.1
2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit)	0.1
Karbonhidrat kaynağı	
Sukroz	130 000
Ortam katılaştırıcı	
Agar	8 000
pH	5.8

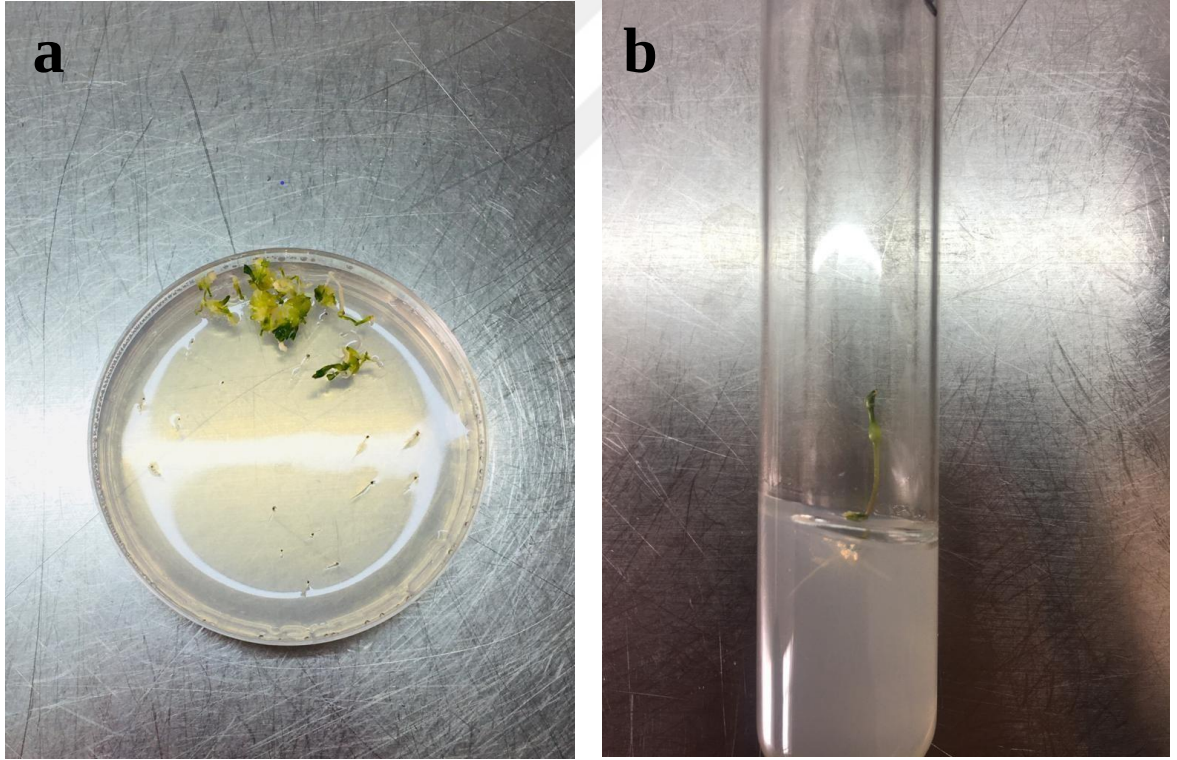
3.2.7. Rejenerasyon ortamı

Oluşturulan kültürlerden her bir donör bitki anteri sekiz hafta boyunca 27°C’de karanlık inkübasyona tabii tutulmuştur. Haftalık beklemeyi tamamlayan kültürler rejenerasyon ortamına alınarak 25°C sıcaklık, ortalama 3000 lux ışık şiddetine sahip iklim odalarında embriyo oluşuncaya kadar bekletilmiştir. Embriyo gelişiminin etkinliği üzerine poliaminlerde pütresinin etkisinin etkisi gözlemlenerek kontrol grubu ile karşılaştırılması yapılmıştır. Rejenerasyon ortamları aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

1. HAR 1: B₅ kontrol ortamı
2. HAR 2: B₅ + 160 mg/l pütresin

3.2.8. Embriyo ortamı

Kültürlerde embriyo gelişimi gözlendikten sonra, embriyolar rejenerasyon ortamından alınıp hormon içermeyen cam tüp içerisinde bulunan MS (Murashige ve Skoog 1962) ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.3). Cam tüpler 16 saat ışık/ 8 saat karanlık olan ışık periyodu, 25°C sıcaklık, ortalama 3000 lux ışık şiddetine sahip iklim odalarında bitki gelişimi gözlenene kadar bekletilmiştir.



Şekil 3.3. Embriyoların MS ortamına aktarım aşaması; **a)** Rejenerasyon ortamında gelişim gösteren embriyolar; **b)** MS ortamı içeren cam tüpe aktarılmış embriyo

3.2.9. Androgenik havuç bitkilerinin aklimatizasyonu

Kök ve gövde gelişimini tamamlayan ve stoma sayımları sayılarak ploidi seviyeleri belirlenen androgenik havuçlar cam tüplerden pens yardımıyla besi ortamından uzaklaştırılıp mini seralara aktarımı gerçekleştirilmiştir. Ploidi seviyesini belirlemek için yaprak büyüklüğü belirli bir seviyeye gelen bitkiciklerden Flow sitometri analizi için örnekler alınmıştır.

3.2.10. Haploid Bitkilerde homozigotluğun SSR markörleri ile belirlenmesi

3.2.10.1. DNA izolasyonu

Gelişen her donör ve DH bitkilerinden toplam 30 adet havuç bitkisinden DNA izolasyonu için yaprak örnekleri alınmış ve Doyle ve Doyle (1987) tarafından geliştirilmiş ve modifiye edilmiş CTAB DNA izolasyonu ile örneklerin DNA izolasyonu yapılmıştır.

1. Yaprak örneklerinden 1 g alınarak sıvı azot ile toz haline getirilmiş ve 2 ml'lik mikro santrifüj tüplerine aktarımı yapılmıştır.
2. Öğütülen örneklerin üzerine 700 µl CTAB solüsyonu (CTAB içerisine % 2 v/w β- Merkaptotanol ilavesi yapılmıştır.) eklenmiştir.
3. Homojen durumdaki örnekler 65 °C'de 30 dakika inkübasyonu yapılmıştır ve inkübasyon sırasında 10 dakika ara ile santrifüj tüpleri karıştırılmıştır.
4. İnkübasyondan alınan örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir ve daha sonra üzerlerine 700 µl klorofom izomil alkol (24:1) eklenerek 13.000 santrifüj hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonrasında örneklerin en üst fazı alınarak 2 ml'lik yeni mikro santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
6. En üst fazı alınan örneklerin üzerine 2 µl RNase eklenerek 37°C'de 10 dakika bekletilmiştir.
7. Örneklerin DNA varlığını kontrol etmek için 1/10 hacminde 5 M'lık NaCl'den 42 µl ve 6/10 hacminde 420 µl soğuk isopropanol eklenmiştir ve -20°C'de 12 saat bekletilmiştir.
8. 12 saat sonra örnekler 13.000 santrifüj hızda 20 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrası örneklerin süpernatant kısmı dökülmüştür ve peletler kuruduktan sonra 1000 µl %70'lik etanol eklenerek 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
10. Sonrasında süpernatant dökülerek tüpler kurumaya bırakılmıştır.

11. Örneklere 50 µl TE (1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA) eklenerek DNA'ların çözünmesi sağlanmıştır ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.10.2. Çalışmada kullanılan SSR markörleri

Çalışmada havuç donör bitkilerinden alınan anter örneklerinden elde edilen DH bitkilerin homozigotluk durumunu kontrol etmek için SSR markörleri ile çalışılmıştır. Havuçta yapılan moleküler çalışmalarla ilgili literatür taraması sonucunda yaklaşık 420 adet markör belirlenmiştir. Seçilen 420 adet markör içerisinde havucun her bir kromozomu üzerine dağılacak şekilde 48 adet markör seçilmiştir (Çizelge 3.2). Markörlerin tümü Genomik DNA kütüphanesinden (GSSR), Bakteriyel Yapay Kromozomu (BAC) dizin veri tabanından, Expressed Sequence Tag (EST) 'den ve genom spesifik izoenzim (Chalcone synthase ve Isopentenyl diphosphate isomerase) markörlerinden olacak şekilde belirlenmiştir. Ayrıca seçim yapılırken markörlerin polimorfizm oranları ve PCR başarıları da dikkate alınmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan SSR markör listesi (Yıldız 2009; Jhang vd. 2010; Cavagnaro vd. 2011; Alessandro vd. 2013; Yıldız vd. 2013; Budahn vd. 2014; Викторовна 2014; Parsons vd. 2015)

Markör Numarası	Markör Adı	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Polimorfizm Oranı (%)	PCR Başarı Oranı (%)
1	GSSR14	F: CCACCTTGGACAAAGCAAAC	55	57	86
		R: GCCCAGTTCTTCTTAATTGCAG			
2	GSSR46	F: GATTACTTGACCTGGGTTGAGG	58	36	100
		R: GTATGTGAAGCGGAGATTGTTG			
3	GSSR138	F: CGCTCGAGTTTCGTAGAGT	56	71	100
		R: CCTCCCCAACTCAATCCAAT			
4	BSSR3	F: CTGATTGTTTTATTCATAAAAAAGCCTAG	51	36	86
		R: TACACAACCTGACCATCAAAGACAA			
5	ESSR28	F: TCTGCGACTCCTCCTCATCT	55	—	—
		R: CAGGAAAATGCAAGTGCTCA			
6	GSSR42	F: CAGCACTACTCGAAGATTGGC	58	29	100
		R: ACCTAGTTCTGTCCAAAGTGCG			
7	GSSR65	F: ACTGCAAAACAGAAACCCAGA	57	21	100
		R: TAGGTCATGGCGATTGATGTAG			
8	GSSR154	F: CTTATATGTGATGGCGTCGAAA	56	43	100
		R: GACTGCACCGCTCCTAACTC			
9	BSSR22	F: GGTGTTCTCAGTATCCTCATAATAAA	51	50	71
		R: AAAGAAAAGGCAAGATTCATG			

Çizelge 3.2' nin devamı

Markör Numarası	Markör Adı	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Polimorfizm Oranı (%)	PCR Başarı Oranı (%)
10	ESSR112	F: CACGGCGTGTACAAATGAAG	55	—	—
		R: AGCAACCCCTGAACATTTTCG			
11	GSSR17	F: GGTCTCTTCCACACTCATGGAT	60	64	100
		R: CCAGCATTCATCTATGTCCACTC			
12	GSSR31	F: GGATTCTAACTGGCCTCAAACA	54	71	100
		R: TGTATATTTCCGCAACAAAGGC			
13	GSSR91	F: ATTCACCTTCAGTGCCTCCTAA	55	71	100
		R: GAATTGTGTGTGGTGCCTTCTA			
14	BSSR13	F: ATGTTGTCCACAAAAGGTGAGT	54	29	100
		R: CGTTCGTACGAGAATATGAAAAC			
15	ESSR87	F: GCATCAGTCGACGAGAACAA	56	—	—
		R: CATCCAGCAACAACAGGCTA			
16	GSSR6	F: TCTCCTCTTGATTCTTCTTCGC	55	93	100
		R: CCAATAAGCGTAAGCGTTTCTC			
17	GSSR39	F: CGACTTGGCTTGTCTCTTCA	55	43	86
		R: CTCCAATTTGAGATACATTTGGG			
18	GSSR92	F: AGAAGGCATCGTGTGTTTCATAA	55	33	100
		R: CAACGGTGATTAAGTGGGTTCT			
19	GSSR96	F: AGCGTCGTTTTTCGCGAGT	55	50	100
		R: CGCGGTTAAAGCAAAGCTAAT			
20	BSSR76	F: GGAGAGAAAAAGCCAGCAGAGAA	56	43	100
		R: ATA TCA GGG TGG ACT TGC TTC AAC			
21	ESSR41	F: AATTCACGAAGCCACGATTC	56	—	—
		R: ATCGTCCCACAGATCCAATC			
22	GSSR19	F: CCGAGTTGGATTCCGAGAG	58	57	100
		R: GTAAATTGAGGATTGCGAGTTG			
23	GSSR54	F: TGCATCTCTTTCCTTGGGAG	54	29	86
		R: TGCCTTCTTCTGGTCAAGTG			
24	GSSR122	F: TCGACATGAAATCAACCTCAG	55	29	100
		R: TGTTGATCGAGAGAGAGAG			
25	GSSR4	F: CAATCTTGCCACTAAAAGAGCA	55	71	100
		R: CAGATACAATAGACAGGAAACATCG			
26	GSSR111	F: GAGGAAGGGTAGATCCAGTCA	55	50	100
		R: ATGGGATGTCTTTCCCCTCTAT			

Çizelge 3.2' nin devamı

Markör Numarası	Markör Adı	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Polimorfizm Oranı (%)	PCR Başarı Oranı (%)
27	ESSR36	F: CTCAGGCGGTTCAGAGTAGG	57	—	—
		R: TTGAGGAGGCTAGCCAAGAA			
28	GSSR12	F: TGTATTGTGTGTATGCAATTTTGG	54	29	100
		R: CAAATCACACAATGCATGAGAGA			
29	GSSR85	F: TGA CTCGGTGGATGAATTAAGA	58	93	100
		R: CACTGCTTTGCCATTGTTTT			
30	GSSR119	F: GCTAAAACCCCTCAAATCTCTGC	55	43	100
		R: ACCACCACAAATATCCATCTCC			
31	BSSR54	F: CGTCACCAGAACATTCGAGAGAT	56	14	100
		R: TACCAGAGATCAGATGGAATGTAGGT			
32	ESSR103	F: CCTCCTCTTTTCGGTTGCATA	56	—	—
		R: CGCTACTTTGGGAAGCAGAA			
33	GSSR35	F: AATTCACAATCACCGACTCTCC	55	50	100
		R: ACGTCAAAGCTCCTGTTTCATT			
34	GSSR44	F: AACTTCACCCAGCTCACC	58	58	100
		R: CAAAGCAAGTAAAGAGACAGCG			
35	GSSR107	F: TTCTGGTCTTTTGACATGAAGG	54	79	100
		R: CGGATTGAGGTGAGTTGAATA			
36	BSSR140	F: AAGATGGATTTTCCACCTCTATAAT	53	29	86
		R: AAGAAGTATATCTCCGCCATGTT			
37	ESSR30	F: TCCCGGCTAAATGAACTGTC	56	—	—
		R: TGGTAGCGATGATGTGTGTG			

Çizelge 3.2' nin devamı

Markör Numarası	Markör Adı	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Polimorfizm Oranı (%)	PCR Başarı Oranı (%)
38	GSSR16	F: ATGCAAACGACAATATCCACAG	57	71	100
		R: GCCCAGCCACTTCCTAGAT			
39	GSSR88	F: TTCTCTCTTGAGCGCGATAATAC	58	29	100
		R: CGCCTTGTTGAATAGAAAGTGA			
40	GSSR139	F: GCAAGTGTTTCGTGACATGC	56	57	100
		R: AACATGAGTTAATCGAAGGGGA			
41	BSSR89	F: GCACAGAAATGTTATGTATCCTGTTT	53	57	100
		R: AGGAGGAAAGGAGAATTCGAATG			
42	ESSR67	F: TCACTTCAAGAACCCAAGGC	55	—	—
		R: AAAGGGCCAAGTCCAAATTC			
43	GSSR125	F: GCGTCTCCGTAGTTGTATGTGT	55	14	100
		R: AATCGCTTCGGGAAAAGTC			
44	BSSR52	F: AATTAGGATTGGAATCACTGCGAGT	55	36	100
		R: ATAGGCAAATGTCATGGATAACTGAA			
45	SSR5	F: AGCCACTCACCTTCTACCAGAG	50	0.72	—
		R: TGTACTTGCCGTCCCAGAAG			
46	SSR7	F: CAAGTTCCAGTTTTTCAATGTC	55	0.89	—
		R: GGGAAATCTACAAAACCTACCT			
47	cPs2	F: CTC AAG GAG AAG TTT AGG CGG ATG	55	—	—
		R: ATG AGG CCA TGT ACT CGC AGA AAC			
48	ipi3	F: CTG TAC AGG GAG TCC GAG CTT ATC	55	—	—
		R: CCA ATC CAA GAC ATT TAC CAT AGG TC			

3.2.10.3. PCR reaksiyon aşaması

Her örnek için toplam PCR hacmi 24 µl olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.3) ve PCR reaksiyonları döngüsü Çizelge 3.4’ de verilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR reaksiyon ürünleri

PCR Ürünleri	Miktar (µl)
Dream Taq Green Master Mix	10 µl
ddH ₂ O	10µl
Forward primer	1µl
Reverse primer	1µl
DNA (5 ng)	2µl
Toplam hacim	24µl

Çizelge 3.4. PCR reaksiyon döngüsü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	
Bağlanma	55	30 sn	35
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	7 dk	1

3.2.10.4. PCR ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi

PCR reaksiyonlarının kontrolünü sağlamak için %5’lik poliakrilamid jel kullanılmıştır. Jeli hazırlamada 46.5 ml steril su, 6 ml 10xTBE (Tris Borik asit EDTA), 7.5 ml %40’lık akrilamid, 0.105 APS (Amonyumpersülfat), 60 µl TEMED (Tetrametil-Etilendiamin) kullanılmıştır. Cam bloğa dökülen jel bekletilerek soğuması sağlandıktan sonra PCR ürünlerinin jele yüklemesi yapılarak 30 dk koşulduktan sonra % 0.1’lik EtBr’de boyanmış ve UV’de görüntülenmiştir.

3.2.11. Androgenik havuç bitkilerinin ploidi seviyelerinin değerlendirilmesi

Androgenik bitkilerin ploidi değerlendirilmesi çekirdek DNA miktarı belirlenerek değerlendirilir. 3-4 yapraklı seviyeye gelen androgenik havuç bitkilerine flow sitometri testi ile ploidi analizi yapılmıştır. Analizler için Sysmex CyFlow Space flow sitometri cihazı ve CyStain UV Precise P analiz kiti kullanılmıştır. Bu analizler TARLAB BİYOTEKNOLOJİ AR&GE Limited şirketinden destek alınarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Androgenesis yanıtı üzerine mikrospor ve anter kültürü karşılaştırılması

Androgenesis, embriyogenesis indüksiyonu ve embriyo gelişimini teşvik etmek ve gelişim aşamalarını takip etmek için mükemmel bir sistem sağlar. Androgenik haploid bitki üretimi için anter ve mikrospor kültür metotları bitki ıslah programlarının önemli bir parçası haline gelmiştir (Singh vd. 2020).

Bu çalışmada ilk aşamada androgenesis yanıtı üzerine etkili iki yöntem olan mikrospor ve anter kültürü metotları karşılaştırılmıştır. Anter kültürü için Keller ve Armstrong (1977) tarafından modifiye edilmiş B5 (Gamborg vd. 1968) ortamı kullanılmıştır ve pH 5.8'e ayarlanmıştır. Mikrospor kültürü için Lichter (1982) tarafından geliştirilen 0.2 mg/l 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit), 0.2 mg/l kinetin (6-furfurylaminopurine) ve %13 sukroz içeren sıvı ½ NLN-13 ortamı kullanılmıştır (pH: 6.2-6.4).

Denemeler kurulmadan önce anter ve mikrospor yöntemlerinin başarılı olması için uygun aşama olarak kabul edilen henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrospor aşamasına sahip anterler en uygun çalışma materyali olarak seçilmiştir. Bu aşama havuçta yaklaşık olarak 0.7-1.3 mm arası uzunlukta bulunan açmamış çiçek tomurcuklarında gözlemlendiği ve belirtilen gelişme aşamasındaki anterler ile çalışmanın başarılı olduğunu gösteren birçok araştırma bulmak mümkündür.

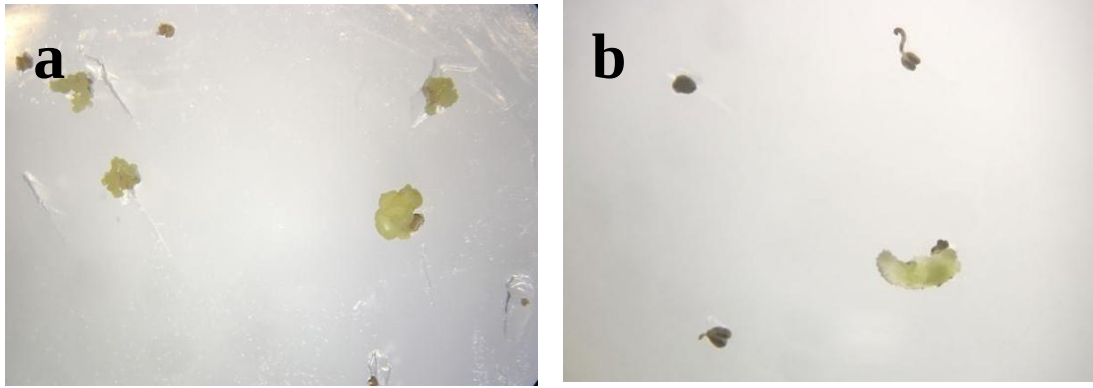
Uygun aşama olan tek çekirdekli mikrospor aşamasındaki anterlere sahip tomurcukları seçebilmek için her genotipte tomurcuk uzunluğu dikkate alınarak denemeler kurulmuştur.

Denemeden elde edilen bulgulara dayanarak yapılan değerlendirmelerde, mikrospor kültüründe hiçbir genotipin gelişim göstermediği saptanmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, havuç bitkisinde androgenesisin uyarılması aşamasında uygulanan kültür metotlarının etkisi açık bir şekilde görülmektedir.

4.2 Androgenesis yanıtı üzerine anter kültürü besi ortamlarının etkisi

Her bir donör bitkiden alınan anterler Gamborg B5 (Gamborg vd. 1968) ortamında inkübasyon süresini tamamladıktan sonra, her donör eşit sayılarda rejenerasyon ortamına alınarak embriyo gelişimi ve düzgün formda bitkicik oluşumları gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1 ve 4.2). Rejenerasyon ortamı için bir kontrol grubu (HAR 1: B₅) ve pütresinin androgenesisin etkinliği üzerine etkisini araştırmak için pütresin içeriğine sahip (HAR 2: B₅ + 160 mg/l pütresin) ortamları tercih edilmiştir. Bu çalışmada, kallus oluşumu gözlemlenmeden besi ortamındaki anterlerden embriyoların oluşumu ile direkt androgenesis oluşumu sağlanmıştır.

Anterlerdeki morfolojik değişiklikler rejenerasyon ortamına alındıktan 4 hafta sonra embriyo geliştirmeye eğilim gösterenlerde içten dışa doğru hacimsel bir artış şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Embriyonik gelişme gösteren anterler; **a)** TTS-1 **b)** TTS-2 donörlerinin embriyo gelişimi görünüşleri

Anter kültüründeki sonuçlar incelendiğinde, her iki rejenerasyon ortamında da bütün genotiplerde embriyo oluşumu gözlemlenmiştir. Donörlerin oluşturduğu embriyo sayıları, kontrol grubu olan HAR-1 ortamında TTS-1 donöründen 118, TTS-2 donöründen 66, TTS-3 donöründen 75, TTS-4 donöründen 48 ve TTS-5 donöründen 41 adet iken, 160 mg/l pütresin içeren HAR-2 ortamında TTS-1 donöründen 457, TTS-2 donöründen 432, TTS-3 donöründen 145, TTS-4 donöründen 145, TTS-5 donöründen 150 adet embriyo oluşmuştur.

Tomurcuk başına embriyo değerlendirilmesinde, HAR-1 ortamında tomurcuk başına TTS-1 donöründe 0.30, TTS-2 donöründe 0.18, TTS-3 donöründe 0.20, TTS-4 donöründe 0.12, TTS-5 donöründe 0.13 embriyo, HAR-2 ortamında TTS-1 donöründe 1.17, TTS-2 donöründe 1.21, TTS-3 donöründe 0.56, TTS-4 donöründe 0.37, TTS-5 donöründe 0.48 embriyo eldesine ulaşılmıştır.

HAR-1 ortamında elde edilen bitki sayısı TTS-1’de 77, TTS-2’de 10, TTS-3’de 13, TTS-4’de 6 ve TTS-5’de 7 adet, HAR-2 ortamında TTS-1’de 341, TTS-2’de 193, TTS-3’de 175, TTS-4’de 23 ve TTS-5’de 97 adet bitki gelişimi gözlemlenmiştir.

HAR-1 ortamında TTS-1’de 0.20, TTS-2’de 0.03, TTS-3’de 0.04, TTS-4 ve TTS-5’de 0.02 bitki, HAR-2 ortamında TTS-1’de 0.87, TTS-2’de 0.54, TTS-3’de 0.47, TTS-4’de 0.06 ve TTS-5’de 0.31 bitki eldesi tomurcuk başına düşen bitki değerleridir.

Bu sonuçlara dayalı olarak veriler incelendiğinde her iki ortam arasında farklılıkların olduğu açık bir şekilde gözlemlenmiştir. İndüksiyon ortamından alınan bütün donörlerinin anterleri B_5 ve $B_5 + 160$ mg/l pütresin bulunan rejenerasyon ortamında embriyo gelişimini sağlayarak düzgün tam bitkiler oluşturmuştur. B_5 kontrol grubu ve $B_5 + 160$ mg/l pütresin içeriklerine sahip rejenerasyon ortamları karşılaştırıldığında pütresin bulunmayan rejenerasyon ortamında embriyo sayısı ve elde edilen bitki miktarı düşük olmasına rağmen pütresin bulunan rejenerasyon ortamında bu değerler oldukça yüksektir. Sonuçlardan açık bir şekilde görülmektedir ki anter kültüründe rejenerasyon ortamına bir poliamin olan pütresinin ilavesi androgenesis yanıtı üzerine olumlu bir etkiye sahip olarak androgenesisini teşvik ettiği saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Havuç donör genotiplerinin HAR-1 ortamında androgenesis yanıtları

HAR-1 Rejenerasyon Ortamı					
Genotip	Tomurcuk sayısı	Embriyo Sayısı	Embriyo/Tomurcuk	Bitki Sayısı	Bitki/Tomurcuk
TTS-1	390	118	0.3	77	0.2
TTS-2	358	66	0.18	10	0.03
TTS-3	370	75	0.20	13	0.04
TTS-4	390	48	0.12	6	0.02
TTS-5	310	41	0.13	7	0.02

Çizelge 4.2. Havuç donör genotiplerinin HAR-2 ortamında androgenesis yanıtları

HAR-2 Rejenerasyon Ortamı					
Genotip	Tomurcuk Sayısı	Embriyo Sayısı	Embriyo/Tomurcuk	Bitki Sayısı	Bitki/Tomurcuk
TTS-1	390	457	1.17	341	0.87
TTS-2	358	432	1.21	193	0.54
TTS-3	370	207	0.56	175	0.47
TTS-4	390	145	0.37	23	0.06
TTS-5	310	150	0.48	97	0.31

4.3 Androgenesis yanıtı üzerine genotipin etkisi

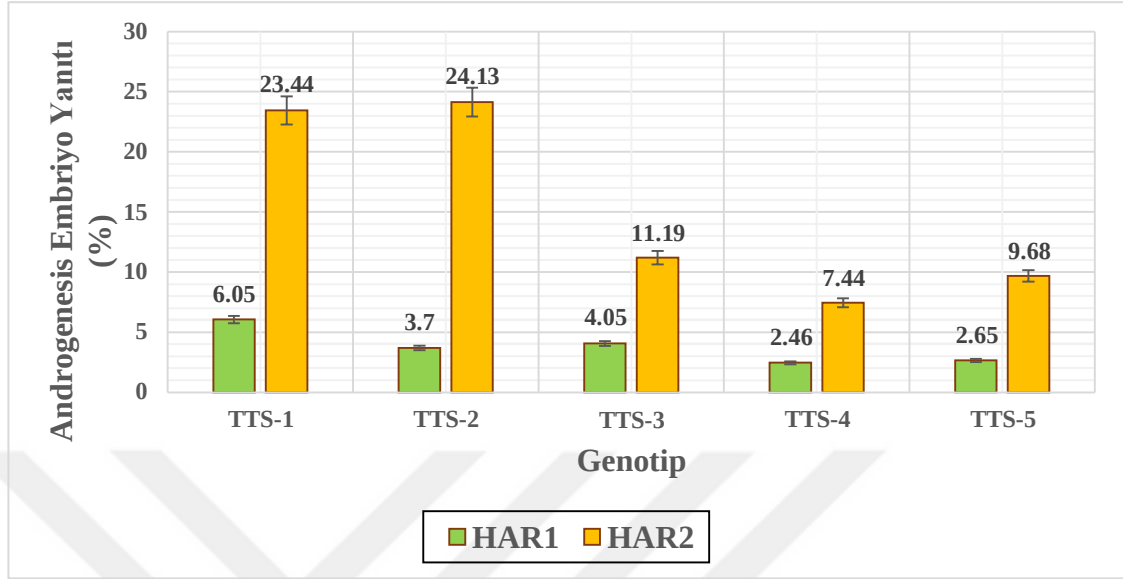
Androgenesis üzerine anter ve mikrospor ortamlarında genotipin etkisi incelendiğinde mikrospor ortamında hiçbir genotip yanıt vermemiştir. Değerlendirmeler Çizelge 4.3 ve 4.4'de verilmiştir. Genotipin embriyo sayısına etkisi yüzde olarak incelendiğinde en yüksek embriyo yanıtı HAR-2 ortamında %24.13 ile TTS-2 çeşidinin donör bitkilerinden elde edilmiştir. TTS-1 ve TTS-2'de HAR-2 ortamındaki embriyo yanıtları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamaktadır. Rejenerasyon ortamında elde edilen en az embriyo yanıtı TTS-4 genotipine aittir.

Yüzde bitki yanıtının en fazla olduğu genotip HAR-2 ortamında %17.49 orana sahip TTS-1 genotipinden daha sonraki en iyi bitki yanıtı %10.78 ile TTS-2 genotipinden elde edilirken, TTS-4 %1.18 bitki yanıtı ile bu değerler arasındaki en düşük yanıtı sahiptir.

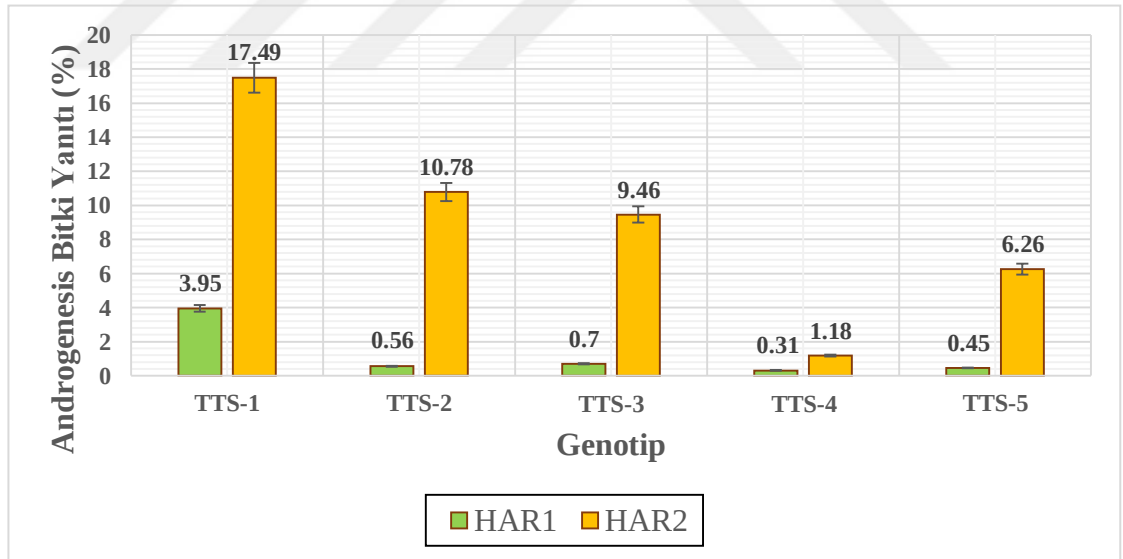
Çalışmada her iki ortamda genotip bazında embriyo ve bitki yanıtı yüzdeleri oldukça farklıdır. HAR-2 ortamında en yüksek embriyo yanıtı TTS-2 genotipinden alınırken, HAR-1 ortamında en yüksek embriyo yanıtı TTS-1 genotipinden alınmıştır. Bitki yanıtında ise her iki ortamda da en yüksek değer TTS-1 genotipine aittir. TTS-4 genotipinin hem embriyo yanıtı hem de bitki yanıtı incelendiğinde diğer genotipler arasında en az yanıtı sahip genotiptir. Çalışmada androgenesisin etkinliği TTS-1 ve TTS-2 çeşitlerinde benzer seviyelerde olduğu saptanmıştır.

Deneme sonucunda en yüksek embriyo ve bitki yanıtları HAR-2 ortamından elde edilmiştir. HAR-2 ortamında bulunana pütresinin embriyo geliştirmeye ve bitki oluşturmada pozitif bir etkiye sahip olarak teşvik ettiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3. Havuç donör genotiplerinin rejenerasyon ortamında yüzde androgenesis embriyo yanıtı



Çizelge 4.4. Havuç donör genotiplerinin rejenerasyon ortamında yüzde androgenesis bitki yanıtı



4.4 Androgenik havuç bitkilerinin SSR markörleri ile homozigotluk tespiti

Çalışmada donör olarak kullanılan 5 genotipe ait bitkiden her genotip için 1 tane olacak şekilde ve bu donörlerden elde edilen DH bitkilerinden de her genotipi temsil edecek şekilde 5'er bitki seçilmiş ve yaprak örneği alınmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. DH havuç genotiplerine ait örnek listesi

DH Havuç Örnek Listesi					
Örnek Numarası	Örnek	Örnek Bilgisi	Örnek Numarası	Örnek	Örnek Bilgisi
1	TTS-1	Donör	16	TTS-3-4	DH
2	TTS-2		17	TTS-3-9	
3	TTS-3		18	TTS-3-1	
4	TTS-4		19	TTS-3-3	
5	TTS-5		20	TTS-4-34	
6	TTS-1-10	DH	21	TTS-4-30	
7	TTS-1-15		22	TTS-4-37	
8	TTS-1-12		23	TTS-4-35	
9	TTS-1-36		24	TTS-4-17	
10	TTS-1-19		25	TTS-4-19**	
11	TTS-2-36		26	TTS-5-79	
12	TTS-2-65		27	TTS-5-58	
13	TTS-2-47		28	TTS-5-76	
14	TTS-2-62		29	TTS-5-82	
15	TTS-2-64		30	TTS-5-96	

** Örneğin üzerinde çiçek tozu bulunduğu gözlenmiştir.

Öncelikle 48 adet markörün donör DNA'ları ile PCR'ı yapılarak, polimorfik olanlar tespit edilmeye çalışılmıştır. PCR sonucunda her bir donör için polimorfizm durumu tespit edilmiştir ve her bir donör için polimorfik bulunan markörler sarı ile boyanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Havuç donör genotiplerinin PCR sonuçları

Markör Numarası	Markör Adı	Donör				
		TTS-1	TTS-2	TTS-3	TTS-4	TTS-5
1	GSSR14	M	M	—	M	M
2	GSSR46	M	M	M	M	P?
3	GSSR138	M	P	—	M	P
4	BSSR3	M	M	—	M	M
5	ESSR28	M	P?	M	M	M
6	GSSR42	P?	P?	P?	P	M
7	GSSR65	M	P?	P?	P	M
8	GSSR154	M	M	P	P	M
9	BSSR22	M	M	—	—	—
10	ESSR112	M	?	?	?	M
11	GSSR17	M	P	P	M	—
12	GSSR31	P?	P?	—	—	P?
13	GSSR91	P?	P	M	M	M
14	BSSR13	—	M	M	—	M
15	ESSR87	P	P?	P?	—	P?
16	GSSR6	—	—	—	—	—
17	GSSR39	M	P	M	M	M
18	GSSR92	—	—	—	—	—
19	GSSR96	M	M	P?	M	P?
20	BSSR76	M	M	M	M	M
21	ESSR41	M	M	M	M	M
22	GSSR19	M	P	P	M	P
23	GSSR54	—	—	—	—	—
24	GSSR122	P?	P	M	M	M

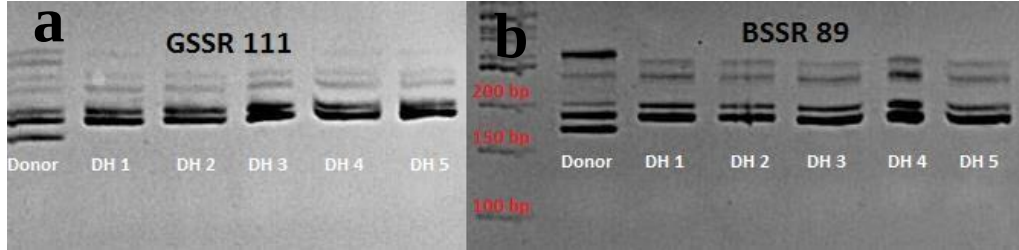
P: Polimorfik, M: Monomorfik

Çizelge 4.6'nın devamı

Markör Numarası	Markör Adı	Donör				
		TTS-1	TTS-2	TTS-3	TTS-4	TTS-5
25	GSSR4	P?	P?	M	M	P?
26	GSSR111	P	P	P	P	P
27	ESSR36	M	M	M	M	P?
28	GSSR12	P	M	M	M	M
29	GSSR85	M	M	M	M	M
30	GSSR119	P?	P	M	M	P
31	BSSR54	M	M	M	—	M
32	ESSR103	P?	P	P?	P	P
33	GSSR35	M	M	M	M	M
34	GSSR44	—	P	P	P?	P
35	GSSR107	M	M	M	M	P
36	BSSR140	M	M	M	M	M
37	ESSR30	M	P?	P	P?	M
38	GSSR16	M	M	P	M	P
39	GSSR88	P?	P?	P?	P?	P?
40	GSSR139	—	—	P?	M	M
41	BSSR89	P	M	P	P?	P
42	ESSR67	M	M	M	M	M
43	GSSR125	M	P	M	M	—
44	BSSR52	M	M	M	M	M
45	SSR5	—	—	—	—	—
46	SSR7	—	—	—	—	—
47	chs2	P?	P?	P?	P?	P?
48	ipi3	P?	P	—	P?	P?

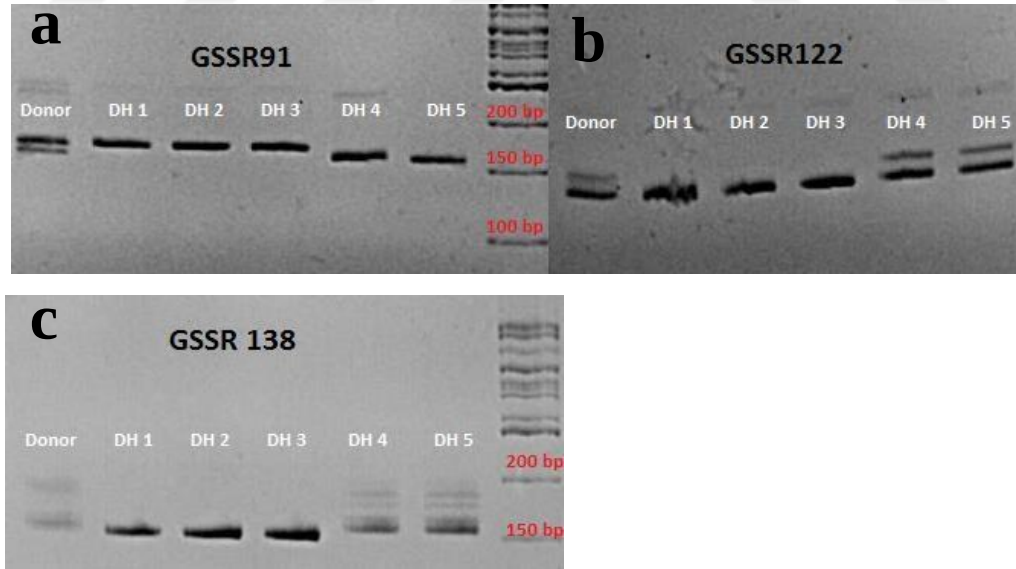
P: Polimorfik, M: Monomorfik

TTS-1 donörü için seçilen 4 adet polimorfizm gösteren markör ile donör ve DH bitkilerin PCR'ı yapılmıştır. Bunlardan 2 tanesi istenilen duruma benzer sonuçlar vermiştir (Şekil 4.2). GSSR 111 ve BSSR 89 için elde edilen jel görüntüleri incelendiğinde TTS-1'den elde edilen 5 adet DH bitkisinin tamamının homozigot olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



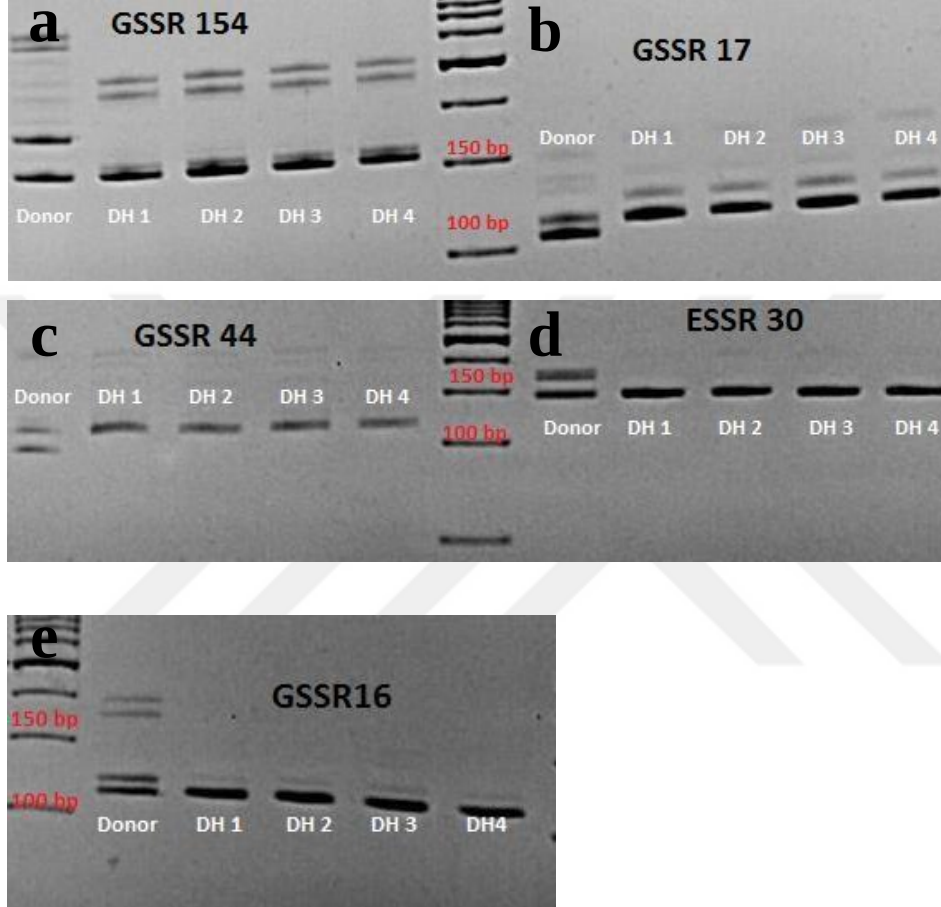
Şekil 4.2. TTS-1 donöründen elde edilen DH bitkilerde polimorfik bant profili; a) GSSR111 markörü; b) BSSR89 markörü

TTS-2 donörü için incelenen 12 adet polimorfizm gösteren markör ile donör ve DH bitkilerinin PCR sonucunda GSSR 91, GSSR 122 ve GSSR 138 markörlerinde istenilen sonuçlara ulaşılmıştır (Şekil 4.3). GSSR 91, GSSR 122 ve GSSR 138 için elde edilen jel görüntüleri incelendiğinde, TTS-2'den elde edilen DH bitkilerinden 1, 2 ve 3 numaranın homozigot olduğu, 4 ve 5 numaralı bitkinin ise homozigot olmadığı görülmüştür. Jel üzerinde örnekler arasındaki homozigot ve heterozigot farklılığı çok net görülebilmektedir.



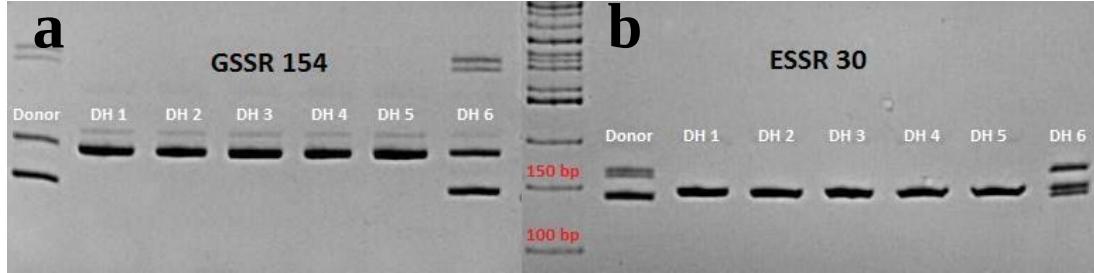
Şekil 4.3. TTS-2 donöründen elde edilen DH bitkilerde polimorfik bant profili; a) GSSR91 markörü; b) GSSR122 markörü; c) GSSR138 markörü

TTS-3 donörü için seçilen 8 adet polimorfizm gösteren markörler ile donör ve DH bitkilerin PCR'ı sonucunda 3 tanesi beklenen sonuçları vermiştir (Şekil 4.4). GSSR 154, GSSR 17, GSSR 44, ESSR 30 ve GSSR 16 için elde edilen jel görüntüleri incelendiğinde, TTS-3'den elde edilen DH bitkilerinin tamamının homozigot olduğu düşünülmüştür.



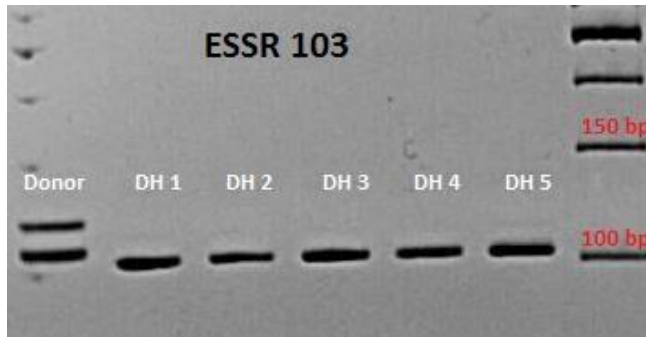
Şekil 4.4. TTS-3 donöründen elde edilen DH bitkilerde polimorfik bant profili; a) GSSR154 markörü; b) GSSR17 markörü; c) GSSR44 markörü; d) ESSR 30 markörü; e) GSSR16 markörü

TTS-4 donörü için 6 adet seçilen polimorfizm gösteren markörler ile donör ve DH bitkilerin PCR'ı sonucunda bunlardan 2 tanesi beklenen sonucu vermiştir (Şekil 4.5). GSSR 154 ve ESSR 30 için elde edilen jel görüntüleri incelendiğinde, TTS-4'ten elde edilen 5 adet DH bitkisinin tamamının homozigot olduğu düşünülmüştür. DH 6 üzerinde çiçek tozu gözlemlendiği için analizin doğruluğu açısından önem taşıdığı için sadece kontrol amaçlı koyulmuş, donör ile aynı profile sahip olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. TTS-4 donöründen elde edilen DH bitkilerde polimorfik bant profili; a) GSSR154 markörü; b) ESSR30 markörü

TTS-5 donörü için 9 adet polimorfizm gösteren markörler ile donör ve DH bitkilerin PCR'ı sonucunda bunlardan sadece 1 tanesi istenilen duruma benzer sonuç vermiştir (Şekil 4.6). ESSR 103 için elde edilen jel görüntüsü incelendiğinde TTS-5 havuçtan elde edilen 5 adet DH bitkisinin tamamının homozigot olduğu düşünülmüştür.



Şekil 4.6. TTS-5 donöründen elde edilen DH bitkilerde ESSR103 markörü polimorfik bant profili

SSR markörlerinden beklenen bant profili n kromozom sayısına sahip bitkilerde donörün allel sayısının yarısı kadar banta sahip olmasıdır. Fakat spontan katlanan $2n$ bitkilerin de donör bitkinin allel sayısının yarısı kadar bant vermesi de olağandır. Bu nedenle elde edilen jel görüntülerinden yorum yapılabilse de DH bitkilerin n ve $2n$ olduğuna dair kesin bilgi vermek oldukça zordur. Yapılan bu incelemeler sonucunda sadece homozigot ya da heterozigot bilgisi verilebilmektedir. Bu nedenle çalışma flow sitometri analizi ile desteklenmiştir.

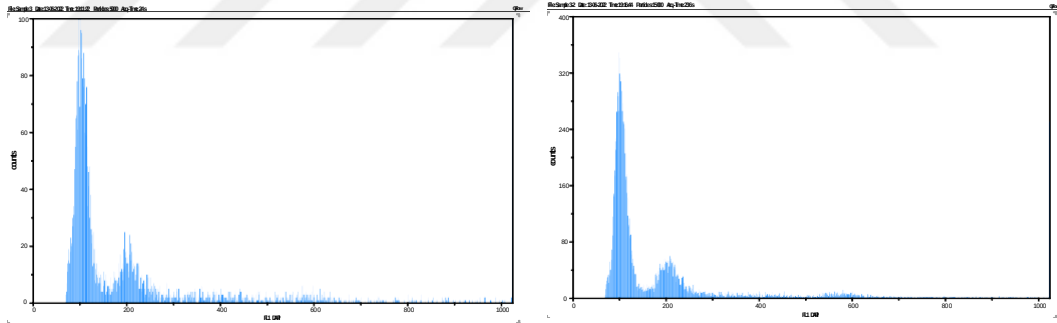


4.5 Androgenik havuç bitkilerinin flow sitometri ile ploidi seviyesi tespiti

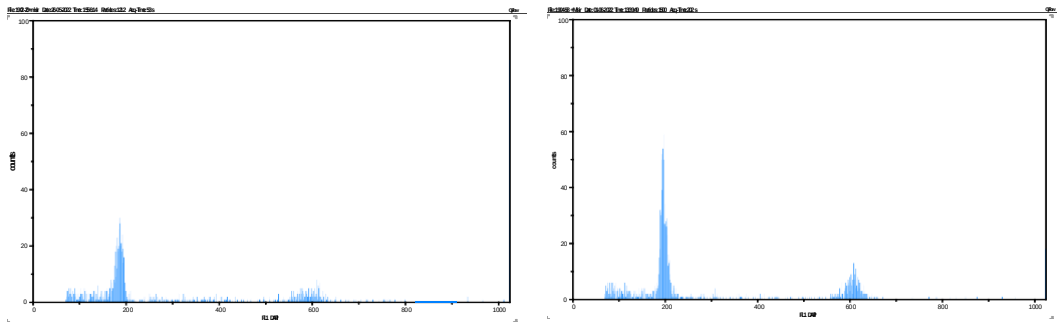
Çalışmada anter kültüründen elde edilen embriyoların oluşturduğu bitkilerin ploidi seviyesi flow sitometri analizi ile tespit edilmiştir. Analiz sonucu şekil 4.7 ve 4.8'deki gibi iki boyutlu bir grafikte gösterilmiştir.

Ploidi analizinde grafikteki piklerin kayması nedeniyle oluşabilecek hataları önlemek için çekirdek DNA miktarı bilinen ve analiz edilen örneğe yakın kontrol türü ($2n$) kullanılmalıdır. Çalışmada kontrol türü olarak mısır (*Zea mays*) kullanılmıştır. Bunun nedeni grafikte mısırın verdiği pikin havuç bitkisinin verdiği pike yakın olmasına rağmen haploid ve tetraploid piklerle uyuşmamasıdır.

Flow sitometri analizi sonuçlarına göre, TTS-1 genotipine ait beş bitki haploid (n) yapıda olduğu belirlenmiş ve SSR markör analizi sonuçlarında ise incelenen bant profilleri homozigot bir açılım göstermektedir (Şekil 4.2). TTS-2 genotipine ait beş, TTS-3 genotipine ait beş, TTS-4 genotipine ait beş, TTS-5 genotipine ait beş bitkinin flow sitometri analizi sonucunda diploid ($2n$) yapıda olduğu belirlenmiş ve SSR markör analizi sonuçları ile kıyaslandığında incelenen bant profillerinde şekil 4.3'de TTS-2 genotipine ait bitkilerin homozigot, Şekil 4.4'de TTS-3 genotipine ait bitkilerin homozigot, Şekil 4.5'de TTS-4 genotipine ait bitkilerin homozigot, Şekil 4.6'da TTS-5 genotipine ait bitkilerin homozigot bir genetik açılım gösterdiği ve sonuç olarak spontane double haploid olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.7. Haploid (n) yapıya sahip bitkilerin flow sitometri analizi grafiği



Şekil 4.8. Diploid ($2n$) yapıya sahip bitkilerin flow sitometri analizi grafiği

5. TARTIŞMA

Androgenesis mikrosporlardan veya polenlerden haploid bitkilerin gelişimini sağlamaktadır. Diğer bir deyişle, anter ve mikrospor kültürü teknikleri kullanılarak androgenik haploid bitkilerin üretimleri sağlanmaktadır (Bhojwani ve Dantu 2010; Bhojwani vd. 1996). Başarılı bir androgenesis genotip, çevre, bitkinin yetiştirilme koşulları, anterlerin gelişme dönemi, besi ortamının bileşimi ve yapısı, inkübasyon koşulları ve antere yapılan ön uygulamalara bağlıdır (Keller ve Armstrong 1977; Bajaj 1990; Andersen vd. 1990; Osolnik vd. 1993; Górecka 1998)

Kielkowska vd. (2014) havuçta (*Daucus carota* L.) partenogenesis ve ovül kültürü için geliştirilmiş bir protokol sundukları çalışmada 30 havuç çeşitinin heterozigot donör bitkilerini ve elde edilen popülasyonları kullanılmıştır. Bitkiler maydanoz (*Petroselinum crispum*) poleni ile tozlanmış/ tozlanmamış veya 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) uygulanmış/ uygulanmamış olacak şekilde planlanmıştır. Bitkilerin yaklaşık %50'sine tozlanmadan 24 saat sonra 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) uygulaması yapılmış olup, kalan bitkilere bu uygulama yapılmamıştır. Partenogenesis etkinliği incelendiğinde ovülden %9.55 oranında embriyo geliştiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında ise anter kültürü yöntemi kullanılarak %24.13 oranında embriyo elde edilmiştir ve sonuç olarak embriyo gelişimi üzerine anter kültürünün, ovül kültüründen daha etkili olduğu açık bir şekilde görülmektedir.

Andersan vd. (1990) ve Tyukavin vd. (1990) havuçta yaptıkları çalışmalarda androgenik haploid havuç elde etmek için mikrospor aşamasının henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrospora sahip anterlerin en uygun ve en etkili aşama olduğu belirtilmiştir. Kiszczak vd. (2017) yaptıkları çalışmada 0.7-1.8 mm arası uzunluğa sahip çiçek tomurcuklarını kullanmışlardır. Bu tez çalışmasında 0.7-1.3 mm arası uzunluktaki çiçek tomurcukları kullanılmıştır ve ışık mikroskobu altında yapılan kontroller sonucunda mikrosporların tek çekirdekli aşamada olduğu görülmüştür. Uygun aşamadaki anterlerin androgenesiste başarı oranını önemli ölçüde arttırmaktadır.

Li vd. (2013) izole edilmiş mikrospor kültüründen haploid ve double haploid bitkilerin üretimi için geliştirmeyi amaçladıkları protokole 47 havuç hattı kullanılarak dört yıl boyunca mikrospor kültürü üzerine genotipin etkisi araştırılmıştır. 28 hat embriyo ve kallus meydana getirerek direkt veya indirekt mikrospor embriyogenesis meydana getirdiği belirtilmiştir. Kiszczak vd. (2017) DH havuç elde etmek için Kazan F1, Feria F1 ve Narbonne F1 olmak üzere üç havuç çeşidinin androgenesis aşaması, rejenerasyon aşaması ve androgenik bitkilerin aklimatizasyonu aşamasında anter ve mikrospor yöntemlerini karşılaştırmaları sonucunda anter ve mikrospor kültürü yöntemleri ile bitki üretiminin her aşamasındaki etkinliğini belirleyen ana faktörün genotip olduğu belirtilmiştir. Çalışmada iki farklı androgenesis yöntemi beş farklı havuç genotipi kullanılarak karşılaştırılması yapılmıştır. Anter kültüründe androgenesis yanıtı tüm genotiplerde gözlemlenirken mikrospor kültüründe hiçbir genotipte androgenesis yanıtına rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile kullanılan genotiplerin androgenesis yanıtında anter kültürünün farklılığı açık bir şekilde görülmüştür.

Górecka vd. (2005) havuçta androgenesisin etkinliği üzerine çeşitin, donör bitkinin ve kültür yönteminin etkisi anter kültürü yöntemi kullanılarak araştırmışlardır.

Çalışmada yüksek karoten içeriğine sahip olan; CxC 9900 F1, Lucky B F1, HCM, Beta III ve Perfekcja beş farklı havuç çeşiti tercih edilmiştir. İki anter kültürü yöntemi karşılaştırılmıştır; bunlardan birincisi iki hafta boyunca karanlık koşullarda inkübasyona bırakılan anterler daha sonra aynı içeriğe sahip temiz bir ortama transferi gerçekleştirilerek devamlı ışığa maruz bırakılmıştır. İkinci yöntemde ise anterlerden embriyo oluşumu gözlemlenene kadar karanlık koşullarda inkübasyonda tutulmuştur. Tüm uygulamalar boyunca sıcaklık 27°C'de sabit tutulmuştur. En iyi androgenesis yanıtı veren HCM çeşiti üzerine yapılan karşılaştırılmada 100 anter başına 8.1 embriyo eldesi ile ikinci yöntemin daha etkili ve ucuz bir yöntem olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu tez çalışmasında ise TTS-1, TTS-2, TTS-3, TTS-4 ve TTS-5 olmak üzere tercih edilen beş farklı havuç genotipinin anterleri benzer şekilde 27°C'de fakat sekiz hafta boyunca karanlık koşullarda inkübasyonda tutulmuş ve daha sonra 25°C'de sürekli ışığa maruz bırakılmıştır. Literatürdeki bir çok anter kültürü çalışmasında inkübasyon süresi boyunca anterlerden embriyo gelişimi gözlemlendikten sonra rejenerasyon ortamına aktarımı yapılırken, bu tez çalışmasında sekiz haftalık inkübasyona maruz bırakılan anterlerin tümü embriyo gelişimi gözlenmeksizin rejenerasyon ortamına aktarılmış ve farklı inkübasyon süresinde başarı elde edilerek, en yüksek androgenesis yanıtı HAR-2 ortamındaki TTS-2 genotipinden elde edilmiş ve 100 anter başına 24.13 embriyo oluşumu tespit edilmiştir.

Chiancone vd. (2006) klementinde, Hema ve Murthy (2008) nigerde, Redha ve Suleman (2011) buğdayda ve Górecka vd. (2014) havuçta yaptığı çalışmada anter kültüründe poliaminlerin kullanımının embriyogenesis oranını arttırdığını belirtmişlerdir. Górecka vd. (2014) havuçta yaptığı çalışmada indüksiyon ve rejenerasyon ortamlarında poliaminlerden pütresin ve spermidini ayrı ayrı ve kombinasyonlu olarak kullanması sonucunda bir genotipten %242.79 ile en iyi androgenesis yanıtı 160 mg/L pütresin içeren rejenerasyon ortamından elde edildiği görülmektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında poliaminlerin embriyogenesis üzerine etkinliğini belirlemek için kontrol grubu olan Gamborg B5 (HAR-1 ortamı) ve poliaminlerden 160 mg/L pütresinin (HAR-2 ortamı) bulunduğu iki farklı rejenerasyon ortamı kullanılarak genotiplerin androgenesis yanıtları karşılaştırılmıştır. Beş donör havuç genotipinin tümünden androgenesis yanıtı elde edilmiştir. HAR-2 ortamında TTS-1 ve TTS-2 donörlerinin embriyo yanıtları arasında önemli bir farklılık bulunmamasına rağmen en yüksek embriyo yanıtı %24.13 ile TTS-2 donörüne aittir. En az elde edilen embriyo yanıtı her iki ortamda da TTS-4 donörüne ait olduğu tespit edilmiştir. Androgenik bitki yanıtının en fazla olduğu genotip HAR-2 ortamında %17.49 oranına sahip olan TTS-1 genotipidir. En düşük androgenik bitki yanıtı %1.18 olan TTS-4 genotipidir. Pütresin içeren rejenerasyon ortamından elde edilen embriyo ve bitki sayısı oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca havuç genotiplerine sahip anterlerin her iki ortamda da farklı oranlarda androgenesis yanıtı verebileceği unutulmamalıdır. Yayınlanmış çalışmalarda farklı havuç genotiplerinin androgenesis yanıtları incelendiğinde; Hu vd. (1993) tarafından yayınlanan çalışmada androgenik embriyo yanıtı %15 olduğu belirtilmiştir. Kiszczak vd. (2018) tarafından yayınlanan çalışmada bir genotipten %305.3 oranında androgenik embriyo elde edildiği belirtilmiştir. Górecka vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada en yüksek androgenik embriyo yanıtının %5.6 olduğu belirtilmiştir. Kiszczak ve diğ. (2017) tarafından yayınlanan çalışmada %338 oranında embriyo elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise %121 oranında en yüksek androgenik embriyo yanıtına ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda kullanılan genotiplerin ve besi

ortamlarının farklı olduğu unutulmamalıdır. Bu tez çalışmasında yapılan gözlemler sonucunda herhangi bir kallus oluşumuna rastlanmadan embriyo oluşumu gözlemlenerek direkt androgenesis meydana gelmiştir. Elde edilen bitkiciklerin direkt androgenesisten dolayı haploid olabileceği düşünülmüştür ve gerekli incelemeler SSR ve flow sitometri testleri ile yapılmıştır.

SSR tekniği bitkilerde bitkilerde genetik haritalama çalışmalarında kullanılmakta ve her geçen gün artmaktadır. Yüksek oranda polimorfik özellik göstermesi ve PCR sisteminde kolaylık sağlaması avantajları arasındadır (Röder vd. 1995). Kodominant özellik göstermesinden dolayı homozigotluk ve heterozigotluk ayırt edilebilmektedir. Anter kültüründen elde edilen haploid bitkiler SSR markör analizi sonucunda SSR markörün sadece tek bir allelini içermelidir. Çalışmada bu bilgilerden yola çıkarak SSR markör değerdendirmelerinde literatür taraması sonucunda 420 markör belirlenmiş ve bunların arasından 48 adet markör seçilmiştir. TTS-1 donöründe GSSR 111 ve BSSR 89 marköründe homozigot olduğu, TTS-2 donöründe GSSR 91, GSSR 122 ve GSSR 138 markörlerinde homozigotluk ve heterozigotluk özellikleri açık bir şekilde görölmektedir. TTS-3 donöründe GSSR 154, GSSR 17, GSSR 44, ESSR 16 ve GSSR 16 markörlerinde, TTS-4 marköründe GSSR 154 ve ESSR 30 markörleri, TTS-5 donöründe ESSR 103 markörlerinin incelenmesi sonucunda donörlerin tamamının homozigot olduğu düşünülmüştür. Keleş vd. (2015) flow sitometri ile rejenere olan biber bitkilerinin dihaploid ve diploid olduğunu belirlemişler ve homozigot ve heterozigotluğunu kontrol etmek için SSR markör analiziden yararlanmışlardır. Tüm biber çeşitlerinde spontane ikiye katlanmanın oldukça yüksek olduğu Keleş vd. (2015) tarafından belirtilmiştir. Havuçta da spontane dihaploid oluşumu gözlemlendiği kaynaklarda mevcuttur. Havuç bitkisinde de spontane double haploid elde edilmesi oldukça yüksektir. Çalışmamızda homozigotluk ve heterozigotluk SSR markörleri ile doğrulanmıştır ve elde edilen sonuçlarda GSSR 91, GSSR 122 ve GSSR 138 markörlerinde DH-4 ve DH-5 bitkileri hariç bütün genotiplerin homozigot olduğu belirlenen bitkilerin flow sitomeri analizinde TTS-1 genotipi hariç diğer genotiplerin dihaploid genoma sahip oldukları gözlemlenmiştir. Bu oluşum spontane olarak meydana gelmiş olup herhangi bir kimyasal işlem uygulanmamıştır. Çavuşoğlu (2023) tarafından yapılan tez çalışmasında anter kültüründen geliştirilmiş havuç bitkilerinin SSR ve flow sitometri analizleri sonucunda diploid ve triploid genoma sahip bitkiler meydana geldiği ve spontane dihaploid oluşumu gözlemlendiği belirtilmiştir. Çalışmamızda da elde edilen havuç bitkilerinde spontane double haploid oluşumu benzer şekilde yüksektir ve çarpıcı yönü ise haploid bitkiler elde edilmesidir.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında beş farklı havuç genotipi mikrospor ve anter kültürü yöntemleri kullanılarak haploid bitki oluşturma potansiyellerinin karşılaştırılması sonucunda anter kültüründe bütün genotipler androgenesis yanıtı verirken mikrospor kültüründe hiç bir genotipten yanıt alınamamıştır. Embriyo gelişiminin etkinliği üzerine poliaminlerden pütresinin etkisini gözlemlemek için iki farklı rejenerasyon ortamı oluşturulmuştur. 160 mg/l pütresin içeren rejenerasyon ortamında elde edilen embriyo sayısının tüm genotipler üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu açık bir şekilde görülmüş olup pütresinin androgenesisini teşvik ettiği saptanmıştır. Rejenerasyon ortamına aktarım, sekiz haftalık inkübasyon süresi sonrasında yapılmış başarılı olduğu görülmüştür. Anter kültürü yönteminde kullanılan iki farklı rejenerasyon ortamında da anterlerin kallus oluşturmada direkt yolla bitkicikler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Androgenesis yoluyla elde edilen bitkilerden her genotipe ait seçilen 5'er bitkinin homozigot ve heterozigotluk durumu SSR markör analizleri ile belirlenerek GSSR 91, GSSR 122 ve GSSR 138 markörleri hariç diğer tüm markör analiz sonuçlarının polimorfik bir profil göstererek homozigot yapıda olduğu tespit edilmiştir. Beş farklı havuç genotipinde yapılan flow sitometri analizi sonuçları, SSR markör analizi sonuçları ile desteklenerek karşılaştırıldığında TTS-1 genotipinden haploid (n) yapıda bitkiler elde edilirken diğer genotiplerde spontane katlanmış double haploid yapıda bitkiler elde edildiği gözlemlenmiştir.

Çalışmanın başında anter ve mikrospor kültürü karşılaştırılması, iki farklı rejenerasyon ortamı kullanılarak bir poliamin olan pütresinin etkisinin araştırılması, inkübasyon süresinin önemi ve farklı genotiplerin kullanılarak androgenesis yanıtlarını tespit etmek amaçlanırken, farklı inkübasyon süresinde başarının yakalanması, haploid bitki elde edilmesi ve başarılı bir homozigotluk tespiti yapılması sonucunda farklılıkları ortaya koyduğumuz sonuçlar elde edilmiştir.

Tohum üretiminin uzun yıllar alması ve F1 hibrit çeşitlerin üretilmesinin zorluğu ülkemizde bilinen klasik ıslah yöntemlerinde görülen problemlerin başında gelmektedir. Islah çalışmalarına entegre edilmiş biyoteknolojik yöntemler ıslah çalışmalarının hızlanmasını sağlamıştır. Biyoteknolojik yöntemlerin başında gelen doku kültürünün uygulamalarından biri olan anter kültürü yöntemi ile elde edilen haploid ve DH havuç bitkilerinin elde edilmesini sağlamak yeni çeşitlerin geliştirilmesinde ıslah sürecinin kısaltmasına katkı sağlayacaktır. Bu tez çalışması anter kültürü konusunda gelecekte yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Abdel-Aal, E.S.M., Akhtar, H., Zaheer, K., Ali, R. 2013. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, 5(4): 1169-1185.
- Adamus, A., Michalik, B. 2003. Anther cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Folia Hort.*, 15:49-58.
- Ali, A., Matthews W.C., Cavagnaro, P.F., Iorizzo, M., Roberts, P.A. and Simon, P.W. 2014. Inheritance and mapping of Mj-2, a new source of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance in carrot. *Journal of Heredity*, 105 (2): 288–291. <https://doi.org/10.1093/jhered/est090>.
- Alessandro, M.S., Galmarini, C.R., Iorizzo, M. and Simon, P.W. 2013. Molecular mapping of vernalization requirement and fertility restoration genes in carrot. *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 415–423. <http://doi.org/10.1007/s00122-012-1989-1>.
- Andersen, S.B., Christiansen, J., Farestveit, B. 1990. Carrot (*Daucus carota* L.): *In vitro* production of haploids and field trials. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer Verlag, Berlin, 12: 393–402.
- Arumuganathan, K., Earle, E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 208-218.
- Ashok Kumar, H.G., Ravishankar, B.V. and Murty, H.N. 2004. The Influence of Polyamines on Androgenesis of *Cucumis sativus* L. *European Journal of Horticultural Science*, 69 (5): 201–205.
- Baranski, R., Allender, C., Klimek-Chodacka, M. 2012. Towards better tasting and more nutritious carrots: Carotenoid and sugar content variation in carrot genetic resources. *Food Res Int.*, 47:182–187.
- Bajaj, Y.P.S. 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer Verlag, Berlin 12: 3–44.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1996. Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition. Elsevier, Amsterdam
- Bhojwani, S.S., Dantu, P.K. 2010. Haploid plants. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. pp. 61–76.
- Bradeen, J.M., Simon, P.W. 2007. Carrot. In: Kole C (ed) *Genome mapping and molecular breeding in plants*, Springer, Berlin, 5:161–184
- Budahn, H., Baranski, R., Grzebelus, D., Kielkowska, A., Straka, P., Metge, K., Linke, B. and Nothnagel, T. 2014. Mapping genes governing flower architecture and pollen development in a double mutant population of carrot. *Frontiers In Plant Science*, 5 (504): 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00504>.

- Cavagnaro, P.F., Chungl, S.M., Manin, S., Yıldız, M., Ali, A., Alessandro, M.S., Iorizzo, M., Senalik, D.A. and Simon, P.W. 2011. Microsatellite isolation and marker development in carrot - genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. *BMC Genomics*, 12:386. [https://doi.org/ 10.1186/1471-2164-12-386](https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-386).
- Chiancone, B., Tassoni, A., Bagni, N. and Germana`, M.A. 2006. Effect of polyamines on in vitro anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87: 145–153. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9149-4>.
- Çavuşoğlu, Ö. 2023. Havuç anter kültüründe gelişen haploit bitkilerin SSR markörlerle belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa, 61 s.
- Dewi, I.S., Purwoko, B.S., Aswidinnoor, H., Somantri, I.H. 2004. Rice anther culture in media containing polyamines. *J Biotech Pertan*, 9: 4–19.
- Singh, D., Swapnil, Sinha, A., Kumar, M. 2020. Androgenesis: A valuable technique to shorten the breeding cycle. *Food and Scientific Reports*, pp:18-20.
- Doyle, J., Doyle, J.L. 1987. A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bull*, 19: 11-15.
- Duran, S. T. 2019. Havuç (*Daucus carota* L.) bitkisinde *Rf* lokusu ile bağlantılı SNP moleküler işaretleyicilerin GBS yöntemi kullanılarak belirlenmesi ve doğrulanması. Doktora Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Bölümü.
- Ferrie, A.M.R., Möllers, C. 2010. Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 104:375–386.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 50: 151–158.
- Germana`, M.A. 2006. Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 86:131–146.
- Germanà, M. A. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 283–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>.
- Górecka K, 1998. Obtaining of homozygous lines of head cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata* L.) with aid of anther culture. Habil Thesis, 14 ed. Res Inst Veg Crops, 1–71.
- Górecka, K., Kryzanowska, D. and Górecki, R. 2005. The influence of several factors on efficiency of androgenesis in carrot. *Journal of Applied Genetics*, 46 (3): 265-269.

- Górecka, K., Kryzanowska, D., Kiszczak, W. and Kowalska, U. 2009. Plant regeneration from carrot (*Daucus carota* L.) anther culture derived embryos. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 1139-1145. <http://doi.org/10.1007/s11738-009-0332-1>.
- Górecka, K., Kowalska, U., Kryzanowska, D. and Kiszczak, W. 2010. Obtaining carrot (*Daucus carota* L.) plants in isolated microspore cultures. *Journal of Applied Genetics*, 51 (2): 141-147.
- Górecka, K., Kiszczak, W., Kryzanowska, D., Kowalska, U., and Kapuscinska, A. 2014. Effect of polyamines on in vitro anther cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Turk Journal Biology*, 38, 593-600. <https://doi.org/10.3906/biy-1403-29>.
- Günay, A. 2005. Sebze Yetiştiriciliği. 88-113 s, İzmir.
- Hema, B.P. and Murty, H.N. 2008. Improvement of *in vitro* androgenesis in niger using amino acids and polyamines. *Biologia Plantarum*, 52 (1): 121-125.
- Hu, K.L., Matsubara, S., Murakami, K. 1993. Haploid plant production by anther culture in carrot (*Daucus carota* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 62 (3): 561-565.
- Iorizzo, M., Ellison, S., Senalik, D., Zeng, P., Satapoomin, P., Bowman, M., vd. 2016. "A high-quality carrot genome assembly reveals new insights into carotenoid accumulation and Asterid genome evolution", *Nat. Genet.*, 48: 657– 666.
- Jabłońska-Trypuć, A., Czerpak, R. 2007. Biological and therapeutical activity of polyamines. *Postępy Fitoterapii*, 1: 32–38.
- Jhang, T., Kaur, M., Kalia, P. and Sharma, T.R. 2010. Efficiency of different marker systems for molecular characterization of subtropical carrot germplasm. *Journal of Agricultural Science*, 148: 171–181. <http://doi.org/10.1017/S0021859609990591>.
- Kasim, R., Kasim, M. U. 2019. Farklı renklerin gücü 'Havuç'. International Marmara Sciences Congress. *Proceedings Book (Natural and Applied Sciences)*, Kocaeli.
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S., Büyükalaca, S. 2015. Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *Horticultural Science*, 50(11): 1671- 1676.
- Keller, W.A., Armstrong, K.C. 1977. Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures. *Can J Bot*, 55: 1383–1388.
- Kesici, S. 2002. F1 hibrit çeşit ıslahı. Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, Mersin.
- Kielkowska, A., Adamus, A. and Baranski, R. 2014. An improved protocol for carrot haploid and double haploid plant production using induced parthenogenesis and ovule excision *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50: 376-383. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9597-1>.

- Kielkowska, A., Adamus, A. and Baranski, R. 2018. Haploid and doubled haploid plant production in carrot using induced parthenogenesis and ovule excision in vitro. *Plant Cell Culture Protocols*, 21, pp. 301-3015. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_21.
- Kiracı, S., Padem, H. (2015). Havuç Yetiştiriciliğinde Bitki Aktivatörü ve Mikrobiyal Gübre Uygulamalarının Verim ve Bazı Fizikokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 10 (1), 65-72.
- Kiszcak, W., Kowalska, U., Kapuścińska, A., Burian, M., Górecka, K. 2015. Effect of low temperature on in vitro androgenesis of carrot (*Daucus carota* L.). *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, DOI 10.1007/s11627-015-9665-1.
- Kiszcak, W., Krzyzanowska, D., Strycharczuk, K., Kowalska, U., Wolko, B., and Górecka, K. 2011. Determination of ploidy and homozygosity of carrot plants obtained from anther cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33:401–407. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0559-x>
- Kiszcak, W., Kowalska, U., Kapuscinska, A., Burian, M. and Górecka, K. 2017. Comparison of methods for obtaining doubled aploids of carrot. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 86 (2): 3547. <https://doi.org/10.5586/asbp.3547>.
- Kiszcak, W., Kowalska, U., Burian, M. and Górecka, K. 2018. Induced androgenesis as a biotechnology method for obtaining DH plants in *Daucus carota* L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, <https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1431058>.
- Lachin, A. 2020. Havuç (*Daucus carota* L.)’ta katlanmış haploid (DH) bitki üretimi. Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 41 s.
- Li, J.R., Zhuang, F.Y., Ou, C.G., Hu, H., Zhao, Z.W. and Mao, J.H. 2013. Microspore embryogenesis and production of haploid and double haploid plants in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112: 275-287. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0235-5>.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *E Pflanzengphysiol*, 105:427–434.
- Lucier, G., Lin, B.H. 2007. Factors Affecting Carrot Consumption in the United States. *Economic Research Service*, https://www.ers.usda.gov/webdocs/outlooks/39511/11719_vgs31901_1.pdf?v=9138
- Maraschin SF, de Priester W, Spaink HP, Wang M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J Exp Bot*. 56:1711– 1726. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri190>

- Matsubara, S., Dohya, N., Murakami, K. 1995. Callus formation and regeneration of adventitious embryos from carrot, fennel and mitsuba microspores by anter and isolated microspore cultures. *Acta. Hortic.*, 392: 129- 137.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologiae Plantarum*, 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Niklas A, Butowt R, Jażdżewska E, Majewska-Sawka A (1998). Polyamines in plant cell: synthesis, the mechanisms of action and functions. *Advan Cel Biol* 25: 33–49.
- Osolnik, B., Bohanec, B., Jelaska, S. 1993. Stimulation of androgenesis in white cabbage *Brassica oleracea* var. *capitata* anthers by low temperature and anther dissection. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 32: 241–246.
- Parsons, J., Matthews, W., Iorizzo, M., Roberts, P. and Simon, P. 2015. *Meloidogyne incognita* nematode resistance QTL in carrot. *Molecular Breeding*, 35: 114. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0309-2>.
- Peterson, C.E., Simon, P.W. 1986. Carrot Breeding. In: Breeding Vegetable Crops (Edit. Mark J.B.), 321-356.
- Pimenov, MG., Leonov, MV. 1993. The genera of the Umbelliferae. A nomenclature. Royal Bot. Garden. Kew
- Redha, A. and Suleman, P. 2011. Effects of exogenous application of polyamines on wheat anther cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105:345–353. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9873-7>.
- Rubatzky, V.E., Quiros, C.F., Simon, P.W. Carrots and related vegetable Umbelliferae. CABI, New York, (1999).
- Röder, M.S., Plaschke, P., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., Ganal, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genetics*, 246: 327-333.
- Sarcan, O. 2018. SNP moleküler işaretlerine dayalı genetik haritasının geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa, 60 s.
- Shebaby, W.N., El-Sibai, M., Smith, K.B., Karam, M.C., Mroueh, M., Daher, C.F. 2013. The antioxidant and anticancer effects of wild carrot oil extract. *Phytother Res.*, 27(5): 737-744
- Shmykova, N., Domblides, E., Vjurtts, T. and Domblides, A. 2021. Haploid embryogenesis in isolated microspore culture of carrots (*Daucus carota* L.). *Life*, 11 (20): 1-17. <https://doi.org/10.3390/life11010020>.
- Simon, P.W. 1993. Carrot, *Daucus carota* L. In: Genetic Improvement of Vegetable Crops, Kalloo G. and BO Bergh (Eds), *Pergamon Press*, Oxford, pp. 479-484.
- Simon, P.W., Freeman, R.E., Vieira, J.V., Boiteux, L.S., Biard, M., Nothnagel, T., Michalik, B. and Kwon, Y.S. 2008. Carrot. In: Prohens J., Nuez F. (eds) *Vegetables II. Handbook of Plant Breeding*, vol 2. Springer, New York.

- Singh, D., Swapnail, Sinha, A. and Kumar, M. 2020. Androgenesis: a valuable technique to shorten te breeding cycle. *Food and Scientific Reports*, 1 (7): 18-20.
- Sińska, I. (1986). Polyamines as regulators of plant growth and development. *Wiad Botan* 30: 9–24.
- Stein, M., Nothnagel, T. 1995. Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.). *Plant Breed*, 114:1-11.
- Steward, F.C. 1958. “Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretation of the growth from free cell to carrot plant”, *Am. J. Bot.*, 45: 709-713.
- Stolarczyk, J., Janick, J. 2011. Carrot: History and Iconography. *Chronica Horticulture*, 51(2), 13–18.
- Şehirali, S., Özgen, M. 2013. Bitki Islahı (5. Baskı), Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, Yayın No: 1582, 270 s..
- Thompson, D.J. 1962. Natural Cross - Pollination in Carrots. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science.*, 81: 332-334
- Tiburcio, A.F., Campos, J.L., Figueras, X., Besford, R.T. 1993. Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Growth Reg.* 12: 331–340.
- Tuna, T., Sönmez, İ., Beşirli, G., Alan, A.R., Çelebi Toprak, F. ve Şeker, M. 2021. Yalova Havuç (*Daucus carota* L.) gen havuzunda bulunan genotiplerin bazı morfolojik özellikleri. *Bahçe*, 50(1): 35-42.
- TÜİK. 2022. Türkiye havuç üretimi. Türkiye İstatistik Kurumu, <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1>.
- Tyukavin, G.B., Shmykova, N.A., Monakhova, M.A. 1999. Cytological study of embryogenesis in cultured carrot anthers. *Russ J Plant Physiol.* 46(6):767–773.
- Vaishnava, S., Hooper, L.V. 2011. Eat Your Carrots! T Cells Are RARing to Go. *Immunity*, 34(3): 290-292.
- Vogel, G. 2005. “How does a single somatic cell become a whole plant?”, *Science*, 309, 86.
- Yıldız, M. 2009. Havuçlarda antosiyanin sentezlenmesini etkileyen genlerin biyosentezi ile mor ve sarı renkleri veren P₁ ve Y₂ genlerinin haritalanması. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 245 s.
- Yıldız, M., Willis, D.K., Cavagnaro, P.F., Iorizzo, M., Abak, K. and Simon, P.W. 2013. Expression and mapping of anthocyanin biosynthesis genes in carrot. *Theoretical and Applied Genetic*, <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2084-y>.

- Watson, M.B., Malmberg, R.L. 1996. Regulation of *Arabidopsis thaliana* L. Heyenh arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. *Plant Physiol.* 111: 1077–1083.
- Xu, Z. S., Huang, Y., Wang, F., Song, X., Wang, G.L., Xiong, A.S. 2014. Transcript profiling of structural genes involved in cyanidin-based anthocyanin biosynthesis between purple and non-purple carrot (*Daucus carota* L.) cultivars reveals distinct patterns. *BMC Plant Biology.* 14 (262), 1-9.
- Викторовна, Ч. А. 2014. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ *IN VITRO* ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ F1 ГИБРИДОВ МОРКОВИ НА ОСНОВЕ САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ. РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, 129 с.



ÖZGEÇMİŞ

LEMAN KOYUTÜRK

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2021-2023	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
2017-2021	Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Tekirdağ