

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HAVUÇ (*DAUCUS CAROTA* L.)'TA KATLANMIŞ HAPLOİD
(DH) BİTKİ ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİREZA LACHİN

DENİZLİ, TEMMUZ - 2020

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



HAVUÇ (*DAUCUS CAROTA* L.)'TA KATLANMIŞ HAPLOİD
(DH) BİTKİ ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

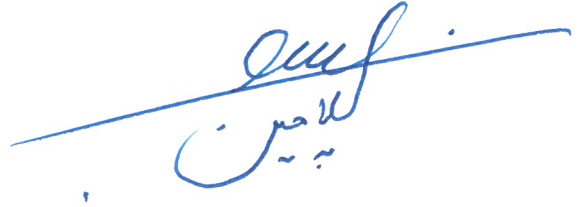
ALİREZA LACHİN

DENİZLİ, TEMMUZ - 2020

Bu tez çalışması T. C. Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından 2019FEBE054 no.lu proje ile desteklenmiştir. Alireza Lachin 1170386 no.lu TÜBİTAK projesinde Yüksek Lisans bursiyeri olarak desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

ALİREZA LACHİN



ÖZET

HAVUÇ (*DAUCUS CAROTA* L.)'TA KATLANMIŞ HAPLOİD (DH) BİTKİ ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİREZA LACHİN

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALİ RAMAZAN ALAN)

DENİZLİ, 2020

Havuç (*Daucus carota* L.) gıda olarak çok değerli olan kökleri için üretilir. Islah materyallerinde tarımsal özelliklerin genetik olarak stabil hale getirilmesi bu türdeki yüksek heterozigotluk ve iki yıllık hayat döngüsü nedeni ile oldukça zor ve zaman alıcıdır. Tamamen homozigot hatların geliştirilmesi işlemi haploid ve katlanmış haploid (DH) bitkilerin üretilmesi ile mümkündür. Bu tez çalışmasında, Türkiye de ilk defa anter (androgenesis) kültürü yöntemi ile DH havuç bitkilerin üretimine yönelik deneyler gerçekleştirilmiştir. Androgenesis uyartım deneylerinde beş donör genotipten alınan 0.7-1.3 mm boyutundaki açmamış tomurcukları kullanılmıştır. Beş donör genotipten izole edilen toplam 2160 adet anter androgenesis uyartım (modifiye B5) ortamı içeren 65 x 15 mm Petri kaplarında kültüre alınmışlardır. Kültürler androgenik embriyoların çıkışına kadar sürekli 25o C' ye ayarlı ve karanlık olan bir büyütme odasında tutulmuşlardır. Dört (üç turuncu köklü ve bir siyah köklü) genotipe ait anterlerden androgenesis cevabı elde edilirken bir donör (siyah köklü) genotipten androgenesis cevabı elde edilememiştir. Donörler arasında androgenesis uyartımına gösterilen en yüksek cevap %12,59 ile DC Biyom01 donöründen elde edilmiştir. Orta düzeyde androgenesis cevapları DC çakır (% 7,49) ve DC Hatay yerli (% 4,81) genotiplerinde gözlenmiştir. En düşük androgenesis cevabı (% 0,18) Marot F1 anterlerinde gözlenmiştir. Çalışmada toplam 2146 adet androgenik bitkicik elde edilmiştir ve bunların 2017 adedi bitki haline dönüşmüştür. Üretilen bitkilerin % 87'si diploittir. Androgenik havuç bitkilerin çoğunluğu dış ortama aklimatize edilmiş ve serada büyütülmüşlerdir.

ANAHTAR KELİMELELER: Androgenesis, *Daucus carota* L., doku kültürü, haploid, katlanmış haploid

ABSTRACT

PRODUCTION OF DOUBLED HAPLOID PLANTS IN CARROT (*DAUCUS CAROTA* L.)

MSC THESIS

ALIREZA LACHIN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ALI RAMAZAN ALAN)

DENİZLİ, 2020

Carrot (*Daucus carota* L.) is produced for its roots that is highly valuable as food. Development of breeding materials with genetically stable agronomical traits is difficult and time consuming due to high levels of heterozygosity and biennial life cycle in this species. Development of fully homozygous lines is possible via production of haploid and doubled haploid (DH) plants. In this thesis work, experiments were carried out to produce DH carrot lines via anter (androgenesis) culture for the first time in Turkey. In the androgenesis induction experiments, flower buds between 0,7-1,3 mm lengths that were collected from five donor carrot genotypes were used. A total of 2160 anthers isolated from five donor genotypes were cultured in 65 x 15 mm plates containing androgenesis induction (modified B5) medium. Cultures were kept in a growth room set for 25o C and darkness until the emergence of androgenic embryos. Androgenesis response was obtained in the anthers of four donors (three with orange and one with black roots) genotypes, whereas no response was obtained from the anthers of a donor (with black roots) genotypes. Medium levels of androgenesis responses were obtained in DC Çakır (7,49%) and DC Hatay yerli (4,81%) genotypes. The lowest androgenesis response (0,18 %) was obtained from Marot F1 anthers. In this study, a total of 2146 androgenic plantlets were produced and 2017 of them were converted to plants. 87% of the plants produced were diploids. A majority of androgenic carrot plants were acclimatized to in vivo and grown in the greenhouse.

KEYWORDS: Androgenesis, *Daucus carota* L., doubled haploid, haploid, tissue culture

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ŞEKİL LİSTESİ | iv |
| TABLO LİSTESİ | v |
| SEMBOL LİSTESİ | vi |
| ÖNSÖZ | vii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. YÖNTEM | 5 |
| 2.1 Bitki materyali | 5 |
| 2.2 Donör havuç genotiplerine ait çiçeklerde yapılan gözlemler | 5 |
| 2.3 Donör havuç genotiplerine ait çiçek tomurcuklarının yüzey sterilizasyonu | 6 |
| 2.4 Androgenesis uyartımına uygun anterlere sahip olan tomurcukların seçilmesi | 6 |
| 2.5 Androgenesis uyartım kültürlerinin oluşturulması | 7 |
| 2.6 Androgenik havuç bitkilerinde ploidi seviyesi tespiti | 10 |
| 2.7 Androgenik havuç bitkilerinin dış ortama aklimize edilmeleri | 10 |
| 2.8 Androgenik havuç bitkilerinde morfolojik özelliklerin karakterizasyonu | 11 |
| 2.9 Verilerin değerlendirilmesi..... | 11 |
| 3. BULGULAR | 12 |
| 3.1 Donör havuç genotiplerinin androgenesis uyartımına gösterdikleri cevaplar | 12 |
| 3.2 Androgenik havuç bitkilerinin ploidi seviyeleri | 19 |
| 3.3 Androgenik havuç bitkilerinin aklimatizasyonu | 19 |
| 3.4 Androgenik havuç bitkilerinin morfolojik özellikleri | 19 |
| 4. TARTIŞMA | 22 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 25 |
| 6. KAYNAKLAR | 26 |
| 7. ÖZGEÇMİŞ | 30 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1: Havuç anterlerinin androgenesis uyartımı kültürü için hazırlanması . | 8 |
| Şekil 3.1: Androgenesis uyartımı ile androgenic havuç bitkiciklerinin üretimi | 14 |
| Şekil 3.2: Androgenik havuç bitkilerinin dış ortama aktarılmaları..... | 15 |
| Şekil 3.3: Androgenik havuç bitkilerinin aklimatizasyonu..... | 16 |
| Şekil 3.4: Androgenik havuç bitkilerinin serada büyütülmeleri | 17 |

TABLO LİSTESİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Tablo 2.1: Donör havuç genotiplerinin genel özellikleri | 5 |
| Tablo 2.2: Havuçta androgenesis uyartımı ve androgenik bitkicik/bitki büyüme ortamları. | 9 |
| Tablo 3.1: Havuç donör genotiplerinde androgenesis uyartımı | 18 |
| Tablo 3.2: Havuç donör genotiplerinde androgenesis cevapları | 18 |
| Tablo 3.3: Dış orama aktarılan androgenik havuç bitkileri..... | 21 |
| Tablo 3.4: Androgenik havuç bitkilerin morfolojik özellikleri..... | 21 |

SEMBOL LİSTESİ

| | |
|--------------|-----------------------------------|
| 2,4-D | : 2,4-Dikloro Fenoksi Asetik Asit |
| BAP | : 6-Benzil Amino Pürin |
| °C | : Santigrad derece |
| m/cm | : Metre/santimetre |
| mm | : Milimetre |
| NIB | : Nuclei isolation buffer |
| g/l | : Gram/litre |
| mg/l | : Miligram/litre |
| µm | : Mikro litre |
| PI | : Propodium iodide |

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında ürettiğimiz katlanmış haploid bitkilerin Türkiye'nin yerli tohum üretimine katkı ve kazanç sağlamasını temenni ediyor ve çok zor şartlarda da olsa sabırla bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ali Ramazan ALAN'a teşekkür ediyorum.

Ayrıca bütün tez süreci boyunca yardım ve desteği ile yanımda olan Prof. Dr. Fevziye ÇELEBİ-TOPRAK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Sürekli arayış içinde olmam ve akademik olarak ilerlemem için beni teşvik ederek yönlendiren Dr. Mohammad Ali TAHIRI'ye teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca benden yardımlarını eksik etmeyen en zor zamanlarımda gerek çalışmalarım, gerekse manevi olarak yanımda olan başta Doğuşcan YILDIZ, Tuğçe ALAN, Salim BARIŞ ve Adamou KORONEY olmak üzere bütün BİYOM ekibine teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatım boyunca bana ilham olan ve her zaman anılarını kalbimde taşıdığım rahmetli anne ve babama çok teşekkür ediyorum.

Öğrenciliğim sırasında 1170386 no.lu projede Yüksek Lisans bursiyeri olarak desteklediğim için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

1. GİRİŞ

Havuç (*Daucus carota* L.) *Apiaceae* familyası içerisinde yer alan ekonomik olarak en önemli türdür. Diploid ($2n = 2x = 18$) bir tür olan havuç bitkisinin somatik hücrelerinde 0.98 pg DNA/2C bulunur ve genomunun büyüklüğü 473 Mbp/1C dir (Arumuganthan and Earle 1991). Genellikle iki yıllık hayat döngüsüne sahip olan havuç türünde birinci yıl kökler üretilir. İkinci yıl kök tepesinde bulunan büyüme noktasından yeniden yaprak ve çiçek sapı üreten bitkiler erselik çiçekler bulunduran umbeller üretirler.

Havuç dünyada en fazla üretimi yapılan 10 bitki türünden biridir. FAOSTAT (2016) verilerine göre yıllık dünya havuç üretimi ~43 Milyon ton dur. Dünya havuç üretimin yaklaşık yarısı Çin'de yapılmaktadır. Türkiye yıllık ~555 bin tonluk üretimle dünyada 13. sırada yer almaktadır. Bu tür köklerin taze ve pişirilmiş olarak tüketimi dışında meyve suyu ve fermente ürün, tatlandırıcı, doğal boya kaynağı olarak kullanımı nedeni ile üretimi ve tüketimi sürekli artış gösteren bir türdür. Serin iklim sebzesi olmasına rağmen sıcak iklimlere adapte olabilen çeşitlerin geliştirilmeside dünya havuç üretimindeki artışın önemli bir nedenlerinden biridir (Simon ve diğ. 2008).

Havuç Orta Asya kökenli bir türdür. Yabani formunun daha geniş alanlara yayılmış olmasına rağmen kökleri için üretimi 100 yıl önce Afganistan da başlamıştır. Tarımsal ürün olarak üretimi buradan batı ve doğuya doğru yayılmıştır (Mackevic 1929). Türkiye havuç için ikincil çeşitlilik merkezi olarak kabul edilmektedir. Bundan yaklaşık 11 yüzyıl önce Orta Asyada kültür havuç formunda kök renklerinin sarı ve mor olduğu kaydedilmiştir (Zagorodskikh 1939; Iorizzo ve diğ. 2013). Avrupa da turuncu kök üreten havuçlar ile ilgili güvenilir bilgiler on altıncı yüzyıla dayanmaktadır (Simon 2000; Arscott ve Tanumihardjo 2010). Havuç kökündeki turuncu renk alfa ve beta karotenden kaynaklanır ve bu nedenle de havuç insanlar tarafından tüketilen en önemli provitamin A kaynağıdır (Simon 2009). Havuçta ıslah çalışmaları kök şekli ve büyüklüğü, deri rengi, floem ve ksilem rengi, deri yüzeyi, kor çapı, karotenoid ve şeker içerikleri özelliklerine yoğunlaşmıştır (Rubatzky ve diğ. 1999; Baranski ve diğ. 2012). Islah çalışmaları ile havuç köklerinin besin değeri ve karoten içerikleri önemli miktarda arttırılmıştır. Kırmızı ve sarı havuçlarda likopen ve

lutein besinsel olarak önemli karotenoidlerdir (Simon 2009). Genellikle besleyici kökleri için türetilip tüketilen havucun tohumlarında aromatiktir ve baharat olarak ve tıbbi amaçlıda kullanılır (Simon ve diğ. 2008).

Mükemmel çiçek yapısına sahip olmasına rağmen, havuç yabancı tozlanma ile tohum üretme eğilimine sahip bir türdür. Bu nedenle açık tozlanan (OP) çeşitlerde heterozigotluk oranı oldukça yüksektir ve bu tip çeşitlerde agronomik özellikler açısından farklılıklara sahip bitkilerin olması kaçınılmazdır. Dünyanın birçok bölgesinde OP genotiplerle üretim yapılmakla beraber gelişmiş ülkelerde daha çok F1 hibrit çeşitlerin kullanımı oldukça yaygındır. Günümüzde havuç ıslahı çalışmaları F1 hibrit çeşitlerin geliştirilmesine yöneliktir. Bu nedenle havuç ıslahında en önemli hedef F1 çeşitlerinin üretiminde kullanılacak olan genetik olarak durultulmuş (inbred) anne ve baba hatlarının üretilmesidir. F1 hibrit çeşitler melez gücü, yüksek ve kaliteli verim gibi özellikleri nedeni ile OP çeşitlerden daha fazla tercih edilmektedirler. Ülkemizde ticari havuç yetiştiriciliği tamamen ithal edilen hibrit çeşitlerle yapılmaktadır.

Klasik F1 hibrit çeşitlerin üretiminde kullanılan inbred hatların üretiminde Klasik kendileme yöntemleriyle uniform bitkiler üretilmeye çalışılır. Bu yolla anne ve baba olarak kullanılacak olan hatların üretimi zor ve uzun süren işlemlerdir. Ayrıca klasik ıslah yöntemleriyle genetik olarak tamamen saflaştırılmış hatların elde edilmesi mümkün değildir (Stein ve Nothnagel, 1995; Ferrie ve Möllers 2011). Bazı bitki türlerinde uygulanabilen haploidizasyon yöntemi ile tamamen homozigot bitkiler üretilebilmektedir.

Havuç türünde haploid bitkilerin üretimi androgenesis veya partenogenesis uyartımı ile sağlanabilir (Andersen ve diğ. 1990; Matsubara ve diğ. 1995; Adamus ve Michalik 2003; Li ve diğ. 2013; Kiełkowska ve diğ. 2014). Androgenesis uygulamasında henüz açmamış çiçek tomurcuklarından alınan anterler androgenesis uyartım ortamlarına ekilirler. Uyartım ortamına ekilen anterler içerisinde bulunan olgunlaşmamış polenler (mikrosporlar) hücre bölünmeleri ile gelişerek anter dışına çıkarlar. Anter dışına çıkan androgenik yapılar kallus, embriyo veya bitkicik formunda olabilir. Çiçeklerin ve içerisindeki anterlerin çok küçük olduğu havuç türünde anter kültürleri yapmanın teknik olarak zor olduğu ve bu nedenle yeteri kadar başarılı olmayacağı öne sürülmüştür. Bunun yerine izole edilmiş mikrosporların kültüre

alınmasıyla çok sayıda haploid bitkinin üretilebileceği (mikrosporogenesis) önerilmiştir. Mikrosporogenesis uygulamasında mikrosporlar kültüre alınır ve mikrospordan başlayarak tüm embriyonal gelişim gözlenebilir. Kiszczak ve diğ. (2017) tarafından yayınlanan çalışmada üç havuç genotipinde anter ve mikrospor kültürü yöntemleri ile benzer oranlarda androgenik havuç bitkileri üretilmiştir. Anter kültürü yoluyla elde edilen bitkilerin çoğunlukla diploid, mikrospor kültürleriyle elde edilen bitkilerinin ise çoğunlukla haploid olduğu tespit edilmiştir.

Kielkowska ve diğ. (2014) tarafından yayınlanan çalışmada havuçta partenogenesis yöntemi ile haploid embriyo gelişimin uyartılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada havuç çiçeklerinin dişik tepeleri maydanoz (*Petroselinum crispum*) poleniyle tozlanarak *in situ* haploid embriyo gelişimi uyartılmış ve bu işlemden 20-22 gün sonra ovüller özel besi yerlerine ekilerek embriyoların *in vitro*'da gelişmeleri teşvik edilmiştir. Bu uygulama ile elde edilen bitkilerin haploid ve diploid oldukları tespit edilmiştir. Moleküler analizler bu yöntemle elde edilen bitkilerin ~%70 oranında gametik kökenli olduğu göstermiştir.

Haploid/katlanmış haploid teknolojisi ile homozigot rekombinant bireyler tek bir generasyonda üretilir. Bu sayede homozigot rekombinant bireylerin üretilmesi için gerekli zaman kısaltılır. Rekombinant hatlarda, resesif genlerle kontrol edilen özelliklerde yapılacak seleksiyonun başarısı artar. Bu teknoloji ile yeni havuç çeşitlerinin üretilmesi hızlı ve başarılı olur. Havuç bitkilerde totipotensi özelliğinin gösterilmesi ve doku kültürü uygulamalarında bir model canlı olması nedeni ile önemli bir türdür (Steward, 1958; Vogel 2005). Buna rağmen yayınlanmış çalışmalarda havuçta haploidizasyon uygulamalarında uyartıma verilen cevabın genotip bağımlı olduğu belirtilmektedir. Bunun yanında çok küçük çiçeklere sahip olan havuçta haploidizasyon için kullanılacak olan çiçek organları ile çalışmakta zordur. Ülkemizde Bu nedenle bu teknolojilerin ülkemizde uygulanabilirliğinin araştırılması gerekmektedir.

Bu tez projesinde turuncu ve siyah köklü havuç genotiplerinin androgenesis uyartımına gösterecekleri cevapların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Havuç genotiplerinin haploidizasyon uyartımına cevap verme özelliği açısından büyük farklılıklar gösterdiği bilindiği ve Türk havuç materyalleri ile yapılan örnek bir çalışma bulunmadığı için yöntem olarak anter kültürü uygulanmıştır. Projede yer alan beş

donör havuç genotipinden üçünde yüksek oranda androgenesis cevabı görölmüş ve bunlardan çok sayıda DH havuç bitkisi geliştirilmiştir. DH havuç bitkileri başarılı bir şekilde dış ortama alıştırılmış ve çiçeklenen bazı DH bitkilerde polen canlılık oranları tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar DH teknolojisinin ülkemizde havuç genetiği ve ıslah programlarında kullanılabileceğini göstermektedir. Bu çalışma ile ülkemizde ilk defa havuçta genetik olarak saf hatların üretilmesi mümkün hale gelmiştir.

2. YÖNTEM

2.1 Bitki materyali

Projede Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (PAU BİYOM) tarafından ıslah materyali olarak geliştirilen iki siyah ve iki turuncu köklere sahip açık tozlanan (OP) ve turuncu kök üreten bir hibrit çeşit kullanılmıştır (Tablo 2.1). Donör genotiplere ait tohumlar 15 Eylül 2018 tarihinde içleri torf ve perlit (2:1) ile doldurulmuş 60 L'lik saksılara ekilmişlerdir. Eylül ayı sonunda çimlenen bitkiler Kasım ayı sonuna kadar dış koşullarda büyütülmüşlerdir. Daha sonra ısıtmasız bir cam seraya alınan bitkiler gelişimlerine burada devam etmişlerdir. Saksıda büyütülen havuç bitkilerinde 2019 yılı mart ayı başından itibaren çiçek sapsarı oluşmuştur. Donör havuç genotiplerin nisan ve haziran ayları boyunca umbeller oluşturmuşlardır (Şekil 2.1A). Bu bitkilerinden toplanan umbelcikler Magenta kutularına konarak laboratuvara getirilmişlerdir.

Tablo 2.1: Donör havuç genotiplerinin genel özellikleri

| Donör genotip | Kök rengi | Kök şekli |
|----------------------|------------------|------------------|
| DC Biyom01 | Turuncu | Nantes tipi |
| DC Çakır | Turuncu | Nantes tipi |
| Marot F1 | Turuncu | Nantes tipi |
| DC Hatay yerli | Siyah | Uzun |
| DC Ereğli yerli | Siyah | Uzun |

2.2 Donör havuç genotiplerine ait çiçeklerde yapılan gözlemler

Antesis aşamasında bulunan havuç çiçeklerinde anterlerin morfolojisi, anterlerde polen üretilip üretilmediği ve üretilen polenlerde canlılık oranları test edilmiştir. Bu işlemler için beş donör genotipten toplanan umbelciklerden alınan açmış çiçekler kullanılmıştır. Her umbelcikten rastgele alınan beş çiçek stereo mikroskop

altında incelenmiştir. Beş çiçekten alınan birer anter bir lam üzerinde iki damla % 1'lik acetocarmin içinde ezilmiştir. Anter parçaları temizlendikten sonra polen örnekleri bir lamel ile kapatılarak 15 dakika kadar oda koşullarında bekletilmişlerdir. Havuç donör genotiplerine ait polen örnekleri bir ışık mikroskopu yardımı ile gözlenmişlerdir. Kırmızı ve pembe renkli polenler canlı, boyanmamış polenler ise cansız olarak kaydedilmişlerdir. Donör havuç genotiplerine ait çiçeklerin anterlerinde >%90 canlı polen bulunduğu tespit edilmiştir.

2.3 Donör havuç genotiplerine ait çiçek tomurcuklarının yüzey sterilizasyonu

Laboratuvara getirilen umbelciklerde bulunan açmış çiçekler uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan tomurcuklar bir makas ile kesilerek bir metal çay süzeklerine doldurulmuşlardır (Şekil 2.1B). Metal çay süzeklerine doldurulan umbelcikler buz kutusu içerisinde bulunan % 70'lik etanol ile doldurulmuş Magenta kutusuna 30 saniye tutulduktan sonra buz kutusunda bulunan steril su ile doldurulmuş olan Magenta kutusunda 10 saniye durulanmışlardır. Daha sonra buz kutusunda bulunan sterilizasyon solüsyonu (0,6 % sodyum hipoklorit ve % 0,1 Tween-20) ile doldurulmuş Magenta kutusunda 12 dakika karıştırılarak tutulmuştur. Tomurcuklar steril kabin içerisinde üç kez beşer dakika soğuk steril su ile durulanmışlardır.

2.4 Androgenesis uyartımına uygun anterlere sahip olan tomurcukların seçilmesi

Yüzey sterilizasyonundan sonra steril bir 65 x 15 mm Petri tabağına konan steril umbelcikler steril kabine yerleştirilmiş olan kamera ataçmanlı bir stereo mikroskop altında ölçülmüşlerdir. Bu çalışmada anter kültürü çalışmaları için uygun gelişim aşamasında mikrosporlarına sahip olan 0,7-1,3 mm arası uzunlukta bulunan açmamış tomurcukları seçilmiştir (Şekil 2.1C, 2.1D). Anter kültürü uygulaması için seçilmiş olan çiçek tomurcukları 65 x 15 mm Petri tabaklarına konduktan sonra üzerlerine bir kaç damla soğuk steril su eklenmiş ve üzeri streç film ile kapatılmış olan buz kutusu üzerine yerleştirilmişlerdir.

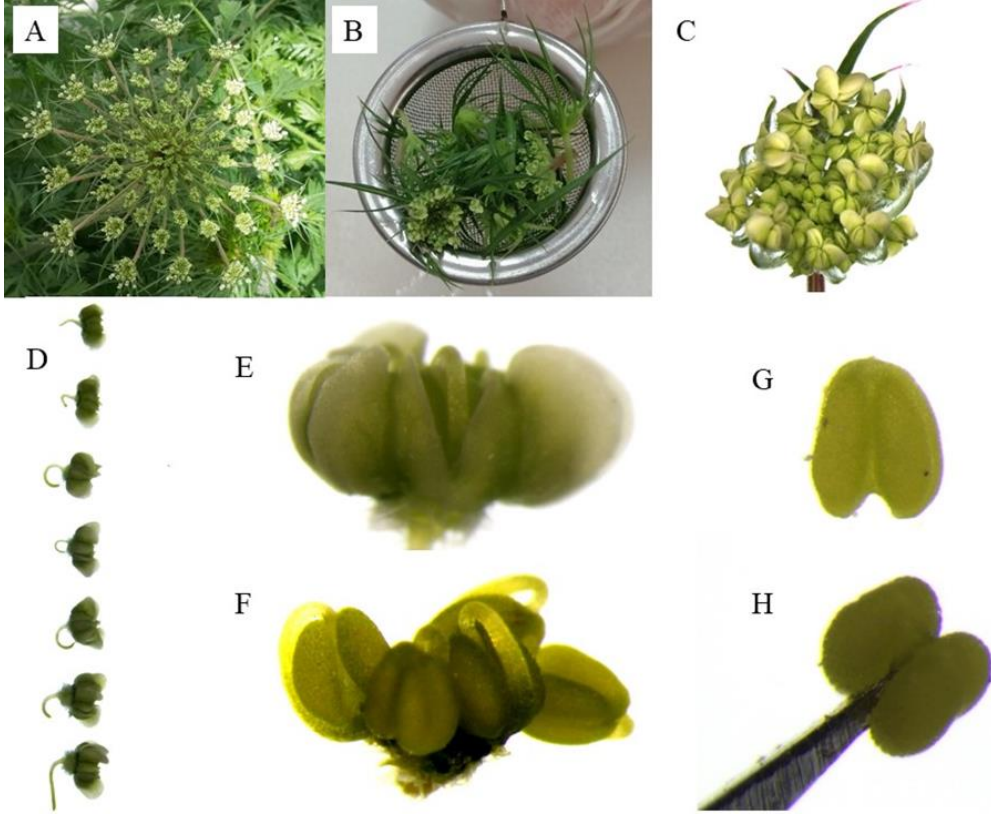
2.5 Androgenesis uyartım kültürlerinin oluşturulması

Çalışmada kullanılan androgenesis uyartım ortamı B5 (Gamborg ve diğ. 1968) temelli olup Keller ve Armstrong (1977) tarafından geliştirilen ve Andersen ve diğ. (1990) tarafından kullanılan uyartım medyasından modifiye edilmiştir (Tablo 2.2). Androgenik bitkicik ve bitki gelişimi için B5 ortamı kullanılmıştır (Tablo 2.2). Ortamlar otoklavda 121° C’de 1 atmosfer basınçta 20 dakika tutularak sterilize edilmişlerdir. Ortamların steril kabin içerisinde 60° C’ye kadar soğuması beklendikten sonra 65 x 15 mm Petri tabaklarına ~15 ml Magenta kutularına ~50 ml doldurularak steril kabin içerisinde katılaşmaları sağlanmıştır.

Anter kültürü uygulaması için seçilmiş olan çiçek tomurcukları stereo mikroskop altında 11 no.lu uçlara sahip iki steril bistüri yardımı ile açılmış ve içinde bulunan anterler anter sapı olmadan izole edilmişlerdir (Şekil 2.1E-H).

Anterler uyartım ortamı içeren Petri tabaklarına 30’arlı olarak ekilmişlerdir (Şekil 3.1A). Kültür tabakları parafilm ile kapatılmıştır ve altılı gruplar halinde kolonlar oluşturularak alüminyum folyo ile örtülmüşlerdir. Bu kültürler sürekli 25° C’ye ayarlanmış olan büyütme odasına konmuşlardır (Şekil 3.1B). Tez çalışmasında her donör havuç genotipinden 540’er olmak üzere toplam 2700 adet anter kullanılmıştır.

Embriyo oluşumunun takibi amacıyla kültürler altıncı haftadan başlanarak haftalık olarak gözlemlenmişlerdir. Androgenesis cevabı gösteren anterler 15 ml büyüme ortamı (20 g/l sukroz, 8 g/l agar, pH=5.8) bulunduran 60 x 15 mm Petri tabaklarına aktarılmıştır. Bu kültürler sürekli olarak 25° C ve 16 saat ışık/8 saat karanlık için ayarlanmış büyütme odasına alınmışlardır. Anterlerden gelişen androgenik bitkicikler steril pens yardımı ile ~50 ml büyütme ortamı içeren Magenta kutularına dikilmişlerdir.



Şekil 2.1: Havuç anterlerinin androgenesis uyartımı kültürü için hazırlanması a) Bir havuç umbeli, b) Yüzey sterilizasyonu için kesilmiş umbelcikler, c) Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış bir umbelcik, d) Çalışmada anter kaynağı olarak kullanılan çiçek tomurcukları, e) Açmamış bir havuç çiçeği tomurcuğu, f) Petallerin alınmasından sonra anterlerin çiçek tomurcuğundaki durumu g) İzole edilmiş bir anter, h) Uyartım ortamına ekilmek için hazır bir anter.

Tablo 2.2: Havuçta androgenesis uyardımı ve androgenik bitkicik/bitki büyüme ortamları

| İçerik | Uyardım ortamı (^aGamborg B5I (mg/l)) | Büyüme ortamı (^aGamborg B5II (mg/l)) |
|--|--|--|
| Makro elementler | | |
| CaCl ₂ | 113.23 | 113.23 |
| KNO ₃ | 2500.00 | 2500.00 |
| NaH ₂ PO ₄ | 130.44 | 130.44 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 134 | 134 |
| MgSO ₄ | 122.09 | 122.09 |
| Mikro elementler | | |
| CoCl ₂ x 6H ₂ O | 0.025 | 0.025 |
| CuSO ₄ x 5H ₂ O | 0.025 | 0.025 |
| H ₃ BO ₃ | 3.00 | 3.00 |
| KI | 0.75 | 0.75 |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 10.00 | 10.00 |
| Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O | 0.25 | 0.25 |
| ZnSO ₄ x 7H ₂ O | 2.00 | 2.00 |
| Demir kaynağı | | |
| EDTANa ₂ x 2H ₂ O | 37.25 | 37.25 |
| FeSO ₄ x 7H ₂ O | 27.85 | 27.85 |
| Vitaminler | | |
| Miyo-inositol | 100.00 | 100.00 |
| Nikotinik asit | 1.00 | 1.00 |
| Piridoksin-HCL | 1.00 | 1.00 |
| Tiamin-HCL | 10.00 | 10.00 |
| Amino asitler | | |
| Glutamin | 500 | - |
| Serin | 100 | - |
| Bitki büyüme düzenleyicileri | | |
| 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) | 0.100 | - |
| α-naftalenasetik asit (NAA) | 0.100 | - |
| Karbohidrat kaynağı | | |
| Sukroz | 130,000 | 20,000 |
| Katılaştırma ajanı | | |
| Agar (mikrobiyolojik kullanım için) | 8,000 | 8,000 |
| pH | 5.8 | 5.8 |

^aGamborg ve diğ. (1968).

2.6 Androgenik havuç bitkilerinde ploidi seviyesi tespiti

Gelişmeye devam ederek 3-4 yapraklı seviyeye gelen androgenik havuç bitkilerinde flow sitometri (FCM) ile ploidi analizi yapılmıştır. Bu projede kullanılan donör havuç genotiplerin ve androgenik bitkilerin ploidi seviyeleri Alan ve ark. (2016) FCM protokolüne göre tespit edilmiştir. Diploid olan havuç ($2n = 2x = 18$) bitkisinin somatik hücrelerinde 0,98 pg/2C çekirdek DNA'sı bulunur (Arumuganathan ve Earle 1991). Androgenik haploid havuç bitkilerinin somatik hücrelerinde diploid bitkilerin somatik hücrelerinde bulunan DNA miktarının yarısı kadar çekirdek DNA'sı (~0.5 pg/2C) bulunması beklenmektedir. Çekirdek DNA miktarı bilinen Brassica napus (2,32 pg/2C; Arumuganathan ve Earle 1991) bitkilerinden izole edilen çekirdekler içsel kontrol olarak kullanılmıştır. Somatik hücrelerinde ~0,98 pg/2C çekirdek DNA'sı bulunduran androgenik havuç bitkileri spontan diploid olarak değerlendirilmiştir.

2.7 Androgenik havuç bitkilerinin dış ortama aklimize edilmeleri

Ploidi seviyeleri belirlenen androgenik havuçların çoğu dış ortama aklimize edilerek büyütülmüşlerdir. Magenta kutusundan çıkarılan androgenik bitkiler çeşme suyu ile besi ortamından temizlendikten sonra otoklavlanmış torf ve perlit karışımı (2:1) doldurulmuş 0.5 L'lik plastik saksılara dikilmişlerdir (Şekil 3.2 A-C). Bu bitkilerin üzerine naylon sandviç poşeti geçirilmiş ve kauçuk lastik ile kapatılmıştır (Şekil 3.2 D). Dış ortama aktarılan androgenik bitkiler sürekli 17° C ve 18 saat ışık ve 6 saat karanlık için ayarlanmış büyütme kabinine yerleştirilmişlerdir (Şekil 3.3A). İki hafta sonra bitkileri örten naylon poşetlerde küçük delikler açılarak bitkilerin dışortama alıştırmaları hızlandırılmış, dört hafta sonra ise poşetler tamamen açılmıştır (Şekil 3.3B-D). Bu şekilde yaklaşık dört hafta daha büyütme kabininde tutulan bitkiler ısıtmasız cam seraya transfer edilmişleridir (Şekil 3.4 A, B). Bu işlemde yaklaşık iki ay sonra androgenik havuç bitkileri torf ve perlit karışımı ile doldurulmuş 4,6 L'lik saksılara aktarılak kök gelişimleri için yeterli alan sağlanmışır (Şekil 3.4 C, D).

2.8 Androgenik havuç bitkilerinde morfolojik özelliklerin karakterizasyonu

Üretilen androgenik havuç bitkilerinde kök rengi ve yaprak (rengi, tüylülüğü ve uzunluğ) zellikleri gözlemlenmiş ve elde edilen bulgular kaydedilmiştir.

2.9 Verilerin değerlendirilmesi

Androgenik bitki rejenerasyonu oranları kültürdeki anter sayısına göre hesap edilmiştir. Aynı besiyeri kompozisyonuna sahip ve aynı genotipten elde edilmiş eksplantlarla oluşturulmuş Petri tabakları bir replikasyon nitesi olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Donör havuç genotiplerinin androgenesis uyartımına gösterdikleri cevaplar

Anter kültürü uygulamasının başlamasında sonra uyartım ortamına yerleştirilen anterlerin cevap vermeyenlerinde genel olarak hacimsel olarak fazla değişiklik gözlenmezken cevap veren anterlerde içten dışa doğru gelişen baloncuk şeklinde embriyoların geliştiği görülmüştür (Şekil 3.1C, 3.1D). Cevap veren anterlerin B5 ortamı içeren Petri tabaklarına aktarılıp normal büyütme odası şartlarında kültüre alınmasından iki hafta kadar sonra androgenik bitkicikler belirginleşme başlamışlardır. Kök ve kotiledon yaprağı oluşturan bitkicikler Magenta kutularında aktarıldıktan yaklaşık iki ay sonra ploidi analizi yapılabilecek büyüklüğe ulaşmışlardır. Çalışmada yer verilen donör havuç genotipleri arasında androgenesis uyartımına cevap verme açısından önemli farklılıklar bulunmuştur (Tablo 3.1). Anterleri uyartım ortamında kültüre alınan beş havuç genotipinden birinde androgenik cevap gözlenmemiştir. Kültüre konan 2160 anterden toplam 136 (% 6,29) adetinde androgenesis cevabı gözlenmiştir. Cevap veren anterlerden toplam 2146 bitkicik üretilmiş bunların 2017 (% 93,99) adeti bitkiye dönüşmüştür.

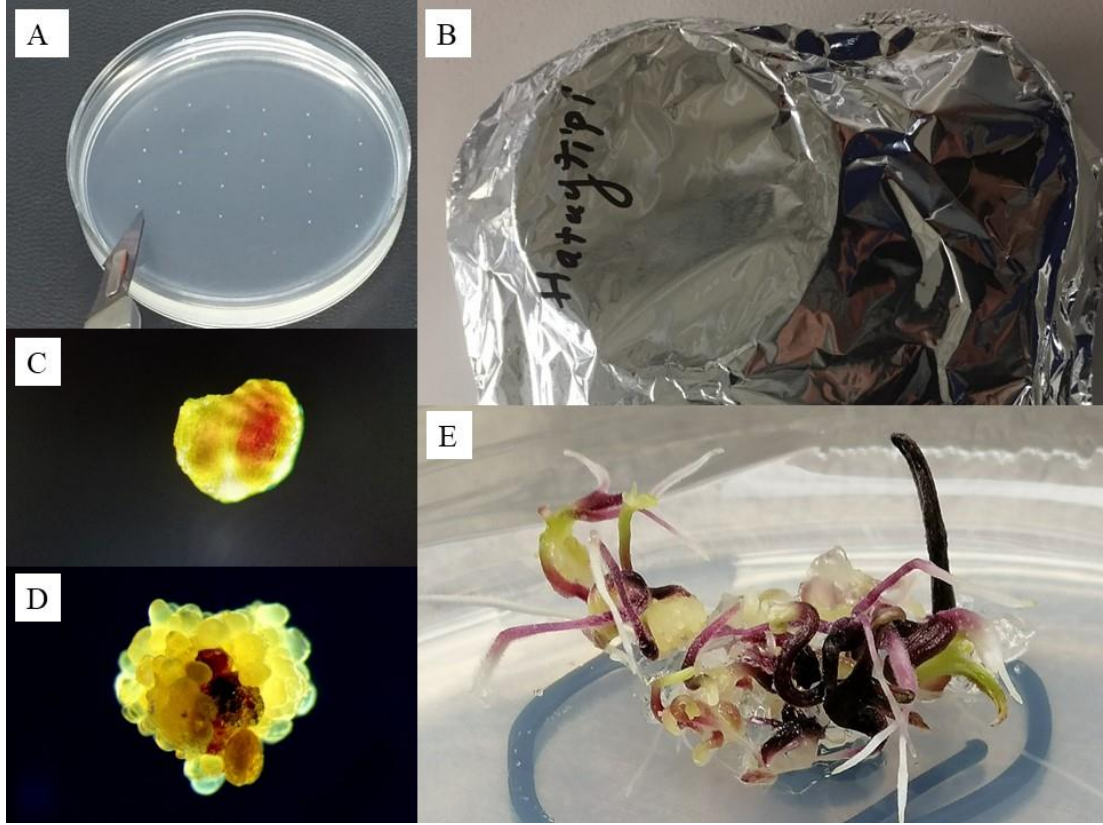
Nantes tipi turuncu kökler üreten OP genotipi olan DC BİYOM01 donörü uyartım deneylerinde en yüksek androgenesis cevabı göstermiştir (Tablo 3.1). Bu genotipe ait uyartım kültürlerinde toplam 68 adet anterde (% 12, 59) cevap gözlenmiştir. Cevap veren anterlerden 567 androgenik bitkicik elde edilmiştir. Bunların 554 adedi bitki haline dönüşmüştür. Bu genotipe ait cevap veren anterlerden anter başına ortalama 8,33 androgenik bitkicik elde edilmiştir (Tablo 3.2). Bu bitkiciklerin ~% 99'u bitki haline dönüşmüştür.

Nantes tipi turuncu kökler üreten bir OP genotipi olan DC Çakır donörüne ait anterlerden 41 adetinde (% 7,49) androgenesis cevabı elde edilmiştir (Tablo 3.1). Bu genotipe ait androgenesise cevap veren anterlerden toplam 513 androgenik bitkicik elde edilmiş ve bunların 444 adeti bitki haline dönüşmüştür. Bu genotipten cevap veren anterlerden ortalama olarak anter başına 12,51 androgenik bitkicik üretilmiştir (Tablo 3.2). Bu androgenik bitkiciklerin ~% 90'nı bitki halini almıştır.

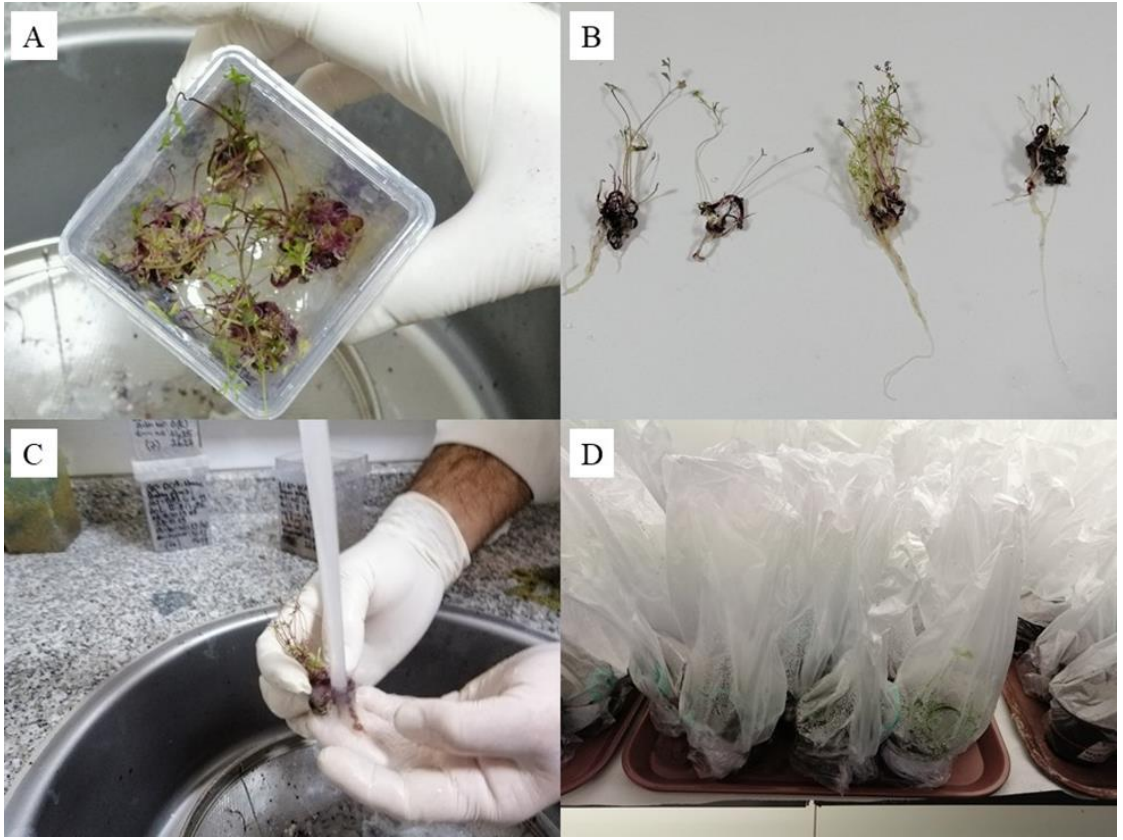
Bir F1 hibrit çeşit olan Marot'a ait anterlerde çok düşük seviyede androgenesis cevabı gözlenmiştir. Bu genotipe ait anterlerden sadece bir tanesinde (% 0,18) androgenik cevap tespit edilmiştir (Tablo 3.1). Androgenik cevap gösteren anterden hiçbir bitkicik gelişimi sağlanamamıştır.

Siyah köklere sahip OP genotip olan DC Hatay yerli genotipine ait anterlerin 26 adeti (% 4,81) androgenesis uyarımına cevap vermiştir (Tablo 3.1). Cevap veren anterlerden toplam 1066 adet androgenik bitkicik gelişmiştir. Bunlardan 1019 adedi bitki elde edilmiştir (Tablo 3.1). DC Hatay tipinde cevap veren anter başına ortalama 41 bitkicik üretilmiştir ve bitkiciklerin ~% 97'si bitki halini almıştır (Tablo 3.2).

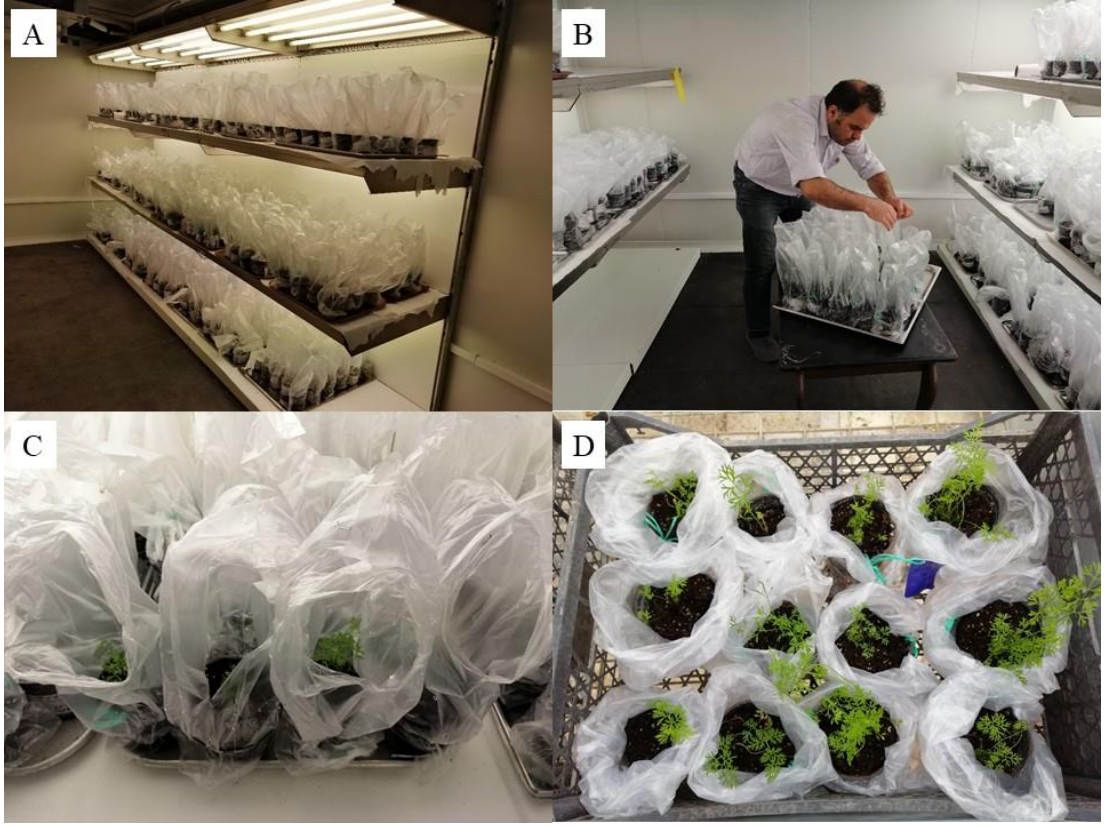
Diğer bir siyah kök oluşturan OP genotip DC Ereğli yerliye ait çiçeklerden alınan anterleri DCA ortamında yapılan uyarıma yanıt vermemiştir. Bu yönü ile çalışmada yer verilen donör genotipler arasında androgenik cevap vermeyen tek tek havuç genotipi olmuştur.



Şekil 3.1: Androgenesis uyartımı ile androgenic havuç bitkiciklerinin üretimi a) Havuç çiçek tomurcuklarından izole edin anterlerin uyartım kültürlerine yerleştirilmeleri, b) Uyartım kültürüne yerleştirilen anterlerin karanlıkta kalmasını sağlamak amacıyla Alüminyum folyo ile kapatılmaları, c) Androgenesis uyartımına cevap göstermeyen bir anter, d) Androgenesis uyartımına cevap veren bir anter, e) B5 ortamında androgenik bitkiciklerin gelişimi.



Şekil 3.2. Androgenik havuç bitkilerinin dış ortama aktarılmaları a) Dış ortama transfere hazır androgenik havuç bitkileri, b) Magenta kutusu dışına çıkartılmış androgenik bitkiler, c) Androgenik bitkilerin musluk suyu ile besi ortamından temizlenmeleri, d) Saksılara aktarılmış ve naylon sandviç poşeti ile kapatılmış androgenik havuç bitkileri.



Şekil 3.3 Androgenik havuç bitkilerinin aklimatizasyonu a) Büyütme kabini raflarına yerleştirilmiş androgenik havuç bitkileri, b) Bitkileri saran poşetlerde küçük deliklerin açılması işlemi, c) Poşetlerde delik açılmış androgenik bitkiler, d) Poşetleri tamamen açılmış ve aklimatize olmuş androgenik havuç bitkileri.



Şekil 3.4 Androgenik havuç bitkilerinin serada büyütülmeleri a) Aklimatize edildikten sonra seraya aktarılmış olan androgenik havuç bitkileri, b) Gelişim farklılığı gösteren iki androgenik havuç bitkisi, c) Masalarda büyütülen androgenik havuç bitkileri, d) Farklı havuç donör genotiplerinden üretilen androgenik havuç bitkileri.

Tablo 3.1: Havuç donör genotiplerinde androgenesis uyartımı

| Donör genotip | Ekilen anter sayısı | Cevap veren anter sayısı (%) | Androgenik bitkicik sayısı (%) | Androgenik bitki sayısı (%) |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| DC Biyom01 | 540 | 68 (12,59) | 567 (105) | 554 (102,59) |
| DC Çakır | 540 | 41 (7,49) | 513 (95) | 444 (82,22) |
| Marot F1 | 540 | 1 (0,18) | 0 (0) | 0 (0) |
| DC Hatay yerli | 540 | 26 (4,81) | 1066 (197,4) | 1019 (188,70) |
| DC Ereğli yerli | 540 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Toplam | 2160 | 136 (6,29) | 2146 (99,35) | 2017 (93,37) |

Tablo 3.2: Havuç donör genotiplerinde androgenesis cevapları

| Donör genotip | Cevap veren anter sayısı (%) | Cevap veren anter başına ortalama androgenik bitkicik sayısı (%) | Cevap veren anter başına androgenik bitkiye dönüşenler (%) |
|----------------------|-------------------------------------|---|---|
| DC Biyom01 | 68 | 8,33 (12,26) | 8,27 (12,17) |
| DC Çakır | 41 | 12,51 (30,51) | 11, 29 (27,54)) |
| Marot F1 | 1 | 0 | 0 |
| DC Hatay Yerli | 26 | 41 (157,69) | 39,80 (153,10) |
| DC Ereğli Yerli | 0 | 0 | 0 |
| Toplam | 136 (6,29) | 61,84 (45,7) | 59,36 (43,64) |

3.2 Androgenik havuç bitkilerinin ploidi seviyeleri

Beş donör havuç genotipine ait 15 bitkide yapılan FCM analizinde tüm bitkilerin çekirdek DNA miktarlarının ~0,98 pg DNA/2C bulunduğu ve hepsinin diploid oldukları tespit edilmiştir. Magenta kutularında büyütölen androgenik havuç bitkilerinden alınan yaprak örnekleri ile yapılan FCM analizinde test edilen 100 bitkiden 87'inin donör bitkilerde olduğu gibi ~0,98 pg DNA/2C çekirdek DNA'sına sahip oldukları tespit edilmiştir. Diğer 13 bitkide ölçölen çekirdek DNA miktarları ~0,50 pg DNA/2C olarak bulunmuştur.

3.3 Androgenik havuç bitkilerinin aklimatizasyonu

Üç donör havuç genotipinden üretilen toplam 1730 adet androgenik bitki in vivo'ya aktarılmıştır (Tablo 3.3). DC Biyom01 ve DC akır genotiplerinden elde edilen androgenik bitkilerin % 95'ten fazlası aklimatize olarak büyümeye devam etmişlerdir. DC Hatay yerli genotipinden üretilen bitkilerin yaklaşık % 15'i dış ortama transfer sırasında kaybedilmiştir. Diploid androgenik bitkilerde aklimatizasyon sırasında fazla kayıp olmadığı, haploid bitkilerin ise genellikle bu aşamada kaybedildikleri görölmüştür. Sadece DC akır genotipinden elde edilen haploid bitkilerin üç adeti aklimatize olabilmıştır. Fakat bunlarda daha sonra serada kaybedilmişlerdir. Hayatta kalan diploid androgenik bitkiler ısıtmasız cam sera şartlarında normal gelişim göstermişlerdir.

3.4 Androgenik havuç bitkilerinin morfolojik özellikleri

Androgenik bitkiler genellikle kaynaklandıkları donör bitkilere benzeyen yaprak ve kök özellikleri göstermişlerdir. Bitkilerin kökleri saksı içerisinde olduğundan sadece kök renkleri kayıt altına alınmıştır. Dış ortama ilk aklimize edilen bitkilerde yaprak rengi, yaprak sapı rengi, tüylölük ve olgun yaprak boyu özellikleri kaydedilmiştir (Tablo 3.4).

DC Biyom 01 donör genotipinden elde edilen androgenik bitkiler morfolojik açıdan donör genotipe benzemektedir. Turuncu kök üreten bitkilerin yaprak ve yaprak sapı yeşil renkte olup az yoğunlukta tüylüdüdür. Gelişimini tamamlamış yaprak uzunluğu ortalama ~49 cm olarak ölçölmüştür (Tablo 3.4).

DC akır donör genotipinden üretilen androgenik bitkilerin tümü turuncu kökler oluşturmuşlardır. Bu genotipten üretilen bitkilerin yaprak ve yaprak sapı yeşil olup az yoğunlukta tüyler bulundurdukları görülmüştür. Gelişimini tamamlamış yaprak uzunluğu ortalama ~61 cm olarak ölçülmüştür (Tablo 3.4). DC akır donöründen elde edile bitkiler araştırmada yer alan materyaller arasında en uzun yapraklara sahip olan bitkilerdir.

DC Hatay yerli genotipinden üretilen androgenik bitkilerin tümü siyah renkli kökler oluşturmuşlardır. Bu bitkilerde donör bitkilerde olduğu gibi yaprakların yeşil olduğu görülmüştür. Bu gruptaki tüm bitkilerin yaprak saplarının antosiyaninli olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.4). Donör genotipten olduğu gibi yaprak ve yaprak sapında yoğun tüylülük vardır. Hatay yerli genotipinden elde edilen androgenik bitkilerin gelişimini tamamlamış olan yapraklarının uzunluğu ~49 cm olarak ölçülmüştür.

Tablo 3.3: Dış orama aktarılan androgenik havuç bitkileri

| Donör genotip | Transfer edilen androgenik bitki sayısı | Aklimatize edilen androgenik bitki sayısı (%) |
|----------------------|--|--|
| DC Biyom01 | 267 | 265 (99,25) |
| DC Çakır | 444 | 430 (96,84) |
| DC Hatay yerli | 1019 | 861 (84,49) |
| Toplam | 1730 | 1556 (89,94) |

Tablo 3.4: Androgenik havuç bitkilerin morfolojik özellikleri

| Donör genotip | Gözlemlenen androgenik bitki sayısı | Kök rengi | Yaprak sapı rengi | Yaprak rengi | Yaprakta tüylülük | En yaşlı yaprak uzunluğu (cm) |
|----------------------|--|------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| DC Biyom01 | 20 | Turuncu | Yeşil | Yeşil | Az | 49,38 ± 9,61 |
| DC Çakır | 20 | Turuncu | Yeşil | Yeşil | Az | 61,45 ± 9,27 |
| DC Hatay yerli | 45 | Siyah | Antosiyantinli | Yeşil | Yoğun | 49,13 ± 8,52 |

4. TARTIŞMA

Havuç türünde androgenik embriyo ve bitkilerin üretilmesi ilk olarak bundan 30 yıl önce Andersen ve diğ. (1990) tarafından gerçekleştirilmiştir. Kiszczak ve diğ. (2005) mikrospor kültürü yolu ile androgenik havuç bitkilerinin üretilebildiği göstermişlerdir. Havuç türünde anter ve mikrospor kültürü yöntemlerinin androgenik bitki üretimi açısından birbirine yakın sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Kiszczak ve diğ. 2017). İzole edilmiş polenlerle kurulan mikrospor kültürü çok sayıda poleni kısa sürede kültüre alma yönünden avantajlı olarak görünmektedir. Ayrıca mikrospor kültüründe gelişen embriyolar genellikle mikrospordan kaynaklanır ve bu nedenle anter dokularından bitki gelişimi riski azalır. Bununla birlikte mikrospor kültürlerinde üretilen androgenik embriyolardan çok sayıda ikincil embriyolar meydana gelebilir. Bununla beraber havuçta anter ve mikrospor kültürlerinin her ikisinde de genotipin androgenik gelişimi etkilediği gösterilmiştir (Kiszczak ve diğ. 2017).

Bu çalışma ile Türkiye de ilk kez androgenik havuç bitkilerinin üretilmesi ve serada büyütülerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada yer verilen beş donör havuç genotipinden dördü Türkiye kaynaklı OP genotiplerdir. Bu genotiplerin üçünden (DC Biyom01, DC Çakır ve DC Hatay yerli) orta ve yüksek androgenesis cevapları elde edilmiştir. Kullanılan tek hibrit genotip olan Marot F1'de ise sadece bir anterde androgenik embriyo tespit edilmiştir. Diğer bir OP genotip olan DC Ereğli yerli'ye ait anterlerden çalışmada kullanılan uyartım ortamında androgenesis cevabı elde edilememiştir. Cevap veren anter başına en yüksek androgenik bitkicik üretimi 41 bitkicik ile DC Hatay yerli donöründen elde edilmiştir. Androgenesis uyartımına cevap veren diğer iki genotipten anter başına 8,33 ile 12,51 androgenik bitkicik üretilmiştir. Marot F1 donöründe androgenesis cevabı gösteren tek anterden bitkicik gelişimi sağlanamamıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular havuç donör genotiplerinin androgenesis uyartımına cevapları arasında önemli farklar olduğunu göstermiştir. Bununla beraber havuç genotiplerine ait anterlerin değişik uyartım ortamlarına gösterecekleri cevaplarında değişebileceği unutulmamalıdır. Yayınlanmış çalışmalarda farklı havuç genotiplerinin androgenesis uyartımına verdikleri cevaplar arasında önemli farklar bulunmuştur. Matsubara ve diğ. (1995) tarafından yayınlanan çalışmada bir genotipten elde % 2,8 androgenik embriyo elde edildiği belirtilmiştir. Hu ve diğ. (1993) tarafından yayınlanan çalışmada androgenik embriyo elde etme

başarısı % 21.4 yükselmiştir. Tyukavin ve diğ. (1999) tarafından yayınlanan çalışmada androgenik embriyo üretme başarısı %156,14 olarak belirtilmiştir. Kiszczak ve diğ. (2017) deneylerinde kullandıkları üç havuç genotipinden % 3,1 ile % 388 arasında değişen miktarda androgenik embriyo elde etmişlerdir. Araştırma gruplarının kullandıkları uyartım ortamları ve genotipler farklı oldukları için elde edilen sonuçları karşılaştırmakta zorlaşmaktadır. Ayrıca androgenik embriyoların bir kısmı gelişmeye devam etmeyerek kaybedilebilir. Bu tez çalışmasında androgenesise cevap veren üç OP havuç genotipinden % 82,22 ile % 188,70 arasında bitki eldesi sağlanmıştır.

Üretilen androgenik havuç bitkilerinin polidi sevipleri açısından değerlendirilmeleri en güvenilir yöntem flow sitometri analizidir. Bu tez çalışmasında içsel kontrol olarak *B. napus* çekirdek DNA'sının kullanılması ile haploid ve diploid bitkilerin tespiti çok hızlı bir şekilde yapılmıştır. Rastgele 100 bitkiden alınan çekirdek örnekleri ile yapılan analizde androgenik bitkilerin çoğunlukla (% 87) diploid oldukları bulunmuştur. Bu oran Kiszczak ve diğ. (2017) tarafından anter kültürü yolu ile elde edilen bitkilerin ploidi testinde elde edilen diploid oranı (% 89,1) ile benzerdir. Aynı araştırma grubunun yayınında mikrospor kültürü yolu ile elde edilen androgenik havuç bitkilerinde diploid olan bitkilerin oranının % 38,2 olduğu belirtilmiştir. Yayınlanmış çalışmalar farklı genotiplerden farklı yöntemlerle elde edilmiş olan androgenik bitkiler arasında diploidlerin oranlarında da farklılıklar olabileceğini göstermektedir (Andersen ve diğ. 1990; Hu ve diğ. 1993; Li ve diğ. 2013; Kiszczak ve diğ. 2017).

Havuç bitkisinin doku kültürü ortamından *in vivo*'ya aktarılması işlemi oldukça zordur. Androgenik havuç bitkileri farklı allel kombinasyonları için homozigot hale gelmişlerdir. Bu nedenle androgenik bitkilerin bazıları güçlü olarak büyüyebilirken bazıları da doku kültürü ortamı dışında hayatta kalmakta zorlanabilirler. Bu tez çalışmasında iki turuncu kök oluşturan donör genotipten üretilen androgenik bitkilerin büyük çoğunluğu aklimatize edilmiştir. DC Hatay yerli genotipinden üretilen androgenik bitkilerde ise yaklaşık % 15 kayıp meydana gelmiştir. Haploid havuçların aklimatizasyonunda başarı oldukça düşüktür. Andersen ve diğ. (1990) tarafından yayınlanan çalışmada androgenik bitkiler torf içeren saksılara aktarıldıktan sonra dört hafta yüksek nemde tutulmuşlardır. Buna rağmen aklimatizasyonu sırasında bitkilerin yaklaşık yarısının kaybedildiği belirtilmiştir. Tyukavin ve diğ. (1999) androgenik

havuç bitkilerini bir hidroponik sistem ile aklimatize etmeye çalışmış fakat bitkilerin yaklaşık % 85'i kaybedilmiştir. Gorecka ve diğ (2009) androgenik bitkileri torf temelli bir karışıma transfer ederek % 70'lik hayatta kalma yzdesi elde etmiştir. Li ve diğ. (2013) androgenik bitkileri transfer ettiği saksılarda perlit kullanarak %75'in üzerinde hayatta kalmalarını sağlamıştır. Bu tez çalışmasında aklimatizasyon sırasında bitki kaybını onlemek için torf ve perlit karışımı otoklavlandıktan sonra steril su ile ıslatılarak kullanılmıştır. Ayrıca dış ortama aktarılan bitkilerde aşırı su kaybı nedeni ile kurumunun onlenmesi için bitkiler sandviç poşeti ile kapatılmıştır. Bu sayede androgenik bitkilerin kaybı onemli oranda azaltılmıştır. Dış ortama aktarılan bitkilerin bzyk bir kısmı serada bzytvlmüştur.

Haploidizasyon tekniğinin ıslah programlarına entegre edilmesi ile homozigot hatların üretimi çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir. Havuç türünde klasik kendileme yöntemi ile en az altı generasyon kendileme yapılması yolu ile inbred hatlar oluşturulabilir. Kendileme yöntemi ile geliştirilen inbredlerde homozigotluk oranı % 98'i geçmez (Ferrie ve Möllers 2011). Tamamen homozigot bitkilerin üretilmesi için DH bitkilerin elde edilmesi gerekir. Her bir DH havuç bitkisi bir polenden üretilmektedir ve her polen rekombinant bir gamet olduğu için bu bireylerin genomlarında benzersizdir. Bu nedenle DH bitkiler arasında normal melezleme ve kendileme uygulamaları ile elde edilen inbredlerden farklıdırlar.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında farklı havuç genotiplerinden çok sayıda androjenik bitkinin üretilebileceği gösterilmiştir. Androgenesis teknolojisinin havuç ıslah çalışmalarına entegre edilmesinin en kısa yolu fertil DH bitkilerin F1 hibrit üretiminde baba (C) hat olarak kullanılmalarıdır. Tamamen homozigot olan DH polen donörleri ile yüksek heterosis özelliğine sahip F1 hibrit çeşitler üretmek mümkün olabilir. Diğer bir kullanım yolu ile yeni anne (A) hatlarının geliştirilmesidir. Havuçta yaygın olarak kullanılan anne hatları bir tip sitoplazmik erkek kısırlık (SMS) olan petaloid (erkek organ yerine petal yaprakların bulunması) özelliğine sahiptirler. Bu durumda öncelikle SMS özelliğinin idame ettiricisi olan (B) hatların ıslahının geliştirilmesi DH tekniği kısa bir süreye indirilebilir. Daha sonra DH B hatlarının CMS bir bitki ile melezlenmesi yolu ile A hatları üretilebilir. Bu tez çalışması ile geliştirilen DH havuç geliştirme protokolü havuç ıslah programlarına entegre edilerek yeni yerli havuç çeşitlerinin ıslahı çalışmaları hızlandırılabilir.

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 ve diğ. 2016). İyi karakterize edilmiş olan DH havuç hatları gen editörlüğü çalışmaları için mükemmel materyallerdir (Xu ve diğ. 2019).

6. KAYNAKLAR

Adamus, A. and Michalik, B., “Anther cultures of carrot (*Daucus carota* L.)”, *Folia Hort*, 15, 49–58, (2003).

Alan, A.R, Çelebi Toprak, F. and Kaska, A., “Production and evaluation of gynogenic leek (*Allium ampeloprasum* L.) plants”, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 125, 249–259, (2016).

Andersen, S.B., Christiansen, I. and Farestveit, B., “Carrot (*Daucus carota* L.). In vitro production of haploids and field trials.” In: Bajaj YPS, editor. Haploids in crop improvement I. Berlin: Springer; 1990. p. 393–402. (*Biotechnology in Agriculture and Forestry*; vol 12), (1990)

Arumuganathan, K. and Earle, E.D., “Nuclear DNA content of some important plant species by flow cytometry”, *Plant Mol Biol Report* 9, 208–218, (1991).

Arscott, S.A., Tanumihardjo, S.A. “Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 223-239, (2010).

Baranski, R., Allender, C. and Klimek-Chodacka, M., “Towards better tasting and more nutritious carrots: Carotenoid and sugar content variation in carrot genetic resources”, *Food Res Int.*, 47, 182–187, (2012).

Dunwell, J.M., “Haploids in flowering plants: origins and exploitation”, *Plant Biotechnol J.*, 8, 4, 377-424, (2010).

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2016)
<http://www.fao.org/faostat>

Ferrie, A.M.R. and Möllers, C., “Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research”, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 104, 375-386, (2011).

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K., “Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells”, *Exp. Cell Res.* 50, 151–158, (1968).

Górecka, K., Krzyżanowska, D., Kiszczak, W. and Kowalska, U., “Plant regeneration from carrot (*Daucus carota* L.) anther culture derived embryos”, *Acta Physiol Plant.*, 31, 6, 1139–1145, (2009)

Hu, K.L, Matsubara, S. and Murakami, K. “Haploid plant production by anther culture in carrot (*Daucus carota* L.)”, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 62, 3, 561–565, (1993).

Iorizzo, M., Senalik, D.A., Ellison, S.L., Shelby, Grzebelus, D., Cavagnaro, P.F., Allender, C., Brunet, J., Spooner, D.M., Van Deynze, A. and Simon, P.W. “Genetic structure and domestication of carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) (*Apiaceae*)”, *Am. J. Bot.*, 100, 930-938, (2013).

Iorizzo, M., Ellison, S., Senalik, D., Zeng, P., Satapoomin, P., Bowman, M., ve diğ., “A high-quality carrot genome assembly reveals new insights into carotenoid accumulation and Asterid genome evolution”, *Nat. Genet.*, 48: 657–666, (2016).

Iovene, M., Grzebelus, E., Carputo, D., Jiang, J. and Simon, P.W., “Major cytogenetic landmarks and karyotype analysis in *Daucus carota* and other *Apiaceae*”, *Am. J. Bot.* 95, 7, 793-804, (2008).

Keller, W.A. and Armstrong, K.C. “Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures”, *Can J Bot.*, 55,1383–1388, (1977).

Kielkowska, A., Adamus, A. and Baranski, R., “An improved protocol for carrot haploid and doubled haploid production using induced parthenogenesis and ovul excision *in vitro*”, *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 50, 376-383, (2014).

Kiszczak, W., Kowalska, U., Kapuscinska, A., Burian, M. And Gorecka, K., “Comparison of methods for obtaining doubled haploids of carrot”, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 86: 1-10, (2017).

Kiszczak, W., Gorecka, K., Krzyżanowska, D. and Kowalska, U., “Size of flower buds in carrot (*Daucus carota* L.) as an indicator of a stage of

microsporogenesis and its suitability for induction of androgenesis”, *Vegetable Crops Research Bulletin*, 62, 81-90, (2005).

Li, J.R., Zhuang, F.Y., Ou, C.G., Hu, H., Zhao, Z.W. and Mao, J.H., “Microspore embryogenesis and production of haploid and doubled haploid plants in carrot (*Daucus carota* L.)”, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 112, 275–287, (2013).

Mackevic, V.I., “The carrot of Afghanistan”, *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed.*, 20, 517-562, (1929).

Matsubara, S., Dohya, N., Murakami, K., Nishio, T. and Dore, C., “Callus formation and regeneration of adventitious embryos from carrot, fennel and mitsuba microspores by anther and isolated microspore cultures”, *Acta Hort.*, 39, 2, 129–137, (1995).

Nowicka, A., Grzebelus, E. and Grzebelus, D., “Fluorescent in situ hybridization with arbitrarily amplified DNA fragments differentiates carrot (*Daucus carota* L.) chromosomes”, *Genome*, 55, 3, 205-13, (2012).

Rubatzky, V.E., Quiros, C.F. and Simon, P.W., “Carrots and related vegetable Umbelliferae”, CABI, New York, (1999).

Schrader, O., Ahne, R. and Fuchs, J., “Karyotype analysis of *Daucus carota* L. using Giemsa C-banding and FISH of 5S and 18S25S rRNA specific genes”, *Caryologia*, 56, 149 – 154, (2003).

Simon, P.W., “Domestication, historical development, and modern breeding of carrot”, *Plant breed. Rev.*, 19, 157-190, (2000).

Simon, P.W., Freeman, R.E., Vieira, J.V., Boiteux, L.S., Biard, M., Nothnagel, T., Michalik, B. and Kwon, Y.S. “Carrot.” In: Prohens J., Nuez F. (eds) *Vegetables II. Handbook of Plant Breeding*, vol 2. Springer, New York, NY, (2008).

Simon, P.W., “Plant breeding for human nutritional quality”, *Plant Breed. Rev.*, 31, 325-392, (2009).

Stein, M. and Nothnagel, T., “Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.)”, *Plant Breed.*, 114, 1–11, (1995).

Steward, F.C., “Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretation of the growth from free cell to carrot plant”, *Am. J. Bot.*, 45, 709-713, (1958).

Tjukavin, G.B., “Osnovy biotekhnologii morkovi”, Moscow: VNISSOK, (2007).

Vogel, G., “How does a single somatic cell become a whole plant?”, *Science*, 309, 86, (2005).

Xu, Z.S., Feng, K. and Xiong, A.S., “CRISPR/Cas9-Mediated Multiply Targeted Mutagenesis in Orange and Purple Carrot Plants”, *Molecular Biotechnology* 61, 3, 191-199, (2019).

Zagorodskikh, P., “New data on the origin and taxonomy of cultivated carrot”, *Comptes Rendus (Doklady) Academy of Sciences. USSR* 25: 522-525, (1939).

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Alireza LACHIN

Doğum Yeri ve Tarihi : HAMEDAN-İRAN/18.10.1983

Lisans Üniversitesi : Bu-Ali Sina Üniversitesi

Elektronik posta : ar.lachin@gmail.com

İletişim Adresi : Zeytinköy mah. Yunus Emre cad. No:54
İç Kapı No:8 PAMUKKALE/DENİZLİ

Yayın Listesi :

Kitap Bölümü

Alan, A.R.^{1,2*}, Celebi-Toprak, F.^{1,2}, Lachin A.R.^{1,2}, Yıldız D.¹, Gozen, V.³ and Besirli, G.⁴ Doubled haploid broccoli (*Brassica olearacea* var. *italica*) plants from anther culture. In: Simarro, J.M.S. (ed) Doubled Haploid Technology: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology Springer, New York, NY, (2020) (Kabul edildi).