

**HAVUÇTA ANTER KÜLTÜRÜNDE GELİŞEN HAPLOİT
BİTKİLERİN SSR MARKÖRLERLE BELİRLENMESİ**

Özge ÇAVUŞOĞLU



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HAVUÇTA ANTER KÜLTÜRÜNDE GELİŞEN HAPLOİT BİTKİLERİN SSR
MARKÖRLERLE BELİRLENMESİ**

Özge ÇAVUŞOĞLU
0000-0003-2320-8587

Prof. Dr. Meryem İPEK
0000-0002-0609-3442
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Özge ÇAVUŞOĞLU tarafından hazırlanan “HAVUÇTA ANTER KÜLTÜRÜNDE GELİŞEN HAPLOİT BİTKİLERİN SSR MARKÖRLERLE BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Meryem İPEK

Başkan : Prof. Dr. Meryem İPEK İmza
000-0002-0609-3442
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Cevriye Mert İmza
0000-00003-3092-5023
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Müge KESİCİ İmza
0000-0001-9533-0800
Bahçeşehir Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü
19/01/2023

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

19/01/2023

Özge ÇAVUŞOĞLU

TEZ YAYINLANMA
FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Danışman Adı-Soyadı
Tarih

Öğrencinin Adı-Soyadı
Tarih

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans

HAVUÇTA ANTER KÜLTÜRÜNDE GELİŞEN HAPLOİT BİTKİLERİN SSR MARKÖRLERLE BELİRLENMESİ

Özge ÇAVUŞOĞLU

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Meryem İPEK

Havuç (*Daucus carota* L.) besin içeriği bakımından zengin ve ekonomik olarak önemli sebze türlerinden biridir. Havuç üretiminde yaygın olarak hibrit çeşitler kullanılmaktadır. Bu nedenle hibrit çeşitlerin elde edilmesinde kullanılan saf hatların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Havuçta anter kültürü yoluyla saf hatlar kısa süre içerisinde elde edilebilmektedir. Anter kültürü çalışmasında erken aşamada haploit (homozigot) olduğu bilinen bitkiciklerin seçilmesi zaman ve maliyet açısından önemlidir. Moleküler markörlerden biri olan basit dizi tekrarları (SSR) markörleri ile bitkilerde homozigot (aday haploit) genotipler rejenerasyon aşamasında belirlenebilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, turuncu ve Hatay siyahı tipi havuç genotiplerinden anter kültürü yoluyla bitkilerin geliştirilmesi ve daha önceden havuç genomunda ifade olan DNA bölgelerinden geliştirilmiş SSR markörleri kullanılarak anter kültürü ile elde edilen bitkilerden aday haploit veya katlanmış haploit bitkilerin daha ekonomik ve kolay bir şekilde seçilmesidir. Çalışmada turuncu havuç tipinde anter gelişimi gözlenememiştir. Hatay siyahı havuç genotipinde ise 2500 anterden 16 anter kallus oluşturmuş ve gelişim göstermiştir. Rejenerasyon aşamasında anter kültüründen gelişen 10 genotip 8 SSR markörüyle analiz edilmiştir. Çalışmada Hatay siyahı genotiplerinde 7 SSR markörü monomorfik profil gösterirken bir SSR markörü polimorfik bir bant profili göstermiştir. Polimorfik profil gösteren GSSR24 markörü ile analiz edilen 10 genotipten 6 genotipin homozigot yapıda olduğu ve 4 genotipin ise heterozigot (diploit) olduğu tespit edilmiştir. Dış ortama adapte olmuş 3 genotipin SSR ve flow sitometri sonuçları karşılaştırıldığında bu genotiplerden ikisinin spontane katlanmış haploit ve bir tanesinin triploit olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları havuçta anter kültüründe haploit veya katlanmış haploit bitkilerin daha kolay ve hızlı bir şekilde bitki rejenerasyonunun erken aşamasında seçilmesi konusunda diğer araştırmacılara ve ıslahçılara katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Anter kültürü, *Daucus carota* L., Flow sitometri, Haploit, SSR markörler

2023, vii + 49 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF HAPLOID PLANTS DEVELOPED IN ANTHER CULTURE IN CARROT WITH SSR MARKERS

Özge ÇAVUŞOĞLU

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticultural

Supervisor: Prof. Dr. Meryem İPEK

Carrot (*Daucus carota* L.) is one of the economically important vegetable species rich in nutritional content. Hybrid varieties are widely used in carrot production. Thus it is of huge importance to develop pure lines used to obtain hybrid varieties. Pure lines could be obtained in a short time through anther culture in carrots. Selection of plants known to be haploid at an early stage in anther culture studies is important in terms of time and cost. Homozygous genotypes in carrots could be determined at early stage of the regeneration with the simple sequence repeat (SSR) markers, which is one of the molecular markers. The aim of this thesis is was to develop plants from orange and Hatay black carrot genotypes by anther culture and to select candidate haploid or doubled haploid plants from plants obtained by anther culture using SSR markers previously developed from expressed DNA regions of the carrot genome. Anther development was not observed in the orange carrot type in this study. In the Hatay black carrot genotype, 16 anthers out of from 2500 anthers planted formed callus. In the regeneration stage, 10 genotypes developed from anther culture were analyzed via 8 SSR markers. In the study, 7 SSR markers showed a monomorphic profile in Hatay black genotypes, while one SSR marker showed a polymorphic band profile. It was determined that 6 genotypes were homozygous and 4 genotypes were heterozygous (diploid) out of 10 genotypes analyzed with the GSSR 24 marker showing a polymorphic profile. According to the SSR and flow cytometry analysis results of 3 genotypes adapted to the external environment, two of these genotypes were found to be spontaneous doubled haploid and one was triploid. The results of this study will contribute to other researchers and breeders in selecting haploid or doubled haploid plants in carrot anther culture more easily and quickly in the early stage of plant regeneration.

Keywords: Anther culture, *Daucus carota* L., Flow cytometry, Haploid, SSR markers

2023, vii + 49pages.

TEŐEKKÖR

Bu tez çalışmamın tđm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak başarılı sonuçlar elde etmeme ve gelişimime çok bđyđk katkıları olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Meryem İPEK'e sonsuz teőekkđrlerimi ve řđkranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardımını esirgemeyen, her zaman bilgi ve deneyimlerini paylaşarak başarılı sonuçlar elde etmeme yardımcı olan saygı değer hocam Prof. Dr. Ahmet İPEK'e sonsuz teőekkđrlerimi sunarım.

Tarla ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Zahide Deniz ALTINŐEKER ACUN'a, Osman Yaşar USLU, Özge BIÇAKÇI ve Fadime ŐZTÖRK'e sonsuz teőekkđrlerimi sunarım.

Őđrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini bir an olsun benden esirgemeyen ve varlıklarıyla her zaman yanımda olduklarını bildiğim, başarımda en bđyđk pay sahibi olan değerli ailem annem Canan AVUŐOđLU, babam Nejdet AVUŐOđLU, kardeşim Erman AVUŐOđLU'na saygılarımı, en içten sevgilerimi sunarım ve çok teőekkđr ederim.

Özge AVUŐOđLU
19/01/2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	10
2.1. Kuramsal Temeller.....	10
2.2. Kaynak Araştırması.....	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal	19
3.2. Uygun Aşamaya Gelen Çiçek Tomurcuklarının Belirlenmesi.....	19
3.3. Kullanılan Malzemelerin Strelizasyonu	20
3.4. Çalışmada Kullanılan Bitki Besin Ortamı.....	20
3.5. Çiçek Tomurcuklarının Sterilizasyonu	21
3.6. Anterlerin Besin Ortamına Ekilmesi	21
3.7. Gelişim Gösteren Anterlerin Rejenerasyon Ortamına Aktarılması	22
3.8. Bitkilerin Vermikülit Ortamında Köklendirilmesi.....	23
3.9 Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılması.....	24
3.10. SSR Moleküler Markörlerle Haploid/Katlanmış Haploid (Homozigot) ve Diploid (Heterozigot) Bitkilerin Belirlenmesi	24
3.10.1. Örnekleme ve DNA izolasyonu	24
3.10.2. Çalışmada kullanılan SSR primerleri.....	26
3.10.3. PCR reaksiyon koşulları.....	27
3.10.4. Poliakrilamid jel elektroforezinde PCR ürünlerinin görüntülenmesi.....	28
3.11. Flow Sitometri ile ploidi seviyesinin belirlenmesi	28
4. BULGULAR	30
4.1. Uygun Mikrospor Aşamasının Belirlenmesi.....	30
4.2. Anter Kültürü Bulguları	30
4.3. SSR Markörler Kullanılarak Haploid Bitkilerin Seçilmesi.....	32
4.4. Flow Sitometri Ölçüm Sonuçları	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

%	Yüzde oranı
°C	Santigrat derece
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
kg	Kilogram
g	Gram
µg	Mikrogram
cm	Santimetre
mm	Milimetre
dk	Dakika
sn	Saniye

Kısaltmalar

Açıklama

AAT	Aspartat aminotransferaz
APS	Amonyumpersülfat
AgNO ₃	Gümüş nitrat
BAP	6-benzilaminopurin
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DH	Çift haploit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
SM	Boyut belirteci (markör)
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSR	Basit Dizi Tekrarları
Taq	Thermus Aquaticus
TEMED	Tetrametil-Etilendiamin
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
NAA	α-Naftalen Asetik Asit
2,4D	2-4 Diklorofenoksi Asetik Asit
PGI	Fosfoglukoz izomeraz
MS	Murashige ve Skoog

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1.	Havuç genotiplerinin çiçek görünümü A) Turuncu ve B) Hatay siyahı tipi havuç genotiplerinin çiçek görünümleri... 19
Şekil 3.2.	Anterlerin asetokarmin ile boyanması A) Lam üzerine konulan anterler B) Anterlerin üzerine asetokarmin damlatılması C) Anterlerin asetokarmin boyası ile ezilmesi 20
Şekil 3.3.	Steril kabinin görünümü 20
Şekil 3.4.	Çiçek tomurcuklarının sterilizasyonu. A) Tomurcukların çeşme suyu ile yıkanması B) Tomurcukların sterilizasyonu 21
Şekil 3.5.	Tomurcuk boyutunun belirlenmesi. A) Uygun tomurcuk boyunun belirlenmesi, B) Mikroskop altında tomurcuktan anterin ayrılması C) Anterin görünümü..... 22
Şekil 3.6.	Petri kabına ekim yapılmış anterler 22
Şekil 3.7.	Gelişim gösteren anter A) Embriyo gelişimi gösteren anter B) Rejenerasyon ortamında büyüyen bitkicik 23
Şekil 3.8.	Vermikülit ortamında büyütülen havuç bitkisi 23
Şekil 3.9.	Bitkilerin dış ortama alıştırılması A) Torf-perlit karışumlu saksıya dikilmesi B) Bitkinin araziye dikimi 24
Şekil 3.10.	Anter kültüründen elde edilen bitkilerden alınan yaprak örneklerinin liyofilizatörde kurutulması..... 25
Şekil 3.11.	PCR ürünlerinin %6'lık poliakrilamid jele yüklenmesi 29
Şekil 3.12.	Flow Sitometri cihazı ile ölçümü yapılan anterden gelişmiş havuç bitkilerinin görünümü 29
Şekil 4.1.	Havuç mikrosporunun tek çekirdekli görünümü 30
Şekil 4.2.	Anter kültürü ile androgenik havuç bitkiciklerinin oluşumu A) Besin ortamında gelişim gösteren bir anter B) Anterden kallus ve bitki gelişimi..... 31
Şekil 4.3.	Gelişim gösteren bitkiciklerin rejenerasyon ortamına aktarılması A) Kallustan kotiledon yaprağı oluşturan bitkicikler B) Rejenerasyon ortamına aktarılmış bitkicik.... 31
Şekil 4.4.	Vermikülit ortamında köklenmiş havuç bitkiciği 32
Şekil 4.5.	Onbeş havuç bitkisinde SSR markörü ile yapılan PCR reaksiyonlarının agaroz jel görüntüsü S.M.100 bp DNA ladder (Thermofisher) 33
Şekil 4.6.	Kontrol bitkilerinde polimorfik profil ve anter kültüründen gelişen bitkiciklerde monomorfik bant profili S. M. 50-350 bp DNA ladder (Li-Cor) 33
Şekil 4.7.	Kontrol grubu ve anter kültüründen gelişen bitkiciklerde polimorfik bant profili S. M. 50-350 bp DNA ladder (Li-Cor) 34
Şekil 4.8.	Flow sitometri ölçüm grafiği. Diploit (Kontrol) Triploit (9) Diploit (11) Diploit (12)..... 36

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Dünya çapında havuç üretiminin 2010 ve 2020 yıllarında değişimi (FAO, 2020)	2
Çizelge 1.2. Havuç kökünün besin maddesi içerikleri (Çıtak, 2014).....	4
Çizelge 2.1. Bazı moleküler markörlerin temel özellikleri (Ben-Ari ve Lavi, 2012).....	11
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan SSR primerleri (Cavagnaro ve diğerleri, 2011).....	27
Çizelge 3.2. PCR reaksiyon ürünleri.....	27
Çizelge 3.3. PCR döngüsü.....	28
Çizelge 4.1. Flow sitometri ölçüm sonuçları.....	35

1.GİRİŞ

Havuç (*Daucus carota* var. *sativus*) Apiaceae familyasında yer almaktadır ve diploid ($2n=18$) bir genoma sahiptir. Havuç tohumla üretilen iki yıllık bir sebze türüdür (Tülek ve Dolar, 2011). Havuç bitkisi birinci yılda, çevre şartları ve genotip yapısına bağlı olarak 60-150 gün arasında vejetatif organlarını oluştururken, ikinci yılda ise generatif organlarını oluşturur (Sarcan, 2018).

Şemsiye (umbel) çiçek yapısına sahip olan havuçta çiçeklenme en üsteki ana şemsiyeden başlamaktadır. Havuç çiçekleri genellikle erselik yapıdadır. Bununla birlikte, bir bitki üzerinde sadece dişi ya da erkek organlı çiçekler de oluşabilmektedir. Havuç çiçeklerinde erkek organların dişi organlardan önce oluşmasına karşın bir bitkinin farklı zamanlarında olgunlaşan çiçekleri birbirlerini tozlayabilmektedir (Cebeci ve Hanci, 2017). Ağırlıklı olarak havuç tropikal ve yarı tropikal bölgelerde kültüre alınmıştır. Avrupa ve Asya'nın büyük bir bölümünde yabani formdadır. Çeşitliliğin birincil merkezi olarak ilk kez Afganistan'da kültüre alınmıştır. Buradan Avrupa, Akdeniz ve Asya'ya yayılmış ve çeşitliliğin ikincil merkezinin Türkiye olduğu kabul edilmiştir (Stolarczyk ve Janick, 2011).

Havucun yabani türünün kökleri acı ve küçük iken, doğadan insanların yıllarca kültüre alması ve ıslah edilmesiyle birlikte renk, şekil ve boyut yönünden çok farklı havuç tipleri oluşmuştur. Kültüre alınan havucun (*Daucus carota* var. *sativus*) Asya'da hızla yayılan üretimiyle birlikte havuç dünyada önemli bir yere sahip olmuştur (Stolarczyk ve Janick, 2011).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)' nun 2010 ve 2020 tarihli verilerinde dünyadaki havuç üretimine ait rakamsal bilgiler turpların üretim değerleri ile birlikte Çizelge 1.1'de sunulmuştur (FAO, 2020). Bu değerlere göre dünyada havuç ve turp üretimi son 10 yılda yaklaşık altı milyon ton artmıştır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'in değerlerine ülkemizde göre havuç üretimi 2020 yılında 109 890 dekar alanda 588 778 ton olarak gerçekleşmiştir. 2020 yılında havuç üretimin en fazla yapıldığı iller ise sırasıyla Konya (337 820 ton), Ankara (154 944 ton) ve Hatay (68 933 ton)' dır (TÜİK, 2020).

Çizelge 1.1. Dünya çapında havuç ve turp üretiminin 2010 ve 2020 yıllarındaki değişimi (FAO, 2020)

	2010 Alan (ha×10 ³)	2010 Verim (ton×ha ¹)	2010 Üretim (ton×10 ³)	2020 Alan (ha×10 ³)	2020 Verim (ton×ha ¹)	2020 Üretim (ton×10 ³)
Dünya	1 168	299	34 961	1 125	363	40 951
Asya	672	321	21 599	646	404	26 126
Amerika	116	293	3 428	111	344	3 836
Avrupa	272	298	8 134	224	366	8 237
Afrika	99	146	1 464	136	175	2 400
Üretimde Öncü Ülkeler						
Çin	449	348	15 662	399	453	18 146
Özbekistan	24	532	1 310	36	778	2 876
ABD	31	421	1 341	28	560	1 582
Türkiye	11	474	534	9	600	591

Pigment içeriklerine göre kültür havuçları, doğu (antosiyenin içeren) ve batı (karoten içeren) havuçları şeklinde iki ana gruba ayrılmaktadır. Doğu havucunun kökleri dallı, sarı, kırmızımsı-mor ila mor-siyah, nadiren sarımsı-turuncu renginde; yaprakları hafif parçalı, grimsi yeşil, tüylüdür ve birinci yıl çiçek açar. Genellikle doğu havucun, Himalaya ve Hindukuş dağlarının birleştiği bölge olan Afganistan'dan geldiği ve Afganistan ile Rusya, İran, Hindistan, Pakistan ve Anadolu'nun komşu bölgelerinde kültüre alındığı varsayılmaktadır (Yıldız, 2009). Batı havucunun ise kökleri dalsız, sarı, turuncu veya kırmızı, bazen beyazdır; yaprakları çok parçalı, parlak yeşil, seyrek tüylüdür ve normalde iki yılda bir, ancak tropikal bölgelerde genellikle ilk yıl çiçek açar (Kamiloğlu ve diğerleri, 2018). Batı havuç muhtemelen Avrupa'da veya batı Akdeniz bölgesinde sarı havuç popülasyonları içinde kademeli seçim yoluyla ortaya çıkmıştır. Hollanda yerel havuçları olan 'Long Orange' ve daha ince olan 'Horn' tipleri, şu anda tüm dünyada yetiştirilen turuncu havuç çeşitlerinin temelini oluşturmuştur (Yıldız, 2009).

Sebzelerdeki vitaminler, beden gelişiminde özel yapılara sahip oldukları için, beslenme ve sağlık açısından değerlidirler. Sebzeler içerdikleri vitaminler, mineraller ve antioksidan kapasitelerinin yüksek olması nedeniyle yaygınlaşarak günlük diyetlerin vazgeçilmez bir parçası olmuştur (Bulantekin ve diğerleri, 2020). Havuç, kökü yenilen sebzelerden biri olarak yaygın kullanıma sahip bir serin iklim sebze türüdür. Zengin besin bileşenlerine sahip havucun tüketimi, üretim miktarı ve alanı gün geçtikçe artmaktadır (Kiraci ve Padem, 2015).

A Vitamini göz sağlığı, hücre yapısı, isleket gelişimi, üreme ve bağışıklık için önemli bir besindir. Ayrıca A vitamini antioksidan özelliklere sahiptir. (Bulantekin ve diğerleri, 2020). Havuç, özellikle A vitaminin öncül maddesi olan β -karoten bakımından oldukça zengindir, ayrıca B1, B2 vitaminlerince de zengindir. Günlük alınması gereken A vitamini değeri yaklaşık olarak 5 000 uluslararası ünit ($0,6 \mu\text{g } \beta\text{-karoten}$)'dir. Dolayısıyla renkli sebzelerin günlük tüketimiyle birlikte hem beden sağlığı, hem de bağışıklık gelişimi sağlanmakta ve kalp-damar hastalıkları, farklı kanser türleri, göz hastalıkları, gibi hastalıklardan korunmak mümkün olmaktadır (Kasim ve Kasim, 2019). β -karotenden A vitamini dönüşümü diğer karotenoidlere kıyasla daha hızlıdır ve havuçlar toplam A vitamini ihtiyacının %14 ile %17'sine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Havucun sağlığa ve beslenmeye olan faydaları göz önüne alındığında, ticarileşmesi ve farklı ürünler halinde sanayileşmesi, özellikle ucuz bir A vitamini kaynağı olarak insanların besin ihtiyaçlarını karşılamada oldukça önemlidir (Haq ve Prasad, 2015). Havuç kökünün besin maddesi içerikleri Çizelge 1.2'de gösterilmiştir (Çıtak, 2014).

Havuç, 22 popüler sebze arasında kişi başına tüketimde altıncı sırada yer almaktadır. Minimal işlenmiş sebzelerden olan havuç artan kullanımıyla birlikte giderek daha fazla tüketilmektedir (Zhang ve Hamauzu, 2004). Havuç, sebze olarak (taze, konserve ve susuz) salatalarda, meyve sularında, çorbalarda, turşularda ve tatlılarda yer alır. Havuç posası ekmek, kek, sos ve fonksiyonel içeceklerde kullanılabilir. Havucun meyve suları ve bebek mamalarının içeriğinde temel bir bileşen olarak kullanımı dünya çapında artmaktadır. Havuç, yüksek karotenoid içeriği ve uçucu aroma bileşikleri sayesinde besin değeri, sağlık yararları ve tadı açısından dünyanın önde gelen bahçe bitkilerinden biri olarak kabul edilmektedir (Çümen ve Bostancı, 2021).

Çizelge 1.2. Havuç kökünün besin maddesi içerikleri (Çıtak, 2014)

Besin İçeriği	g/100 g taze ağırlık
Protein	0,93
Karbonhidrat	9,58
Toplam şeker	4,74
Sukroz	3,59
Glikoz	0,59
Fruktoz	0,55
Mineral içeriği	mg/100 g taze ağırlık
Ca	33
Fe	0,3
Mg	12
P	35
K	320
Na	69
Zn	0,24
Cu	0,05
Mn	0,14
Vitamin içeriği	mg/100 g taze ağırlık
C vitamini	5,9
Thiamin	0,07
Riboflavin	0,06
Niasin	0,93
B-6 vitamini	0,14
Beta karoten	8285
Beta alpha	3477
Vitamin içeriği	µg/100 g taze ağırlık
Lutein + zeaxanthin	256
E vitamini	0,66
K vitamini	13,2

Havuç, ticari olarak en önemli sebzelerden biridir ve bu nedenle yeni çeşitler elde etmeyi amaçlayan yoğun araştırmaların konusu haline gelmiştir. 1970 yılından itibaren havuç ıslahında heterosis temelli yöntem hâkim olmuştur. Erkek-steril bitkiler dışı hat olarak kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen melez çeşitler yüksek düzeyde üniformdur. Ancak hibrit çeşitleri elde etmek için ebeveyn hatları elde etme süreci zaman alıcı ve pahalıdır. Havuç çiçekleri kontrol edilemeyecek kadar küçük olduğundan, havuçta melezleme yoluyla yeni çeşitlerin geliştirilmesi zordur (Hu ve diğerleri, 1993).

Havuç yaygın olarak hibrit çeşitler kullanılarak üretilmektedir. Ancak ticari olarak yaygın kullanıma sahip yerli hibrit havuç çeşitleri ülkemizde henüz geliştirilmemiştir. (Duran, 2019). Hibrit çeşitler üstün özelliklere sahip iki saf hattın melezlenmesiyle oluşan bir F₁ ürünüdürler. Ancak F₁ çeşitleri bir sonraki nesilde (F₂) genetik açılımlar gösterdiklerinden dolayı üstün özelliklerini koruyamazlar. Bu sebeple üreticiler her yıl hibrit (F₁) tohumluk satın almak zorundadır (Baydar, 2016). Yabancı hibrit tohumluğun fiyatları yerli hibrit tohumluklara göre daha yüksektir. Bu da üreticilerin üretim maliyetlerini daha da artırmaktadır. Bu nedenle havuçta yerli hibrit çeşitlerin geliştirilmesi ülkemiz için büyük öneme sahiptir.

Böceklerle tozlanan havuçta kendileme depresyonu sıklıkla görülür. Ayrıca tohumdan gelişen bir bitkiden tekrar tohum elde edilmesi iki yıl sürer. Bu nedenlerle havuçta hibrit çeşitler için kendileme ile saf hatların geliştirilmesi en az 11 yıl sürmektedir. Dolayısıyla hibrit çeşitleri elde etmek için homozigot hatları elde etme süreci zahmetli ve zaman alıcıdır. Ayrıca klasik yöntemlerle elde edilen hatlar %100 homozigot değildir. Ancak anter veya mikrospor kültürleri kullanılarak tamamen homozigot hatlar çok daha kısa sürede elde edilebilir (Górecka ve diğerleri, 2009).

Anter kültürü, ovaryum kültürü, mikrospor kültürü gibi bitki doku kültürü teknikleri, esas olarak bir üretim tekniğidir. Bitki doku kültürü teknikleri, bitkinin farklı bölgelerinden (apikal, meristem, kök, yaprak, gövde ve gametik organları, meristematik veya kallus hücreleri) alınan küçük bir dokunun laboratuvar koşullarında sterilizasyonundan sonra, bitki besin elementlerini bulandıran steril besin ortamında (*in vitro*) ve uygun ışık, rutubet ve sıcaklık koşullarında büyütülmesi işlemidir (Dinçer ve diğerleri, 2016; Çıtak, 2014).

Doğada, erkek üreme hücreleri polen tanelerine dönüşür, ancak çeşitli uyaranlar altında sporofit gelişim yollarını değiştirebilir ve haploit bir bitkiye dönüşebilen bir embriyo oluşturabilir. Androenez, anter kültürlerinde veya izole edilmiş mikrospor kültürlerinde uyarılabilir (Kiszczak ve diğerleri, 2015). Kendileme ile saf hatların elde edilmesine alternatif olarak, anter kültüründe haploit bitkilerin üretiminin uyarılmasıyla tam homozigot bitkiler elde edilebilir (Kiełkowska ve diğerleri, 2018). Ancak çiçek tomurcuklarının ve anterlerin küçük boyutları nedeniyle, havuçta anter kültürü tekniğinin

çalışılması zordur. (Kiszczak ve diğeri, 2018). Bununla birlikte, günümüzde anter kültürü ile haploit bitkilerin üretimi birçok bitki türünde kullanılmaktadır. Anter kültürünün diğeri haploit kültürü yöntemlerine göre avantajı, bir anter içerisinde binlerce mikrospor bulunmasından dolayı uygun koşullarda kültüre alındığında, bir anterden çok sayıda haploit bitki gelişebilmesidir (Ercan, 1997).

Anter kültürüyle yeni çeşit geliştirme birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Anter kültüründe en önemli etmenlerden biri tomurcukların alındıkları zaman, içerisinde buldukları gelişme dönemidir (Dinçer ve diğeri, 2016). Anter kültüründe androgenezin etkinliğini etkileyen diğeri faktörler ise: genotip, besiyerinin bileşimi, anter kültürü prosedürü, donör bitkilerin büyüme koşulları (sıcaklık ve ışık), donör bitkilerin çiçeklenme aşaması, mikrosporogenez aşaması ve ısı şoku uygulamalarıdır. Andersen ve diğeri (1990), homozigot havuç hatları elde etmek için anter kültürü uygulamasına yönelik araştırmalar yürütmüştür. Anter kültüründe androgeniz etkinliği üzerine genotip, mikrosporogenez aşaması, besiyeri kompozisyonu ve anter kültürü prosedürünün etkisini araştırmışlar ve bu süreç üzerinde en güçlü etkiyi genotipin uyguladığını belirtmişlerdir. Dolayısıyla, anter kültürünün her çeşitte, hatta her bitkide optimize edilmesi gerekmektedir (Górecka ve diğeri, 2005).

Haploit bitkiler, genom haritalama, genetik analiz, mutasyonlar, transformasyon, somatik hibridizasyon, biyokimyasal ve fizyolojik analizleri içeren çeşitli çalışmalarda ve tohum üretiminde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, çoğu zaman, bitki üretiminde katlanmış haploitler (DH) kullanılır. Anter kültürlerinde veya izole edilmiş mikrospor kültürlerinde *in vitro* androgeniz yoluyla elde edilen bitki materyallerinden dünya çapında 280'den fazla çeşidin elde edildiği tahmin edilmektedir. En fazla çalışma, kolza, arpa ve pirinç türlerinde gerçekleştirilmiştir (Kiszczak ve diğeri, 2018). DH hatların ıslah çalışmalarında kullanılması, homozigot ebeveyn bileşenlerinin ıslah süresini önemli ölçüde kısaltmaktadır. Klasik ıslah yöntemleriyle homozigot hatlar elde etmek için en az altı nesil boyunca kendileme yapmak gerekir ve bu hatların homozigotluğu %98'i geçmemektedir (Kiszczak ve diğeri, 2017).

Islahta haploidi ve marker destekli seçim (MAS) gibi gelişmiş tekniklerin kullanılması, bitkilere önemli özellikleri aktarma etkinliğini artırmaktadır. Nitekim haploit bitkilerde

her bir genin tek bir alleli olacağından baskın ve çekinik özellikler kolayca belirlenebilmektedir. Ayrıca haploidi ve DH teknolojisi ıslahçıların mevcut ebeveyn hattını tek bir yıl içinde istenen özelliklerle iyileştirmesine ve stabilize etmesine olanak tanır ve geleneksel ıslah yoluyla yeni çeşit geliştirme için gereken süreyi beş yıla kadar azaltabilir. Islah verimliliği, hem baskın hem de çekinik genlerin homozigot düzeyini ifade eden DH popülasyonların kullanımıyla önemli ölçüde artar, bu da özellikle çekinik genler ve çoklu minör etki genler (QTL'ler) tarafından kontrol edilen özelliklerin seçimini etkili kılmaktadır (Kaushal ve diğerleri, 2014). Diploit (2n) bir bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip bitkiler, haploit (n) bitkiler. Haploit bitkiler n sayıda kromozoma sahip olduklarından diploitlere (2n) göre cılız yapılı olup, erkek ve dişi organları diploitlere göre küçüktür. Ayrıca haploit bitkiler n kromozom sayısında olduklarından çiçeklerinde polen oluşmaz ve bu nedenle tohum oluşumu gözlemlenmez. Haploit bitkilerin kromozom sayılarının katlanmasıyla %100 homozigot hatlar elde edilebilmekte, hibrit çeşit ıslahı çalışmalarında zaman ve maliyet açısından önemli kazançlar sağlanmaktadır (Soydemir ve diğerleri, 2021).

Haploitler bir gametofitik kromozom sayısına sahip bitkilerdir. Katlanmış haploit bitkiler ise, kromozomun kopyalanması ile kromozom sayısı iki katına çıkmış haploit bitkilerdir. Gametik embriyogenez yoluyla haploit ve DH üretimiyle heterozigot ebeveynlerden tam homozigot hatların geliştirmesi sağlanmaktadır. Haploidi teknolojisi ile homozigot bitkiler üretmek için protokollerin geliştirilmesi, tarımsal sistemler üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Günümüzde bu teknolojiler, tarımsal açıdan önemli birçok ürünün ıslah programlarının ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır (Germanà, 2011).

Katlanmış haploit teknolojisinde rejenere olan bitkilerde kromozomları katlamak amacıyla yaygın olarak “kolhisin” kimyasalı kullanılmaktadır. Kolhisin bitki hücresinde mitoz bölünmenin metafaz aşamasında iğ ipliklerin sentezini önleyerek replike olmuş kromozomların kutuplara çekilmesini engellemekte ve hücrede kromozom sayısının iki katına çıkmasına neden olmaktadır (Ellialtıoğlu ve diğerleri, 2006).

Haploit teknolojisinde rejenere olan bitkilerdeki ploidi seviyesi fenotipik gözlemler, kromozom sayımı, stomal incelemeler ve flow sitometri cihazıyla belirlenebilmektedir. Flow sitometri ile ploidi seviyesini belirleme, göreceli florans yoğunluğunu analiz

ederek bir örneğin çekirdek DNA içeriğinin çekirdek DNA içeriği bilinen bir standard ile kıyaslanarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Şahin, 2019). Bu yöntemlerden bazılarının uygulanabilirliği bitki türüne göre değişmektedir. Örneğin kromozom sayımı, kromozomları ışık mikroskobu altında rahatlıkla görülebilen türler için çok uygun iken havuç gibi kromozomları çok küçük olan türlerde kullanılamayan, pratik ve hızlı olmayan bir yöntemdir. Flow stometri ışık mikrobuna göre nispeten daha hızlı ve pratik bir yöntemdir ve tüm bitki türlerinde kullanılabilir. Ancak diğer yöntemlere göre maliyeti oldukça yüksektir. Ayrıca yukarıdaki yöntemler bitkiler rejenere olduktan sonra veya tam olgunluk aşamasında uygulanabilmektedir. Bu durum zaman kaybı, maliyet artışı ve etkin bir seleksiyon yapılamaması gibi dezavantajları ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenlerle son yıllarda haploit veya DH bitkilerin daha etkin, pratik ve hızlı bir şekilde belirlenmesine olanak sağlayan eş-baskın DNA moleküler markörler kullanılmaktadır. Keleş ve diğerleri (2015) biber çeşitlerinde yaptıkları çalışmada SSR markörleri kullanarak haploit veya DH (homozigot) bitkilerin diploit (heterozigot) bitkilerden etkin bir şekilde ayırt edilebileceğini göstermişlerdir. Flow sitometri yolu ile bitkilerin ploidi seviyesinin belirlenebildiğini ancak bitkilerin diploit mi yoksa DH mi olduğunu belirlemek için SSR markör gibi eşbaskın markörlerle analiz yapılmasına ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında da SSR markörlerin havuçta anter kültürünün erken gelişim aşamasında haploit veya DH (homozigot bant profili gösteren) bitkilerin seçiminde uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Anter kültürü yoluyla haploit bitkilerin üretilmesi, hibrit tohum üretiminde saf hatların oluşturulması için büyük önem taşımaktadır. Havuç bitkisinde kendileme yoluyla %100 saf hatların oluşturulması mümkün olmadığından anter kültürü tekniğinin kullanılması ve kullanılan protokollerin optimize edilmesi gerekmektedir. *In vitro* koşullar altında anterlerin büyütülmesi birçok faktör tarafından etkilendiği için laboratuvar koşullarında ve sonrasında uygulanan tüm teknikler anter kültüründe başarı için önemlidir. Ülkemiz sebzeçilik ıslahı açısından bu tekniğin havuç bitkisinde geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar bu tekniğin geliştirilmesinin ıslah çalışmaları açısından büyük önem taşıdığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, turuncu ve Hatay siyahı havuç genotiplerinden anter kültürü yoluyla bitkilerin geliştirilmesi ve daha önceden havuç genomunda ifade olan (mRNA)

DNA bölgelerinden geliştirilmiş SSR markörleri kullanarak anter kültürü ile elde edilen bitkilerden aday haploit veya DH (homozigot) bitkilerin daha ekonomik ve kolay bir şekilde seçilmesidir. Havuçta SSR moleküler markörleri kullanılarak anter kültüründe rejenere olmuş olası haploit bitkilerin belirlenmesi konusunda yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışması sonuçları havuçta anter kültüründe haploit bitkilerin daha kolay ve hızlı bir şekilde seçilmesi konusunda diğer araştırmacılara ve ıslahçılara katkı sağlayacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kuramsal Temeller

Bitki ıslah programlarında genetik varyasyonların oluşturulması, yeni çeşitlerin geliştirilmesi için en önemli ve temel adımlardan biridir. Klasik bitki ıslahında söz konusu genetik varyasyonlar içerisinde arzu edilen karakterler bakımından üstün genotiplerin seçimi (seleksiyonu) amaçlanmaktadır (Salgotra ve Stewart, 2020). Bitkilerde genetik varyasyonların seçilmesi, tanımlanması ve kullanılması için yardımcı araç olarak klasik markörler ve moleküler markörler ıslahçılar tarafından kullanılmaktadır (Xu, 2010; Idrees ve Irshad, 2014). Klasik markörler arasında morfolojik markörler, biyokimyasal markörler ve sitolojik markörler bulunurken (Jiang, 2013), moleküler markörler arasında ise, ‘Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)’ (Botstein ve diğerleri, 1980), ‘Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)’ (Vos ve diğerleri, 1995), ‘Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)’ (Williams ve diğerleri, 1990; Welsh ve McClelland, 1990), Simple Sequence Repeat (SSR) (Tautz, 1989; Litt ve Luty, 1989) ve ‘Single Nucleotide Polymorphism (SNP)’ gibi çeşitli polimorfizm saptama teknikleri yer almaktadır (Gupta ve diğerleri, 2001).

Günümüzde klasik markörlerin yerini büyük ölçüde genomik yaklaşımlardan gelen moleküler markörler almıştır (Gupta ve diğerleri, 2005; Kumar ve diğerleri., 2018). Moleküler markörler bir genin alelleri arasındaki polimorfizmi tespit etmek için kullanılabilen, mutasyonları/varyasyonları ortaya çıkarabilen ve genom içerisinde belirli bir konumla ilişkilendirilen bir DNA parçası olarak tanımlanır (Jiang, 2013). Klasik markörlere kıyasla moleküler markörler çevresel faktörlerden ve bitkinin gelişme aşamalarından etkilenmezler (Winter ve Kahl, 1995). Polimorfizmi saptamak için bir probe hibridizasyon tekniği olan Southern blotting (Southern, 1975) ve bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (Mullis, 1990) tekniği olmak üzere iki temel yöntem vardır. PCR veya moleküler hibridizasyon uygulamalarının ardından elektroforez kullanılarak, DNA örneklerindeki varyasyon veya DNA dizisinin belirli bir bölgesi için polimorfizm, bant boyutu ve hareketlilik gibi ürün özelliklerine dayalı olarak tanımlanabilir (Jiang, 2013).

Bitki ıslah programlarına ve genetik çalışmalarda kullanılan moleküler markörlerin karakteristik özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 2.1’de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Bazı moleküler markörlerin temel özellikleri (Ben-Ari ve Lavi, 2012)

Moleküler Markör	Laboratuvar Tekniği	Lokus Sayısı	Polimorfizm Düzeyi	Baskınlık	Bulunma Sıklığı
RFLP	Southern blotting Agaroz jel	Tek lokus	Düşük	Eşbaskın	Orta
RAPD	PCR Agaroz jel	Çoklu lokus	Düşük	Baskın	Düşük
AFLP	PCR Akrilamid jel	Çoklu lokus	Düşük	Baskın	Orta
SSR (Microsatellites)	PCR Akrilamid jel	Tek lokus	Çok yüksek	Eşbaskın	Orta
SNP	Primer uzama (extension) Mikroçipler	Tek lokus	Lokus için düşük. Genotipleme için yüksek.	Eşbaskın	Çok yüksek

Mikrosatelit veya basit dizi tekrarları (SSR), çoğu bitki türünün çekirdek genomlarında yüksek sıklıkta bulunan 1 ila 6 nükleotid uzunluğunda [mononükleotit (A)₁₁, dinükleotit (GT)₁₂, trinükleotit (ATT)₉, trinükleotit (ATCG)₈, pentanükleotit (TAATC)₆ ve hexanükleotit (TGTGCA)₅] değişiklik gösteren ardışık tekrar motifleridir (Beckmann ve Weber, 1992). Dinükleotit, trinükleotit ve tetranükleotit tekrarları, moleküler genetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır ve trinükleotit tekrarlar bitkilerde en fazla bulunan motiflerdir (Beckmann ve Weber, 1992; Kantety ve diğerleri, 2002; Chen ve diğerleri, 2006). Mikrosatelitlerin birçok organizmada genom haritalaması için son derece değerli bir araç olduğu rapor edilmiş (Knapik ve diğerleri, 1998) ve akrabalık analizinden popülasyon genetiğine ve biyolojik kaynakların korunması/yönetimi gibi farklı alanlarda kullanıldığı bildirilmiştir (Jarne ve Lagoda, 1996). SSR'lar, tekrar motiflerinin bulunduğu bölgenin 5' ucu ve 3' ucundaki DNA dizileri üzerinden tasarlanacak primerler aracılığıyla PCR tekniği kullanılarak tanımlama için çoğaltılır ve amplifikasyon sonrasında agaroz veya poliakrilamid jeller üzerinde PCR ürünleri görselleştirilerek sonuçlar değerlendirilir (Idrees ve Irshad, 2014). Bu süreçte primerlerin geliştirilmesi genellikle maliyetli bir süreç olsa da bir türde geliştirilip karakterize

edildikten sonra, SSR'lar tekrar üretilebilirlikleri, çok alellik yapıları, eşbaskın kalıtları, yüksek sıklıkta bulunmaları ve genom çapında uygulanabilirlikleri nedeniyle moleküler çalışmalarda oldukça güçlü araçlardır (Liu ve Cordes 2004).

Geçmiş yıllarda araştırmacılar, bir bitki hücresinin çekirdeğindeki toplam DNA miktarını (genom boyutunu) çeşitli yöntemler (feulgen densitometry, reassociation kinetics) aracılığıyla tahmin etmişler ve evrim, popülasyon genetiği ve bitki ıslahı gibi birçok alanda bu bilgileri kullanmışlardır (Kron ve diğerleri, 2007; Leus ve diğerleri., 2009; Pellicer ve Leitch, 2014). Ancak, günümüzde örnek hazırlama kolaylığı ve çok kısa sürede güvenilir sonuçlarının elde edilebilmesinden dolayı Flow sitometri (Flow Cytometry) yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır (Doležel ve diğerleri, 2007; Pellicer ve Leitch, 2014).

Flow sitometri yönteminin çalışma prensibi kısaca üç adımda özetlenebilir. İlk olarak hücre çekirdeklerini ortaya çıkarmak için bir bitki dokusu örneği uygun bir sıvı tampon içinde parçalanır. Devamında çekirdekler, DNA'ya bağlanan bir florokrom ile boyanır ve çekirdekler, her çekirdeğe bağlı boya miktarını ölçen bir flow sitometrisinden geçirilir. Sonuç olarak çekirdeğin DNA miktarı belirlenir (Pellicer ve Leitch, 2014). Flow sitometri analizinde bilinen bir ploidi düzeyine sahip bir örneğin DNA içeriği, bilinmeyen bir örneğin DNA ploidi düzeyini belirlemek için bir referans standart olarak kullanılmaktadır (Doležel ve diğerleri, 2003).

Bitkilerde poliploidi seviyelerinin tanımlanması için, kloroplast sayısının belirlenmesi ve stoma hücrelerinin boyutuna bakılması gibi dolaylı yöntemler hızlı ve basittir (Ciprian-Salcedo ve diğerleri, 2020). Ancak, bu dolaylı yöntemler genellikle hatalı sonuçlar vermektedir ve kromozom sayımı veya flow sitometrisi ile genom boyutu ölçümü gibi yöntemlerle ise daha doğru olarak belirlenmektedir (Sattler ve diğerleri, 2016). Kromozom sayımı yöntemi poliploidi seviyelerini tespit etmek için en doğru yöntem olarak kabul edilmiştir (Sattler ve diğerleri, 2016). Ancak kromozom sayılarının sitolojik sayımı, kromozom sayıları ve boyutlarından dolayı çok zor bir tekniktir ve her tür için son derece spesifik protokoller gerektirmektedir (Doležel ve diğerleri, 2007; Ciprian-Salcedo ve diğerleri, 2020). Buna karşın, flow sitometri yöntemi, ploidi seviyesini ölçmek ve doğrulamak için hızlı, güvenilir ve basit bir yöntemdir ve kısa sürede çok sayıda hedef

bitkinin analizine olanak sağlamaktadır (Roy ve diğeri, 2001; Sattler ve diğeri, 2016). Dolayısıyla büyük bitki popülasyonlarını değerlendirme kapasitesi ve yüksek etkinliği nedeniyle, flow sitometri yöntemi bitki ıslahında seleksiyon süreçlerini hızlandırmak için yaygın bir araç olarak kullanılmaktadır (Ojiewo ve diğeri, 2006; Ciprian-Salcedo ve diğeri, 2020). Bu yöntemin en büyük dezavantajları ise analiz maliyetlerinin yüksek olması ve diploit bitkileri katlanmış haploit bitkilerden ayırt edememesidir. Bu yöntemlere ek olarak, haploit kültüründen gelişmiş bitkileri eş-baskın özellikteki SSR ve izoenzim gibi moleküler markörlerle analiz ederek aday haploit bitkilerin belirlenmesidir (Keleş ve diğeri, 2015). Bu yöntemin sonuçları flow sitometri analizi ile karşılaştırıldığında yöntemin aday haploit bitkilerin seçiminde oldukça etkin olduğu, daha kolay ve bitki gelişiminin erken aşamalarında haploit veya katlanmış haploit bitkilerin seçilmesine olanak sağladığı görülmüştür. (Kiszczak ve diğeri, 2010).

2.2. Kaynak Araştırması

Andersen ve diğeri (1990) gerçekleştirdikleri çalışmada havuçta anter kültürüyle *in vitro* haploit bitki elde etme olasılıklarını araştırmışlardır. İki açıta tozlanan havuç çeşidinin çiçek şemsiyeleri hasat edildikten sonra 2 ila 4 gün 5-7 °C' de bekletilmiştir. Çiçek tomurcuklarının sterilizasyon işleminden sonra anterler besin ortamına ekilmiştir. Anterlerin ekileceği ortamda Gamborg B5 besin ortamına ilave olarak 500 mg/L glutamine, 100 mg/L serine, 0,1 mg/L NAA, 0,1 mg/L 2,4-D, %10 sukroz ve %0,8 agar kullanılmıştır. Ekilen anterler 27 °C'de 2 hafta boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Sonrasında aynı sıcaklıkta ışıklı ortama alınmıştır. Rejenerasyon ortamı olarak B5 besin ortamı ve %2 sukroz kullanılmıştır. Ayrıca mikrosporlardaki uygun çekirdek gelişim aşamaları belirlenmiştir. Anter kültüründen elde edilen 26 farklı bitkide kök ucu sayımı ile ploidi seviyesi belirlenmiştir. Kırk iki klon bitki test edilmiş ve on dört klon bitkide haploit bitki üretimi gerçekleşmiştir. Yirmi beş klon bitkide diploid bitki oluşumu gözlenmiştir. Üç klon bitkide haploit ve diploit bitkiler gözlemlenmemiştir. Bu protokol kullanılarak daha sonraki çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Hu ve diğeri (1993), farklı oranlarda bitki büyüme düzenleyicisi kullanılarak havuçta anter kültürü yoluyla haploit bitki üretimini araştırmışlardır. Havuçların olgunlaşmamış anterleri fitohormonların çeşitli kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre

alınmıştır. Bu kombinasyonlardan 0,01 mg/L 2,4-D ve 0,1 mg/L kinetin eklenmesinin kallus oluşumunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Kallus formunun en yüksek oranı (%12) 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L kinetin içeren ortamda gözlenmiştir. Embriyo oluşumu ise 1 mg/L 2,4-D ve 0-0,1 mg/L kinetin içeren ortamda gözlemlenmiştir. Ancak en yüksek embriyo gelişim oranı (%15) 1 mg/L 2,4-D ve kinetinsiz ortamda gözlenmiştir. Rejenere olan 18 bitki arasından, 16 bitkinin haploit ve diğer iki bitkinin aneuploit olduğu tespit edilmiştir

Gorecka ve diğerleri (2005) havuçta anter kültürü ile yaptıkları çalışmada, donör bitki ve kültür prosedürleri gibi faktörlerin andogenesis verimliliğine etkisini araştırmışlardır. Karoten oranı yüksek beş havuç genotipi seçilmiştir. Anter kültüründe iki prosedür karşılaştırılmıştır. İlki iki hafta karanlığa maruz bıraktıktan sonra ışığa maruz bırakma ve aynı bileşimde taze bir ortama aktarma, ikincisi ise taze bir ortama aktarmaksızın embriyolar görünene kadar karanlıkta bekletilmesidir. Tüm kombinasyonlarda 27 °C sıcaklık uygulanmıştır. Donör genotipler arasında istatikselsel olarak farklılıklar belirlenmiş ve HCM genotipinin her 100 anterde 5,6 embriyoyla en verimli genotip olduğu gözlenmiştir. Anter kültürünün ikinci prosedürünün daha etkili, ucuz ve daha az karmaşık olduğu ve en çok embriyo oluşumunun (her 100 anter) anterlerin ilk embriyolar oluşana kadar taze ortama transfer etmeksizin karanlıkta inkübe edilmesinde edildiği belirtilmiştir.

Górecka ve diğerleri (2009a), havuçta rejenerasyon sürecinin verimliliğinde rejenerasyon ortamının etkisinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları anter kültürü çalışmalarında yedi havuç genotipi kullanmışlardır. Anter kültürü için dört farklı besin ortamı; hormonsuz B5 ve MS ortamı, aktif kömürlü MS ortamı ve MS ortamına ilave 1 mg BA ve 0,01 mg NAA kullanılmıştır. Anter kültürlerinden gözlemlenen embriyolar sekonder embriyoları üretmiştir ve bitki rejenerasyonu gözlemlenmiştir. Sekonder embriyo hormonsuz B5 besin ortamında gözlemlenmiştir. Rejenerasyon sürecinin verimliliğinin çeşide bağlı olduğu bulunmuştur. Diğer çeşitlerle karşılaştırıldığında en çok androgenik oluşum Feria F₁ çeşidinde gözlemlenmiştir. Feria F₁ çeşidinde androgenik embriyoların çoğu sekonder embriyo formunda olmuştur. On iki hafta boyunca bir embriyodan 102 bitki rejenere olmuştur. Rejenerasyon sürecinin havuç genotipine ve uygulanan rejenerasyon ortamına bağlı olduğu belirtilmiştir.

Górecka ve diğerleri (2009b), havuçta double haploitlerin araştırılması için yirminin üzerinde havuç genotipi kullanmışlardır. Tomurcuk büyüklüğü için embriyogenesisde optimum aşamanın tek çekirdek aşaması olduğu belirtilmiştir. Anter kültüründe alt kültüre almaksızın 27 °C’de karanlıkta bekletmenin embriyogenesis oluşumu için önemli etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Cam sera koşullarında yetiştirilen bitkiler açık alanda yetiştirilenlerden daha fazla embriyo üretmiştir. Rejenere olan bitkiler hindistan cevizi torfunu ekilmiş, büyüme odası ve cam serada aklimize edilmiştir. Sitolojik ve sitometrik çalışmalar rejenere olan bitkilerin %90’in üzerinde double haploit ve izoenzim analizinde %96-100 homozigotluk gösterdiği tespit edilmiştir.

Kiszcak ve diğerleri (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, anter kültürlerinden elde edilen havuç bitkilerinin ploidi ve homozigotluk durumlarının tespiti hedeflenmiştir. Berjo, Kazan F₁, Narbonne F₁ ve Splendid F₁ genotipleri kullanılmıştır. Ploidi seviyeleri flow sitometri cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Analiz edilen bitkilerin homozigotluk durumları izoenzimlerden fosfoglukoz izomeraz (PGI) ve aspartat aminotransferaz (AAT) kullanılarak belirlenmiştir. Sitometrik testlerle anter kültürlerinden oluşan havuç bitkilerinin %90’dan daha fazlasının double haploit olduğu belirlenmiştir. Berjo, Kazan F₁ ve Splendid F₁ genotiplerinden gelişen androgenik bitkilerin PGI ve AAT izoenzimleri analizinde %100 homozigot olduğu belirlenmiştir. Narbonne F₁ genotipinden elde edilen androgenik bitkilerin PGI analizinde %94 ve AAT analizinde ise %100 homozigot olduğu belirlenmiştir. Kazan F₁ genotipinin androgenik bitkilerin AAT enzim sistemi ile analizinde %89’nun homozigot olduğu, PGI enzim sisteminin ise heterozigotları homozigotlardan ayırmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar enzim polimorfiziminin havuç genotipine bağlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle birden fazla izoenzim sistemiyle bitkilerin homozigotluk durumlarının doğrulanması gerekmektedir. Sonuç olarak androgenik havuç bitkilerinde homozigotluğu belirlemek için PGI ve AAT izoenzim sistemlerinin kullanılabileceği belirtilmiştir.

Gorecka ve diğerleri (2014), yaptıkları çalışmada havuçta anter kültüründe poliaminlerin etkisini araştırmışlardır. Bu alışmada, Kazan F₁ ve Narbonne F₁ havuç genotiplerinin anter kültüründe androgenesisin verimliliğine putresin ve spermidin poliaminlerinin etkisi incelenmiştir. Kazan F₁ genotipinde, iki poliaminin ayrı olarak ve kombinasyonunun her birinde embriyo miktarında artış gözlenmiştir. Narbonne F₁

genotipinde poliaminlerin faydalı bir etkisi gözlenmemiştir. Putresin ilave edilen rejenerasyon ortamında gözlemlenen bitkilerin miktarı artmıştır. En iyi putresin miktarı 1 litre için 0,5 mg olarak belirlenmiştir. Oluşan bitkilerin ploidi seviyesinde herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bitkilerin %80'den fazlası PGI ve AAT izoenzim analizlerinde homozigot olarak belirlenmiştir. Anter kültüründe embriyolardan oluşan bitkilerin rejenerasyonunda her 1 litre ortama 160 mg putresin ilavesi pozitif etki yaratmıştır. Androgenik bitkilerin büyük bir kısmında haploit kromozom seti spontane double haploit ile yer değiştirmiştir.

Kiszczak ve diğerleri (2014), tarafından gerçekleştirilen çalışmada düşük sıcaklığın havuçta *in vitro* androgenesise etkisi araştırılmıştır. Düşük sıcaklık (4 °C) anter kültüründe adrogenesisi teşvik etmek için donör bitkilere sıklıkla uygulanmaktadır. Havuç anter kültürleri için donör bitki 9, 12, ve 21 gün soğuk uygulamasından sonra anterler kültüre alınmıştır. 12 gün boyunca soğuk uygulamasının etkili sonuç verdiği gözlemlenmiş ve her 100 anterde 24,3 embriyo oluşmuştur. Bitkilerin embriyolardan rejenera olma, adaptasyon ve sonrasında onların ploidi ve homozigotlukları değerlendirilmiştir. Ploidi seviyesi flow sitometri cihazı ile ölçülmüştür. 2x kromozoma karşılık gelen DNA miktarıyla adrogenesisten elde edilen bitkiler karşılaştırılmıştır. Homozigotluk oranı değerlendirildiğinde, bu bitkilerin gametik orjini PGI izoenzim analizinde %77,8, ATT izoenzim analizinde %75,0 olarak belirlenmiştir. Homozigot veya heterozigotluk dağılımının ısı şokuna bağlı olmadığı belirtilmiştir.

Keleş ve diğerleri (2015), yaptıkları çalışmada farklı biber tiplerinde spontane ikiye katlanmış haploidi oranlarını karşılaştırmışlardır. Bitki materyali olarak yedi çarliston, altı dolmalık, sekiz kapyra ve yedi yeşil biber genotipi kullanılmıştır. Dört mg/L naftalinasetik asit, 0,5 mg/L 6-benzilaminopurin, %0,25 aktif kömür, 30 g/L sakaroz ve 15 mg/L gümüş nitrat (AgNO₃) içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Anter kültürü yoluyla oluşan bitkilerin ploidi seviyeleri hem flow sitometrisi hem de basit dizi tekrarları (SSR) markörü kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuçlar, farklı biber tiplerinde farklı spontane katlanmış haploidi oranlarının elde edildiğini göstermiştir. Haploit bitkilerin en yüksek spontane katlanma oranı, %53,4 (altı genotipin ortalaması) ile dolmalık biber tipinde gözlenmiştir. Bunu sırasıyla %31,9 ve %30,4 ile çarliston ve kapyra biber tipleri

izlemiştir. Yeşil biber tipi genotipleri ortalama %22,2 ile en düşük spontane katlanmış haploidi oranını vermiştir.

KiszczaK ve diğeri (2016), havuçta katlanmış haploit eldesi için anter kültürü ve mikrospor kültürlerini karşılaştırmışlardır. Üç havuç genotipi (Kazan F₁, Feria F₁, ve Narbonne F₁) kullanılarak iki method karşılaştırılmıştır. Anter ve mikrospor kültürlerinin her ikisinde de bitki üretiminin her adımında verimliliği etkileyen ana faktörün genotip olduğu gözlenmiştir. Mikrospor kültürüyle karşılaştırıldığında anter kültüründe Feriha F₁'de androgenesisin verimliliği daha yüksek ve bitkilerin daha çok adrogenik yapıdaki kültürlerden oluştuğu bulunmuştur. Kazan F₁ ve Narbonne F₁'de daha çok anter kültüründen elde edilen bitkilerin adrogenik yapıda olduğu tespit edilmiştir. Anter kültürlerinden üretilen androgenik bitkilerin daha iyi aklimize olduğunu gözlemlemişlerdir. Narbonne F₁'in aklimize olan bitkilerinin ploidi ölçümünde, anter kültüründen gelişmiş bitkilerin çoğunun katlanmış kromozom seti içerdiği belirlenmiştir. Mikrospor kültüründen elde edilen bitkilerin büyük bir kısmının ise haploit yapıda olduğu belirlenmiştir. Anter kültüründe oluşan bitkilerin PGI ve AAT izoenzimleriyle analizinde homozigotluk oranının genotipe bağlı olduğu bulunmuştur. Mikrospor kültüründe ise elde edilen bitkilerin büyük bir kısmının genotip ne olursa olsun homozigot olduğu tespit edilmiştir.

Domblides (2017), havuçta anter kültürü ve tozlanmamış ovaryum kültürü ile katlanmış haploit üretim metodu geliştirmek için bir çalışma yapmıştır. Her iki yöntemde Nantes 4 ve NIIOCH336 havuç çeşitleri kullanılmıştır. Toplam olarak 450 ovul ve 223 anter Murashige ve Skoog (MS) besin ortamı ve 2,4-D kullanılarak hazırlanan besin ortamına ekilmiştir. 5-6 hafta sonra ovullardan kallus oluşmuştur. Tüm kallus ve embriyolar bitki rejenerasyonu için kinetin kullanılan taze ortama aktarılmıştır. Gynogenik yapıların %36'sı kallus ve %2,1'i embriyonik yapılardan oluşurken anter kültüründe ise %22,2 oranında kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile iki teknik karşılaştırıldığında ovaryum kültürünün daha verimli olduğu gözlemlenmiştir.

KiszczaK ve diğeri (2018), tarafından yürütülen çalışmada, *Daucus carota* L. bitkisinde yüksek oranda DH bitkiler elde edilmesinde genotipin etkisi, donör bitkilerin yapısı ve büyüme şartları araştırılmıştır. Ayrıca çeşitli rejenerasyon ortamlarının etkisi

incelenmiştir. Çalışmada B5 besin ortamına ilave olarak 2,4-D ve 0,1 g·L⁻¹ NAA kullanılmıştır. Genotipe bağlı olarak, her 100 anterde 1,2- 305,3 embriyo gözlenmiştir. En fazla embriyo gelişimi (100 anterde 5,5) tek bir şemsiye çiçeği içeren birincil sürgünlü donör bitkilerden oluşmuştur. Androgenik embriyolardan bitkilerin rejenerasyonu en çok hormonlar ve aminoasitler olmaksızın B5 besin ortamında gözlenmiştir. Ploidi analizinde bitkilerin %92'si double haploit kromozom seti ve %8'i tetraploit kromozom setine sahip olmuştur. Katlanmış haploit kromozomların gametik orijinlerinin %73'ün PGI izoenziminde ve %100'ün AAT izoenziminde homozigot olduğu gözlemlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Moleküler analizler ise Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal

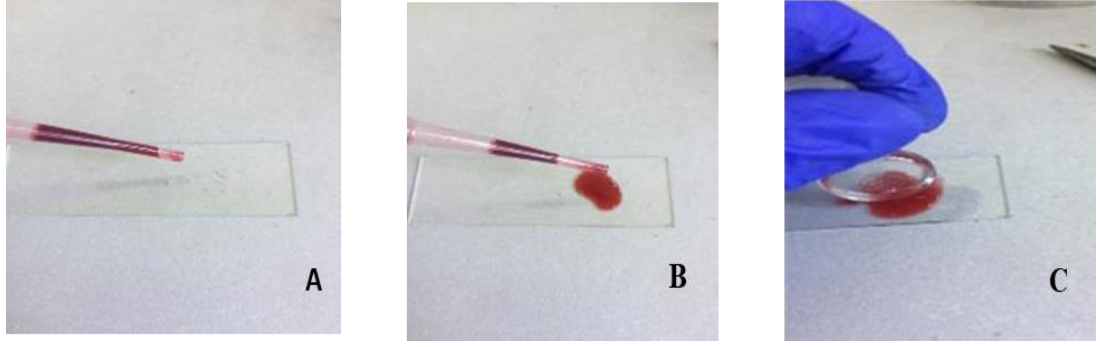
Anter kültürü için turuncu ve Hatay siyahı tipi havuç genotipleri çiçek bitkisel materyal olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1 A, B).



Şekil 3.1. Havuç genotiplerinin çiçek görünümü **A)** Turuncu ve **B)** Hatay siyahı tipi havuç genotiplerinin çiçek görünümüleri

3.2. Uygun Aşamaya Gelen Çiçek Tomurcuklarının Belirlenmesi

Çiçek tomurcuklarının içerisinde bulunan anterlerin mikrospor gelişim aşaması asetokarmin boyama yöntemiyle belirlenmiştir. Asetokarmin çözeltisi; 55 mL ddH₂O, 45 mL asetik asit ve 0,5 gram asetokarmin kullanılarak hazırlanmıştır. Üç ila beş adet anter lam üzerine konulduktan sonra üzerine 1-2 damla asetokarmin damlatılarak iyice ezilen anterlerin üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskobu altında immersiyon yağı kullanılarak 100X objektif ile incelenmiştir (Şekil 3.2 A, B, C).



Şekil 3.2. Anterlerin asetokarmin ile boyanması **A)** Lam üzerine konulan anterler **B)** Anterlerin üzerine asetokarmin damlatılması **C)** Anterlerin asetokarmin boyası ile ezilmesi

3.3. Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Tüm çalışma steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Çalışma sırasında kullanılan tüm materyaller otoklavda 121 °C’de ve 1 ATM basınçta 20 dakika steril edildikten sonra steril kabin içerisine alınmıştır.



Şekil 3.3. Steril kabinin görünümü

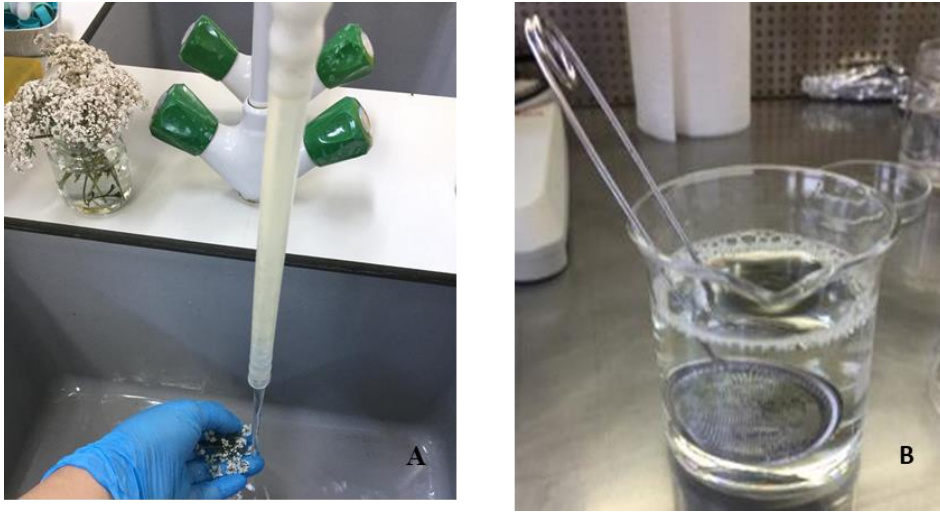
3.4. Çalışmada Kullanılan Bitki Besin Ortamı

Çalışmada Gamborg B5 besin ortamına ilave olarak 500 mg L⁻¹ glutamine, 100 mg L⁻¹ serine, 0,1 mg L⁻¹ 2,4-D, 0,1 mg L⁻¹ NAA, 100 g L⁻¹ sakkaroz ve 6,5 g L⁻¹ agar (Andersen ve diğerleri, 1990) kullanılmıştır. Ortamın pH’sı 5,8 olarak ayarlanmıştır.

Rejenerasyon ortamı ise Gamborg B5 besin ortamında %20 sakaroz ve 6,5 g L⁻¹ agar kullanılarak hazırlanmıştır. Ortamın pH’sı 6,0 olarak ayarlanmıştır.

3.5. Çiçek Tomurcuklarının Sterilizasyonu

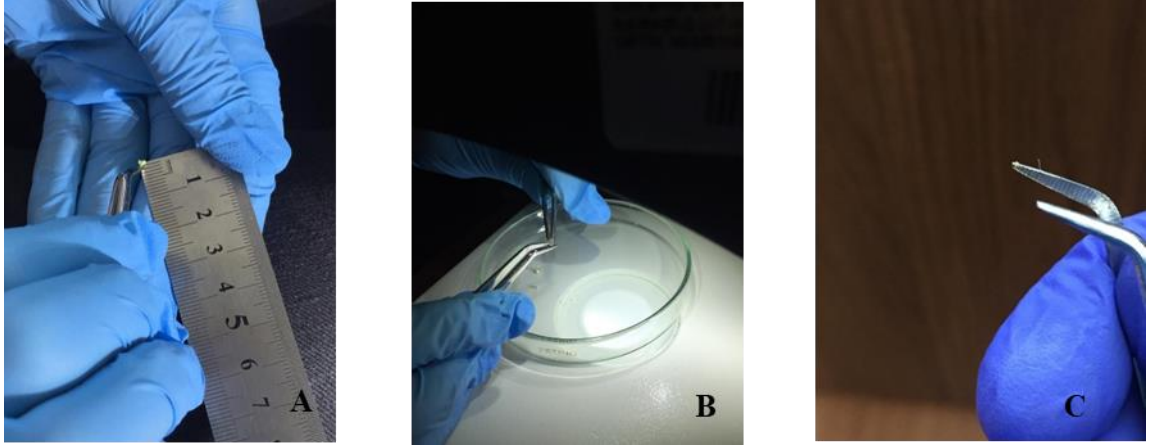
Tarlada çiçek saplarından kesilen havuç çiçekleri su ile doldurulmuş şişelere alınmış ve buzdolabında +4 °C’de 4 gün boyunca bekletildikten sonra besin ortamına ekilmişlerdir. Sterilizasyon için havuç çiçekleri çeşme suyu ile yıkandıktan sonra Tween20’de 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonrasında üç defa ddH₂O (distile su) ile yıkanmış ve %70’lik etanolde 45 saniye bekletildikten sonra distile su ile tekrar üç defa yıkanmıştır. %20’lik çamaşır suyunda 5 dakika bekletildikten sonra distile su ile 3 defa yıkanmıştır (Şekil 3.4 A, B). Sonrasında havuç çiçekleri petri içerisine konularak kurutulmuştur.



Şekil 3.4. Çiçek tomurcuklarının sterilizasyonu **A)** Tomurcukların çeşme suyu ile yıkanması **B)** Tomurcukların sterilizasyonu

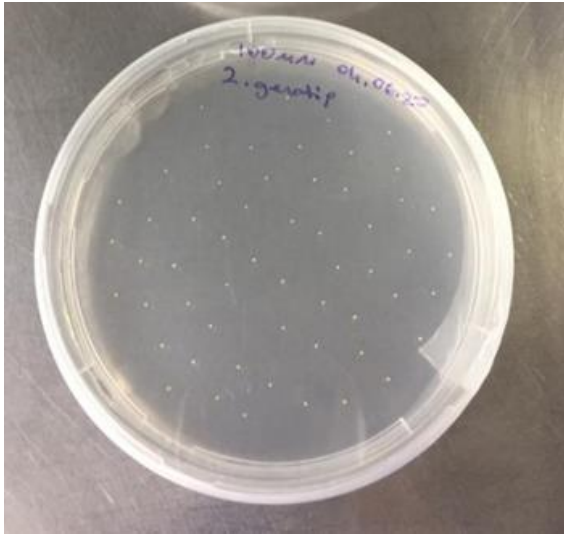
3.6. Anterlerin Besin Ortamına Ekilmesi

Sterilizasyon işlemi tamamlanan anterler mikroskop altında çiçek tomurcuklarından filament kısmı alınmadan sadece anter olacak şekilde ayrılmış ve besin ortamına ekilmiştir. Bu aşamada 0,5-0,9 mm boyutundaki çiçek tomurcuklarından çıkarılan anterler kullanılmıştır (Şekil 3.5 A, B, C).



Şekil 3.5. Tomurcuk boyutunun belirlenmesi. A) Uygun tomurcuk boyunun belirlenmesi, B) Mikroskop altında tomurcuktan anterin ayrılması C) Anterin görünümü

Çalışmada her genotipten 2500 adet anter kullanılmıştır. Her bir petri kabına 50 adet anter ekilmiştir (Şekil 3.6). Kontaminasyonun engellenmesi için petri kapları parafilm ile kapatılmış ve 27 °C’de karanlık ortamda anterler gelişim gösterinceye kadar bekletilmiştir.



Şekil 3.6. Petri kabına ekim yapılmış anterler

3.7. Gelişim Gösteren Anterlerin Rejenerasyon Ortamına Aktarılması

Embriyo gelişimi gösteren anterler rejenerasyon ortamına (%2 sakaroz içeren Gamborg B5 besin ortamı, pH 6,0) aktararak 25 °C ve 16 saat ışık/8 saat karanlık olan iklim kabininde büyütülmüştür. Anterlerden gelişen bitkicikler 750 mL’ lik cam kavanozlardaki rejenerasyon ortamına dikilmiştir (Şekil 3.7 A, B).



Şekil 3.7. Gelişim gösteren anter **A)** Kallus gelişimi gösteren anter **B)** Rejenerasyon ortamında büyüyen bitkicik

3.8. Bitkilerin Vermikülit Ortamında Köklendirilmesi

Gelişen bitkilerin köklenmesi ve dış ortama alıştırılması amacıyla yarı yarıya sıvı B5 besin ortamı içeren vermikülit (750 mL'lik cam kovanozun 1/3 vermikülit ile doldurularak) otoklavlandıktan sonra bitkiler distile suyla temizlenerek bu ortama dikilmiştir. Vermikülit ortamı bitkilerin daha iyi köklenerek dış ortama alışmasını kolaylaştırmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Vermikülit ortamında büyütülen havuç bitkisi

3.9 Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılması

Vermikülit ortamında iyice köklenen ve gelişen bitkilerin kapakları aşamalı bir şekilde açılarak dış ortama alıştırılması sağlanmıştır. Sonrasında bitkiler torf ve perlit (1:1) içeren saksılara ve sonrasında araziye dikilmişlerdir (Şekil 3.9 A, B).



Şekil 3.9. Bitkilerin dış ortama alıştırılması **A)** Torf-perlit karışımı saksıya dikilmesi **B)** Bitkinin araziye dikimi

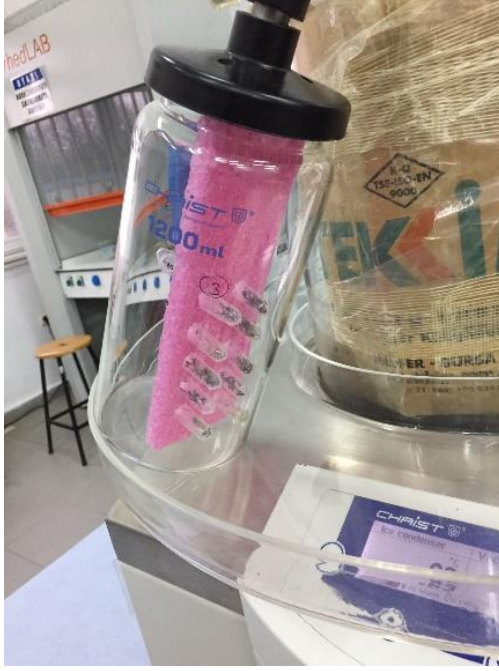
3.10. SSR Moleküler Markörlerle Haploid/Katlanmış Haploid (Homozigot) ve Diploid (Heterozigot) Bitkilerin Belirlenmesi

3.10.1. Örnekleme ve DNA izolasyonu

Gelişen her bitkiden rejenerasyon ortamına aktarma aşamasında DNA ekstraksiyonu için yaprak numuneleri alınmış ve 72 saat liyofilizatörde (Christ Alpha 1-4 LD Plus, Amerika Birleşik Devletleri) kurutulmuştur. Kurutulan yaprak numuneleri DNA izolasyonu yapılabildiği kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.10).

Futterer ve diğerleri (1995)’nin geliştirdiği yöntemle göre DNA izolasyonu aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

1- Liyofilizatörde kurutulmuş -20 °C’de bekletilen yaprak numunelerinde 20 mg alınarak 2 mL’lik mikro santrifüj tüplere aktarılmıştır.



Şekil 3.10. Anter kültüründen elde edilen bitkilerden alınan yaprak örneklerinin liyofilizatörde kurutulması

2- Yaprak numunelerinin parçalanması amacıyla 2 mL'lik mikro santrifüj tüplere cam boncuklar eklenmiş ve örneklerin 10 dakika süreyle parçalanması sağlanmıştır.

3- Sonrasında 1 mL ekstraksiyon tamponu [50 mM Tris-HCl pH 8,0, %1 Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), 50 mM Na₂EDTA, 0,7 M NaCl] eklenmiş ve vortekslenmiştir.

4- Homojenize edilen örnekler 65 °C sıcaklıkta 30 dk su banyosunda inkübe edilmiş ve inkübasyon sırasında 10 dk ara ile mikro santrifüjtüpleri karıştırılmıştır.

5- Oda sıcaklığına gelene kadar bekletildikten sonra üzerlerine 800 µL kloroform izoamil alkol (24:1) ilave edilen örnekler 16 000 g hızda 5 dk santrifüj edilmiştir.

6- Santrifüj işleminden sonra örneklerin sadece en üst fazı alınarak yeni 2 mL'lik yeni mikro santrifüj tüplere konulmuştur.

7- Örneklerin üzerine 100 µL %10'luk Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) tamponu ve 800 µL kloroform izoamil alkol (24:1) ilave edildikten sonra karıştırılmış ve 16 000 g hızda 5 dk santrifüj edilmiştir.

- 8- Santrifüj edilen örneklerin en üst fazı 2 mL'lik yeni mikro santrifüj tüplere aktarıldıktan sonra 800 µL izopropanol eklenmiş ve -80 °C'de 1 saat bekletilmiştir.
- 9- Örnekler oda sıcaklığına gelene kadar bekletildikten sonra DNA'ların tüpün dibine çökmesi için 16 000 g hızda 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 10- En altta oluşan pellet kısmı kalacak şekilde sıvı kısım dökülmüş ve üzerine 400 µL 1 M'lık NaCl ilave edilmiştir.
- 11- Örnekler su banyosunda 65 °C sıcaklıkta 20 dk bekletildikten sonra 16 000 g hızda 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 12- Örneklerin üzerine 1 mL %96'lık etil alkol eklenerek -20 °C'de 12 saat bekletilmiştir.
- 13- 12 saat sonra örneklerin oda sıcaklığına gelmesi sağlanarak 16 000 g hızda 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 14- Sonrasında 500 µL %70'lik etanol eklenmiş ve 16 000 g hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 15- Sonrasında etanolün uçması için tüpler kurumaya bırakılarak etanolün iyice uçması sağlanmıştır.
- 16- Örneklerle 50 µL TE (1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA) ilave edilerek DNA'lar çözündürülmüş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.10.2. Çalışmada kullanılan SSR primerleri

Çalışmada haploit veya katlanmış haploit bitkileri diploit bitkilerden ayırmak amacıyla Cavagnaro ve diğerleri (2011) tarafından geliştirilen ve aşağıda özellikleri verilen SSR markör primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1.). İleri primerlerinin 5' ucuna M13 kuyruk dizileri (TAAAACGACGGCCAGTGC ve TGTAACGACGGCCAGT) eklenmiştir. Bu diziler 700 nm ve 800 nm dalga boyundaki infrared boya (Li-Cor IRDye) ile 5' ucundan etiketlenmiş M13-IRD700-5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' ve M13-IRD800-5'- TAAAACGACGGCCAGTGC-3' primerlerin dizileri ile eşleşmektedir.

Bu şekilde PCR ürünlerindeki uzun dalga boyu ışınları ışınları Li-Cor 4300 DNA Analyzer (Amerika Birleşik Devletleri) cihazı ile algılanabilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan SSR primerleri (Cavagnaro ve diğerleri, 2011)

SSR Primerleri	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Bağlanma Sıcaklığı (°C)
GSSR-5-M13IRD800_F	ATAATAAACCCAACCAGACCCC	54
GSSR-5_R	ATCAGGCAAATCCCATACTGAC	
GSSR-6-M13IRD800_F	TCTCCTCTTGATTCTTCTTCGC	57
GSSR-6_R	CCAATAAGCGTAAGCGTTTCTC	
GSSR-11-M13IRD700_F	TAAATTCACCACAACGCCTC	54
GSSR-11_R	GGGTAATCGGACTGTGTTTTGT	
GSSR-14-M13IRD700_F	CCACCTTGGACAAAGCAAAC	55
GSSR-14_R	GCCCAGTTCTTCTTAATTGCAG	
GSSR-24-M13IRD700_F	GCCAACCATCAAAATCACTTCT	58
GSSR-24_R	GAATAACTGCCTGCAATACCG	
BSSR-14-M13IRD700_F	TACCCATAACTCAAGTTGGATAATTC	52
BSSR-14_R	AATGTCTAAACCCACTGATTTAAAAG	
BSSR-52-M13IRD800_F	AATTAGGATTGGAATCACTGCGAGT	55
BSSR-52_R	ATAGGCAAATGTCATGGATAACTGAA	
BSSR-89-M13IRD800_F	GCACAGAAATGTTATGTATCCTGTTT	53
BSSR-89_R	AGGAGGAAAGGAGAATTTCGAATG	

3.10.3. PCR reaksiyon koşulları

Toplam PCR reaksiyon hacmi her örnek için 20 µL olarak aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (Çizelge3.2.).

Çizelge 3.2. PCR reaksiyon ürünleri

PCR Ürünleri	Miktar (µl)
10x PCR tamponu	2
MgCl ₂ (25 mM)	1,3
5' ucuna M13 primer dizisi eklenmiş uzun ileri primer (5 mM)	0,4
Kısa geri primer (5 mM)	0,8
700 nm veya 800 nm dalga boyundaki infrared boya (LI-COR IRDye) ile 5' ucundan etiketlenmiş M13 primeri (5 mM)	0,5
dNTP karışımı (2,5 mM)	2
ddH ₂ O	11,35
Taq DNA Polimeraz enzimi (5 U/µl)	0,15
DNA (40 ng/µl)	1,5
Total hacim	20

PCR reaksiyonları döngüsü Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. PCR Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler (Amerika Birleşik Devletleri) cihazında yapılmıştır.

Çizelge 3.3. PCR döngüsü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	
Bağlanma (Annealing)	Primer bağlanma sıcaklığının 5 °C üzeri	50 sn	5
Uzama (Extension)	72	1 dk	
Denatürasyon	95	30 sn	
Bağlanma	Primer bağlanma sıcaklığı	50 sn	28
Uzama	72	1 dk	
Denatürasyon	95	30 sn	
Bağlanma	54	50 sn	7
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	5 dk	1

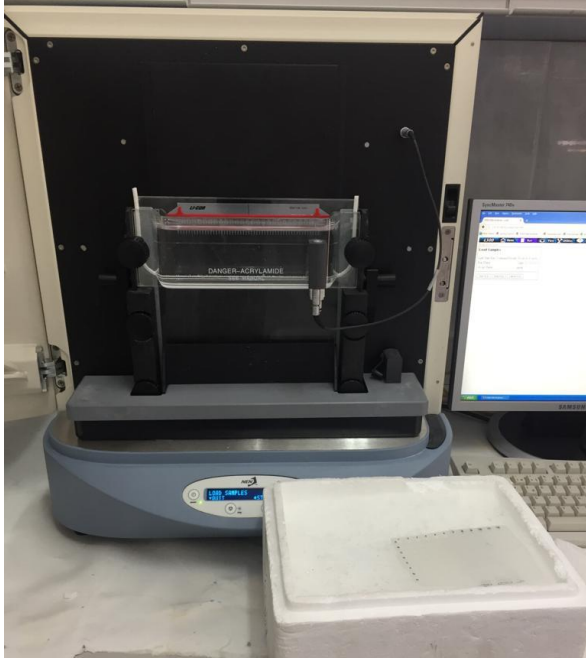
3.10.4. Poliakrilamid jel elektroforezinde PCR ürünlerinin görüntülenmesi

PCR reaksiyonlarını kontrol etmek için PCR ürünleri önce %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve daha sonra PCR ürünleri %6'luk poliakrilamid jele yüklenmiştir. Jel 20 mL %6'luk akrilamid, 16 µL TEMED (Tetrametil-Etilendiamin) ve %10'luk 175 µL APS (Amonyumpersülfat) kullanılarak hazırlanmıştır. Jel cam bloğa döküldükten sonra 1 gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra ki gün Li-Cor 4300 DNA Analyzer (Amerika Birleşik Devletleri) cihazına yerleştirilmiş ve 15 dk ön yürütme yapılmıştır.

PCR ürünleri 94 °C'de 5 dk denatüre edildikten sonra örnekler buz içine konulmuştur. Denatüre edilmiş örneklerden jele 0,5 µL yüklenmiştir. Yürütme işlemi ortalama 2-3 saatte gerçekleşmiştir (Şekil 3.11).

3.11. Flow Sitometri ile ploidi seviyesinin belirlenmesi

Çalışmada dış ortama adapte olmuş üç Hatay siyahı havuç genotipine (Şekil 3.12) ait yaprak örneklerinde flow sitometri ile ploidi seviyeleri ölçülmüştür. Bu ölçümler İda Yaşam Teknolojileri (Kocaeli) firmasında hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.11. PCR ürünlerinin %6'lık poliakrilamid jele yüklenmesi

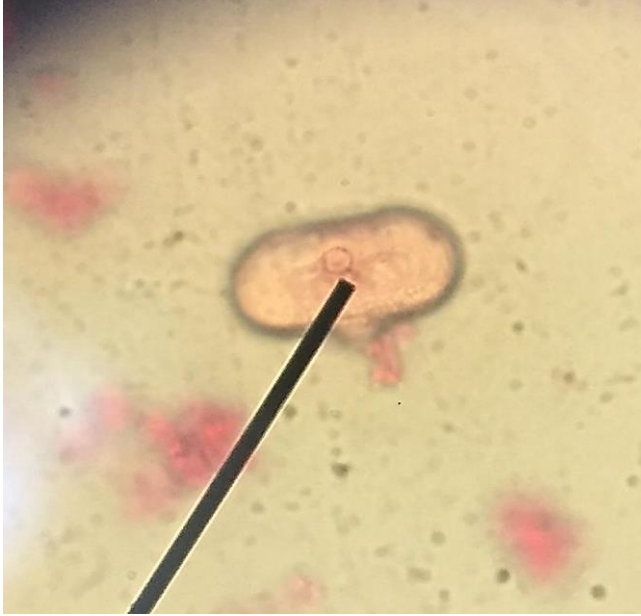


Şekil 3.12. Flow sitometri cihazı ile ölçümü yapılan anterden gelişmiş havuç bitkilerinin görünümü

4.BULGULAR

4.1. Uygun Mikrospor Aşamasının Belirlenmesi

Çiçek tomurcuklarındaki morfolojik evre ve mikrospor gelişim evresi arasındaki ilişkinin tespit edilerek ekimi yapılacak tomurcukların boyutlarının seçilebilmesi için asetokarmin ile mikrosporların boyanması yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla her iki genotipten uygun morfolojik dönemde olduğu düşünülen tomurcuklardaki mikrosporlar ışık mikroskobu altında 100X objektif kullanılarak incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda tek çekirdekli mikrosporların 0,5-0,9 mm büyüklüğündeki tomurcuklarda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1).

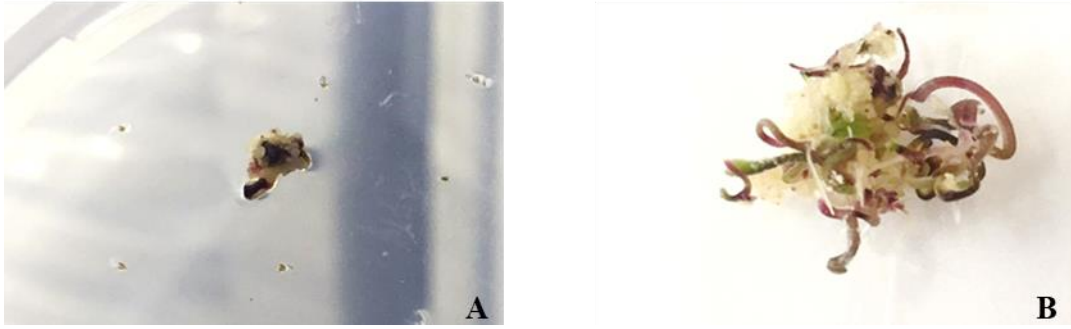


Şekil 4.1. Havuç mikrosporunun tek çekirdekli görünümü

4.2. Anter Kültürü Bulguları

Çalışmada, turuncu ve Hatay siyahı tipi havuç genotiplerinden her bir petri kabına 50 anter ekilerek toplamda her genotip için 2500 anter ekimi yapılmıştır. Turuncu havuç genotipinde anter gelişimi gözlemlenmezken Hatay siyahı havuç genotipinde 16 anter kallus oluşturarak gelişim göstermiştir (Şekil 4.2). Hatay siyahı havuç genotipinde anterlerde gelişim B5 besin ortamına konulduktan 10-12 hafta sonra gözlenmiştir. Bu gelişim tüm anterlerde kallus oluşturarak gerçekleşmiştir. Her bir kallustan kotiledon yaprağı oluşturan bitkicikler seçilerek B5 besin ortamı ve %2'lik sakaroz bulunan 350

mL'lik cam kavanozlara dikilmiştir (Şekil 4.3). Bu aşamadayken DNA izolasyonu için 10 bitkicikten yaprak örneği alınarak liyofilizatörde kurutulmuş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.10). Rejenerasyon ortamında büyüyen bitkiciklerin daha iyi köklenmesi amacıyla 1:2 oranında B5 besin ortamı ve vermikülit içeren 750 mL'lik cam kavanozlara aktarılmıştır. Vermikülit ortamı köklenmeyi hızlandırarak bitkiciklerin dış ortama alışmalarını kolaylaştırmıştır (Şekil 4.4). Vermikülit ortamında kök gelişimi sağlandıktan sonra bitkileri dış ortama alıştırma aşamasına geçilmiş ve toplam 3 bitki saksıda gelişme göstermiştir. Bu bitkilerden ikisi daha sonra fungal kontaminasyondan ölmüş ve 1 tanesi tarla koşullarında gelişmiş ve çiçeklenmiştir. Bu bitkinin kendilenmesi sonucu elde edilen tohumlarda ise çimlenme gerçekleşmemiştir.



Şekil 4.2. Anter kültürü ile androgenik havuç bitkiciklerinin oluşumu **A)** Besin ortamında gelişim gösteren bir anter **B)** Anterden kallus ve bitki gelişimi



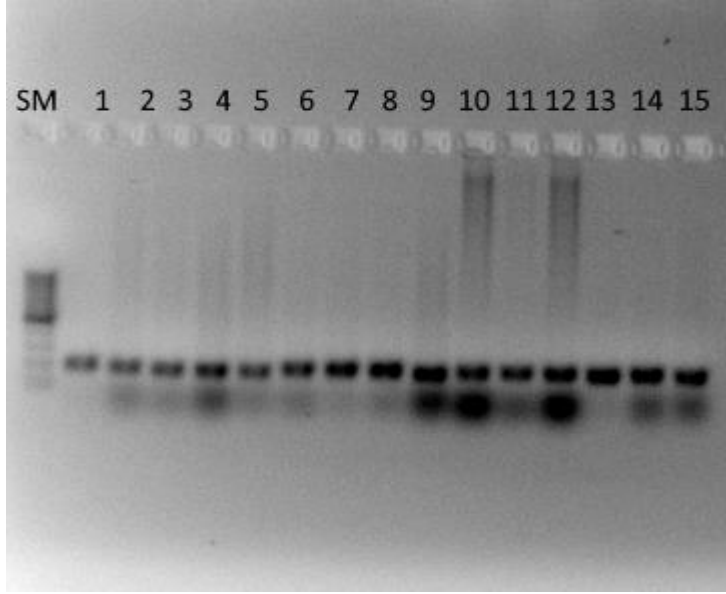
Şekil 4.3. Gelişim gösteren bitkiciklerin rejenerasyon ortamına aktarılması **A)** Kallustan kotiledon yaprağı oluşturan bitkicikler **B)** Rejenerasyon ortamına aktarılmış bitkicik



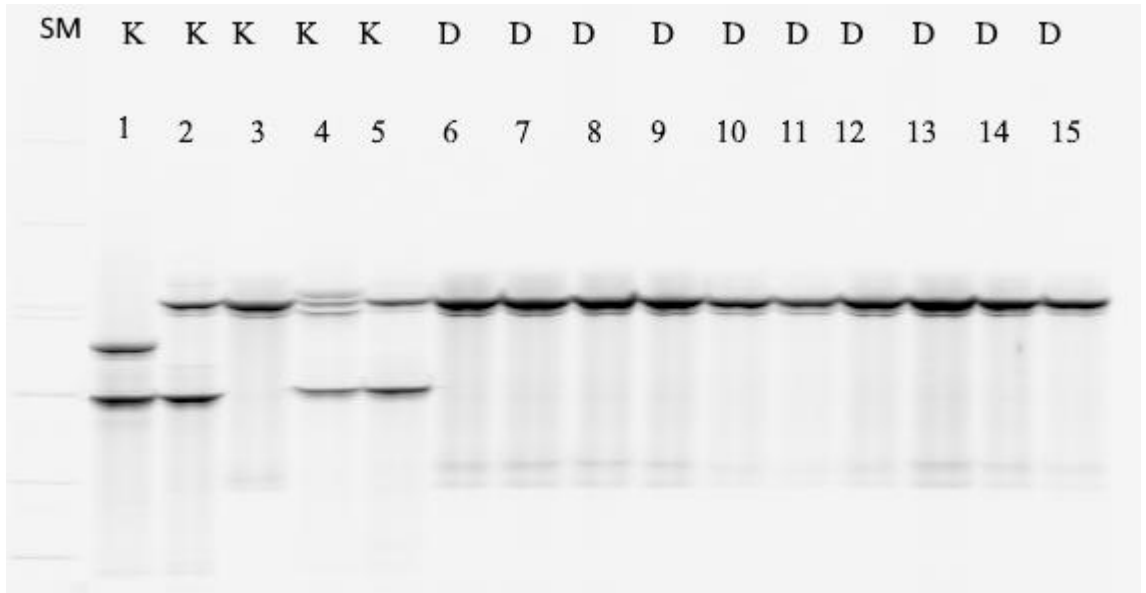
Şekil 4.4. Vermikülit ortamında köklenmiş havuç bitkiciği

4.3. SSR Markörler Kullanılarak Haploit Bitkilerin Seçilmesi

Çalışmada anter kültüründen gelişen 10 havuç bitkisi ve diploit yapıda olduğu bilinen 5 kontrol havuç bitkisinin DNA izolasyonu yapılmış ve daha sonra Cavagnora ve diğerleri (2011) tarafından geliştirilen 8 SSR primer kombinasyonu kullanılarak PCR reaksiyonları yapılmıştır. PCR ürünleri önce %1'lik agarozda koşturularak reaksiyonların çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 4.5). Daha sonra SSR bantlarının daha iyi ayrılması için reaksiyonlar %6'lık poliakrilamid jele yüklenmiş ve her SSR marköründeki alleller görüntülenmiştir. Test edilen sekiz SSR marköründen yedi tanesi on bitkide monomorfik bir bant profili vermiştir (Şekil 4.6). Bu sonuç, test edilen yedi SSR markörünün donör Hatay siyahı havuç genotopinde polimorfik olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.5. Onbeş havuç bitkisinde SSR markörü ile yapılan PCR reaksiyonlarının agaroz jel görüntüsü. S.M.100 bp DNA ladder (Thermofisher)



Şekil 4.6. Kontrol bitkilerinde (K) polimorfik profil ve anter kültüründen gelişen (D) bitkiciklerde monomorfik bant profili. S. M. 50-350 bp DNA ladder (Li-Cor)

GSSR 24 markörü ise polimorfik bir bant profili vermiştir (Şekil 4.7). Diğer bir ifade ile aynı donör bitkiden gelen bitkiler bir genetik açılım göstermektedir. Şekil 4.7’de ilk beş bant kontrol bitkileri (K) göstermektedir. Kontrol bitkileri tohumdan gelen diploit yapıda olduğu bilinen havuç genotiplerinden oluşmaktadır. Doku kültüründen gelişen (D) bitkicikler ise 6-15 arasında numaralandırılan bitkilerdir. On bitkiden dört tanesi çift bant

(heterozigot), altı tanesi (9, 11, 12, 13, 14 ve 15 numaralı) ise tek bant (homozigot) profili göstermiştir. On üç, on dört ve on beş numaralı bitkiler renerasyon aşamasından sonraki süreçte dış ortama adapte olamamışlardır. Diğer tek bant (homozigot) profil gösteren dokuz, on bir ve on iki numaralı bitkiler ise dış ortama alıştırılarak gelişimlerini devam ettirmişlerdir. Adapte olmuş bu bitkiciklerin flow sitometri cihazı ile ploidi seviyesi ölçülmüştür.



Şekil 4.7. Kontrol grubu (K) ve anter kültüründen gelişen (D) bitkiciklerde polimorfik bant profili. S. M. 50-350 bp DNA ladder (LI-COR)

4.4. Flow Sitometri Ölçüm Sonuçları

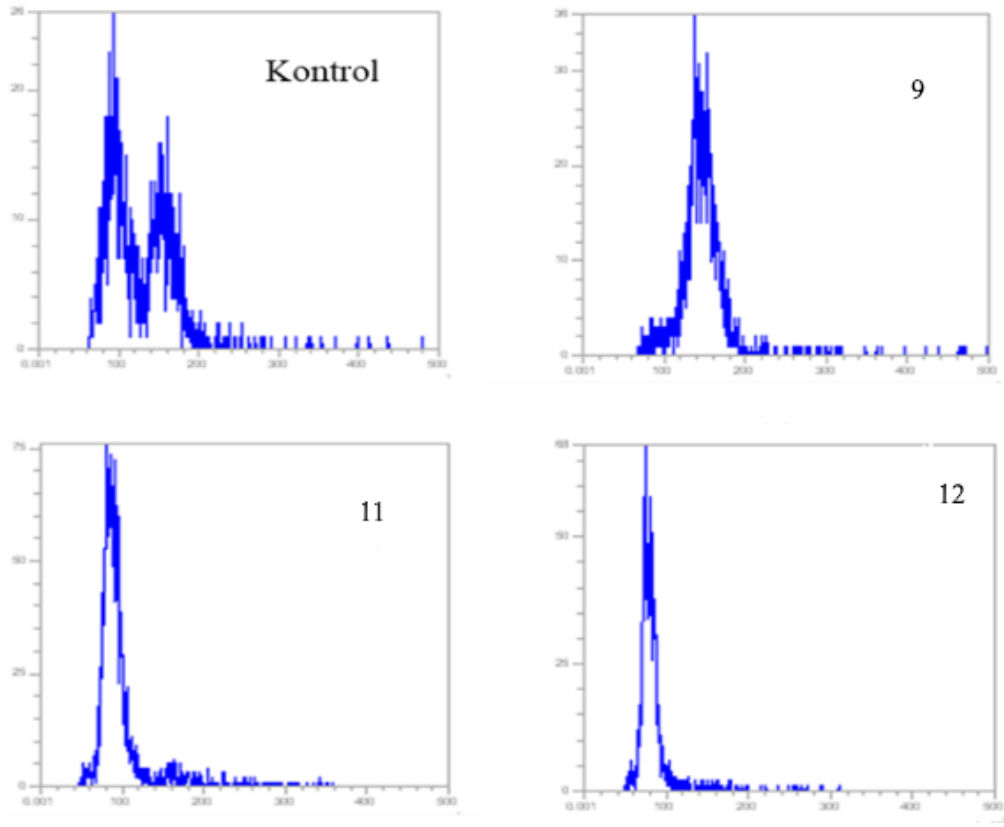
Çalışmada dış ortama adapte olmuş üç Hatay siyahı havuç bitkisinin ploidi düzeyi ölçümü flow sitometri ile yapılmıştır. Flow sitometri ölçüm sonuçları Çizelge 4.1 ve Şekil 4 8’de gösterilmiştir. Kontrol yaprak örneği olarak diploit yapıda olduğu bilenen Hatay siyahı havuç genotipi kullanılmıştır. Flow sitometri ölçüm sonuçlarına göre, dokuz numaralı bitkinin triploit yapıda olduğu ve on bir, on iki numaralı bitkilerin ise diploit yapıda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu sonuçlar SSR markör sonuçları ile kıyaslandığında bu bitkilerin homozigot yapıda olduğunu ancak spontane kromozom katlanması ile dihaploit hale geldiğini göstermektedir. Bu sonuç teorik olarak beklendiği gibidir. Nitekim anter kültüründen gelişen bitkiler haploit genoma sahipse, anterlerin alındığı bitkinin genomunda heterozigot (her iki allelede sahip) olan her SSR lokusunun sadece bir allelini içerecektir. Ancak donör bitkinin anterlerinde mayoz bölünme ile dört

mikrospor gelişirken meydana gelen genetik açılamdan dolayı her bir mikrospor farklı bir allele sahip olmaktadır ve bu mikrospordan gelişen bitkilerin SSR bant profili Şekil 4.7'deki gibi bir genetik açılım göstermektedir. Diğer taraftan anter kültüründen gelişen bitkiler diploit yapıda ise bu bitkilerde SSR lokusunun her iki alleli de görülecektir. Bu da bu bitkilerin androgenezle mikrospordan değil anterlerin somatik hücrelerinden geliştiğini göstermektedir. Bununla birlikte tek bir bant (homozigot) profiline sahip bitkiler her zaman haploit olmayabilir. Bazen doku kültürü aşamasında haploit embriyolar spontane kromozom katlanması ile dihaploit veya autopoliploit bitkilere dönüşebilmektedir.

Bir nuralı triploit bitkinin tarla koşullarında çiçeklenmesi sağlandıktan sonra çiçeklerde kendileme yapılmış ve tohum elde edilmiştir. Ancak elde edilen tohumların çimlendirme testinde canlılık gözlenememiştir. Nitekim triploit bitkiler eşey hücrelerindeki genetik dengesizlikten dolayı kısır dırlar. On bir ve on iki numaralı bitkicikler ise tarla koşullarına adapte olamamıştır.

Çizelge 4.1. Flow sitometri ölçüm sonuçları

Numune Adı	Ploidi Seviyesi	Çekirdek Yoğunluğu
Kontrol	Diploit	101
9	Triploit	145
11	Diploit	87
12	Diploit	78



Şekil 4.8. Flow sitometri ölçüm grafiği. Diploit (Kontrol) Triploit (9) Diploit (11) ve Diploit (12)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anter kültürü yoluyla bitkilerin elde edilmesi çevre, genotip, bitkinin yetiştirilme koşulları, uygun çekirdek bölünme zamanı, kullanılan besin ortamı ve bileşenleri gibi birçok faktör tarafından etkilendiği için her bitki hatta her genotip için optimize edilmesi gereklidir.

Asetokarmin boyama ile hem polen canlılığı hemde mikrosporların uygun aşamaya gelip gelmediği belirlenerek aynı boyuta sahip anterlerin ekilmesi başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. Uygun aşamaya gelmemiş ya da tek çekirdekli aşamayı geçmiş olan anterlerin ekilmesi neticesinde herhangi bir oluşum gözlemlenemeyebilir. Bu aşama belirlenerek anterlerin ekilmesi başarıyı önemli ölçüde arttırmaktadır. Asetokarmin boyama yöntemiyle parafin yöntemi kadar net görüntüler alınamamasına rağmen Karakullukçu (1991)'nin patlıcanda ve Sayılır ve Özzambak (2005)'in biberde yaptığı çalışmalarda belirttikleri gibi yeterli sonuçlar verebilmektedir. Çalışmamızda havuç bitkisinde tek çekirdekli mikrospor aşaması asetokarmin boyama yöntemiyle belirlenmiştir.

Andersen ve diğerleri 1990'da yaptığı çalışmada, havuç çeşitlerinde uygun tomurcuk boyutunun 0,7-0,9 mm boyutunda olduğu aşamada alınan anterlerdeki polenlerin tek çekirdekli aşamada olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında 0.5-0.9 mm çapındaki çiçek tomurcukları kullanılmaya çalışılmış ve asetokarmin boyama ile yaptığımız kontrollerde polenlerin tek çekirdekli aşamada oldukları görülmüştür (Şekil 4.1).

Çalışmada, turuncu havuç genotipinden 2500 anter ekilmiş ancak herhangi bir anter gelişimi gözlenmemiştir. Hatay siyahı havuç genotipinde ise ekilen 2500 anterin 16'sında kallus oluşumu ve bitkicik gelişimi gözlenmiştir. Ancak her kallustan elde edilen her bir bitkicik kendi içerisinde haploit veya diploit yapıya sahip olabilir. Bu nedenle her bir bitkicik kendi içerisinde incelenmesi gerekmektedir.

Tomurcuk alınan bitkinin büyütüldüğü zamandaki sıcaklık, ışık şiddeti, günlük ışık alma zamanı, bitki besin maddeleri ve bitkinin çevre şartlarına dayanıklılığı anter kültürünü etkileyen diğer faktörlerdir. Havuç bitkisi sıcak ortama maruz kaldığında bitki strese

girebilmekte ve metabolik faaliyetlerinin etkilenmesiyle anter kültüründe negatif etkilere neden olabilmektedir. Bu çalışmanın yapıldığı birinci yıl döneminde (20 Mayıs) hava şartları elverişli ve çok sıcak olmadığından Hatay tipi havuç genotipinde anter gelişimi gözlemlenmiştir. Diğer genotip (turuncu havuç tipi) Hatay tipi havuçtan yirmi ila otuz gün daha sonra çiçeklenmiş bu nedenle bu genotiplerde anterler üç ila dört hafta daha geç dönemde (aniden sıcaklık artışının olduğu dönem) kültüre alınabilmiştir. Bu genotipten hiçbir kallus gelişimi gözlenmemiştir. Ayrıca bir sonraki yıl Hatay tipi ve üç farklı havuç genotipinde aynı uygulama yapıldığında tüm genotiplerde herhangi bir gelişim gözlemlenmemiştir. İkinci yılda anterler yaklaşık bir ay daha geç kültüre alınmıştır. Bu durum havuçların yetiştirildiği dönemde sıcaklığın fazla olduğunu ve bu sıcaklığın anterlerin gelişimini olumsuz yönde etkilediğine işaret etmektedir. Bu nedenle bitkinin sıcaklık stresine maruz kalmadan yetiştirilmesi ve anter alınma döneminde sıcaklığın çok yüksek olmaması durumunda anter kültüründe başarı oranını arttıracaklarını düşünmekteyiz. Bundan sonraki çalışmalarda yetiştirme dönemi sıcaklığı etkisinin belirlenmesi gerekmektedir.

Anter kültüründe uygun aşamaya gelmiş olan ve mitoz bölünmeden 1-2 gün önceki zamanda toplanan umbellerin buzdolabında 4-7 gün bekletilmesi anterlerde biriken nişasta üretimini azalttığı için haploit yapıya sahip bitkiciklerin oluşumunu arttırdığı bildirilmektedir (Sharma ve Nayyar, 2016). Bu tez çalışmasında hasat edilen umbeller dört gün süre ile buzdolabında 4 °C'de bekletilmiş ancak bitkilerin yetiştikleri çevre koşullarının daha etkili olmasından dolayı ikinci yıl yapılan anter kültüründe bu uygulamanın bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Rejenerasyon sürecinde besin ortamına bitki büyüme düzenleyicisi ve aminoasit ilave edilmemiş, bitkinin sadece gamborg B5 besin ortamında rejenera olması sağlanmıştır. Doku kültüründe kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi ve aminoasitlerin rejenerasyon sürecinde ilave edilmemesinin havuç anter gelişiminde negatif bir etkiye sahip olduğu gözlenmemiştir. Bu da maliyeti azalttığı için önemli bir unsurdur.

Doku kültüründen gelişen bitkiciklerin daha iyi köklenmesi için toprak aşamasına geçmeden önce vermikülit ortamına aktarılması köklenmenin daha iyi olmasını ve bitkinin dış ortama adapte olmasını kolaylaştırmıştır. Vermikülit köklere zarar vermeden

bitki gelişimini desteklemek için kullanılmıştır. Çalışmada direk rejenerasyondan gelişen bitkilerin toprak-perlit (1:1) karışımli ortama dikilmesi ve vermikülit ortamında köklendirildikten sonra toprak-perlit (1:1) karışımına dikilmesi denenmiş ve vermikülit ortamının havuç bitkisi için iyi köklenmede etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Bitki besin ortamında aktif kömür kullanımının zararlı oluşumları engelleyerek embriyo gelişimini pozitif yönde etkilediği yapılan kaynak araştırmalarında incelenmiş ayrıca karanlık ortam oluşumuna katkı sağladığı bilinmektedir. Havuç bitkisinde de ikinci yıl denenmiş ancak aktif kömürün olumlu bir etkisinin olduğu gözlemlenmemiştir.

SSR markörleri eşbaskın özellikte bir markör sistemidir. Bu özelliğinden dolayı her SSR lokusundaki allellerin homozigot yapıda mı yoksa heterozigot yapıda mı olduğu belirlenebilmektedir. Ayrıca SSR markörleri çekinik ve baskın alleleri belirleyebilen, yapılması hızlı ve ekonomik bir markör sistemidir. Bu nedenlerle SSR markörleri *in vitro* yöntemlerle elde edilmiş haploit veya katlanmış poliploit bitkileri diploit bitkilerden hızlı ve ekonomik bir şekilde ayırt etmek için kullanılabilir (Ahmadi ve Ebrahimzadeh,2020). Nitekim anter kültüründe elde edilen haploit ya da katlanmış poliploit bitkiler, anterlerin alındığı bitkide heterozigot bir lokusa sahip SSR markörü ile analiz edildiğinde bu SSR markörün sadece bir allelini (baskın veya çekinik allel olabilir) içereceklerdir. Bu mantıktan yola çıkarak Hatay siyahı havuç genotipinde anter kültürü ile elde ettiğimiz on bitkicik sekiz SSR markörüyle incelenmiş ve GSSR 24 marköründe dört bitki heterozigot bir yapıda iki bant içerirken altı bitkicığın homozigot bir yapıda tek bir banda sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Bu sonuç bu altı bitkinin haploit veya katlanmış poliploit bir genoma sahip olduğunu göstermiştir. Keleş ve diğerleri (2015) Anter kültüründen gelişen biberlerin flow sitometri ile analizinde diploit olarak belirledikleri biber bitkilerinde dihaploit ve diploit bitkileri ayırt etmek için eş baskın bir SSR markörü kullanarak tüm dihaploit bitkilerin homozigot yapıda olduğunu göstermişlerdir. Keleş ve diğerleri (2015) genel olarak, kendiliğinden ikiye katlanmış haploidi oranlarının tüm biber çeşitlerinde oldukça yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Havuç bitkisinde de spontane dihaploit oluşumunun gözlenmesi yaygındır. Çalışmamızda da GSSR 24 SSR markörü ile homozigot olarak belirlenen bitkilerin flow sitometri analizinde kromozom katlanmasıyla dihaploit ve triploit genoma sahip oldukları gözlemlenmiştir. Bu oluşum kendiliğinden meydana gelmiş olup herhangi bir kimyasal kullanılmamıştır.

Anter kültürü ile elde edilen bitkiciklerin SSR markörleri kullanılarak homozigotluk-heterozigotluklarının belirlenmesi bitkinin erken gelişim döneminde tespit edilerek aday haploitlerin seçilmesine katkı sağlamaktadır. Bu sayede heterozigot yapıya sahip bitkicikler erken safhada elimine edilerek sadece homozigot yapıya sahip bitkiciklerin gelişimine devam ettirilmesi iş gücünü ve maliyeti azaltmaya yardımcı olmaktadır. Nitekim üretim maliyeti her doku kültürü ile çoğaltım programında sınırlayıcı bir faktördür. Perera ve diğerleri (2008) anter kültüründen geliştirdikleri Hindistan cevizi bitkisinde dihaploitleri erken aşamada belirlemek amacıyla SSR markörlerini kullanmışlardır. Çalışmamızda havuç SSR primerleri kullanılarak altı havuç bitkisinin homozigot yapıda olduğu belirlenmiştir.

Ülkemiz bitkisel çeşitlilik bakımından geniş bir yelpazeye sahiptir. Klasik ıslah yöntemleriyle çeşit geliştirme yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi ve bitkilerin totipotensi özelliğine sahip olmaları bitki biyoteknoloji metodlarının uygulanabilirliği arttırmış ve bu yöntemler gelişmiş ülkelerde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Gelişmiş ülkelerde, bitkisel üretime katkısından dolayı doku kültürü çalışmalarına yapılan yatırım her geçen gün artmaktadır. Yüksek verimli ve istenilen özelliklere sahip bitkilerin geliştirilmesinin artan nüfus ve azalan toprak alanı düşünüldüğünde son derece önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca, doku kültürü tekniklerinden biri olan anter kültürünün havuç bitkisine uygulanmasıyla saf hatların geliştirilmesi ekonomik ve ticari açıdan ülkemizin gelişmesine katkı sağlayacaktır. Bu nedenle yapılan bu çalışma anter kültürü tekniğinin uygulanabilirliğine katkı sağlayacaktır.

Yapılan bu çalışmada, Türkiye’de yetiştirilen yerli turuncu ve Hatay tipi havuç genotiplerinin haploit bitki oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi ve elde edilen haploit bitkilerin doku kültürü rejenerasyonun erken dönemlerinde moleküler markörlerle hızlı bir şekilde seçilmesi hedeflenmiştir. Araştırmada yerli havuç genotiplerinde yapılan anter kültüründe genotip ve sıcaklığın etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan doku kültürü ortamında (Andersen ve diğerleri, 1990), anterlerin kallus oluşturarak indirekt yolla bitkicikler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Anter kültüründe turuncu havuç genotipine göre daha iyi sonuç veren Hatay siyahı havuç genotipinde anter kültüründen gelişen on bitkide homozigotluğu (haploit/katlanmış haploit) belirlemek amacıyla sekiz

SSR markörü kullanılmıştır. Bu on bitkide yedi SSR markörü monomorfik profil gösterirken, GSSR24 markörü polimorfik profil göstererek altı genotipin homozigot yapıda olduğunu ortaya koymuştur. Dış ortama adapte olmuş üç genotipin SSR ve flow sitometri sonuçları karşılaştırıldığında bu genotiplerin spontane katlanmış haploit ve poliploit yapıda olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle eksplantlarda kallus oluşumu ile bitki meydana getirme yeteneğinin başarılı olduğu Hatay tipi havuç genotipinin haploit bitki elde edilmesi açısından daha başarılı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmadi, B., & Ebrahimzadeh, H. (2020). *In vitro* androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. *Plant Cell Reports*, 39(3), 299-316. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02509-z>.
- Andersen, S.B., Christiansen, I. & Farestveit, B. (1990). Carrot (*Daucus carota* L.): In vitro production of haploids and field trials. Bajaj Y. P. S., editor. Haploids in crop improvement, Springer; *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 12, 393–402.
- Baydar, H. (2016). Bitki ıslahında genetiğın yeri ve önemi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü.
- Beckmann, J. S., & Weber, J. L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12(4), 627-631.
- Ben-Ari, G., & Lavi, U. (2012). Marker-assisted selection in plant breeding. *In Plant Biotechnology and Agriculture*, 163-184.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., & Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314–331.
- Bulantekin, Ö., Düzalan, B. Ö., & Kuşçu, A. (2020). Meyve sebze tüketiminin diyabette önemi. *Eurasian Journal Humanity Science* 2020; 3(2), 55-61.
- Cavagnaro, P. F., Chung, S. M., Manin, S., Yildiz, M., Ali, A., Alessandro, M.S., Iorizzo, M., Senalik, D. A., & Simon, P. W. (2011). Microsatellite isolation and marker development in carrot -genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. *BioMed Central Genomics* 12, 386-405.
- Cebeci, E., & Hanci, F. (2017). Mor havuça (*Daucus carota ssp. sativus* var. *atrorubens* Alef) Kendilemenin Tohum Verim ve Kalitesine Etkileri. *Akademik Ziraat Dergisi*, 102, 99–102.
- Chen, C., Zhou, P., Choi, Y. A., Huang, S., & Gmitter, F. G. (2006). Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 112 (7), 1248-1257.
- Ciprian-Salcedo, G. C., Jimenez-Davalos, J., & Zolla, G. (2020). Flow-cytometry applications in plant breeding. *Revista Peruana de Biología*, 27(1), 079-084.
- Çıtak, S. (2014). Farklı organik gübreler ile toprak düzenleyicinin brokoli (*Brassica oleracea L.var.italica*) ve havuç (*Daucus corata* L.) yetiştiriciliğinde verim ve kalite üzerine etkileri. Doktora Tezi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Çümen, E., & Bostancı, Ş. (2021). Havuucun farklı gıda ürünlerine işlenebilirliği. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 14(2), 202-215.
- Dinçer, D., Bekçi, B., & Bekiryazıcı, F. (2016). Türkiye'deki doğal bitki türlerinin üretiminde doku kültürü tekniklerinin kullanımı. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5, 295–295. <https://doi.org/10.17100/nevbiltek.211012>.
- Doležel, J., Bartoš, J., & Voglmayr, H. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* 51A, 127–128.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2(9), 2233-2244.
- Domblides, A. S. (2017). Anther and ovule in vitro culture in carrot (*Daucus carota* L.). *Acta Horticulture* 1153. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1153.9>.
- 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 <https://orcid.org/0000-0003-4990-832X>.
- Elliatlıoğlu, Ş., Başay, S., & Kuşvuran, Ş. (2006). Anter kültüründen elde edilen haploid patlıcanların katlanması amacıyla kullanılan *in vitro* ve *in vivo* kolhisin uygulamalarının karşılaştırılması. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu.
- Ercan, N., Boyacı, F. Y., & Biner, B. (1997). Anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10, 374-380.
- FAO. (2022). Carrot production. The state of food and agriculture organization of the united nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>.
- Futterer, j., Gisel, A., Iglesias, V., Kloti, A., Kost, B., Mittelsten Scheid, O., Neuhaus, G., Neuhaus-Url, G., Schrott, M., Shillito, R., Spangenberg, G., & Wang, Z.Y. (1995). Standard molecular techniques for the analysis of transgenic plants gene transfer to plants, *In Gene transfer to Plants*, 215-263.
- 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., Krzyzanowska, D., & Górecki, R. (2005). The influence of several factors on the efficiency of androgenesis in carrot. *Journal of Applied Genetics*, 46(3), 265–269.
- Górecka, K., Krzyzanowska D., & Kiszczak (2009a). Plant regeneration from carrot (*Daucus carota* L.) anther culture derived embryos. *Acta Physiol Plant* (2009) 31, 1139–1145. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0332-1>.

Górecka, K., Krzyżanowska, D., Kiszczak, W., Kowalska, U., & Górecki, R. (2009b). Carrot doubled haploids. *Springer, In Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 231-239.

Górecka, K., Kiszczak, W., Kryzanowska, D., Kowalska, U., & 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>.

Gupta, P.K., Roy, J.K., & Prasad, M. (2001). Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science*, 80, 524–535.

Haq, R., & Prasad, K. (2015). Nutritional and processing aspects of carrot (*Daucus carota*)-a review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment*, 01(01), 1–14. <https://doi.org/10.46370/sajfte.2015.v01i01.01>.

Hu Kai, L., Matsubara, S., & Murakami, K. (1993). Haploid plant production by anther culture in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 62(3), 561–565. <https://doi.org/10.2503/jjshs.62.561>.

Idrees, M., & Irshad, M. (2014). Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *European Academic Research*, 2(1), 1513-1540.

Jarne, P., & Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11(10), 424-429.

Jiang, G. L. (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, 3, 45-83.

Kantety, R.V., Rota, M. L., Matthews, D.E., & Sorrells, M.E. (2002). “Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology* 48, 501-510.

Kamiloğlu, S., Camp, J. V., & Capanoglu, E. (2018), Black carrot polyphenols: effect of processing, storage and digestion: an overview. *Phytochemistry Reviews*, 17(2), 379-395. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9539-8>.

Karakullukçu, Ş. (1991). Değişik patlıcan genotiplerinden *in vitro* androgenesis ve haploid bitki oluşumunu uyarıcı bazı etmenler üzerinde araştırmalar. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı.

Kasim, R., & Kasim, M. U. (2019). Farklı renklerin gücü “Havuç”. International Marmara Sciences Congress (Autumn). *Proceedings Book (Natural and Applied Sciences)* <https://www.researchgate.net/publication/339146062>.

Kaushal, L., Balachandran, S., & Ulaganathan, K.I. J. (2014). Effect of culture media on improving anther culture response of rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 3(1), 2319-1473.

- 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. *Horticulture Science*, 50(11), 1671–1676. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.11.1671>.
- Kielkowska, A., Adamus, A., & Baranski, R. (2018). Haploid and doubled haploid plant production in carrot using induced parthenogenesis and ovule excision *in vitro*. *Methods in Molecular Biology*, 1815, 301–315. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_21.
- Kiraci, 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., Krzyzanowska, D., Strycharczuk, K., Kowalska U., Wolko, B., & Gorecka, K. (2010). Determination of ploidy and homozygosity of carrot plants obtained from anther culture, *Acta Physiol Plant* 33, 401–407. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0559-x>.
- Kiszcak, W., Kowalska U., Kapuscinska A., Burian, M., & Gorecka, K., (2014), Effect of low temperature on in vitro androgenesis of carrot (*Daucus carota* L.). *The Society for In Vitro Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9665-1>.
- 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 Cellular and Developmental Biology Plant*, 51(2), 135–142. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9665-1>.
- Kiszcak, W., Kowalska, U., Kapuścińska, A., Burian, M., & Górecka, K., (2016). Comparison of methods for obtaining doubled haploids of carrot. *Research Institute of Horticulture*. <https://doi.org/10.5586/asbp.3547>.
- Kiszcak, W., Kowalska, U., Kapuścińska, A., Burian, M., & Górecka, K. (2017). Comparison of methods for obtaining doubled haploids of carrot. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 86(2), 1–10. <https://doi.org/10.5586/asbp.3547>.
- Kiszcak, W., Kowalska, U., Burian, M., & Górecka, K. (2018). Induced androgenesis as a biotechnology method for obtaining DH plants in *Daucus carota* L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 6(93), 625–633 <https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1431058>.
- Knapik, E. W., Goodman, A., Ekker, M., Chevrette, M., Delgado, J., Neuhauss, S., & Jacob, H. J. (1998). A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics*, 18(4), 338-343.
- Kron, P., Suda, J., & Husband, B. C. (2007). Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 847-876.

- Kumar, M., Chaudhary, V., Sharma, R., Sirohi, U., & Singh, J. (2018). Advances in biochemical and molecular marker techniques and their applications in genetic studies of orchid. *International. Journal Chemical Study*, 6, 806-822.
- Leus, L., Van Laere, K., & Dewitte, A. (2009). Flow cytometry for plant breeding. *Acta Horticulture* 836, 221–226.
- Litt, M., & Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Humanity Genetics*, 44, 397–401.
- Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(14), 1-37.
- Hu, K. L., Matsubara, S., & Murakami, K. (1993). Haploid Plant Production by Anther Culture in Carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1993, 62(3), 561-565.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65.
- Ojiewo, C. O., Agong, S. G., & Murakami, K., (2006). Chromosome duplication and ploidy level determination in african nightshade *solanum villosum* miller. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81(2), 183–88. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512048>.
- Pellicer, J., & Leitch, I. J. (2014). The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants. *In Molecular Plant Taxonomy*, 279-307.
- Perera, P. I. P., Perera, L., Hoher, V., Verdeil, J. L., Yakandawala, D. M. D., L., & Weerakoon, L. K. (2008). Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 73(4), 429-435. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0592-z>.
- Roy, A. T., Leggett, G., & Koutoulis, A. (2001). *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, 18(10), 858-862. <https://doi.org/10.1007/s002990100364>.
- Salgotra, R. K., & Stewart, C. N. (2020). Functional markers for precision plant breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4792. <https://doi.org/10.3390/ijms21134792>.
- Sarcan, O. (2018) SNP moleküler işaretlerine dayalı havuç genetik haritasının geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281-296.

- Sayılır, A., & Özzambak, E. (2005). Biber anter kültüründe uygun tomurcuk büyüklüğü ile besin ortamı içeriklerinin embriyo verimine etkileri üzerine bir araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat. Fakültesi. Dergisi*, 2005, 42(3),1-11.
- Sharma, K. D., & Nayyar, H. (2016). Regulatory networks in pollen development under cold stress. *Frontiers Plant Science*,7,402. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00402>.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503-517.
- Soydemir, H.E., Yılmaz, A., & Çiftçi, V. (2021). Bitki ıslahında haploid tekniğinin avantajları. ISPEC 8th International Conference on Agriculture, Animal Sciences and Rural Development 24-25 December Bingol, Turkey.
- Stolarczyk, J., & Janick, J. (2011). Carrot: History and Iconography. *Chronica Horticulture*, 51(2), 13–18.
- Şahin, B. (2019). Flow sitometri ile korunga gen bankası aksesyonlarının çekirdek DNA içeriği ve ploidi düzeylerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*,17(16), 6463-6471.
- TÜİK. (2022). Türkiye havuç üretimi. Türkiye İstatistik Kurumu, <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1>.
- Tülek, S., & Dolar, F. S. (2011). Havuçlarda Görülen Depo Hastalıkları ve Yönetimi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2011, 28(2), 187–198.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., & Kuiper, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407–4414.
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213–7218.
- Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J., & Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18, 6531–6535.
- Winter, P., & Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 438-448.
- Xu, Y. (2010). Molecular plant breeding CABI. *International Legume Database and Information Service*. <http://www.ildis.org/LegumeWeb>.

Yıldız, M. (2009). Havuçlarda antosiyanin sentezlenmesini etkileyen genlerin biyosentezi ile mor ve sarı renkleri veren *PI* ve *Y2* genlerinin haritalanması. Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Zhang, D., & Hamazu, Y. (2004). Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (*Daucus carota L.*). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2, 95-100.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge ÇAVUŞOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa 04.09.1994
Yabancı Dil : İngilizce (B1)

Eğitim Durumu
Lise : Şehit Jandarma Er Selim Koçdemir Lisesi
Lisans : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (Tarımsal Biyoteknoloji)
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi (Bahçe Bitkileri)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Bursa TOHUMCULUK A.Ş (19 ay)
BASF Nunhems Netherlands B.V (6 ay)

İletişim (e-posta) : ozge_cvs_94@hotmail.com

Yayımları :