

Havuç Genotiplerinde Anter Kültüründen Gelişen Bitkilerde Haploid Uyartımı

Özge ÇAVUŞOĞLU¹, Meryem İPEK^{2*}

¹Dr. Öğrenci, Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bursa; ORCID: 0000-0003-2320-8587

²Prof. Dr., Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bursa; ORCID: 0000-0002-0609-3442

ÖZ

Havuç, içerdiği zengin vitaminler, mineraller ve yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle insan sağlığı açısından önemli sebze türlerinden biridir. Dünya’da havuç üretimi yaygın olarak hibrit çeşitler kullanılarak yapılmaktadır. Hibrit çeşitlerin üretiminde kullanılan saf hatların geliştirilmesinde, havuç yabancı tozlanan bir tür olduğundan kendilemeyle %100 saf hatların elde edilmesi mümkün değildir. Günümüzde doku kültürü yöntemlerinden biri olan anter kültürü tekniğiyle kısa süre içerisinde homozigot hatların eldesi mümkün olmaktadır. Çalışmada, Hatay siyahı ve Turuncu havuç genotipleri kullanılmıştır. Modifiye B5 besin ortamına her bir petri kabında 50 anter olacak şekilde her genotipten toplamda 2500 anter ekilmiştir. Besin ortamı pH’sı 5.8’e ayarlanmıştır. Ekilen anterler gelişim gözleninceye kadar 27°C’de karanlık ortamda bekletilmişlerdir. Turuncu havuç genotipinden herhangi bir gelişme gözlenmemiştir. Hatay siyahı havuç genotipinde ise 16 anterde kallus oluşturarak bitkicik oluşumu gözlemlenmiştir. Sonrasında kallustan gelişim gösteren bitkicikler rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Ploidy analizleri sonucunda 6 bitkicığın haploid yapıda olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada Hatay siyahı havuç genotipinde haploid uyartımının turuncu havuç genotipine göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ülkemiz sebzecilik ıslahı açısından bu tekniğin farklı havuç genotiplerinde geliştirilmesi ve protokollerin optimize edilmesi ıslah çalışmalarını için büyük önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Anter kültürü, *Daucus carota* L., haploit, B5 besin ortamı

Haploid Induction in Plants Developed from Anther Culture in Carrot Genotypes

ABSTRACT

Carrot is one of the important vegetable species for human health due to its rich vitamins, minerals and high antioxidant capacity. Carrot production in the world is widely carried out using hybrid varieties. The development of pure lines used in the production of hybrid varieties, it is not possible to obtain 100% pure lines by inbreeding, because carrots are a cross pollinated species. Nowadays, it is possible to obtain homozygous lines in a short time by anther culture technique, which is one of the tissue culture methods. In this study, Hatay black and orange carrot genotypes were used. A total of 2500 anthers from each genotype were planted in a modified B5 nutrient medium with 50 anthers in each petri dish. The pH of the medium was adjusted to 5.8. The planted anthers were kept in the dark at 27°C until development was observed. Callus development was not observed in any anthers obtained from orange carrot genotype. On the other hand, callus formation was observed in 16 anthers planted from Hatay black carrot genotype. Afterwards, the plantlets developed from the callus were transferred to regeneration medium. Ploidy analysis revealed that 6 plantlets were haploid. In this study, it was observed that haploid induction was higher in the Hatay black carrot genotype than in the orange carrot genotype. In terms of vegetable breeding in our country, the development of this technique in different carrot genotypes and the optimization of the protocols are of great importance for breeding studies.

Keywords: Anther culture, *Daucus carota* L., haploid, B5 nutrient medium

GİRİŞ

Havuç, (*Daucus carota* L.) Apiaceae familyasının diploid ($2n=2x=18$) genomlu iki yıllık otsu türü olarak yenilebilir bir köke sahiptir [13]. Havucun kökü iyi bir karotenoid, vitamin, mineral ve antioksidan kaynağıdır [4]. β -karotenden A vitamini dönüşüm, diğer karotenoidlerle kıyaslandığında daha hızlıdır ve havuçlar insan beslenmesinde toplam A vitamini ihtiyacının %14 ile %17’sine katkıda bulunmaktadır. 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 [7]. Zengin besin bileşenlerine sahip havucun tüketimi, üretim miktarı ve alanı gün geçtikçe artmaktadır [10]. Havuçta hibrit çeşitlerin bin dokuz yüz yetmişlerden itibaren kullanımı yaygınlaşmıştır. Geleneksel ıslah yöntemleri kullanılarak hibrit çeşitleri elde etmek için ebeveyn hatları geliştirme süreci zaman alıcı ve pahalıdır. Havuç çiçekleri kontrol edilemeyecek

*Sorumlu yazar / Corresponding author: msipek@uludag.edu.tr

kadar küçük olduğundan, havuçta melezleme yoluyla yeni çeşitlerin geliştirilmesi zordur. Ayrıca geleneksel ıslah yöntemleriyle %100 saf hatların eldesi mümkün olmamaktadır. Yüzde yüz saf hatların elde edilmesi yeni F₁ çeşitlerinin geliştirilmesi için kilit noktadır [1, 8]. 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 [3]. 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. Bitki ıslahında biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesiyle birlikte in vitro koşullar altında saf hatların elde edilebilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu bağlamda bitki doku kültürü tekniklerinden biri olan anter kültürü tekniği kullanılarak saf hatların eldesi kısa süre içerisinde gerçekleştirilebilmektedir. Geleneksel ıslah süreci düşünüldüğünde zaman, iş gücü ve maliyet açısından bitki doku kültürü tekniklerinin kullanılması ıslahçıya önemli avantajlar sağlamaktadır. Anter kültürü tekniği, kullanılan besin ortamı bileşenleri, anterlerin alındığı dönem, sıcaklık, gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bu nedenle oluşturulacak protokollerin optimize edilmesi anter kültüründeki başarıyı etkileyeceğinden büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, Hatay siyahı ve turuncu havuç genotiplerinde anter kültürü tekniği kullanılarak haploid bitki uyartımı incelenmiştir. Ayrıca rejenerasyon döneminde alınan bitki örneklerinden 6 adet bitkiciğin haploid yapıda olduğu tespit edilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Anter kültürü için turuncu ve Hatay siyahı tipi havuç genotiplerinin çiçekleri bitkisel materyal olarak kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Havuç genotiplerinin çiçek görünümü A) Turuncu ve B) Hatay siyahı tipi havuç genotiplerinin çiçek görüntüleri

Metot

1. Uygun aşamaya gelen çiçek tomurcuklarının belirlenmesi: Çiçek tomurcuklarının içerisinde bulunan anterlerin mikrospor gelişim aşaması asetokarmin boyama tekniği ile belirlenmiştir. Asetokarmin çözeltisi; 55 mL ddH₂O, 45 mL asetik asit ve 0,5 gram asetokarmin kullanılarak hazırlanmıştır. Üç ila beş adet anter lam üzerine yerleştirildikten sonra üzerine 1-2 damla asetokarmin damlatılarak iyice ezilen anterlerin üzerine lamel kapatılmış ışık mikroskobu altında immersiyon yağı kullanılarak 100X objektif ile incelenmiştir.

2. 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 sakaroz ve 6,5 g.L⁻¹ agar kullanılmıştır [2]. 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. 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.

4. Anterlerin besin ortamına ekilmesi: Sterilizasyon işleminden sonra anterler mikroskop altında çiçek tomurcuklarından filament kısmı alınmadan sadece anter kısmı ayrılmış ve besin ortamına ekilmiştir. Bu aşamada 0,5-0,9 mm boyutundaki çiçek tomurcuklarından çıkarılan anterler kullanılmıştır. Çalışmada her genotipten 2500 adet anter kullanılmıştır. Her bir petri kabına 50 adet anter ekilmiştir. Kontaminasyonun engellenmesi için petri kapları parafilm ile kapatılmış ve 27°C'de karanlık ortamda anterler gelişim gösterinceye kadar bekletilmiştir.

5. Gelişim gösteren anterlerin rejenerasyon ortamına aktarılması: Kallus gelişimi gösteren anterler rejenerasyon ortamına (%2 sakaroz içeren Gamborg B5 besin ortamı, pH 6,0) aktarılarak 25°C ve 16 saat ışık/8 saat karanlık olan iklim kabininde büyütülmüştür. Anterlerden gelişen bitkicikler 750 mL'lik cam kavanozlardaki rejenerasyon ortamına dikilmişlerdir.

6. Bitkilerin vermikülit ortamında köklendirilmesi: Rejenerasyon ortamında gelişen

bitkilerin daha iyi köklenmesi amacıyla yarı yarıya sıvı B5 besin ortamı içeren vermikülit (750 mL'lik cam kavanozun 1/3 vermikülit ile doldurularak) otoklavlandıktan sonra bitkiler distile suyla temizlenerek bu ortama dikilmiştir. Vermikülit ortamı bitkilerin daha iyi köklenerek dış ortama alışmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

7. *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 gelişen bitkiler çiçeklendirme amacıyla araziye dikilmiştir.

8. *Haploit bitkilerin belirlenmesi*: Çalışmada anter kültüründen gelişen 10 havuç bitkisi ve diploit yapıda olduğu bilinen 5 kontrol havuç bitkisinde Futterer ve diğerlerinin [6] geliştirdiği yönteme göre DNA izolasyonu yapılmış ve daha sonra Cavagnora ve diğerleri [5] tarafından geliştirilen 8 SSR primer kombinasyonu kullanılarak PCR reaksiyonları yapılmıştır. Daha sonra aday haploid/katlanmış bitkiler flow sitometri ile analiz edilmiştir.

BULGULAR

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.

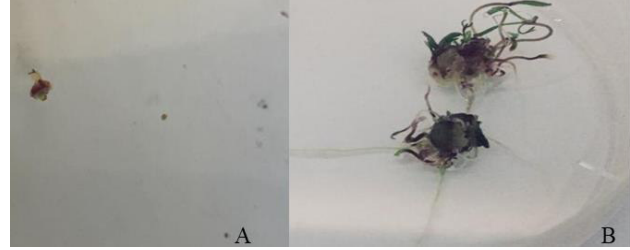
Anter Kültürü Bulguları

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. Hatay siyahı havuç genotipinden anterlerde gelişim B5 besin ortamına konulduktan 10-12 hafta sonra gözlenmiştir. Bu gelişim tüm anterlerde kallus oluşturarak gerçekleşmiştir (Şekil 2).

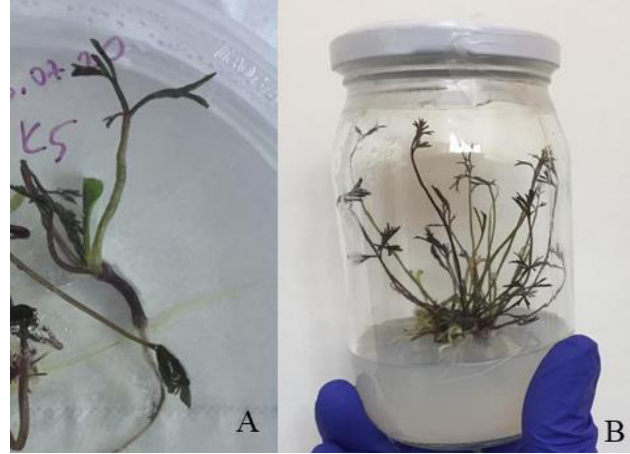
Her bir kallustan Kotiledon yaprağı oluşturan bitkicikler seçilerek B5 besin ortamı ve %2'lik sakaroz bulunan 350 mL'lik cam kavanozlara dikilmiştir (Şekil 3).

Rejenerasyon ortamında büyüyen bitkiciklerin daha iyi köklenmesi için 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). Vermikülit ortamında kök gelişimi sağlandıktan sonra bitkileri dış ortama alıştırma aşamasına geçilmiştir.



Şekil 2. Anter kültürü ile androgenik havuç bitkiciklerinin oluşumu A) Besin ortamında gelişim gösteren bir anter B) Anterden kallus ve bitki gelişimi



Şekil 3. Gelişim gösteren bitkiciklerin rejenerasyon ortamına aktarılması A) Kallustan kotiledon yaprağı oluşturan bitkicikler B) Rejenerasyon ortamına aktarılmış bitkicik



Şekil 4. Vermikülit ortamında köklenmiş havuç bitkicigi

Haploid Bitkilerin Belirlenmesi

Rejenere olan bitkilerde haploit/dihaploit bitkilerin belirlenmesi ilk aşamada SSR moleküler markörlerle gerçekleştirilmiştir. Test edilen sekiz SSR marköründen yedi tanesi anterlerden gelişen bitkilerde monomorfik bir bant profili vermiştir. Bu sonuç, test edilen yedi SSR markörünün donör Hatay siyahı havuç genotopinde polimorfik olmadığını göstermektedir. Sekiz SSR marköründen bir tanesi ise anterlerden gelişen bitkilerde polimorfik bir bant profili vermiştir. Bu SSR marköründe bazı rejenere olan bitkiler heterozigot bant profili verirken bazı bitkiler homozigot dominant veya homozigot resesif bant bant profili göstermiştir. Homozigot olarak belirlenen bitkilerin ploidi seviyesi flow sitometri ile analiz edilmiş ve bu bitkilerin genelde diploit, bazılarının ise triploit genoma sahip oldukları görülmüştür. Bu sonuç havuçta anter kültürü aşamalarında spontane kromozom katlanması oranının yüksek olduğu ve SSR markörle belirlenen homozigot bitkilerin dihaploit genoma sahip olduğunu göstermektedir.

TARTIŞMA

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 edilerek uygun protokollerin oluşturulması gereklidir.

Asetokarmin boyama ile hem polen canlılığı hem de mikrosporların uygun aşamaya gelip gelmediği belirlenerek aynı boyuta sahip anterlerin ekilmesi başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. Asetokarmin boyama yöntemiyle parafin yöntemi kadar net görüntüler alınamamasına rağmen Karakullukçunun [9] patlıcanda, Sayılır ve Özzambak [12]'nin biberde yaptığı çalışmalarda belirttikleri gibi yeterli sonuçlar verebilmektedir. Çalışmamızda havuç bitkisinde tek çekirdekli mikrospor aşaması asetokarmin boyama yöntemiyle belirlenmiştir.

Andersen vd. [2] 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 çalışmada 0,5-0,9 mm çapındaki çiçek tomurcukları kullanılmaya çalışılmış ve asetokarmin boyama ile yaptığımız kontrollerde polenlerin tek çekirdekli aşamada oldukları görülmüştür.

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 [11]. Bu çalışmada 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.

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

SONUÇ

Ülkemiz bitkisel çeşitlilik bakımından geniş bir yelpazeye sahiptir. Klasik ıslah yöntemleriyle çeşit geliştirme yaygın olarak kullanılmaktadır. Havuçta kendileme yolu ile %100 saf hatların elde edilmesi mümkün olmamakla birlikte, kendileme depresyonu gibi nedenlerle bu süreç sektöre uğramaktadır. 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.

KAYNAKLAR

1. 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>.
2. 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.
3. Baydar, H. 2016. Bitki ıslahında genetiğin yeri ve önemi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Isparta.
 4. Bulantekin, Ö., Düzalan, B.Ö., Kuşçu, A. 2020. Meyve sebze tüketiminin diyabette önemi. *Eurasian Journal Humanity Science* 3(2):55-61.
 5. 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.
 6. 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*, pp:215-263.
 7. Haq, R., Prasad, K. 2015. Nutritional and processing aspects of carrot (*Daucus carota* L.)-a review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment* 01(01):1-14. <https://doi.org/10.46370/sajfte.2015.v01i01.01>.
 8. 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>.
 9. 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, Ankara.
 10. 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.
 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>.
 12. 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* 42(3):1-11.
 13. Tülek, S., Dolar, F.S. 2011. Havuçlarda görülen depo hastalıkları ve yönetimi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 28(2):187-198.