



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**HAPLOİD VE DİPLOİD MISIR BİTKİLERİNDE MORFOLOJİK, SİTOLOJİK  
VE FİZYOLOJİK FARKLILIKLARIN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TALHA TUNÇ**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. FATİH KAHRIMAN**

**ÇANAKKALE – 2023**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**HAPLOİD VE DİPLOİD MISIR BİTKİLERİNDE MORFOLOJİK, SİTOLOJİK  
VE FİZYOLOJİK FARKLILIKLARIN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TALHA TUNÇ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. FATİH KAHRIMAN

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2021-3823

ÇANAKKALE – 2023



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Talha TUNÇ tarafından Prof. Dr. Fatih KAHRIMAN yönetiminde hazırlanan ve **29/11/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Haploid ve Diploid Mısır Bitkilerinde Morfolojik, Sitolojik ve Fizyolojik Farklılıkların İncelenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tarla Bitkileri Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Prof. Dr. Fatih KAHRIMAN  
(Danışman)

.....

Prof. Dr. Harun BAYTEKİN

.....

Doç. Dr. Alpay BALKAN

.....

Tez No : 10603454

Tez Savunma Tarihi : 29/11/2023

.....  
Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL  
Enstitü Müdürü

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

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

(İmza)

Talha TUNÇ

29/11/2023

## TEŞEKKÜR

Tezimin ortaya çıkması için, çalıőmam boyunca hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ve tecrübesi ile bana yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Fatih KAHRIMAN'a, deneysel çalıőmaların yürütölmesi için sađlamıő olduğu olanaklardan dolayı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi'ne, tez süresinde olduğu gibi hayatımın her anında her daim destek olan değerli eőime ve aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Bu alıőmaya FYL-2021-3823 no'lu proje kapsamında maddi destek veren ÇOMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teőekkürü borç bilirim.

Talha TUNÇ  
anakkale, Kasım 2023

**ÖZET**  
**HAPLOİD VE DİPLOİD MISIR BİTKİLERİNDE MORFOLOJİK, SİTOLOJİK**  
**VE FİZYOLOJİK FARKLILIKLARIN İNCELENMESİ**

Talha TUNÇ  
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi  
Danışman: Prof. Dr. Fatih KAHRIMAN

29/11/2023, 29

Mısırdaki *in vivo* katlanmış haploid tekniği, homozigot hat geliştirme, genetik çeşitlilik çalışmaları gibi farklı alanlarda kullanılan bir tekniktir. Bu teknik kullanılarak oluşturulan örneklerinin ploidi sınıfının belirlenmesi *in vivo* katlanmış haploid tekniğinde önemli adımlardan birisidir. Bu adımda haploidlerin diğerlerinden ayrılması amacıyla tohum farklı yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu çalışma mısırdaki haploid ve diploid örneklerin morfolojik ve fizyolojik özellikler bakımından karşılaştırılması ve bu özelliklerin örneklerin ploidi seviyelerine göre ayırımında kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Ayrıca sitogenetik analizler ile örneklerin gerçek ploidi seviyeleri tespit edilerek incelenen özelliklerin sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrasındaki farklılıkların incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada donör olarak iki mısır genotipi (B73, Hya×B73) bir indirgeyici hat ile melezlenmiş ve elde edilen tohumlar Navajo renk markörüne göre sınıflanmıştır. Gözle ayırımı yapılan tohumların tohum morfometrisine yönelik olarak tohum boyu, tohum eni, tohum çevresi ile tek tohum ağırlığı belirlenmiştir. Ardından bu örnekler çimlendirilerek kök uzunluğu, sürgün uzunluğu ve kök sayısı ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm yapılan bitkilerden kök ucu örneği alınmış ve sitolojik analizler ile örneklerin kromozom sayıları belirlenmiştir. Daha sonra aynı örnekler fidelenmiş ve sera şartlarına şartılarak bitki boyu, yaprak sayısı, stoma boyu, stoma sayısı ve SPAD ölçümleri yapılmıştır. İncelenen özelliklerin büyük kısmında haploid örnekler için değerler diploid örneklerden düşük bulunmuştur. Genotiplere göre haploid/diploid örnekler arasındaki farklar değişkenlik göstermiş ve hibrit donör materyalin bu bakımdan daha belirgin farka sahip olduğu tespit

edilmiştir. Sitogenetik doğrulamaya göre göz ile ayırım işleminin ayırım başarısının B73 hattı için %87, Hya×B73 melezi için ise %92 olarak hesaplanmıştır. Her iki materyal için de diploid örneklerin haploidler örneklere göre daha başarılı şekilde ayrılabilirdiği saptanmıştır. Ayrıca haploid ve diploid örnekleri ayırt etmek için kök uzunluğu ve tohum çevresi özelliklerinin etkin şekilde kullanılabilirdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ploidi seviyesi, Homozigot hat, *Zea mays*





## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF MORPHOLOGICAL, CYTOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL DIFFERENCES IN HAPLOID AND DIPLOID MAIZE PLANTS

Talha TUNÇ

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science in Field Crops

Advisor: Prof. Dr. Fatih KAHRIMAN

29/11/2023, 29

*In vivo* doubled haploid technique is used for different fields such as homozygous line development and genetic diversity studies in maize. Determination of the ploidy level of samples generated using this technique is one of the important steps in the *in vivo* doubled haploid technique. In this step, different methods are utilized to distinguish haploids from others. This study was carried out to compare haploid and diploid samples in maize in terms of morphological and physiological traits and to determine whether these traits can be used to differentiate the samples according to their ploidy levels. In addition, it was aimed to determine the actual ploidy levels of the samples by cytogenetic analyses and to examine the differences of the studied traits before and after cytogenetic verification. In the study, two maize genotypes (B73, Hya×B73) as donors were crossed with an inducer line and the seeds obtained were classified according to the Navajo color marker. Seed length, seed width, seed circumference and single seed weight were determined for seed morphometry of the visually separated seeds. Then these samples were germinated and root length, shoot length and root number were measured. Root tip samples were taken from the measured plants and chromosome numbers of the samples were determined by cytological analysis. Then, the same samples were planted and transferred to greenhouse conditions and plant height, leaf number, stomatal length, stomatal number and SPAD were measured. In most of the traits examined, the values of haploid samples were lower than diploid samples. The differences between haploid/diploid samples varied according to genotypes and hybrid donor material

was found to have more significant differences in this respect. According to the cytogenetic verification, the discrimination success of the visual separation was calculated as 87% for the B73 line and 92% for the Hya×B73 hybrid. For both donors, it was determined that diploid samples could be separated more successfully than haploid samples. It was also determined that root length and seed circumference traits can be used effectively to separate haploid and diploid samples.

**Keywords:** Ploidy level, Homozygous line, *Zea mays*



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv

### BİRİNCİ BÖLÜM

#### GİRİŞ

1.1. Mısır ile İlgili Genel Bilgiler.....	1
1.2. Haploid Bitki Elde Etme Yöntemleri.....	2
1.3. Haploid Seçim Yöntemleri.....	3
1.4. Çalışmanın Amacı.....	5

İKİNCİ BÖLÜM  
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Önceki Çalışmalar.....	6
-----------------------------	---

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM  
MATERYAL YÖNTEM

3.1. Materyal.....	9
3.2. Yöntem.....	10
3.2.1. Tohum Örneklerinde Morfolojik Ölçümlerin Yapılması.....	10
3.2.2. Fizyolojik Ölçümler.....	10
3.2.3. Sitogenetik Analizler.....	12
3.2.4. Verilerin Değerlendirilmesi.....	13

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM  
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Sitogenetik Doğrulama.....	14
4.2. Morfolojik Ölçümler.....	16
4.2.1. Tohum Morfolojisine Yönelik Ölçümler.....	16
4.2.2. Çimlendirilmiş Tohum Özelliklerine Yönelik Ölçümler.....	18
4.2.3. Bitki Morfolojisine Yönelik Ölçümler.....	19

4.2.4 Fizyolojik Ölçümler.....	20
4.3. Haploid/Diploid Örnek Ayrımına Yönelik Özelliklerin Seçimi.....	22

## BEŞİNCİ BÖLÜM SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuç ve Öneriler .....	25
KAYNAKÇA .....	26
ÖZGEÇMİŞ .....	I

## SİMGELER VE KISALTMALAR

CIMMYT	Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırmalar Merkezi (International Maize and Wheat Improvement Center)
D	Diploid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
H	Haploid
HIR	Haploid İndirgeme Oranı
$\mu\text{m}$	Mikrometre
KH	Katlanmış Haploid
NPD	Negatif Tahmin Değeri
PTD	Pozitif Tahmin Değeri
R1-nj	R1-Navajo

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	Tez çalışmasında kullanılan genotipler	9
<b>Tablo 2</b>	Sitogenetik analizler ile doğrulanmış haploid diploid sayılarının donör materyallere göre değişimi	15
<b>Tablo 3</b>	Sitogenetik analizler ile doğrulanmış haploid diploid sayılarının donör materyallere göre değişimi	15
<b>Tablo 4</b>	Tohum morfolojisine yönelik ölçümler	16
<b>Tablo 5</b>	Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası tohum eni, tohum boyu, tohum çevresi ve tek tohum ağırlığı için haploid ve diploid örneklerin farklarını gösteren tablo	17
<b>Tablo 6</b>	Çimlenme özelliklerine ilişkin varyans analizi sonuçları	18
<b>Tablo 7</b>	Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası kök uzunluğu, kök sayısı ve sürgün uzunluğu için haploid ve diploid örneklerin farklarını gösteren tablo	19
<b>Tablo 8</b>	Bitki morfolojisi ölçümlerine ilişkin varyans analiz sonuçları	19
<b>Tablo 9</b>	Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası bitki boyu ve yaprak sayısı için haploid ve diploid örneklerin farklarını gösteren tablo	20
<b>Tablo 10</b>	Fizyolojik ölçümlerle ilgili varyans analizi sonuçları	21

<b>Tablo 11</b>	Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası SPAD değeri, stoma boyu ve stoma sayısı için haploid ve diploid örneklerin farklarını gösteren tablo	21
-----------------	--	----





## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim No</b>	<b>Resim Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Resim 1</b>	Haploid-diploid tohum ayrımı	4
<b>Resim 2</b>	Sera çalışmasında bir görüntü	11
<b>Resim 3</b>	Stoma ölçümünde kullanılan dijital görüntü örneği	11
<b>Resim 4</b>	Haploid (solda) ve diploid (sağda) örneklerde kromozom sayımı için alınan örnek görüntüleri	14
<b>Resim 5</b>	Tohum örneklerinin R1-nj markörüne göre ayrılmış sınıfına göre diğer değişkenler üzerinden ayrılması amacıyla oluşturulan regresyon ve karar ağaçları grafiği	22
<b>Resim 6</b>	Tohum örneklerinin sitolojik analizlere göre ayrılmış sınıfına göre diğer değişkenler üzerinden ayrılması amacıyla oluşturulan regresyon ve karar ağaçları grafiği	23

# BİRİNCİ BÖLÜM

## GİRİŞ

### 1.1. Mısır ile İlgili Genel Bilgiler

Mısır yüksek verimli ve birim alandan yüksek kuru madde üreten buğdaygiller (*Gramineae*) familyasına giren bir C4 bitkisidir (Kırtok, 1998). Mısır bitkisi temel tahıl türleri arasında üretim miktarı bakımından birinci sırada, ekim alanı bakımından ikinci sırada yer almaktadır. Mısır bitkisinin adaptasyon kabiliyetinin yüksek olması ve yüksek verim potansiyeli gibi faktörler nedeniyle yeryüzünde geniş bir yayılma alanı bulmuştur (Yaşak vd., 2003; Alan vd., 2005).

Çeşitli endüstri dallarında hammadde olarak kullanılmasından dolayı mısır bitkisine olan talep dünya nüfusunun artışına paralel olarak artmaktadır. Bu talebi karşılamak için yüksek verimli ve kaliteli çeşitlerin ıslah edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Kahrıman vd., 2013). Sürdürülebilir üretimi sağlayabilmenin en önemli temellerinden biri de ticari çeşit sayısının artırılmasıdır. Bunun için yüksek kalitede verimli çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Yüksek kalitede ve verimli mısır melez çeşitlerin geliştirilmesi için ise üstün nitelikli ebeveyn hatların ıslah edilmesine ihtiyaç vardır (Dwivedi vd., 2015).

Melez mısır ıslah programlarında ilk aşama homozigot ebeveyn hatların geliştirilmesidir (Cerit vd., 2016). Geliştirilen homozigot hatlar arasında melezleme yapılarak melez çeşit adayları oluşturulmaktadır. Klasik bitki ıslahı, çevre koşulları ile birebir bağlantılı olmasından dolayı bir çeşidin ıslah edilebilmesi için uzun yıllar gerekmektedir. Ayrıca uzun süren çalışmalar sonrasında yine de yüzde yüz homozigot hatlar elde etmek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle bitki ıslahçıları istenilen düzeyde homozigotluk oranını yakalamak, zaman tasarrufu sağlamak, maliyetleri azaltmak için yeni ıslah teknolojilerine başvurmuşlardır (Cengiz ve Korkut., 2016). Bu yeni ıslah teknolojilerinden birisi in vivo katlanmış haploid tekniğidir. Mısır ıslah çalışmalarında in vivo haploid tekniği kullanılarak homozigot hatların elde edilmesine yönelik çalışmalar oldukça eskiye dayanmaktadır (Chase, 1969). Yapılan ıslah çalışmalarında katlanmış haploid tekniği ile daha kısa sürede homozigot hatlar geliştirilebilmekte ve daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Bu teknik ile ıslah programlarının giderleri azaltılmış ve

harcanan iş gücünden tasarruf sağlanmıştır. Bu nedenle ticari açıdan hibrit mısır çeşit geliştirme çalışmalarında *in vivo* katlanmış haploid olan ilgi gittikçe artmaktadır.

## 1.2. Haploid Bitki Elde Etme Yöntemleri

Haploid bitki elde etmek için iki farklı teknik kullanılmaktadır. Bunlar “*in vitro*” ve “*in vivo*” teknikleridir. *In vitro* yöntemle katlanmış haploid hatların geliştirilme işlemi, mikrospor, anter ve yumurtalık gibi gametik eksplantlar kullanılarak yapay besi ortamlarında gerçekleştirmektedir. Bunların yanı sıra anter, mikrospor veya polenlere sıcaklık uygulayarak (Mathur vd., 1980), polen örneklerine ışın muamelesi (Mathur vd., 1976), koçan püsküllerine kimyasal muamele (Zuoyu ve Mingguang, 1984) gibi çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Ancak bu yöntemlerde genetik etkiler nedeni ile baları oranı düşüktür (Cerit vd., 2016).

*In vivo* katlanmış haploid tekniği bilimsel ve uygulamalı alanda mısır ıslah programlarında kullanımı gittikçe yaygınlaşmaya başlayan bir metottur. Bu metodun uygulanması indirgeyici (Induzer) adı verilen özel hatların kullanımına dayanmaktadır. *In vivo* katlanmış haploid tekniğinde tozlandığı bitki üzerinde oluşan haploid tohum oluşumuna imkân vermektedir. Haploid tohumlar göz ile tohum renklenmesine göre ayrıldıktan sonra çimlendirilmekte ve çimlendirilen tohumlar özel kimyasallarla muamele edilerek kromozom katlanması gerçekleştirilmekte ve bu tohumlardan elde edilen bitkiler kendileneren %100 homozigot hatlar elde edilmektedir (Geiger ve Gordillo 2009). Günümüzde ticari olarak geliştirilmiş hatların büyük kısmı *in vivo* katlanmış haploid tekniği ile elde edilmiş olup diğer hatların saf hat geliştirmede daha az etkili olduğu raporlanmıştır (Geiger ve Gordillo 2009). Haploidler ve katlanmış haploidler (KH), modern mısır ıslahında ıslah sürecini kısalttıkları ve ıslah etkinliğini arttırdıkları için büyük öneme sahiptirler (Chase ve Nanda, 1969). Katlanmış haploid (KH) tekniğinde %100 homozigot hat geliştirilme işlemi, haploid hücrelerde bulunan kromozom sayısının farklı teknikler kullanılarak katlar şeklinde artırılmasına dayanmaktadır. Bu teknikte başarı elde edilebilmesi için öncelikte haploid tohumların elde edilmesi gerekmektedir.

*In-vivo* katlanmış haploid tekniği pratikte iki farklı şekilde uygulanabilmektedir. Bunlar, “maternal” ve “paternal” katlanmış haploid olarak isimlendirilen iki alt yöntemdir. Bunlardan maternal haploid yönteminde indirgeyici hat tozlayıcı olarak kullanılırken

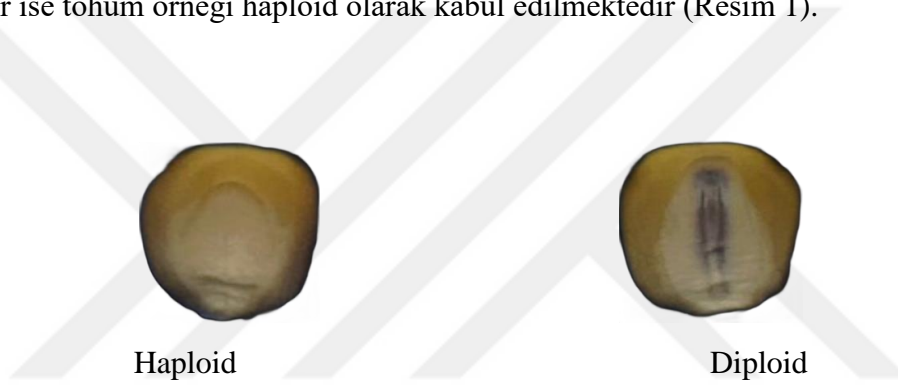
paternal haploid yönteminde indirgeyici hat donör yani toz alıcı olarak kullanılmaktadır (Coe,1959; Kermicle, 1969). Haploid tohum oluşumu bakımından in-vivo maternal haploid tekniği paternal haploid tekniği yöntemine göre daha başarılıdır. (Lashermes ve Beckert, 1988). Bu nedenle in vivo katlanmış maternal haploid tekniği genel bilimsel literatürde daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

*In vivo* maternal katlanmış haploid tekniğinin uygulama basamakları temel olarak dört adımdan oluşmaktadır. Bunlar; indüksiyon melezlemesi, haploid örneklerin seçimi, kromozom katlaması ve KH0 tohumların elde edilmesidir (Chaikam vd. 2019). İndüksiyon melezlemesinde katlanmış haploid elde edebilmek için kullanılacak kaynak genotip (donör) ana materyal olarak kullanılmak suretiyle, indirgeyici veya induzer olarak isimlendirilen özel bir mısır hattıyla melezlenmektedir. İndirgeyici hatlar haploid tanelerde özel bir renklenmeye sebep olarak haploid tanelerin tanımlanmasına olanak sağlayan özel genotiplerdir. İkinci aşamada indüksiyon melezlemesinden elde edilen tohum örneklerinden haploid olanlar farklı yöntemlerle ayrılmaktadır. Bu aşamada indirgeyicilerin buldukları özel genler aracılığı ile donör materyalde tohum ya da kök renklenmesine dayalı görsel markörlere dayalı olarak haploid örnekler diğerlerinden ayrılabilir. Üçüncü aşamada kromozom katlaması farklı yöntemler ile gerçekleştirilmektedir. Bu aşamada fertil olmayan haploid taneler fertilite olması için çimlendirildikten sonra kromozom sayılarını artırmak amacıyla farklı uygulamalara tabi tutulmaktadır Son aşamada ise elde edilen katlanmış haploid bitkilerin çoğaltımı için kendileme işlemi yapılarak KH0 tohumlar elde edilmektedir (Geiger, 2009; Trentin vd., 2020). Bu aşamalardan en önemli olanlardan birisi haploid seçimidir.

### **1.3. Haploid Seçim Yöntemleri**

Haploid örnekler tohum ya da erken fide aşamasında farklı fenotipik belirteçlerle diploid tohumlardan veya yetişkin aşamada bitki özelliklerindeki farklılıklardan kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Chaikam vd., 2015). Bu amaçla, haploid indirgeyici hatlarla çaprazlamadan sonra elde edilen tohumlar embriyo ve endosperm bölgelerindeki antosiyanin oluşumuna bağlı olarak ayrılabilir. Bu amaç tohumun endosperm kısmında (taç kısmında) renklenme var ise ve embriyo bölgesinde renklenme var ise bu örnekler haploid olarak tanımlanmaktadır (Nanda ve Chase, 1966).

Haploid belirlenmesinde tanenin renklenmesi, endosperm ve embriyo renklenmesine göre gerçekleştirilmektedir. Eğer sadece endospermde renklenme varsa hücre haploid kabul edilmektedir. Embriyoda ve endospermde renklenme varsa tohum diploid olarak kabul edilir. Tohum renklenmesi, R1-nj geni tarafından kontrol edilmektedir ve bu gen aleuron ve skutellumda yoğun bir renk oluşumuna yol açmaktadır. Bu genin etkisini C1-I inhibitör engelleyebilmektedir ve donör materyaller C1-I genini taşıması halinde beklenen tohum renklenmesi görülmemektedir (Geiger ve Gordillo, 2009). Bu yöntemin biyolojik mekanizmasının, eksik sperm hücresi ile yumurta hücresinin birleşmesi ve haploid embriyogenezisi tetiklemesiyle ilgili olduğu kabul edilmektedir. Eğer tohumlarda embriyo bölgesinin her ikisinde de renklenme varsa diploid, yalnızca taç kısmında renklenme görülüyor ise tohum örneği haploid olarak kabul edilmektedir (Resim 1).



Resim 1. Haploid-diploid tohum ayrımı

Tohum döneminde haploid genotipleri diploidlerden ayırmak için antosiyanin renklenmesine neden olan bu markör kullanılmaktadır (Cengiz ve Korkut, 2016). Bu renklenme indüksiyon melezlemesi sırasında tohum aşamasında haploid tohumların kolay ve hızlı tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Chaikam vd., 2015). Göz ile renk markörüne dayalı olarak yapılan haploid-diploid tohum ayrımı flow sitometri cihazı ile, polen boylarının ölçülmesi, karyotipik çalışmalarla kromozom sayılarıyla belirlenmesi gibi farklı yöntemlerle de gerçekleştirilmektedir (Röber vd., 2005; Cerit vd., 2016). In vivo katlanmış haploid tekniğinde temel hedef hedeflenen haploid tohum elde edilmesidir. Bu yöntemde haploid ve diploid örneklerin ayrımı bu tekniğin başarısına etki eden en önemli adımlardan birisidir. Dolayısıyla bu aşamada bitkilerin farklı tekniklerle ayrımına veya seçilen potansiyel haploid doğrulanmasına ihtiyaç vardır. Bu amaçla bilimsel çalışmalarda farklı tekniklerden yararlanılmıştır. Kullanılan başlıca tekniklerin dayandığı ölçümler;

- Morfolojik gözlemler (Tohum renklenmesi, tohum iriliği)

- Çimlenme özellikleri (Kök sayısı, kök uzunluğu, kök rengi)
- Sitogenetik ölçümler (Kromozom sayısı, hücre yapısı)
- Fizyolojik gözlemler (Stoma özellikleri, klorofil içeriği)

Yapılan bilimsel çalışmalarda bu tekniklerin ya birisi ya da bir kaç birlikt kullanılmıştır. Ancak literatürde mısırdaki haploid ayrımı için başarılı sonuç verdiği ortaya konulan metotların bir arada kullanıldığı bir araştırmaya ulaşamamıştır. Yapılan farklı ölçümlerden hangilerinin haploid/diploid örneklerin ayrımında daha etkili olduğu ise merak konusudur.

#### **1.4. Çalışmanın Amacı**

Bu çalışmanın amacı in vivo katlanmış haploid tekniğinde morfolojik, fizyolojik ve sitolojik ölçümlere dayalı olarak haploid ve diploid örneklerin farklarının incelenmesidir. Bunun yanı sıra incelenen özellikler arasında haploid örneklerin ayrımında etkin olarak kullanılabilecek özelliklerin belirlenmesi de diğer amaçtır.

## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Önceki Çalışmalar

Deimling vd., (1997), çimlenmiş haploid tohumlarda ilk kök oluşumu ve koleoptili üzerinde kesim yaparak, %0,06 konsantrasyonlu kolşisin ve %0,5 DMSO solüsyonunda ışıksız koşullarda bekletmeyi, 48 saat boyunca uygulayarak kromozom katlama etkinliğini arttırmışlardır. Yapay kromozom katlamasından sonra çimlenmiş materyal özenle yıkanmış ve serada, ilk günler yüksek nemde olacak şekilde büyütülerek 5-6 yaprak evresine kadar yetiştirilmiştir. Birkaç hafta sonra bitkiler tarlaya dikilmiştir. Bu yaklaşım sayesinde, %72,5 oranında canlı bitki, canlı bitkilerden %50'si fertil bitki, fertil bitkilerden %39'u kendileme yeteneğine sahip bitki ve %27,3'ü kendileme yoluyla elde edilen tohumlu bitki elde edilmiştir.

Eder ve Chalyk (2002) ile Deimling ve ekibinin (1997) yöntemlerini, çeşitli donör genotiplerinden elde edilen haploid tohumlara uygulayarak ortalama %49 oranında kromozom katlaması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada karşılaştırma amacıyla, 3-4 yaprak evresinde enjeksiyon yoluyla kolşisin uygulama yöntemi de test edilmiş ve yalnızca bitkilerin %16'sında kromozom katlaması başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Her iki metotla gerçekleştirilen kromozom katlamasına sahip materyallerde, polen döken bitkilerin %50-60'ında başarılı kendileme işlemleri gerçekleştirilebilmiştir.

Tang vd. (2009), haploid indirgeyici olan Stock 6 hattını kullanarak özel genotiplerde haploidlerin üretilmesini ve sitogenetik analizlerle üretilen bu hatların daha kapsamlı bir şekilde incelemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada antosiyanin markör geni olan R1-nj ile yaklaşık 14 bin mısır tohumu taranmış ve haploid tohumlar seçilmiştir. Seçilmiş haploid mısırlar ile ( $n=x=10$ ) üzerinde ayrıntılı sitogenetik çalışmalar yapılmıştır. Taranan haploid mısır tanelerinden 253 adeti çimlendirilerek somatik kromozom sayısı tanımlaması için sitogenetik çalışmalar yapılmıştır. Sitogenetik analiz sonuçları mayoz I ve mayoz II'de yüksek sıklıkta mayotik anormallik olduğunu göstermiştir.

Battistelli vd. (2013)'ün KEMS indirgeyici hattı ile 6 farklı hibrit ve bu hibritlerin F2 nesillerini materyal olarak kullandıkları çalışmada Navajo renk markörü, akış sitometrisi ve moleküler markörler yardımıyla haploid/diploid bitkilerin ayırımını amaçlamışlardır. Çalışma sonuçları akış sitometrisi ve SSR markörlerinin haploid/diploid bitkilerin ayırımında başarılı sonuç verdiğini göstermiştir.

Couto vd. (2015) tropikal iklim şartlarında KEMS indükleyici hattının indüksiyon yeteneğini değerlendirmek ve kromozom katlama yöntemlerini karşılaştırmak protokolünü değerlendirmek ve sahada katlanmış haploidleri değerlendirmek için akış sitometrisi ile R1-Navajo işaretleyicisinin verimliliğini test etmişlerdir. Dört donör ve KEMS indirgeyici hattın kullanıldığı çalışma sonuçları, haploid ayırımında R1-Navajo sistemine ek olarak diğer araçların da kullanılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Cerit vd. (2016), dört indirgeyici (RWK-76, RWS, RWK-76 × RWS ve Stock-6) ve 75 farklı donör materyal kullanılarak indüksiyon melezlemeleri yapmıştır. Haploid tohum seçimi Navajo markör sistemine göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada haploid oluşturma potansiyelinin indirgeyicilere göre değişim gösterdiği raporlanmıştır. Kullanılan donörlerden 6'sında haploid tohum oluşumu gözlenmemiştir. Melezleme sonucu oluşan ayırt edici marköre göre 1463 adet haploid tohum seçimi gerçekleşmiştir. RWK-76 indirgeyici hattında en yüksek haploid tohum oluşturma oranı gözlemlenirken (%7,80), Stock-6 indirgeyici hattı ise %1,28 oranında haploid tohum oluşumu sağlamıştır. HIR oranı ortalama %4,79 olarak saptanmıştır.

Chaikam vd. (2017) tarafından yürütülen çalışmada in vivo maternal haploid tekniği ile elde edilmiş haploid ve diploid tohumların çimlenme özellikleri bakımından ayırım potansiyelini araştırmıştır. Çalışmada kök uzunluğu, koleoptil uzunluğu, yan kök sayısı hakkında ölçümler toplamıştır. Araştırma bulguları haploid örnek ayırımında genetik markör sisteminden bağımsız olarak çimlenme özelliklerinin kullanılabilmesi ortaya konulmuştur.

Ribeiro vd. (2018), tek melez bir mısır ile indirgeyici hat melezlemesinden elde ettiği örnekleri morfolojik, sitogenetik, moleküler ve akış sitometrisi teknikleri ile haploid ve diploid olarak ayırt etmeyi amaçladığı bir çalışma yürütmüştür. Bu çalışmada morfolojik ölçümlerin yanıltıcı sonuçlar verebileceği, moleküler markör ve akış sitometrisi ölçümlerinin ise güvenilir sonuçlar verdiği bulunmuştur.



Molenaar vd. (2019) tarafından yürütülen araştırmada in vivo katlanmış haploid tekniğinde erken dönemde örnek sınıflandırması için stoma uzunluğu ve akış sitometrisi ölçümlerinden yararlanılmıştır. Çalışmada haploid, diploid ve melez tohumların bu ölçümlere dayalı olarak birbirinden ayrılıp ayrılamayacağı ele alınmıştır. Çalışma sonucunda melez tohumların ölçümleri ile haploid tohumların ölçümlerinde örtüşmeler olabileceği belirlenmiştir.

Rádi vd. (2020) tarafından yürütülen çalışmada öncelikle Navajo genine göre göz ile haploidler ayrılmı ve daha sonra çimlendirilen tohumların kök uçlarından alınan örneklerde akış sitometrisi ve DNA markörleri ile doğrulama yapılmıştır. Üç donör materyalin kullanıldığı araştırmada bu genotiplerin renk markörüne göre seçilen örneklerinin %59'unun yalnızca gerçek haploid olduğu saptanmıştır. Ayrıca kromozom katlaması sonrasında yetiştirilen bitkilerden yalnızca %3'ünden katlanmış haploid tohum elde edildiği vurgulanmıştır.

Baleroni vd. (2021) yürütülen çalışmada R1-Navajo işaretçisi kullanılarak sınıflandırılan örnekleri içerisinde yanlış sınıflanan haploidlerin fide özellikleri yardımıyla elemine edilme imkanını değerlendirmiştir. Farklı sıcaklıklarda tutulan örneklerin koleoptil uzunlukları ve yan seminal kök sayıları ölçülmüştür. Çalışma sonuçları fide özelliklerinin, R1-Navajo işaretçisi tarafından seçilen yanlış pozitiflerin ortadan kaldırılmasında etkili olduğunu göstermiştir.

Silva vd. (2023) donör materyal olarak 20 farklı cin mısır genotipi ve 5 standart kullandıkları çalışmalarında KHI (Krasnador Haploid Inducer) indirgeyicisini kullanarak indüksiyon melezlemesi yapmış ve elde edilen tohumları R1-Navajo markörüne göre ayırmışlardır. Akış sitometrisi ile doğrulamanın ardından kullanılan indirgeyici hattın HIR değerinin daha düşük olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar R1-Navajo markörüne göre seçilmiş ve haploid olarak varsayılan örneklerin akış sitometrisi ile doğrulanması gerektiğini, ayrıca örneklerin çimlenme gücüne bakarak yanlış sınıflanan haploidlerin elemine edilebileceğini bildirmişlerdir.

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak bir indirgeyici hat ile 2 donör genotip kullanılmıştır. Bu materyallerle ilgili genel bilgiler Tablo 1’de sunulmuştur. İndirgeyici hat bilimsel araştırma amaçlı olarak Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırmalar Merkezi (CIMMYT) nden temin edilmiştir. Donör olarak kullanılan materyaller ise ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri bölümünde yürütülen ıslah çalışmalarında kullanılan genotiplerdir.

Tablo 1.  
Tez çalışmasında kullanılan genotipler

Genotip Adı/Kodu	Genel Özellikler	Temin Edildiği Yer
CIM2GTAIL-P2	Navajo markör, İndirgeyici Hat	CIMMYT
B73 (G1)	Sarı, At Dişi	ÇOMÜ
HYA×B73 (G2)	Sarı	ÇOMÜ

CIMMYT: Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırmalar Merkezi, COMU: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Tez çalışmasında kullanılan tohumluk örnekleri 2020 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri bölümünde yürütülen ıslah çalışmalarından elde edilmiştir. Tohum örneklerinin elde edilmesi amacıyla iki donör materyal (B73, Hya×B73) ile bir indirgeyici hat (CIM2GTAL-P2) tarla şartlarında yetiştirilmiştir. Bitkiler çiçeklenme zamanına geldiğinde kontrollü tozlama yöntemlerinden yararlanılmıştır (Kahrıman, 2016). Bu amaçla donör materyaller koçan püskülleri çıkmadan koruma altına alınmıştır. İndirgeyici hattın toplanan polenler ile donör materyallerin koruma altına alınmış koçanları melezlenerek tez çalışmasında kullanılacak tohumluk örnekleri oluşturulmuştur.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Tohum Örneklerinde Morfolojik Ölçümlerin Yapılması

Çalışmada başlangıç materyali olarak kullanılan tohum örneklerinde öncelikle göz ile haploid ve diploid olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamada tohum örneğinde taç ve embriyo kısmında antosiyanin renklenmesi olan örnekler diploid, yalnızca taç kısmında renklenme olanlar haploid olarak ayrılmıştır. Her bir indüksiyon melezi için en az 100 adet haploid ve 100 adet diploid tohum örneği ayrılmıştır. Daha sonra bu tohum örneklerinde sırasıyla aşağıdaki ölçüm ve gözlemler yapılmıştır.

Morfolojik Ölçümler: Tohum morfolojisi ile ilgili olarak tohum eni (mm), tohum boyu (mm), tohum çevresi (mm) ölçümleri alınmıştır. Bu ölçümler içerisinde tek tohum ağırlığı haricindeki ölçümler SmartGrain programından elde edilmiştir (Tanabata vd., 2012). Tek tohum ağırlığı ise laboratuvar tipi hassas terazide belirlenmiştir.

### 3.2.2. Fizyolojik Ölçümler

Fizyolojik Ölçümler: Kök özelliklerine yönelik ölçümler Chaikam vd. (2017) tarafından önelin yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla morfolojik ölçümleri tamamlanan tohumlar çimlendirme işlemine alınmıştır. Çimlenen tohumlarla ilgili (kök uzunluğu, kök sayısı, bitki boyu, yaprak sayısı, SPAD değeri) özelliklerin ölçümleri yapılmıştır. Çimlendirilmiş tohum örneklerinin kök uçlarından 1-2 cm kadarlık bir kısmı kesilerek kromozom analizlerinde kullanılmak üzere %70'lik etanol içerisinde alınmıştır. Kromozom analizlerinde karşılaşılabilecek olumsuzluklara karşı önem amacıyla, çimlenmiş her örnekten iki kök ucu alınmıştır. Bu örnekler önce soğuk su uygulamasına tabi tutulmuş ve ardından %1'lik acetocarmin boyası ile en az 12 saat süre boyunca boyanmak üzere her bitkiye ait örnek ayrı tüplerde olacak şekilde boyanmıştır. Daha sonra bu örnekler %70'lik etanol bulunduran tüplere alınmış ve trinoküler mikroskopta 100x büyütme kapasitesinde dijital görüntüleri kaydedilmiştir.

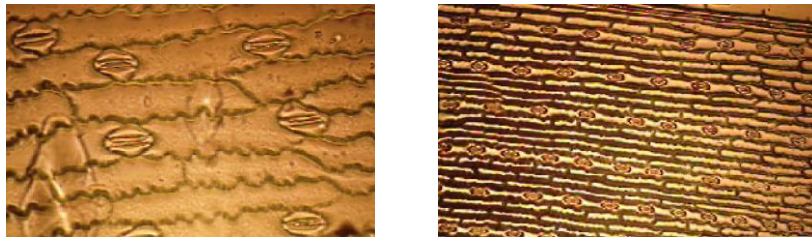
Çimlendirilmiş tohum örnekleri önce 5 x 9 gözlü viyollere torf doldurularak şaşırtılmıştır. Daha sonrasında bitki çıkışları gerçekleştiğinde ve bitkiler 2-3 yapraklı evreye geldiğinde 2021 yılının Eylül ayında küçük saksılara şaşırtma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Şaşırtma yapılan bitkiler sera şartlarında yetiştirilmiş ve su ihtiyacına göre sulanmıştır. Çalışmanın bu aşaması 2020 Eylül ayında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi'ne ait araştırma serasında kurulmuştur (Resim 2).



Resim 2. Sera çalışmasında bir görüntü

Tüm bitkilerde morfolojik ölçümler gerçekleştirilmiş olup, ölçümü yapılan bitkilerde yaprağın alt kısmında stoma ölçümü için örnekleme yapılmıştır. Stoma ölçümlerinin yapılması için örnekleme metodu olarak Millstead vd. (2020) tarafından önerilen yöntemden yararlanılmıştır. Bu kapsamda bitkilerin yapraklarının alt kısmında pvc bant yapıştırılmış ve bu bantlar bitkiden ayrılarak temiz lam üzerine yapıştırılarak örneklerin kodları bu lamlar üzerine yazılmıştır. Bu örnekler trinoküler mikroskop ile 10x ve 40x büyütme kapasitesinde görüntülenerek her slayta ait 3 ayrı noktadan TIFF uzantılı olarak dijital görüntüler kayıtlanmıştır. Bu dosyalar görüntü analizlerinde kullanılmak üzere kayıtlanmıştır. Stoma örneklerinden elde edilen dijital görüntüler ImageJ programında analiz edilmiştir. Bu amaçla öncelikle mikro görüntüler üzerinden ölçüm yapılması için kalibrasyon slaytı görüntüsü alınmıştır. Alınan görüntü kullanılarak ImageJ programı kalibre edilmiş daha sonra stoma ölçümü gerçekleştirilmiştir. Stoma sayımı ve stoma boyu ölçümleri ImageJ programında manuel olarak yapılmıştır (Resim 3).



Resim 3. Stoma ölçümünde kullanılan dijital görüntü örneği (40x solda, 10x sağda)

### 3.2.3 Sitogenetik Analizler

Çimlendirilmiş haploid ve diploid örneklerden alınan kök uçlarındaki hücreler metafaz safhalarında kromozom görüntüleme amacıyla kullanılmıştır. Sitogenetik analizler Sekiya vd. (2020) tarafından önerilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda hazırlanan solüsyonlar ve analizlerde izlenen yollar aşağıda açıklanmıştır.

%45'lik asetik asit solüsyonu: 45 ml saf analitik safiyette asetik asit üzerine 55 ml saf su eklenerek hazırlanmıştır.

%1'lik Asetokarmin solüsyonu: Bu solüsyonun hazırlanması için %45'lik kaynayan asetik asit içerisine 1 g karmin boyası konulmuştur. Yaklaşık 30 dakika kaynatıldıktan sonra solüsyon oda sıcaklığına gelmesi için beklenmiş ve kaba filtre kağıdından süzülerek renkli bir cam şişe içerisinde buz dolabında saklanmıştır.

Carnoy solüsyonu: Analitik safiyette etanol ve asetik asit 3:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

Önişlem olarak örnekler soğuk su uygulamasına tabi tutulmuştur. Bu amaçla soğuk saf su bulunduran eppendorf tüpleri içerisine örneklerin kök uçları 16-18 saat +4 °C'de tutulmuştur. Ardından örnekler Carnoy solüsyonuna alınmış ve 24 saat bekletilmiştir. Sonrasında bu örnekler sırası karışmayacak şekilde asetokarmin boyasına alınmış ve en az bir gece bekletilmiştir.

Slatylar hazırlanırken kök ucu bir lam üzerinde kesilerek birkaç damla %45'lik asetik asit damlatılmıştır. Örnek üzerine lamel kapatılmış ve hafifçe bastırılarak örneklerin dağılması sağlanmıştır. Ezilen örnekler sıcak su banyosunun üst kısmında birkaç saniye buhara tutulmuştur. Daha sonra bu örnekler ve 250 gr'lık bir metal ağırlık ile ezilmiştir. Trinoküler mikroskopta 100x büyütme kapasitesinde immersiyon yağı kullanılarak dijital görüntüler kaydedilmiştir.

### 3.2.4. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmadan elde edilen veriler R paket programında analiz edilmiştir (R Core Team, 2019).

Sitogenetik analizlerle yapılan doğrulama işleminin ardından tespit edilen ploidi seviyesi ile göz ile ayırım sonucunda elde edilen ploidi seviyelerinden elde edilen sonuçlar karmaşıklık matrisine dönüştürülmüştür. Bu matris üzerinden aşağıdaki formüller ile güvenilirlik istatistikleri hesaplanmıştır. Formüllerde TP: Diploid olarak sınıflandırılan gerçek diploidler, TN: Haploid olarak sınıflandırılan gerçek haplodiler, FP: Haploid olarak sınıflandırılan diploid örnekleri, FN: Diploid olarak sınıflandırılan haploid örnekleri göstermektedir.

$$\text{Hassasiyet: } \frac{TP}{TP+FN}$$

$$\text{Özgüllük: } \frac{TN}{TN+FP}$$

$$\text{PTD: } \frac{\text{Duyarlılık} \times \text{Yaygınlık}}{((\text{Duyarlılık}) \times \text{Yaygınlık}) + ((1 - \text{Özgüllük}) \times (1 - \text{Yaygınlık}))}$$

$$\text{NTD: } \frac{\text{Özgüllük} \times (1 - \text{Yaygınlık})}{((1 - \text{Duyarlılık}) \times \text{Yaygınlık}) + ((\text{Özgüllük}) \times (1 - \text{Yaygınlık}))}$$

$$\text{Doğruluk: } \frac{TP+TN}{TP+FN+FP+TN}$$

Haploid ve diploid olarak ayrılan örneklerde ölçülen özellikler bakımından yapılan karşılaştırma için T testinden yararlanılmıştır. Farklı kriterlerin bir arada kullanılarak haploid ve diploid örnekleri ayırt etmek amacıyla Regresyon ve Karar Ağaçları yöntemi kullanılmıştır.

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. Sitogenetik Doğrulama

Sitogenetik analizlerde doğrulama işlemi kök ucundan mitoz bölünmenin metafaz aşamasındaki görüntülere dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde diploid ve haploid örneklerde kromozom boyasının etkinliği ve görüntü kalitesinin de değişim gösterdiği dikkat çekmiştir (Resim 4). Diploid olduğu doğrulanan örneklerde kromozomların bölünme aşamaları daha belirgin olduğu görülmüştür.



Resim 4. Haploid (solda) ve diploid (sağda) örneklerde kromozom sayımı için alınan örnek görüntüleri

Çalışmada sitogenetik analizler sonrasında göz ile ayrılan tohumların varsayılan ploidi seviyeleri ile gerçek ploidi sınıflarına göre tohum sayıları aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 2). Toplamda 95 diploid 70 haploid örnek olmak üzere 165 örnek üzerinde yapılan doğrulama işlemine göre diploid olarak seçilen örneklerin büyük çoğunluğunun gerçekte de diploid oldukları görülmüştür. Buna karşın haploid örneklerde %22'lik yanlış sınıflandırma olduğu (16 yanlış sınıflanan haploid) saptanmıştır (Tablo 3). Bu sonuçlara göre tohum renklenmesine göre başlangıçta yapılan sınıflandırmada haploidlerin dikkate değer bir hata payı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2.

Sitogenetik analizler ile doğrulanmış haploid diploid sayılarının donör materyallere göre değişimi

	B73		Hya×B73		Birleşik	
	Diploid	Haploid	Diploid	Haploid	Diploid	Haploid
Diploid	23	1	70	1	93	2
Haploid	6	20	10	34	16	54

Karmaşıklık matrisi üzerinden hesaplanan değerlendirme istatistikleri Tablo 3'te sunulmuştur. Bu hesaplamalarda pozitif grup diploid olarak atanmıştır. Her iki donör için de hassasiyet değerlerinin 0,70'in üzerinde olduğu ve özgüllük değerinin hassasiyetten daha yüksek olduğu görülmüştür. PPV değeri de NPV değerinden oldukça yüksek bulunmuştur. Bu bulgular hem Hya hem de Hya × B73 genotipi için diploid örneklerin ayırım başarısının haploid örneklerden daha yüksek olduğuna işaret etmektedir. Buna karşın haploid örneklerin %70-%80 arasında doğruluk değeri ile göz ile ayrılabilirdiği anlaşılmaktadır. Genel olarak sınıflama doğruluğu dikkate alındığında Hya×B73 hibrit materyalin B73 hattından daha yüksek sınıflama doğruluğuna sahip olduğu görülmüştür (Tablo 3).

Tablo 3.

Sitogenetik analizler ile doğrulanmış haploid diploid sayılarının donör materyallere göre değişimi

	B73	Hya×B73	Ortalama
Hassasiyet	0,79	0,88	0,85
Özgüllük	0,95	0,97	0,96
PTD	0,96	0,99	0,97
NTD	0,77	0,77	0,77
Doğruluk	0,87	0,92	0,91

R1-nj markörüne göre görsel ayırım başarısını konu edinen çeşitli çalışmalar yürütülmüş ve bu çalışmalarda doğrulama aracı olarak sitolojik ölçümler, akış sitometrisi ve moleküler markörler gibi çeşitli araçlardan yararlanılmıştır (Couto vd., 2013; Ribeiro vd., 2018). Bu çalışmalarda R1-nj geninin oluşturduğu tohum renklenmesine dayalı olarak haploid ayırım başarısının değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında ayrılan haploid örneklerin her iki genotip için de %70'den fazlasının doğru sınıflandığı dikkat



çekerken Ribeiro vd. (2018) tarafından yürütülen çalışmada bu ancak %1,41 olduğu raporlanmıştır. Ancak bu çalışmada haploid varsayılan tüm örneklerden (260 adet) yalnızca 16'sında ölçüm yapılmıştır. Bu durum kullanılan donör materyalden ve indirgeyici hatların farklılıkların kaynaklanabilir. Zira Ribeiro vd. (2018) at dişi endosperm yapısına sahip olan donör materyallerin antosiyaninleşmeyi daha belirgin gösterdiği ve ayırım başarısının da buna bağlı olarak artabileceğini bildirmiştir. Çalışmamızda kullanılan her iki genotip te atdişi/atdişi-sert endosperm yapısına sahiptir. Bu nedenle R1-nj geninin neden olduğu renklemeye dayalı olarak göz ile ayırmda haploid örneklerin başarı oranının yüksek olduğu ifade edilebilir.

## 4.2. Morfolojik Ölçümler

### 4.2.1. Tohum Morfolojisine Yönelik Ölçümler

Tohum morfolojisine yönelik ölçümlerine ilişkin varyans analizi sonuçları Tablo 4'de sunulmuştur. Sitogenetik doğrulama öncesinde genotip, tohum sınıfının incelenen özellikler üzerine (tohum boyu hariç) istatistiki olarak önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Sitogenetik doğrulama sonrasında genotip etkisi yine tohum morfolojisine yönelik ölçümler üzerinde etkili iken, tohum sınıfının bu özellikler üzerine (tohum çevresi hariç) etkisi önemsiz bulunmuştur. G×S interaksiyon etkisi ise incelenen özellikler için hem doğrulama öncesinde hem de doğrulama sonrasındaki önemsiz bulunmuştur (Tablo 4).

Tablo 4.

Tohum morfolojisine yönelik varyans analizi sonuçları

Özellik	Sitogenetik Doğrulama Öncesi			Sitogenetik Doğrulama Sonrası		
	Genotip	Sınıf	G×S <sup>†</sup>	Genotip	Sınıf	G×S <sup>†</sup>
Tohum Eni	<0,001	0,014	0,963	<0,001	0,164	0,685
Tohum Boyu	<0,001	0,098	0,381	<0,001	0,613	0,633
Tohum Çevresi	<0,001	<0,001	0,631	<0,001	0,045	0,782
Tek Tohum Ağırlığı	<0,001	0,001	0,312	<0,001	0,004	0,642

<sup>†</sup>G × S = Genotip × Sınıf etkisi

Genotip ortalamaları arasındaki fark dikkate alındığında Hya×B73 genotipinin B73 hattından tohum ölçümleri bakımından hem doğrulama öncesinde hem de doğrulama

sonrasında daha yüksek ortalamaya sahip olduğu görülmüştür. Bu durum beklenen bir sonuç olup söz konusu genotipin hibrit bir materyal olmasından kaynaklanmaktadır. Hya nispeten tohum iriliği düşük olan bir hat olduğundan hem alan hem de ağırlık değerleri hibrit genotipten daha düşük bulunmuştur. Haploid ve diploid tohum örneklerinin ortalama değerleri dikkate alındığında doğrulama öncesinde tohum boyu hariç diğer özellikler bakımından sınıf ortalamaları arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu gözlenmiştir. Doğrulama sonrasında ise tohum çevresi ve tek tohum ağırlığı bakımından tohum sınıfları arasındaki farkın önemli olduğu dikkat çekmiştir. Hem doğrulama öncesinde hem de doğrulama sonrasında tohum ölçümlerine ait örnek ortalamaları bakımından diploid örneklerin ortalaması haploidlerden daha yüksek bulunmuştur. Ancak bu farkın tüm özellikler bakımından önemli bulunmadığı da saptanmıştır. Bu durum sitogenetik doğrulama sonrasında tohum eni ve tohum boyu için sınıflar arasındaki farkın önemsiz olduğuna işaret etmektedir. Her iki genotipte de diploid örneklerin genel olarak haploidlerden yüksek ortalamaya sahip olması nedeniyle G×S interaksiyon etkisinin önemsiz olduğu görülmüştür (Tablo 5).

Tablo 5.

Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası tohum eni, tohum boyu, tohum çevresi ve tek tohum ağırlığı için haploid ve diploid örneklerin farklarını gösteren tablo

İncelenen Özellik	Sitogenetik Doğrulama Öncesi							
	B73		Hya×B73		Ortalama		Ortalama	
	D	H	D	H	D	H	B73	Hya×B73
Tohum Eni	6,89	6,64	8,08	7,82	7,48 <sup>a</sup>	7,23 <sup>b</sup>	6,76 <sup>b</sup>	7,98 <sup>a</sup>
Tohum Boyu	8,24	8,20	9,72	9,49	8,98	8,84	8,22 <sup>b</sup>	9,63 <sup>a</sup>
Tohum Çevresi	25,27	24,48	29,48	28,41	27,37 <sup>a</sup>	26,44 <sup>b</sup>	24,9 <sup>b</sup>	29,1 <sup>a</sup>
Tek Toh. Ağ.	0,17	0,16	0,30	0,27	0,23 <sup>a</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,28 <sup>a</sup>
İncelenen Özellik	Sitogenetik Doğrulama Sonrası							
	B73		Hya×B73		Ortalama		Ortalama	
	D	H	D	H	D	H	B73	Hya×B73
Tohum Eni	6,80	6,71	8,03	7,88	7,41	7,29	6,76 <sup>b</sup>	7,98 <sup>a</sup>
Tohum Boyu	8,21	8,23	9,66	9,12	8,93	8,67	8,22 <sup>b</sup>	9,63 <sup>a</sup>
Tohum Çevresi	25,06	24,5	29,27	27,78	27,16 <sup>a</sup>	26,03 <sup>b</sup>	24,9 <sup>b</sup>	29,1 <sup>a</sup>
Tek Toh. Ağ.	0,17	0,16	0,30	0,27	0,23 <sup>a</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,28 <sup>a</sup>

#### 4.2.2. Çimlendirilmiş Tohum Özelliklerine Yönelik Ölçümler

Çimlendirilmiş tohum özelliklerine yönelik ölçümlere ilişkin varyans analiz sonuçları Tablo 6’da sunulmuştur. Varyans analizi sonuçlarına göre kök uzunluğu için hem sitogenetik doğrulama öncesi hem de sonrasında genotip, sınıf, G×S interaksiyon etkileri önemli bulunmuştur. Kök sayısı için yalnızca doğrulama öncesi sınıflar arasındaki fark önemli bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından ise varyans kaynaklarının etkisi önemsiz bulunmuştur (Tablo 6). Kök özellikleri ile ilgili ortalama değerler dikkate alındığında diploid örneklerin haploidlerden daha yüksek ortalamaya sahip olduğu görülmüştür. Kök uzunluğu bakımından diploid örneklerin ortalaması(4,23 cm) haploid örneklerden (3,50cm) istatistiki olarak önemli bir farka sahip olduğu gözlenmiştir. Benzer durum kök sayısı içinde geçerlidir. Genotip ortalamalarına göre B73 hattı (3,33 cm) Hya×B73 melezinden daha düşük kök uzunluğuna sahip olmuştur. Kök uzunluğu için donörlerden Hya×B73 genotipinin haploid örnek ortalamalarının, B73 hattına ait diploid örnek ortalaması ile aynı istatistiki sınıfta yer almıştır (Tablo 7). Literatürde bu konuda yapılan çalışma sonuçları da haploid mısır tohumlarının diploidlerden daha düşük kök uzunluğu, sürgün uzunluğu ve yanal kök sayısına sahip olduklarını göstermiştir (Chaikam vd., 2017). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar da bu bulguları doğrulamaktadır.

Tablo 6.  
Çimlenme özelliklerine ilişkin varyans analizi sonuçları

Özellik	Sitogenetik Doğrulama Öncesi			Sitogenetik Doğrulama Sonrası		
	Genotip	Sınıf	G×S <sup>†</sup>	Genotip	Sınıf	G×S <sup>†</sup>
Kök Uzunluğu	<0,001	<0,001	0,009	<0,001	0,001	0,025
Kök Sayısı	0,476	0,01	0,737	0,483	0,236	0,91
Sürgün Uzunluğu	0,897	0,124	0,866	0,897	0,215	0,481

<sup>†</sup>G × S = Genotip × Sınıf etkisi

Tablo 7.

Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası kök uzunluğu, kök sayısı ve sürgün uzunluğu için haploid ve diploid örneklerin farklarını gösteren tablo

Sitogenetik Doğrulama Öncesi								
İncelenen Özellik	B73		Hya×B73		Ortalama		Ortalama	
	D	H	D	H	D	H	B73	Hya×B73
Kök Uzunluğu	3,35 <sup>b</sup>	3,31 <sup>b</sup>	5,12 <sup>a</sup>	3,69 <sup>b</sup>	4,23 <sup>a</sup>	3,50 <sup>b</sup>	3,33 <sup>b</sup>	4,57 <sup>a</sup>
Kök Sayısı	4,33	3,81	4,08	3,68	4,20 <sup>a</sup>	3,74 <sup>b</sup>	4,06	3,93
Sürgün Uzunluğu	4,56	4,29	4,53	4,18	4,54	4,23	4,42	4,39
Sitogenetik Doğrulama Sonrası								
İncelenen Özellik	B73		Hya×B73		Ortalama		Ortalama	
	D	H	D	H	D	H	B73	Hya×B73
Kök Uzunluğu	3,36 <sup>b</sup>	3,29 <sup>b</sup>	4,97 <sup>a</sup>	3,32 <sup>b</sup>	4,16 <sup>a</sup>	3,30 <sup>b</sup>	3,33 <sup>b</sup>	4,57 <sup>a</sup>
Kök Sayısı	4,14	3,95	4,00	3,40	4,07	3,67	4,06	3,93
Sürgün Uzunluğu	4,44	4,39	4,51	4,73	4,47	4,56	4,42	4,39

#### 4.2.3. Bitki Morfolojisine Yönelik Ölçümler

Bitki morfolojisine yönelik ölçümlerine ilişkin varyans analiz sonuçları Tablo 8'de sunulmuştur. Varyans analizi sonuçlarına göre bitki boyu için hem sitogenetik doğrulama öncesi hem sitogenetik doğrulama sonrası sınıflar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunurken genotip etkileri ve G×S interaksiyon etkileri önemsiz bulunmuştur. Yaprak sayısı için sitogenetik doğrulama öncesi sınıflar arasındaki fark önemli bulunurken genotip etkisi ve G×S interaksiyon etkileri önemsiz bulunmuştur. Ayrıca sitogenetik doğrulama sonrası genotip, sınıf, G×S interaksiyon etkileri önemsiz bulunmuştur.

Tablo 8.

Bitki morfolojisi ölçümlerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Özellik	Sitogenetik Doğrulama Öncesi			Sitogenetik Doğrulama Sonrası		
	Genotip	Sınıf	G×S <sup>†</sup>	Genotip	Sınıf	G×S <sup>†</sup>
Bitki Boyu	0,364	0,01	0,951	0,367	0,031	0,975
Yaprak Sayısı	0,909	0,076	0,104	0,909	0,08	0,658

<sup>†</sup>G × S = Genotip × Sınıf etkisi

Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası bitki boyu ve yaprak sayısı için haploid ve diploid örneklerin farklarını gösteren tabloyu incelediğimizde (Tablo 9) Hya×B73

genotipinin B73 hattından bitki boyu bakımından hem doğrulama öncesinde hem de doğrulama sonrasında daha yüksek ortalamaya sahip olduğu görülürken yaprak sayısında hem doğrulama öncesi hem doğrulama sonrasında B73 hattının Hya×B73 genotipinde daha yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. Haploid ve diploid tohum örneklerinin ortalama değerleri dikkate alındığında hem doğrulama öncesinde hem doğrulama sonrasında bitki boyu bakımından diploid örneklerin bitki boyu değerleri haploid örneklerden daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 9.

Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası bitki boyu ve yaprak sayısı için haploid ve diploid örneklerin farklarını gösteren tablo

<b>Sitogenetik Doğrulama Öncesi</b>								
İncelenen Özellik	B73		Hya×B73		Ortalama		Ortalama	
	D	H	D	H	D	H	B73	Hya×B73
Bitki Boyu	21,50	19,35	21,94	19,89	21,72 <sup>a</sup>	19,62 <sup>b</sup>	20,4	21,2
Yaprak Sayısı	6,22	6,30	6,38	6,03	6,30	6,16	6,26	6,25
<b>Sitogenetik Doğrulama Sonrası</b>								
İncelenen Özellik	B73		Hya×B73		Ortalama		Ortalama	
	D	H	D	H	D	H	B73	Hya×B73
Bitki Boyu	21,13	19,35	21,72	22,36	21,42 <sup>a</sup>	20,85 <sup>b</sup>	20,4	21,2
Yaprak Sayısı	6,32	6,18	6,33	6,52	6,32	6,35	6,26	6,25

#### 4.2.4 Fizyolojik Ölçümler

Fizyolojik ölçümlere ilişkin varyans analiz sonuçları Tablo 10'da sunulmuştur. Varyans analizi sonuçlarına göre SPAD ölçüm değerleri arasındaki farklar hem sitogenetik doğrulama öncesi hem doğrulama sonrasında genotip, sınıf ve G×S interaksiyon etkileri önemsiz bulunmuştur. Stoma boyu ölçümlerinde ise hem doğrulama öncesi hem doğrulama sonrası genotip etkisi önemli bulunurken G×S interaksiyon etkileri ise önemsiz bulunmuştur. Stoma sayısı ölçümleri sitogenetik doğrulama öncesi ve doğrulama sonrası genotip etkisi ve sınıflar arasındaki fark önemsizken G×S interaksiyonu önemli görülmüştür.

Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası SPAD değeri, stoma boyu ve stoma sayısı için haploid ve diploid örneklerin farkları Tablo 11 de sunulmuştur. Haploid ve diploid tohum örneklerinin ortalama değerleri dikkate alındığında hem sitogenetik doğrulama öncesinde hem doğrulama sonrasında SPAD değeri stoma boyu ve stoma sayısı değerleri arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. B73 hattının Hya×B73 genotipine göre SPAD değeri (38,9) ve stoma boyu (37,8) bakımından hem doğrulama öncesinde hem de doğrulama sonrasında daha yüksek ortalamaya sahip olduğu görülürken stoma sayısında ise hem doğrulama öncesi hem doğrulama sonrasında Hya×B73 genotipinin B73 hattına göre daha yüksek değere sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 10.  
Fizyolojik ölçümlerle ilgili varyans analizi sonuçları

Özellik	Sitogenetik Doğrulama Öncesi			Sitogenetik Doğrulama Sonrası		
	Genotip	Sınıf	G×S <sup>†</sup>	Genotip	Sınıf	G×S <sup>†</sup>
SPAD	0,05	0,138	0,187	0,052	0,51	0,292
Stoma Boyu	<0,001	0,327	0,118	<0,001	0,042	0,285
Stoma Sayısı	0,087	0,364	0,024	0,085	0,131	0,012

<sup>†</sup>G × S = Genotip × Sınıf etkisi

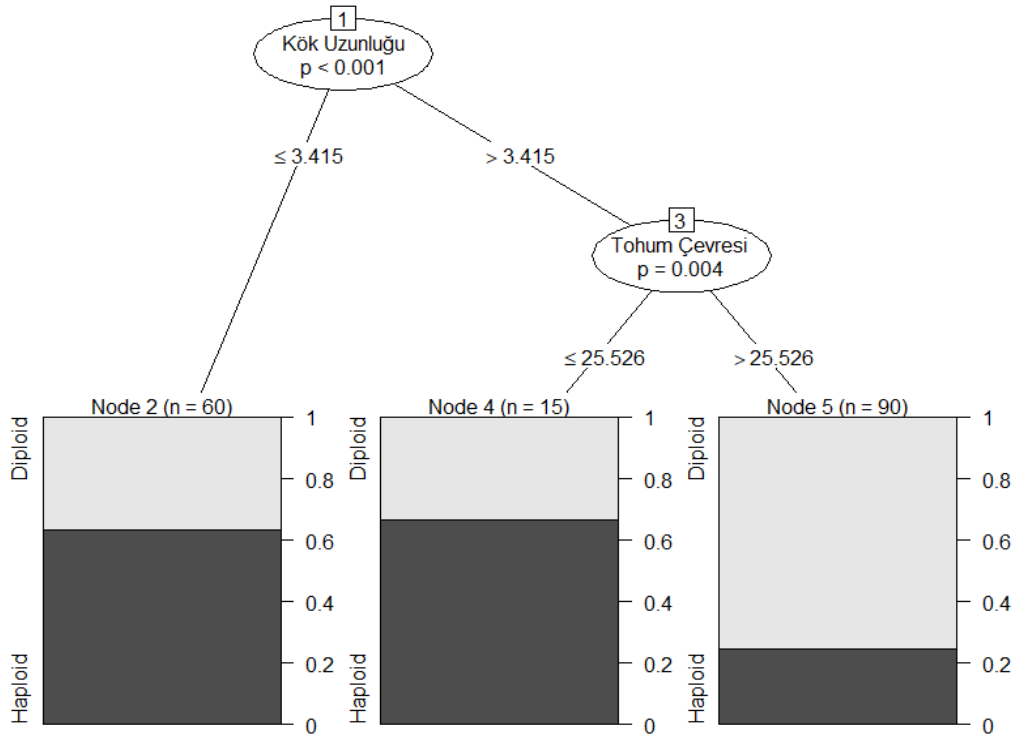
Tablo 11.

Sitogenetik doğrulama öncesi ve sonrası SPAD değeri, stoma boyu ve stoma sayısı için haploid ve diploid örneklerin farklarını gösteren tablo

İncelenen Özellik	Sitogenetik Doğrulama Öncesi							
	B73		Hya×B73		Ortalama		Ortalama	
	D	H	D	H	D	H	B73	Hya×B73
SPAD Değeri	39,02	38,71	36,85	38,44	37,93	38,57	38,9 <sup>a</sup>	37,5 <sup>b</sup>
Stoma Boyu	37,31	38,17	33,83	32,50	35,57	35,33	37,8 <sup>a</sup>	33,3 <sup>b</sup>
Stoma Sayısı	62,13 <sup>b</sup>	76,88 <sup>ab</sup>	86,52 <sup>a</sup>	71,73 <sup>ab</sup>	74,32	74,30	69,8	80,9
İncelenen Özellik	Sitogenetik Doğrulama Sonrası							
	B73		Hya×B73		Ortalama		Ortalama	
	D	H	D	H	D	H	B73	Hya×B73
SPAD Değeri	39,11	38,52	37,16	40,21	38,13	39,36	38,9 <sup>a</sup>	37,5 <sup>b</sup>
Stoma Boyu	37,91	37,55	33,90	30,24	35,90 <sup>a</sup>	33,89 <sup>b</sup>	37,8 <sup>a</sup>	33,3 <sup>b</sup>
Stoma Sayısı	64,34 <sup>b</sup>	77,33 <sup>ab</sup>	87,15 <sup>a</sup>	74,01 <sup>b</sup>	75,74	75,67	69,8	80,9

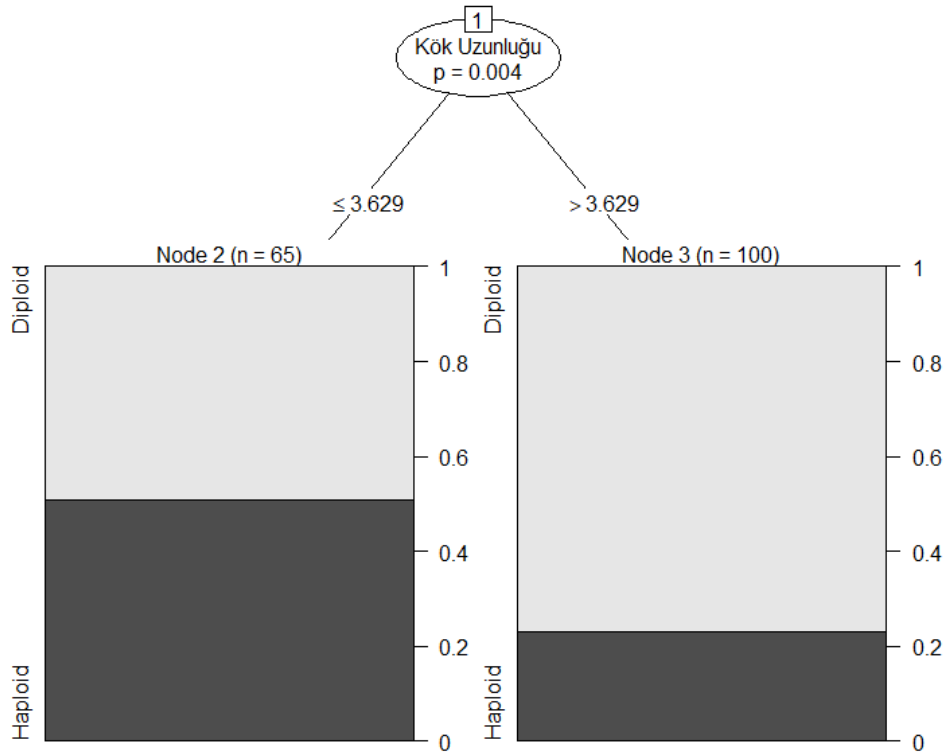
### 4.3. Haploid/Diploid Örnek Ayrımına Yönelik Özelliklerin Seçimi

Çalışmada incelenen özellikler üzerinden tohum sınıfının belirlenip belirlenemeyeceğini tespit etmek amacıyla oluşturulan regresyon ve karar ağaçları grafikleri sitogenetik doğrulama öncesi (Resim 5) ve sitogenetik doğrulama sonrası (Resim 6) için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Sitogenetik doğrulama öncesi ile ilgili grafiğe göre, haploid ve diploid tohum örneklerinin ayrılabilmesi için kök uzunluğu ve tohum çevresi özelliklerinin etkin olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Tohum örnekleri üç boğum altında sınıflanmış olup ikinci boğumda (Node 2) kök uzunluğu 3,41 cm'nin altında olan örnekler yer almıştır. Bu örneklerin toplam 60 adet olduğu ve büyük kısmının haploid tohumlardan oluştuğu belirlenmiştir. Dördüncü düğümde (Node 4) kök uzunluğu 3,415 cm'nin üzerinde olan ve tohum çevresi 25,526 mm'nin altında örnekler sınıflanmıştır. Bu örneklerin toplam sayısı 15 olup, yine haploid tohumların oranı %60'ın üzerinde bulunmuştur. Son boğumda ise (Node 5) 90 adet örnek sınıflanmıştır. Bu örneklerin kök uzunlukları 3,41 cm'nin üzerinde ve tohum çevreleri de 25,526 mm'nin üzerinde örnekler olduğu görülmektedir. Bu boğumda yaklaşık %75'lik bir kısmın diploid örnekler olduğu dikkat çekmiştir.



Resim 5. Tohum örneklerinin R1-nj markörüne göre ayrılmış sınıfına göre diğer değişkenler üzerinden ayrılması amacıyla oluşturulan regresyon ve karar ağaçları grafiği

Sitogenetik doğrulama sonrası ile ilgili grafiğe göre, haploid ve diploid tohum örneklerinin ayrılabilmesi için kök uzunluğunun etkin olarak kullanılacağı belirlenmiştir. Tohum örnekleri iki boğum altında sınıflanmış olup ikinci boğumda (Node 2) kök uzunluğu 3,62 cm'nin altında olan örnekler yer almıştır. Bu örneklerin toplam 65 adet olduğu ve yaklaşık yarısı haploid ve diploid örneklerden meydana geldiği gözlenmiştir. Diğer boğumda (Node 3) ise toplam 100 örnek yer almış olup bu örneklerin 3,62 cm'den daha uzun kök uzunluğuna sahip oldukları saptanmıştır. Bu örneklerin %85'inden fazlasının diploid örneklerden oluştuğu anlaşılmıştır. Sitogenetik doğrulama sonrasındaki modele göre yalnızca kök uzunluğuna bakarak diploid örneklerin daha doğru şekilde ayrılacağı, haploid örnek ayrımı için ise farklı bir sınıflama modeline ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir (Resim 6).



Resim 6. Tohum örneklerinin sitolojik analizlere göre ayrılmış sınıfına göre diğer değişkenler üzerinden ayrılması amacıyla oluşturulan regresyon ve karar ağaçları grafiği



Literatürde fide özelliklerinden yararlanarak haploid örneklerin doğrulanmasına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Baleroni vd. (2021) tarafından yürütülen araştırmada kök uzunluğu, koleoptil uzunluğu ve seminal kök sayısı için sınır değerler belirlenmiştir. Yürütülen çalışmada çimlenme özellikleri için belirlenen sınır değerlerin donör genotiplere göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Kök uzunluğu için bu değerler 2,1 cm ile 5,6 cm arasında değişirken, koleoptil uzunluğu 1,8 cm ile 2,8 cm arasında bulunmuştur. Çalışmamızda da kök uzunluğunun haploidlerin doğrulanmasında etkin olarak kullanılabileceği belirlenmiş ve tespit edilen sınır değerlerin de literatürdeki sınırlar içerisinde bulunmuştur.



## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

#### 5.1. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada mısır ıslahında yaygın olarak kullanılan *in vivo* katlanmış haploid tekniği ile elde edilmiş haploid ve diploid mısır örneklerinin tohum morfolojisi, bitki morfolojisi ve fizyolojik özellikler bakımından karşılaştırılmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre haploid tohum örneklerinin diploid örneklerden ölçülen özellikler bakımından genel olarak düşük değerlere sahip olduğu saptanmıştır. İstatistik analiz sonuçlarına göre tohum boyu, kök uzunluğu ve kök sayısı, yaprak sayısı, stoma sayısı, SPAD değeri bakımından haploid diploid örnekler arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bu farklılıkların her iki donör için de geçerli olmadığı, Hya×B73 isimli donör materyalde söz konusu farklılıkların belirgin olduğu anlaşılmıştır. Bu bulgulara dayanarak kullanılan donör materyale göre haploid/diploid örnek ayırımının başarısının da değişkenlik gösterdiği söylenebilir.

Araştırmadan elde edilen diğer bir sonuç ise incelenen özelliklerden yararlanarak haploid diploid örneklerin ayırımının gerçekleştirilip gerçekleştirilmeyeceği konusundadır. Regresyon ve Karar Ağaçları yöntemine göre varsayılan haploid olarak ayrılan tohumlarda incelenen özelliklerden kök uzunluğu ve tohum çevresi değerlerine bakarak doğrulama yapılabileceği ve ayırım başarısının artırılacağı belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu araştırma bulguları haploid ve diploid mısır örneklerinin bazı morfometrik ve fizyolojik özellikler bakımından farklılık gösterdiğini, bu özellikler içerisinde kök uzunluğu ve tohum çevresi gibi özellikler bakımından yapılacak ölçümlerle sınıflama başarısının artırılacağı göstermiştir. Bu yol ile büyük çaplı ıslah çalışmalarında örnek sınıflama işlemlerinin etkinliği artırılabilir ve kullanılan emek ve iş gücünün yanı sıra yetiştiricilik yapılan alanlardan da tasarruf edilebilir.

## KAYNAKÇA

- Alan Ö, Akdemir H, Budak B, 2005. “Küçük Menderes koşullarında bazı melez mısır (*Zea mays* L.) çeşitlerinin tane verimi üzerine bir araştırma”. *Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi*. 5-9 Eylül 2005, Antalya.
- Baleroni, A.G., Ré, F., Pelozo, A., Kamphorst, S.H., Carneiro, J.W.P., Rossi, R. M. ve Scapim, C.A. (2021). “Identification of haploids and diploids in maize using seedling traits and flow cytometry”. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 21, e38422145.
- Battistelli, G. M., Von Pinho, R. G., Justus, A., Couto, E. G., ve Balestre, M. (2013). “Production and identification of doubled haploids in tropical maize”. *Genetics and Molecular Research*, 12, 4230-4242.
- Cengiz, R. ve Korkut, K. Z. (2016). “Development of doubled haploid maize lines by using *in vivo* haploid technique”. *Biotech Studies*, 29(1), 1-7.
- Cerit, İ., Cömertpay, G., Oyucu, R., Çakır, B., Hatipoğlu, R., ve Özkan, H. (2016). “Melez mısır islahında *in-vivo* katlanmış haploid tekniğinde kullanılan farklı inducer genotiplerin haploid indirgeme oranlarının belirlenmesi”. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25 (1), 52-57.
- Chaikam, V., Nair, S. K., Babu, R., Martinez, L., Tejomurtula, J. ve Boddupalli, P. M. (2015). “Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for *in vivo* haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression”. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(1), 159-171.
- Chaikam, V., Antonio Lopez, L., Martinez, L., Burgueno, J., ve Boddupalli, P. M. (2017). “Identification of *in vivo* induced maternal haploids in maize using seedling traits”. *Euphytica*, 213, e177.
- Chaikam, V., Molenaar, W., Melchinger, A. E. ve Boddupalli, P.M. (2019). “Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects”. *Theoretical and Applied Genetics*, 132, 3227-3243.
- Coe, E. H. (1959). “A Line of Maize with haploid frequency”. *The American Naturalist*, 93, 381-382.

- Couto, E.G.O., Davide, L.M.C., Bustamante, F.O., Pinho, R.G.V. ve Silva, T.N. (2013). "Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers". *Science and Agrotechnology* 37(1): 25-31.
- Couto, E.G.D.O., Pinho, É.V.D.R.V., Pinho, R.G.V., Veiga, A.D., Bustamante, F.D.O. ve Dias, K.O.D.G. (2015). "In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize." *Ciência e Agrotecnologia*, 39, 435-442.
- Deimling, S., Röber, F, ve Geiger, H. H. (1997). "Methodik und Genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei Mais". *Vortr Pflanzzüchtg*, 38, 203-224.
- Dwivedi, S. L., Britt, A. B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H. D. ve Ortiz, R. (2015). "Haploids: constraints and opportunities in plant breeding". *Biotechnology advances*, 33(6), 812-829.
- Eder, J. ve Chalyk, S. (2002). "In vivo haploid induction in maize." *Theoretical and Applied Genetics*, 104(4), 703-708.
- Geiger, H. H., ve Gordillo, G. A. (2009). "Doubled haploids in hybrid maize breeding". *Maydica*, 54, 485-499.
- Kahrıman, F., Egesel, C.Ö. ve Demir, A. (2013). "Türkiye’de mısır ıslahı çalışmalarının geçmişı ve bugünü". *Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi 10-13 Eylül, Konya, Bildiriler Kitabı*, 1, 545-550.
- Kermicle, J. L. (1969). "Androgenesis conditioned by a mutation in maize". *Science*, 166, 1422-1424.
- Kırtok, Y., (1998). "Mısır Üretimi ve Kullanımı". *Kocaelik Basım ve Yayınevi, İstanbul*, 445 s.
- Lashermes, P. ve Becerkert, M. (1988). "Genetic Control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines". *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 405-410.
- Mathur, D.S., Sachan J.K.S. ve Sarkar K.R. (1976). "Radiation induced haploid and heterofertilization in maize". *Journal of Nuclear Agriculture and Biology*, 5: 76-77.
- Mathur, M.A. ve Sarkar K.R. (1980). "Induction of maternal haploids in maize through heat treatment of pollen". *Current Science*, 49: 744-746.
- Millstead, L., Jayakody, H., Patel, H., Kaura, V., Petrie, P. R., Tomasetig, F. Ve Whitty, M. (2020). "Accelerating automated stomata analysis through simplified

- sample collection and imaging techniques”. *Frontiers in Plant Science*, 11, 580389.
- Molenaar, W. S., Couto, E. G. O., Piepho, H. P., ve Melchinger, A. E. (2019). “Early diagnosis of ploidy status in doubled haploid production of maize by stomata length and flow cytometry measurements”. *Plant Breed*, 138, 266-276.
- Nanda, D. K. ve Chase, S. S. (1966). “An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea Mays* L.)”. *1. Crop Science*, 6(2), 213-215.
- R Core Team (2019). “R A Language and Environment for Statistical Computing”. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna: Austria.
- Rádi, F., Török, K., Nagymihály, M., Kereszt, A. ve Dudits, D. (2020). “Improved reliability in production of maize inbred lines by the combination of the R1-navajo marker with flow cytometry or microsatellite genotyping”. *Cereal Research Communications*, 48, 423-430.
- Ribeiro, C. B., Pereira, F. D. C., Filho, L. D. N., Braz, G. T., Ruy, M. C., Silva, M. B., Cenzi, G., Techio, V. H., ve Souza, J. C. D. (2018). “Haploid identification using tropicalized haploid inducer progenies in maize”. *Crop Breed Appl Biotechnol*, 18(1),16-23.
- Röber, F. K., Gordillo, G. A., ve Geiger, H. H. (2005). “In vivo haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding”. *Maydica*, 50, 275-283.
- Sekiya, A., Pestana, J. K., Silva, M. G. B., Krause, M. D., Silva, C. R. M., ve Ferreira, J. M. (2020). “Haploid induction in tropical supersweet corn and ploidy determination at the seedling stage”. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 55, e00968.
- Silva, J. P. A. D., Viana, J. M. S., Dias, K. O. D. G., Silva, J. C., Tupper, V. T. B., & Clarindo, W. R. (2023). “Popcorn (*Zea mays* L. var. Everta) haploids identified by Navajo phenotype and ploidy level”. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1176504.
- Tanabata, T., Shibaya, T., Hori, K., Ebana, K., ve Yano, M. (2012). “SmartGrain: High-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis”. *Plant Physiology*, 160(4), 1871-1880.

- Tang, Q. L., Feng, Y. C., Han, X. L., Zheng, M. M. ve Rong, T. Z. (2009). ‘‘Study on haploid inducing and its meiotic abnormality in maize’’. *Agricultural Sciences in China*, 8(10), 1159-1165.
- Trentin, H. U., Frei, U. K., & Lubberstedt, T. (2020). ‘‘Breeding maize maternal haploid inducers’’. *Plants*, 9, 614.
- Yasak S., ınar A., ve Tugay M.E., 2003. ‘‘Mısırdada (Zea mays L.) Ekim Zamanının Tohum Tutma ve Diğer Bazı zellikler zerine Etkileri’’. *Türkiye 5. Tarla Bitkileri Kongresi*, 13-17 Ekim, Diyarbakır, 352-357
- Zuoyo Z. ve Minguang G., (1984). ‘‘Production of pure lines of maize through parthenogenesis induced by chemicals’’. *Acta Genetica Sinica*, 11: 39-46



