

***IN VIVO* TEKNİĞİ İLE KATLANMIŞ  
HAPLOİD MISIR HATLARININ ELDE  
EDİLMESİ  
Rahime CENGİZ  
Doktora Tezi  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT**

**2016**

**T.C.**  
**NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

***IN VIVO* TEKNİĞİ İLE KATLANMIŞ HAPLOİD MISIR HATLARININ  
ELDE EDİLMESİ**

**Rahime CENGİZ**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT**

**TEKİRDAĞ-2016**

**Her hakkı saklıdır**

Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT danışmanlığında, Rahime CENGİZ tarafından hazırlanan “*In vivo* Tekniği ile Katlanmış Haploid Mısıır Hatlarının Elde Edilmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Prof.Dr. Kayıhan Z. KORKUT

*İmza :*

Üye : Prof.Dr. Bayram SADE

*İmza :*

Üye : Prof.Dr. İsmet BAŐER

*İmza :*

Üye : Prof.Dr. Süleyman SOYLU

*İmza :*

Üye : Yrd.Doç.Dr. Nezihi SAğLAM

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Doktora Tezi

*IN VIVO* TEKNİĞİ İLE KATLANMIŞ HAPLOİD MISIR HATLARININ ELDE EDİLMESİ

**Rahime CENGİZ**

Namık Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT

Katlanmış haploid (KH) teknolojisi son yıllarda gelişmiş ıslah programlarında yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmiştir. *In vivo* haploid indirgemenin mısır da paternal (androgenetic) ve maternal (gynogenetic) haploidler olarak bilinen iki metodu vardır. Bu çalışmada maternal haploid indirgeme metodu uygulanmıştır. RWS, RWK-76, RWS x RWK-76 ve WS14 indirgeyici materyalleri tozlayıcı olarak kullanılmıştır. Mısır Araştırma Enstitüsünde 2010-2013 yılları arasında yürütülen çalışmada 30 tek melez kaynak materyal olarak kullanılmıştır. Kaynak materyaller FAO 650-700 olum grubundadır. Kaynak materyal ile indirgeyici genotipler arasında yapılan indüklenme melezlemesinden 15911 adet tohum elde edilmiştir. *R1-nj* renk markörü dikkate alınarak seleksiyon yapılmış ve 3012 adet haploid kabul edilen tohum seçilmiştir. Yönteme göre her bir indirgeyici hattın Sakarya koşullarında haploid indüklenme oranı (HİO) belirlenmiştir. En yüksek HİO, RWK-76 indirgeyici hattında %20.42 bulunmuştur. En düşük HİO ise WS14 hattında %17.75 olarak hesaplanmıştır. Haploid embriyoya sahip tohumlar 23 °C’de karanlıkta iklim odasında çimlendirilmiştir. Çimlendirilmiş materyalde koleoptil ve kök kısaltılmıştır. Kromozom katlaması için %0.06 colchicine+%0.5 dimethylsulfoxide (DMSO) çözeltisi 20 °C’de 12 saat uygulanmıştır. Daha sonra su ile yıkanarak viyollere dikimi yapılmıştır. KH<sub>0</sub> bitkileri 3-4 yapraklı olana kadar iklim odasında büyütülmüştür. Tarlaya dikimi yapılan KH<sub>0</sub> bitkilerinde çiçeklenme döneminde fertil olanlarda kendileme yapılmıştır. Haploid kabul edilen 3012 tohumdan çimlendirme ve kromozom katlaması sonrası tarlaya dikilen 2178 fideden %89’u canlı bitki, canlı bitkilerin %57’si fertil bitki, fertil bitkilerin %31.23’ü kendileme yapılabilecek bitki ve kendileme yapılan bitkilerden %7.8’i kendileme yapılarak tohum alınan bitki olmuştur. Tez çalışması sonucunda 27 adet katlanmış haploid hat elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Mısır, ıslah, *in vivo* maternal haploid, katlanmış haploid, kromozom katlaması

2016 , 114 sayfa

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### DEVELOPMENT OF DOUBLED HAPLOID MAIZE LINES BY USING *IN VIVO* HAPLOID TECHNIQUE

**Rahime CENGİZ**

Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Field Crops

Supervisor : Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT

The double haploid (DH) technology has become widely used tool of modern maize breeding programs in recent years. There are two methods *in vivo* haploid induction in maize which are paternal (androgenetic) haploid and maternal (gynogenetic) haploid induction. In this study, the maternal haploid induction method was applied. RWS, RWK-76, RWS x RWK-76 and WS14 inducer genotypes were used as pollinator. This study was conducted through 2010-2013 years and 30 single cross were used as source material. The source materials are in 650-700 FAO maturity groups. Seeds of 15911 number were obtained by crossing inducer lines with source materials. Putative haploid seeds of 3012 number were selected as using *R1-nj* coloration marker gene. According to the method, haploid induction rate (HIR) was determined in each inducer line on Sakarya location. Highest HIR were established as 20.42% in RWK-76 inducer line. The lowest HIR was calculated as 17.75% in the WS14. Putative haploid seeds were germinated at 23 °C in a growth chamber. Coleoptile and root of seedlings were reduced and treated with 0.06% colchicine+0.5% dimethylsulfoxide (DMSO) solution for 12 hours at 20 °C to seedlings. Seedlings were planted viols after washing with water and DH<sub>0</sub> plants were grown until reaching 3-4 leaves in growth chamber. Following planting in the field, inbreeding were conducted for the fertile DH<sub>0</sub> plants during the flowering period. Seedling of 2178 was formed from putative haploid seeds of 3012 numbers. Live plants were from 89% of 2178 seedlings which are planted the field. Fertile plants were formed 57% of live plants. Inbreeding were able to made on 31.23% of fertile plants and seeds have been taken from 7.8% of inbreeding plants. At the end of the study, 27 doubled haploid lines were obtained.

**Keywords :** Maize, breeding, *in vivo* maternal haploid, doubled haploid, chromosome doubling

2016 , 114 pages

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iii
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	iv
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	7
2.1. Haploid Bitkilerin Özellikleri .....	7
2.2. Haploid Bitkilerin Elde Ediliş Yöntemleri .....	9
2.3. İndirgeyici Hatlar ve Özellikleri .....	23
2.4. Haploid Tohumların Ayrımı İçin Kullanılan Sistemler .....	25
2.5. <i>In vivo</i> Haploid İndüklemenin Temelinde Olan Muhtemel Biyolojik Mekanizmalar .....	31
2.6. Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi .....	43
2.7. Maternal Haploidlerin Kromozom Katlaması .....	45
2.8. Haploid İndirgeme İçin Kullanılacak Kaynak Materyal .....	49
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	52
3.1. Materyal .....	52
3.2. Yöntem .....	56
3.2.1. Kaynak materyal ve indirgeyici genotiplerin yetiştirilmesi .....	58
3.2.2. <i>In vivo</i> maternal haploid tekniği ile haploidlerin elde edilmesi .....	59
3.2.3. Kromozom katlaması .....	64
3.2.4. Katlanmış haploid bitkilerin yetiştirilmesi ve hasadı .....	71
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA</b> .....	79
4.1. İndükleme Melezlemesi .....	79
4.2. Haploid Kabul Edilen Tohumların Seçimi ve Haploid İndükleme Oranı (HİO) .....	82
4.3. Çimlendirme ve Kromozom Katlaması .....	87
4.4. Katlanmış Haploid Bitkilerde Gözlemler .....	88
4.5. Hasat ve Gözlemler .....	90
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	94
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	101
<b>EKLER</b> .....	107
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	113
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	114

## ŞEKİL DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Paternal haploid indüklenme metodu.....	11
Şekil 2.2. Maternal haploid indüklenme metodu.....	13
Şekil 2.3. Maternal haploid indüklenme metodunda haploid ve katlanmış haploidlerin oluşumu.....	14
Şekil 2.4. Klasik ıslah ve katlanmış haploid tekniğinde eklemeli varyans karşılaştırması.....	15
Şekil 2.5. Katlanmış haploid hatlar ile F <sub>2</sub> generasyonunda hedef genlerin bir genotipte ortaya çıkma frekansı açısından karşılaştırılması.....	16
Şekil 2.6. Farklı heterotik gruplar kullanılarak katlanmış haploid hatların geliştirilmesi ve melez mısır ıslahında kullanılması.....	17
Şekil 2.7. Tüm genom seleksiyonu (Genome-wide Selection) entegre edilerek KH hatların geliştirilmesi, PS; fenotipik seleksiyon (phenotypic selection), GS; tüm genom seleksiyonu (genome-wide selection), $\square$ ; tüm genom seleksiyonunun yapıldığı dönem sembolü, A, B, C, D: Homozigot hatlar, F <sub>1</sub> : Melez, H: Haploid, KH: Katlanmış haploid, KH tek sıra GB: Katlanmış haploidlerin tek sıralı gözlem bahçesi, YM <sub>2</sub> : Yoklama melezi verim denemeleri.....	18
Şekil 2.8. Altı hedef genin bir genotipte toplanması için gen piramidi şeması, P; ebeveyn (parent), H; hibrit (hybrid).....	19
Şekil 2.9. KH hatların yoklama melezi seleksiyonu ile geliştirilmesinin standart ve hızlandırılmış ıslah şeması, A, B, C, D; Homozigot hatlar, F <sub>1</sub> ; Melez, H: Haploid, KH; Katlanmış haploid, KH tek sıra GB; Katlanmış haploidlerin tek sıralı gözlem bahçesi, T ve T'; Test edici hatlar, YM <sub>1</sub> ve YM <sub>2</sub> ; Yoklama melezi verim denemeleri.....	21
Şekil 2.10. Ön seçim yapılmış S <sub>2</sub> hatlarından KH hatların geliştirilmesi (diğer kısaltmalar için Şekil 2.2.9'a bakınız).....	22
Şekil 2.11. Navajo mısırın görüntüsü.....	26
Şekil 2.12. Haploid tohumların kök renkliliğine göre ayrımı.....	29
Şekil 2.13. Mısır bitkisinde normal çift dölllenme.....	32
Şekil 2.14. Haploid embriyoya ve diploid endosperme yol açan tek dölllenme.....	33
Şekil 2.15. a ve b: İki döllenmiş yumurtalığın sırasıyla döllenmeden 31 ve 30 saat sonra yumurta ve sperm çekirdeğinin birleşme başarısızlığını gösteren kesiti. Ok işareti sperm çekirdeğini (sperm nucleus-sn) göstermektedir, sperm çekirdeği yumurta çekirdeğinin yanında yumurta çekirdeğine nüfuz etmeden durmaktadır.....	34
Şekil 2.16. İndirgeyici hattın sperm çekirdekleri ile normal çift döllenenin gerçekleşmesi.....	35
Şekil 2.17. Hua24 x HZI1melezinden elde edilen mor aleuron ve mor embriyolu (F <sub>1</sub> ) tanelerin sitolojisi, a1-a4; F <sub>1</sub> tanelerinin kökçüklerinde kök ucu metafazları, 2n = 20 (a1), 15 (a2), 13 (a3), 10 (a4) Bar 10 $\mu$ m, c; kök metafazında bir gecikmeli kromozom, d-g; HZI1 ile döllenenmiş Hua24'ün yumurta hücreleri Bar 10 $\mu$ m, d; metafazda bir kromozom gecikmesi, e; anafazda bir	

	kromozom gecikmesi, f; telofazda gecikenler, g1 ve g2; telofazda mikroçekirdek, b1 ve b2; Nos. 869, 867'de haploidlerin polen taneleri Bar 20 µm.....	37
Şekil 2.18.	İndükleme özelliğinin normal olmayan dağılımı.....	39
Şekil 2.19.	Jinogenetik indükleme özelliğinin ortaya çıkma sıklığının mikrosatelit markörleri kullanılarak genetik haritalaması ve analizi.....	40
Şekil 2.20.	Haploid indükleme özelliğinin genetik haritalaması.....	41
Şekil 2.21.	Dört F <sub>2</sub> popülasyonunda açılım bozulmasının kromozomlardaki konumu, yönü ve boyutu (sütun SD), haploid indükleme oranı (HIR), embriyosuz tane oranının (EAR) popülasyonların Fn generasyonlarında belirlenmesi, Bin belirlemede IBM2 2008 komşuluk referans haritası temel alınmıştır ( <a href="http://maizegdb.org">http://maizegdb.org</a> ), sentromerik bin kalın çizgiler arasında gösterilmiştir.....	42
Şekil 2.22.	Embriyosuz ve endospermsiz taneler a; endospermsiz tanelerin görüntüsü, b; embriyosuz tanelerin oluşumu.....	43
Şekil 2.23.	Normal mitoz ve colchicine ile mitoz bölünme.....	46
Şekil 2.24.	Farklı kaynak materyallerde HİO ve yanlış sınıflandırma oranları, SC (Single Cross-Tek melez), LR (Landrace-Köy popülasyonu), OPV (Open Pollinated Variety-Açık döllenmiş çeşit), Dent (Atdışi), Flint (Sert mısır).....	51
Şekil 3.1.	Kaynak materyal olarak kullanılan tek melezlerden görüntü.....	53
Şekil 3.2.	RWS indirgeyici hattının bitki ve koçan görünümü.....	54
Şekil 3.3.	RWK-76 indirgeyici hattının bitki ve koçan görünümü.....	55
Şekil 3.4.	RWS x RWK-76 indirgeyici materyalinin bitki ve koçan görünümü.....	55
Şekil 3.5.	WS14 indirgeyici hattının bitki ve koçan görünümü.....	56
Şekil 3.6.	Klasik ıslah yöntemiyle kendilenmiş hatların elde edilmesi.....	57
Şekil 3.7.	<i>In vivo</i> maternal haploid yöntemi.....	57
Şekil 3.8.	Tek melezlerin koçanlarının izolasyon kağıtları ile kapatılması.....	60
Şekil 3.9.	RWS x RWK-76 indirgeyici materyalinde tepe püsküllerinin izolasyonu.....	61
Şekil 3.10.	Melez çeşitlerin indirgeyici hatların polenleriyle döllenmesi.....	61
Şekil 3.11.	RWS x RWK-76 indirgeyici materyali ile melezlenmiş bir koçanın izolasyon kağıdı ile kapatılması.....	62
Şekil 3.12.	<i>In vivo</i> maternal haploid yönteminde <i>R1-nj</i> renk markörüne göre tohum seleksiyonu (Orj.), MD; melez dışı kabul edilen tohumlar, F <sub>1</sub> ; indirgeyici hat ile melez olmuş tohumlar, H; haploid kabul edilen tohumlar, DE; diploid endosperme sahip tohumlar.....	63
Şekil 3.13.	İndükleme melezlemesinden elde edilen farklı kategorilerdeki tohumlar.....	64
Şekil 3.14.	Haploid tohumların iklim odasında çimlendirilmesi.....	65
Şekil 3.15.	Koleoptil ve köklerde makas yardımıyla kesme işlemi.....	66
Şekil 3.16.	Kromozom katlaması için hazırlanmış materyal.....	66
Şekil 3.17.	Colchicine çözeltisinin hazırlanması.....	67
Şekil 3.18.	Çimlendirilmiş materyallerin uygulama tankına yerleştirilmesi.....	68
Şekil 3.19.	Colchicine ve DMSO çözeltisinin uygulanması.....	68
Şekil 3.20.	Uygulama sonrası colchicine ve DMSO çözeltisinin boşaltılması.....	69
Şekil 3.21.	Colchicine ve DMSO çözeltisi boşaltıldıktan sonra materyalin yıkanması.....	69
Şekil 3.22.	Bitki materyallerinin plastik poşetlere dikilmesi.....	70
Şekil 3.23.	Bitki materyallerinin iklim odasında bekletilmesi.....	71



Şekil 3.24.	Bitki materyallerinin iklim odasında büyütülmesi.....	71
Şekil 3.25.	Fide çukurlarının açılması.....	72
Şekil 3.26.	Dikime hazır katlanmış haploid mısır fidesi.....	72
Şekil 3.27.	Katlanmış haploid mısır fidelerinin dikilmesi.....	73
Şekil 3.28.	KH <sub>0</sub> bitkilerinin tarladaki görüntüleri.....	74
Şekil 4.1.	Bir tek melezin farklı 3 indirgeyici materyal ile yapılmış melezleri.....	80
Şekil 4.2.	RWK-76 indirgeyici hattı ile indükleme melezlemesi yapılmış koçan.....	80
Şekil 4.3.	RWS indirgeyici hattı ile indükleme melezlemesi yapılmış koçan.....	81
Şekil 4.4.	WS14 indirgeyici hattı ile indükleme melezlemesi yapılmış koçan.....	81
Şekil 4.5.	İndirgeyici genotiplerin <i>RI-nj</i> renk markörü ifadeleri, a; RWS x RWK-76, b; RWK-76, c; RWS, d; WS14.....	82
Şekil 4.6.	<i>RI-nj</i> renk markörüne göre haploid kabul edilen tohumların seleksiyonu.....	83
Şekil 4.7.	<i>RI-nj</i> renk markörünün endosperm ve embriyoda çıkış yoğunluğu.....	85
Şekil 4.8.	İndükleme melezlemesinden elde edilen diğer kategoriler, a; endospermsiz taneler, b; embriyosuz taneler.....	86
Şekil 4.9.	Tepe püskülünde fertil ve steril başakçıklar.....	89
Şekil 4.10.	ADA 6.17 donöründen gelen KH <sub>0</sub> bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan.....	91
Şekil 4.11.	ADA 8.18 donöründen gelen KH <sub>0</sub> bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan.....	91
Şekil 4.12.	ADA 3.28 donöründen gelen KH <sub>0</sub> bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan.....	92
Şekil 4.13.	ADA 6.16 donöründen gelen KH <sub>0</sub> bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan.....	92
Şekil 4.14.	ADA 6.13 donöründen gelen KH <sub>0</sub> bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan.....	93
Şekil 5.1.	KH hatların ilk generasyonundan elde edilen tohum sayıları.....	97

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Mısır bitkisinde dihaploid hatların elde edilmesinde <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> sistemlerinin genel karşılaştırması.....	10
Çizelge 2.2. <i>In vivo</i> tekniğinde kullanılan indirgeyici hatlar ve özellikleri.....	23
Çizelge 3.1. <i>In vivo</i> maternal haploid tekniğinde kaynak materyal olarak kullanılan tek melezlerin özellikleri.....	52
Çizelge 3.2. Katlanmış haploid hatlarda alınan gözlemler ve değerlendirme karakterleri.....	75
Çizelge 4.1. İndükleme melezlemesinden elde edilen tohumlarda haploid ve diğer kategorilere ait tohum sayıları.....	83
Çizelge 4.2. İndükleme melezlemesinden elde edilen tohumlarda haploid indükleme oranı (HİO) ve diğer kategorilere ait oranlar.....	84
Çizelge 4.3. KH hatların ilk generasyonundan elde edilen tohum sayıları.....	90

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AB	: Avrupa Birliği
APM	: Amiprofos methyl
<i>Bl</i>	: Booster 1
C	: Çekirdek DNA miktarı
CMS	: Cytoplasmic Male Steril
DE	: Diploid Endosperm
DH	: Doubled Haploid
DMSO	: Dimethylsulfoxide
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ETO	: Embryosuz Tane Oranı
EAR	: Embryo Abortion Rate
FAO	: Food and Agriculture Organisation
FYD	: Farklılık Yeknesaklık Durulmuşluk
H	: Haploid
HIR	: Haploid Induction Rate
HİO	: Haploid İndükleme Oranı
INRA	: French National Institute for Agricultural Research
<i>ig</i>	: Indeterminate Gametophyte
KH	: Katlanmış Haploid
KH <sub>0</sub>	: Katlanmış Haploidlerin İlk Generasyonundaki Bitki
MD	: Melez Dışı
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NAA	: Naphthalene Acetic Acid
OPV	: Open Pollinated Variety
PAT	: Phosphinotricin Acetyl Transferase
<i>P11</i>	: Purple 1
PI	: Propidium Iodide
<i>R1-nj</i>	: R1-Navajo
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
QTL	: Quantative Trait Loci
S	: Selfing
SAM	: Sürgün Apikal Meristem
SC	: Single Cross
SSR	: Simple Sequence Repeat
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UPOV	: The International Union for the Protection of New Varieties of Plants

## 1. GİRİŞ

Mısır halen Dünya nüfusunun beslenme ihtiyacını karşılayan altı tahıldan bir tanesidir. Çok yönlü kullanım alanı, adaptasyon kabiliyeti ve verimliliği ile Dünya’da en fazla üretilen sıcak iklim tahılıdır. Dünya mısır üretimi 2015 yılı Aralık ayı verilerine göre toplam 973.87 milyon ton olmuştur (Anonymous 2015).

Ülkemizde tahıllar içerisinde buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanına sahip olan mısır, ana ürün ve ikinci ürün olarak başarıyla üretilmektedir. 1980’li yıllardan sonra Türkiye’de mısır üretiminde belirgin artışlar kaydedilmiştir. Devletin mısır üretimini teşvik etmesi, üreticilerin modern mısır üretim tekniklerini uygulamaya koyması, hibrit tohum kullanımının yaygınlaştırılması, mısır üretiminin sulanan alanlara kaydırılması ve belli düzeylerde gübre kullanımının sağlanması mısırdaki verim artışının nedenleri olarak sıralanabilir. Geçmiş yıllarda Akdeniz Bölgesi’nde mısır üretiminin yaygınlaştırılması, son yıllarda ise özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki yoğun mısır ekilişleri ve ülke genelinde verim artışları ile birlikte Türkiye mısır üretiminde gözle görülür bir artış olmuştur (Cengiz 2014).

Türkiye, mısırın ana vatanı olmamasına rağmen, sarı ve beyaz atdışi, sarı sert, cin mısır ve şeker mısırında yerel popülasyonlar mevcuttur. 1980’li yıllarda farklı bölgelerden toplanan popülasyonlar Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nde bulunan gen bankasında muhafaza edilmektedir. Aynı materyaller ıslah çalışmaları yürüten enstitüler tarafından değerlendirilmiş ve tane tiplerine göre popülasyonlar oluşturulmuştur. Yürütülen popülasyon ıslah çalışmaları ile bazı özellikleri bakımından geliştirilmiştir. Bazı sarı atdışi popülasyonlar ise halen kendilenmiş hatların elde edilmesinde kaynak materyal olarak kullanılmaktadır (Cengiz 2014).

Mısır, Dünya’da 1800’lü yıllardan beri ıslah çalışmalarının en yoğun şekilde sürdürüldüğü bitki türü olma özelliğini taşımaktadır. Ülkemizde 1950’lerde başlayan mısır ıslah çalışmaları önemli sonuçları ortaya çıkarmıştır. Kamu araştırma enstitüleri, ıslaha yeni teknolojileri entegre ederek ve alt yapıdaki donanım yetersizliklerini tamamlayarak gelecekte de önemli çalışmalar yapacak birikime sahiptir. Bugüne kadar ülkemizde bu ıslah programları ile

çok sayıda kendilenmiş hatlar ve 42 adet mısır çeşidi geliştirilmiştir. Bu çeşitlerin 22 adedi üretimde yer almaktadır (Cengiz 2014).

Tescil edilen melez mısır çeşitlerinin içinde yerli melez mısır çeşit sayısı oldukça azdır. Ülkemizde yabancı sermayeli özel sektör çok sayıda hibrit mısır çeşitleri tescil ettirmişlerdir. Bu çeşitler yaygın ekim alanı bulmuştur. Kamu araştırma enstitülerinin geliştirdiği hibrit mısır çeşitleri yerli sermayeli özel sektöre devredilmesine rağmen, kamuya ait çeşitlerin, tohumluğun içindeki oranı yıllara göre değişmekle beraber %2-5 arasındadır. Yerli sermayeli özel sektör firmalarımız sermaye açısından yabancı sermayeli özel sektör firmaları ile kıyaslanamayacak durumdadır. Buna rağmen, daha çok sayıda yerli firma yeni geliştirilen çok sayıda çeşidin tohumluğunu üretip çiftçiye ulaştırdıklarında ülkemizde kullanılan yerli mısır tohumluğunun oranı artacaktır. Yerli sermayeli özel sektör ulusal ve uluslararası tohumculuk piyasasında rekabet gücü kazanacaktır (Cengiz 2014).

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 25 Eylül 2014'te resmi gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren "Bitki Çeşit, Çeşit Adayı ve İslah Materyalinin Tohumculuk Kuruluşlarına Devri, Tohumluk Üretimi ve Pazarlama Hakkı Satışı Hakkında Yönetmelik" ile kamu araştırma enstitülerinin geliştirdiği ve geliştireceği mısır hatlarının kullanım hakları yerli sermayeli özel sektör tohumculuk firmalarına verilebilecektir (Anonim 2014). Bu yönetmelik kamu araştırma enstitülerine nitelikli ve çok sayıda mısır hattını kısa sürede geliştirme sorumluluğunu yüklemiştir. Bu sorumluluğun yerine getirilmesinde haploidi tekniği önemli bir enstrümandır.

Hibrit mısır ıslahında ilk ve temel aşama kendilenmiş hatların elde edilmesidir. Kendilemede amaç homozigot hatların oluşturulmasıdır. Kendileme işlemi için en az yedi yıl gerekmektedir. Bir materyalin teknik olarak yedi yıl kendileme yapılmasıyla %99'luk bir homozigotlukta kendilenmiş hat elde edilmektedir. Çeşit geliştirme süreci içerisinde en fazla zamanı, anaçların elde edilmesi almaktadır. Bu sürecin kısaltılması için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni yöntemlerin kullanılması alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Cengiz ve ark. 2013).

Mısır yabancı döllenen bir türdür ve her yeni generasyon genotipini oluşturmak için gereken genleri bir arada toplayan bir popülasyon olarak düşünülebilir. Böyle bir popülasyon içindeki her genotip diğerlerinden bir dereceye kadar farklıdır. Her biri yüksek derecede heterozigottur. Her biri geniş çapta yabancı döllenenmiştir ve her biri farklı dölleri verirler. Bu bitkiler yüksek derecede heterozigot olmalarına rağmen, bazı ıslah metotlarıyla bazı karakterleri fikse edilerek homozigot hale getirilebilir. Fakat, döllenmeleri serbest bırakıldığında bu homozigotluk kolaylıkla bozulabilir. Yabancı döllenen bitkilerde yedi generasyon kendileme sonunda homozigot karakterde, istenen özelliklere sahip bitkilerin seçilmesiyle elde edilen her bir bitkiye kendilenmiş hat (saf hat, saf döl) denir (Cengiz ve ark. 2013).

Mısırdaki yüksek verimli ve kaliteli hibritlerin geliştirilmesi için sürekli olarak yeni kendilenmiş hatların geliştirilmesi gerekir. Geleneksel metotlar ile kendilenmiş hatların elde edilmesinde oldukça uzun süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sürenin kısaltılmasında haploid tekniği önemli avantajlar sağlamaktadır. Mısır ıslahında katlanmış haploidlerin potansiyeli uzun süre önce ortaya konmuştur (Chase 1969). Mısır haploid çalışmaları 1920'lerde başlamıştır. Chase'in ticari hibrit çalışmaları için katlanmış haploid (KH) hatlar geliştirmeye başlamasına kadar mısır haploid çalışmaları sınırlı kalmıştır. Chase (1951) mısır ıslahında katlanmış haploidlerin pratik uygulamasını göstermiştir. Chase'in ilk önemli haploid ebeveynli hibriti Dekalp 640 çeşidi olmuştur. Bir çift melez ile geliştirilen bu çeşidin 3 hattı KH hatlardan oluşmuştur (Forster ve Thomas 2005).

Günümüzde verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Klasik bitki ıslahının temelini oluşturan varyasyon ve seleksiyon, yeni teknolojide karşımıza transformasyon ve *in vitro* seleksiyon olarak çıkmaktadır (Simmonds 1983, Philips ve Eberhart 1993).

Haploid tekniğinin diploid ve allopoliploid türlerin homozigot bitkilerinin elde edilmesinde, yeni çeşit ve saf hat ıslahında giderek önemleri artmaktadır. F<sub>2</sub> generasyonunda hastalıklara dayanıklı, agronomik ve kalite özellikleri yönünden üstün genotiplerin seçimi KH genotiplerde daha kolaydır (Kasha ve ark. 2006).

Günümüzde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda haploid bitkiler kısa sürede elde edilmektedir. Haploid bitkilerin kromozom setlerinin katlanması ve %100 homozigot saf hatların hızla geliştirilmesi, haploidi tekniğinin esasını oluşturmaktadır. Kromozom katlanması pratikte çoğunlukla kimyasal madde uygulamalarıyla gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlerle homozigot hatların elde edilmesi 1-2 yıl gibi kısa bir sürede olmaktadır (Geiger 2009). Mısır ıslah çalışmalarında son 3-5 yıl içerisinde *in vivo* haploid tekniği yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Dünya’da yapılan çalışmalarda katlanmış haploid hatların haritalama popülasyonları olarak, bağlantı analizlerinde ve haplotip analizlerinde kullanılabilirliği belirlenmiştir (Röber ve ark. 2005).

Haploidler, döllenmemiş dişi yumurtadan (gynogenesis) veya erkek hücreden (androgenesis) geliştirilir. *In vitro* androgenesis metodu anter kültürü ile yapılır. Mısır bitkisinde embriyodan haploidlerin elde edilmesinin bilinen iki farklı yöntemi vardır. Bunlar maternal haploid ve paternal haploidlerdir. Bu yöntemde, bazı doğal genotipler kullanılır ki bunlar ‘indirgeyici hat’ olarak adlandırılır, bu hatlar ile maternal haploidler elde edilebilir. İndirgeyici hatların tozlayıcı olarak kullanıldığı yöntem *in vivo* gynogenesis olarak tanımlanır. Ancak, indirgeyici hatlardan tohum elde etmek zordur. Tohumu üretecek nesilde embriyo çoğunlukla haploiddir. Hattın içinde üretim yapılırken hat içi tozlamada elde edilen döllerin çoğunluğu diploiddir. Modern indirgeyici hatlardan haploid elde etme oranı %5-8 arasındadır (Geiger 2009).

Mısır bitkileri indirgeyici olarak adlandırılan özel genotipler ile melezlendiğinde haploid ve normal diploid embriyoya sahip mısır taneleri kesin ve net bir ayırım gösterir. Bu durum *in vivo* haploid indirgeme olarak isimlendirilir. Genellikle haploid embriyolu taneler normal triploid endosperme sahiptir. Bu yüzden bu taneler diploid embriyolu taneler gibi aynı çimlenme oranı ve çimlenme gücünü gösterir (Coe ve Sarkar 1964).

Hibrit çeşit ıslah sürecinin temelini oluşturan homozigotlaşma, popülasyon içinden uygun genotiplerin seçimi ve sonra uygulanacak 7 kendileme generasyonu ile elde olunmakta, bu yolla yinede %100 homozigot dölleri elde edilememektedir. Buna karşılık, haploid bitkilerden kromozom katlaması yoluyla %100 homozigot genotip elde edilebilmektedir. Böylece uzun yıllar

gereksinme duyulan kendileme işlemleri bir iki yıl kadar kısa sürede yapılabilmektedir. Hibrit mısır ıslahında KH hatları kullanma avantajları; i) melez ıslahında KH hatları kullanarak tek sıra gözlem bahçeleri ve yoklama melezi denemelerinde maksimum genetik varyans sağlanması, ii) katlanmış haploid hatların %100 homozigot olma durumları ve çoğaltılabilir oluşu ile klasik ıslah programında hatların erken generasyonda seçilmesinden doğan olumsuz sonuçları ortadan kaldırması, iii) hedeflenen genlerin bir genotipte yığılması ile yüksek verim performansının olması, iv) ıslah çalışmalarının basitleştirilmesi, v) ıslah çalışmaları için harcanan yüksek giderlerin düşürülmesi olarak sıralanabilir (Röber ve ark. 2005).

Haploid bitkiler, morfolojik görünüşleri bakımından diploidlere göre daha küçük yapıdadırlar. Normal bir bitkide bulunan tüm organlara sahip oldukları halde, diploidlere oranla hücreleri daha küçük olan haploid bitkilerin boyları daha kısa, yaprakları dar ve küçüktür. Çiçekleri de diploidlere oranla küçük olan haploidler, hücrelerinde taşıdıkları kromozom sayısı bakımından indirgenmiş gametlerin yapısını gösteren bitkilerdir. Bu bitkiler gamet oluşturamadıkları için kısır ve tohum bağlayamazlar. Haploid bir bitkinin kromozomlarının bazı kimyasal maddeler yardımıyla veya spontan olarak katlanması sonucunda ait olduğu türün kromozom sayısına ( $2n$ ) yeniden kavuşturulması, böylece mutlak homozigot bitkilerin elde edilmesine yaygın olarak 'dihaploidizasyon' adı verilmektedir. Haploidlerin kromozom sayılarının katlanmasıyla elde edilen bitkilere, değişik dillerde farklı isimler verilmektedir. Örneğin İngilizce'de 'dihaploid' veya 'doubled haploid' hatta son zamanlarda sadece 'DH', Fransızca'da 'haplodiploid' veya 'haploide doublé', Türkçe'de ise 'katlanmış haploid' terimleri kullanılmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark. 2001).

Haploid bitkiler sadece tek kopya kromozom içermektedirler. Maternal *in vivo* indükleme ile elde edilen haploidler sadece donör ebeveyninden kromozom içerirler. Haploid bitkilerin üreme organlarında mayoz bölünme esnasında homolog kromozom çiftleri oluşturma gibi ilerleyemediğinden, erkek ve dişi gametler üretken değildir. Yani, haploid bitkiler genellikle kısırdır. Kromozom katlamasının amacı bir haploitten ( $n$ ) katlanarak ( $2n$ ) katlanmış haploid üretilen haploid bitkilerde fertilitiyi sağlamaktır. Böylece bu bitkilerde kendileme yapılarak KH hatları geliştirilebilir (Chaikam ve Mahuku 2012).



Colchicine, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısı ile replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar (Ellialtıoğlu ve ark. 2001).

Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenebilmesi için değişik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bitkinin fenotipine göre yapılan ayrımlar kromozom sayısı bakımından bir fikir verse de, kuşkusuz ploidi belirlemede kullanılan en eski ve en güvenilir yöntem, hızlı büyüyen doku ve organlarda (özellikle kök uçlarında) yapılan kromozom sayımlarıdır. Ancak, son yıllarda kromozom sayımlarına alternatif yöntemler de geliştirilmiş ve değişik bitki türlerinde uygulama alanı bulmuştur. Flow sitometri ve stoma hücrelerinde yapılan gözlemlere dayanarak geliştirilen yöntemler, günümüzde ploidi düzeyinin belirlenmesinde kromozom sayımlarının yanısıra rutin olarak kullanılabilir aşamaya gelmiş yeni tekniklerdir (Ellialtıoğlu ve ark. 2001).

Ülkemizde var olan genetik materyal zenginliğimizin saflaştırılarak çeşit geliştirilmesinde kullanımı son derece yararlı olacak bir teknik olan haploid tekniği, pratik anlamda ıslah çalışmalarında yerini almaya başlamıştır. Bu doktora tezi, ülkemizde mısır ıslah çalışmalarında indirgeyici hatların kullanımı ile KH mısır hatlarının elde edilmesi konulu ilk akademik çalışma olmuştur. Dünya’da pek çok ülkede indirgeyici hatların kullanılmasına rağmen, ülkemizde bu materyallerin bulunmaması çalışmaların yapılmamasına sebep olmuştur.

Mısır Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen mısır çeşitlerinin indirgeyici hatlar ile melezlenerek haploid materyalin elde edilebilirliği ve kromozom katlaması ile KH mısır hatlarının oluşturulması bu çalışmanın amacı olmuştur.

Tez çalışması ülkemizde *in vivo* maternal haploid tekniğinin mısır ıslahında kullanımına bir örnek olması sebebiyle bazı teknik terimler de ilk defa Türkçe olarak verilmiştir. Dünya literatüründe “inducer line” olarak bilinen materyaller dilimize “indirgeyici hat” olarak uyarlanmıştır. “Doubled haploid” tanımı ise “katlanmış haploid” olarak tanımlanmıştır. İndirgeyici genotiplerin en önemli özelliği “Haploid Induction Rate-HIR” ise “Haploid İndükleme Oranı-HİO” olarak çevrilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kaynak Özetleri bölümü alt başlıklar halinde ele alınmıştır.

### 2.1. Haploid Bitkilerin Özellikleri

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gametlerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler adı verilmektedir. Haploidler, her bir lokustaki allelerden sadece bir seriyi içermekte ve bu özellikleri ile ıslah çalışmalarında önemli yer tutmaktadırlar. Haploid bitkilerin homolog kromozomlardan sadece bir takımını içermesi, resesif mutasyonların açığa çıkartılmasına olanak tanımaktadır. Bunun yanısıra, haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması sayesinde %100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Böylece, uzun yıllara gereksinim duyan saflaştırma işlemi birkaç yıl gibi kısa bir sürede yapılabilen; kombinasyon ıslahı ve hibrit çeşit ıslahı programlarında zaman yönünden önemli düzeyde kazanç sağlanabilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark. 2001).

İlk haploid mısır bitkileri Stadler ve Randolph tarafından tanımlanmıştır (Randolph 1932). Chase (1947) yirmi yıl sonra Amerika mısır kuşağı materyallerinde düşük oranda (1/1000) haploidler bulmuştur. Chase, haploidlerin genetikte ve mısır ıslahında büyük potansiyellerinin olacağına farkına varmıştır. Colchicine kimyasalının kromozom katlamasında etkili madde olduğunun bulunması, anter ve mikrospor kültürü tekniklerindeki başarılı uygulamalar ve özel genotiplerin *in vivo* haploid çalışmalarına uygunluğunun belirlenmesi diğer kilometre taşları olmuştur. Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki, hem *in vitro* hem de *in vivo* haploid indirgemedede çok genle yönetilen karakterler ve QTL (Quantative Trait Loci-Kantitatif Karakter Lokus) analizleri ile haploid indüklenme genomik bölgeleri hemen hemen tüm kromozom üzerinde belirlenmiştir (Geiger 2009).

Haploid bitkiler, KH veya kendilenmiş hatlara oranla daha küçük ve daha az bitki canlılığına sahiptirler. Haploid bitkiler herhangi bir stres koşuluna çok daha hassastır. Pek çok haploid bitki diploid bitkilerle döllenğinde belli bir oranda dişi çiçek fertilitesi gösterir (Chase 1952, Chalyk 1994).

Chalyk (1994) sentetik atdışı popülasyonundan geliştirdiği haploidlerin %96'sının en azından birkaç tohum ürettiğini yaptığı çalışmada belirlemiştir. Bu çalışmada ortalama 27 adet tohum, en fazla 107 adet tohum elde edilmiştir.

Geiger ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada üç adet tek melezden elde edilen haploid neslini analiz etmişler ve onların hepsinde farklı oranlarda fertilité gözlemlemişlerdir. Fertilitesi en yüksek haploid bitkide bitki başına tane sayısı 80 olarak gerçekteşmiştir. Dişi çiçeğin fertil olmasının aksine haploid bitkilerin çoğunluğu erkek fertiliteden yoksundur.

Chase (1952) ilk çalışmalarında haploid bitkilerin %1'inde tepe püsküllerinde fertil bölümler tespit etmiştir.

Zabirova ve ark. (1993) çalışmalarında haploidlerin polen verme oranı için donör genotiplerin büyük etkisini kanıtlamışlardır. Çalışmada belirlenen bir donör hattan elde edilen haploidlerin %33'ü başarılı bir şekilde kendilenmiştir. Çalışmada kullanılan donör hat bahsedilen özelliği için dört döngü seleksiyon sonucu elde edilmiştir.

Geiger ve Schönleben (2011) yaptıkları çalışmada farklı ışlah materyallerinden (durulmuş mısıır hatları) elde ettikleri haploidlerin, flow sitometri yöntemiyle haploid olduklarını doğrulamışlardır. Bu haploidlerde dişi organın fertil olduğunu tespit etmek için diploidler ile melezleme yapılmıştır. Haploid hatlar dişi fertilité göstermiştir. Haploid hatların erkek fertilité oranlarını belirlemek için tarla ve sera koşullarında çalışmalar yürütölmüş ve kendileme yapılmıştır. Tarla şartlarında 412 haploid bitkide anter skorlaması yapılmıştır. Toplam 412 haploid bitkinin 29 adedi (%7) koçan başına bir veya daha fazla tohum üretmiştir. Sera çalışmalarında 371 haploid bitkiden 248 adedinde belli oranlarda erkek fertilité gözlemlenmiştir. Tüm bitkilerde kendileme yapılmıştır. Bunlardan 27 adedinde tohum tutumu olmuştur. Bu bitkilerin 3 tanesinde sırasıyla 23, 16 ve 11 adet koçan başına tane oluşmuştur.

Çalışmalar gösteriyor ki haploid bitkilerde dişi fertilité daha yüksek oranda gözlemlenirken, erkek fertilité donör genotipe bağlı olarak farklı oranlarda ortaya

çıkabilmektedir. Fakat, bu oran düşük olduğundan haploid bitkilerde yapay kromozom katlamasını gerektirmektedir.

## 2.2. Haploid Bitkilerin Elde Ediliş Yöntemleri

Haploid bitkiler, bazı bitki türlerinde çeşitli doğal yollarla kendiliğinden oluşabilmektedir. Doğada haploidlerin oluşum yolları beş ana grupta özetlenebilir (Ellialtıoğlu ve ark. 2001):

- 1- Yumurta hücresinin döllenmesinden önce, dişi eşey hücresinin çekirdeği kaybolur veya inaktif hale geçer. Bu yolla oluşan haploidler, hücrelerinde yalnızca erkek gametin kromozom takımını içerdiklerinden bu olaya androgenesis adı verilmektedir (Goodsell 1961).
- 2- Erkek ve dişi eşey hücrelerinin birleşerek embriyo oluşumuna katılmasının söz konusu olduğu fakat, çekirdeksel erimenin gerçekleşmediği semigami durumunda ise ana ve babaya ait sektörlerin bulunduğu kimeralı haploid bitkiler oluşmaktadır (Turcotte ve Feaster 1969).
- 3- Yumurta hücresi ile polen generatif çekirdeği birleşirler ve döllenme olur. Ancak, embriyo gelişmesinin ilk devrelerinde ana babadan birine, genellikle babaya ait kromozomlar elimine olur ve gelişen embriyo n sayıda kromozom içerir. Bu şekildeki haploid oluşumuna da kromozom eliminasyonu adı verilir (Subrahmanyam ve Kasha 1973).
- 4- Poliembriyoni durumunda, normal döllenme sonucu zigot bölünmeye başlar. Ancak, döllenmiş yumurta hücresinin yanındaki sinerjit hücrelerinden biri de bölünerek gelişir ve haploid embriyo haline geçer. Böylece, yeni oluşan tohum içinde biri diploid, diğeri haploid olan iki embriyo bulunur (Lacadena 1974).
- 5- Yumurta hücresi döllenme olmaksızın zigot gibi bölünmeye başlayarak haploid yapıda bir embriyo oluşturur. Dişi eşey hücresi ile erkek eşey hücresi birleşmediği halde; embriyo kesesi sekonder çekirdekleri ile polen generatif çekirdeği birleşerek embriyonun gelişip çimlenebilmesi için gereksinim duyacağı endospermi oluştururlar. Bu durum ginogenesis olarak adlandırılmaktadır (Sauton 1989).

İndirgeyici hatlar kullanılarak *in vivo* tekniği ile haploid bitki elde etme başarısı kullanılan indirgeyici hattın özelliklerine göre %2-15 arasında değişmektedir (Röber ve ark. 2005).

Anter kültürü tekniği ile *in vitro* da haploid bitki elde etme başarısının da yine genotiplere bağlı olarak %2-10 arasında olduğu bildirilmiştir. Haploid bitki elde etme başarı oranları iki teknik arasında çok farklı olmamakla beraber her iki yöntemde de genotipe bağlıdır (Beckert 1994).

Beckert (1994) *in vitro* ve *in vivo* haploid bitki elde etme sistemlerini karşılaştırmanın zor olduğunu çünkü, birbirlerinden farklı olduklarını belirtmiştir. Genel bir değerlendirme yaparak aşağıdaki kriterleri belirlemiştir (Çizelge 2.1).

**Çizelge 2.1.** Mısır bitkisinde dihaploid hatların elde edilmesinde *in vitro* ve *in vivo* sistemlerinin genel karşılaştırması (Beckert 1994)

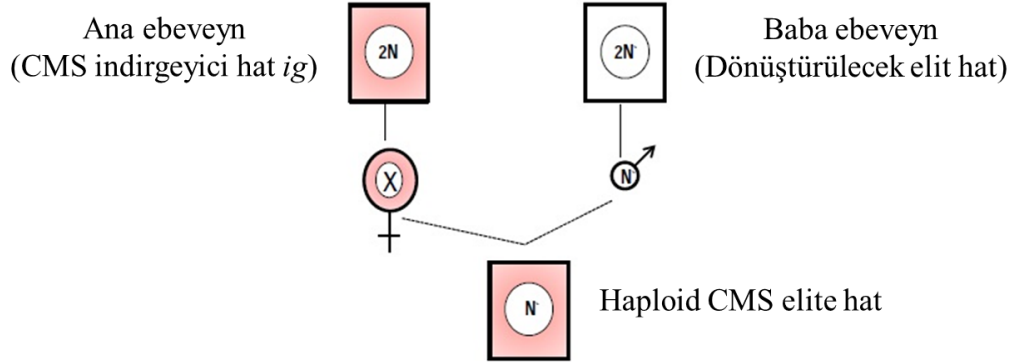
Parametreler	<i>In vivo</i> gynogenesis	<i>In vitro</i> androgenesis
Genotipik seçicilik	Düşük	Güçlü
Elde edilen dihaploidlerin takibi (Tekrarlamalı seleksiyon)	Gerekli	Gereksiz
Haploid bitki elde etme averajı	Düşük	Düşük
En yüksek haploid üretimi	Melez başına 12 haploid	Her bir anterden bir haploid
Spontan dihaploid oluşumu	Çok düşük, % 1	% 20-30
Tohum verimi	Kötü	Daha iyi
Katlanmış haploidlerin homojenitesi	İyi	İyi
Katlanmış haploidlerin stabilitesi	İyi	İyi
Katlanmış haploidlerin üretim maliyeti	Düşük	Orta

*In vivo* haploid indüklemenin mısırdaki paternal (androgenetic) ve maternal (gynogenetic) haploidler olarak bilinen iki metodu vardır. Paternal haploid metodunda, indirgeyici materyal ana ebeveyn, donör bitki ise baba ebeveyn olarak kullanılır. Böylece, paternal haploidlerin sitoplazması indirgeyici hattan meydana gelir fakat, kromozomlar sadece donör bitkiye aittir (Röber ve ark. 2005, Spitko ve ark. 2006).

Paternal haploid indükleme, *ig* resesif geninin sebep olduğu “indeterminate gametophyte” mutantının sahip olduğu özelliklerde yatmaktadır (Kermicle 1969). Çoklu embriyolojik anormallikler homozigot *ig* bitkilerinde gözlemlenmiştir. Bazı embriyo keselerinde tüm çekirdekler 3 kez bölünmez. Bu bir çekirdek olmaksızın yumurta hücrelerini içeren çeşitli

hücresel düzensizliklere yol açar. Babaya ait iki sperm hücresinden biriyle birleştikten sonra, böyle bir yumurta hücresi, anaya ait sitoplazma ve sadece babaya ait kromozomlara sahip bir haploid embriyo içinde gelişebilir (Geiger 2009).

Paternal haploidler, klasik melez mısır ıslahında hatların benzeş sitoplazmik erkek kısır hatlarının geliştirilmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu amaçla sitoplazmaları indirgenmiş erkek kısır indirgeyici hatlar geliştirilmiştir (Pollacsek 1992, Schneerman ve ark. 2000). Bu CMS (cytoplasmic male steril) indirgeyici hatlarının kullanılması ile CMS sitoplazma özelliği yeni geliştirilen hatlara transfer edilirken, çoklu geri melez generasyonları oluşturmak yerine sadece tek bir indükleme melezi ile sonuca ulaşılmıştır (Şekil 2.1) (Schipprack 2012).



**Şekil 2.1.** Paternal haploid indükleme metodu (Schipprack 2012)

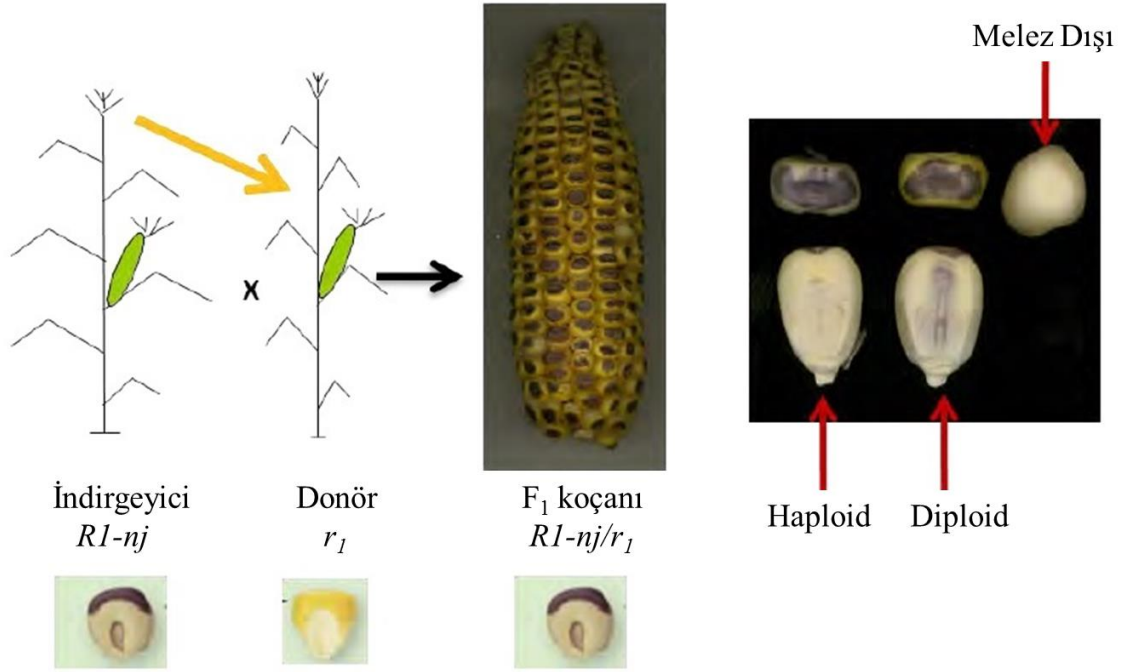
Maternal haploidlerin üretimi için indirgeyici genotip tozlayıcı olarak kullanılır. Ortaya çıkan haploidlerin taşıdığı hem stoplazma hem de kromozomlar donör bitkiden gelmektedir (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3). Paternal ve maternal haploid indükleme metodlarında farklı indirgeyici genotipler kullanılır. *In vivo* haploid indüklemenin her iki metodu da *in vitro* tekniğinden çok daha az donör genotipin yapısına bağlıdır (Röber ve ark. 2005, Spitko ve ark. 2006).

Chase (1952), Amerika mısır kuşağı materyallerinde spontan haploid indükleme oranını %0.1 olarak bildirmiştir. Chase tarafından belirtilen bu değer, KH teknolojisinin ekonomik bir

uygulama olabilmesi için oldukça düşüktür. Belirtilen %0.1'lik orandan 10-20 kere daha yüksek indüklenme oranına sahip Stock-6 kendilenmiş hattının belirlenmesi büyük bir adım olmuştur (Coe 1959). Stock-6, sonradan geliştirilen indirgeyici hatların anası olmuştur. Önemli gelişmeler Hindistan'dan (Sarkar ve ark. 1994), Rusya ve Moldovya'dan (Tyrnov ve Zavalishina 1984, Chalyk 1994, Shatskaya ve ark. 1994a), Fransa'dan (Lashermes and Becker 1988, Bordes ve ark. 1997) ve Almanya'dan (Deimling ve ark. 1997, Röber ve ark. 2005) pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Geçen zaman içinde, haploid tohumların seçimi için, kromozom katlaması için, tarlada katlanmış haploidlerin yetiştirilme teknikleri için daha etkili yöntemler geliştirilmiştir. Böylelikle KH teknolojisi modern mısır araştırma ve ıslahında standart bir araç olmuştur (Seitz 2005, Röber ve ark. 2005, Presterl ve ark. 2007).

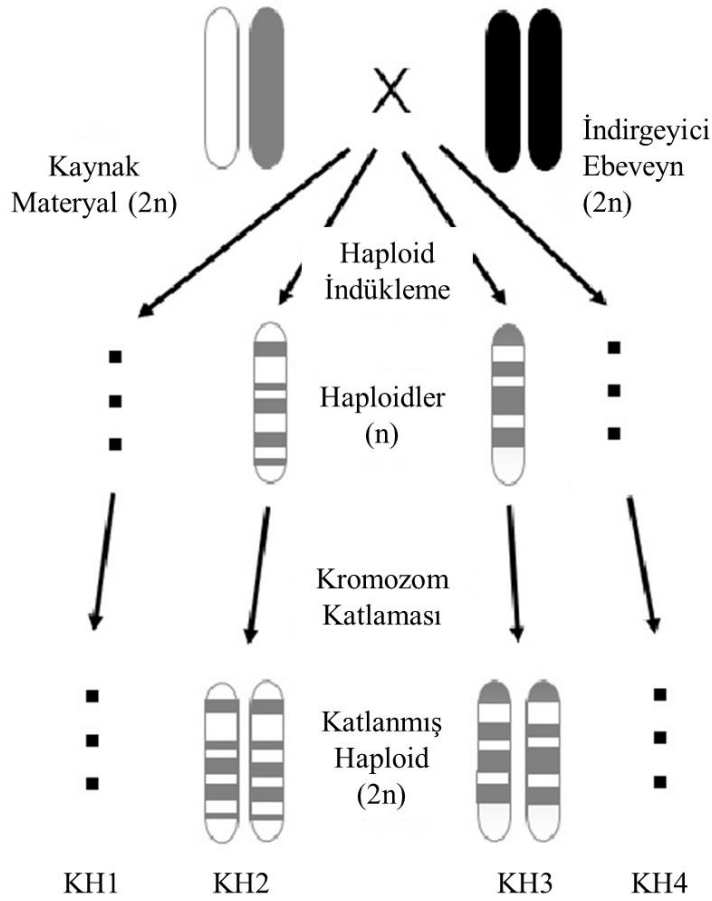
Katlanmış haploid teknikleri sayesinde homozigot mısır hatları elde etmek ve bunların nesillerini kendilemeyle devam ettirmek mümkündür. Bir indirgeyici hattın kullanımı *in vivo* da haploid bitki üretiminin basit, hızlı ve ucuz olarak elde edilmesini mümkün kılan bir yöntemdir (Röber ve ark. 2005).

Günümüzde katlanmış haploidler, mısır araştırmalarının pek çok alanında ve dünya çapında klasik melez mısır ıslahında yaygın olarak kullanılmaktadır. Araştırmalarda katlanmış haploid genotipler yapısal ve fonksiyonel genom biliminde, proteomik, metabolomik, markör destekli çalışmalarda, moleküler sitogenetikte, genetik mühendisliğinde ve başka alanlarda değerli bir araç olmuştur. İslahta KH hatlar, seleksiyonun etkinliğinin yükselmesine izin verir, ıslah süresini kısaltır, zaman ve emek tasarrufu sağlar (Geiger 2009).



Şekil 2.2. Maternal haploid indüklenme metodu (Chaikam ve Boddupalli 2012)





**Şekil 2.3.** Maternal haploid indükleme metodunda haploid ve katlanmış haploidlerin oluşumu (Prigge ve ark. (2012))

Röber ve ark. (2005) melez çeşit ıslah sürecinin temelini oluşturan homozigotlaşma, popülasyon içinden uygun genotiplerin seçimi ve sonra uygulanacak 7 kendileme generasyonu ile elde edildiğini ancak, bu yolla yine de %100 homozigot döller elde edilemediğini belirtmişlerdir. Buna karşılık, haploid bitkilerden kromozom katlaması yoluyla %100 homozigot genotip elde edilebildiğini vurgulamışlardır.

Katlanmış haploid hatlar ile kendilenmiş hatlar arasında karşılaştırma yapıldığında katlanmış hatların avantajları şunlardır; i) Katlanmış hatların ilk generasyonlarında yoklama melezi performansları ve tek sıra gözlem bahçelerinde maksimum genetik varyans belirlenmiştir,

ii) KH hatların elde edilmesi ıslah döngüsünü kısaltır, iii) KH hatlar çeşit özelliğinin korunması için gerekli FYD (Farklılık, Yeknesaklık, Durulmuşluk) kriterlerini mükemmel bir şekilde yerine getirirler, iv) Katlanmış haploid tekniği ile kendilemeye harcanan masraflar azalır ve ıslahın sürdürülebilirliği için önemlidir, v) Katlanmış haploid tekniği ile kendilemeye harcanan süre azalacağından ıslahta kullanılan işçilik masrafları düşer, vi) Markör destekli seleksiyonun etkinliğini artırır, vii) Arzu edilen genlerin bir genotipte toplanmasını kolaylaştırır (Geiger ve Gordillo 2009).

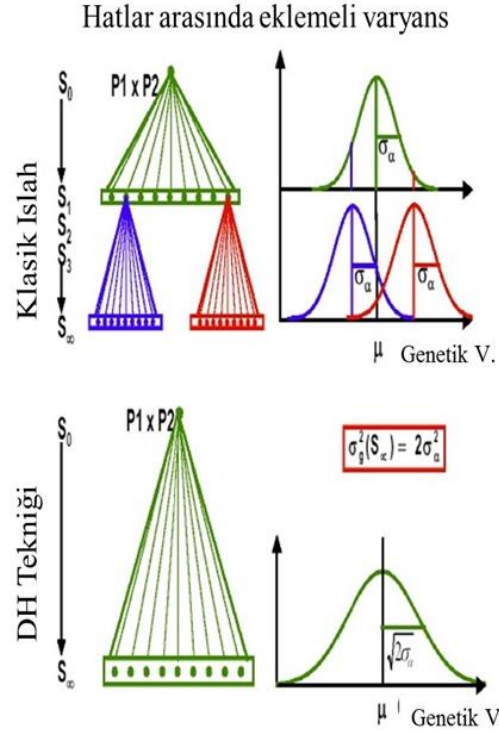
Katlanmış haploid hatların ıslahçıya sunduğu en büyük avantajlardan bir tanesi seleksiyon sürecinin sonunda ulaşacağımız genetik varyansı ilk generasyonda elde etme imkânıdır (Şekil 2.4) (Geiger ve Gordillo 2009).

#### Heterozigot bir genotipin kendilemesi

- Gametler:  $\frac{1}{2} A + \frac{1}{2} a$
- F<sub>2</sub>  $\frac{1}{4} AA + \frac{1}{2} Aa + \frac{1}{4} aa$
- F<sub>3</sub>  $\frac{1}{4} Aa$
- F<sub>4</sub>  $\frac{1}{8} Aa$
- F<sub>5</sub>  $\frac{1}{16} Aa$
- F<sub>6</sub>  $\frac{1}{32} Aa$
- F<sub>n</sub>  $\sim \frac{1}{2} AA + \frac{1}{2} aa$

#### Heterozigot bir genotipin haploidi

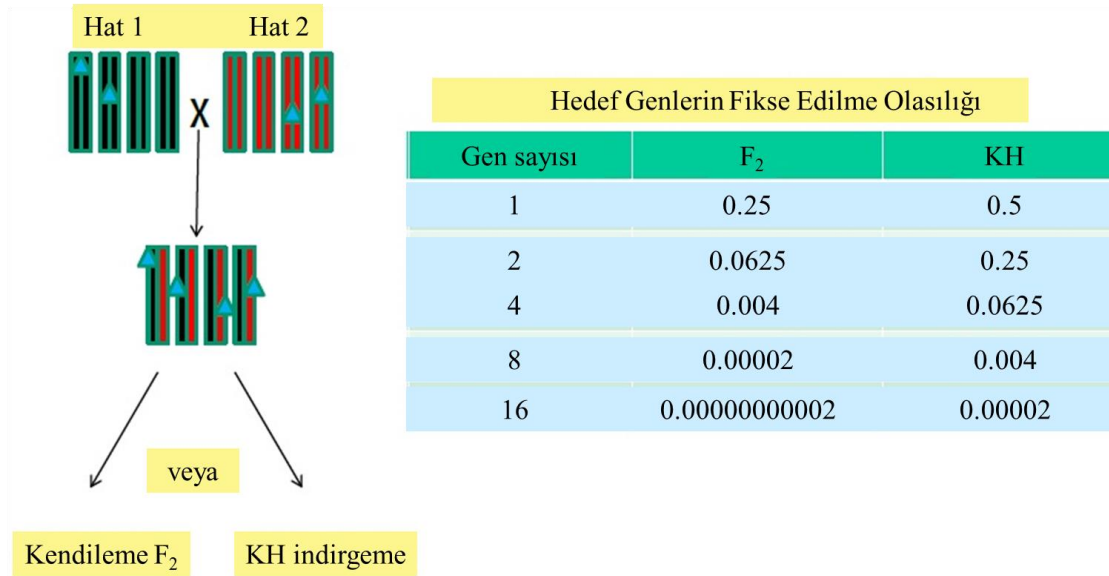
- Gametler:  $\frac{1}{2} A + \frac{1}{2} a$
- Kromozom katlaması
- $\frac{1}{2} AA + \frac{1}{2} aa$
- 4-5 generasyon zaman tasarrufu



**Şekil 2.4.** Klasik ıslah ve katlanmış haploid tekniğinde eklemeli varyans karşılaştırması (Geiger ve Gordillo 2009)

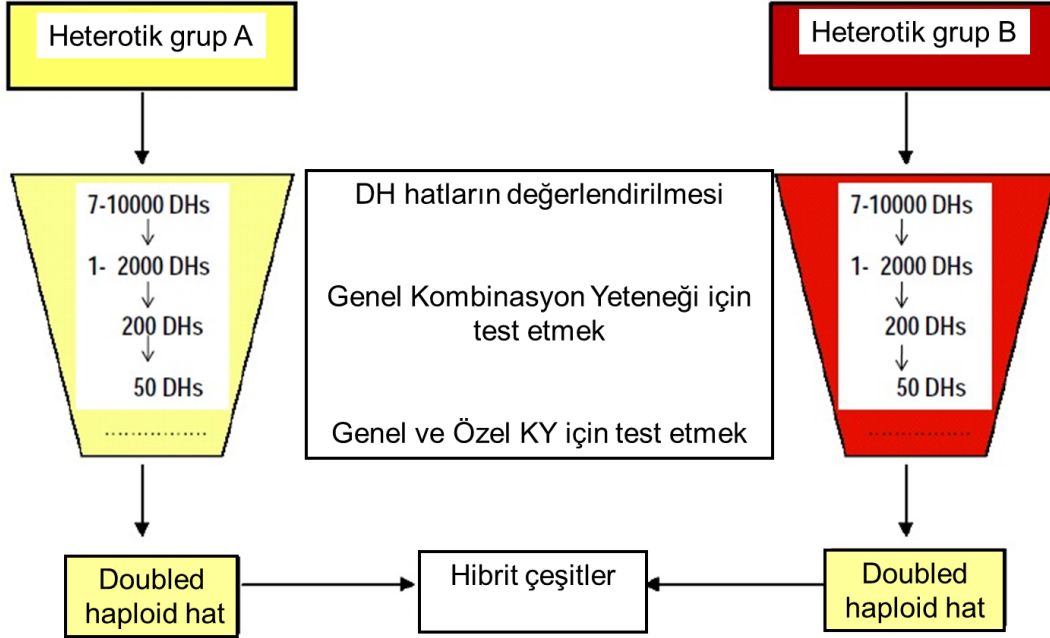
Katlanmış haploid hatların ilk seleksiyonu ıslahçının hedeflerine göre katlanmış haploid hatların ilk generasyonunda yapılır (Gordillo ve Geiger 2010).

Lübberstedt ve Frei (2012) ıslahta hedeflenen genleri bir genotipte toplama konusunda katlanmış haploid tekniği ile klasik kendileme yöntemini karşılaştırmışlardır. Katlanmış haploid hatlar ve  $F_2$  popülasyonunda hedeflenen genlerin ortaya çıkma frekansı yönünden değerlendirildiğinde  $F_2$  popülasyonunda daha düşük olmaktadır (Şekil 2.5). KH tekniğinde klasik kendileme tekniğine göre daha az popülasyon büyüklüğüne ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında bir çift istenen hedef genin genetik uzaklığı ve hedef genlerin sayısını geri melez programlarının son adımı olan  $BC_nF_2$  popülasyonunda ve katlanmış haploid hatlarda belirlemeyi hedeflemişlerdir. Sonuç olarak, geri melez yönteminde kendileme generasyonlarında hedef genlerin birbirleriyle ilişkisiz açılımlarının hızla artmasıyla karşılaştırıldığında özellikle hedef genlerde yakın bağlantı (linkage) olması halinde KH hatların kullanılmasının avantajlarını bulmuşlardır.



**Şekil 2.5.** Katlanmış haploid hatlar ile  $F_2$  generasyonunda hedef genlerin bir genotipte ortaya çıkma frekansı açısından karşılaştırılması (Lübberstedt ve Frei 2012)

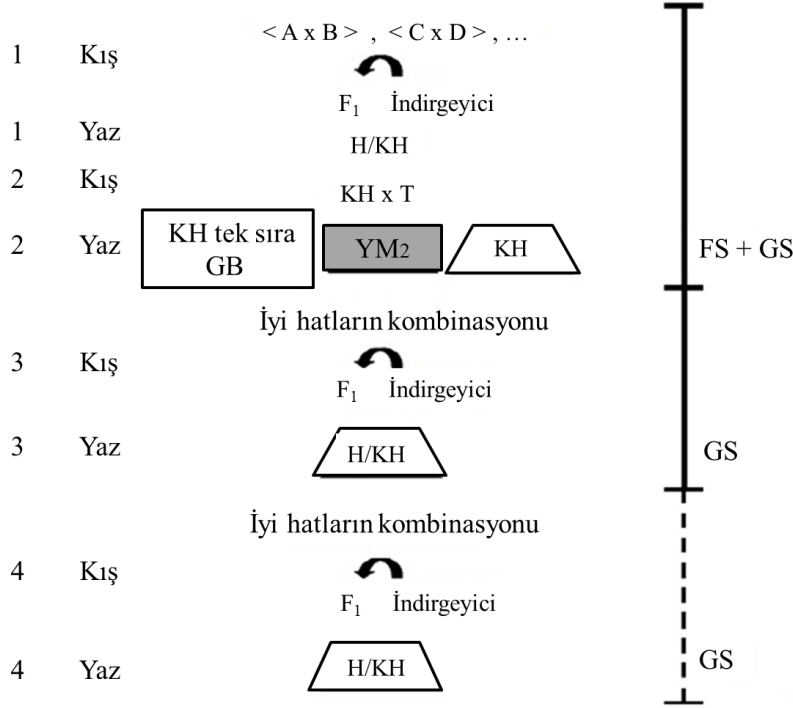
Tekrarlamalı yoklama melezi seçimi tabanından gelen katlanmış haploid hatlar melez mısır ıslahında daha yüksek etkinliğe sahip olmaktadır. Bununla birlikte, ıslah popülasyonunun genetik varyansı daha çabuk küçülmektedir. Varyansın küçülmesini sınırlamak için etkili bir minimum popülasyon büyüklüğü temin edilmek zorundadır. Ancak, başarılı bir seleksiyon yoğunluğu, her yıl yeni melezlemeler yapılarak yeni bir seleksiyon programı başlatılması ve bir heterotik grubu temsil eden melez ıslah popülasyonunu denk ve güncel alt popülasyonlara derecelendirerek bölünmesi gibi durumlar yeterli popülasyon büyüklüğünü korumayı sınırlandırır (Şekil 2.6) (Gordillo ve Geiger 2008).



**Şekil 2.6.** Farklı heterotik gruplar kullanılarak katlanmış haploid hatların geliştirilmesi ve melez mısır ıslahında kullanılması (Gordillo ve Geiger 2008)

Markör destekli seleksiyon KH hatların ıslah şemasına kolayca entegre edilmiştir. Bu çalışmalar örnek alınarak tüm genom seleksiyonu (Genom-wide selection- GS) yöntemi de benzer bir yaklaşımla ıslah şemasına entegre edilebilir. Bernardo ve Yu (2007) tarafından önerilen bu yaklaşım Geiger ve Gordillo (2009) tarafından da şematize edilmiştir (Şekil 2.7). Bu şemada KH hatların tek sıra gözlem bahçesi ve yoklama melezi gözlem bahçesi verim

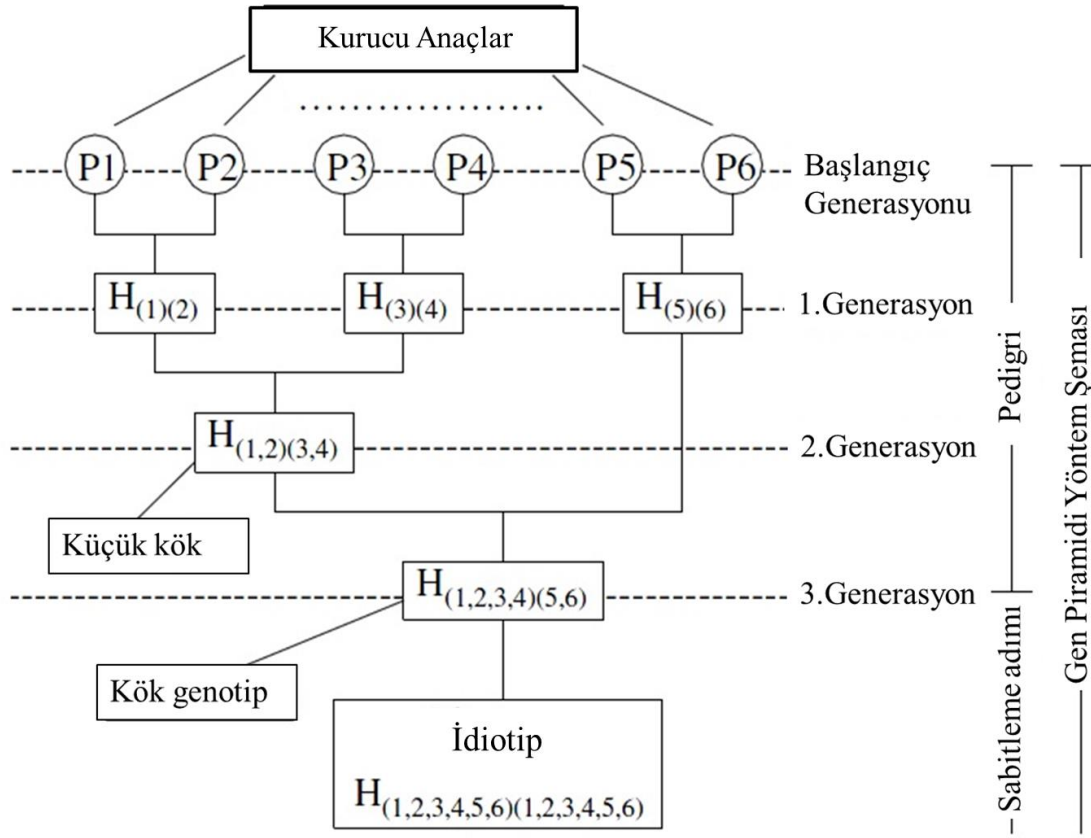
denemelerinde aynı zamanda genotiplemede yapılmıştır. Katlanmış haploidlerin tek sıra gözlem bahçeleri ve yoklama melezinde genotipik değerleri öngörmek ve aday KH hatlar arasında seleksiyon yapmak için özelliklerin tüm markör etkileri hesaplanmıştır. Tüm genom seleksiyonu yönteminin esas özelliği, ilgili özelliklerle önemli derecede ilişkili olan bir seri markörün tanımlanması olmaksızın verimliliği tahmin etmeye odaklanmasıdır.



**Şekil 2.7.** Tüm genom seleksiyonu (Genome-wide Selection) entegre edilerek KH hatların geliştirilmesi, PS; fenotipik seleksiyon (phenotypic selection), GS; tüm genom seleksiyonu (genome-wide selection),  $\square$ ; tüm genom seleksiyonunun yapıldığı dönem sembolü, A, B, C, D: Homozigot hatlar, F<sub>1</sub>: Melez, H: Haploid, KH: Katlanmış haploid, KH tek sıra GB: Katlanmış haploidlerin tek sıralı gözlem bahçesi, YM<sub>2</sub>: Yoklama melezi verim denemeleri (Geiger ve Gordillo 2009)

Joshi ve Nayak (2010) gen piramidi oluşturmak için yaptıkları çalışmalarında katlanmış haploid tekniği ile geri melez programlarını karşılaştırmışlardır. Markör destekli seleksiyonun gen piramidi çalışmalarında kullanılmasının tartışılmaz bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Oluşturdukları idiotipin kaynak materyal olarak kullanıldığı F<sub>2</sub> popülasyonlarında her generasyonda markör destekli seleksiyon uygulanması gerekirken, katlanmış haploid tekniğinde

sadece bir generasyonda hedef genlerin belirlenmesinin mümkün olduğunu ifade etmişlerdir. Şekil 2.8’de verilen yöntemle genlerin bir genotipte toplanması mümkün olmakla beraber genler arasındaki bağlantı dikkate alındığında istenilen genler ile beraber istenmeyen genlerin de açılan popülasyonda çıkışı veya katlanmış haploid hatlarda ortaya çıkışı söz konusu olacaktır. Fakat, çalışılan popülasyon büyüklükleri dikkate alındığında katlanmış haploid tekniğinin avantajlı olduğu belirlenmiştir.



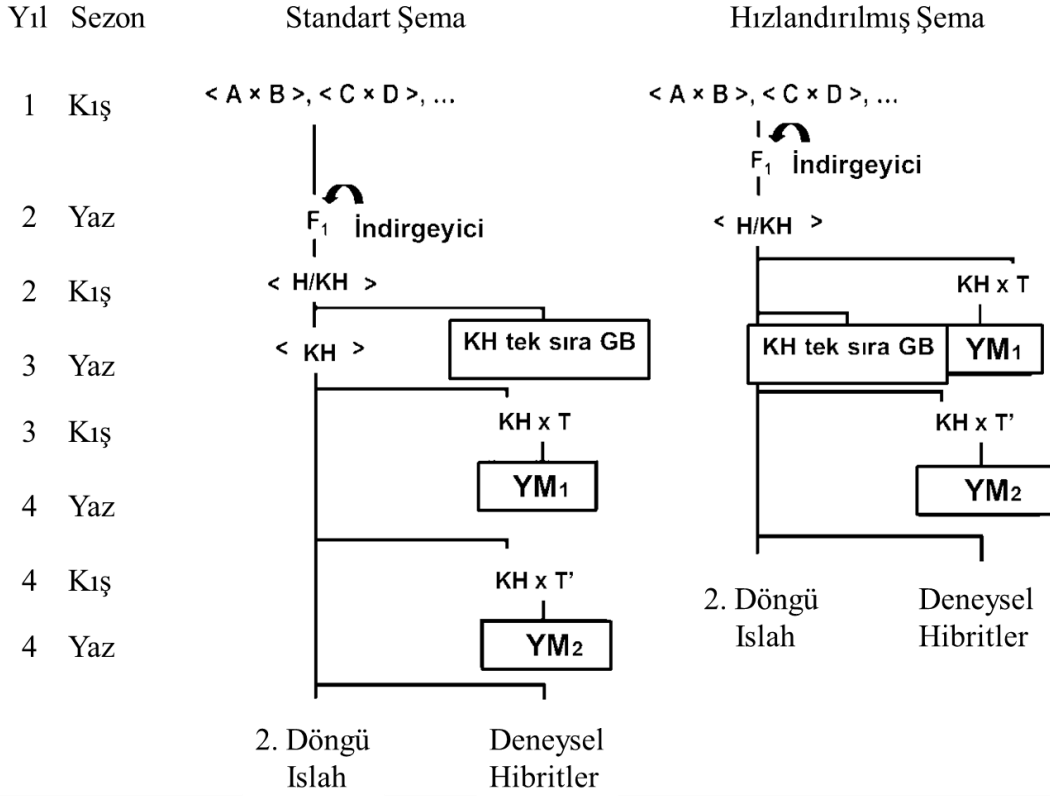
**Şekil 2.8.** Altı hedef genin bir genotipte toplanması için gen piramidi şeması, P; ebeveyn (parent), H; hibrit (hybrid) (Servin ve ark. 2004)

Geiger ve Gordillo (2009) tekrarlamalı seleksiyonun hedefini, genetik varyasyonu önemli derecede azaltmaksızın ıslah popülasyonunda nicelik olarak kalıtsal özelliklerin ortaya çıkışını

sağlayan, istenen allellerin frekansını arttıran, döngüsel genetik bir ilerleme olarak tanımlamışlardır.

Geiger ve Gordillo (2009) çalışmalarında katlanmış haploid temelli dört ıslah şeması ortaya koymuşlardır. Bunlardan standart ıslah şeması (Şekil 2.9) aşağıdaki aşamaları içermektedir.

- Yeni bir ıslah döngüsü başlatmak için seçilmiş hatlar arasında melezleme yaparak yeni varyasyon yaratmak.
- F<sub>1</sub> generasyonunda *in vivo* haploid indükleme yöntemini uygulamak.
- Elde edilen tohumlarda haploidleri belirlemek, kromozom katlaması yapmak, KH<sub>0</sub> bitkilerinde kendileme yaparak KH hatları elde etmek.
- KH hatların tek sıra denemelerini yaparken aynı zamanda tohum çoğaltmalarını yapmak.
- Tek sıra denemelerinden seçilen KH hatlarda bir veya daha fazla test edici hat ile yoklama melezi yapmak (test edici hatların katlanmış haploid hatlardan farklı bir heterotik gruptan gelmeleri gerekmektedir).
- Yoklama melezi verim denemelerini çoklu lokasyonlarda değerlendirmek, kombinasyon yeteneği yüksek, verimli KH hatları seçmek.

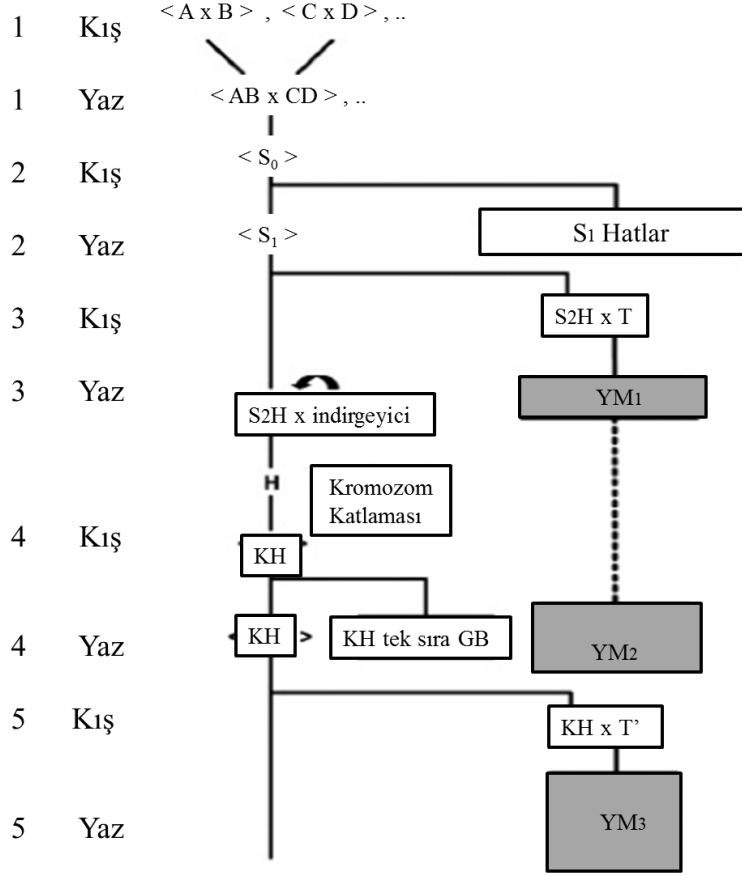


**Şekil 2.9.** KH hatların yoklama melezlemesi seleksiyonu ile geliştirilmesinin standart ve hızlandırılmış ıslah şeması. A, B, C, D: Homozigot hatlar, F<sub>1</sub>: Melez, H: Haploid, KH: Katlanmış haploid, KH tek sıra GB: Katlanmış haploidlerin tek sıralı gözlem bahçesi, T ve T': Test edici hatlar, YM<sub>1</sub> ve YM<sub>2</sub>: Yoklama melezi verim denemeleri (Geiger ve Gordillo 2009).

Katlanmış haploid hatların geliştirilmesinde donör olarak kullanılacak kaynak materyalin yapısı ıslahın şemasını değiştirebilir. Geiger ve Gordillo (2009) bir ıslah popülasyonunun adaptasyon eksikliğine karşı güçlü bir seleksiyon gerektirdiğinde indükleme melezlemesi yapmadan önce kendileme yaparak S<sub>1</sub> veya S<sub>2</sub> generasyonunda erken seleksiyon yapmanın elde edilecek KH hatların başarısını arttıracaklarını belirtmişlerdir. Katlanmış haploid hatların S<sub>2</sub> hatlarından geliştirilmesi ıslah şeması, zayıf adaptasyonlu hat ile adaptasyonu iyi hat arasında yapılan melezlerden oluşturulan çift melez ile başlar. Bu materyal ıslahçıya zayıf adaptasyonlu hatların adaptasyon yeteneğini artırma imkânı verir. Çift melezde yapılan kendileme ile elde edilen S<sub>1</sub> hatlar çoklu lokasyonlarda gözlem bahçelerinde değerlendirilerek adaptasyonu iyi olanlarda kendileme yapılır. Elde edilen S<sub>2</sub> hatlarında yoklama melezi yapılarak verim



denemelerinde değerlendirilir ve seçilen  $S_2$  hatlarda indükleme melezlemesi yapılır. Elde edilen KH hatlarda standart şemada yer alan yoklama melezi yapımı ve tekrarlamalı seçim ile devam eder (Şekil 2.10).



**Şekil 2.10.** Ön seçim yapılmış  $S_2$  hatlarından KH hatların geliştirilmesi (diğer kısaltmalar için Şekil 2.9'a bakınız) (Geiger ve Gordillo 2009)

Geiger ve Gordillo (2009) tekrarlamalı seleksiyonun hedefini, genetik varyasyonu önemli derecede azaltmaksızın ıslah popülasyonunda nicelik olarak kalıtsal özelliklerin ortaya çıkışını sağlayan, istenen allellerin frekansını arttıran, döngüsel genetik bir ilerleme olarak tanımlamışlardır.

### 2.3. İndirgeyici Hatlar ve Özellikleri

Chase (1952)'in bulduğu spontan haploid indüklenme oranı sonrasında pek çok ülkede yapılan farklı araştırmalar özellikle ılıman iklim kuşağına adapte olmuş indirgeyici hatların geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır (Çizelge 2.2). Tropikal alanlara adapte olan indirgeyici hatların geliştirilmesi ile *in vivo* tekniği daha da yaygınlaşmaya başlamıştır. Halen yeni indirgeyici hatların geliştirilmesi süreci devam etmektedir. İndirgeyici hatların geliştirilmesinde haploid indüklenme oranı önemli olmakla beraber, haploid tohumların seçimini kolaylaştıracak farklı genlerin indirgeyici hatlara aktarılması da gerçekleştirilmiştir. Haploid tohumların hızlı ve daha az iş gücü ile seçimini kolaylaştırmak için son dönemde yüksek yağ oranına sahip indirgeyici hatlar geliştirilmiştir.

**Çizelge 2.2.** *In vivo* tekniğinde kullanılan indirgeyici hatlar ve özellikleri

Adı	Orjini	HIO(%)	Özellikleri
Spontan	Iowa State Üniversitesi (Chase 1952)	0.1	
Stock-6	USDA (Coe 1959)	2	<i>R-nj</i>
KMS ve ZMS	(Korichnevsky Marker Saratovsky) her ikisi de Stock-6 dan geliştirilmiştir (Tyrnov ve Zavalishina 1984)		<i>R-nj</i>
WS14	Stock-6 ve W23ig hatlarının melezinden geliştirilmiştir (Lashermes ve Beckert 1988)	8	<i>R-nj</i>
KEMS	(Krasnador Embryo Marker Synthetic) (Shatskaya ve ark. 1994b)	7	<i>R-nj</i>
MHI	(Moldovian Haploid Inducer), KMS ve ZMS hatlarının melezinden geliştirilmiştir (Chalyk 1999)	4.5	<i>R-nj, B1, P11</i>
RWS, RWK-76	(Russian inducer KEMS+WS14), KEMSxWS14 melezinden geliştirilmiştir (Röber ve ark. 2005)	8-10	<i>R-nj</i>
UH400, UH402	Hohenheim Üniversitesinde KEMS hattundan geliştirilmiştir (Röber ve ark. 2005)	8-10	<i>R-nj</i>
PK6	Stock-6, WS14, FIGHI, MS1334 materyallerinden geliştirilmiştir (Barret ve ark. 2008)	6	<i>R-nj</i>
HZ11	Stock-6 dan geliştirilmiştir (Zhang ve ark. 2008)	>10	<i>R-nj, Sh2</i>
CAUHOI, CAU5, CAU019	Çin Tarım Üniversitesi tarafından Stock-6 ve Pekin Yüksek Yağlı popülasyonu arasında yapılan melezden geliştirilmiştir (Li ve ark. 2009)	2-10	<i>R-nj</i> , Yüksek Yağ (CAUHOI)
PHI serisi	(Procera Haploid Inducer), MHI ve Stock-6 arasında yapılan melezden geliştirilmiştir (Rotarencu ve ark. 2010)	12-14	<i>R-nj, P11, B1</i>
TAIL serisi	(Tropical Inducer Lines), Hohenheim Üniversitesi ve CIMMYT (Uluslararası Mısır ve Buğday Geliştirme Merkezi) tarafından RWS ve UH400 indirgeyici hatları ile CMLs hatları arasında yapılan melezlemeden geliştirilmiştir (Prigge ve ark. 2012)	>10	<i>R-nj</i> , tropikal koşullara adapte olmuş
BHI serisi	Iowa State Üniversitesi (2014)	>8	<i>R-nj, P11</i> , cin mısır
UH600, UH601	Hohenheim Üniversitesi (Melchinger ve ark. 2014)	8-12 3-9.6	<i>R-nj</i> , yüksek yağ

Ülkemizde ise indirgeyici hatların geliştirilmesi çalışmaları Mısır Araştırma Enstitüsünde 2011 yılında başlamıştır. RWS ve RWK-76 indirgeyici hatları FAO 450 olum grubunda olup ülkemiz mısır kaynak materyallerinden erkencidir. RWS ve RWK-76 indirgeyici hatlarının bitki boyu ülkemiz kaynak materyalleri ile kıyaslandığında ise kısadır. Bu sebeple açık alanda melezleme yapılması zor olduğundan geçici, uzun boylu ve haploid indüklenme oranı yüksek indirgeyici hatların geliştirilmesi amaçlanmıştır (Cengiz ve ark. 2014).

Literatürlerde bildirildiğine göre son dönemde en etkili indirgeyici olan RWS hattı Hohenheim Üniversitesi'nde geliştirilmiştir. RWS hattı, Rus sentetik KEMS indirgeyici materyali ile Fransa'nın WS14 indirgeyici hattı arasında yapılmış melezden çekilerek geliştirilmiştir. Bu hat Orta Avrupa'nın ılıman iklim kuşağına adapte olmuştur. Fakat, tropikal çevrelerde de etkili olduğu belirlenmiştir (Röber ve ark. 2005).

Pek çok çevre ve donörlerin çoğunluğu için WS14 hattının indüklenme oranı %8 olmuştur. WS14xKEMS melezinden geliştirilen RWK-76 indirgeyici hattının indüklenme oranı %9-10'a ulaşmıştır. Aynı oran RWSxRWK-76 melezinde de gözlemlenmiştir. Akaraba ebeveynlere sahip olmasına rağmen, bu melez anaçlarından daha fazla canlı, gür bitki ve daha iyi polen verme yeteneğine sahiptir. Özellikle kötü çevrelerde RWSxRWK-76 melezini kullanmak, polen verimi ile ilgili olumsuzlukları azaltmakta etkili olmaktadır (Geiger 2009).

Roux (1995) Stock-6, WS14 ve W23ig hatlarının maternal haploid olarak indüklenme oranlarını test etmiştir. Wisconsin'de geliştirilen W23 atdışi hattının izogenik bir formu olan W23ig hattı paternal haploid indüklemesine olanak sağlamaktadır. W23 hattı is ne paternal ne de maternal haploid indüklemesine neden olur. Bu durumla uyumlu olarak, W23ig hattının maternal haploidler için indüklenme oranı kendiliğinden meydana gelen haploidlerin sıklığından önemli bulunmamıştır. İndirgeme oranları W23ig hattı için %0.2, Stock-6 için %2 ve WS14 hattı için %7.3 olarak belirlenmiştir.

Donör genotipler arasında (atdışi, sert mısır, yerel ırklar gibi) indüklenme oranı için önemli farklılıklar belirlenmiştir (Roux 1995, Eder ve Chalyk 2002, Röber ve ark. 2005). Ancak, bu farklılıklar için belirlenen varyasyon aralığı, anter ve mikrospor kültürüne yanıt ile

karşılaştırıldığında küçük bulunmuştur. Çevresel koşullar da *in vivo* haploid tekniğinin başarısını etkiler. Röber ve ark. (2005) kötü çevrelerin indüklenme oranına etkisini belirlemek için, KEMS ve RWS hatlarını kullanarak bir yakaciksız (liguleless), resesif mutant işaretli donör genotiple melezleme yapmış ve en kötü çevrede indüklenme oranını ortalama %2, en iyi çevrede %16.4 olarak belirlemiştir. Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin minimum olduğu optimum büyüme koşulları, indüklenme başarısını yükseltmektedir (Geiger 2009).

Prigge ve ark. (2011) üç farklı tropikal lokasyonda yürüttükleri çalışmada 120 kaynak materyal ile RWS, UH400 ve RWSxUH400 ılıman indirgeyici genotipleri kullanarak haploid indüklenme oranına çevre faktörlerinin etkisini test etmişlerdir. İlıman indirgeyici hatların tropikal koşullarda ılıman koşullara benzer haploid indüklenme oranı vermesine rağmen, ılıman indirgeyici hatların bitki boyu kısalmış, polen verme kapasiteleri düşmüştür. Elle melez yapma zorunluğu olduğundan tropikal çevrelere uygun indirgeyici hatların geliştirilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Hu (2014), farklı indirgeyici hatların aynı koşullarda indüklenme oranlarını belirlemek için yaptığı çalışmada, altı indirgeyici hat ve 10 farklı F<sub>1</sub>'i donör olarak kullanmıştır. Haploid indüklenme oranı %2.17-5.33 arasında değişmiş ve indirgeyici hatların indüklenme oranı düşükten yükseğe doğru KMS-3<WY-1<PR-2<YP-13<KMS-2<KMS-1 olarak sıralanmıştır. Farklı donörlerden elde edilen haploid tohumlar dikkate alındığında ortalama haploid indüklenme oranı donörlere göre önemli derecede farklılık göstermiş ve %1.26-10.27 arasında değişmiştir.

#### **2.4. Haploid Tohumların Ayrımı için Kullanılan Sistemler**

Navajo, Arizona'nın kuzeydoğusu, Utah'ın güneydoğusu ve New Mexico'nun kuzeybatısını kapsayan ve Amerikan yerlilerinin yaşadığı alana verilen isimdir (Anonymous 2015a). Burada ekilen ve insan gıdası olarak tüketilen bitki aksamalarında ve tanesinde yoğun mor renkliliği içeren mısıra da Navajo ismi verilmiştir (Şekil 2.11). Bu sebeple endosperm ve embriyo dokularında mor renkliliği ortaya çıkaran R-Navajo allellerine sahip fenotip Navajo tane fenotipi olarak adlandırılır.



Şekil 2.11. Navajo mısırın görüntüsü (Anonymous 2015a)

Haploid bitkilerin, kısa dik yaprakları, zayıf bitki canlılığı ve çiçek organlarının kısırılığı gibi bazı özellikleri bakımından diploid bitkilerden ayrımı yapılabilir. Bu karakterler, haploid bitkilerin yeterince büyümelerinden sonra gözlemlenebilir. Tohum döneminde haploidlerin diploidlerden ayrılması; suni kromozom katlamasına izin vermek, maliyeti düşürmek, işçiliği azaltmak, sera çalışmalarını ve tarla alanını azaltmak gibi avantajları bize sunar. Tohum döneminde haploidlerin ayrımı ticari anlamda KH teknolojisinin adaptasyonu için önemlidir (Chaikam ve Boddupalli 2012).

Tohum döneminde haploidleri diploidlerden ayırmak için antosiyanin renkliliğine bağlı ticari anlamda pratik fenotipik markör 1960'lı yıllarda belirlenmiştir (Nanda ve Chase 1966, Greenblatt ve Bock 1967). Antosiyanin markörlerinin haploid indirgeyici hatlara entegre edilmesi, sadece tohum döneminde değil aynı zamanda bitki büyümesinin farklı dönemlerinde haploidlerin belirlenmesine olanak sağlamıştır. En etkili haploid belirleme markörü kırmızı taç veya Navajo tane özelliği *RI* geninin *RI-nj* dominant mutant alleli ile kodlanmış tane özelliğidir. *A1* veya *A2* ve *C2* allelleri dominant pigmentasyonun ortaya çıkışına, *RI-nj* tanenin tepe bölgesinde aleuronun derin pigmentasyonuna ve embriyoda pigmentasyona sebep olur. Bu yöntemin etkili olması için kaynak materyalin renksiz tohuma sahip olması ve indirgeyici hattın *RI-nj* ve yukarıda belirtilen dominant renk genlerine homozigot olarak sahip olması gerekmektedir (Geiger 2009).

*R1* lokusunun dominant bir faklı alleli *R1-nj* (R1-Navajo) günümüzde tohumda haploidinin gözlemlenmesi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antosiyanin sentezinde etkili diğer dominant allellerle *R1-nj* allelinin kombinasyonu, tohumun tepesinde (taç kısmında) endosperm dokusunun (aleurone) derin bir şekilde renklenmesine sebep olur. Ayrıca, embriyo dokusunda (scutellum) mor renkliliğin oluşumunu sağlar (Chaikam ve Boddupalli, 2012).

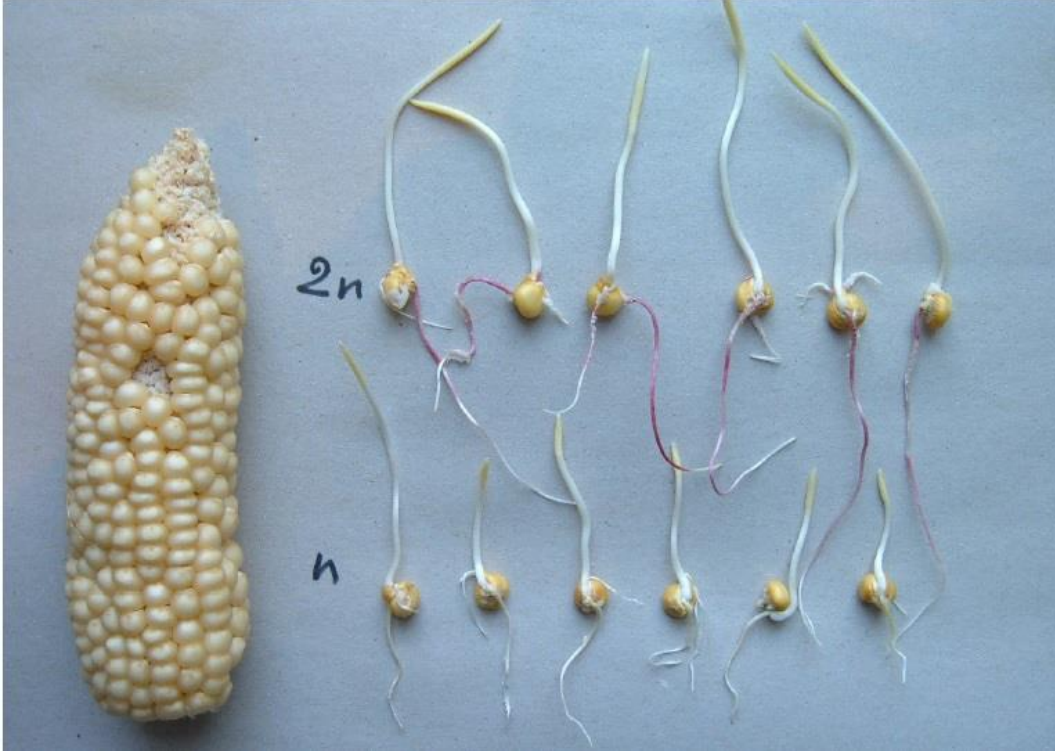
Günümüzde yaygın kullanılan haploid indirgeyici hatlarda *R1-nj* alleli antosiyanin biyosentezi için gerekli diğer allellerle birleştirilmiştir. İslah programlarında kullanılan çoğu mısır germplasmı tane veya bitki dokusunda kırmızı-mor rengi veren antosiyanin biyosentezleyen allellere veya *R1-nj* alleleline sahip değildir. Antosiyanin renk geni içermeyen kaynak materyal ile baba olarak kullanılan indirgeyici hatlar melezlendiğinde *R1-nj* alleli renksiz *r1* alleleline dominant olduğundan elde edilen tüm tohumlarda embriyo ve endospermde Navajo fenotipinin ortaya çıkması beklenir. Fakat, *R1-nj* allelinin farklı ifadeleri maternal haploidlerin diploidlerden ayırımına olanak sağlar. Yüksek haploid indüklenme oranına sahip indirgeyici hatlar indüklenme melezlemesinde kullanıldığı zaman, genellikle maternal haploidler %6-10 arasında meydana gelir (Chaikam ve Boddupalli, 2012).

*R1-nj* renk markörüne göre haploid tohumların ayırımında da bazı kısıtlamalar vardır. Kaynak materyal dominant antosiyanin inhibitör genleri taşıyorsa, örneğin *CI-I* ki bu gen sert mısırlarda yaygındır (Röber ve ark. 2005), *R1-nj* renk markörünün ifadesi tamamıyla bastırılır ve haploid tohumların ayırımı neredeyse imkânsızdır. Kaynak popülasyon olarak indüklenme melezlemesinde kullanılan  $F_1$  veya  $F_2$ 'lerde eğer, bu genotiplerin ebeveynlerinden bir tanesi inhibitör gen taşıyor ise, tohumlarda Navajo fenotipi için ayrılma, açılma olacaktır. Bu durumda tüm haploid tohumların etkin bir şekilde ayırımı ve seçimi gerçekleşmeyebilir. Böylece, haploidlerin %30-40'ı veya yarısını kaybetme olasılığı vardır. Haploidlerin hızlı ve doğru bir şekilde ayırımı, seçimi yapan kişilerin endosperm ve embriyodaki renk ifadesini doğru algılayarak haploidleri anlamasına bağlıdır. Haploidlerin otomatik olarak seçimi zordur fakat, bir sistem oluşturulduktan sonra yapılması mümkündür (Chaikam ve Boddupalli 2012).

Hasat zamanında tanenin nem içeriği, mor rengin yoğunluğunu etkileyebilir (Rotarenc ve ark. 2010).

*RI-nj* renk markör sistemin bazı sınırlamalarından dolayı, araştırmacılar maternal haploidlerin güvenilir bir şekilde ayrımı için özellikle çimlenme döneminde kök ve sapa renk oluşturan başka renk markörlerini keşfetmişlerdir (Rotarenco ve ark. 2010). *PII* (Purple 1 bu gen güneş ışığına bağlı olmadan bitki dokusunda mor renklilik oluşturur) ve *BI* (Booster 1 güneş ışığına bağlı olarak bitkinin toprak üstündeki aksamında renk oluşturur) bitki dokusuna mor veya kırmızı rengi verebilen iki alleldir. *BI* ve *PII* allelleri, *RI-nj* markör sistemine sahip indirgeyici hatlara entegre edilebilir. Böylece, Navajo renkliliği tanelerde ortaya çıkmadığı zaman haploid tohumlar çimlendirilerek kök renkliliğinden veya tarlada sap renkliliğinden ayrılabilir. Böyle bir indirgeyici hat ile kaynak materyal melezlendiğinde elde edilen tohumlarda, diploid olanlar renkli (mor) kök ve sapa sahip olacaktır. Haploid olduğu kabul edilenlerde ise bu renklilik olmayacaktır (Coe ve Sarkar 1964).

Eder ve Chalyk (2002) MHI ılıman iklim kuşağı indirgeyici hattının, Rotarenco ve ark. (2010) da PHI indirgeyici hattının *RI-nj*, *BI* ve *PII* allelleri birlikte iğerdiğinden haploidlerin daha efektif ayrımını sağlayacağını belirtmişlerdir. Rotarenco ve ark. (2010), *CI-I* inhibitör geni iğereren bir kaynak materyal ile PHI indirgeyici hattı arasında yaptıkları indüklemeye melezlemesinden elde edilen koçanda *RI-nj* allelinin ortaya çıkmadığını belirlemişlerdir. Bu durumda tohumların tamamı çimlendirildiğinde *BI* ve *PII* allelleri sayesinde kök renkliliğine göre haploid tohumların belirlenebileceğini ortaya koymuşlardır (şekil 2.12).



**Şekil 2.12.** Haploid tohumların kök renkliliğine göre ayrımı (Rotarenco ve ark. 2010)

Chaikam ve Boddupalli (2012) *B1* ve *P11* renk markörlerinin de bazı kısıtlamaları olduğunu belirtmiştir. Pek çok kaynak materyal *B1* ve *P11* alleli içermektedir. Bu gibi kaynak popülasyonlardan elde edilecek haploid bitkiler de kök ve sap renkliliği göstereceğinden, haploidlerin güvenilir bir şekilde ayrımını imkânsız hale getirebilir. *B1* ve *P11* allellerinin ortaya çıkışı bitkinin büyüme koşullarından etkilenmektedir. Özellikle gün ışığı ve sıcaklık etkilidir. En iyi mor renkliliğin birikmesi düşük sıcaklık koşulları altında gözlemlenmiştir.

Bazı araştırmacılar küçük hata payıyla haploid ayrımını otomatik olarak belirleyecek farklı markör sistemleri üzerinde çalışmaktadır. Rotarenco ve ark. (2007) Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) temelli tekniklerle otomatik olarak ölçülebilecek tanedeki yağ içeriğini temel alan haploid ayrımını önermişlerdir.

Li ve ark. (2009) CAUHOI indirgeyici hattını Stock-6'dan türeterek geliştirmişlerdir. Bu indirgeyici hat %2 haploid indüklemeye oranına sahip ve tanede 78 g/kg yağa sahiptir. CAUHOI



indirgeyici genotipi hem *RI-nj* nin kriterlerine göre embriyodaki rengin olmayışı hem de düşük embriyo yağ içeriğine göre haploidlerin seçimine imkân tanımaktadır. Bu farklı yaklaşım umut verici görünmesine rağmen, yöntemin güvenilirliği ve uygulanabilirliği kullanılacak kaynak materyalin yağ içeriğine bağlıdır. Tanede yağ oranı yüksek materyaller ile çalışmak neredeyse imkânsız olur.

Geiger ve ark. (1994) maternal haploidlerin belirlenmesi için RWS indirgeyici hattına dominant herbisite direnç markörü phosphotricin acetyl transferase (PAT) geni aktarmışlardır. İndirgeyici hat olarak RWS kullanıldığında, indirgenmiş haploid materyaller çimlendirildiğinde herbisite hassas ve  $F_1$  materyaller çimlendirildiğinde ise herbisite dayanıklı olarak gözlemlenmiştir. Çimlendirilmiş haploid ve  $F_1$  materyallerinde küçük bir yaprak bölgesine herbisit uygulandığında hassas haploid bitkilerde uygulama yerinde ölümler oluşmuş fakat,  $F_1$ 'lerde oluşmamıştır. Bu durum her iki tip materyal arasında net bir ayrımaya yol açmıştır. Ancak, çok sayıda materyal ile çalışıldığında bu metodun çok işçilik gerektireceğini belirtmişlerdir.

Belicuas ve ark. (2007) mikrosatellit markörlerinin güvenilir ve evrensel geçerli haploid belirleme aracı olduğunu göstermişlerdir. Fakat, genotipleme masrafı ve yeterli yüksek yanıtı markör donanımları temin etmedeki güçlüklerin bu yaklaşımın yürütülebilirliğini sınırladığını belirtmişlerdir.

Haploidlerin otomatik olarak seçimi zordur. Fakat, bir sistem oluşturulduktan sonra yapılması imkânsız değildir. Hasat zamanında tanenin nemi, rengin yoğunluğunu etkileyebilir (Rotarenco ve ark. 2010).

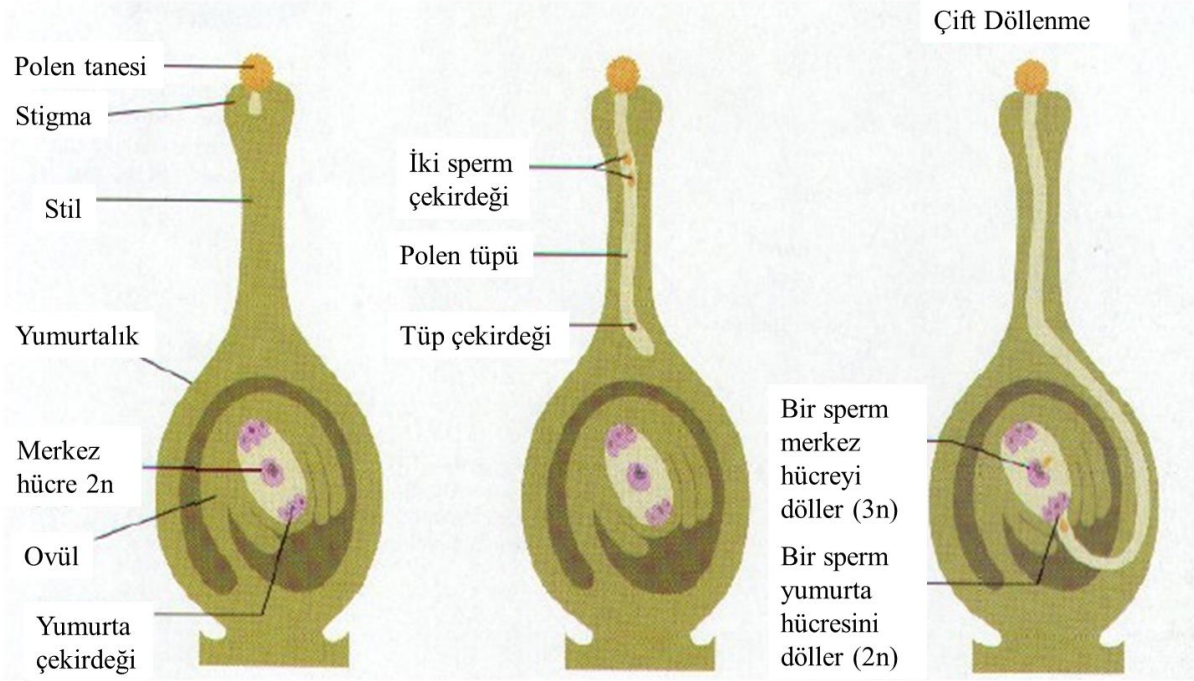
Junxiong ve ark. (2013) haploid tohumların elle ayrımının, haploid seçiminin etkinliğini azalttığını belirtmişlerdir. Günümüzde yaygın olarak tarımsal ürünlerin işleme prosesinde, sınıflandırmada ve belirlemede kullanılan otomatik görsel teknolojinin haploid mısır tohumlarının ayrımında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yöntemde bazı modifikasyonlar yapmışlardır. Haploid ve  $F_1$  olan tohumlar Navajo renk markörünün endosperm ve embriyoda ortaya çıkışına göre seçildiğinden otomatik görsel seleksiyonun temelini bu karaktere bağlı olarak

planlamışlardır. Tohumların embriyolarını fotoğraflayarak renk markörünü belirleme yoluna gitmişlerdir.

Melchinger ve ark (2014) tarafından yüksek yağ oranına ve *RI-nj* renk markörüne sahip UH600 ve UH601 indirgeyici hatları geliştirilmiştir. Bu hatlar tanede % 11-12 yağ içermektedir ve haploid indüklenme oranı %10 civarındadır. Tek melezler, sentetikler ve yerel ırkların donör olarak kullanıldığı çalışmada UH600 indirgeyici hat olarak kullanılmıştır. Haploid tohumlar tane ağırlığına ve toplam yağ içeriğine göre nükleer manyetik rezonans yöntemiyle ayrılmıştır. Bu yöntemde kaynak materyalin yüksek yağ oranına sahip olmaması gerektiği vurgulanmıştır. İndirgeyici hat ile melez olmuş tohumlar yüksek yağ oranına sahiptirler, haploidlerin ise kaynak materyalin sahip olduğu düşük yağ oranını ihtiva ettiği belirlenmiştir.

## **2.5. *In vivo* Haploid İndüklemenin Temelinde Olan Muhtemel Biyolojik Mekanizmalar**

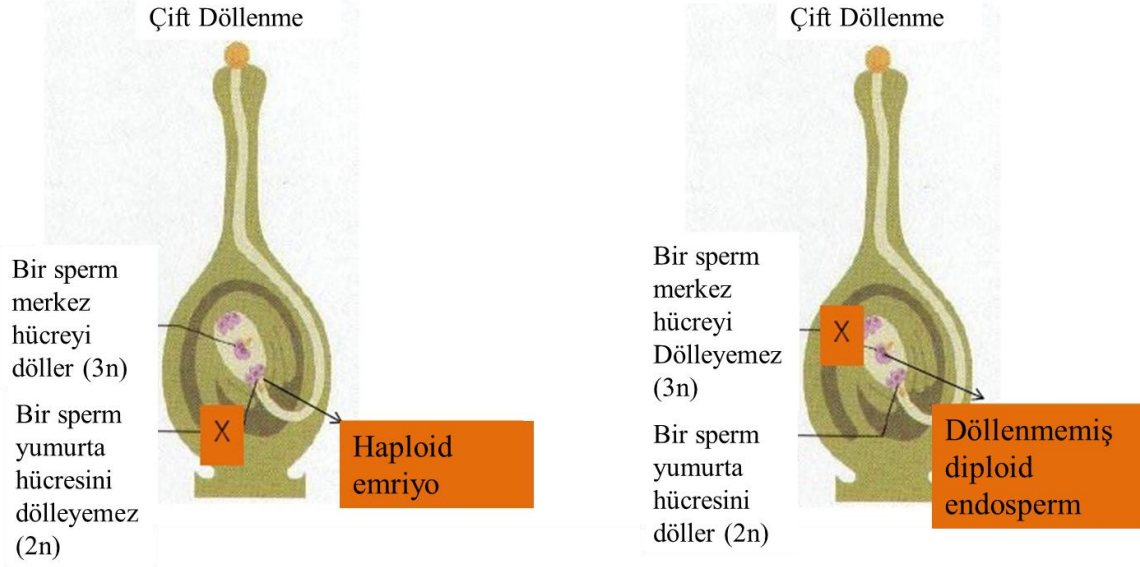
İndirgeyici hatlar polen verici ebeveyn olarak kullanıldıklarında, haploidlerin doğal olarak ortaya çıkma olasılığı olan %0.01'den daha yüksek oranda haploid üretirler. İndirgeyici hatlar özel genetik stoklardan geliştirilmişlerdir. Normal diploid bir mısırla melezlendiklerinde koçanda oluşan taneler döllenme anomalisi sebebiyle haploid (n) ve diploid (2n) tohum olarak ayrılırlar. İndirgeyici genotiplerin haploid oluşturmalarının biyolojik mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu konuda yapılan pek çok çalışma iki hipotez ortaya koymuştur. Mısır bitkisinde normal çift döllenme iki sperm hücresinden birinin yumurta hücresini diğerinin ise merkez hücreyi döllemesiyle gerçekleşir (Şekil 2.13).



**Şekil 2.13.** Mısır bitkisinde normal çift döllenme (Anonymous 2013)

#### 1.Hipotez: Bozuk-kırılmış çift döllenme

İndirgeyici hatların polenlerindeki anomaliler, normal çift döllenme etkisini, tek döllenmeye yol açarak haploid indüklemeye sebep olmaktadır. İndirgeyici hattın polenindeki sperm hücrelerinden bir tanesi bozuk olduğundan yumurta hücresini veya merkez hücreyi dölleyemez (Şekil 2.14).



**Şekil 2.14.** Haploid embriyoya ve diploid endosperme yol açan tek döllenme (Anonymous 2013)

Bylich ve Chalyk (1996) morfolojik olarak farklı sperm çekirdeği olabileceği konusuna odaklanmışlar, ZMS indirgeyici hattında polenlerin %6.3'ünde bir çift morfolojik olarak farklı sperm çekirdeği belirlemişlerdir. Bu araştırmanın sonucuna göre iki farklı kaniya varmışlardır:

- Muhtemelen, farklı hızda iki sperm hücresi geliştiği için bu durum meydana gelmektedir.
- İki sperm çekirdeği farklı oranda büyümektedir. İki sperm hücresinden bir tanesi döllenme için hazır durumdadır fakat, diğeri değildir.

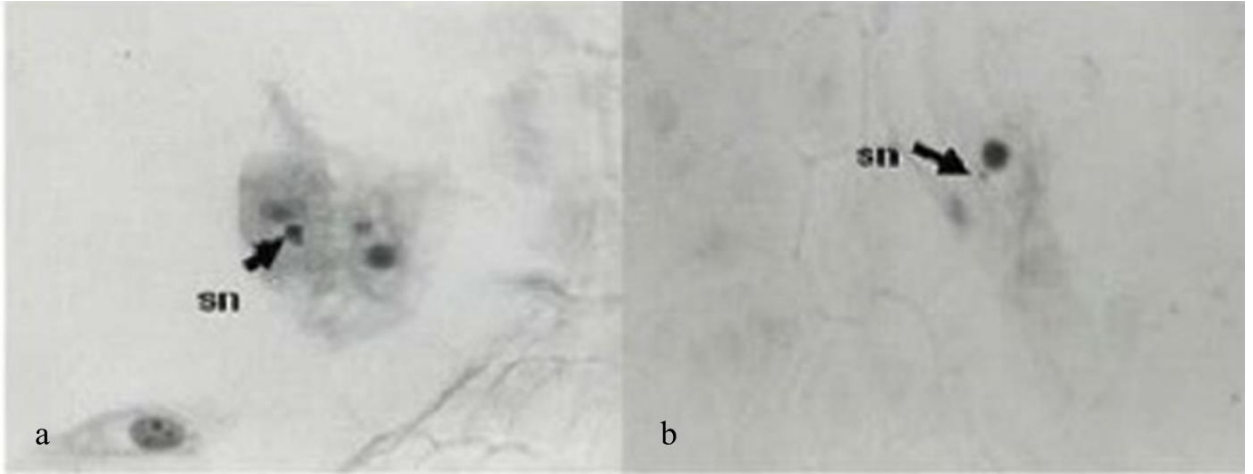
Sarkar ve Coe (1966, 1971) farklı (çoklu) döllenme olabileceği konusuna odaklanmışlar, Stock-6 indirgeyici hattında yüksek bir sıklıkta heterodöllenme gözlemlemişlerdir.

Rotarenco ve Eder (2003) yaptıkları çalışmada, gecikmeli döllenmenin heterodöllenmeye sebep olduğunu belirtmektedir. Stock-6 indirgeyici hattında yüksek bir sıklıkta heterodöllenmeyi de gözlemlemişlerdir.

Pogna ve Marzetti (1977) polen anomalileri konusuna yoğunlaşmışlar, indirgeyici hatlardan ve indirgeyici olmayan hatlardan elde edilen polen tanelerini *in vitro* ortamda

incelemişler ve indirgeyici hatların polenlerinin yüksek sıklıkta iki polen tüpüne sahip olduklarını gözlemlemişlerdir.

Mahendru ve Sarkar (2000), Swapna ve Sarkar (2011) sperm çekirdeğinin gücünü yitirmesi konusuna odaklanmışlar fakat, yaptıkları çalışmada polen tüpünün büyümesinde herhangi bir kusur bulamamışlar ve döllenmede gecikme gözlemlememişlerdir. Swapna ve Sarkar (2011) indirgeyici hat ile döllenmeden 22, 24, 26, 30 ve 36 saat sonra embriyoyu incelemişlerdir. Araştırmacılar, güçsüz-zayıf sperm çekirdeğinin embriyo kesesine girdikten sonra embriyo çekirdeğine nüfuz etmeyerek haploid indüklemeyi ortaya çıkarmasının muhtemel olduğunu öne sürmektedirler (Şekil 2.15).



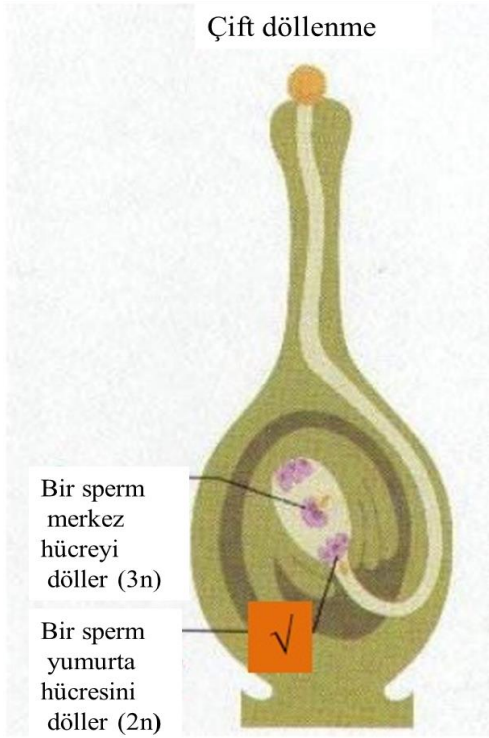
**Şekil 2.15.** a ve b: İki döllenmiş yumurtalığın sırasıyla döllenmeden 31 ve 30 saat sonra yumurta ve sperm çekirdeğinin birleşme başarısızlığını gösteren kesiti. Ok işareti sperm çekirdeğini (sperm nucleus-sn) göstermektedir. Sperm çekirdeği yumurta çekirdeğinin yanında yumurta çekirdeğine nüfuz etmeden durmaktadır (Swapna ve Sarkar, 2011)

Chalyk ve ark. (2003) anöplid (aneuploid) spermilerin haploidiye neden olduğu konusuna odaklanmış ve yaptıkları çalışmada, MHI ve M471 indirgeyici hatlarında %10-15 arasında anöplid mikrosporositi bulmuşlardır. Aşağıdaki iki kavramı öne sürmüşlerdir:

- Mikrosporların teşekkül etme sırasında kromozom bölünmesindeki anormalliklerden kaynaklanabilir.
- Anöloid gametler normal çift dölleme sırasında kopabilir ve yumurta hücresinde dölleme olmaksızın embriyo geliştirmeyi teşvik edebilir.

## 2. Hipotez: Normal çift dölleme

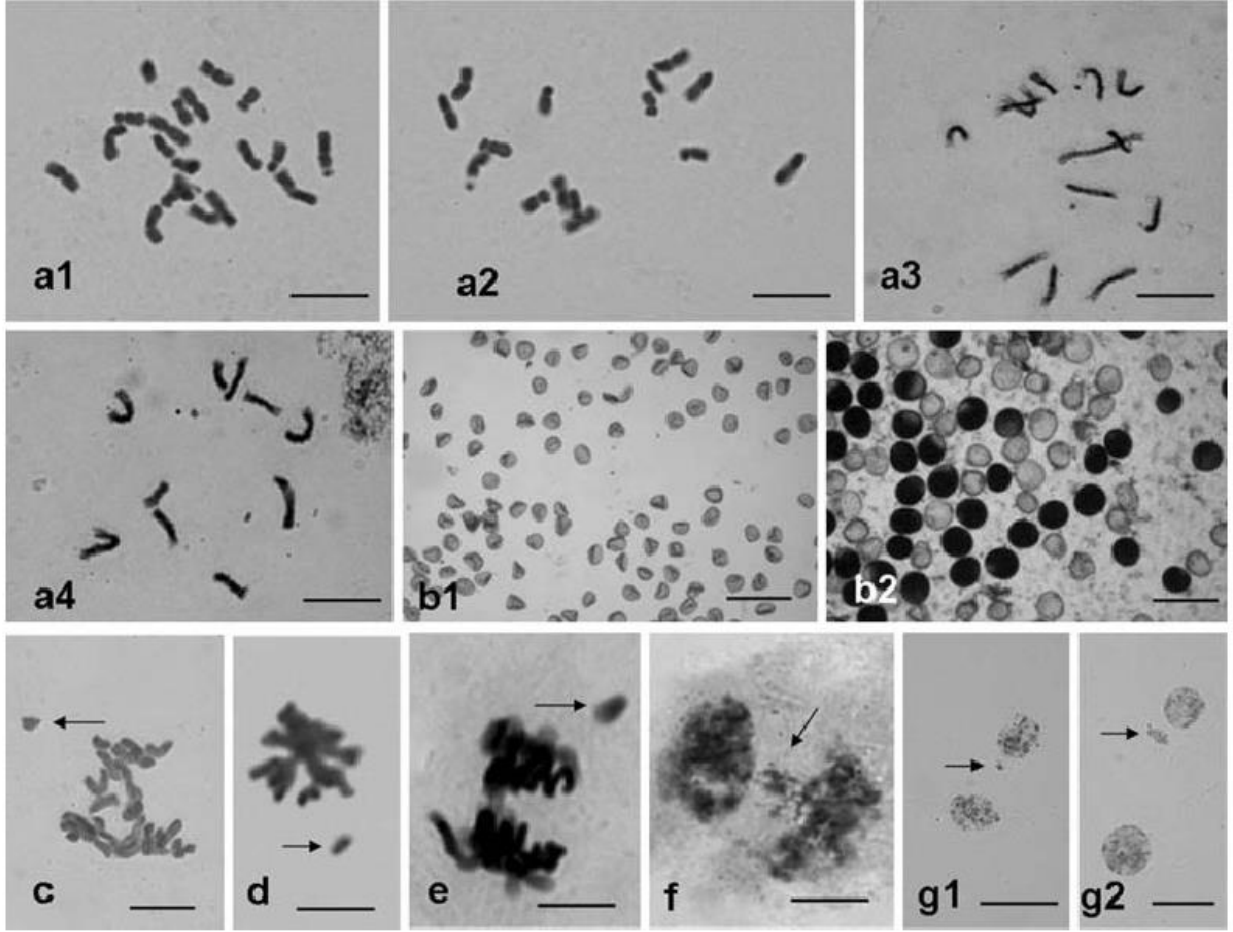
Bu hipoteze göre normal çift dölleme gerçekleşir (Şekil 2.16). Fakat, indirgeyici ebeveynlerden gelen kromozomlar hücre bölünmesini müteakip elimine edilirler.



**Şekil 2.16.** İndirgeyici hattın sperm çekirdekleri ile normal çift döllemenin gerçekleşmesi (Anonymous 2013)

Kromozom eliminasyonunu destekleyen bazı çalışmalar da vardır. Wedzony ve ark. (2002) indirgeyici hattın kromozomlarının bozulduğunu ve yeni oluşan hücrelerden elimine edildiğini belirlemişlerdir.

Zhang ve ark. (2008) çalışmalarında Stock-6'dan geliştirilen HZI1 indirgeyici hattını ve dört kendilenmiş hattı kullanmışlardır. Bu çalışmada Hua24 x HZI1 melezinin tanelerinin %0.2'sinde Hua24'ün özelliği olan sarı shrunken kısımlar ve HZI1'den mor aleuronlu kısımlar mozaik şeklinde ortaya çıkmıştır. HZI1 ile döllenmiş yumurtanın mitotik hücrelerinde münferit gecikmeli kromozomlar ve mikroçekirdek gözlemlemiştir (Şekil 2.17). Mor aleuron ve renksiz embriyolu tanelerde kökçüklerin yaklaşık %56.4'ünün mixoploid olduğu ( $2n=9-21$ ) ve diğer üç melezden elde edilen mor aleuron ve renksiz embriyolu tanelerde kökçüklerin %45.22'den fazlası haploid ( $n=10$ ) hücreler olduğu belirlenmiştir. Mor aleuron ve mor embriyolu taneler çimlendirildiğinde kökçüklerin %62.5'den fazlası mixoploid ( $2n=9-21$ ) ve hücrelerin %54.27'si  $2n=20$  kromozoma sahiptir. SSR analizleri göstermiştir ki Hua24 x HZI1 melezinden elde edilen tüm haploidler Hua24 bitkilerindeki Nos. 862 ve 857 de bazı polimorfik DNA bantları hariç aynı genomik kompozisyonları paylaşmıştır (Şekil 2.17). Araştırmacılar bu sonuçların mısırdaki haploid oluşumuna döllenmeden sonra kromozom eliminasyonunun sebep olduğunu iddia etmişlerdir.



**Şekil 2.17.** Hua24 x HZI1 melezinden elde edilen mor aleuron ve mor embriyolu ( $F_1$ ) tanelerin sitolojisi, a1–a4:  $F_1$  tanelerinin kökçüklerinde kök ucu metafazları,  $2n = 20$  (a1), 15 (a2), 13 (a3), 10 (a4) Bar 10  $\mu\text{m}$ , c: Kök metafazında bir gecikmeli kromozom, d–g: HZI1 ile döllenmiş Hua24'ün yumurta hücreleri Bar 10  $\mu\text{m}$ , d: Metafazda bir kromozom gecikmesi, e: Anafazda bir kromozom gecikmesi, f: Telofazda gecikenler, g1 ve g2: Telofazda mikroçekirdek, b1 ve b2: Nos. 869, 867'de haploidlerin polen taneleri Bar 20  $\mu\text{m}$  (Zhang ve ark. 2008)

Fischer (2004) haploidlerin %1.4'ünün indirgeyici hattın bir veya birkaç kromozom parçasına sahip olduklarını gözlemlemiştir.

Li ve ark. (2009), Zhang ve ark. (2008) indirgeyici ebeveynden gelen kromozom parçalarının katlanmış haploid ve haploidlerin gametlerine birleştiğini, entegre olduğunu tespit etmişlerdir.

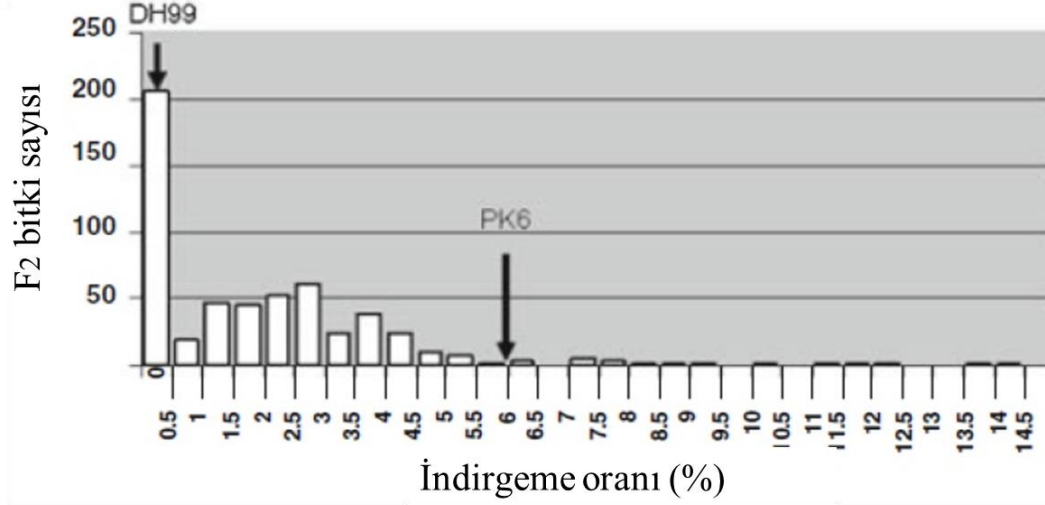


Yukarıda verilen tüm araştırmalar gösteriyor ki haploid indüklenme henüz anlaşılmış değildir. Farklı indirgeyici hatlarda haploid indüklemeye yol ačan birkaç mekanizma mevcut olabilir.

Sarkar ve Coe (1966), Lashermes ve Beckert (1988) haploid indüklemenin genetiği hakkında yaptıkları araştırmada Stock-6'dan geliştirilmiş germplasmdan gelen döllerde morfolojik markörleri dikkate alarak çalışmışlar; haploid indüklemenin kalıtsal bir özellik olduğunu, hem paternal hem de maternal etkiler gösterdiğini, birkaç genle yönetilen bir kalıtım olduğunu ve çekirdekte belirlenebilen dominant bir karakter olduğunu ortaya koymuşlardır.

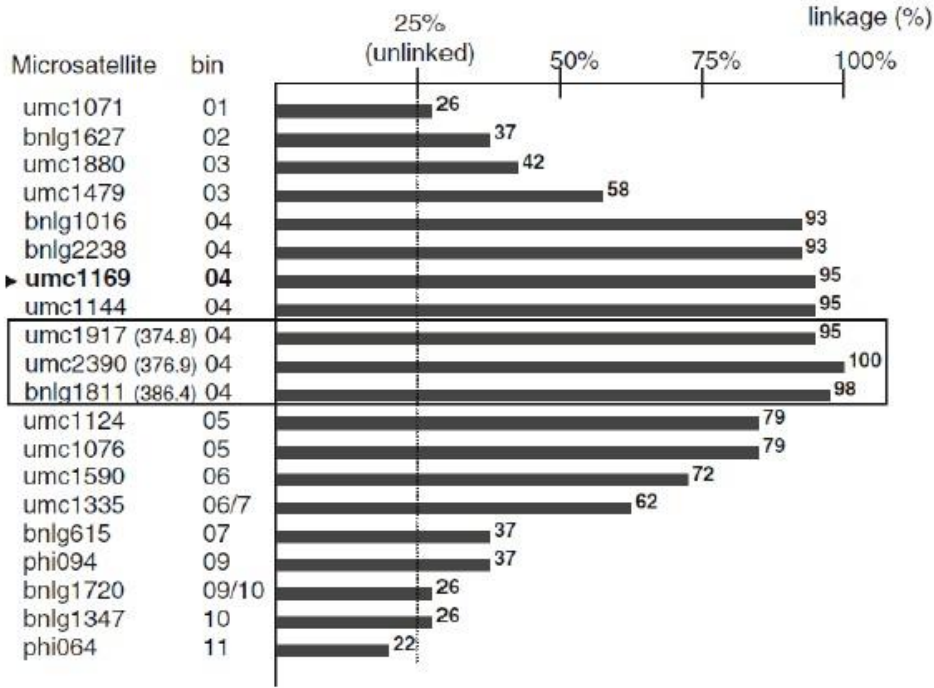
Deimling ve ark. (1997) ve Röber (1999) haploid indüklemenin genetiği ile ilgili yaptıkları araştırmada, Stock-6 ve W23ig indirgeyici ebeveynler, melezleri ve F<sub>3</sub> popülasyonu da dahil materyallerin bağlantı (linkage) haritalaması için RFLP markörleri kullanmışlardır. İki QTL (kromozom 1 ve 2'de) belirlemişlerdir. Bu QTL'ler haploid indüklenme oranı için genetik varyansın %40.7 ve fenotipik varyansın %17.9 olduğunu ifade etmişlerdir. Kromozom 1'deki pozitif QTL allel dominant olup Stock-6'dan, 2. kromozomdaki eklemeli gen etkili ve W23ig hattından geldiğini belirtmişlerdir.

Barret ve ark. (2008) bir indirgeyici PK6 ve bir indirgeyici olmayan DH99 hat arasında yapılmış mezelden geliştirilmiş popülasyondaki açılımda normalden farklı biçim bozulması bulmuşlardır. DH99 (indüklenme özelliği olmayan ana ebeveyn) x PK6 (%6 indüklenme oranı gösteren baba ebeveyn) mezelden elde edilen 471 F<sub>2</sub> bitkileri, indüklenme oranının dağılımı açısından değerlendirilmiştir. Açılan popülasyonda indirgeyici hattın (PK6) indüklenme oranından daha fazla indüklenme oranı gösteren genotipler ortaya çıkmıştır (şekil 2.18).



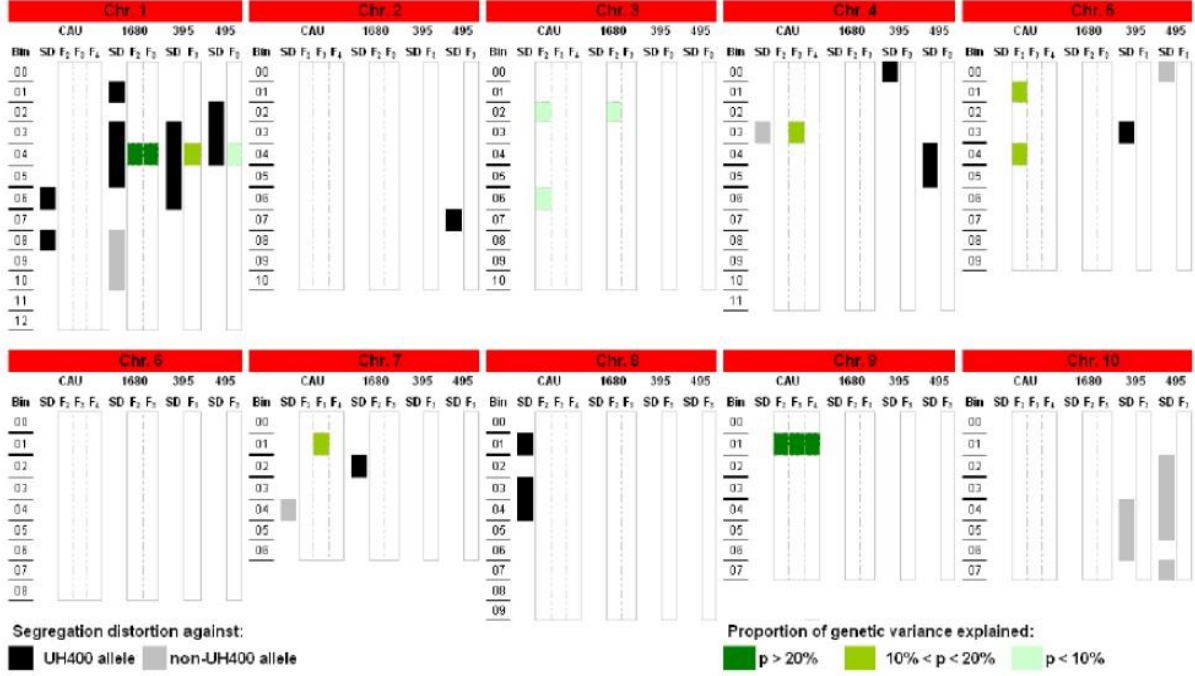
Şekil 2.18. İndikleme özelliğinin normal olmayan dağılımı (Barret ve ark. 2008)

Barret ve ark. (2008) SSRs markörleri ile fenotipik özelliklerde açılma oranını analiz etmişlerdir. Kromozom 1'de major bir lokusun 11.6 cM yer kapladığı tanımlanmıştır. Kullanılan tüm polimorfik mikrosatelit markörlerinden uygun olanları genetik haritada 1.04 bin de yoğunlaşmıştır. Analiz edilen 44 F<sub>2</sub> bitkisinin % bağlantı oranı belirlenmiştir. Genetik haritada konumlanmış üç ve daha fazla mikrosatelitin yakın bağlantılı olduklarını belirlemişlerdir (Şekil 2.19).



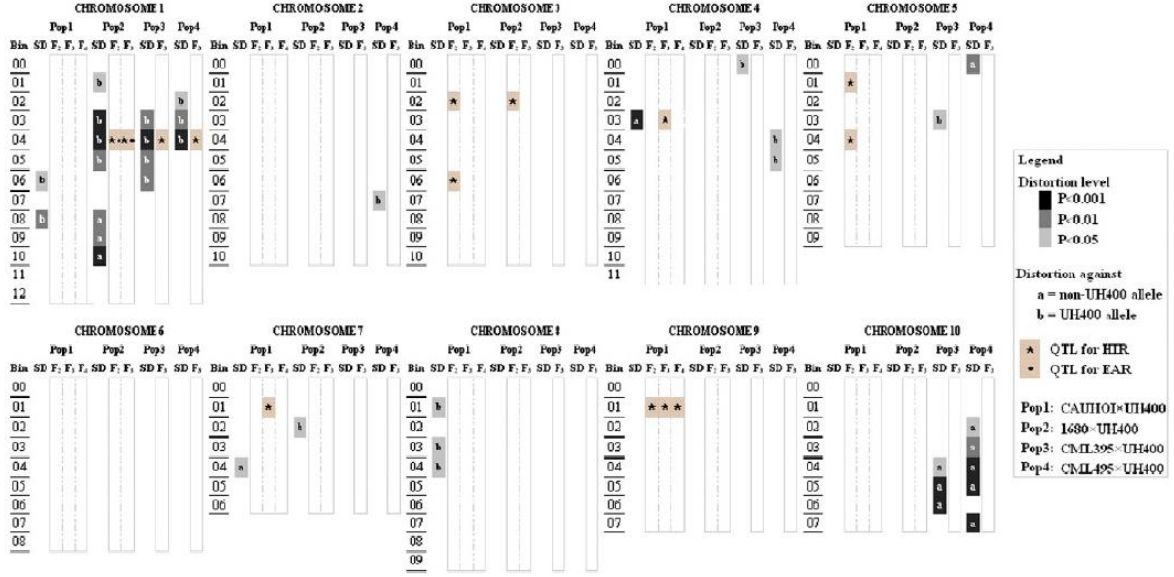
**Şekil 2.19.** Jinogenetik indükleme özelliğinin ortaya çıkma sıklığının mikrosatelit markörleri kullanılarak genetik haritalaması ve analizi (Barret ve ark. 2008)

Prigge ve ark. (2011) UH400 indirgeyici hattı ile melezlenmiş iki ılıman (CAUHOI, 1680) ve iki tropikal (CML395, CML495) hattın geliştirilen açılan materyalde haritalama yapmışlardır. Bu popülasyonların üçünde kromozom 1’de haploid indükleme için büyük bir QTL belirlemişler ve genetik varyansın %66’nın üzerinde olduğunu açıklamışlardır. Bu üç popülasyonda kromozom 1’deki (bin 1.04) bölge UH400 allelinin aksine açılım bozulması göstermiştir. İki indirgeyici hattın (CAUHOI ve UH400) melezinden gelen diğer açılan popülasyonda beş kromozomda yedi QTL ile bu melezin üç generasyonunda %20 katkıda bulunan kromozom 9’da bir QTL belirlenmiştir. Haploid indükleme yeteneği kromozom 1’de birkaç minor QTL ile bir major QTL arasında konumlanmıştır (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Haploid indükleme özelliğinin genetik haritalaması (Prigge ve ark. 2011)

Prigge ve ark. (2012) 1680 x UH400 materyalinde embriyosuz tane oranını (ETO) %0-11 arasında bulmuşlardır. SSRs kullanılarak ETO için bağlantı analizleri kromozom 1’de bir major QTL’in HİO ve ETO için birlikte yerleştiğini belirlemişlerdir. ETO için hesaplanan genetik varyans komponentleri ( $\sigma_g^2$ ) ve yinelenebilirlik ( $w^2$ ) 1680-F<sub>2</sub> ve 1680-F<sub>3</sub> popülasyonunda önemli ve yüksek bulunmuştur. Ortalama ETO, 1680-F<sub>3</sub> de 1680-F<sub>2</sub> popülasyonundan daha yüksek ve 1680-F<sub>3</sub> popülasyonunda ETO’nın bulunma dağılımı daha geniş bulunmuştur (Şekil 2.21).



**Şekil 2.21.** Dört F<sub>2</sub> popülasyonunda açılım bozulmasının kromozomlardaki konumu, yönü ve boyutu (sütun SD), haploid indükleme oranı (HIR), embriyosuz tane oranının (EAR) popülasyonların F<sub>n</sub> generasyonlarında belirlenmesi, Bin belirlemede IBM2 2008 komşuluk referans haritası temel alınmıştır (<http://maizegdb.org>), sentromerik bin kalın çizgiler arasında gösterilmiştir (Prigge ve ark. 2012)

İndükleme melezlemesi sonucu elde edilen tohumlarda embriyosuz ve endospermsiz tane oluşumu da gözlemlenmektedir (Şekil 2.22). İndirgeyici genotip ile indükleme melezlemesinde normal çift dölleme gerçekleşmez. İki sperm çekirdeğinden bir tanesi yumurta hücrecini dölleyen diğeri merkez hücreyi dölleyemez ve endosperm 2n olarak kalır. Tanede endosperm çok iyi gelişmeyebilir ve zayıf taneler oluşabilir. Aynı şekilde döllememiş embriyo da gelişimini tamamlayamadığında embriyosuz taneler oluşur. Bu taneler çimlenmezler.



**Şekil 2.22.** Embriyosuz ve endospermsiz taneler a; endospermsiz tanelerin görüntüsü, b; embriyosuz tanelerin oluşumu (Orjinal)

## 2.6. Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi

Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenebilmesi için değişik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bitkinin fenotipine göre yapılan ayrımlar kromozom sayısı bakımından bir fikir verse de, kuşkusuz ploidi belirlemede kullanılan en eski ve en güvenilir yöntem, hızlı büyüyen doku ve organlarda (özellikle kök uçlarında) yapılan kromozom sayımlarıdır. Sağlıklı ve güçlü bir gelişme gösteren taze kök uçlarından alınan örnekler, kromozom sayımları için en uygun materyaldir. Kromozom sayımları için yapılan laboratuvar işlemlerinin uzun süre alması ve deneyimli elemana ihtiyaç göstermesi en önemli dezavantajdır. Ancak, klasik ve doğru sonuç veren bir yöntemdir (Ellialtıoğlu ve ark. 2001, Brummer ve ark. 1999, Tuna ve ark. 2001).

Flow sitometri ve stoma hücrelerinde yapılan gözlemlere dayanarak geliştirilen yöntemler, günümüzde ploidi düzeyinin belirlenmesinde kromozom sayımlarının yanı sıra rutin olarak kullanılabilir aşamaya gelmiş yeni tekniklerdir. Flow sitometri, hücrelerin tek tek

flouresans dedektörden geçerken emdikleri ışının analizine dayanan bir yöntemdir. Her bitki türü için yöntemin optimize edilme gereksinimi, bu yöntemin dezavantajlarından biri olsa da; miksploid hücrelerin varlığının ortaya çıkartılması, bir kişinin günde 100'den fazla bitkide analiz yapabilme olanağını sunması gibi avantajları, flow sitometrinin günümüzde kromozom sayımlarının yapılması için en fazla tercih edilen yöntem haline gelmesine neden olmuştur (Ellialtıoğlu ve ark. 2001).

Dolezel ve ark. (1989) *in vitro* kültüründeki hüce süspansiyonlarından, kalluslardan ve normal sağlam bitki hücrelerinden izole edilen hücre çekirdeklerinin DNA içeriklerinin belirlenmesinde flow sitometri yöntemi kullanmışlardır. Hücre çekirdekleri hücrelerden ya mekanik olarak (doğrama, enjektörle çekme) ya da hipotonik erime (hücre sitoplazmasına göre su derişimi çok olan ortam) yöntemiyle izole edilmiştir. Her iki metot benzer sonuçlar vermesine rağmen, sağlam dokulardan ve kalluslardan izole edilen hücrelerden sonra daha düşük ploidi seviyelerinde hafif bir değişim gözlemlenmiştir. Hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak karşılaştırma yapıldığında ise iki metodun da farklılıklar göstermediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki sağlam bitki dokularında ve çeşitli *in vitro* kültürlerinde hücre çekirdeğinde DNA içeriğinin belirlenmesinde flow sitometri hızlı ve doğru bir yöntemdir.

Lee ve ark. (2002) farklı sekiz kendilenmiş mısır hattının ve bunların melezlerinin flow karyotiplerini analiz etmişlerdir. Pek çok mısır hattının kök uçlarından çok miktarda yüksek kalitede metafaz kromozomlarının toplanması ve elde edilmesi başarılmıştır. Kromozom süspansiyonları mısır kök uçlarının doğranması yöntemiyle hazırlanmış ve flow sitometri ile analiz edilmiştir. Hatlar ve hatların hibritleri arasında kromozom pikleri veya konumları açısından deneysel flow karyotiplerin varyasyonları belirlenmiştir. Sekiz kendilenmiş hat arasında 2C DNA miktarı 5.09-5.52 pg arasında değişmiştir. Uygun mısır hatlarının seçimi tek kromozom tiplerine özel sınıflandırma açısından önemlidir. En azından beş farklı kromozom tipi beş farklı mısır hattından sınıflandırılabilir ve farklılıkları belirlenebilir. Kromozom 1'deki DNA miktarının değişkenliği %9.1 olmuştur ve 0.685-0.747 pg arasında değişmiştir. Hatların hibritlerinde homolog kromozom 1'de DNA içeriğinde de farklılıklar belirlenmiştir.

## 2.7. Maternal Haploidlerin Kromozom Katlanması

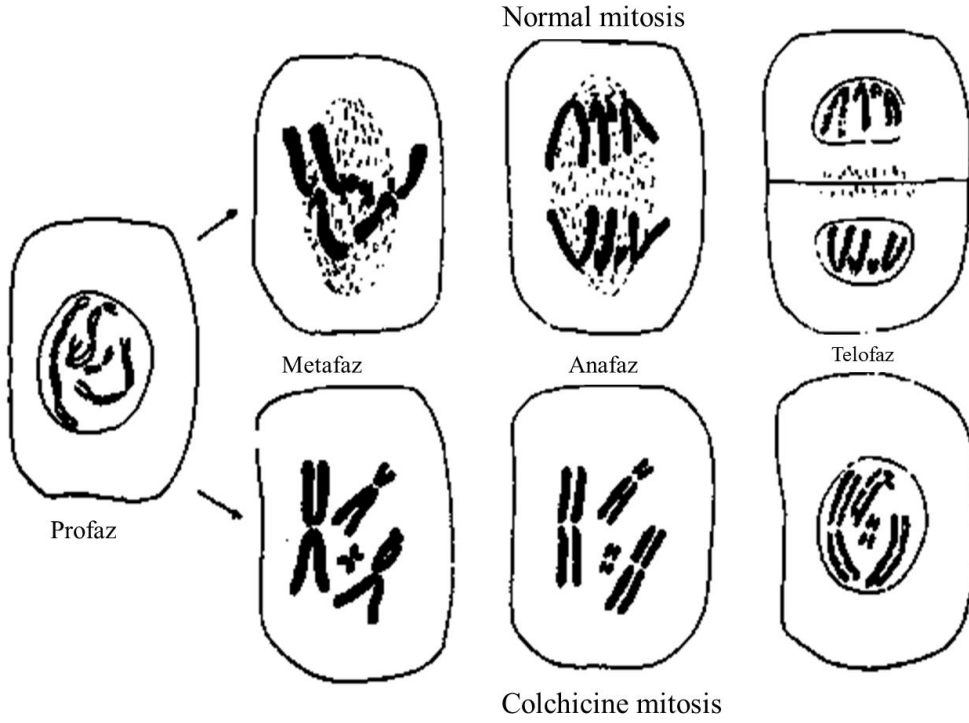
Diploid bitkiler, hücrelerinde bir kopyası ana ebeveynden diğer kopyası da baba ebeveynden gelen iki kopya kromozom içerir. Mısır bitkisinde erkek organ tepe püskülü ve dişi organ koçan tek kopya kromozom içerirler. Döllenme sonucu taneler  $2n=20$  kromozom içermektedir.

Kromozom katlanmasında azot protoksit, kafein, kloral hidrat, asenaften, sulfinilamid, etil merkuriklorid, heksaklorosikloheksan ya da colchicine gibi antimitotik özellik gösteren kimyasallardan yararlanılmaktadır. Yine bu amaçla 2,4 D ve NAA gibi hormonlar (Changdeng ve ark. 1998) ve trifluralin ve orizalin etken maddeli bazı herbisitler de (Bouvier ve ark. 1994, Hansen ve Andersen 1998) kullanılabilir. Günümüzde kromozom katlaması için bitki ıslahçıları tarafından en yaygın kullanılan kimyasal madde; colchicine dir. Bu madde *Liliaceae* familyasına ait *Colchicum autumnale* L. (güz çiğdemi) bitkisinin köklerinden elde edilen, alkaloid yapısında kuvvetli bir zehir olup; alkol, kloroform ve soğuk suda eriyen, buna karşılık sıcak suda ve eterde erimeyen bir maddedir. Kimyasal formülü  $C_{22}H_{25}O_6$  olarak gösterilen 'colchicine', değişik kaynaklarda 'kolkisin', 'kolşisin' veya 'kolçisin' olarak da ifade edilebilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark. 2001).

Colchicine, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısı ile replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar (Şekil 2.23) (Ellialtıoğlu ve ark. 2001).

Kromozom katlanması için en etkili yöntem colchicine uygulamasıdır. Colchicine konsantrasyonu, uygulama dönemi ve genotip, kromozom katlamasında etkilidir (Castillo ve ark. 2009).





**Şekil 2.23.** Normal mitoz ve colchicine ile mitoz bölünme (Müntzing 1961)

Bitkilerde generatif organları da dahil olmak üzere toprak üstü organları sürgün apikal meristem (SAM) den meydana gelir. SAM meristematik hücreleri içerir. Bu hücrelerden ilk organlar farklılaşarak oluşur. Haploid bitkilerin generatif organlarında tamamen fertilitiyi başarmak için meristematik hücrelerde kromozom katlanmasını generatif organlar farklılaşıp oluşmadan önce gerçekleştirmek gerekir. Bu sebeple, çimlendirilmiş çok genç (erken dönem) filizlerin mitotik inhibitörlere maruz bırakılması önerilmiştir (Jackson 2009).

Diğer tarla bitkilerinin aksine mısır bitkisinde fide döneminde colchicine ile yapay kromozom katlaması yüksek derecede genotipe bağlı reaksiyonlar gösterdiğinden, mısır bitkisinde haploid indükleme çalışmalarında ciddi bir sınırlama olmuştur (Geiger 2009).

Haploid bitkiler sadece tek kopya kromozom içermektedirler. *In vivo* maternal indükleme ile elde edilen haploidler sadece donör ebeveynden kromozom içerirler. Haploid bitkilerin üreme

organlarında mayoz bölünme esnasında homolog kromozom çiftleri oluşturma gibi ilerleyemediğinden, erkek ve dişi gametler üretken değildir. Yani haploid bitkiler genellikle kısırdır. Kromozom katlamasının amacı bir haploidten (n) katlanarak (2n) katlanmış haploid üretilen haploid bitkilerde fertilitiyi sağlamaktır. Böylece bu bitkilerde kendileme yapılarak katlanmış haploid hatlar geliştirilebilir (Chaikam ve Mahuku 2012).

*In vivo* maternal haploid tekniğinde spontan kromozom katlanması düşük oranda meydana gelir ve bazı haploid bitkilerin fertil olması ile sonuçlanır. Spontan katlanmış haploidlerin elde edilme oranı kaynak materyalin genotipine bağlıdır. Kromozom katlanmasının yüksek oranda ve istikrarlı olmasını başarmak için haploid bitkilere mitotik inhibitör denilen kimyasallar uygulanmalıdır. Mitotik inhibitör kimyasallar mayoz bölünmeyi engeller (Chaikam ve Mahuku 2012).

Gayen ve ark. (1994) haploid kabul edilen tohumlarda çimlenme döneminde koleoptil oluşuktan sonra colchicine uygulayarak bir devrim gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada çimlendirilmiş materyalde koleoptillerin uçları kesilerek %0.06 colchicine ve %0.5 DMSO solüsyonunda 12 saat 18 °C de bekletilmiştir.

Zabirova ve ark. (1993) %0.125 colchicine ve %0.5 DMSO solüsyonunu 3-4 yapraklı genç haploid bitkilere direkt 3-5 mm enjekte etmişlerdir. Bu metot sera şartlarında daha başarılı olmuştur. Tarla şartlarında %88.6 canlı bitki elde edilirken sera şartlarında %92.8 canlı bitki elde edilebilmiştir. Canlı bitkilerin %42.4'ü polen vermiş, polen verenlerin %30.5'inde kendileme yapılabilmektedir. Fakat, %11.9 gibi bir düşük oranda polen verme ve koçan püskülü oluşturma durumu gerçekleşmiştir.

Bordes ve ark. (1997) 20 tane genç ve aynı homojenlikte büyüyen 3 yapraklı dönemdeki bitkilerin köklerini 1.5 g/l colchicine solüsyonunda 3 saat boyunca bekletmiştir. Sonuçta bitkilerden %30-61 oranında tohum elde edilebilmiştir.

Deimling ve ark. (1997) çimlendirilmiş materyalin koleoptilinin yanı sıra oluşan ilk köklerde de kesim yaparak %0.06 colchicine ve %0.5 DMSO solüsyonunda karanlıkta bekletmiş

ve bu metodun etkinliğini daha da artırmışlardır. Yapay kromozom katlamasından sonra çimlendirilmiş materyal dikkatlice su ile yıkanmış ve 5-6 yaprak dönemine kadar serada ilk günler yüksek nemde olacak şekilde büyütülmüştür. Birkaç hafta sonra bitkiler tarlaya dikilmiştir. Bu yöntemle %72.5 canlı bitki, canlı bitkilerden %50 fertil bitki, fertil bitkilerden %39 kendileme yapılabilecek bitki ve %27.3 kendileme yapılarak tohum alınan bitki elde edilmiştir.

Eder ve Chalyk (2002), Deimling ve ark. (1997)'nin uyguladığı metodu çok sayıda ve farklı donör genotiplerinden elde edilen haploid tohumlara uygulamışlar ve ortalama %49 oranında kromozom katlaması başarmışlardır. Bu çalışmada karşılaştırma yapmak için 3-4 yapraklı dönemde enjeksiyon ile colchicine uygulama yöntemini test etmişler ve sadece %16 oranında kromozom katlaması tespit etmişlerdir. Her iki metotla kromozom katlaması yapılan materyalde %50-60 oranında polen döken bitkilerde kendileme yapılabilmıştır.

Kato (2002) kromozom katlaması için bir yöntem geliştirmiştir. Haploid bitkilere çiçeklenme öncesi 2 gün süreyle nitrous oxide gazı (NO<sub>2</sub>) 600 kPa uygulanmıştır. Donör bitkilerin genelinde uygulama yapılmış bitkilerin ortalama %44'ü kendileme sonucu tohum üretmiştir. Ancak, kromozom katlama oranına donör genotiplerin çok güçlü bir etkisi gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu metot çok zahmetli ve özel ekipmanlar gerektirmektedir. Bu sebeple kolayca uygulanabilen yüksek verimli bir uygulama olmamıştır. Diğer taraftan, yüksek iyileşme oranı bu metodu özel sitogenetik çalışmalar ve diğer bilimsel problemler için çekici yapmaktadır.

Colchicine in mikrotübülüs alt birimlerine bağlanma kapasitesi olduğundan bitkilerdeki mitoz bölünmeyi durdurabilir. Bu sebeple colchicine mısır ıslahında homozigot katlanmış haploidlerin üretilmesi için çok sayıda haploidin kromozom katlamasında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, colchicine memeliler için çok zehirli ve çevreye olumsuz etkileri olan bir kimyasaldır. Bu yüzden, mısır bitkisinde kromozom katlamasını sağlayabilecek colchicine yerine kullanılabilir kimyasal bileşimler veya fiziksel metotlar alternatif olarak araştırılmıştır. Amiprofos methyl, oryzalin ve pronomide herbisitlerinin mısırdaki kromozom katlamasında etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu bileşimlerin toksisitesi colchicine den daha düşük ve çimlendirilmiş materyalin uygulama sonrası iyileşmesi ve büyümesi daha iyi olmuştur.

Dolayısıyla bu kimyasal bileşim colchicine e kıyasla azaltılmış konsantrasyonlarda uygulandığında sonuç vermiştir (Chaikam ve Mahuku 2012).

Häntzschel ve Weber (2010) mitoz bölünmeyi durdurmaya ve kromozom katlamasına yol açan colchicine uygulamasına bir alternatif bulmak için farklı yöntemler uygulamışlardır. Bazı fiziksel koşulların ve kimyasal bileşimlerin mısır kök ucunda kromozom katlanması oluşturma potansiyelini analiz etmişlerdir. Mitoz bölünmeyi durdurmak için kullanılacak farklı yöntemlerin potansiyelini araştırmak ve ayrıca uygulama koşullarının optimizasyonu için ilk adım olarak kök ucu hücrelerinin mikroskopik değerlendirilmesi kullanılmıştır. Bu çalışmada birkaç fiziksel uygulamanın mısır hücrelerinde tetraploidlere yol açma kapasiteleri test edilmiştir. Bunlar yüksek ve düşük sıcaklık, yüksek hava basıncı ve elektrik akımı uygulamalarıdır. Ancak, 3 gün 6 °C düşük sıcaklık uygulaması yapılan çimlendirilmiş materyalde kök ucu hücrelerinin çok az bir oranında katlanmış kromozom sayıları belirlenmiştir. Hava basıncı veya elektrik akımı uygulamalarında sonuç çok düşük bulunmuştur. Aynı zamanda hava basıncının veya elektriğin şiddetinin yükseltilmesi çok kompleks bir deneysel kurulum gerektirmektedir. Düşük sıcaklığa maruz kalan dokularda anöploid hücrelerin artışının oranını çok az etkilediğinden, bu teknik mısır ıslahındaki uygulamalar için faydasızdır.

Häntzschel ve Weber (2010)'in yaptıkları çalışmalar gösterdi ki herbisitler (APM, pronomide ve oryzalin) katlanmış mısır hatlarının üretimi için colchicine e alternatif olabilirler. Bu herbisitler daha az toksik olup uygulamaları da daha ucuzdur. Burada anlatılan çalışmalar sadece diploid kök meristem dokuları kullanılarak yapılmıştır. Günümüzdeki çalışmalar bu kimyasal bileşimlerin haploid dokularda ve mısırın diğer dokularında hücre bölünmesini engelleme etkinliğini test etme aşamasındadır.

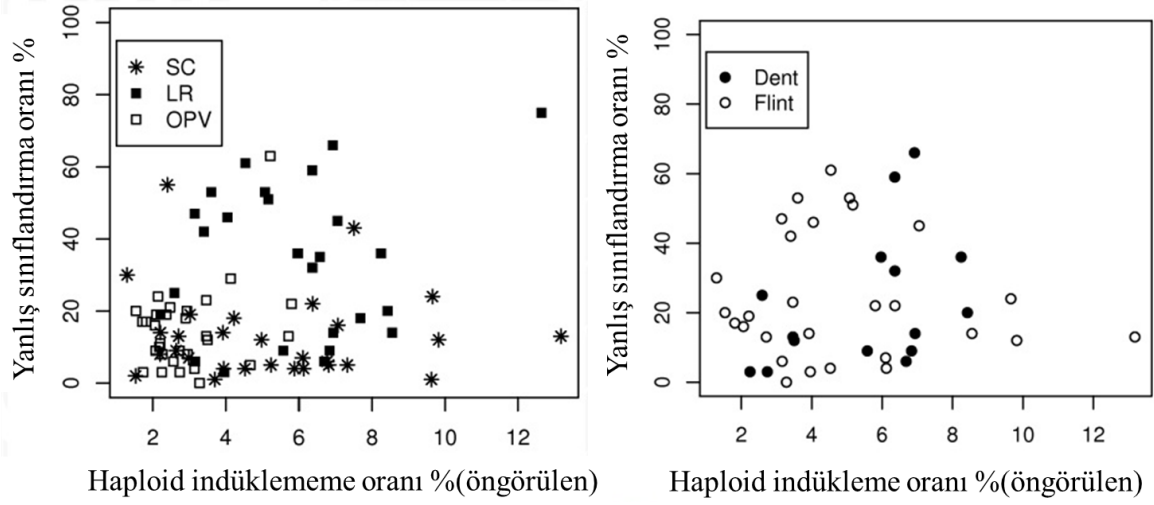
## **2.8. Haploid İndirgeme için Kullanılacak Kaynak Materyal**

Haploid indüklemeye için kullanılacak donör veya kaynak materyalin seçimi ıslah programının amacına bağlıdır. Genellikle ıslahçılar haploid indüklemede kaynak materyal olarak  $F_1$  veya  $F_2$  popülasyonlarını kullanmaktadır.  $F_2$ 'den geliştirilen bir KH hattın  $F_1$ 'den

geliştirilenden %50 daha fazla en iyi rekombinantları içerdiği belirlenmiştir (Gallais 1990). Ancak, F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> popülasyonları kıyaslandığında en iyi rekombinantların sıklığındaki farklılık küçüktür. Bu şunu ifade etmektedir; KH yaklaşımı genler arasında bağlantı olduğunda F<sub>2</sub> popülasyonunda daha iyi izlenir (Gallais 1990, Bernardo 2009).

Mısır köy popülasyonlarında istenmeyen resesif allellerin yüksek mutasyona sahip olması melez mısır ıslahında kullanımını engeller. KH tekniği, bir gen havuzundan istenmeyen resesif allellerin eliminasyonu için etkili bir yaklaşım olabilir (Gallais 1990, Wilde ve ark. 2010). Önemli tarımsal özellikler için ciddi performans farklılıkları yüzünden köy popülasyonlarından türetilmiş hatlar direkt olarak melez mısır ıslahında ebeveyn gibi kullanılamamasına rağmen, markör destekli geri melez veya ıslah başlangıcı çalışmaları için değerli genetik kaynaklar olarak kullanılabilir. Kendilenmiş hatlara kıyasla Hard-Weinberg kuralına en yakın materyal olarak köy popülasyonlarından türetilmiş KH hatlar, QTL'lerin yüksek doğruluk ve netlik ile haritalanması ve bulunmasına olanak sağlar. Böylece köy popülasyonlarından türetilmiş KH hatlar markör-özellik bağlantı analizleri için uygun materyallerdir (Wilde ve ark. 2010).

Prigge ve ark. (2011) çalışmalarında *in vivo* maternal indükleme için kaynak materyal olarak tek melezler, köy popülasyonları ve açık döllenen çeşitleri kullanmışlardır. Bunun yanı sıra bu materyallerin tane tipine göre (atdışi ve sert mısır) kaynak materyal olarak kullanıldığında haploid indükleme oranı (HİO) ve yanlış haploid seçim oranları karşılaştırılmıştır. Haploid indüklemeye yanıt açısından kullanılan kaynak materyaller arasında önemli varyasyonlar saptanmıştır. Tek melezlerde diğer kaynak materyallere göre daha yüksek HİO belirlenmiştir (Şekil 2.24).



**Şekil 2.24.** Farklı kaynak materyallerde HİO ve yanlış sınıflandırma oranları, SC (Single Cross Tek melez), LR (Landrace-Köy popülasyonu), OPV (Open Pollinated Variety-Açık döllenmiş çeşit), Dent (Atdışi), Flint (Sert mısır) (Prigge ve ark. 2011)

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bu araştırmada materyal olarak Mısır Araştırma Enstitüsü mısır ıslah programı ile geliştirilmiş olan 30 tek melez çeşit kaynak materyal olarak kullanılmıştır. Tüm tek melezlerin olum grubu FAO 650-700 arasındadır. Bitki boyları ve koçan yükseklikleri indirgeyici materyallerden uzundur (Şekil 3.1). Kaynak materyalin geneli atdışi tane yapısında olup beş adedi atdışi yapısından sert tane tipine dönük yapıdadır. İndükleme melezlemesinde kullanılan 30 tek melez ve bazı özellikleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** *In vivo* maternal haploid tekniğinde kaynak materyal olarak kullanılan tek melezlerin özellikleri

Sıra No	Melez	Çiçeklenme tarihi (gün)	Bitki Boyu (cm)	Tane Yapısı
1	ADA 3.28	64	253	Atdışi
2	ADA 3.49	75	337	Atdışi gibi
3	ADA 6.9	73	317	Atdışi
4	ADA 6.13	70	323	Atdışi
5	ADA 6.15	65	307	Atdışi
6	ADA 6.16	72	310	Atdışi
7	ADA 6.17	72	327	Atdışi
8	ADA 6.18	73	307	Atdışi
9	ADA 6.19	75	330	Atdışi
10	ADA 6.21	65	293	Atdışi
11	ADA 6.23	73	320	Atdışi
12	ADA 6.51	74	330	Atdışi gibi
13	ADA 7.2	73	337	Atdışi
14	ADA 7.13	72	313	Atdışi
15	ADA 7.20	72	293	Atdışi
16	ADA 7.28	69	293	Atdışi
17	ADA 7.33	75	313	Atdışi
18	ADA 7.36	73	313	Atdışi gibi
19	ADA 7.38	70	297	Atdışi
20	ADA 8.2	72	307	Atdışi
21	ADA 8.3	69	293	Atdışi
22	ADA 8.4	63	287	Atdışi
23	ADA 8.5	65	273	Atdışi
24	ADA 8.6	62	293	Atdışi
25	ADA 8.8	69	287	Atdışi
26	ADA 8.12	71	317	Atdışi
27	ADA 8.18	66	287	Atdışi gibi
28	ADA 8.23	67	307	Atdışi gibi
29	ADA 8.30	73	320	Atdışi
30	ADA 8.32	64	300	Atdışi



**Şekil 3.1.** Kaynak materyal olarak kullanılan tek melezlerden görüntü (Orj.)

*In vivo* maternal haploid tekniğinde indirgeyici genotip olarak kullanılmak üzere Hohenheim Üniversitesi'nden temin edilen RWS, RWK-76 ve bunların melezi RWSxRWK-76 materyalleri ile INRA'dan temin edilen WS14 indirgeyici hatları kullanılmıştır.

RWS, Hohenheim Üniversitesi'nde geliştirilen ilk yüksek performanslı indirgeyici hat olmuştur (Deimling ve ark. 1997, Röber ve ark. 2005). Rus indirgeyici sentetik materyalinden geliştirilen KEMS hattı (Shatskaya ve ark. 1994b) ve Fransa indirgeyici hattı WS14 (Lashermes ve Beckert 1988) arasında yapılan bir melezden RWS indirgeyici hattı geliştirilmiştir. RWS indirgeyici hattı Orta Avrupa ılıman iklim kuşağına adapte olmuş bir materyal olmasına rağmen, tropikal çevrelerde de kullanılmıştır (Röber ve ark. 2005, Prigge ve ark. 2011). Çok sayıda donör ve çevre koşullarının ortalamasına göre RWS hattının haploid indüklenme oranı %6-14 arasındadır. Benzer değerler RWK-76 hattı ve onların melezi olan RWSxRWK-76 için de belirlenmiştir. RWK-76 hattı RWS indirgeyici hattı ile kardeş hattır (Geiger 2009).

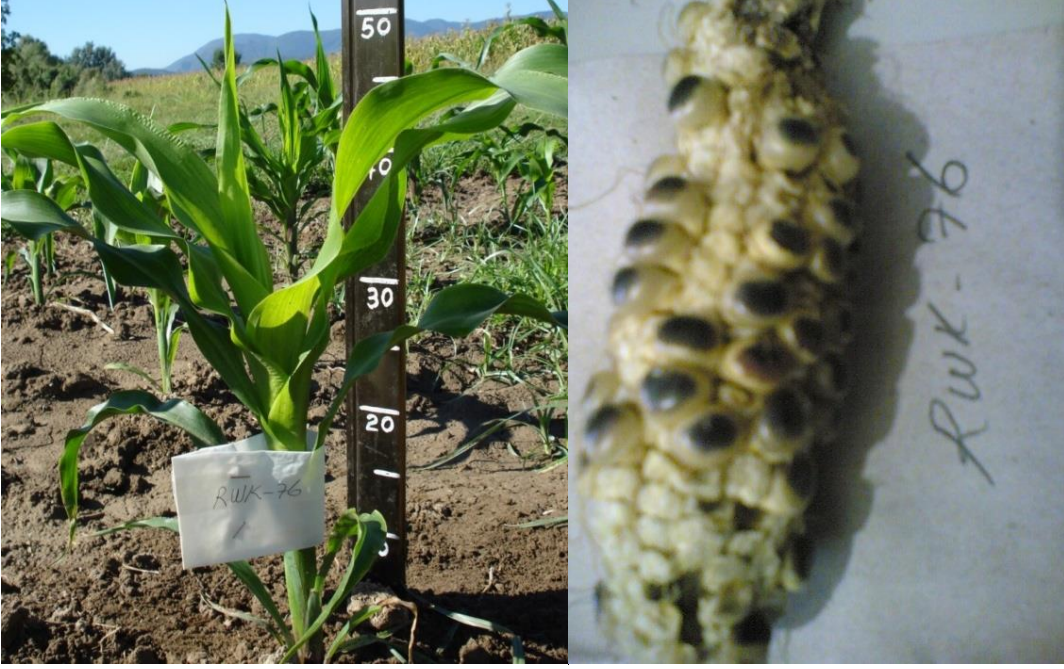




**Şekil 3.2.** RWS indirgeyici hattının bitki ve koçan görünümü (Orj.)

Dünya’da en yaygın kullanılan indirgeyici hatlar olan RWS ve RWK-76’nın özellikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

- RWS ve RWK-76 indirgeyici hatları ile onların melezleri olan RWSxRWK-76 bir polinatör olarak maternal haploidleri elde etmede kullanılır.
- Döllenenmiş embriyolar arasında haploidlerin izlenmesinde RWS ve RWK-76 indirgeyici hatları ile onların melezleri olan RWSxRWK-76’nın sahip olduğu iki markör özellik bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; embriyo ve endospermdeki antosiyanin varlığıdır. İkicisi ise; bitki gövdesindeki antosiyanin renkliliğidir.
- Haploid embriyo elde etme başarısı çevre şartlarına bağlı olarak %6-14 arasındadır.
- Tane tipi sert-atdışi arasında geçiş grubu özelliğindedir.
- RWS ve RWK-76 indirgeyici hatları ile onların melezleri olan RWSxRWK-76 tohum tutma ve tohum gücü açısından çevre şartlarına da bağlı olmakla beraber bazı olumsuz özelliklere sahiptir. Olumsuz çevre şartlarında hatların tane bağlama oranı düşebilir veya döllenmiş taneler çok cılız olabilir.



Şekil 3.3. RWK-76 indirgeyici hattının bitki ve koçan görünümü (Orj.)



Şekil 3.4. RWS x RWK-76 indirgeyici materyalinin bitki ve koçan görünümü (Orj.)



WS14 indirgeyici hattı W23xStock-6 melezinden geliştirilmiştir. Maternal haploidlerin elde edilmesinde baba ebevy olarak kullanıldığında kaynak materyalin genotipine bağı olarak %2-5 arasında haploid indüklenme oranı gösterebilir (Lashermes ve Beckert 1988).

WS14 indirgeyici hattının bitki aksamında antosiyanin renkliliği azdır (Şekil 3.5). Haploid tohumların ayırımı için *R-nj* renk markörü içermektedir. Tane tipi sert ile atdışi arasında geçiş grubu özelliğindedir.



Şekil 3.5. WS14 indirgeyici hattının bitki ve koçan görünümü (Orj.)

### 3.2. Yöntem

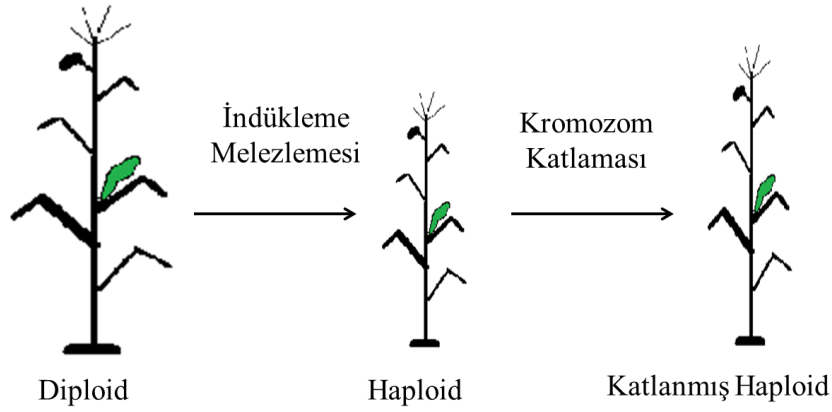
Klasik ıslah yönteminde homozigot kendilenmiş hatların elde edilmesi teorik olarak yedi kendileme generasyonu sürmektedir (Şekil 3.6). Buna rağmen, yine de %100 homozigot hatlar elde edilememektedir. *In vivo* maternal haploid tekniğinde tozlayıcı olarak kullanılan özel

genotipler ile indükleme melezlemesi yapılarak uzun yıllar süren kendileme generasyonlarına gerek kalmaksızın 1-2 yıl içerisinde %100 homozigot hatlar elde edilebilmektedir (Şekil 3.7).



Generasyon	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>
Homozigotluk	%50	%75	%87.5	%93.75	%96.87	%98.45	%99.23
Süre (Ay)	6	12	18	24	30	36	42

Şekil 3.6. Klasik ıslah yöntemiyle kendilenmiş hatların elde edilmesi (Boddupalli ve ark. 2012)



	Diploid	Haploid	Katlanmış Haploid
Kromozom	2n	n	2n
Genotip	AaBbCc	AbC	AAbbCC
Homozigotluk	%50		%100

Şekil 3.7. *In vivo* maternal haploid yöntemi (Boddupalli ve ark. 2012)

### 3.2.1. Kaynak materyal ve indirgeyici genotiplerin yetiştirilmesi

Bu araştırma, Sakarya İli Arifiye ilçesinde yer alan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne (TAGEM) bağlı Mısır Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Kirazca İşletmesi arazisinde 2010, 2011, 2012 ve 2013 yetiştirme yıllarında yürütülmüştür. Araştırmanın yürütüldüğü yer 40° 42' kuzey boylamları ile 30° 22' doğu enlemleri arasında yer almakta olup, denizden yüksekliği 41 metredir.

*In vivo* maternal haploid tekniği için kaynak materyal olarak kullanılan 30 adet tek melezin ve indirgeyici hatların tohumları sayılarak paketlenmiştir. Tohumlar toprakaltı zararlılarına karşı 600 g/l imidacloprid etken maddeli ilaç kullanılarak 600 ml/100 kg doz ile muamele edilmiştir. Melez çeşitlerin her biri 3 sıralı, 70 cm sıra arası ve 20 cm sıra üzeri olacak şekilde 5 m parsel uzunluğundaki sıralara el ekim tabancaları ile 01 Temmuz ve 10 Temmuz 2010 tarihlerinde iki zamanlı olarak ekilmiştir.

Yöntem gereği indirgeyici hatlar polinatör olarak kullanılmıştır. İndirgeyici genotipler 70 cm sıra arası ve 20 cm sıra üzeri olacak şekilde 5 m parsel uzunluğunda ve her biri blok şeklinde çok sayıda bitki olacak şekilde 2 zamanlı olarak ekilmiştir. Ekim işlemi Enstitü'de bulunan ekim tabancaları ile elle yapılmıştır.

Deneme alanları ekim öncesi uygun toprak işleme aletleriyle hazırlandıktan sonra dekara 10 kg saf azot (N) ve 10 kg saf fosfor (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) içeren 20:20:0 kompoze gübreden verilerek karıştırılmıştır. Kaynak materyal olarak kullanılan tek melezler her ocağa çift tohum olacak şekilde ekildiğinden fide döneminde tekleme yapılarak seyreltilmiştir. Bitkiler 25-30 cm olduğunda azotlu üst gübrenin (Amonyum nitrat %33 N formunda) birinci yarısı (6 kg/da N), 40-50 cm olduğunda ise ikinci yarısı (6 kg/da N) verilmiştir.

Yabancı otlar ile kültürel mücadele (el çapası) yapılmıştır. Ekili materyalde vejetasyon süresi boyunca 4 defa damla sulama yapılmıştır.

İndirgeyici hatlar FAO 450 olum grubunda erkenci materyallerdir. İndirgeyici hatların tohumlarının yurtdışından gelmesi için gereken resmi prosedürün tamamlanması uzamıştır. Bu sebeple hatların ekimi gecikmiştir. RWS ve RWK-76 hatlarından 50 adet RWS x RWK-76 melezinden 100 adet tohum gelmiş ve 06 Ağustos 2010 tarihinde ekilmiştir. WS14 indirgeyici hattı diğerlerinden daha geç ulaştığından geç ekilmiştir. Kaynak materyal çiçeklenme döneminde iken WS14 henüz 6 yapraklı döneminde olduğundan 2010 yılında bu indirgeyici hatta kendileme yapılarak tohum çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Otuz tek melez WS14 ile indüklenme melezlemesi yapılmak üzere 05 Mayıs 2011 tarihinde yeniden ekilmiştir. WS14 indirgeyici hattı, kullanılan kaynak materyalden erkenci olduğundan 16 Mayıs 2011 tarihinde ekilmiştir.

### **3.2.2. *In vivo* maternal haploid tekniği ile haploidlerin elde edilmesi**

*In vivo* maternal haploid tekniğinde indirgeyici hat polinatör olarak kullanılmıştır. Kaynak materyal donördür ve ana ebevyn olarak kullanılmıştır.

Kaynak materyal olarak kullanılan tek melez çeşitlerin çiçeklenme dönemi geldiği zaman tüm tepe püskülleri kesilerek uzaklaştırılmıştır. Koçan taslakları henüz püskül çıkarmadan izolasyon kağıtları ile kapatılmıştır. Melez çeşitlerin 3 sıralı parsellerinde her bir sırasındaki koçanlar bir indirgeyici hat ile melezlenmiştir. Melezleme işlemi, Russel ve Eberhart (1975)'e göre yapılmıştır.

Tek melezlerin çiçeklenme dönemi geldiği zaman tüm tepe püskülleri kesilerek uzaklaştırılmıştır. Bunun amacı melezleme esnasında kontaminasyonu önlemektir. Koçan taslakları henüz püskül çıkarmadan izolasyon kağıtları ile kapatılmıştır (Şekil 3.8). Melez çeşitlerin 3 sıralı parsellerinde her bir sırasındaki koçanlar RWS, RWK-76 ve RWSxRWK-76 indirgeyici genotip ile melezlenmiştir. İndirgeyici hatların bitkileri tepe püskülü çıkışından sonra ana ekseninde %50 anterler polen dökmeye başladığında izolasyon kağıtları ile kapatılmıştır (Şekil 3.9). Döllenmeye uygun koçanlara göre tepe kâğıtları toplanarak her bir indirgeyici hattın polenleri ayrı ayrı bir araya getirilerek tek melezlerin belirli sıralarındaki koçanlar döllenmiştir (Şekil 3.10). Tüm kaynak materyalin üç indirgeyici hat ile melezlenmesi bitene kadar işlem

devam etmiştir. Melezleme işleminde polinatör değıştikçe eller alkol ile yıkanarak bulaşma engellenmiştir. Melezleme yapılan koçanlar hasada kadar izolasyon kağıtları içinde muhafaza edilmiştir. İzolasyon kâğıtlarının üzerine polinatör ismi yazılmıştır (Şekil 3.11).

Tez çalışmasının materyali olarak kullanılan 30 adet tek melez 5 m'lik bloklara 2 sıralı olarak 2011 yılında tekrar ekilmiştir. WS14 indirgeyici hattı polinatör olarak kullanılmıştır. Melezleme yukarıda belirtilen yöntemle göre yapılmıştır.



**Şekil 3.8.** Tek melezlerin koçanlarının izolasyon kağıtları ile kapatılması (Orj.)





**Şekil 3.9.** RWS x RWK-76 indirgeyici materyalinde tepe püsküllerinin izolasyonu (Orj.)



**Şekil 3.10.** Melez çeşitlerin indirgeyici hatların polenleriyle dölllenmesi (Orj.)





**Şekil 3.11.** RWS x RWK-76 indirgeyici materyali ile melezlenmiş bir koçanın izolasyon kağıdı ile kapatılması (Orj.)

Hasatta her bir melezin dört indirgeyici genotip ile melezleri ayrı ayrı fileli torbalara alınarak melez numarası ve melez yapıldığı indirgeyici genotip ismi yazılarak, etiketler bağlanmış, tane nemini %14'e düşürmek için kurutma odasında bekletilmiştir. Tane nemi Enstitü'de bulunan Dickey John marka cihaz ile ölçülmüştür. Her bir koçan ayrı ayrı tanelenerek pedigri yazılmış kese kâğıtlarına konulmuştur.



**Şekil 3.12.** *In vivo* maternal haploid yönteminde *RI-nj* renk markörüne göre tohum seleksiyonu (Orj.), MD; melez dışı kabul edilen tohumlar, F<sub>1</sub>; indirgeyici hat ile melez olmuş tohumlar, H; haploid kabul edilen tohumlar, DE; diploid endosperme sahip tohumlar

İndükleme melezlemesi sonrası kaynak materyalden elde edilen tohumlarda *RI-nj* renk markörüne göre seleksiyon yapılmıştır (Şekil 3.12 ve 3.13). Pratikte indükleme melezlemesinden dört farklı tipte tohum elde edilir (Şekil 3.13) (Geiger 2009);

1- Normal diploid veya hibrit tohumlar (F<sub>1</sub>); mor renkte endosperm ve embriyoya sahiptir.

- 2- Haploid kabul edilen tohumlar (H); mor endosperm ve renksiz embriyoya sahiptir.
- 3- Diploid endospermli tohumlar (DE); endospermde renklilik olmayıp, embriyoda renklilik olanlardır.
- 4- Melez dışı olarak kabul edilenler (MD); embriyoda ve endospermde renklilik olmayan tohumlardır.



**Şekil 3.13.** İndükleme melezlemesinden elde edilen farklı kategorilerdeki tohumlar (Orj.)

İndirgeyici genotiplerin haploid indükleme oranı aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir. Haploid indükleme oranı (HİO)= (Haploid tohum sayısı/ Toplam tohum sayısı) x 100 (Geiger 2009).

### 3.2.3. Kromozom katlaması

Haploid kabul edilen tohumlar 23 °C’de karanlık iklim odasında çimlendirilmiştir. Çimlendirme için kurutma kâğıtları kullanılmıştır. Kurutma kâğıtları gramafon şeklinde katlanarak tepsilere yerleştirilmiştir. Haploid tohumlar belli aralıklarla katlanmış kurutma kâğıtlarının arasına dizilmiştir. Çimlenme gerçekleşene kadar kurutma kâğıtları saf su ile ıslatılmıştır. Tohumların konulduğu tepsilerin üstü alüminyum folyo ile kapatılarak iklim odasında 3 gün 23 °C’de karanlıkta bekletilmiştir. Bu tez çalışmasında kromozom katlaması için

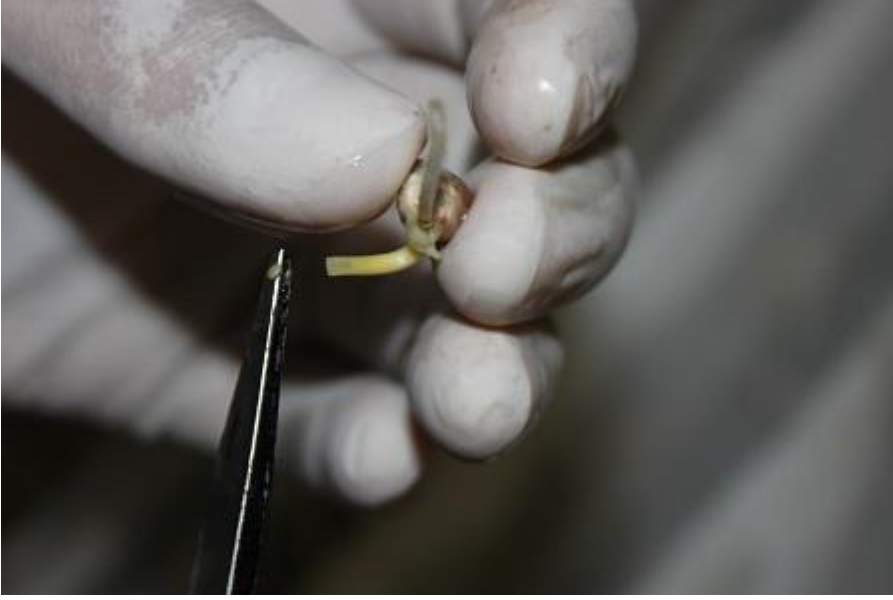
Deimling metodu kullanılacağından yöntemine göre koleoptil uzunluğu 1.5-2 cm olduğunda materyaller iklim odasından alınmıştır (Şekil 3.14).



**Şekil 3.14.** Haploid tohumların iklim odasında çimlendirilmesi (Orj.)

Koleoptil ve köklerde bistüri veya makas yardımıyla kesme işlemi yapılmıştır (Şekil 3.15). Kesilen materyaller etiketleri ile birlikte ayrı ayrı file torbalara konularak colchicine çözeltisi uygulanana kadar su içerisinde bekletilmiştir (Şekil 3.16).





**Şekil 3.15.** Koleoptil ve köklerde makas yardımıyla kesme işlemi (Orj.)



**3.16.** Kromozom katlaması için hazırlanmış materyal (Orj.)

Deimling ve ark. (1997)'e göre bir litre solüsyon için 600 mg toz colchicine, 5 ml DMSO ve 995 ml su gerekmektedir. Colchicine bir miktar su ve DMSO nun tamamı ile beher içerisine

konulmuş ve vorteks üzerinde karıştırılarak çözülmüştür. Çözelti hazırlama işleminin tamamı çeker ocak altında yapılmıştır (Şekil 3.17). Çimlendirilmiş materyalin tamamını kapatacak kadar solüsyon hazırlanmıştır. Colchicine uygulama kazanına materyal yerleştirildikten sonra normal su ile doldurularak gerekli solüsyon miktarı 5 lt olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.17.** Colchicine çözeltisinin hazırlanması (Orj.)

Çimlendirilmiş ve koleoptil uzunluğu 1.5-2 cm olarak kısaltılmış haploid tohumlar uygulama tankına yerleştirilmiştir (Şekil 3.18). Hazırlanmış %0.06 colchicine ve %0.5 DMSO çözeltisi, uygulama kazanına yerleştirilen çimlendirilmiş materyalin üzerine dökülmüştür (Şekil 3.19). Uygulama kazanının üzeri örtülerek 12 saat 20 °C sıcaklıkta iklim odasında bekletilmiştir.



**Şekil 3.18.** Çımlendirilmiş materyallerin uygulama tankına yerleştirilmesi (Orj.)



**Şekik 3.19.** Colchicine ve DMSO çözeltisinin uygulanması (Orj.)

Uygulama kazanından 12 saat sonra çözelti boşaltılmıştır (Şekil 3.20). Daha sonra 20 dakika su ile yıkanmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.20. Uygulama sonrası colchicine ve DMSO çözeltisinin boşaltılması (Orj.)



Şekil 3.21. Colchicine ve DMSO çözeltisi boşaltıldıktan sonra materyalin yıkanması (Orj.)



Plastik poşetlere steril torf doldurularak kasalara yerleştirilmiştir. Kromozom katlaması gerçekleştirilen materyaller elde edildikleri kaynak materyale göre plastik poşetlere dikilmiştir (Şekil 3.22). Dikim yapılırken koleoptilin kırılmamasına özen gösterilmiştir. Bitki materyalleri iklim odasında 25 °C ve ilk günler % 80 nemde büyütülmüştür. İklim odasında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık uygulaması yapılmıştır. İhtiyaç olduğu dönemlerde sulama yapılmıştır. Sulama suyuna kompoze gübreden ilave edilmiştir. Kompoze gübre %13 azot, %40 fosfor, %13 potasyum ile mikro elementlerden bor, bakır, demir, mangan, molibden ve çinko içermektedir. Fideler 3-4 yapraklı olana dek iklim odasında büyütülmüştür (Şekil 3.23 ve 3.24). Birkaç hafta sonra bitkiler tarlaya dikilmiştir.



**Şekil 3.22.** Bitki materyallerinin plastik poşetlere dikilmesi (Orj.)



Şekil 3.23. Bitki materyallerinin iklim odasında bekletilmesi (Orj.)



Şekil 3.24. Bitki materyallerinin iklim odasında büyütülmesi (Orj.)

#### **3.2.4. Katlanmış haploid bitkilerin yetiştirilmesi ve hasadı**

Fidelerin dikileceği tarla 2012 yılında uygun toprak işleme aletleriyle işlenmiş ve yabancı otlara karşı ilaçlanmıştır. Dikim öncesi 10 kg/da saf azot ve 10 kg/da saf fosfor içeren 20:20:0 kompoze gübre toprağa karıştırılmıştır. Dikim yapılmadan önce sırtlar oluşturulmuş ve fide

çukurları metal aparatlar kullanılarak açılmıştır (Şekil 3.25). Dikime hazır mısır fideleri poşetlerinden uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.26). Fideler 06.06.2012 tarihinde dikilmiştir (Şekil 3.27).



Şekil 3.25. Fide çukurlarının açılması (Orj.)



Şekil 3.26. Dikime hazır katlanmış haploid mısır fidesi (Orj.)





**Şekil 3.27.** Katlanmış haploid mısır fidelerinin dikilmesi (Orj.)

Fideler dikildikten sonra 350 gr/lt imidacloprid etken maddeli insektisitten 30 ml/da doz kullanılarak tarla yüzey ilaçlaması yapılmıştır. Damla sulama boruları her sıraya çekilmiş ve sulama yapılmıştır. Fideler 30 cm olduğunda üst gübre olarak 12 kg saf azot (Amonyum nitrat %33 N formunda) uygulaması yapılmıştır. Yabancı otlar ile mücadele el çapası yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Katlanmış haploid bitkilerde koçan taslağı çıkışı takip edilmiştir. Koçan püskülü çıkış öncesi şeffaf ve ışık geçiren izolasyon kağıtları ile koçan taslakları kapatılmıştır (Şekil 3.28). Tarlada her bir bitki bir mısır hattını temsil etmektedir. Her bitkinin tepe püskülü ana ekseninde %50 anterleri polen döktüğü zaman izolasyon kağıdı ile kapatılmıştır. Koçan püskülü 3-5 cm uzunluğa geldiğinde tepe püskülüne takılı izolasyon torbası alınarak polen kontrolü gözle yapılmış ve aynı bitkideki koçanın üzerindeki izolasyon kağıdı hızla çekilerek üzerine kapatılmıştır. Kendileme yapılırken polen verme dönemi takip edilmiş, tepe püskülü polen vermeye tekrar başladığında kâğıt torba aynı tepe püskülüne takılıp polen alınarak aynı bitkideki koçana tekrar verilmiştir. Kendileme işlemi Russel ve Eberhart (1975)'e göre yapılmıştır.



**Şekil 3.28.** KH<sub>0</sub> bitkilerinin tarladaki görüntüleri (Orj.)

Kendileme işlemini yapan kişiler bir bitkiden diğer bitkiye geçtiklerinde ellerini alkolle yıkamıştır. Koçan üzerindeki izolasyon kağıdı hasada kadar bırakılmış ve yıprananlar değiştirilmiştir. Kendileme yapılan bitkilerin bazılarında iki koçan mevcut olup fazla tohum alabilmek için her iki koçanda da kendileme işlemi yapılmıştır. Dört bitki haricinde ikinci koçanlardan tohum alınamamıştır.

Tanede fizyolojik olum evresi (R6) takip edilmiştir. Her tanenin sömeğe bağlı olduğu dip kısmında yer alan doku tabakası besin maddelerinin taneye geçişinde rol alır. Tane fizyolojik oluma ulaştığında bu doku tabakası görevini tamamlar ve rengi siyaha döner. Bu siyah nokta tanenin fizyolojik olgunluğa ulaştığının belirtisidir. Fizyolojik olum tamamlandığında koçanlar hasat edilmiştir. Hasatta her bir katlanmış haploid bitkinin üzerindeki koçanlar ayrı ayrı file torbalara alınmış ve etiketleri yazılmıştır. Kurutma odasında tane nemi % 14 olana kadar bekletilmiştir. Kurutulan koçanların her biri ayrı tanelenerek kese kağıtlarına konulmuş ve hat kodu (KH-1, KH-2,...) verilmiştir. Tohum miktarları belirlenmiştir.

Katlanmış haploid hatlar 2013 yılında ekilerek tohum çoğaltımı yapılmıştır. Tohum çoğaltımı kendileme yapılarak gerçekleştirilmiştir. Genel bakım işleri (tekleme, çapalama, gübreleme, sulama v.b.) 3.2.1’de anlatılan uygulamalar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Gözlemler, UPOV tarafından belirtilen (EK 1) gelişme dönemlerinde her bitkide gözlemlenerek formlara yazılmıştır. Katlanmış haploid hatların UPOV (Uluslararası Yeni Bitki Çeşitlerinin Korunması

Birliği- The International Union for the Protection of New Varieties of Plants) özellik belgesindeki 34 karaktere göre tanımlanması yapılmıştır. Katlanmış haploid hatların UPOV özellik belgeleri EK 1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Katlanmış haploid hatlarda alınan gözlemler ve değerlendirme karakterleri

No	Özellik	Gözlemlenen Dönem	Değerler	
1	İlk yaprak kımında antosiyanin renkliliği	Bitki iki yapraklı iken	Yok veya çok az Az Orta Koyu Çok koyu	1 3 5 7 9
2	İlk yaprak ucu şekli	Bitki dört yapraklı iken	Sivri Sivri-yuvarlak Yuvarlak Yuvarlak-kaşksı Kaşksı	1 3 5 7 9
3	Gövde ile yaprak arasındaki açı	Anterlerin oluşmaya başlama zamanı	Çok dar Dar Orta Geniş Çok geniş	<5° 5°-50° 50°-75° 75°-90° >90°
4	Yaprak ayası duruşu	Anterlerin oluşmaya başlama zamanı	Düz Hafifçe aşağı doğru Aşağı doğru Kuvvetlice aşağı doğru Çok kuvvetli aşağı doğru	1 3 5 7 9
5	Gövdedeki boğumdan boğuma zigzag derecesi	Anterlerin %50’si oluştuğunda	Yok veya çok az Hafif Kuvvetli	1 2 3
6	Destek köklerde antosiyanin renkliliği	Anterlerin %50’si oluştuğunda	Yok veya çok az Az Orta Kuvvetli Çok kuvvetli	1 3 5 7 9
7	Tepe püskülü çıkış zamanı	Anterlerin %50’si oluştuğunda	Çok erken Çok erken-erken Erken Erken-orta Orta Orta-geç Geç Geç-çok geç Çok geç	<45 45-50 51-55 56-60 61-65 66-70 71-75 76-80 >80
8	Tepe püskülü kavuzu tabanındaki antosiyanin renkliliği	Anterlerin %50’si oluştuğunda	Yok veya çok az Az Orta Kuvvetli Çok kuvvetli	1 3 5 7 9
9	Tepe püskülü kavuzlarında antosiyanin renkliliği	Anterlerin %50’si oluştuğunda	Yok veya çok az Az Orta	1 3 5

			Kuvvetli		7
			Çok kuvvetli		9
10	Anterlerde antosiyanin renkliliği	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Yok veya çok az		1
			Az		3
			Orta		5
			Kuvvetli		7
			Çok kuvvetli		9
11	Başakçık yoğunluğu	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Seyrek		3
			Orta		5
			Yoğun		7
12	Ana eksen ile yan dallar arasındaki açı	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Çok dar	<5°	1
			Dar	5°-50°	3
			Orta	50°-75°	5
			Geniş	75°-90°	7
			Çok geniş	>90°	9
13	Yan dalların duruşu	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Düz		1
			Hafif aşağı doğru		3
			Aşağı doğru		5
			Kuvvetlice aşağı doğru		7
			Çok kuvvetli aşağı doğru		9
14	İlk yan dal sayısı	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Yok veya çok az	0-3	1
			Az	4-10	3
			Orta	11-15	5
			Fazla	16-20	7
			Çok fazla	>20	9
15	Püskül çıkış zamanı	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Çok erken	<45	1
			Çok erken-erken	45-52	2
			Erken	53-57	3
			Erken-orta	58-62	4
			Orta	63-67	5
			Orta-geç	68-72	6
			Geç	73-77	7
			Geç-çok geç	78-82	8
			Çok geç	>83	9
16	Püskül antosiyanin renkliliği	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Yok		1
			Var		9
17	Püskülde antosiyanin yoğunluğu	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Çok zayıf		1
			Zayıf		3
			Orta		5
			Kuvvetli		7
			Çok kuvvetli		9
18	Yaprak kınındaki antosiyanin renkliliği	Koçanda taneler sulu iken	Yok veya çok zayıf		1
			Zayıf		3
			Orta		5
			Kuvvetli		7
			Çok kuvvetli		9
19	Tepe püskülü: En alt yan daldan itibaren eksen uzunluğu	Koçanda taneler sulu iken	Çok kısa	<30 cm	1
			Kısa	30-35 cm	3
			Orta	36-40 cm	5
			Uzun	41-45 cm	7
			Çok uzun	>45 cm	9
20	Tepe püskülü: En üst yan daldan itibaren eksen uzunluğu	Koçanda taneler sulu iken	Çok kısa	<20 cm	1
			Kısa	20-25 cm	3
			Orta	26-30 cm	5
			Uzun	31-35 cm	7

			Çok uzun	>35 cm	9
21	Tepe püskülü: Yan dalların uzunluğu	Koçanda taneler sulu iken	Çok kısa Kısa Orta Uzun Çok uzun	<15 cm 15-20 cm 21-25 cm 26-30 cm >30 cm	1 3 5 7 9
22	Bitki boyu (tepe püskülü dahil)	Süt olumu	Çok kısa Kısa Orta Uzun Çok uzun	<120 cm 120-160 cm 160-200 cm 200-240 cm >240 cm	1 3 5 7 9
23	Üst koçanın bitkiye bağlandığı yerin bitkinin toplam yüksekliğine oranı	Süt olumu	Çok küçük Küçük Orta Büyük Çok büyük	<0.30 0.31-0.40 0.41-0.50 0.51-0.60 >0.60	1 3 5 7 9
24	Yaprak ayası genişliği (üst koçan yaprağı)	Süt olumu	Çok dar Dar Orta Geniş Çok geniş	<5 cm 6-8 cm 9-11 cm 12-14 cm >14 cm	1 3 5 7 9
25	Koçan sapı uzunluğu	Tane yumuşak hamurumsu iken	Çok kısa Kısa Orta Uzun Çok uzun	<3 cm 4-6 cm 7-9 cm 10-12 cm >12 cm	1 3 5 7 9
26	Koçan uzunluğu (koçan kavuzu hariç)	Tanelerin tam olumu (taneler tırnakla çizilemez)	Çok kısa Kısa Orta Uzun Çok uzun	<15 cm 16-19 cm 20-23 cm 24-27 cm >27 cm	1 3 5 7 9
27	Koçan çapı (orta kısımda)	Tanelerin tam olumu (taneler tırnakla çizilemez)	Çok küçük Küçük Orta Büyük Çok büyük	<4 cm 4.1-5 cm 5.1-6 cm 6.1-7 cm >7 cm	1 3 5 7 9
28	Koçan şekli	Tanelerin tam olumu (taneler tırnakla çizilemez)	Konik Konik-silindirik Silindirik		1 2 3
29	Koçandaki sıra sayısı	Tanelerin tam olumu (taneler tırnakla çizilemez)	Çok az Az Orta Fazla Çok fazla	<10 10-12 13-14 15-16 >16	1 3 5 7 9
30	Tane tipi (koçan ortası 1/3'lük kısımda)	Tanelerin tam olumu (taneler tırnakla çizilemez)	Sert Sert gibi Orta At dişi gibi At dişi Tatlı Cin mısır		1 2 3 4 5 6 7
31	Tane ucu rengi	Tanelerin tam olumu (taneler tırnakla çizilemez)	Beyaz Sarımsı beyaz Sarı Sarı-portakal		1 2 3 4



			Portakal	5
			Kırmızı-portakal	6
			Kırmızı	7
			Koyu kırmızı	8
			Mavi siyah	9
32	Tane sırt rengi	Tanelerin tam olumu (taneler tırnakla çizilemez)	Beyaz	1
			Sarımsı beyaz	2
			Sarı	3
			Sarı-portakal	4
			Portakal	5
			Kırmızı-portakal	6
			Kırmızı	7
			Koyu kırmızı	8
			Mavi siyah	9
33	Koçan kavuzlarında antosiyenin renkliliği	Taneler seyrek ve gevşek iken	Yok	1
			Var	9
34	Koçan kavuzlarında antosiyenin yoğunluğu	Taneler seyrek ve gevşek iken	Çok zayıf	1
			Zayıf	3
			Orta	5
			Kuvvetli	7
			Çok kuvvetli	9

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. İndükleme Melezlemesi

*In vivo* maternal haploid tekniğinde indükleme melezlemesinde tek melezler, melezlerin F<sub>2</sub> leri, bir veya iki yıl kendilenmiş materyaller ve popülasyon aileleri kaynak materyal olarak kullanılabilir. İndükleme melezlemesinde polinatör olan indirgeyici genotipin kromozomları haploid tohumda bulunmaz ve sadece kaynak materyal olarak kullanılan genotipin n kromozomunu taşır. Bu sebeple kullanılan kaynak materyaller donör olarak nitelendirilir. Bu çalışmada 30 adet tek melez donör olarak kullanılmıştır.

RWS ve RWK-76 indirgeyici hatlarının polen verme yetenekleri azdır. Bu sebeple indükleme melezlemesinde tane tutma oranı düşük olmuştur (Şekil 4.2 ve 4.3). İki indirgeyici hattın melezi olan RWS x RWK-76 materyalinin polen verme kabiliyeti daha iyi olmuştur (Şekil 4.1). İslahçı kuruluş da indükleme melezlemesinde RWS x RWK-76 materyalinin kullanılmasını tavsiye etmiştir.

Hasatta her bir donörün RWS, RWK-76 ve RWS x RWK-76 indirgeyici genotip ile melezleri 2010 yılında, WS-14 indirgeyici hattı ile yapılan melezleri ise 2011 yılında ayrı ayrı fileli torbalara alınarak melez numarası ve melez yapıldığı indirgeyici genotip ismi yazılarak, etiketler bağlanmış, tane nemi %14'e düşürülmek için kurutma odasında bekletilmiştir.

Her bir koçan ayrı ayrı tanelenerek pedigrisi yazılmış kese kâğıtlarına konulmuştur. Hasatta yapılan gözlemlere göre 1 numaralı RWS ve 2 numaralı RWK-76 indirgeyici hatları ile onların melezleri olan 3 numaralı RWS x RWK-76 indirgeyici materyali ile yapılan melezlemelerde, en fazla tane tutumu 3 numaralı materyal ile yapılan melezlerde olmuştur (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Bir tek melezin farklı 3 indirgeyici materyal ile yapılmış melezleri (Orj.)



**Şekil 4.2.** RWK-76 indirgeyici hattı ile indüklenme melezlemesi yapılmış koçan (Orj.)



**Şekil 4.3.** RWS indirgeyici hattı ile indüklenme melezlemesi yapılmış koçan (Orj.)

WS14 indirgeyici hattında 2010 yılında tohum çoğaltıldığı için 2011 yılında yapılan indüklenme melezlemesinde tozlayıcı bitki sayısı fazla olmuştur. WS14 indirgeyici hattının polen verme kapasitesi az olmasına rağmen, bitki sayısının fazla olması indüklenme melezlemesinde tane tutma oranını artırmıştır (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** WS14 indirgeyici hattı ile indüklenme melezlemesi yapılmış koçan (Orj.)

## 4.2. Haploid Kabul Edilen Tohumların Seçimi ve Haploid İndükleme Oranı (HİO)

*In vivo* maternal haploid tekniğinde indüklenme melezlemesi ile haploid ve dihaploid olanların tanede belirlenmesini sağlayan indirgeyici hattın genetik işaretleridir. *In vivo* haploid bitki üretiminde polinatör bitki endosperm ve embriyosunda (antosiyanın) işaretleyici renk içermektedir. Çalışmada kullanılan indirgeyici genotipler *RI-nj* alleli taşımaktadır (Şekil 4.5).

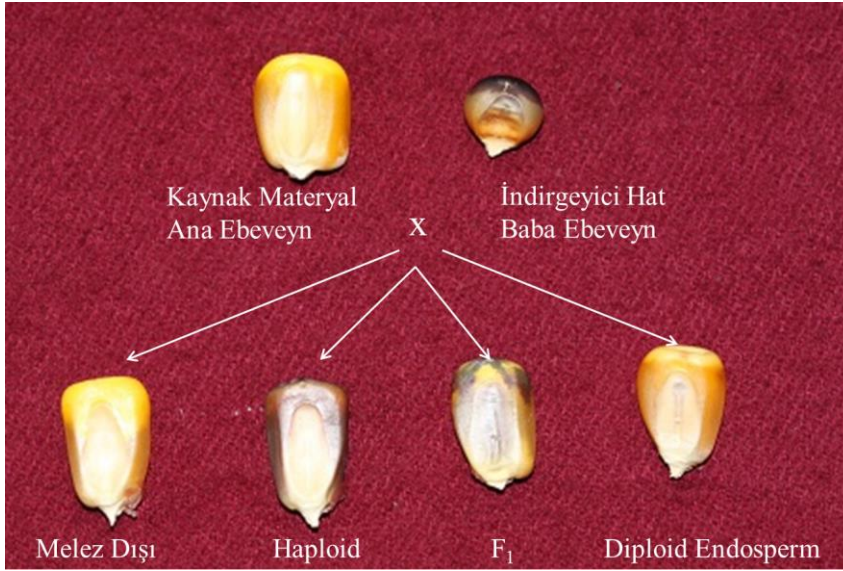


**Şekil 4.5.** İndirgeyici genotiplerin *RI-nj* renk markörü ifadeleri, a; RWS x RWK-76, b; RWK-76, c; RWS, d; WS14 (Orj.)

*In vivo* maternal haploid tekniği gereği indüklenme melezlemesi yapılmış materyaller hasat sonrası tane nemi %14'e düştüğünde ayrı ayrı tanelenmiştir. Haploid taneler seçilmeden önce toplam tohum sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

İndüklenme melezlemesinden elde edilen tohumlar yöntemde verilen kriterlere göre ayrılmıştır (Şekil 4.6).





**Şekil 4.6.** *R1-nj* renk markörüne göre haploid kabul edilen tohumların seleksiyonu (Orj.)

Her bir indirgeyici genotipin indüklemeye melezlemesinden elde edilen tohumlarda dört kategoriye göre ayırım yapılmıştır. Yöntemde verilen formüle göre haploid indirgeme oranı belirlenmiştir.

Yöntemde belirtilen kriterlere göre ayrılan materyalin içinden sadece embriyoda renklilik olmayıp endospermde renklilik olanlar haploid olarak kabul edilmiştir. Buna göre yapılan seleksiyonda haploid, diploid endosperm, F<sub>1</sub> ve melez dışı tohum sayıları toplamı Çizelge 4.1’de, oranları ise Çizelge 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** İndüklemeye melezlemesinden elde edilen tohumlarda haploid ve diğer kategorilere ait tohum sayıları

İndirgeyici genotipler	Tohum (adet)				
	Haploid	Diploid endosperm	F <sub>1</sub>	Melez dışı	Toplam
RWS x RWK-76	922	19	3215	571	4727
RWS	410	11	1256	392	2069
RWK-76	473	15	1403	425	2316
WS14	1207	25	3681	1886	6799
Toplam	3012	70	9555	3274	15911

**Çizelge 4.2.** İndükleme melezlemesinden elde edilen tohumlarda haploid indükleme oranı (HİO) ve diğer kategorilere ait oranlar

İndirgeyici genotipler	HİO (%)	Diploid Endosperm (%)	F <sub>1</sub> (%)	Melez Dışı (%)
RWS x RWK-76	19.50	0.40	68.01	12.08
RWS	19.82	0.53	60.71	18.95
RWK-76	20.42	0.65	60.58	18.35
WS14	17.75	0.37	54.14	27.74
Ortalama HİO	18.93			

İndükleme melezlemesi sonucu donörlerden elde edilen tohumlar indirgeyici genotipler esas alındığında küçükten büyüğe doğru RWS<RWK-76<RWS x RWK-76<WS-14 olarak sıralanmıştır (Çizelge 4.1). WS-14 indirgeyici hattı ile yapılan indükleme melezlemesinden daha fazla tohum elde edilmesi, hattın indükleme melezlemesinde kullanılan bitki sayısının dolayısıyla polen miktarının fazla olması ile ilişkilendirilmiştir.

İndirgeyici genotiplerin haploid indükleme oranları değişiklik göstermiştir. En yüksek haploid indükleme oranı RWK-76 indirgeyici hattında belirlenmiştir. İndükleme melezlemesinden diploid endospermlı tanelerin elde edilme oranları oldukça düşüktür. Tohumların çoğunluğu (%54.14-68.01) indirgeyici genotip ile melez olanlar (F<sub>1</sub>) kategorisine girmiştir (Çizelge 4.2). Bu çalışmada belirlenen haploid indükleme oranları literatürlerde verilen değerlerden daha yüksektir. Sakarya lokasyonunun mısır bitkisi için optimum koşullara sahip olması HİO'nun artmasına sebep olabilir.

Nitekim Röber ve ark. (2005) kötü çevrelerin indükleme oranına etkisini belirlemek için, KEMS ve RWS hatlarını kullanarak bir yakacıksız (liguleless), resesif mutant işaretli donör genotiple melezleme yapmışlar ve en kötü çevrede indükleme oranını ortalama %2, en iyi çevrede %16.4 olarak belirlemişlerdir. Geiger (2009) biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin minimum olduğu optimum büyüme koşullarında indükleme başarısının yükseleceğini bildirmiştir.

*RI-nj* markör sistemi haploidlerin ayırımında etkili bir yol olmasına rağmen, *RI-nj* allelinin ifadesi ana ebeveynin (kaynak materyal) genetik yapısından oldukça etkilenmiştir. Navajo taç renkliliği küçük bir nokta (püskülün taneye bağlandığı noktada) şeklindeki renklilikten başlayarak, tüm endospermi kapsayan renkliliğe kadar çeşitlilik göstermiştir. Ayrıca, endosperm ve embriyodaki rengin koyuluğu da çok açıktan koyuya ve daha derine doğru değişiklik göstermiştir (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** *RI-nj* renk markörünün endosperm ve embriyoda çıkış yoğunluğu (Orj.)

*RI-nj* geninin ortaya çıkışındaki varyasyon farklı sonuçlara yol açmıştır. Bütün endosperm ve embriyo dokuları renkli olduğunda haploidlerin ayırımı kolay olmuştur. Embriyo ve endospermin taçında renkliliğin iyi olması haploidlerin seçimini kolaylaştırmıştır. Endospermin taçında sadece bir mor nokta ve embriyoda rengin hafif ortaya çıkması ile haploid ayırımı mümkün olmuştur. Fakat, haploid ayırımındaki zorluk yüzünden yanlış seçim yapma oranı yükselmiştir. Hem endospermin hem de embriyonun tamamıyla renksiz olduğu tohumlar ise melez dışı olarak kabul edilmiştir. Endospermin tamamı renksiz fakat, embriyo dokusu bir derece renkli olduğu durumda ise renkli embriyoya sahip tüm tohumlar diploid olarak varsayılmıştır.



Prigge ve ark. (2012) indirgeyici genotip ile indüklenme melezlemesinde normal çift döllemenin gerçekleşmemesinin embriyosuz ve endospermsiz tane oluşturduğunu belirtmişlerdir. İki sperm çekirdeğinden bir tanesinin yumurta hücreğini dölleyen diğersinin merkez hücreyi dölleyemediğini, endospermin 2n olarak kaldığını ve endospermin oluşmadığını, yumurta hücreğinin döllememesi durumunda da bazı embriyoların gelişmediğini ifade etmişlerdir. Literatürle benzer olarak haploid indüklenme sonucu elde edilen tohumlarda embriyosuz ve endospermsiz tane oluşumu da gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Bazı koçanlarda düşük oranda da olsa endospermin çok iyi gelişmediği zayıf taneler oluşmuştur. Aynı şekilde bazı döllememiş embriyolar da gelişimini tamamlayamadığından embriyosuz taneler oluşmuştur. Bu tanelerin çimlenme yeteneği olmadığı için toplam tohum sayısına eklenmemiştir. İndüklenme melezlemesinden elde edilen tohumlarda endospermsiz ve embriyosuz taneler ayrıldıktan sonra haploid, F<sub>1</sub>, diploid endosperm ve melez dışı kategorileri belirlenmiştir.



**Şekil 4.8.** İndüklenme melezlemesinden elde edilen diğerkategoriler, a; endospermsiz taneler, b; embriyosuz taneler (Orj.)

Chaikam ve Boddupalli ( 2012) *RI-nj* renk markörüne göre haploid tohumların ayırımında da bazı kısıtlamaların olduğunu belirtmişlerdir. Kaynak materyal dominant antosiyanin inhibitör genleri taşıyorsa, örneğin *CI-1* ki bu gen sert mısırlarda yaygındır (Röber ve ark. 2005), *RI-nj* renk markörünün ifadesinin tamamıyla bastırıldığını ve haploid tohumların ayırımının neredeyse imkânsız olduğunu ifade etmişlerdir. Kaynak popülasyon olarak indüklenme melezlemesinde kullanılan F<sub>1</sub> veya F<sub>2</sub> lerde eğer, bu genotiplerin ebeveynlerinden bir tanesi inhibitör gen taşıyor

ise, tohumlarda Navajo fenotipi için ayrılma, açılma olacağını belirtmişlerdir. Bu durumda tüm haploid tohumların etkin bir şekilde ayrımı ve seçiminin gerçekleşmeyeceğini, haploidlerin %30-40'ı veya yarısının kaybedileceğini ifade etmişlerdir.

Tez çalışmasında kullanılan 30 tek melez donör atdışı ve geçiş tane tiplerine sahip olduğundan tamamında indükleme melezlemesi sonrası *R1-nj* renk markörü gözlemlenmiştir.

### 4.3. Çimlendirme ve Kromozom Katlaması

Haploid kabul edilen tohumlar çimlendirme öncesi herhangi bir fungusit ile ilaçlanmamıştır. Haploid kabul edilen 3012 adet tohum yöntem gereği 23 °C'de karanlık iklim odasında çimlendirilmiştir. Tohumlar çimlenme gerçekleşene kadar iklim odasında 3 gün karanlıkta bekletilmiştir.

Tohumların 2673 adedi 3 günlük çimlendirme süresi sonunda 1.5-2 cm koleoptil büyütülmüştür. Fakat, bazı tohumlar çimlenme göstermemiştir. Çimlenmeyen tohum oranı %11.25 olarak gerçekleşmiştir.

*In vivo* maternal haploid tekniğinde spontan kromozom katlanması düşük oranda meydana gelir ve bazı haploid bitkilerin fertil olması ile sonuçlanır. Spontan katlanmış haploidlerin elde edilme oranı kaynak materyalin genotipine bağlıdır. Kromozom katlanmasının yüksek oranda ve istikrarlı olmasını başarmak için haploid bitkilere mitotik inhibitör denilen kimyasallar uygulanmalıdır. Mitotik inhibitör kimyasallar mayoz bölünmeyi engeller (Chaikam ve Mahuku 2012).

Kromozom katlanmasında azot protoksit, kafein, kloral hidrat, asenaften, sulfinilamid, etil merkuriklorid, heksaklorosikloheksan ya da colchicine gibi antimitotik özellik gösteren kimyasallardan yararlanılmaktadır. Yine bu amaçla 2,4 D ve NAA gibi hormonlar (Changdeng ve ark. 1998) ve trifluralin ve orizalin etken maddeli bazı herbisitler de (Bouvier ve ark. 1994, Hansen ve Andersen 1998) kullanılabilir. Günümüzde kromozom katlaması için bitki ıslahçıları tarafından en yaygın kullanılan kimyasal madde; colchicine dir. Bu madde *Liliaceae*

familyasına ait *Colchicum autumnale* L. (güz çiğdemi) bitkisinin köklerinden elde edilen, alkaloid yapısında kuvvetli bir zehir olup; alkol, kloroform ve soğuk suda eriyen, buna karşılık sıcak suda ve eterde erimeyen bir maddedir. Kimyasal formülü  $C_{22}H_{25}O_6$  olarak gösterilen 'colchicine', değişik kaynaklarda 'kolkisin', 'kolşisin' veya 'kolçisin' olarak da ifade edilebilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark. 2001).

Bu çalışmada kromozom katlaması işlemi Deimling ve ark. (1997) yöntemine göre colchicine kullanılarak yapılmıştır. Ancak, colchicine memeliler için çok zehirli ve çevreye olumsuz etkileri olan bir kimyasaldır. Bu yüzden, mısır bitkisinde kromozom katlamasını sağlayabilecek colchicine yerine kullanılacak kimyasal bileşimler veya fiziksel metotlar alternatif olarak araştırılmıştır. Amiprofos methyl, oryzalin ve pronomide herbisitlerinin mısırdaki kromozom katlamasında etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu bileşimlerin toksisitesi colchicine den daha düşük ve çimlendirilmiş materyalin uygulama sonrası iyileşmesi ve büyümesi daha iyi olmuştur. Dolayısıyla bu kimyasal bileşim colchicine e kıyasla azaltılmış konsantrasyonlarda uygulandığında sonuç vermiştir (Chaikam ve Mahuku 2012).

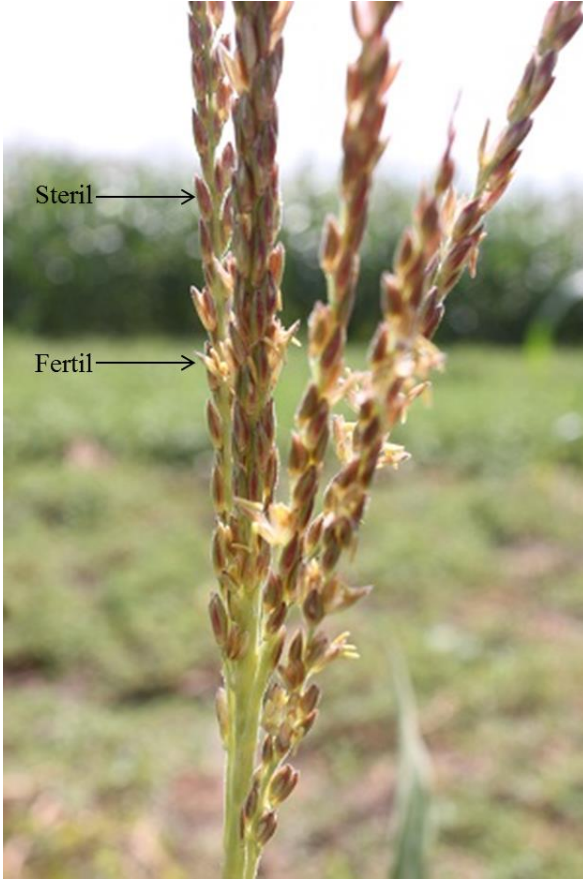
#### **4.4. Katlanmış Haploid Bitkilerde Gözlemler**

Katlanmış haploid bitkiler yöntemde belirtilen uygun bakım şartları gerçekleştirilerek büyütülmüştür. Tarlaya dikilen fidelerden canlı kalan 1939 adet bitkide çiçeklenme dönemi takip edilmiştir. Kendileme işlemi Russel ve Eberhart (1975)'e göre yapılmıştır. Tüm fertil bitkilerde kendileme işlemi gerçekleştirilmiştir. Tarlada her bir bitki bir mısır hattını temsil etmektedir.

Deimling yöntemine göre yapılan çalışmada %72.5 canlı bitki, canlı bitkilerin %50'si fertil bitki, fertil bitkilerin %39'u kendileme yapılabilecek bitki ve kendileme yapılan bitkilerden %27.3'ü kendileme yapılarak tohum alınan bitki şeklinde ifade edilmiştir (Deimling ve ark. 1997).

Deimling yönteminde de belirtildiği gibi kromozom katlaması yapılırken, fide oluşturmada ve tarlada bitki ölümleri beklenen bir durumdur. Tarlaya dikilen  $KH_0$  bitkileri

içerisinden bitkilerin gümrah ve tam gelişmelerine göre diploid bitki ve tohum seleksiyonundan kaynaklanabilecek yanlış bitkiler ile colchicine uygulamasından doğan farklı ploidi durumlarına göre bitkiler seçilmiştir. KH<sub>0</sub> bitkiler generatif organlarını oluşturmuştur. Fakat, bazı bitkilerde tepe püskülleri tamamen steril olmuştur. Bazı bitkilerdeki tepe püsküllerinde ise polen dökümü çok zayıf gerçekleşmiştir. Aynı zamanda koçanlar da küçük olmuştur. Pekçok bitkide ise dişi ve erkek çiçek senkronize bir şekilde oluşmamıştır. Bazı bitkilerde dişi çiçek açmış ve erkek çiçek 10-15 gün sonra açmıştır. Bazılarında ise durum tam tersi gelişmiş ve erkek çiçek açıp polen dökümü bittikten sonra dişi çiçek açmış bu sebeple kendileme gerçekleştirilememiştir. Fertil bitkilerin bir kısmında ise tepe püsküllerinde hem fertil hem de steril başakçıklar gözlemlenmiştir (Şekil 4.9). Tarlaya dikilen ve canlı kalan 1939 bitkiden 1105 adedinde fertil veya kısmen fertil tepe püskülleri gözlemlenmiştir. Bu bitkilerin %31.23'ünde (345 bitki) kendileme yapılabilmıştır.



**Şekil 4.9.** Tepe püskülünde fertil ve steril başakçıklar (Orj.)

#### 4.5. Hasat ve Gözlemler

Kendileme yapılan bitkilerde yönteme göre tanede fizyolojik olum takip edilmiştir. Hasat 07.11.2012 tarihinde yapılmıştır. Kendileme yapılan 345 bitkiden %7,8'inde (27 adet) tohum tutumu gerçekleşmiştir. KH hatların ilk generasyonundan elde edilen tohum sayıları izelge 4.3'te verilmiştir.

KH hatların ilk generasyonundan elde edilen tohum sayıları 1-33 adet arasında değişmiştir. KH hat kodu verilen materyallerden KH-27'de en fazla tohum miktarı belirlenmiştir (izelge 4.3).

**izelge 4.3.** KH hatların ilk generasyonundan elde edilen tohum sayıları

KH Hat Kodu	Tohum Sayısı	KH Hat Kodu	Tohum Sayısı
KH-1	24	KH-15	3
KH-2	2	KH-16	9
KH-3	9	KH-17	19
KH-4	11	KH-18	11
KH-5	8	KH-19	17
KH-6	15	KH-20	26
KH-7	7	KH-21	6
KH-8	10	KH-22	22
KH-9	8	KH-23	10
KH-10	3	KH-24	7
KH-11	12	KH-25	4
KH-12	22	KH-26	16
KH-13	1	KH-27	33
KH-14	28		

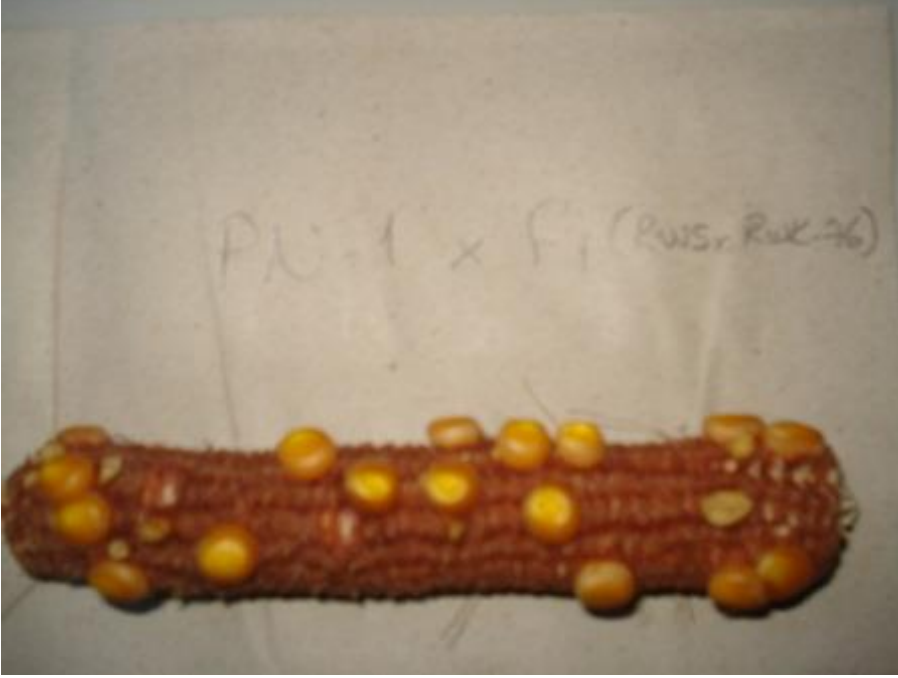
KH<sub>0</sub> bitkilerinden elde edilen tohumlar bitkilerin polen verme yeteneklerinden dolayı az olmuştur (şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14).



**Şekil 4.10.** ADA 6.17 donöründen gelen  $KH_0$  bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan (Orj.)



**Şekil 4.11.** ADA 8.18 donöründen gelen  $KH_0$  bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan (Orj.)



**Şekil 4.12.** ADA 3.28 donöründen gelen  $KH_0$  bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan (Orj.)



**Şekil 4.13.** ADA 6.16 donöründen gelen  $KH_0$  bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan (Orj.)



**Şekil 4.14.** ADA 6.13 donöründen gelen  $KH_0$  bitkisinden kendileme yapılarak elde edilen koçan (Orj.)

Elde edilen 27 adet katlanmış haploid hatların tohum çoğaltımı ve UPOV gözlemlerinin alınması için 2013 yılında ekim yapılmıştır. Bazı hatların tohum sayıları çok az olduğundan viyollere ekim yapılmış ve yöntemde belirtilen kriterlere uyarak 3-4 yapraklı fide olana kadar iklim odasında büyütülmüştür. Fideler 14 Mayıs 2013'te tarlaya dikilmiştir. Kendileme işlemi yöneme göre gerçekleştirilmiştir. Katlanmış haploid hatların UPOV özellikleri uygun dönemlerde gözlemlenmiştir. Katlanmış haploid hatlarda alınan gözlemler EK 1'de verilmiştir.



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, ülkemizde mısır ıslah çalışmalarında indirgeyici hatların kullanımı ile KH mısır hatlarının elde edilmesi konulu ilk akademik çalışma olmuştur. Dünya’da pek çok ülkede indirgeyici hatların kullanılmasına rağmen, ülkemizde bu materyallerin bulunmaması çalışmaların yapılmamasına sebep olmuştur. Sahip olduğumuz kaynak materyaller ile indirgeyici hatların indüklenme melezlemesinden KH mısır hatlarının elde edilmesi melez mısır ıslahında kullanılması açısından önemli bir çalışmadır.

*In vivo* maternal haploid tekniğinde farklı indirgeyici genotipler kullanılmıştır. Tez çalışmasının kaynak materyali olan 30 tek melez ile her bir indirgeyici hattın melezlemesinden elde edilen tohumlarda haploid olanlar seçilmiştir. Yönteme göre her bir indirgeyici hattın Sakarya koşullarında HİO belirlenmiştir. En yüksek HİO RWK-76 indirgeyici hattında %20.42 olarak bulunmuştur. En düşük HİO ise WS14 hattında %17.75 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada belirlenen haploid indüklenme oranları literatürlerde verilen değerlerden daha yüksektir. Sakarya lokasyonunun mısır bitkisi için optimum koşullara sahip olması HİO’nun artmasına sebep olabilir.

Ülkemiz kamu ve özel sektör ıslah kuruluşlarının hiçbirinde ıslahçı hakkı kendisine ait olan indirgeyici hat bulunmamaktadır. İndirgeyici hatlar yurt dışından temin edilmek zorundadır. İndirgeyici hatlara sahip kuruluşlar farklı kontrat şartlarıyla bu hatları ticari olarak kullanmaktadır.

Dünya’da yaygın olarak kullanılan indirgeyici hatlar ülkemiz mısır kaynak materyallerinden erkenci olup bitki boyları kaynak materyallerin koçan yüksekliğinden kısadır. Bu durum açık alanda indüklenme melezlemesi yapmayı oldukça güçleştirmektedir. İndüklenme melezlemesinin el ile yapılması gerekmektedir. Bu nedenle hem elde edilecek tohum sayısı düşmekte hem de işçilik masrafları artmaktadır.

Ülkemizde indirgeyici hatların geliştirilmesi çalışmaları Mısır Araştırma Enstitüsü'nde 2011 yılında başlamıştır. RWS ve RWK-76 indirgeyici hatları FAO 450 olum grubunda olup Ülkemiz mısır kaynak materyallerinden erkencidir. RWS ve RWK-76 indirgeyici hatlarının bitki boyu ülkemiz kaynak materyalleri ile kıyaslandığında ise kısadır. Bu sebeple açık alanda melezleme yapılması zor olduğundan geçici, uzun boylu ve haploid indüklenme oranı yüksek indirgeyici hatların geliştirilmesi amaçlanmıştır (Cengiz ve ark. 2014). Ülkemize adapte olacak, istenilen özelliklerde indirgeyici hatların geliştirilmesi için TÜBİTAK tarafından desteklenen “Yeni İndirgeyici Mısır Hatlarının Geliştirilmesi” isimli ve 1150343 numaralı 1001 projesi Mısır Araştırma Enstitüsü tarafından yürütülmektedir.

Tez çalışmasının yürütüldüğü yıllarda ülkemizde *in vivo* maternal haploid tekniği uygulamaları ile ilgili yeterince tecrübe bulunmadığından literatürler dikkate alınarak yöntemin pratikteki uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple pratikteki bazı uygulamalardan kaynaklanan olumsuzluklar tez çalışması içerisinde de yaşanmıştır. Bunlardan bir tanesi çimlendirme şeklidir. Haploid kabul edilen tohumların kurutma kâğıdı üzerine belli bir düzende dizilerek tekrar üzeri kurutma kâğıdı ile kapatılıp rulo halinde sarılması ve bu şekilde çimlendirmeye alınması ile çimlenme daha homojen olacaktır. Çimlendirme ve kurutma kâğıtlarının ıslatılmasında kullanılacak suyun %0.05'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi olarak kullanılması tavsiye edilmektedir.

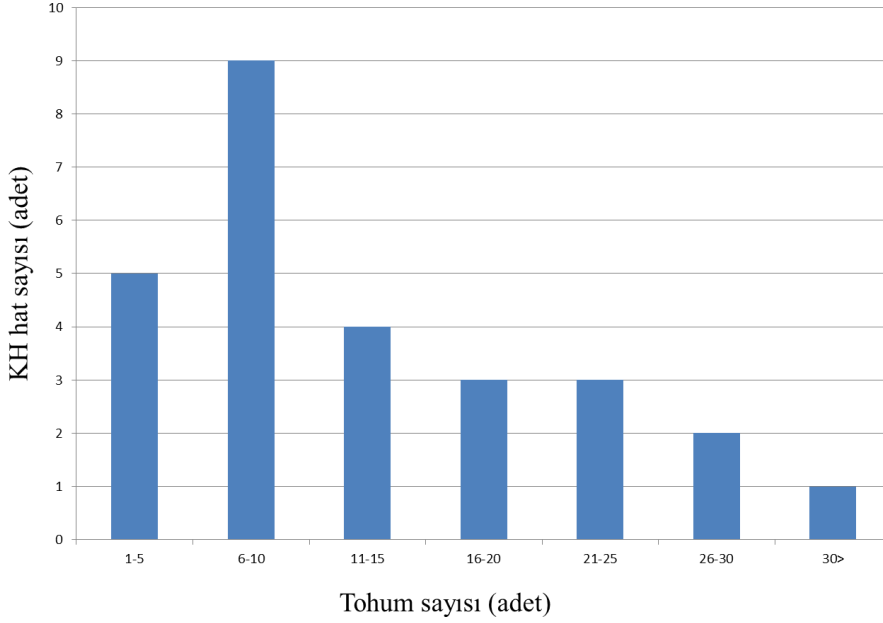
Bu çalışmada çimlenme öncesi haploid kabul edilen tohumlara fungusit uygulaması yapılmamıştır. Çimlendirme öncesi haploid kabul edilen tohumların etken maddesi thiabendazole olan bir fungusit ile ilaçlanması mantari hastalıkları önleyeceğinden sağlıklı bir çimlenme ve daha sonra ise sağlıklı fidelerin oluşumunu sağlayabilir.

Tez çalışmasında çimlendirilmiş ve kromozom katlaması yapılmış materyaller plastik küçük fide poşetlerine dikilmiştir. Plastik poşetler yerine 3-4 cm çaplı viyollere dikilmesi hem kullanılan torf miktarını azaltacak hem de fidelerin kök sistemi çok dağılmadığı için tarlaya dikimi kolaylaşacaktır.

Katlanmış haploid hatların ilk generasyonundan tohum elde edilmesi çalışmanın yapıldığı çevre koşullarına da bağlıdır. Stres faktörlerinin az olduğu lokasyonlarda veya dönemlerde çalışmanın yapılması canlı kalan bitki sayısını, canlı bitkilerde polen verme kapasitesini ve polen canlılığını olumlu yönde etkileyebilir. Katlanmış haploidlerin ilk generasyonlarında bitkiler daha zayıf, polen verme yetenekleri daha az ve koçanlar küçük olmuştur. Sulama, gübreleme, yabancı otlar ile mücadele ve zararlılarla mücadele gibi agronomik uygulamalar yönetime göre ve zamanında yapılmıştır. Böylece, zaten zayıf olan KH hatlara ait bitkilerin ilk generasyonunda olumsuz koşullardan etkilenmesi azaltılmıştır.

Bu çalışmada haploid kabul edilen 3012 tohumdan çimlendirme ve kromozom katlaması sonrası tarlaya dikilen 2178 fideden %89 canlı bitki, canlı bitkilerin %57'si fertil bitki, fertil bitkilerin %31.23'ü kendileme yapılabilecek bitki ve kendileme yapılan bitkilerden %7.8'i kendileme yapılarak tohum alınan bitki elde edilmiştir. Deimling yöntemine göre yapılan çalışmada ise %72.5 canlı bitki, canlı bitkilerin %50'si fertil bitki, fertil bitkilerin %39'u kendileme yapılabilecek bitki ve kendileme yapılan bitkilerden %27.3'ü kendileme yapılarak tohum alınan bitki şeklinde ifade edilmiştir (Deimling ve ark. 1997). Tez çalışmasında kromozom katlamasında Deimling (1997) yöntemi kullanılmasına rağmen oranların literatür bildirişinden daha az gerçekleşmesi; çimlendirme yöntemi, tohumların bir fungusit ile ilaçlanmaması ve fidelerin dikiminde yapılan uygulamaların farklılığı sonucunda oluştuğu düşünülmektedir.

Tez çalışması sonucunda 27 adet katlanmış haploid mısır hattı elde edilmiştir. Katlanmış haploid bitkilerde kendileme yapılarak elde edilen tohum miktarları Şekil 5.1'de verilmiştir.



**Şekil 5.1.** KH hatların ilk generasyonundan elde edilen tohum sayıları

*RI-nj* markör sistemi haploidlerin ayırımında etkili bir yol olmasına rağmen, *RI-nj* allelinin ifadesi ana ebeveynin (kaynak materyal) genetik yapısından oldukça etkilenmiştir. Navajo taç renkliliği küçük bir nokta (püskülün taneye bağlandığı noktada) şeklindeki renklilikten başlayarak, tüm endospermi kapsayan renkliliğe kadar çeşitlilik göstermiştir. Ayrıca, endosperm ve embriyodaki rengin koyuluğu da çok açıktan koyuya ve daha derine doğru değişiklik göstermiştir.

*RI-nj* geninin ortaya çıkışındaki varyasyon farklı sonuçlara yol açmıştır. Bütün endosperm ve embriyo dokuları renkli olduğunda haploidlerin ayırımı kolay olmuştur. Embriyo ve endospermin taçında renkliliğin iyi olması haploidlerin seçimini kolaylaştırmıştır. Endospermin taçında sadece bir mor nokta ve embriyoda rengin hafif ortaya çıkması ile haploid ayırımı mümkün olmuştur. Fakat, haploid ayırımındaki zorluk yüzünden yanlış seçim yapma oranı yükselmiştir. Hem endospermin hem de embriyonun tamamıyla renksiz olduğu tohumlar ise melez dışı olarak kabul edilmiştir. Endospermin tamamı renksiz fakat, embriyo dokusu bir derece renkli olduğu durumda ise renkli embriyoya sahip tüm tohumlar diploid olarak varsayılmıştır.

Haploidlerin hızlı ve doğru bir şekilde ayrımı, seçimi yapan kişilerin endosperm ve embriyodaki renk ifadesini doğru algılayarak haploidleri anlamasına bağlıdır. Tohum seleksiyonu yapan kişilerin bu konuda tecrübeli olması, bol ışık alan bir ortamda çalışması ve dört saatten fazla seleksiyon yapmaması tarafımızdan önerilmiştir.

*RI-nj* renk markörüne göre haploid kabul edilen tüm tohumların flow sitometri yöntemiyle ploidi seviyelerinin belirlenmesi, indüklenme melezlemesinden elde edilen tohum miktarı dikkate alındığında, masraflı ve uzun zaman alan bir çalışma olacağı tarafımızdan değerlendirilmiştir.

İndüklenme melezlemesinden elde edilen tohum miktarı fazla olduğunda haploid seçimi uzun bir süreç almaktadır. *RI-nj* renk markörüne göre tohumların seleksiyonunda rengin endosperm ve embriyoda çıkış yoğunluğu haploid kabul edilen tohumların görsel seçimini kolaylaştırmakta veya zorlaştırmaktadır. Tohumların farklı kategorilere ayrımında otomasyon sistemler geliştirilmelidir. Böylece, tohumu görsel ve içerik olarak tarayacak bu sistemler haploid seçimini kolaylaştıracak, yanlış seleksiyon oranını oldukça azaltacaktır. Bu konuda yapılan farklı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada Mısır Araştırma Enstitüsü'nde farklı ışık dalga boylarında ışık kaynakları altında tohum seleksiyonu ön çalışmaları yapılmıştır.

Haploid tohumların etkin bir şekilde seçimi halen üzerinde çalışılması gereken önemli bir konudur. İndüklenme melezlemesinden elde edilen tohumların içerisinde haploid olanların ayrımında renk markörü gibi görsel sınıflandırmanın yanı sıra yüksek yağ oranı ve moleküler olarak sınıflandırma da ön plana çıkmıştır. Gelecekte haploid tohumların otomatik olarak yüksek doğrulukta seçimini sağlayacak yeni yöntemlerin geliştirilmesi olasıdır.

Elde edilen katlanmış haploid mısır hatlarının kombinasyon yeteneklerinin belirlenmesi ve heterotik gruplarının tahmin edilmesi yoklama melezi yöntemiyle mümkün olabilmektedir. Aynı zamanda moleküler olarak genetik farklılıklarının belirlenmesi de melez kombinasyonlarında kullanımı açısından bilgi verebilmektedir.

Katlanmış haploid hatların ilk seleksiyonu ıslahçının hedeflerine göre ilk generasyonda yapılabilir. Islahçı katlanmış haploid hatların köken aldığı kaynak materyali dikkate alarak seleksiyon kriterlerini belirleyebilir.

Markör destekli seleksiyon katlanmış haploid hatların ıslah şemasına kolayca entegre edilmiştir. Literatürlerde verilen çalışmalar örnek alınarak katlanmış haploid hatların ıslah çalışması ıslahın hedeflerine bağlı kalınarak şematize edilebilir. Tüm genom seleksiyonu (Genom-wide selection- GS) yöntemi de benzer bir yaklaşımla ıslah şemasına entegre edilebilir.

Farklı hedef genlerin bulunduğu mısır hatlarının seçilip bu genlerin bir genotipte toplanmasını sağlayarak bir idiotip elde edilmektedir. Katlanmış haploid tekniği ile markör destekli seleksiyonun gen piramidi çalışmalarında kullanılması geri melez yöntemine göre oldukça etkili ve kısa sürede sonuca ulaşılacak bir yöntem olarak önerilmektedir. Elde edilen idiotipin kaynak materyal olarak kullanıldığı F<sub>2</sub> popülasyonlarında her generasyonda markör destekli seleksiyon uygulanması gerekirken, katlanmış haploid tekniğinde sadece bir generasyonda hedef genlerin belirlenmesi mümkün olmaktadır.

Hedef genlerin toplandığı ideotip katlanmış haploid tekniğinde kaynak materyal olarak kullanıldığında elde edilen KH hatlar markör destekli seleksiyon ile seçilmelidir. KH hatların ilk generasyonunda fide döneminde bu seleksiyon yapılabilir böylece henüz kendileme yapılmadan istenen genleri taşıyan KH hatlar belirlenmiş olur. Tekrarlamalı seleksiyon yöntemi bu ıslah yöntemine entegre edilerek istenen genler ile birlikte adaptasyon ve verimlilik testleri de çoklu lokasyonlarda gerçekleştirilebilir.

Katlanmış haploid hatların geliştirilmesinde donör olarak kullanılacak kaynak materyalin yapısı ıslahın şemasını değiştirebilir. Yüksek yağlı hatlar ve adaptasyon kabiliyeti iyi hatların yer aldığı çift melezi donör olarak indükleme melezlemesinde kullanılabilir. Fakat, kaynak materyalin taşıdığı özellikler açısından güçlü bir seleksiyon gerekmektedir. İndükleme melezlemesi yapmadan önce kendileme yaparak S<sub>1</sub> veya S<sub>2</sub> generasyonunda yüksek yağlı genotipler ve aynı zamanda adaptasyon kabiliyeti iyi olanların seçilmesi ve katlanmış haploid tekniğinde kullanılması elde edilecek KH hatların başarısını arttıracaktır.

Dünya’da, *in vivo* maternal haploid tekniği gelişmiş ıslah programlarının vazgeçilmez bir yöntemi olmuştur. Ülkemizde ıslah çalışmaları yürüten kamu araştırma enstitüleri ve bazı özel sektör tohumculuk şirketleri de son yıllarda *in vivo* maternal haploid tekniğini uygulamaya başlamışlardır.

## 6. KAYNAKLAR

- Anonymous (2013). Plant Reproduction [http://www.biologyjunction.com/plant\\_reproduction.htm](http://www.biologyjunction.com/plant_reproduction.htm)  
Erişim Tarihi: 12.08.2013.
- Anonymous (2015). Coarse Grains: World Market and Traits.  
<http://www.fas.usda.gov/search/Corn%20production> Erişim tarihi: 21.12.2015.
- Anonim (2014). Resmi Gazete <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/09/20140925>. Erişim tarihi : 30.01.2015.
- Anonymous (2015a). Navajo [http://www.wikipedia.org/wiki/Navajo\\_Nation](http://www.wikipedia.org/wiki/Navajo_Nation) Erişim Tarihi: 20.01.2015.
- Barret P, Brinkmann M, Beckert M (2008). A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 117: 581-594.
- Beckert, M (1994). Advantages and disadvantages of the use of *in vitro/in situ* produced DH maize plants. pp. 201-213. *In*: Y. P. S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 25. Maize. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Belicuas PR, Guimarães CT, Paiva LV, Duarte JM, Maluf WR, Paiva E (2007). Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. *Euphytica*, 156: 95-102.
- Bernardo R (2009). Should maize doubled haploids be induced among F<sub>1</sub> or F<sub>2</sub> plants. *Theor. Appl. Genet.*, 119: 255-262.
- Bernardo R, YU J (2007). Prospects for genome-wide selection for quantitative traits in maize. *Crop Sci.*, 47: 1082-1090.
- Boddupalli MP, Chaikam V, Mahuku G (2012). *Double Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practise*. CIMMYT, Mexico.
- Bouvier L, Fillon FR, Lespinasse Y (1994). Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots *in vitro*. *Plant Breed.*, 113: 343-346.
- Bordes J, De Vaulx RD, Lapierre A, Pollacsek M (1997). Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. *Agronomie*, 17: 291-297.
- Brummer EC, Cazarro PM, Luth D (1999). Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. *Crop Sci.*, 39: 1202.
- Bylich VG, Chalyk ST (1996). Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid-inducing capacity in ZMS line. *Maize. Genet. Coop. Newslett.*, 70: 33.
- Castillo AM, Cistué L, Vallés MP, Soriano M (2009). Chromosome Doubling in Monocots. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. 27: 329-338
- Cengiz R, Cerit İ, Tezel M, Pamukçu M (2013). Kendilenmiş Hatların Elde Edilmesi. *Melez Mısırla 100 Yıl Çalıştayı Kitabı*. BİSAB Yayın No:1, 115-136.



- Cengiz R (2014). Maize in Turkey, Country Report. 12th Asian Maize Conference and Expert Consultation on Maize for Food, Feed, Nutrition and Environmental Security. Bangkok, Thailand, pp. 352-361.
- Cengiz R, Esmeray M, Özbey AE (2014). Development of late temperate inducer lines. 12th Asian Maize Conference and Expert Consultation on Maize for Food, Feed, Nutrition and Environmental Security. (poster presentation) 30 October - 1 November, 2014, Bangkok, Thailand.
- Chaikam V, Boddupalli MP (2012). Double Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practise. CIMMYT, Mexico, pp. 20-23.
- Chaikam V, Mahuku G (2012). Double Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practise. CIMMYT, Mexico, pp. 24-29.
- Changdeng Y, Lianbin W, Chengzhang Z (1998). *In vitro* regulation of haploid somaclonal micro-buds in indica rice. Chinese J. Rice Sci., 12, 4: 219-222.
- Chase SS (1951). Production of homozygous diploids of maize from monoploids. Agron., 44: 263-267.
- Chase SS (1952). Monoploids in maize. Iowa State College Press, Ames, Iowa, pp. 389-399.
- Chase SS (1969). Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). Bot. Rev., 35: 117-167.
- Chalyk ST (1994). Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. Euphytica, 79: 13-18.
- Chalyk S, Baumann A, Daniel G, Eder J (2003). Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize. Maize Genet. Coop. Newslett., 77: 29.
- Coe EH (1959). A line of maize with high haploid frequency. Am. Naturalist, 93: 381-382.
- Coe EH, Sarkar KR (1964). The detection of haploids in maize. J. Heredity, 55: 231-233.
- Deimling S, Röber F, Geiger HH (1997). Methodik und Genetik der *in-vivo*-Haploideninduktion bei Mais. Vortr Pflanzenzüchtg, 38: 203-224.
- Dolezel J, Binarova P, Lucretti S (1989). analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biologia Plantarum, 31(2): 113-120.
- Eder J, Chalyk ST (2002). *In vivo* haploid induction in maize. Theor. Appl. Genet., 104: 703-708.
- Ellialtıoğlu Ő, Sarı N, Abak K (2001). Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kùltürü ve Uygulamaları. Babaođlu M, Gürel E, Özcan S (edit.). 5: 137-189. Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Fischer E (2004). Molekulargenetische Untersuchungen zum Vorkommen paternaler DNA-Übertragung bei der *in-vivo*-Haploiderinduktion bei Mais (*Zea mays* L.). PhD dissertation, University of Hohenheim. Grauer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Forster BP, Thomas WTB (2005). Doubled haploids in genetics and plant breeding. Plant Breed Rev., 25: 57-88.
- Gallais A (1990). Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. Genetics, 124: 199-206.

- Gayen P, Madan JK, Kumar R, Sarkar KR (1994). Chromosome doubling in haploids through colchicine. *Maize Gen. Coop. Newslett.*, 68: 65.
- Geiger HH, Roux SR, Deimling S (1994) Herbicide resistance as a marker in screening for maternal haploids. *Maize Genet. Newslett.*, 68: 99
- Geiger HH (2009). Doubled haploids. In: JL Bennetzen, S Hake (eds.) *Maize handbook -volume II: genetics and genomics*. Springer Science and Business Media, New York, pp. 641-657.
- Geiger HH, Braun MD, Gordillo GA, Koch S, Jesse J, Krützfeldt BAE (2006). Variation for female fertility among haploid maize lines. *Maize Genet. Coop. Newsletter*, 80: 28-29.
- Geiger HH, Gordillo GA (2009). Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*, 54: 485-499.
- Geiger HH, Schönleben M (2011). Incidence of male fertility in haploid elite dent maize germplasm. *Maize Genet. Coop. Newsletter*, vol: 85.
- Goodsell SR (1961). Male sterility in corn by androgenesis. *Crop. Sci.*, 1: 227-228.
- Gordillo A, Geiger HH (2008). Alternative recurrent selection strategies using doubled haploids lines in hybrid maize breeding. *Crop Sci.*, 48: 911-922.
- Gordillo A, Geiger HH (2010). Optimum hybrid maize breeding strategies using doubled haploids, 46th Illinois Corn Breeders School, Champaign, 1st of March 2010.
- Greenblatt IM, Bock M (1967). A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *J. Hered.*, 58: 9-13.
- Hansen NJP, Andersen SB (1998). Efficient production of doubled haploid wheat plants by in vitro treatment of microspores with trifluralin or APM. *Plant Breed.*, 117(5): 401-405.
- Häntzschel KR, Weber G (2010). Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma* 241:99-104.
- Hu G (2014). Study on haploid induction rates in different maize inducers. *Agricultural Science & Technology*, 15(4): 554-556.
- Jackson D (2009). Vegetative shoot meristems. *Handbook of Maize Its Biology*, Jeff L. Bennetzen, Sarah C. Hake. Springer, USA, 1-12.
- Joshi RK, Nayak S (2010). Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 5(3): 51-60.
- Junxiong Z, Zhanyuan W, Peng S, Wei Li, Shaojiang C, Jin L (2013). Embryo feature extraction and dynamic recognition method for maize haploid seeds. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 29: 4.
- Kasha KJ, Shim YS, Simion E, Letarte J (2006). Haploid Production And Chromosome Doubling. *Acta Hort. (ISHS)* 725: 817-828.
- Kato A (2002). Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant Breed.*, 121: 370-377.

- Kermicle JL (1969). Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science*, 166: 1422-1424.
- Lacadena JR (1974). Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis. In: Kasha KJ, Haploids in higher plants advances and potential. Proceeding of the 1st International Symposium, University of Guelph, 13-32.
- Lashermes P, Beckert M (1988). A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 405-410.
- Lee JH, Arumuganathan K, Kaeppler SM, Park SW, Kim KY, Chung YS, Kim DH, Fukui K (2002). Variability of chromosomal DNA contents in maize (*Zea mays* L.) inbred and hybrid lines. *Planta*, 215: 666-671.
- Li L, Xu X, Jin W, Chen S (2009). Morphological and Molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta*, 230: 367-376.
- Lübberstedt T, Frei UK (2012). Application of doubled haploids for target gene fixation in backcross programmes of maize. *Plant Breed.*, 131: 449-452.
- Mahendru A, Sarkar KR (2000). Cytological analysis of the pollen of haploidy inducer lines in maize (*Zea mays* L.) *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 60: 37-43.
- Melchinger AE, Schipprack W, Friedrich HU, Mirdita V (2014). In vivo haploid induction in maize: identification of haploid seeds by their oil content. *Crop Sci.*, 54 (4): 1497-1504.
- Müntzing A (1961). Genetic research. A survey of methods and main results. LTs Förlag Stockholm. 345 Seiten, 213 Abb. Preis 36-Swed. Kr.
- Nanda DK, Chase SS (1966). An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.*, 6: 213-215.
- Philips RL, Eberhart SA (1993). Novel methodology in plant breeding. In Proc. of the Int. Crop Sci. Cong. Ames, USA. *Crop Sci. Soc. of America*, pp. 647-648.
- Pogna NE, Marzetti A (1977). Frequency of two tubes in *in vitro* germinated pollen grains. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 51: 44.
- Pollacsek M (1992). Management of the *ig* gene for haploid induction in maize. *Agronomie*, 12: 247-251.
- Presterl T, Ouzunova M, Schmidt W, Möller EM, Röber FK, Knaak C, Ernst K, Westhoff P, Geiger HH (2007). Quantitative trait loci for early plant vigour of maize grown in chilly environments. *Theor. Appl. Genet.*, 114: 1059-1070.
- Prigge V, Sanchez C, Dhillon BS, Schipprack W, Araus JL, Banziger M, Melchinger AE (2011). Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates. *Crop Sci.*, 51: 1498-1506.
- Prigge V, Xu X, Li L, Babu R, Chen S, Atlin GN, Melchinger AE (2012). New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics*, 190: 781-793.
- Randolph LF (1932). Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. *Genetics*, 18: 222-229.

- Rotarenco VA, Eder J (2003). Possible effect of heterofertilization on the induction of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 77: 30.
- Rotarenco VA, Kirtoca IH, Jacota AG (2007). Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 81: 11.
- Rotarenco VA, Dicu G, State D, Fuia S (2010). New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 84: 15.
- Roux SR (1995). Züchterische Untersuchungen zur *in-vivo*-Haploideninduktion bei Mais. Ph.D. thesis, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Röber FK (1999). Fortpflanzungsbiologische und genetische Untersuchungen mit RFLP-Markern zur *in-vivo* Haploideninduktion bei Mais. Ph.D. dissertation, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Röber FK, Gordillo GA, Geiger HH (2005). *In vivo* haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*, 50: 275–283.
- Russel WA, Eberhart SA (1975). Hybrid performance of selected maize lines from reciprocal recurrent and testcross selection programs *crop. Sci.*, 15:1-4.
- Sarkar KR, Coe EH Jr (1966). A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. *Genetics*, 54: 453-464.
- Sarkar KR, Coe EH Jr (1971). Analysis of events leading to heterofertilization in maize. *J. Hered.*, 62: 118-120.
- Sarkar KR, Pandey A, Gayen P, Mandan JK, Kumar R, Sachan JKS (1994). Stabilization of high haploid inducer lines. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 68: 64-65.
- Sauton A (1989). Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. *Cucurbit Genetics Coop.*, 12: 22-23.
- Schippreck W (2012). Doubled Haploid (DH) Technology in Maize Breeding. Trainin Course, CIMMYT, Mexico. 20-24 August, 2012.
- Schneerman MC, Charbonneau M, Weber DF (2000). A survey of *ig* containing materials. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 74: 92-93.
- Seitz G (2005). The use of doubled haploids in corn breeding. pp. 1-7. *In: Proc. 41th Annual Illinois Corn Breeders' School 2005. Urbana-Champaign, IL, USA.*
- Servin B, Martin OC, Mézard M, Hospital F (2004). Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding. *Genetics*, 168(1): 513-523.
- Shatskaya OA, Zabirowa ER, Shcherbak VS (1994a). Autodiploid lines as sources of haploid spontaneous diploidization in corn. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 68: 51-52.
- Shatskaya OA, Zabirowa ER, Shcherbak VS, Chumak MV (1994b). Mass induction of maternal haploids in corn. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 68: 51.
- Simmonds NW (1983). Plant Breeding: The state of the art. *In Genetic Engineering of Plants. Plenum press, New York, London*, pp. 5-25.

- Spitkó T, Sági L, Pintér J, Marton LC, Barnabás B (2006). Haploid regeneration aptitude maize (*Zea mays* L.) lines of various origin and of their hybrids. *Maydica*, 51: 537-542.
- Subrahmanyam NC, Kasha KJ (1973). Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. *Chromosoma*, 42: 111-125.
- Swapna M, Sarkar KR (2011). Anomalous fertilization in haploidy inducer lines in maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, 56: 221-225.
- Tuna M, Vogel KP, Arumuganathan K, Gill KS (2001). DNA content and ploidy determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry. *Crop Sci.*, 41: 1629-1634.
- Turcotte EL, Feaster CV (1969). Semigametic production of haploids in Pima cotton. *Crop. Sci.*, 9: 653-655.
- Tyrnov VS, Zavalishina AN (1984). Inducing high frequency of matroclinous haploids in maize (in Russian). *Dokl Akad Nauk SSSR*, 276: 735-738.
- Wedzony M, Röber FK, Geiger HH (2002). Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS. In: XVIIth International Congress on Sex Plant Reports Maria Curie-Sklodowska University Press, Lublin, p. 173.
- Wilde K, Burger H, Prigge V, Presterl T, Schmidt W, Ouzunova M, Geiger HH (2010). Testcross performance of doubled-haploid lines developed from European flint maize landraces. *Plant Breeding*, 129: 181-185.
- Zabirova ER, Shatskaya OA, Shcherbak VS (1993). Line 613/2 as a source of a high frequency of spontaneous diploidization in corn. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 67: 67.
- Zhang Z, Qiu F, Liu Y, Ma K, Li Z, Xu S (2008). Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock-6 derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.*, 27: 1851-1860.

## EKLER

EK 1. Katlanmış haploid hatların UPOV özellikleri

No	Özellik	KH-1	KH-2	KH-3	KH-4	KH-5	KH-6	KH-7	KH-8	KH-9	KH-10	KH-11	KH-12	KH-13	KH-14
1	İlk yaprak kımında antosiyanin renkliliği	5	3	3	5	1	5	3	7	3	7	1	3	5	1
2	İlk yaprak ucu şekli	1	3	3	3	1	5	5	7	3	3	1	3	1	3
3	Gövde ile yaprak arasındaki açı	3	3	3	3	3	5	3	5	5	5	3	3	5	3
4	Yaprak ayası duruşu	3	3	3	1	1	3	1	3	3	1	1	1	3	3
5	Gövdedeki boğumdan boğuma zigzag derecesi	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1
6	Destek köklerde antosiyanin renkliliği	7	3	3	5	7	9	1	1	3	3	5	3	7	5
7	Tepe püskülü çıkış zamanı	7	7	6	6	6	6	6	5	7	7	6	7	6	6
8	Tepe püskülü kavuzu tabanındaki antosiyanin renkliliği	3	3	5	1	7	5	5	3	3	1	5	7	3	3
9	Tepe püskülü kavuzlarında antosiyanin renkliliği	3	5	5	1	5	3	3	1	1	3	7	5	5	3
10	Anterlerde antosiyanin renkliliği	3	3	3	1	3	1	1	1	1	3	5	3	3	3

11	Başakçık yoğunluğu	5	5	5	5	7	5	5	5	3	5	5	5	7	5
12	Ana eksen ile yan dallar arasındaki açı	7	1	3	3	5	7	3	3	1	5	3	3	1	3
13	Yan dalların duruşu	5	1	3	3	7	7	5	3	3	5	1	1	1	3
14	İlk yan dal sayısı	5	5	5	5	7	7	3	5	5	5	3	7	7	5
15	Püskül çıkış zamanı	7	7	6	6	6	6	6	5	7	7	6	7	6	6
16	Püskül antosiyanin renkliliği	9	9	9	1	1	9	9	1	9	9	1	1	9	9
17	Püskülde antosiyanin yoğunluğu	3	3	5	1	1	7	7	1	5	3	1	1	5	3
18	Yaprak kınındaki antosiyanin renkliliği	1	1	1	1	1	3	1	1	5	3	3	1	1	3
19	Tepe püskülü: En alt yan daldan itibaren eksen uzunluğu	3	5	5	5	5	3	3	5	5	5	5	5	7	5
20	Tepe püskülü: En üst yan daldan itibaren eksen uzunluğu	3	5	5	5	7	3	3	5	7	5	5	3	7	3
21	Tepe püskülü: Yan dalların uzunluğu	3	3	5	5	5	3	3	3	5	3	5	1	5	1
22	Bitki boyu (tepe püskülü dahil)	3	3	3	3	3	3	5	5	3	3	3	3	5	3
23	Üst koçanın bitkiye bağlandığı yerin	5	5	5	5	5	3	5	5	5	5	5	5	3	5

	bitkinin toplam yüksekliğine oranı														
24	Yaprak ayası genişliği (üst koçan yaprağı)	7	7	5	5	5	5	3	3	5	5	3	5	5	5
25	Koçan sapı uzunluğu	5	3	3	3	7	5	3	3	5	5	5	3	5	5
26	Koçan uzunluğu (koçan kavuzu hariç)	1	1	1	1	3	1	3	3	5	1	1	3	3	3
27	Koçan çapı (orta kısımda)	3	3	3	3	3	5	3	3	3	3	3	1	5	3
28	Koçan şekli	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	2
29	Koçanda ki sıra sayısı	3	3	3	5	3	3	7	5	3	3	3	5	3	5
30	Tane tipi (koçan ortası 1/3'lük kısımda)	5	5	5	5	5	4	4	5	4	5	5	5	5	5
31	Tane ucu rengi	3	3	3	3	4	4	3	3	5	3	3	3	4	3
32	Tane sırt rengi	3	3	3	4	4	4	3	3	5	4	4	3	5	4
33	Koçan kavuzlarında antosiyanin renkliliği	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	9	1
34	Koçan kavuzlarında antosiyanin yoğunluğu	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	3	1



EK 1. Katlanmış haploid hatların UPOV özellikleri

N o	Özellik	KH-15	KH-16	KH-17	KH-18	KH-19	KH-20	KH-21	KH-22	KH-23	KH-24	KH-25	KH-26	KH-27
1	İlk yaprak kınında antosiyanin renkliliği	7	5	5	9	1	5	5	3	7	1	5	3	3
2	İlk yaprak ucu şekli	5	5	7	3	3	3	3	7	3	5	5	3	3
3	Gövde ile yaprak arasındaki açı	3	3	3	3	3	3	5	3	5	3	3	3	3
4	Yaprak ayası duruşu	3	1	1	1	3	3	3	3	5	5	3	3	3
5	Gövdedeki boğumdan boğuma zigzag derecesi	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1
6	Destek köklerde antosiyanin renkliliği	3	5	5	5	7	1	1	3	3	9	5	7	3
7	Tepe püskülü çıkış zamanı	6	6	6	7	6	6	6	6	5	6	7	7	6
8	Tepe püskülü kavuzu tabanındaki antosiyanin renkliliği	1	3	7	3	5	7	1	1	3	5	5	1	7
9	Tepe püskülü kavuzlarında antosiyanin renkliliği	1	1	5	3	3	7	3	1	3	3	3	3	3
10	Anterlerde antosiyanin renkliliği	3	1	1	5	3	3	1	1	5	3	3	3	3
11	Başakçık yoğunluğu	5	5	5	5	3	5	5	7	3	3	5	5	5
12	Ana	5	3	3	3	3	3	5	3	3	3	3	5	5

	eksen ile yan dallar arasındaki açı													
13	Yan dalların durumu	5	3	3	5	3	3	3	3	3	5	5	3	5
14	İlk yan dal sayısı	5	5	5	7	5	3	3	3	5	5	7	5	5
15	Püskül çıkış zamanı	6	6	6	7	6	6	6	6	5	6	7	7	6
16	Püskül antosiyanin renkliliği	9	9	9	9	1	1	9	1	9	9	1	1	9
17	Püskülde antosiyanin yoğunluğu	7	9	7	5	1	1	3	1	7	5	1	1	3
18	Yaprak kınındaki antosiyanin renkliliği	3	3	3	5	5	3	5	3	3	3	3	5	3
19	Tepe püskülü: En alt yandan itibaren eksen uzunluğu	5	3	3	3	1	3	5	3	3	3	3	3	3
20	Tepe püskülü: En üst yandan itibaren eksen uzunluğu	3	3	3	3	1	3	5	3	3	1	3	3	3
21	Tepe püskülü: Yan dalların uzunluğu	3	3	2	3	3	5	3	5	3	3	3	3	3
22	Bitki boyu (tepe püskülü dahil)	5	3	3	3	3	5	3	3	3	3	5	3	3
23	Üst koçanın bitkiye bağlandığı yerin bitkinin toplam yüksekliğine	5	5	5	7	7	5	7	7	7	5	5	5	7

	oranı													
24	Yaprak ayası genişliği (üst koçan yaprağı)	5	5	5	5	3	5	5	5	7	5	3	7	5
25	Koçan sapı uzunluğu	5	3	3	7	5	5	5	5	7	5	3	5	5
26	Koçan uzunluğu (koçan kavuzu hariç)	3	1	1	1	3	5	3	1	1	3	3	3	3
27	Koçan çapı (orta kısımda)	1	3	3	3	3	1	3	1	3	3	1	1	1
28	Koçan şekli	2	2	2	3	2	3	3	3	3	2	2	3	3
29	Koçanda ki sıra sayısı	3	5	5	5	5	3	3	5	3	3	3	5	3
30	Tane tipi (koçan ortası 1/3'lük kısımda)	5	5	5	5	5	5	4	5	5	4	5	5	5
31	Tane ucu rengi	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	4	3	3
32	Tane sırt rengi	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	5	4	4
33	Koçan kavuzları nda antosiya nin renkliliği	1	1	9	9	1	1	1	1	1	1	9	1	1
34	Koçan kavuzları nda antosiya nin yoğunluğu	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	5	1	1

## ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Erzincan'da doğdu. Trabzon Ev Ekonomisi Meslek Lisesinden 1992 yılında mezun oldu ve aynı yıl T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bitlis İl Müdürlüğünde Ev Ekonomisti olarak göreve başladı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Makineleri Bölümünde 1994-1999 yılları arasında lisans eğitimini aldı. 2000 yılında Mısır Araştırma Enstitüsü'nde Ziraat Mühendisi olarak çalışmaya başladı. 02/02/2006 tarihinde Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde “Mısır Hatları Arasındaki 8x8 Yarım Diallel Melez Döllerinde Verim ve Verim Unsurlarının Kalıtları Üzerine Araştırmalar” çalışması ile yüksek lisansını tamamladı ve doktora programına başladı. 2000 yılından bu yana Mısır Araştırma Enstitüsü Sıcak İklim Tahılları Şubesinde bitki ıslahçısı olarak çalışmaktadır. Evli ve bir kız çocuk annesidir.

## TEŞEKKÜR

*In vivo* maternal haploid tekniği için gerekli indirgeyici hatların temin edilmesinde verdiği destek ve tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesi ile yaptığı katkılardan dolayı Sayın hocam Prof. Dr. Kayıhan Z.KORKUT'a,

*In vivo* maternal haploid tekniğinin uygulamalarında bilgisiyle beni destekleyen Prof. Dr. Hartwig H. GEIGER'a, indirgeyici hatları temin ettiğimiz Hohenheim Üniversitesi ve French National Institute for Agricultural Research (INRA)'a,

Tez çalışmam süresince verdiği destek ile eşim Bülent CENGİZ'e, gösterdiği sabır ile kızım B. İrem Cengiz'e,

Tezimin tarla ve sera çalışmalarının yürütülmesindeki katkılarından dolayı Mısır Araştırma Enstitüsü'ne ve Sıcak İklim Tahılları Şubesi çalışanlarına şükranlarımı sunarım.