

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MISIRDA *İN VİVO* HAPLOİD KATLAMA YÖNTEMLERİNE KARŞI İNDİRGEYİCİ VE DONÖR GENOTİPLERİN TEPKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE HAPLOİD TOHUM TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

UMUT SONGUR

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MISIRDA *İN VİVO* HAPLOİD KATLAMA YÖNTEMLERİNE KARŞI İNDİRGEYİCİ VE DONÖR GENOTİPLERİN TEPKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE HAPLOİD TOHUM TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Umut SONGUR
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: **25/08/2020**

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Fatih KAHRIMAN

ÇANAKKALE

Umut SONGUR tarafından Doç. Dr. Fatih KAHRIMAN yönetiminde hazırlanan ve **25/08/2020** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Mısırda *İn vivo* Haploid Katlama Yöntemlerine Karşı İndirgeyici ve Donör Genotiplerin Tepkilerinin Araştırılması ve Haploid Tohum Tespitinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tarla Bitkileri Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr. Fatih KAHRIMAN ……
Başkan

Prof. Dr. İlhan TURGUT ……
Üye

Prof. Dr. Mevlüt AKÇURA …….
Üye

Doç. Dr. Pelin KANTEN
Müdür
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Sıra No: ……

Bu çalışma TÜBİTAK 1002 programı kapsamında desteklenmiştir. Proje Numarası: TÜBİTAK 119O619.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Umut SONGUR

TEŞEKKÜR

Tez konusunu seçmemde, tezin gerçekleştirilmesinde, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, ve sonuçların değerlendirilmesinde bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, bir an olsun yardımlarını esirgemeyen değerli danışaman hocam Doç. Dr. Fatih KAHRIMAN'a tüm kalbi duygularımla teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite hayatım boyunca engin hayat tecrübesini ve çok değerli akademik bilgisini her zaman benimle paylaşan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Harun BAYTEKİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK bu araştırmayı TÜBİTAK 119O619 kodlu proje ile destekleyerek yürütülmesi ve gerçekleştirilmesinde finansal destek sağlamıştır. Sağladıkları maddi desteklerden dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca proje başvurusunda ve yürütülmesinde katkı sağlayan AGROMAR Maramara Tarım Ürünleri A.Ş. firmasına teşekkür ederim.

Çalışmanın uygulanması kısmında katkılarından dolayı Tarla Bitkileri 4. Sınıf lisans öğrencilerine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana inanan ve güvenen, dua ve desteklerini her daim yüreğimde hisettiğim annem Çeçani SONGUR'a, babam Feyzi SONGUR'a, ve tüm aileme teşekkür ederim.

Umut SONGUR

Çanakkale, Ağustos 2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

BPNN	Geri yayılım sinir ağı
CIMMYT	Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırmalar Merkezi (International Maize and Wheat Improvement Center)
CKBO	Canlı kalan bitki oranı
CKFO	Canlı kalan fide oranı
CNN	Konvolüsyonel sinir ağları
DH	Double haploid
DMSO	Dimetil sulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DVM	Destek vektör makineleri
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
HÇO	Haploid çimlenme oranı
HİO	Haploid indükleme oranı
HSV	Renk özü, Doygunluk, Değer
KH	Katlanmış haploid
KH_0	İndüksiyon melezlezlenmesinden elde edilen bitki
LG	Lojistik regresyon
LSTM	Uzun ve kısa vadeli hafıza
NIR	Yakın kızıl ötesi spektroskopisi
NTV	Negatif tahmin değeri
PLSR	Kısmi en küçük kareler regresyonu
PTV	Pozitif tahmin değeri
RF	Random frog
RGB	Mavi, Yeşil, Kırmızı
R1-nj	R1-Navajo
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SRA	Sınıflama ve Regresyon Ağacı
TIC	Tropik indükleyici adayları
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
VİS	Görünür spektroskopi

ZCA	Sıfır fazlı bileşen analizi
QTL	Kantitatif özellik lokusu

ÖZET

MISIRDA İV VİVO HAPLOİD KATLAMA YÖNTEMLERİNE KARŞI İNDİRGEYİCİ VE DONÖR GENOTİPLERİN TEPKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE HAPLOİD TOHUM TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Umut SONGUR
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Fatih KAHRIMAN
25/08/2020, 39

Bu tez çalışması mısır ıslahında kullanılan in vivo haploid katlama yöntemlerine karşı kullanılan materyallerin yanıtlarının irdelenmesi ve haploid tohum ayrımında kullanılan tekniklerin karşılaştırılması amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada materyal olarak üç donör (DNR1, DRN4, DNR5) ile iki indirgeyici hat (CIM2GTAIL-P2, RWK-76xRWS) kullanılmıştır. Donör materyaller ve indirgeyici hatlar 2019 yılı Eylül ayında sera şartlarında KH_0 tohumların elde edilmesi için yetiştirilmiştir. Serada yapılan tozlama işlemlerinin ardından donörlerden elde edilen tohumlardan haploid ve diploid olanlar göz ile sınıflandırılmıştır. Sınıflanan tohumlar kodlanmış ve sırası karışmayacak şekilde önce masaüstü tarayıcıda resimleri daha sonra da masaüstü NIR (Yakın Kızıl Ötesi) spektroskopi cihazında reflektans verileri toplanmıştır. KH_0 tohumlar Zabirova ve diğerleri (1996) ve CIMMYT (Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırma Merkezi) tarafından önerilen iki farklı yöntem ile kromozom katlama işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemin ardından fideler yeterli büyüklüğe ulaştığında 2020 yılı Mayıs ayında tarlaya şaşırtılmış ve bitki görünümü ile sap renklenmesi dikkate alınarak bitkilerin sınıflama durumları kayıt altına alınmıştır. Başlangıçta yapılan sınıflamadan elde edilen veriler ile son sınıflama verileri bağımlı değişken olarak kabul edilerek spektral veriler ve görüntü verileri (Mavi, Yeşil, Kırmızı bant) tahminleyici olarak kullanılmış ve sınıflama modelleri oluşturulumuştur. Oluşturulan modellerin sınıflama kapasiteleri gerçek sınıflama sonuçları ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Araştırma bulgularına göre kullanılan donör ve indirgeyici hatların kromozom katlama yöntemlerine karşı tepkilerinin farklı olduğu görülmüştür. Haploid indirgenme oranları %9,2 ile %16,1 arasında değişim göstermiştir. CIMMYT yönteminde hem fideleme hem tarlaya şaşırtma aşamalarında bitki kayıplarının yüksek olduğu gözlenmiştir. Haploid tohum sınıflama amacıyla kullanılan teknikler bakımından da dikkate değer farklar olduğu belirlenmiştir. Yaygın olarak kullanılan göz ile ayırma yönteminin doğruluk oranı %87 olarak tespit edilir iken tohum görüntülerine ve spektral verileri dayalı oluşturulan modellerin doğruluk oranları sırasıyla %79 ve %83 olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları hem sepktral tekniklerin hem de görüntü işleme tekniğinin mısır ıslah programlarında in vivo maternal haploid tekniğinde sınıflama aracı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: Mısır ıslahı, Kendilenmiş hat, Ploidi, Tohum sınıflama

ABSTRACT

INVESTIGATION OF REDUCTIVE AND DONOR GENOTYPE RESPONSES TO İN VIVO HAPLOID FOLDING METHODS AND COMPARISON OF METHODS USED IN HAPLOID SEED DETERMINATION IN CORN PLANT

Umut SONGUR

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Agricultural Field Crops

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih KAHRIMAN

25/08/2020, 39

This thesis study has been conducted in order to examine the responses of the materials used against the in vivo haploid folding methods used in maize breeding, and also to compare the techniques used in haploid seed segregation. In this study work, three donors (DNR1, DRN4, DNR5) and two inducers line (CIM2GTAIL-P2, RWK-76xRWS) were used as materials. Donor materials and inducer lines have been grown under greenhouse conditions in September 2019 for the purpose of obtaining DH0 seeds. Haploid and diploid ones from seeds obtained from donors were classified by naked eye after the completion processes of pollination under greenhouse conditions. The classified seeds were coded and firstly, their pictures have been taken with the help of a desktop scanner and then reflectance data were collected on a benchtop NIR (Near Infrared Reflectance) spectroscopy device aim to not be mixed with each other. DH_0 seeds have been subjected to chromosome folding using two different proposed methods by Zabirova et al (1997) and CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center). After this process, when the seedlings reached a sufficient size, they were transplanted into the field in May 2020 and the classification of the plants has been recorded by considering the plant appearance and the colour of stalk. The data obtained from the initial classification and the final classification data were accepted as dependent variables, spectral data and image data (Blue, Green, Red band) were used for prediction and classification models generation. The classification capacities of the models have been evaluated by comparing them with the actual results of classification.

According to the findings of current study, it has been observed that the reactions of the donor and used inducer lines were found different against the chromosome doubling methods. Haploid reduction rates shown a variation between 9.2% and 16.1%. In the CIMMYT method, plant losses have been observed high both in seedling as well as transplanting stages. It has also been observed that there were considerable differences in terms of techniques used for haploid seed classification. Accuracy rates of models created based on seed images and spectral data were found to be 79% and 83%, respectively, while the accuracy rate of widely used naked eye-separation method was determined as 87%. The overall results of this study revealed that both of the spectral techniques and image processing technique could be used as classification tools for in vivo maternal haploid technique in maize breeding programs.

Keywords: Maize breeding, Inbred line, Ploidy, Seed classification

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vii
ABSTRACT ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
TABLOLAR DİZİNİ xiv
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
1.1. Genel Bilgiler 1
1.2. Mısır Islahında Geleneksel Yöntemlerle Saf Hat Geliştirme 2
1.3. Mısır ıslahında İn vivo Haploid Tekniği ile Saf Hat Geliştirme 3
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 7
2.1. İn vivo Haploid Teknolojisinin Tarihçesi 7
2.2. İn vivo Haploid Tekniği ile Islah Çalışmalarında Kullanılan İndirgeyici ve Donör Hatların Genotipik Tepkilerine Yönelik İncelen Çalışmalar 8
2.3. Mısır Islahında İn Vivo Maternal Haploid Tekniği İle Elde Edilen Tohumların Haploid/Diploid Olarak Tanımlanması Ve Kromozom Katlanmasına Yönelik İncelenen Çalışmalar 10
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 15
3.1. Materyal 15
3.1.1. Denemenin Kurulması ve Uygulama Aaşamaları 15
3.2. Yöntem 16
3.2.1. Birinci Aşama: KH_0 Tohumların Elde Edilmesi 16
3.2.2 İkinci Aşama: Tohumların Haploid/Diploid Olarak Sınıflandırılması 17
3.2.3. Üçüncü Aşama: Kromozom Katlama Yöntemleri Ve KH_1 Bitkilerin Tarlada Yetiştirilmesi ile Yanlış Sınıflandırılan Bitkilerin Tespiti 19
3.2.4 Yanlış Sınıflandırılan Bitkilerin Tespiti 21
3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi 21
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 23

4.1. Donör Materyallerin İndirgeyicilerle ve Katlama Yöntemleri ile Etkileşimi 23
4.2. Haploid/Diploid Tohumların Ayrım Yöntemlerinin Karşılaştırılması 25
4.2.1. Göz ile Haploid ve Diploid Tohumların Ayrımı 25
4.2.2. Görüntü Verilerine Dayalı Haploid ve Diploid Tohumların Ayrımı 26
4.2.3. Spektral Verilere Dayalı Haploid ve Diploid Tohumların Ayrımı 30
BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER 34
KAYNAKLAR 35
ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Türkiye, ABD ve Dünya'daki mısır veriminin kıyaslanması 1
Şekil 2. İn vivo katlanmış haploid tekniğinin çeşitleri 4
Şekil 3. İn vivo haploid tekniğinin tarihçesi 7
Şekil 4. Çalışmanın uygulama aşamaları 16
Şekil 5. Sera koşullarında kontrollü tozlama işlemi 17
Şekil 6. Haploid/diploid mısır tohumlarının embriyo renklenmesine göre göz ile ayrımı 17
Şekil 7. Tohumlardan alınan görüntüler 18
Şekil 8. Kök ucu kesme işlemi kromozom katlama 20
Şekil 9. Bitki sapına kolşisin enjeksiyonu 20
Şekil 10. KH_1 bitkilerin yetiştirilmesi 21
Şekil 11. KH_0 tohumların ilk sınıflamasına dayalı olarak tohum görüntülerinden oluşturulan SRA grafiği 28
Şekil 12. KH_0 tohumların tarlaya ekiminden sonra yapılan sınıflandırmaya dayalı olarak tohum görüntülerinden oluşturulan SRA grafiği 29
Şekil 13. Haploid/diploid tohumlardan alınan spektral ölçümlerle oluşturulan grafik 31

TABLOLAR DİZİNİ

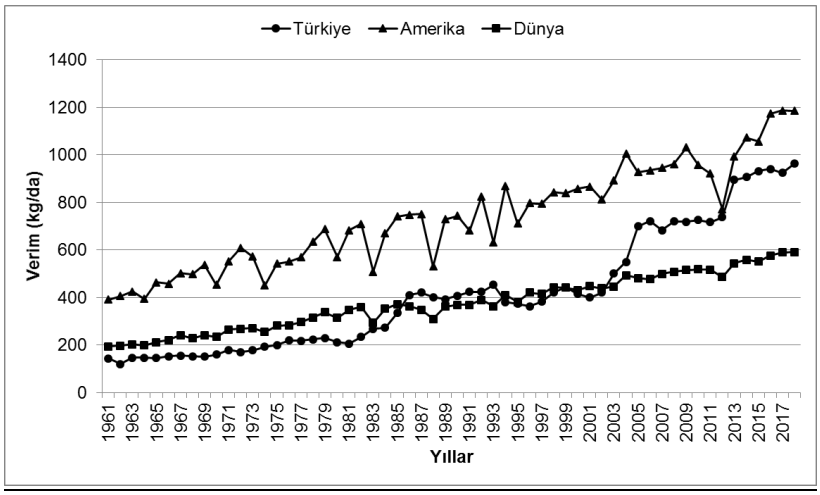
Sayfa No

Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyaller 15
Tablo 2. Sınıflama sonuçlarına ilişkin istatistiklerin hesaplandığı karşmaşıklık martisi 22
Tablo 3. Haploid indirgenme oranları 23
Tablo 4. Haploid çimlenme oranları 24
Tablo 5. Canlı kalan fide oranları 24
Tablo 6. Canlı kalan bitki oranları 25
Tablo 7. Göz ile yapılan ayrıma dayalı olarak diploid ve haploid tohumların başlangıç ve son sınıflama durumlarına ait DVM modelinden elde edilen karmaşıklık matrisi 25
Tablo 8. Haploid ve diploid tohumların göz ile yapılan başlangıç ve son gruplama verilerine dayalı olarak oluşturulan DVM modellerinin sınıflama başarısını gösteren değerlendirme istatistikleri 26
Tablo 9. Donörlerin son sınıflamasına göre haploid ve diploid tohumların farklı bantlardaki görüntülerine örnekler 27
Tablo 10. Görüntü verilerine dayalı olarak diploid ve haploid tohumların başlangıç ve son sınıflama durumlarına ait SRA modelinden elde edilen karmaşıklık matrisi 29
Tablo 11. Haploid ve diploid tohumların başlangıç ve son gruplama verilerine dayalı olarak oluşturulan SRA modellerinin sınıflama başarısını gösteren değerlendirme istatistikleri 30
Tablo 12. Spektral verilere dayalı olarak diploid ve haploid tohumların başlangıç ve son sınıflama durumlarına ait DVM modelinden elde edilen karmaşıklık matrisi 32
Tablo 13. Haploid ve diploid tohumların başlangıç ve son gruplama verilerine dayalı olarak oluşturulan DVM modellerinin sınıflama başarısını gösteren değerlendirme istatistikleri 33

BÖLÜM 1
GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Mısır (*Zea mays* L.) *Poaceae* (buğdaygiller) familyasına ait tek evcikli ve tek çenekli bir bitkidir. Anavatanı Amerika olarak bilinen mısır yüksek adaptasyon kabiliyetine sahip ve dünyanın birçok yerinde yetiştiriciliği yapılabilen bir sıcak iklim bitkisidir (Sezer ve Yanbeyi, 1997). Ülkemizde ve dünyada mısır ekim alanı oldukça fazladır. Ülkemizde tanelik mısır üretimi 638 bin hektarlık bir alanı kapsamaktadır ve bu ekilen alandan 6 milyon ton tanelik mısır üretilmekte olup 939 kg/da'lık verim elde edilmektedir (TUİK, 2019). Dünyaya kıyasla ülkemiz tanelik mısır veriminde dünya ortalamasının üstünde bir verim değerine sahiptir. Mısır dünya genelinde 193.7 milyon hektarlık ekiliş alanıyla 1.1 milyar ton üretim kapasitesine sahiptir ve 592 kg/da'lık verim elde edilmektedir (FAO, 2020). Mısır bitkisi, insan ve hayvan beslenmesinin yanı sıra endüstride de geniş kullanım alanı bulan buğday ve çeltikten sonra en fazla tarımı yapılan önemli ve stratejik bir bitkidir. Mısırın çeşitli endüstri dallarında hammadde olarak kullanılmasından dolayı mısır bitkisine olan talep dünya nüfusuna paralel olarak artmaktadır. Bu ihtiyaçları karşılamak için yüksek verimli ve kaliteli çeşitlerin ıslah edilmesi gerekmektedir (Kahrıman ve diğerleri, 2013). 1980 yılından itibaren dünyada hibrit mısır verimi ciddi şekilde artış göstermiştir (Şekil 1). Bu artışın temelinde gelişen tarım teknolojisi, modern ıslah metodları ve bilinçli üretici gibi etkenler yatmaktadır.



Şekil 1. Türkiye, ABD ve Dünya'daki mısır veriminin kıyaslanması (FAO, 2020)

Mısırda birim alan verimindeki artışa etki eden unsurlar içerisinde ıslah çalışmaları ile adaptasyon kabiyeti yüksek başarılı çeşitlerin geliştirilmesi önemli bir paya sahiptir. Başarılı çeşit ıslahı bu çeşitlerin ebeveyn hatların başarısına bağlıdır. Ebeveyn hatların saf hat olması ise F1 hibrit mısır üretiminin temel yaklaşımlarından birisidir. Bu bakımdan mısır ıslah programlarında saf hatların geliştirilmesi en önemli aşamalardan birisidir.

1.2. Mısır Islahında Geleneksel Yöntemlerle Saf Hat Geliştirme

Mısır yabancı döllenen bir bitki olduğu için istenilen özelliklere sahip hatların geliştirilmesi için belirli bir süre kendilenmesi gerekmektedir. Klasik ıslah yöntemleri ile bu işlemler en az 5-7 yıl sürmektedir. Klasik ıslah yöntemleri ile mısır saf hatlarının geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemler, kendileme, toptan seleksiyon, teksel seleksiyon ve geriye melezlemedir.

Bir mısır genotipinde heterezigot allellerin homozigot hale getirilmesi için fenotipik özellikler bakımından durulması için kendileme işlemi yapılır. Kendileme uygulaması 3 aşamada gerçekleştirilir.

1. aşama: Koçan sürgünü göründüğü anda koçan püskülünün dışardan toz almaması için izole edilir.

2. aşama: Tepe püskülü toz verdiği anda bir gün öncesinden koçan ucu kesilir ve tepe püskülü özel olarak üretilmiş tepe püskülü kapatma keseleriyle kapatılır.

3. aşama: Önceki gün kontrollü toz alabilmek için kapatılan tepe püskülünden toplanan tozlar aynı bitkinin koçan püskülüne dağıtılır.

Kendileme yolu ile saf hat geliştirmede bu işlem 6-8 nesil tekrar edilmektedir. Yapılan kendileme işlemi toptan veya tekrar seçme yöntemine uyumlu olarak uygulanabilmektedir.

Toptan seleksiyonda temel yaklaşım, istenilen karakter yönünden üstün genotiplerin seçilip, tohumlarının eşit oranda karıştırılarak ekilmesidir. Buradaki asıl amaç istenilen karakterdeki genotiplerin üzerinde çalışılan ıslah popülasyonu içerisindeki oranını yükseltmektir. Bu metodun en büyük avantajları, basit ve kolay olması, kalıtım derecesi yüksek olan karakterlerde etkili olmasıdır. Popülasyon geliştirme amacıyla sıklıkla başvurulan bir metottur

Teksel seçmede popülasyondan elit bitkiler seçilmek suretiyle seçilen elit bitkiler ayrı sıralarda ekilir ve yine yavru döllerden en iyi bitkiler seçilir. Bu yöntemin uygulanması 7-10 yıl arası bir zaman almaktadır ve bu sürenin sonunda yine de istenen başarının sağlanamama ihtimali vardır.

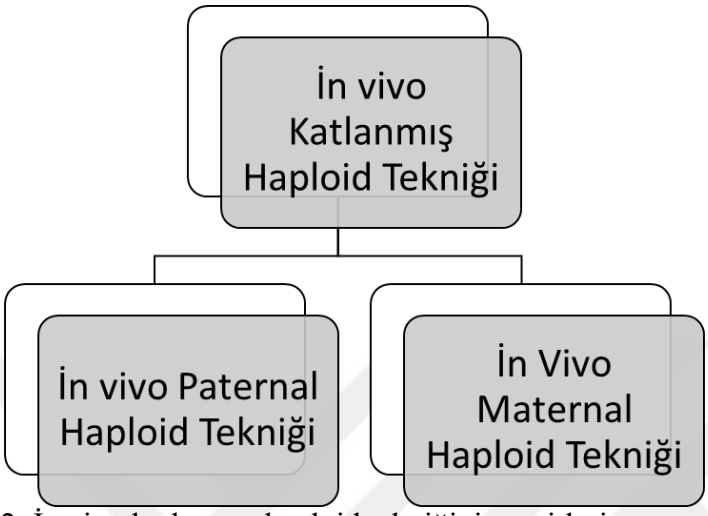
Geriye melezleme üstün bir genotipin istenilen özellikler açısından noksan olan bir veya birkaç karakterini iyileştirme amacına dayanmaktadır. Yöntemin uygulanmasında en önemli nokta anaç seçimidir. Burada anaçların birisi bölge şartlarına uyumlu ve verimli olması gerekir diğerinin ise ilk genotipte olmayan üstün karakteri taşıyan bir genotip olması gerekir. Uygulama süreci standart genotipin bütün karakterleriyle birlikte ikinci anacın üstün karakterlerini de taşıyan çeşit elde edilinceye kadar sürdürülür. Bu işlemde diğer klasik ıslah yöntemleri gibi 6-7 yıl sürmektedir. Geriye melezmele hastalıklara dayanıklı hat ve genetik kaynakların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.3. Mısır ıslahında İn vivo Haploid Tekniği ile Saf Hat Geliştirme

Yüksek verimli ve kaliteli mısır çeşitlerinin geliştirilmesi için sürekli olarak yeni saf hatların geliştirilmesi gerekmektedir. Geleneksel ıslah yöntemleri ile bu saf hatların elde edilmesi için 6-7 yıllık bir zaman gerekmekte olup bu 7 yılın sonunda istenilen düzeyde homozigotluk oranına ulaşılamamaktadır. Bitki ıslahçıları zaman tasarrufu sağlamak, maliyetleri azaltmak ve istenilen düzeyde homozigotluk oranını yakalamak için yeni ıslah teknolojilerine başvurmuşlardır. Bu yeni ıslah teknolojilerinin başında haploid bitki elde etme teknikleri gelmekte olup, bu teknik ıslahçılara önemli faydalar sağlamaktadır (Chase, 1969). Hibrit mısır ıslahında Katlanmış haploid (KH) hatları kullanmanın avantajları; i) yoklama melezi denemelerinde başarı şansını artırması, ii) elde edilen katlanmış haploid hatların %100 homozigot olması ve erken seçim sonuçlarının yüksek tekrarlanabilirliği, iii) istenilen genlerin bir genotipte toplanılması ile yüksek verimlilik göstermesi, iv) ıslah çalışmalarının daha uygulanabilir hale getirilmesi, maliyet ve zaman tasarufu sağlanması, v) birkaç sezon içinde geliştirilen hatların ticari olarak kullanılabilmesidir (Röber ve diğerleri, 2005).

Mısırda haploid bitki elde etme çalışmalarının 1920'lerde başlamıştır. Mısır ıslahında katlanmış haploid teknolojisi bir indirgeyici hat kullanarak in vivo indüksiyonu, haploidlerin sınıflandırılması, haploid kromozom katlanması ve katlanmış haploid bitkilerinden tohumlarının üretilmesi aşamalarını içermektedir (Prasanna ve diğerleri, 2012; Prigge ve Melchinger, 2012b). Mısır ıslahında katlanmış haploid teknolojisi özellikle ticari mısır üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tekniğin en büyük avantajlarının başında ıslah süresini 6-10 nesilden 2 nesile kısaltmakta ve %100 homozigotluk oranı sağlamasıdır (Vanous ve diğerleri, 2017). Bu teknik in vivo paternal katlanmış haploid ve in vivo maternal katlanmış haploid tekniği olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır (Şekil 2). İn vivo paternal haploid tekniğindede indirgeyici ana

donör hat baba olarak kullanılır iken, in vivo maternal haploid tekniğinde indirgeyici baba donör hat ana olarak kullanılmaktadır (Röber ve diğerleri, 2005; Chidzanga ve diğerleri, 2017). İn vivo maternal haploid tekniği uygulamada başarı oranı yüksek olduğu için daha yaygın tecih edilmektedir.



Şekil 2. İn vivo katlanmış haploid tekniğinin çeşitleri

Şu an kullanılan maternal haploid indirgeyicilerin hepsi Stock 6 isimli bir indirgeyici hatta dayanmaktadır. Stock 6'nın indükleme potansiyeli yaklaşık %1-2 civarındadır (Coe, 1959). Geçmişi Stock 6 ya dayanan RWS, KEMS, WS14 ve MHI yüksek haploid indirgeme oranlarına sahiptir (Röber ve diğerleri, 2005). Bu indirgeyici hatların şu anda ortalama indükleme potansiyelleri şu anda %8'dir (Prigge ve diğerleri, 2011). Bunun bir sonucu olarak mısır ıslah çalışmalarında in vivo haploid tekniğinin kullanımı bir hayli yaygınlaşmıştır. Günümüzde genetik temelleri tam olarak çözülmeyen bu teknikle ilgili temelde iki hipotez öne sürülmektedir (Prigge ve diğerleri, 2012c). Bu hipotezlerden birincisine göre yumurta hücresinin döllenmesi başarısız olmakta ve partenokarpik bir gelişim sonucu haploid embriyo oluşmaktadır. İkinci hipotez ise normal döllenme sonrasında indirgeyici kromozomların elemine olduğunu ileri sürmektedir (Prigge ve diğerleri, 2012c). Bu hipotezlerin öne sürdüğü mekanizmaların aydınlatılması için çalışmalar halen devam etmektedir.

İn vivo maternal haploid tekniğinin uygulanması üç temel aşamada gerçekleştirilmektedir. Bunlar;

i) Donör materyal ile indirgeyici hattın melezlenmesi

ii) Donör hat üzerinde oluşan KH_0 tohumlarda haloid ve diploid tohumların ayrılması

iii) Haploid tohumların kromozom katlamaya tabi tutulması ve KH_1 tohumların elde edilmesi adımlarıdır.

Bu aşamalar içerisinde indirgeyici hatlarla melezlenen materyallerdeki haploid/diploid bitkilerin ayrımı için tohum, kökçük ya da sap renklenmesine dayalı görsel seçim yöntemleri kullanılmaktadır. KH teknolojisinin geniş bir kullanım alanı mevcuttur. Bunlar; inbred hatların hızlı gelişimi, markör destekli geri melezleme, gen kaynaklarının korunması gibi uygulamalardır. Katlanmış haploid teknolojisi tamamen homozigot ve homojen bir hat elde etmek için ve bitki çeşitliliğinin korunması için gerekli tüm gereksinimleri karşılayan alternatifi az olan yöntemlerdendir (Liu ve diğerleri, 2016). Şu anda, KH teknolojisi dünya çapında ticari ıslah programlarında oldukça fazla bir şekilde kullanılmaktadır. Bu ıslah teknolojisinin mısır ıslah programlarının hızlandırılması için etkili ve güvenilir yoldur (Schmidt, 2003; Seitz, 2005; Chen ve diğerleri, 2009) ve bu tekniğin başarı durumuna bağlı olarak genelde mısır ve diğer ürünlerin ıslahının verimliliğini hızlandırmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Liu ve diğerleri, 2017).

Haploid ve diploid tohum ayrımı tohumun farklı bölgelerindeki antosiyanin renklenmesine göre yapılabilmektedir. Tohumunda antosiyanin bulundurmayan bir donör materyal indirgeyici hat ile melezlenmesinden elde edilen tohumlarda, embriyo ve taç bölgesinin her ikisinde de renklenme olan tohumlar diploid, yalnızca taç bölgesinde renklenme olanlar ise haploid olarak kabul edilmektedir (Chaikam ve diğerleri, 2012). Uygulamada in vivo katlanmış haploid tekniğinin başarılı sağlayabilmesi için donör materyal ile indirgeyici hatların melezlenmesinden elde edilen tohumların haploid/diploid olarak sınıflanması yüksek öneme sahiptir. Bu sınıflama işleminde farklı yöntemler uygulanmaktadır. Bu amaçla kullanılan başlıca yöntemler;

i) Göz ile ayırma
ii) Tohum görüntülerine dayalı olarak bilgisayar destekli ayırma
iii) Tohumlardan alınan sprektral verilere dayalı olarak ayırmadır.

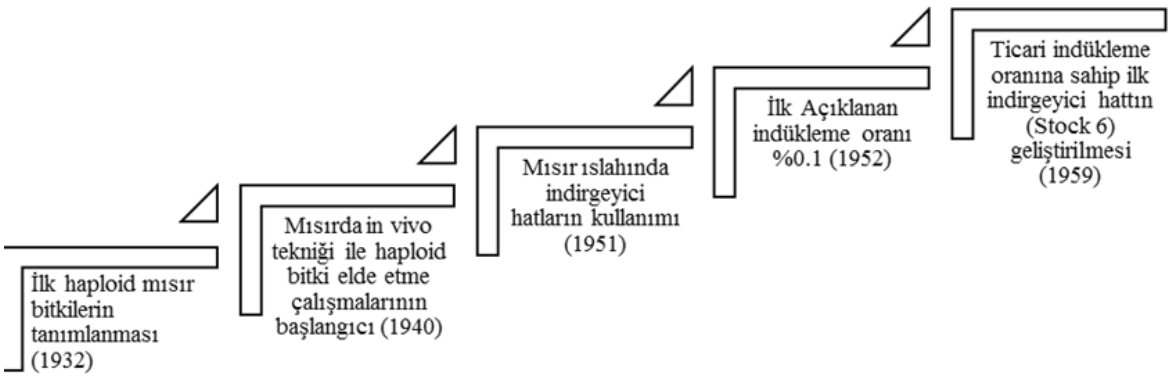
Bu yöntemler içerisinde yoğun olarak kullanılan yöntem göz ile ayırma olmasına rağmen bu yöntemin sınıflamada deneyimli personele ihtiyaç duyulması ve uzun zaman alması nedeniyle alternatif yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Tohum görüntülerin sayısallaştırılması veya spektral verilerin kullanıldığı bilgisayar destekli sınıflama modellerinin göz ile ayrımın dezavantajlarını ortadan kaldırabileceği yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Bu alanda halen farklı cihaz veya modelleme tekniklerinin kullanıldığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez in vivo haploid tekniğinin mısırda kullanımına yönelik iki farklı kromozom katlama yöntemin farklı indirgeyici ve donör materyallerde

kullanımını ve farklı haploid tohum seçme tekniklerinin başarı oranını konu edinmektedir. Tez çalışmasının amacı in vivo haploid tekniğinde uygulanan kromozom katlama yöntemlerinin kullanılan donörlerin indirgeme oranlarına etkisinin araştırılması ve haploid tohum ayırma amacıyla farklı teknikler karşılaştırılmasıdır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. İn vivo Haploid Teknolojisinin Tarihçesi

Mısır ıslahında in vivo haploid teknolojisinin tarihsel gelişimi oldukça eskilere dayanmaktadır (Şekil 3). Mısırda haploid bitki elde etme çalışmalarının başlangıcı 1920'lere kadar ulaşmaktadır. İlk haploid mısır bitkilerinin tanımlanması 1932 yılında olmuştur (Randolph, 1932). Katlanmış haploid hatların geliştirilme çalışmaları ticari hibritlerin geliştirilmesi ile hareketlenmiştir. Mısır ıslahında katlanmış haploidlerin kullanımı ilk olarak Chase tarafından uygulanmıştır. Chase (1951) tarafından yürütülen araştırmalarda başlangıçta spontan haploid indüksiyona bağlı indükleme oranını %0,1 olarak açıklanmıştır. Açıklanan bu oranın düşük olmasından dolayı ticari uygulamaya elverişli bulunmamıştır. Coe (1959) tarafından ticari olarak uygulanabilecek düzeyde haploid indükleme oranına sahip (%2-3) kendilenmiş Stock-6 hattı geliştirilmiş ve bu katlanmış haploid tekniği için büyük bir adım olmuştur. Stock-6 indirgeyici hattı daha sonra geliştirilen tüm indirgeyici hatların temelini oluşturmuştur (Coe, 1959). Bu tekniğin geçmişi eskilere dayanmakla birlikte son yıllarda tekrar in vivo haploid tekniği üzerine bilimsel çalışmaların arttığı gözlenmektedir. Bu çalışmaların büyük kısmı, haploid/diploid tohumların ayrımı, indirgeyici hatlar yardımıyla saf hat geliştirme, haploid indirgeme mekanizmasının genetik olarak çözümlenmesi ve yeni indirgeyici hatların geliştirilmesine odaklanmıştır.



Şekil 3. İn vivo haploid tekniğinin tarihçesi (Randolph, 1932; Chase, 1951; Chase, 1952; Coe 1959)

2.2. İn vivo Haploid Tekniği ile Islah Çalışmalarında Kullanılan İndirgeyici ve Donör Hatların Genotipik Tepkilerine Yönelik İncelen Çalışmalar

Chalyk (1994) maternal haploid mısır bitkilerinin özelliklerini incelediği çalışmada, farklı özellikler bakımından katlanmış haploid hatları inbred hatlarla karşılaştırmıştır. İki yıl süren çalışmada haploid indirgeyici olarak ZMS hattı kullanılmıştır. Toplamda birinci yıl 604 ve ikinci yıl 1030 haploid tohum elde edilmiştir. Çalışmanın ilk yılında, koçan başına ortalama 27,4 tohum, ikinci yılda 26,3 haploid tohum elde edilmiştir. Haploid bitkilerinin çoğunun çiçeklenme sırasında püsküllerinde anterler olmadığı ve neredeyse tamamen erkek kısırlık sergiledikleri gözlemlenmiştir. ZMS indirgeyici hattı kullanılarak çok sayıda maternal haploid mısır bitkilerinin üretilmiştir. Ancak bu hatların ıslah amaçlı kullanılmasında tepe püsküllerinin neredeyse tamamen steril olmasından kaynaklanan zorluklarla karşılaşılabildiği saptanmıştır.

Eder ve Chalyk (2002) iki indirgeyici hat (MHI ve M741H) ve donör materyal olarak da sert ve at dişi mısır genotipleri kullandıkları çalışmalarında, donörlerden %2,7 ile %8 arasında değişen oranlarda haploid tohum elde etmiştir. Kromozom katlanması için, fideler kolşisin çözeltisi ile muamele edilmiş ve haploid bitkilerin %49,4 ü verimli polen üretmiştir. Yarı-kardeş karşılıklı tekrarlayan seçim (Half-sib recurrent selection) ile geliştirilen sentetik popülsyonlar saha denemesinde test edilmiştir. Maternal haploid bitkilerin mısır ıslahı ve mısır genetiği için büyük bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir.

Prigge ve diğerleri (2011) Meksika'da yürüttükleri araştırmada 120 donör ve 3 farklı indirgeyici kullanmıştır. Tarla koşullarında elde edilen haploid indüksiyon oranları iki farklı haploid tanımlama sistemi ile belirlenmiştir. Haploid indükleme oranı için indirgeyiciler ve donör materyaller arasında oldukça anlamlı genotipik farklılıklar tespit edilmiş ancak bu faktörler arasındaki etkileşim önemsiz bulunmuştur. Tropik koşullar altında ortalama haploid indükleme oranı, ılıman koşullarda yapılan değerlendirmeler için daha önce yapılan araştırmalara benzer sonuçlara varılmış ve ılıman indirgeyicilerin tropik bölgelerde KH ıslah programlarının başlatılması için kullanılabileceğini göstermiştir. Çalışmada özellikle genetik tabanı farklılık gösteren donörlardan veya tanımlama markörünün ifadesinin zayıf olmasından dolayı beklenenden yüksek haploid indükleme oranları kaydedilmiştir. Tropikal bölgelerde katlanmış haploid tekniğinin kullanımı ile ilgili bir sorun olmadığı, fakat bu bölgelere iyi adapte tropik indirgeyicilerin geliştirilmesine ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Prigge ve diğerleri (2012a) tropikal koşullara daha iyi uyum sağlayan indirgeyiciler geliştirmek için HİO'ları %8-10 arasında olan ılıman indirgeyici hatlarla CIMMYT'in tropikal mısır hatları arasında melezleme yaparak yeni nesiller oluşturmuştur. Oluşturulan hatlar tropik koşullarda haploid indüksiyon oranı ve agronomik performans açısından değerlendirmiştir. Kalıtsal ve görsel olarak skorlanabilir özellikler kullanılarak F_2 bitkileri içerisinde toptan seleksiyona dayalı pedigri yöntemi uygulanmıştır. Tropik indirgeyicilerin indirme oranları %10 civarında bulunmuştur. Bu hatlar polen üretimi, hastalık direnci ve bitki canlılık özellikleri geliştirilmiştir. Agronomik özellikler bakımından CML ve indirgeyiciler karşılaştırıldığında önemli ölçüde gelişme kaydedildiği görülmüş, her iki popülasyonun ortalama haploid indükleme oranı benzer çıkmıştır.

Dang ve diğerleri (2012) tarafından yürütülen çalışmada subtropikal nitelikli mısır çeşitlerinden haploid döllerin üretimi için üç modern indirgeyici hattın performansları karşılaştırmıştır. İkisi opak biri mumsu mısır olmak üzere 3 adet Çin kökenli hibrit mısır deneme materyali olarak kullanılmıştır. Antosiyanin pigmentasyonuna bağlı olarak haploid tohumların arasında akış sitometrisi ile yanlış sınıflandırılan haploidler ayırt edilmiştir. Bu yanlış sınıflamanın nedeni olarak, ana bitki materyalinde indüklenen tohumların neredeyse %50'sinde renk ifadesinin engellenmesi olarak gösterilmiştir. Çalışmada akış sitometrisi ile, haploid indüksiyon oranları %10,2-12,3 ile yüksek bir indükleme oranı tespit edilmiştir. Kromozom katlama oranlarının ise %50 civarında olduğu saptanmıştır. Araştırmada gerçekte indüklenen haploid tohumlarının kesin ve hızlı bir şekilde tanınması için indirgeyici hatların daha da geliştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Ayrıca mısır ıslahında modern indirgeyici hatların kullanılmasının elit inbred hatların oluşturulması için gereken süreyi önemli ölçüde azaltabileceği vurgulanmıştır

Cerit ve diğerleri (2016) katlanmış haploid hat geliştirmek amacıyla farklı indirgeyici hatların indirgenme oranlarını belirlenmesini amaçlamışlardır. İndirgeyici olarak RWS, RWK-76 hatlarını ve bu hatların melezi olan RWS/RWK-76 ve Stock-6 hatları kullanılmıştır. Haploid tohum seçimleri renk markörüne göre yapılmış olup toplamda 1463 adet haploid tohum seçilmiştir. Elde edilen haploid tohum oranları indirgeyiciden indirgeyiciye farklılık göstermiştir. En yüksek haploid tohum oranı %7,80 ile RWK-76 hattından elde edilmiştir. En düşük haploid tohum oranı ise %1,28 Stock-6 hattından elde edilmiştir.

Zararsız ve diğerleri (2019) in vivo maternal haploid tekniği kullanarak mısır bitkisinde katlanmış haploid bitkilerin indüksiyon oranını incelemiştir. Çalışmada toplam 7 donör ve indirgeyici hat olarak RWK-76xRWS hattı kullanılmıştır. Sera şartlarında

gerçekleştirilen çalışmada, ortalama haploid indüksiyon oranı %7,1 ile 12,8 arasında değişmiştir. Kolşisin uygulamasından sonra seradaki fidelerin hayatta kalma oranı %57,9 ila %77,6 olarak belirlenmiş ve tarlaya şaşırtılma işleminden sonra bu bitkilerin %78,3 ila %92,6'sının hayatta kaldığı saptanmıştır. Donör materyale bağlı olarak maternal kromozom katlanma oranı %22,5 ila %48,3 arasında değişmiştir. Ortaya çıkan haploid indüksiyon oranı üzerine, kullanılan donör, indirgeyici hattın ve çevrenin etkili olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada ortalama kromozom katlanma oranı yapılan diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Nair ve diğerleri (2020) donörların haploid indükleme oranı üzerindeki etkisini, iki ilişkilendirme haritalandırma paneline ayrılmış toplam 671 tropik inbred hat kullanarak analiz etmeyi amaçlamıştır. Bu iki ilişkilendirme haritalama paneli (AMP1 ve AMP2) iki farklı tropik indirgeyici hattı ile melezlenmiştir. Haploid indükleme oranının değerlendirmesi için, indüksiyon melezlerinden elde edilen tohumlar tarlaya ekilmiş ve hayatta kalan her bitkinin ploidi durumu, haploid ve diploid bitkiler arasındaki görsel farklılıklara dayalı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) markör sistemi kullanılarak haploid indirgeme oranları ile moleküler bağlantısı olan markörler belirlenmiştir. Haploid sınıflamada SNP analiz sonuçlarının da kullanılması sınıflama başarısını artırmıştır.

2.3. Mısır Islahında İn Vivo Maternal Haploid Tekniği İle Elde Edilen Tohumların Haploid/Diploid Olarak Tanımlanması Ve Kromozom Katlanmasına Yönelik İncelenen Çalışmalar

Röber ve diğerleri (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 hatlar elde edilemediğini belirtmiştir. Bu bakımdan, in vivo maternal haploid bitkilerden kromozom katlaması yoluyla %100 homozigot genotip elde edilebildiğini ve zaman tasarrufu sağlanacağını vurgulamıştır.

Geiger ve Gordillo (2009) günümüzde geliştirilen katlanmış hatların büyük çoğunluğunun in vivo haploid tekniği sayesinde elde edildiğini vurgulamışlardır. Haploid bitki elde etme çalışmalarının kontrollü ortamda el ile yapılması tavsiye edilmiştir. Haploid bitki elde çalışmalarında indirgeyici hatlar tozlayıcı olarak kullanılmış ve donör olarak kullanılan bitkinin koçanlarında haploid ve diploid tohumların oluşmasını sağlamışlardır. Elde edilen tohumlar haploid ve diploid olarak tanımlandıktan sonra haploid olarak seçilen

tohumlar çimlendirilmiş ve çimlenen tohumlara kolşisin ile muamele edilip kromozom kromozom katlanmasının gerçekleşmesi sağlanılmıştır. Bu sayede %100 homozigot katlanmış hatlar elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Chaikam ve Boddupali (2012) haploid tohumların diploid tohumlardan ayrılmasının in vivo haploid tekniğini daha avantajlı hale getireceğini, maliyet ve zaman tasarrufu sağlayacağını bildirmiştir. Araştırmacılar R1-nj renk markörü'nün tohum evresinde haploidlerin diploidlerden ayırılmasında sıklıkla kullanıldığını ve haploid tohumların diploid tohumlardan ayrılmasının ticari anlamda önemli avantajlar sağlayacağını savunmuştur. Tarlaya şaşırtıldıktan sonra haploid bitkilerin diploid bitkilerden ayrımı ise, haploid bitkilerin diploid bitkilere göre daha kısa ve dik yapraklara sahip olması ve çiçek organlarının kısır olmasına göre gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir.

Chaikam ve diğerleri (2012) tohum döneminde haploidlerin diploidlerden doğru şekilde ayırılmasının, işçilik, sera çalışmaları ve kullanılacak tarla alanının azaltılması gibi avantajlarının olduğunu bildirmiştir. Çalışmada genetik markör sistemlerinden bağımsız olarak herhangi bir indüksiyon çaprazında kullanılabilen haploidlerin ve diploidlerin fide özelliklerine dayanan yeni bir haploid/diploid tanımlaması yöntemi önerilmiştir. Ayrıca KH ıslah tekniğinde n kromozoma sahip haploid genomların kolşisin ile muamele edilip, kendilenmesiyle 2n kromozoma sahip %100 saf hatlar elde edildiğini belirtmiştir.

Couto ve diğerleri (2013) haploid tohumları akış sitometrisi ile ayırmak ve bu tohumların moleküler içeriğini morfolojik ve morfometrik özellikleriyle ilişkilendirmek için yürttükleri çalışmada ayrıca mikrosatellit moleküler markörlerden de yararlanmıştır. İndirgeyici hat olarak W23 hattı ve donör materyal olarak da P30F90 hattı kullanılmıştır. Tohum örneklerden haploid tohumlar embriyo ve taç bölgesindeki renklenmeye göre göz ile ayrılmıştır. Ayrılan örnekler tohum morfolojisi, tohum morfometrisi ve nükleer DNA içeriğine göre karakterize edilmiştir. Sitometri analizleri tanımlanan haploidlerin hepsi küçük boyutlu, kırılgan yaprakları olan bitkiler olarak tespit edilmiştir. Haploid tohumlarının ağırlığı, uzunluğu, kalınlığı ve genişliği çok değişkenlik göstermiş olup, bu morfometrik özelliklerin haploid tohumlarının görsel seçimi için güvenilir veri oluşturmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca mikrosatellit moleküler markörlerin, haploid tohumların doğrulanmasında etkili olduğu kanıtlamıştır.

Junxiong ve diğerleri (2011) haploid tohumların BPNN modeline göre tohum görüntülerinden yararlanarak haploid ve diploid tohumların ayrımı için bir araştırma yürütülmüştür. Yapılan çalışmada renk özelliklerine göre, mısır tohumu görüntüleri mor alan, sarı alan ve beyaz alan olmak üzere üç renk desenine ayırılmıştır. RGB ve HSV renk

aralıklarının farklı renk özellikleri analiz edilmiş ve bilgisayar destekli BPNN modeli oluşturulmuştur. Model mor işaretli alan için %97,61, sarı alan için %93,34 ve beyaz alan için %94,09' lük bir doğruluk oranı sağlamıştır. BPNN modeli ile mor işaret alanın haploid tohumların ve hibrit tohumların tanımlanmasında etkili ve güvenilir olduğu saptanmıştır.

Melchinger ve diğerleri (2013) in vivo haploid indüksiyonundan sonra haploid tohumların hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması gerektiğini vurgulamıştır. Araştırmacılar haploid tohumların diploid tohumlardan ayırt edilmesi için yüksek yağ içeren indirgeyici hat kullanılması sonucu elde edilen tohum örneklerinde yağ içeriğindeki farklılıklara dayanan alternatif bir yöntem önermişlerdir. Bu yaklaşım mısırda katlanmış haploid teknolojisinde yeni atılım olmuş ve dünya çapında herhangi bir mısır tohumu için uygulanabilir olduğu öne sürülmüştür.

Zhang ve diğerleri (2013) in vivo katlanmış haploid tekniğinde, embriyonun karakteristik özelliklerini ortaya çıkarmak için bir görüntü bölütlendirme yöntemini önermiştir. R1-nj genetik markörünü taşıyan mısır tohumlarının embriyo görüntüleri çıkarılmıştır. Mısır tohumlarının hızlı bir tanıma algoritmasını oluşturmak için embriyo bölgesindeki RGB renk aralıkları çıkarılmış ve her tohum için R1-nj piksellerinin sayısı hangi sınıflandırmaya ait olduğunu değerlendirmek için sayılmıştır. Çalışmada materyal olarak kullanılan LC9124-UH400 mısır tohumları için dinamik sınıflandırma testi sonucunda haploid tohumlar için doğru tanıma oranının %98,04 olarak bulunmuştur.

Liu ve diğerleri (2015) haploid mısır tohumlarını görüntü tanıma teknolojisine dayanarak tanımlamak için görünür (VIS) bölge spektroskopisi ve destek vektör makinelerini (DVM) kullanmıştır. Araştırmada 9 genotipten 141 haploid ve 141 diploid tohum olmak üzere tohumların ayrı ayrı geçirim spektrumlarını, taşınabilir bir UV-Vis spektrometresi kullanarak toplanmıştır. Ham spektral veriler, düzgünleştirme ve vektör normalleştirme yöntemleri kullanılarak ön işlemden geçirilmiş olup istenen özellikteki dalga boyları Kolmogorov-Smirnov testinin sonuçlarına göre seçilmiştir. Bu işlem sonrasında oluşturulan modelin ortalama doğru tanımlama oranı %92,06 çıkmıştır. Bu sonuç haploid mısır tohumlarını tanımlamak için VIS spektroskopisinden yararlanılabileceğini göstermiştir.

Qin ve diğerleri (2016) tarafından yürütülen çalışmada haploid mısır tohumlarını tanımlamak için microNIR-1700 serisi minyatür yakın kızılötesi spektrometre kullanılmıştır. Yakın kızılötesi spektroskopisi (NIRs) ile yansıma ve geçirgenlik modlarında kaydedilen verilerle oluşturulan modellerin doğru tanıma oranları hesaplanmıştır. Yapılan ölçümlerde yansıtma modunda alınan ölçümler için, embriyo

pozisyonlarına bakılmaksızın ortalama tanıma oranı %60'ın altında çıkmıştır. Ancak geçirgenlik modunda ortalama tanıma oranı %93,2 seviyelerine ulaşmıştır. Yapılan çalışma sonuçları, yansıma verilerine dayalı yanıma oranının embriyo pozisyonundan ciddi şekilde etkilendiğini, buna karşın geçirgenlik modunda embriyo pozisyonunun tanıma oranı üzerinde daha az etkili olduğunu göstermiştir.

Boote ve diğerleri (2016) R1-nj renk markeri kullanılarak haploid mısır tohumların ayrımı için floresan mikrospektroskopisi ve görüntülemeye dayalı yeni bir floresan bazlı yöntem geliştirmişlerdir. Embriyonik bölgede renklenme gösteren diploid tohumların floresan tepkisinin düşük yoğunlukta olduğu ve embriyo bölgesinde renklenme olmayan haploid tohumların ise floresan tepkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu yöntem ile karışık bir örnekte haploid tohumları ayırmak için floresan görüntülere yoğunluk ve alan eşikleri uygulanmış %80'in üzerinde sınıflandırma başarısı elde edilmiştir. Floresan görüntülemenin, tohum ayrımı için kullanılan mevcut teknolojilerle birleştirildiğinde yüksek verimli sınıflandırma potansiyeli ile bu amaçla kullanılabilecek bir alternatif haline getirilebileceği öne sürülmüştür.

Fuente ve diğerleri (2017) videometerLab 3 sistemini kullanarak haploid tohumların tanımlanması için yaptığı çalışmada donör olarak 6 kendilenmiş hat ve indirgeyici olarak RWS/RWK-76 hattını kullanmıştır. Her hat için bir tohum olacak şekilde örnekler el ile sıralanmış ve VideometerLab 3 sistemi kullanılarak, haploidler ve diploidler arasında ayrım yapmak için spektral görüntüleme tekniğinden yararlanılmıştır. Test edilen tohumun haploid/diploid olma durumunu doğrulamak için DNA işaretleyicileri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda haploid olarak tanımlanması amacıyla %50'nin üzerinde bir doğruluk oranı sağlanmıştır.

Wang ve diğerleri (2018) diploid ve haploid mısır tohumlarının yüksek doğruluklu bir tanımlama modelini oluşturmak amacıyla LSTM-CNN algoritması ve optimum dalga boyu seçimine dayanan bir teknik kullanmışlardır. Oluşturulan model, 862,9-1704,2 nm spektral bölgesinde 256 dalga boyununda tohum görüntülerini toplamış ve yüksek gürültülü dalga bandı aralıkları LTSM tekniği kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Optimum veri dalga bandı aralıkları, konvolüsyonel sinir ağları (CNN) ile belirlenmiştir. Derin öğrenme ve hiperspektral görüntüleme teknolojisine dayanan çalışmada %97'ye varan doğruluk değerine ulaşılmıştır. Önerilen modelin haploid mısır tohumlarını tanımlaması amacıyla başarı ile kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Altuntaş ve diğerleri (2018) haploid ve diploid mısır tohumlarını görüntü işleme teknikleri ve destek vektör makineleri kullanarak sınıflandıracak bir yöntem önermiştir.

Önerilen yöntemin başarısı 10 kat çapraz doğrulama yöntemi ile sınanmıştır. Bu test sonucunda haploid mısır tohumu sınıflandırma başarı oranı %94,25 diploid mısır tohumu sınıflandırma başarı oranı ise %77,91 olarak tespit edilmiştir. Haploid ve diploid mısır tohumlarının sınıflandırılmasında embriyo ve endosperm bölgelerinden çıkarılan özniteliklerin sınıflandırma başarısı açısından doğru ve yeterli olduğu değerlendirilmiştir.

Altuntaş ve diğerleri (2019a) tarafından yürütülen başka bir çalışmada haploid ve diploid msıır tohumlarını otomatik olarak sınıflandırmak için konvolüsyonel sinir ağları (CNN) kullanılmıştır. Tohumların sınıflandırılması için AlexNet, VVGNet, GoogLeNet ve ResNet teknikleri uygulanmıştır. 1230 haploid ve 1770 diploid mısır tohumu görüntülerinden oluşan bir veri seti kullanılarak sınıflandırma analizleri yapılmıştır. Tohumlar, R1-nj antosiyanin markörü dikkate alınarak sınıflandırılmıştır. CNN modellerinin başarısını ölçmek için, karışıklık matrisine dayalı olarak hesaplanan doğruluk, duyarlılık, özgüllük, kalite endeksi ve F-skoru gibi çeşitli performans ölçüleri kullanılmıştır. Çalışmada CNN modelleri umut verici sonuçlar vermiş ve VGG-19 ile en verimli sonuçlar elde edilmiştir. Vgg-19'un doğruluğu, duyarlılığı, özgüllüğü, kalite indeksi ve F-skoru sırasıyla %94,22, 94,58%, 93,97%, 94,27%, ve %93,07 olarak ölçülmüştür. CNN modellerinin haploid mısır tohumlarını tanımada yararlı bir araç olabileceği kanıtlanmıştır.

Altuntaş ve diğerleri (2019b) 3000 mısır tohumu ile yürüttükleri çalışmada bilgisayar öğrenmesine dayalı bir yöntem ile haploid ve diploid tohumları sınıflandırmıştır. Mısır tohum embriyoları k-ortalamalar kümeleme metodu ile bölütlenmiştir. Her renk kanalı için ilk dört dereceden RGB, HSV ve Lab renk uzaylarında renk momentleri çıkarılmıştır. Her renk uzayı için 12 öznitelik kullanılmıştır. Elde edilen öznitelikler destek vektör makinesi yöntemi ile modelleme işlemine tabi tutulmuştur. Daha genel sonuçlar elde edebilmek için 10-kat çapraz doğrulama yöntemi 20 kez tekrar edilmiştir. En iyi performans %87,03 doğruluk, %80,15 duyarlılık ve %93,00 özgünlük değerleriyle Lab renk uzayında ölçülmüştür.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada indirgeyici hat olarak CIMMYT'ten temin edilen CIM2GTAIL-P2 hattı ve AGROMAR Marmara Tarım Ürünleri A.Ş'den temin edilen RWK-76xRWS hatları kullanılmıştır. Donör olarak kullanılan materyaller ise (DNR1901, DNR1904, DNR1905) AGROMAR Marmara Tarım Ürünleri A.Ş'den temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan materyaller hakkında genel bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur.

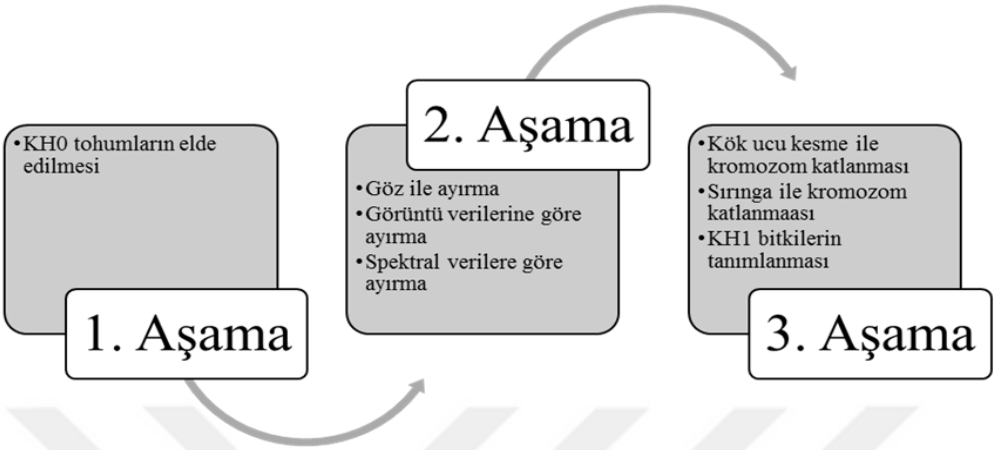
Tablo 1
Tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyaller

Genotip Adı/Kodu	Niteliği	Temin Edildiği Yer
DNR1	Donör hat	AGROMAR A.Ş.
DNR4	Donör hat	AGROMAR A.Ş.
DNR5	Donör hat	AGROMAR A.Ş.
RWK-76xRWS	İndirgeyici hat	AGROMAR A.Ş.
CIM2GTAIL-P2	İndirgeyici hat	CIMMYT

3.1.1. Denemenin Kurulması ve Uygulama Aaşamaları

Deneme (2019-2020) sonbahar-kış sezonunda Çanakkale ilinde ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Çiftliği Bitkisel Üretim Araştırma ve Uygulama Birimi ile Bursa İli Karacabey ilçesinde bulunan AGROMAR A.Ş.'nin araştırma deneme alanlarında sera koşullarında 2 ayrı deneme olarak eş zamanlı yürütülmüştür. Çanakkale lokasyonunda CIMMYT'ten temin edilen hat ile indüksiyon yapılırken Karacabey lokasyonunda ise AGROMAR A.Ş'den temin edilen hat ile indüksiyon işlemi yapılıp KH_0 tohumlar elde edilmiştir. Çalışmada materyal olarak kullanılan donör genotipler indirgeyici hatlarla kontrollü tozlama yöntemleri kullanılarak melezlenmiştir. Melezlenen bitkilerden elde edilen KHO tohumlardan üç farklı yöntem kullanılarak haploid tohumlar ayırılmıştır. Ayrılan tohumlarda CIMMYT tarafından önerilen kök ucunun kesilmesi ile kolşisin çözeltisinin uygulanması ve Zabirova ve diğerleri (1996) tarafından önerilen fide oluştuktan sonra bitki sapına kolşisin kimyasalı enjeksiyonu yöntemlerine dayalı iki farklı kromozom katlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kromozom katlamaya tabi tutulan tohumlar tarlaya şaşırtılmştır. Bu bitkiler sap renklenmesine göre görsel olarak haploid/diploid olarak kayıt altına alınmıştır. Çalışma 3 ana aşama olarak yürütülmüştür. Şekil 5'te bu safhalar belirtilmiştir.

Çalışmanın uygulama safhaları ile ilgili detaylı bilgiler ise başlıklar halinde yöntem kısmında sunulmuştur.



Şekil 4. Çalışmanın uygulama aşamaları

3.2. Yöntem

3.2.1. Birinci Aşama: KH_0 Tohumların Elde Edilmesi

Donör hatlar ile indirgeyici hatların melezlenmesi ve KH_0 tohumlarının elde edilme işlemi ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Çiftliği, Bitkisel Üretim Uygulama ve Araştırma biriminde ve AGROMAR Marmara Tarım Ürünleri A.Ş'de bulunan tam otomasyonlu sera şartlarında geçekleştirilmiştir. Bitkilerin çiçeklenme zamanlarının denk gelmesi için indirgeyiciler 3 ayrı grup halinde 7'şer gün aralıklarla çimlendirilip saksılara şaşırtılmıştır. Ekilen materyaller çiçeklenme zamanına geldiğinde her bir indirgeyici hat baba olarak kullanılmak suretiyle her donör genotipe ait bitki ile tozlama işlemi gerçekleştirimişr. Tozlama işleminde indirgeyici hatların tepe püsküllleri polen vermeye başladığında, tepe püskülü kâğıdı ile kapatılmıştır. Donör bitkilerin kendilerinden toz almalarını önlemek için tepe püskülleri göründüğünde kesilerek uzaklaştırılmış ve koçan püskülü çıkmadan kontrolsüz tozlanmayı önlemek için koçan sürgünleri koçan kâğıdı ile koruma altına alınmıştır (Kahrıman, 2016). Koçan sürgünü koruma altına alınan donör bitkilerin koçan püskülü yeterince gelişen bitkilere indirgeyici hatlardan toplanan tozlar kontrollü şekilde dağıtılmıştır. Bu şekilde elde edilen KH_0 bitkiler fizyolojik oluma ulaşana kadar gerekli tarımsal işlemler uygulanarak koçanları hasat edilmiştir. Hasat edilen koçanlar tanelenip ve laboratuvar ortamında haploid tohumların ayrılması amacıyla üç farklı yöntem kullanılarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 5. Sera koşullarında kontrollü tozlama işlemi

3.2.2 İkinci Aşama: Tohumların Haploid/Diploid Olarak Sınıflandırılması

Bu aşamada ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, indirgeyici hat ile donör bitkilerin melezlenmesi sonucu elde edilen tohumlarının ayrılması amacıyla üç yöntemden yararlanılmıştır. Bu yöntemlerin uygulanma aşamaları aşağıdaki gibidir.

Göz İle Ayırma

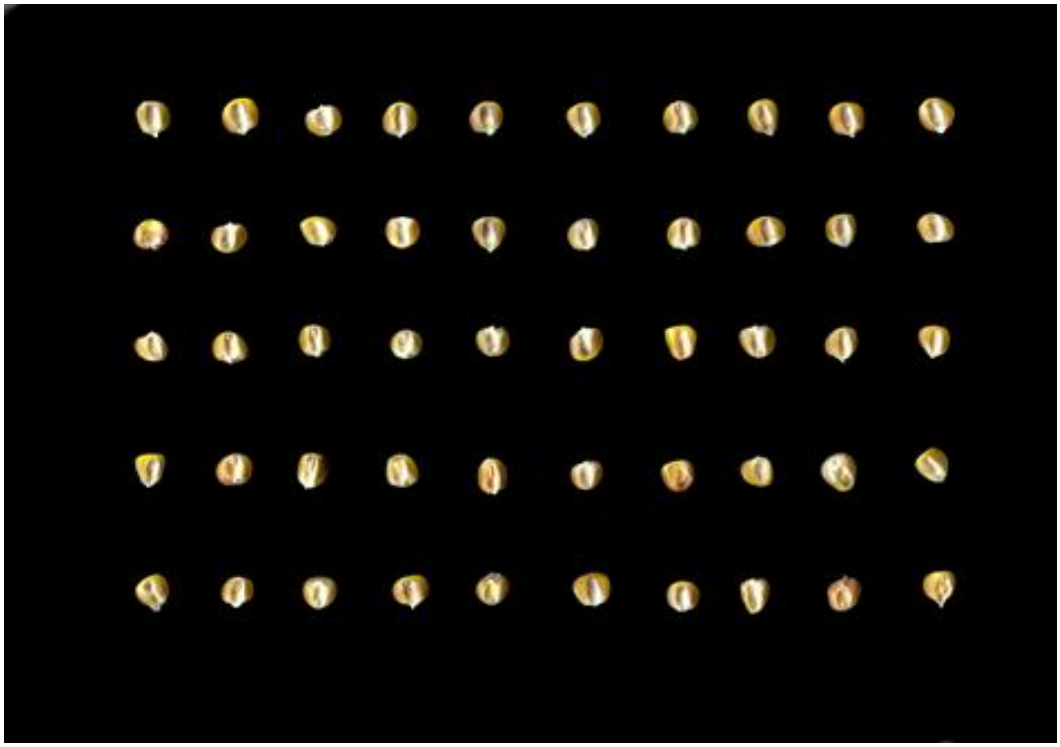
Bu yöntemde indirgeyici hatlarla melezlenen donör bitkilerden elde edilen KH_0 tohumlar laboratuvar ortamında göz ile sınıflandırılımıştır. Haploid olan ve olmayan tohumların ayrımında eğer incelenen tohumun yalnızca taç bölgesinde renklenme var ise bu tohum haploid olarak kabul edilmiş, hem taç bölgesi hem embriyo bölgesinde renklenme var ise bu tohum diploid olarak kabul edilmiştir, hiç renklenme yok ise tip dışı (bulaşık) tohum olarak değerlendirmeye alınmıştır. Göz ile ayrılan tohumlar KH_1 bitkiler elde edilinceye kadar birbirine karışmaması için kodlanarak daha sonrasıda tohum bazlı veriler alınmıştır. Çalışmızda kontrollü tozlama yöntemleri kullanıldığından bulaşık tohum gözlenmemiştir.



Şekil 6. Haploid/diploid mısır tohumlarının embriyo renklenmesine göre göz ile ayrımı

Görüntü İşleme İle Ayırma

Görüntü işleme yolu ile ayrım Altuntaş ve diğerleri (2018) tarafından önerilen yöntem üzerine bazı revizyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 7). Her genotip için göz ile seçilen KH_0 tohumlar her bir genotip için embriyoları yukarıda olacak şekilde ve 50'şerli gruplar halinde masaüstü tarayıcı (HP Scanjet) ile görüntüleri alınmıştır.



Şekil 7. Tohumlardan alınan görüntüler

Tohumlardan alınan görüntülerde embriyo ve endosperm bölgelerinin R, G, B kanallarının piksel değerlerinin toplam piksel değerine bölünmesi ile hesaplanmıştır. Alınan bu görüntüler önce bölütleme, daha sonra öz nitelik çıkarımı ve son olarak destek vektör makineleri (DVM) yöntemi kullanılarak sınıflama işlemine tabi tutulmuştur. Sınıflama işleminde haploid tohumlar ile diploid tohumları ayıran bir hiper düzlemin belirlenmesi amacıyla çekirdek fonksiyonu olarak radyal tabanlı fonksiyon kullanılmıştır. Bu analizlere ilaveten R, G, B kanallarındaki değerlerin sınıflamaya etkisi belirlemek ve sınır değerleri tespit etmek amacıyla Sınıflama ve Regresyon Ağacı (SRA) yönteminden yararlanılmıştır. Bu analizlerde bağımlı değişken olarak başlangıç ve son sınıflama değerleri ayrı ayrı atanmış ve bağımsız değişkenler ise tüm tohuma ait R, G, B kanalları ile embriyo bölgesine ait R, G, B kanallarına ait veriler kullanılmıştır. Görüntü işleme ile ilgili hesaplama ve sınıflama analizleri R programında gerçekleştirilmiştir (R Core Team, 2019).

NIR Spektroskopisi ile Ayırma

Göz ile ve görüntü işleme yolu ile sınıflamada kullanılan her bir tohumdan ayrı ayrı 1200-2400 nm arasında her bir nm dalga boyunda tohumların embriyo yönünden spektral veriler alınmıştır. Bu amaçla NIR spektroskopi cihazında (Spectrastar 2400D, Unity Scientific, USA) tek tohum ölçümüne uygun olan özel bir kap kullanılmıştır. Alınan spektral veriler tohuma verilen kod ile kayıt altına alınmıştır. Bu spektral veriler tahminleyici değişken olarak, göz ve görüntü işleme yolu ile gruplandırılan tohumların sınıflama verileri (haploid, diploid olma) ise bağımlı değişken olarak kullanılmak suretiyle destek vektör makineleri (DVM) sınıflama yöntemiyle tahmin modelleri oluşturulmuştur. Spektral verilere dayanarak oluşturulan modelin doğru sınıflama oranı kalibrasyon setinin dışında bulunan örneklerden alınan spektrumların modele uygulanması sonucu elde edilen sonuçların, bu örneklere ait gerçek sınıf değerleri ile karşılaştırılması vasıtasıyla belirlenmiştir. Spektral verilerin analizinde R paket programı (R Core Team, 2019) yazılımı kullanılmıştır.

3.2.3. Üçüncü Aşama: Kromozom Katlama Yöntemleri Ve KH_1 Bitkilerin Tarlada Yetiştirilmesi ile Yanlış Sınıflandırılan Bitkilerin Tespiti

Bu aşamada in vivo haploid tekniğinde kromozom katlama işlemi iki farklı yöntem ile uygulanmıştır. Bu iki yöntem temel olarak kromozom katlamaya sebep olan kimyasalların uygulanma biçimleri bakımından farklılık gösteren tekniklerdir. Kromozom katlama işlemi, KH_1 bitkilerin yetiştirilmesi ve haploid/diploid tohum sınıflamasının kayıt altına alınması AGROMAR Marmara Tarım Ürünleri A.Ş'nin mısır ıslah istasyonunda gerçekleştirilmiştir.

Kök Ucu Kesme Yöntemi ile Kromozom Katlanması

Bu yöntem CIMMYT tarafından önerilen ve yaygın olarak bilimsel çalışmalarda karşılaşılan in vivo haploid tekniğidir (Prassana ve diğerleri, 2012). İndirgeyici genotiplerle melezlenen donör bitkilerden elde edilen haploid tohumların yarısı kod numaralarına göre karışmayacak şekilde 25 °C'de 7 gün boyunca çimlendirilme dolabına konulmuştur. Çimlenen haploid tohumların kök uçları 2-3 cm bistüri yardımı ile kesilerek %0,06 kolçisin ve %0,05 DMSO (dimetil sulfoksit) bulunduran solüsyonunda 12 saat boyunca kolçisin tankında bekletilmiştir (Şekil 8). Bu inkubasyonun ardından alınan fideler tohum kodlarındaki sıra dikkate alınarak viyollere aktarılmıştır. Fideler alışma evresini geçirene kadar sera şartlarında tutulmuştur. Bu uygulama esnasında yöntemin

başarısı ile ilgili hesaplamalarda kullanılmak üzere çimlenen tohum sayısı kayıt altına alınmış, çimlenmeyen tohumlarla ilgili de kayıt alınarak şaşırtma aşamasında çimlenme durumuna göre parsellere şaşırtma işlemi gerçekleştirilmiştir. Diploid tohumlar da haploid tohumlarla eş zamanlı olarak çimlendirilerek ve katlama işlemi uygulamaksızın fide oluşumundan sonra tarlaya şaşırtılmıştır



Şekil 8. Kök ucu kesme işlemi kromozom katlama

Şırınga ile Bitki Sapına Enjeksiyon Yöntemi ile Kromozom Katlanması

Bu yöntem Zabirova ve diğerleri (1996) tarafından geliştirilmiş olup, CIMMYT yönteminden farklı olarak haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması aşamasında yapılan işlem bakımından farklılık göstermektedir. İndüksiyon melezlemesine tabi tutulan donör bitkilerden elde edilen geriye kalan 50 haploid tohum verilen kodlar karışmayacak şekilde viyollere ekilmiştir. Bitkiler 2-3 yapraklı döneme geldiğinde, 100 mikrolitre %0,125 kolşisin ve %0,5 DMSO karışımından oluşan kromozom katlama solüsyonu 1 ml'lik steril şırınga ile enjekte edilmiştir (Vanous ve diğerleri (2017). Enjeksiyonun ardından bitkiler tarlaya şaşırtılacak aşamaya gelinceye kadar sera şartlarında yetiştirilmiştir (Şekil 9). Bu uygulama esnasında yöntemin başarısı ile ilgili hesaplamalarda kullanılmak üzere hayatta kalan bitki sayısı kayıt altına alınmıştır. Diploid tohumlar da haploid tohumlarla eş zamanlı olarak çimlendirilmiş ve katlama işlemi uygulamaksızın fide oluşumundan sonra şaşırtılmıştır.



Şekil 9. Bitki sapına kolşisin enjeksiyonu

3.2.4 Yanlış Sınıflandırılan Bitkilerin Tespiti

Son olarak, KH_0 tohumlardan katlama işlemi uygulanan fideler ile diploid olarak ayrılan tohumlardan elde edilen fideler tarlaya şaşırtılmıştır. Şaşırtma işleminde, tohum kodlarına göre haploid ve diploid tohumlardan elde edilen 5 metrelik 2 sıralı alt parsellere tohum kodlarına göre sıralı olarak tarlaya aktarılmıştır. Tarla denemesinde gübreleme ve sulama işlemlerinin yanı sıra ihtiyaç duyulması halinde gölgelendirme vb. gibi uygulamalar Prasana ve diğerleri (2012) tarafından önerilen yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir. Uygulanan katlama işleminin başarısı ve tohumluk sınıflamada kullanılan yöntemlerin ayrım başarılarının doğrulamak amacıyla tarla yetiştirilen bitkilerde sap renklenmesine haploid/diploid bitkiler kayıt altına alınmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. KH_1 bitkilerin yetiştirilmesi

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Haploid tohumların sayıları ve KH_1 bitkilerin durumuna göre katlama işleminin başarısı Zararsız ve diğerleri, (2019) tarafından önerilen aşağıdaki 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 numaralı formüllere göre tespit edilmiştir.

$$Haploid\ İndirgene\ Oranı\ (HİO) = \left(\frac{Haploid\ tohum}{Toplam\ tohum}\right) x\ 100 \quad 3.1$$

$$Haploid\ Çimlenme\ Oranı\ (HÇO) = \left(\frac{Haploid\ tohumlar - Çimlenmeyen\ tohumlar}{Toplam\ haploid\ tohumlar}\right) x\ 100 \quad 3.2$$

$$Canlı\ Kalan\ Fide\ Oranı\ (CKFO) = \left(\frac{Şaşırtılan\ Fide\ Sayısı}{Kolşisin\ Uygulanan\ Fide\ Sayısı}\right) x\ 100 \quad 3.3$$

$$Canlı\ Kalan\ Bitki\ Oranı\ (CKBO) = \left(\frac{Canlı\ kalan\ bitki\ sayısı}{Şaşırtılan\ fide\ sayısı}\right) x\ 100 \quad 3.4$$

Çalışmadan elde tohum ayrım sonuçlarına ilişkin sınıflama değerleri aşağıdaki tabloda sunulan martise dayalı olarak 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13 numaralı

formüllere göre değerlendirilmiştir. Bu istatistikler R paket programının (R Core Team, 2019) caret paketi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 2
Sınıflama sonuçlarına ilişkin istatistiklerin hesaplandığı karşmaşıklık martisi

	Gerçek Grup	
Model Tahmini	Haploid	Diploid
Haploid	A	B
Diploid	C	D

$$Duyarlılık = \frac{A}{A+C} \quad (3.5)$$

$$Özgüllük = \frac{D}{B+D} \quad (3.6)$$

$$Yaygınlık = \frac{A+C}{A+B+C+D} \quad (3.7)$$

$$Pozitif\ Tahmin\ Değeri\ (PTD) = \frac{Duyarlılık\ x\ Yaygınlık}{((Duyarlılık)xYaygınlık)+((1-Özgüllük)x(1-Yaygınlık))} \quad (3.8)$$

$$Negatif\ Tahmin\ Değeri\ (NTD) = \frac{Özgüllük\ x\ (1-Yaygınlık)}{((1-Duyarlılık)xYaygınlık)+((Özgüllük)x(1-Yaygınlık))} \quad (3.9)$$

$$Tespit\ Oranı = \frac{A}{A+B+C+D} \quad (3.10)$$

$$Tespit\ Yaygınlığı = \frac{A+B}{A+B+C+D} \quad (3.11)$$

$$Dengelenmiş\ Doğruluk = \frac{Duyarlılık+Özgüllük}{2} \quad (3.12)$$

$$Doğruluk = \frac{A+D}{A+B+C+D} \quad (3.13)$$

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Donör Materyallerin İndirgeyicilerle ve Katlama Yöntemleri ile Etkileşimi

Yürütülen araştırmada indirgeyici hatlarla oluşturulan melezlere ilişkin haploid indirgenme oranları Tablo 3'te sunulmuştur. İndirgeyici genotiplerin haploid indükleme oranları donörler arasında değişiklik göstermiştir. HİO'ları %9,2 ile %16,1 arasında değişmiştir. En düşük indükleme oranı CIM2GTAIL-P2 indirgeyici hattı ile indüklenen DNR1 hattında gözlemlenmiştir. En yüksek haploid indükleme oranı %16,1 ile RWK-76xRWS hattı ile indüklenen DNR5 genotipinde tespit edilmiştir. RWK-76xRWS hattının indükleme potansiyelinin CIM2GTAIL-P2 hattından daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. CIM2GTAIL-P2 yeni sayılabilecek indirgeyici hatlardan ve ülkemizde ilk defa bir çalışmada kullanılmasına rağman indükleme oranı orta seviyede sonuç vermiştir.

Yine ülkemizde Sakarya lokasyonunda farklı indirgeyici hatlarının indükleme oranlarına yönelik yapılan bir başka çalışmada da RWS x RWK-76 hattının HİO oranı yüksek (%19,50) bulunmuştur (Cengiz ve Korkut, 2020).

Tablo 3
Haploid indirgenme oranları

	CIM2GTAIL-P2	**RWK-76xRWS**
DNR1	%9,2	%10,5
DNR4	%13,8	%10,4
DNR5	%9,7	%16,1
Ortalama	%10,6	%12,3

KH_0 tohumların kromozom katlama yöntemlerine göre haploid çimlenme oranları Tablo 4'te sunulmuştur. Haploid çimlenme oranları materyal olarak kullanılan donörden, kromozom katlama yönteminden ve indirgeyici hatlardan farklı şekillerde etkilendiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre haploid çimlenme oranları %64 ile %100 arasında değişmiştir. Genel haploid çimlenme ortalaması ise %84,5 olarak saptanmıştır. Ülkemizde farklı donör genotiplerinin haploid çimlenme oranlarının tespit edildiği başka bir çalışma da donör hatların haploid çimlenme oranlarının ortalaması %81,8 bir oran ile benzer sonuç vermiştir (Zararsız ve diğerleri, 2019).

Tablo 4
Haploid çimlenme oranları

	Yöntem 1 (Kök ucu kesme)		**Yöntem 2 (Sapa enjeksiyon)**	
	CIM2GTAIL-P2	RWK-76xRWS	CIM2GTAIL-P2	RWK-76xRWS
DNR1	%80	%77	%85	%88
DNR4	%100	%98	%76	% 93
DNR5	%64	%93	%88	%72
Ortalama	%81	%89	%83	84

Kromozom katlama işleminin ardından canlı kalan fide oranları Tablo 5'da izlenmektedir. Kromozom katlanması işleminin ardından canlı kalan fide oranları literatür taramasında tespit edilen oranlarların üstünde olduğu gözlenlenmiştir. Kromozom katlanmasının ardından ortalama canlı kalan fide oranı CIMMYT yönteminde %60, Zabirova yönteminde ise bu oran %95'in üzerinde tespit edilmiştir. Yapılan benzer başka bir çalışma da haploid tohumların kök ucunun kesilmesine ile kromozom katlanmasının ardından canlı kalan fide oranının düşük seviyelerde olduğu rapor edilmiştir (Zararsız ve diğerleri, 2019). Kromozom katlamasının ardından CIMMYT metodunun Zabirova metodundan daha fazla ölüm oranına sahip olmasının nedeni çimlenen tohumlarının kök ucu ve bitki ucunun kesildikten sonra kolşisin ile muamele edilmesinin ardından tahrip olduğu düşünülmektedir.

Tablo 5
Canlı kalan fide oranları

	Yöntem 1 (Kök ucu kesme)		**Yöntem 2 (Sapa enjeksiyon)**	
	CIM2GTAIL-P2	RWK-76xRWS	CIM2GTAIL-P2	RWK-76xRWS
DNR1	%56	%85	%100	%88,8
DNR4	%58	%63	%100	%100
DNR5	%47	%56	%100	%100
	%53,7	%68	%100	%96,3

Fidelerin tarla şaşırtılmasının ardından tarlada canlı kalan bitki oranları Tablo 6'de gösterilmiştir. Fideler tarlaya şaşırtılması genel mısır ekim işlemlerine göre gerçekleştirilmiş olup belli aralıklarla sulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm donörlerde canlı kalan bitki oranlarında yine Kök ucu kesme metodunun CIMMYT metodundan daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Tarla şartlarında canlı kalan bitki oranlarında en iyi

sonuç veren genotip Zabirova (1996) tarafından önerilen bitki sapına enjeksiyon metodu ile kromozom katlanması gerçekleştirilen DNR1 genotipinde gözlemlenmiştir.

Tablo 6
Canlı kalan bitki oranları

	Yöntem 1 (Kök ucu kesme)		**Yöntem 2 (Sapa enjeksiyon)**	
	CIM2GTAIL-P2	RWK-76xRWS	CIM2GTAIL-P2	RWK-76xRWS
DNR1	%88	%100	%100	%100
DNR4	%60	%82	%100	%85
DNR5	%87	%100	%90	%92
Ortalama	%78	%94	%96	%92

4.2. Haploid/Diploid Tohumların Ayrım Yöntemlerinin Karşılaştırılması

4.2.1. Göz ile Haploid ve Diploid Tohumların Ayrımı

Donör materyallerin indirgeyici hatlarla melezlenmesinden sonra elde edilen KH_0 tohumların haploid ve diploid olanların göz ile sınıflamasına ilişkin sonuçlar Tablo 8'de sunulmuştur. Bu tabloya göre ilk yapılan sınıflamada toplam 300 adet diploid tohumdan 13 adedinin yanlış olarak sınıflandığı anlaşılmaktadır. Göz ile ayrım metodunda toplam 245 adet haploid tohumun ise 55 adedinin aslında diploid görülmektedir (Tablo 7).

Tablo 7
Göz ile yapılan ayrıma dayalı olarak diploid ve haploid tohumların başlangıç ve son sınıflama durumlarına ait DVM modelinden elde edilen karmaşıklık matrisi

	Başlangıç Sınıflaması	
Son Sınıflama	Haploid	Diploid
Haploid	190	13
Diploid	55	287

Göz ile ayrım ve sonrasında bu sınıflanan tohumların tarlada yetiştirilmesi ile gerçek sınıflarının belirlenmesinin ardından bu sınıflama değerlerine ilişkin değerlendirme istatistikleri Tablo 8'da sunulmuştur. Bu tabloya göre göz ile yapılan sınıflamanın %87,52 doğruluğa sahip olduğu görülmektedir. Bu sınıflamada pozitif sınıf haploid tohumlar olarak atanmıştır. Haploid tohumların doğru sınıflama oranı %93,59 iken diploid tohumların %83,91 olduğu izlenmektedir (Tablo 8). Toplam haploidler arasından doğru sınıflanan haploidleri gösteren duyarlılık değeri %77 iken toplam diploidler arasından

doğru sınıflanan diploid verilerini yansıtan özgüllük değeri %95 olarak tespit edilmiştir. Haploid tohumların diploid tohumlardan ayırmada göz ile ayrım sıklıkla kullanılsa da uzman kişiler tarafından yapılmadığı sürece yanlış sonuç verme olasılığı yüksektir. Yapılan literatür taramasında bu yöntemin sınıflandırma etkinliğini düşürdüğü yüksek doğrulukta bir sınıflandırma yoluna ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Dang ve diğerleri (2012) göz ile yapılan sınıflamada yapılan hatalı ayrımın daha çok donör materyalin indirgeyici hattan kaynaklanan pigmentasyonu yeterli düzeyde göstermemesi ya da bu pigment oluşumunu engelleyen bir genetik yapıya sahip olmasına bağlamıştır. Araştırmamızda göz ile yapılan başlangıç sınıflamasında haploid olarak ayrılan tohumlardan diploid bitkiler elde edilmesi başlangıç sınıflamasında pigmentasyon yetersizliğinden kaynaklanan nedenlere bağlanabilir.

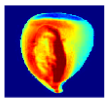
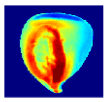
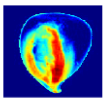
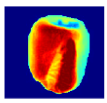
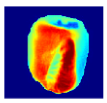
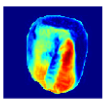
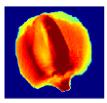
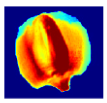
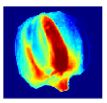
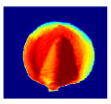
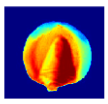
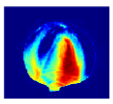
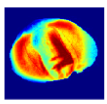
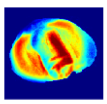
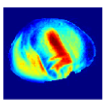
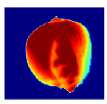
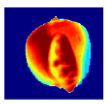
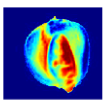
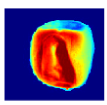
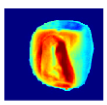
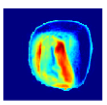
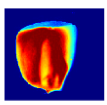
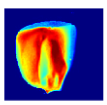
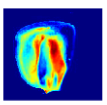
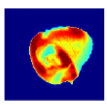
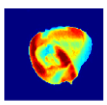
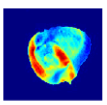
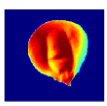
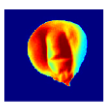
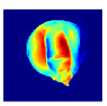
Tablo 8
Haploid ve diploid tohumların göz ile yapılan başlangıç ve son gruplama verilerine dayalı olarak oluşturulan DVM modellerinin sınıflama başarısını gösteren değerlendirme istatistikleri

Değerlendirme İstatistiği	**Model Sonucu**
Duyarlılık	0,7755
Özgüllük	0,9566
Pozitif Tahmin Değeri	0,9359
Negatif Tahmin Değeri	0,8391
Yaygınlık	0,4495
Tespit Oranı	0,3486
Tespit Yaygınlığı	0,3724
Düzeltilmiş Doğruluk	0,8660
Doğruluk	0,8752

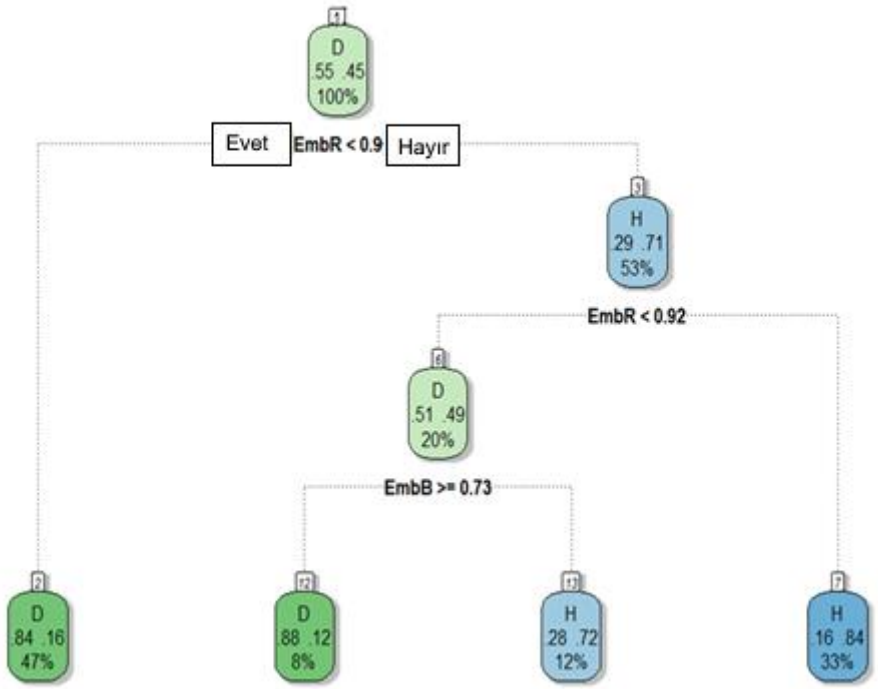
4.2.2. Görüntü Verilerine Dayalı Haploid ve Diploid Tohumların Ayrımı

Görüntü verilerine dayalı olarak yapılan sınıflamada masa üstü tarayıcıdan alınan tohum resimleri ayrı ayrı üç banttaki görüntüleri elde edilmiştir. Her donörün indirgeyici hatlarla melezlerine ait örnek görüntüler Tablo 9'da gösterilmiştir. Gözle net bir ayrım olmamasına rağmen kırmızı (R) mavi (B) bantlara ilişkin görüntülerde antosiyanin renklenmesine bağlı bölgelerin daha belirgin olduğu söylenebilir.

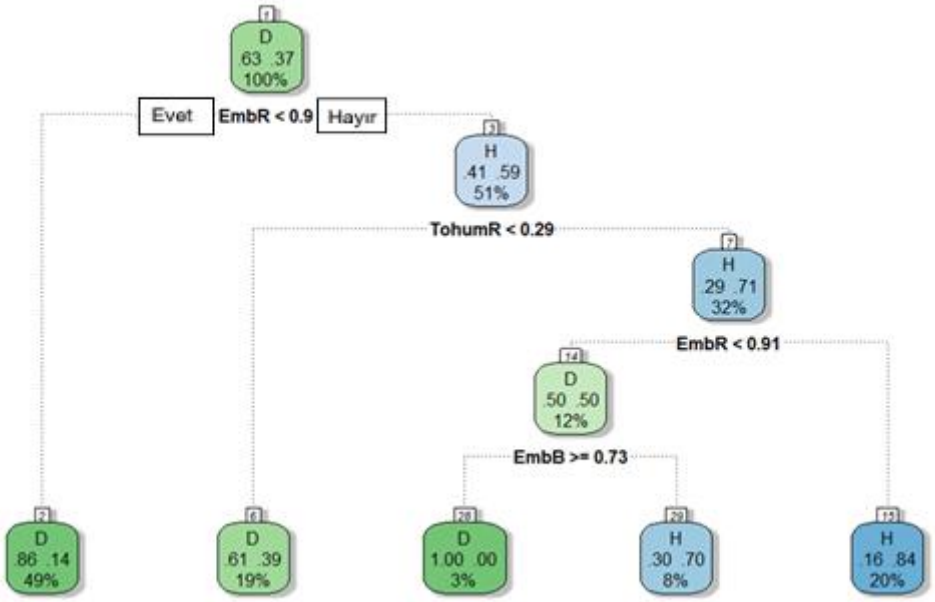
Tablo 9
Donörlerin son sınıflamasına göre haploid ve diploid tohumların farklı bantlardaki görüntülerine örnekler

		RGB	Kırmızı (R)	Yeşil (G)	Mavi (B)
DNR1 x CIM2GTAIL-P2	Diploid				
	Haploid				
DNR1 x RWK-76xRWS	Diploid				
	Haploid				
DNR4 x CIM2GTAIL-P2	Diploid				
	Haploid				
DNR4 x RWK-76xRWS	Diploid				
	Haploid				
DNR5 x CIM2GTAIL-P2	Diploid				
	Haploid				
DNR5 x RWK-76xRWS	Diploid				
	Haploid				

Donör materyallerin indirgeyici hatlarla tozlanmasının ardından elde edilen tohumların ilk sınıflanma sonuçlarının bağımlı değişken olarak atandığı SRA (Sınıflama ve Regresyon Ağacı) modelinde embriyo bölgesinin kırmızı bant değeri ve embriyo bölgesinin mavi bant değerinin sınıflamada ayırt edici olduğu görülmektedir. Bu modele göre embriyo kırmızı bant değeri 0,92'nin üzerinde ise bu tohumların haploid olarak sınıflandığı anlaşılmaktadır. Bu sınır değerin altında olup mavi bant değeri 0,73 ün altında ve eşit olanlar da yine haploid tohum olarak sınıflanmıştır (Şekil 11). Son sınıflamaya göre yine embriyo bölgesinin kırmızı bant değeri ile tüm tohuma ait kırmızı bant değeri sınıflamada etkili bulunmuştur (Şekil 12).



Şekil 11. KH_0 tohumların ilk sınıflamasına dayalı olarak tohum görüntülerinden oluşturulan SRA grafiği



Şekil 12. KH_0 tohumların tarlaya ekiminden sonra yapılan sınıflandırmaya dayalı olarak tohum görüntülerinden oluşturulan SRA grafiği

Başlangıç ve son sınıflamaya dayalı olarak oluşturulan modellerin karmaşıklık matrisi Tablo 10'da gösterilmiştir. Başlangıç sınıflamasına dayalı olarak tohum görüntülerinden oluşturulan modelde diploid tohumlardan 39 adedinin yanlış sınıflandığı izlenmektedir. Toplam 245 adet haploid tohumdan ise 81 adedinin yanlış sınıflandığı gözlenmiştir. Son sınıflamaya göre oluşturulan modelde ise diploidlerin sınıflama başarısı artarken haploid tohumların sınıflama başarısında oransal bir düşüş görülmüştür (Tablo 10).

Tablo 10
Görüntü verilerine dayalı olarak diploid ve haploid tohumların başlangıç ve son sınıflama durumlarına ait SRA modelinden elde edilen karmaşıklık matrisi

	Gerçek Grup			
	Model 1 (Başlangıç)		Model 2 (Son)	
Model Tahmini	Haploid	Diploid	Haploid	Diploid
Haploid	164	39	124	32
Diploid	81	261	79	310

Görüntü verilerine dayalı oluşturulan modellerin değerlendirme istatistikleri Tablo 11'de sunulmuştur. Embriyo bölgesinden RGB görüntüleri alınan tohumların tohumların tanımlanmasına yönelik yapılan benzer bir çalışmada Destek Vektör Makineleri (DVM)

Random Frog (RF) ve Logistik Regresyon (LR) sınıflandırma modelleri kullanarak test edilen tohumlardan en yüksek sınıflandırma doğruluğu 0,876 ile destek vektör makinelerinin gösterdiği raporlanmıştır (Veeramani ve diğerleri, 2018). RGB renk aralıklarının kullanıldığı bir çalışmada haploid mısır tohumlarının göz ile ayrımının çok zaman aldığını ve pratik olmadığını ifade ederek mısır bitkisinin R1-nj genetik markörlü mısır tohumlarının embriyo bölgesi görüntülerini çıkararak hzlı tanıma algolitmasını oluşturmak için embriyo bölgesindeki R1-nj genetik markörleri RGB renk aralıklarını ayrıştırmıştır. Yapılan test sonucunda haploid tohumlar için tanıma oranının %98,04 olduğunu ve hibrit tohumlar için %94,44 olduğunu rapor etmiştir (Zhang ve diğerleri, 2013). Çalışmamızda görüntü verilerine dayalı oluşturulan modelin doğruluk derecesi rapor edilen bu değerlerin altında bulunmuştur. Bu çalışmalarda tohum görüntüleri fotoğraf makinesi ile alınmıştır ve tek tohum düzeyinde çözünürlük daha yüksektir. Araştırmamızda tohum görüntüleri masaüstü taracıyıcıdan alınan resimlere dayalı olarak işlenmiştir. Bu durum çalışmalar arasında sınıflama başarısı açısından bir farklılığa neden olmuş olabilir.

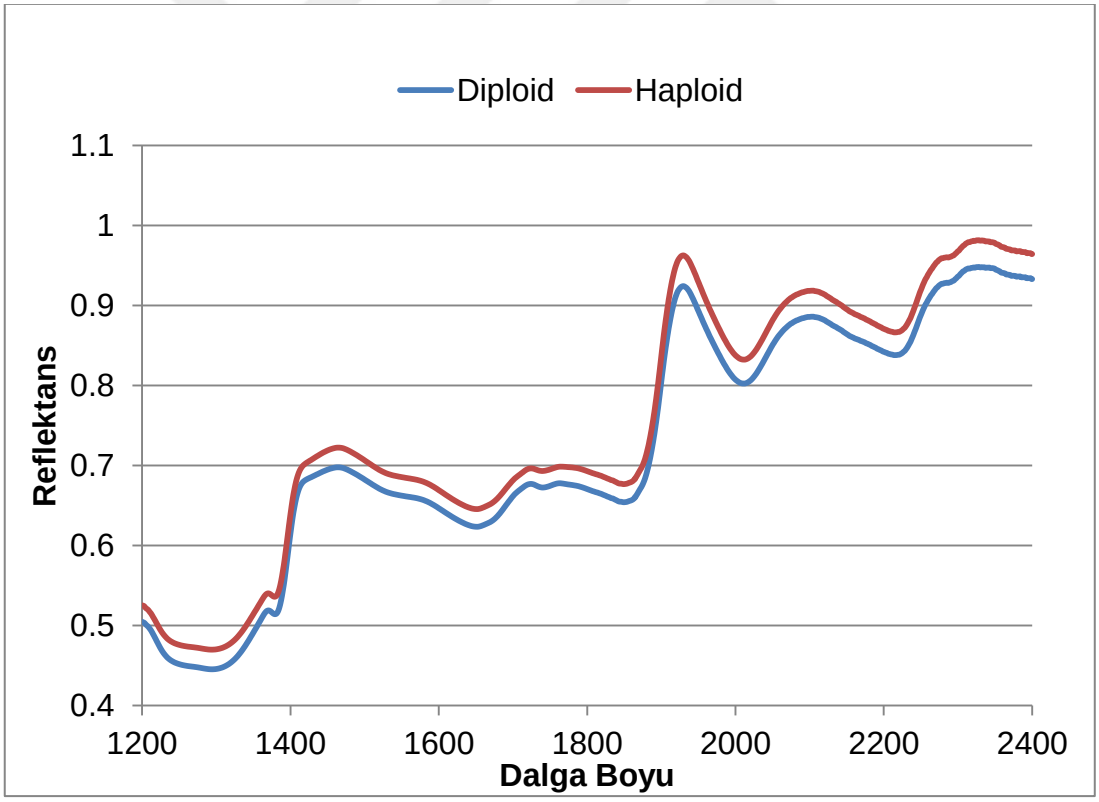
Tablo 11
Haploid ve diploid tohumların başlangıç ve son gruplama verilerine dayalı olarak oluşturulan SRA modellerinin sınıflama başarısını gösteren değerlendirme istatistikleri

Değerlendirme İstatistiği	Model 1 Sonucu (Başlangıç)	Model 2 Sonucu (Son)
Duyarlılık	0,6693	0,6108
Özgüllük	0,8700	0,9064
Pozitif Tahmin Değeri	0,8078	0,7948
Negatif Tahmin Değeri	0,7631	0,7969
Yaygınlık	0,4495	0,3724
Tespit Oranı	0,3009	0,2275
Tespit Yaygınlığı	0,3724	0,2862
Düzeltilmiş Doğruluk	0,7696	0,7586
Doğruluk	0,7798	0,7963

4.2.3. Spektral Verilere Dayalı Haploid ve Diploid Tohumların Ayrımı

Haploid ve diploid tohumlara ait spektral verilerle oluşturulan grafik Şekil 13'de gösterilmiştir. Bu şekilden de anlaşılacağı üzere haploid ve diploid tohumlardan alınan spektral verilerde ortalama iki eğrinin benzer eğilimde olduğu ancak haploid tohumların NIR spektroskopisinden elde edilen ortalama reflektans değeri diploid tohumlardan yüksek bulunmuştur (Şekil 13). Çalışmada tohumların embriyo bölgelerinden spektral veri toplanmıştır. Haploid tohumların embriyo bölgelerinde antosiyanin renklenmesi

gözükmediğinden reflektans değerinin yüksek bulunması muhtemeldir. Şüphesiz haploid ve diploid tohumlara ait spektral verideki bu karakteristik farklılıklar bu verilerle oluşturulan modelin ayrım başarısına da etki etmiştir. Yine bu çalışmaya benzer başka bir çalışmada 250 haploid 250 diploid tohum örneği 900-1700 nm dalga boyu aralığı ile taranmıştır. ZCA ön işlemi, PLSR boyut indirgemesi ve BPNN sınıflandırıcısının bir arada kullanıldığı yöntemde ortalama spektral verilerde haploid tohumların diploid tohumlardan yüksek reflektans değerine sahip olduğu ve %90 üzerinde bir tanımlama doğruluğu rapor edilmiştir (Lin ve diğerleri, 2018). NIRs ile taranan tohumların haploid ve diploid olarak tanımlanması için DVM sınıflama modelinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise %95 civarında tanıma doğruluğu rapor edilmiştir (Liu ve diğerleri, 2017). Haploid mısır tohumlarını sınıflamak için yapılan benzer bir çalışmada NIR spektroskopisinin ekonomik ve hızlı olduğunu ifade edilerek NIRS ile yapılan taramada %90 nın üzerinde tutarlı bir doğruluk ortalaması rapor edilmiştir (Cui ve diğerleri, 2019).



Şekil 13. Haploid/diploid tohumlardan alınan spektral ölçümlerle oluşturulan grafik

Spektral verilerle başlangıç ve tarla gözlemlerine dayalı tohum sınıflandırmasına dayalı DVM modellerinin karmaşıklık matrisi sonuçları Tablo 12'de gösterilmiştir. Başlangıç sınıflamasına göre diploid olarak sınıflandırılan 300 adet tohumun 23'ünün

modelde haploid olarak sınıflandığı izlenmektedir. Toplam 245 adet haploid tohumun ise 65 adedinin diploid olarak sınıflandığı belirlenmiştir. Tarla şartlarında yapılan sınıflandırma sonrasında ise diploid tohum sayısının aslında 342 adet olduğu görülmüştür. Bu tohumların 28 adedi haploid olarak sınıflanmıştır. İlk sınıflamada 245 olarak ayrılan tohumlardan 203'ünün haploid tohum olduğu anlaşılmaktadır. Bu haploid tohumların ise son sınıflamada 69 adedi spektral modelde yanlış sınıflanmıştır (Tablo 12).

Tablo 12
Spektral verilere dayalı olarak diploid ve haploid tohumların başlangıç ve son sınıflama durumlarına ait DVM modelinden elde edilen karmaşıklık matrisi

	Gerçek Grup			
	Model 1 (Başlangıç)		Model 2 (Son)	
Model Tahmini	Haploid	Diploid	Haploid	Diploid
Haploid	180	23	134	28
Diploid	65	277	69	314

Spektral modele ait değerlendirme istatistikleri Tablo 13'te gösterilmiştir. DVM modellerinin başlangıç sınıflamasına dayalı oluşturulan modelin doğruluk oranı ile (%83) son sınıflamaya dayalı oluşturulan modelin doğruluk oranı (%82) benzerlik göstermiştir. Spektral verilere dayalı olarak haploid ve diploid tohumları ayırt etmeyi amaçlayan önceki çalışmalarda bizim araştırmamızdan daha yüksek doğru sınıflama oranları kaydedilmiştir (Liu ve diğerleri, 2017). Söz konusu çalışmalarda spektral verilere ön işlem uygulandığı dikkat çekmiş olup, ön işlem uygulanan modellerde doğruluk oranları daha yüksek olduğu anlaşılmıştır (Liu ve diğerleri, 2017). İleriki çalışmlarda, sınıflandırma modellerinin başarısının spektral verilere ön işlem uygulanarak ve dalga boyu seçim yöntemleri kullanılarak geliştirilebileceği öngörülmektedir. Diğer taraftan spektral ölçümde kullanılan cihazlardaki ölçüm kabiliyetlerindeki farklılıklar da, çalışmalardan elde edilen sonuçların farklılaşmasına neden olabilir. Nitekim araştırmamızda kullanılan NIR spektroskopi cihazı tek tohum analizlerine yönelik ölçümler için tasarlanmış bir cihaz değildir. Kullanılan NIR cihazında kontakt ölçüm yapılamadığından, tohum yüzeyinden yansıyan ışık enerjisinin saçılım düzeyi yüksektir. Buna rağmen haploid/diploid tohumların ayrımında tatminkar bir başarı sağladığı (~%82) görülmektedir. Araştırmamızda elde edilen bulgular spektral verilerin embriyo tarafından tohum bazlı olarak alınması ve alınan verinin daha önce sınıfı bilinen tohumlardan alınan verilerle oluşturulmuş modele uygulanması ile tohum sınıfının belirlenebileceği anlaşılmaktadır. Geliştirilen modellerin makineli ayrım işlemini

gerçekleştirecek bir cihaza aktarılması vasıtasıyla tohum sınıflamanın spektral verilere dayalı olarak gerçekleştirilmesi mümkündür.

Bu çalışmada spektral modellerde haploid tohumlar pozitif grup olarak alınmıştır. Oluşturulan modele ait özgüllük değerinin başlangıç ve son sınıflamaya dayalı modelde benzerlik gösterdiği, duyarlılık değerinin ise başlangıç sınıflamasında son sınıflamadan daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Diğer bir ifade ile her iki sınıflamada da diploid olarak sınıflanan tohumlar içerisinde, spektral model yardımıyla diploid olarak sınıflananların oranı, haploid grupta spektral model ile haploid olarak sınıflananlardan daha yüksek bulunmuştur (Tablo 13). Bu bulgular spektral veriler yardımıyla diploid tohumların referans olarak kabul edilen tohum sınıfına gore sınıflama başarısının haploid tohumların sınıflama başarısından daha yüksek olduğuna işaret etmektedir. Buna karşın tarla şartlarındaki sınıflama nihai olarak gerçek durumu gösterdiğinden haploid/diploid tohum ayrımının bu sınıflamaya göre değerlendirilmesi sağlıklı olacaktır. Çalışmamızda pozitif grup olarak atanan haploid tohum örneklerinin sınıflama başarısı (%82,72) ile diploid gurubun ayrım başarısı (%81,98) nihai olarak benzerlik göstermiştir.

Tablo 13
Haploid ve diploid tohumların başlangıç ve son gruplama verilerine dayalı olarak oluşturulan DVM modellerinin sınıflama başarısını gösteren değerlendirme istatistikleri

Değerlendirme İstatistiği	Model 1 Sonucu (Başlangıç)	Model 2 Sonucu (Son)
Duyarlılık	0,7346	0,6601
Özgüllük	0,9233	0,9181
Pozitif Tahmin Değeri	0,8867	0,8272
Negatif Tahmin Değeri	0,8099	0,8198
Yaygınlık	0,4495	0,3724
Tespit Oranı	0,3302	0,2458
Tespit Yaygınlığı	0,3724	0,2972
Düzeltilmiş Doğruluk	0,8290	0,7891
Doğruluk	0,8385	0,8220

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında üç farklı donör hat ile iki farklı indirgeyici hattın iki farklı kromozom katlama yöntemine verdikleri tepkiler ile haploid tohum oluşturma kabiliyeti bakımından hatlar arasındaki etkileşimler irdelenmiştir. Ayrıca haploid ve diploid tohumlarının ayrımında kullanılan üç farklı yöntem kıyaslanmıştır.

Haploid tohum oluşumuna yönelik sonuçlar dikkate alındığında, donör hatların farklı indirgeyici hatlara göre haploid tohum oluşturma kabiliyetlerinin değişim gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca kullanılan kromozom katlama yönteminin fide ve tarlaya şaşırtma aşamasında canlı kalan bitki sayıları üzerine önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. Zabirova ve diğerleri (1996) tarafından önerilen ve bitki sapına katlama solüsyonunun enjeksiyonuna dayanan yöntemin canlı kalan bitki sayısının artışına neden olduğu belirlenmiştir. CIMMYT yönteminde ise kök ucu ve sürgün ucu kesilmesi ile haploid bitkilerin fideleme ve tarla şaşırtma aşamalarındaki kayıpları daha yüksek bulunmuştur.

İn vivo maternal katlanmış haploid tekniğinde haploid ve diploid tohumların ayrımına yönelik kullanılan yöntemler arasında da önemli farklar gözlenmiştir. Öncelikle yaygın yöntem olarak kullanılan göz ile ayırma yönteminde hata payının yüksek olduğu gerek haploid ve gerekse diploid sınıflandırmada yanlış gruplanan tohum sayısının dikkate değer sayıda olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan spektral ön işlem ve görüntü işleme yöntemlerinin tohum sınıflandırmasında güvenilir sınıflama sonuçları verebileceği anlaşılmıştır. Hem görüntü verileri hem de spektral verilerle oluşturulan tahmin modellerinde, gerçek sınıf yani son sınıflama sonuçlarına dayalı ayrım başarısının benzer olduğu görülmüştür.

İleriki araştırmalarda farklı nitelikte spektral ölçüm cihazlarının kullanılması ve görüntü işleme analizlerinde masaüstü tarayıcı yerine fotoğraf makinesinden ya da dijital kemara görüntülerinin kullanılması alternatif yöntemlerin sınıflama başarısını olumlu yönde etkileyebilir. Diğer taraftan sınıflamada kullanılan modelleme istatistik modelleme tekniklerinin çeşitlendirildiği araştırmaların tez çalışmasının yürütüldüğü alana önemli katkıları olabilir. Hem spektral hem de görüntü verilerine dayalı sınıflama yapabilen yazılımların geliştirilmesi ve bu yazılımların tohum ayırabilen robotik sistemlere entegrasyonu uygulamada alternatif yöntemlerin kullanımını artırabilecektir.

KAYNAKLAR

Altuntaş, Y., Cömert, Z., ve Kocamaz, A. F. (2019a). Identification of haploid and diploid maize seeds using convolutional neural networks and a transfer learning approach. *Computers and Electronics in Agriculture*, 163, 104874.

Altuntaş, Y., Kocamaz, A. F., Cengiz, R., ve Esmeray, M. (2018). Classification of haploid and diploid maize seeds by using image processing techniques and support vector machines. *In 2018 26th Signal Processing and Communications Applications Conference*, 1-4.

Altuntaş, Y., ve Kocamaz, A. F. (2019b). Renk Momentleri ve Destek Vektör Makineleri Kullanarak Haploid Mısır Tohumlarının Tanımlanmasında Renk Uzaylarının Sınıflandırma Performansına Etkisinin Karşılaştırılması. *Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 31(2), 551-560.

Boote, B. W., Freppon, D. J., De La Fuente, G. N., Lübberstedt, T., Nikolau, B. J., ve Smith, E. A. (2016). Haploid differentiation in maize kernels based on fluorescence imaging. *Plant Breeding*, 135(4), 439-445.

Cengiz, R., ve Korkut, K. Z. (2020). Development of doubled haploid maize lines by using in vivo haploid technique. *Biotech Studies*, 29(1), 1-8.

Cerit, İ., Cömertpay, G., Oyucu, R., Çakır, B., Hatipoğlu, R., ve Özkan, H. (2016). Melez mısır ıslahında in-vivo katlanmış haploid tekniğinde kullanılan farklı inducer genotiplerin haploid indirgeme oranların belirlenmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(özel sayı-1), 52-57.

Chaikam, V., Prasanna, B. M., ve Mahuku, G. (2012). Maternal haploid detection using anthocyanin markers. *Doubled haploid technology in maize breeding: Theory and practice*, 21-24. CIMMYT, Mexico, DF.

Chaikam, V., ve Boddupalli, M. P. (2012). *Double Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practise*, 20-23.

Chalyk, S. T. (1994). Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. Euphytica, 79(1-2), 13-18.

Chase, S. S. (1951). Production of Homozygous Diploids of Maize from Monoploids 1. *Agronomy Journal*, 44(5), 263-267.

Chase, S. S. (1952). *Monoploids in maize*. Iowa State College Press, Ames, Iowa, 389–399.

Chase, S. S. (1969). Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Review, 35*(2), 117-168.

Chen, S., Li, L., Li, H., & Xu, X. E. (2009). Maize doubled haploid breeding. *China Agricultural University Press, Beijing*.

Chidzanga, C., Muzawazi, F., Midzi, J., ve Hove, T. (2017). Production and use of haploids and doubled haploid in maize breeding: A review. *African Journal of Plant Breeding*, 4, 201-213.

Coe, E. H. (1959). A line of maize with high haploid frequency. *American Naturalist,* 93: 381–382.

Couto, E. G. D. O., Davide, L. M. C., Bustamante, F. D. O., Pinho, R. G. V., ve Silva, T. N. (2013). Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. *Ciência e Agrotecnologia*, 37(1), 25-31.

Cui, Y., Ge, W., Li, J., Zhang, J., An, D., ve Wei, Y. (2019). Screening of maize haploid kernels based on near infrared spectroscopy quantitative analysis. *Computers and Electronics in Agriculture*, 158, 358-368.

Dang, N. C., Munsch, M., Aulinger, I., Renlai, W., ve Stamp, P. (2012). Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays.* L.). *Euphytica*, 183(2), 153-160.

De La Fuente, G. N., Carstensen, J. M., Edberg, M. A., ve Lübberstedt, T. (2017). Discrimination of haploid and diploid maize kernels via multispectral imaging. *Plant Breeding*, 136(1), 50-60.

Eder, J., ve Chalyk, S. (2002). İn vivo haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(4), 703-708.

FAO (2020). Erişim adresi: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC

Geiger, H. H., ve Gordillo, G. A. (2009). Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica,* 54: 485-499.

Junxiong, Z., Kebin, W., Peng, S., Wei, L., ve Shaojiang, C. (2011). Image segmentation of maize haploid seeds based on BP neural network. *Journal of Jiangsu University (Natural Science Edition), 6.*

Kahrıman, F. (2016). Mısırda Polen Etkisi ve Bu Etkinin Kontrolünde Uygulanan Yöntemler, *Lambert Academic Publishing*, Saarbrücken, Almanya.

Kahrıman, F., Egesel, C. Ö., Demir, A. (2013). Türkiye'de mısır ıslahı çalışmalarının geçmişi ve bugünü. *Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi* 10-13 Eylül, Konya, Bildiriler Kitabı, 1, 545-550.

Lin, J., Yu, L., Li, W., ve Qin, H. (2018). Method for Identifying Maize Haploid Seeds by Applying Diffuse Transmission Near-Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 72(4), 611-617.

Liu, C., Li, X., Meng, D., Zhong, Y., Chen, C., Dong, X., Xu, X., Chen, B., Li, W., Li, L., Tian, X., Zhao, H., Song, W., Luo, H., Zhang, Q., Lai, J., Jin, W., Yan, J., ve Chen, S. (2017). A 4-bp insertion at ZmPLA1 encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize. *Molecular Plant*, 10(3), 520-522.

Liu, J., Guo, T. T., Li, H. C., Jia, S. Q., Yan, Y. L., An, D., Zhang Y., ve Chen, S. J. (2015). Discrimination of maize haploid seeds from hybrid seeds using vis spectroscopy and support vector machine Method. *Guang pu xue yu Guang pu fen xi= Guang pu*, 35(11), 3268-3274.

Liu, W. J., Li, W. J., Li, H. G., Qin, H., ve Ning, X. (2017). Research on the method of identifying maize haploid based on KPCA and near infrared spectrum. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 37(7), 2024-2027.

Liu, Z., Wang, Y., Ren, J., Mei, M., Frei, U. K., Trampe, B., ve Lübberstedt, T. (2016). Maize doubled haploids. *Plant Breeding Reviews*, 40, 123-166.

Melchinger, A. E., Schipprack, W., Würschum, T., Chen, S., ve Technow, F. (2013). Rapid and accurate identification of in vivo-induced haploid seeds based on oil content in maize. *Scientific Reports*, 3, 2129.

Nair, S. K., Chaikam, V., Gowda, M., Hindu, V., Melchinger, A. E., ve Boddupalli, P. M. (2020). Genetic dissection of maternal influence on in vivo haploid induction in maize. *The Crop Journal*, 8(2), 287-298.

Prasanna, B. M., Chaikam, V., ve Mahuku, G. (2012). *Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice.* CIMMYT.

Prigge, V., Sánchez, C., Dhillon, B. S., Schipprack, W., Araus, J. L., Bänziger, M., ve Melchinger, A. E. (2011). Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. *Crop Science*, 51(4), 1498-1506.

Prigge, V., Schipprack, W., Mahuku, G., Atlin, G. N., ve Melchinger, A. E. (2012a). Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. *Euphytica*, 185(3), 481-490.

Prigge, V., ve Melchinger, A. E. (2012b). *Production of haploids and doubled haploids in maize. In Plant cell culture protocols*, Humana Press, Totowa, NJ. 161-172.

Prigge, V., Xu, X., Li, L., Babu, R., Chen, S., Atlin, G. N., ve Melchinger, A. E. (2012c). New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics*, 190: 781-793.

Qin, H., Ma, J. Y., Chen, S. J., Yan, Y. L., Li, W., Wang, P., ve Liu, J. (2016). Identification of Haploid Maize Kernel Using NIR Spectroscopy in Reflectance and Transmittance Modes: A Comparative Study. *Guang pu xue yu Guang pu fen xi= Guang pu*, 36(1), 292-297.

R Core Team (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/

Randolph, L. F. (1932). Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. *Genetics*, 18: 222-229.

Röber, F. K., Gordillo, G. A., ve Geiger, H. H. (2005). İn vivo haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*, 50, 275–283.

Schmidt, W. (2003). *Hybrid maize breeding at KWS SAAT AG. Bericht über die Arbeitstagung der Vereinigung der Pflanzenz üchter und Saatgutkaufleute Österreichs*, Gumpenstein, Österreich, 25-27.

Seitz, G. (2005). The use of doubled haploids in corn breeding. In Proc. *41st Annual Illinois Corn Breeders' School* 2005 (pp. 1–7). Illinois: Urbana-Champaign.

Sezer, İ., ve Yanbeyi, S. (1997). Çarşamba ovasında yetiştirilen cin mısırda (Zea mays L. everta) bitki sıklığı ve azotlu gübrenin tane verimi, verim komponentleri ve bazı bitkisel karakterler üzerine etkileri. *Türkiye*, 2, 22-25.

TUİK (2019). Erişim adresi: http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 (Erişim tarihi: 27.07.2020)

Vanous, K., Vanous, A., Frei, U. K., ve Lübberstedt, T. (2017). Generation of maize (*Zea mays*) doubled haploids via traditional methods. *Current Protocols in Plant Biology*, 2(2), 147-157.

Veeramani, B., Raymond, J. W., ve Chanda, P. (2018). DeepSort: deep convolutional networks for sorting haploid maize seeds. *BMC Bioinformatics*, 19(9), 289.

Wang, X. Y., Liao, W. X., An, D., ve Wei, Y. G. (2018). Maize Haploid Identification via LSTM-CNN and Hyperspectral Imaging Technology. *arXiv preprint arXiv*:1805.09105.

Zabirova, E. R., Chumak, M. V., Shatskaia, O. A., ve Scherbak, V. S. (1996). Technology of the mass accelerated production of homozygous lines (in Russian). *Kukuruza Sorgo*, 4, 17-19.

Zararsız, D., Öztür, L., Yanıkoğlu, S., Turgut, I., Kizik, S., ve Bilgin, B. (2019). Production of double haploid plants using in vivo haploid techniques in corn. *Journal of Agricultural Sciences*, 25(1), 62-69.

Zhang, J., Wu, Z., Song, P., Li, W., Chen, S., ve Liu, J. (2013). Embryo feature extraction and dynamic recognition method for maize haploid seeds. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 29(4), 199-203.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Umut SONGUR

Doğum Yeri : Mardin

Doğum Tarihi : 13.07.1995

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 2014-2018

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, 2018

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

1) SCI

Kahrıman F., Songur U., Şerment M., Akbulut Ş., Egesel C.Ö., 2020. Comparison of Colorimetric Methods for Determination of Phytic Acid Content in Raw and Oil Extracted Flour Samples of Maize, Journal of Food Composition And Analysis, vol.86, pp.103380-103380.

Kahrıman F., Aktaş F., Songur U., Şerment M., Egesel C.Ö., 2020. Screening Turkish maize landraces for kernel oil content and oil quality traits, Plant Genetic Resources-Characterization and Utilization, Kabul Edildi, 2020

Kahrıman F., Akbulut Ş., Düz G., Songur U., Egesel C.Ö., 2020. Screening of genetic variability in Turkish maize landraces for protein and starch related traits, Maydica, vol.65, M3.

2) Diğer

Kahrıman F., Ada F., Uysal Z., Songur U., 2020. Türkmenistan Menşeili Yerel Mısır Popülasyonlarının Çanakkale Koşullarında Verim ve Tane Kalite Özelliklerinin İncelenmesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, cilt. Özel Sayı, ss.79-87.

Kahrıman F., Aktaş F., Pınar G., Songur U., Egesel C.Ö., 2020.Assessment of genetic diversity of Turkish maize landraces for phytic acid and total phenolic contents, Acta fytotechnica et zootechnica, Kabul Edildi.

b) Bildiriler

1) Uluslararası

Songur U., Kahrıman F., Dişbudak A., Kızık S., 2020. Haploid Ve Diploid Mısır Tohumlarının NIR (Yakin Kızıl Ötesi) Spektroskopisi Ve Kemometrik Yöntemlerle Sınıflanması, International Conference On Agriculture, Animal Science And Rural Development-IV, Ankara, Türkiye, 12-14 Haziran 2020, vol.1, pp.94-96

Kahrıman F., Ada F., Uysal Z., Songur U., 2019. Türkmenistan Menşeili Yerel Mısır Popülasyonlarının Çanakkale Koşullarında Verim ve Tane Kalite Özelliklerinin İncelenmesi, Türkiye 13. Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya, Türkiye, 1-4 Kasım 2019, ss.179-179

Kahrıman F., Kaya S., Talay C., Songur U., 2019. Mısır Tanesinde Nem Tayini İçin Kullanılan Farklı Ölçüm Yöntemlerinin Karşılaştırılması, Türkiye 13. Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya, Türkiye, 1-4 Kasım 2019, ss.136-142

Kahrıman F., Egesel C.Ö., Baytekin H., Şerment M., Songur U., 2019. Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Toplanmış Yerel Mısır Popülasyonlarının Çanakkale Koşullarındaki Performanslarının Değerlendirilmesi, Türkiye 13. Ulusal, 1. Uluslararası Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya, Türkiye, 1-4 Kasım 2019, cilt.1, ss.17-27

c) Katıldığı Projeler

Mısırda İn vivo Haploid Katlama Yöntemlerine Karşı İndirgeyici ve Donör Genotiplerin Tepkilerininin Araştırılması ve Haploid Tohum Tespitinde Kullanılan Yöntemlerinin Karşılaştırılması, TÜBITAK Projesi, TÜBİTAK 119O619 (Bursiyer).

İLETİŞİM

E-posta Adresi : umut.songur47@gmail.com

ORCID : 0000-0001-7035-9607