T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

İNDİRGEYİCİ MISIRDA FARKLI İRİLİKTEKİ POLENLERİN KARAKTERİZASYONU VE POLEN İRİLİĞİNİN HAPLOİD TOHUM OLUŞUMUNA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLİZAR PINAR

Tez Danışmanı
Doç. Dr. FATİH KAHRIMAN

ÇANAKKALE – 2021

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

İNDİRGEYİCİ MISIRDA FARKLI İRİLİKTEKİ POLENLERİN KARAKTERİZASYONU VE POLEN İRİLİĞİNİN HAPLOİD TOHUM OLUŞUMUNA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLİZAR PINAR

Tez Danışmanı
Doç. Dr. FATİH KAHRIMAN

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2020-3396

ÇANAKKALE – 2021

ETİK BEYAN

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

(İmza)
Gülizar PINAR
09/08/2021

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca bana yol gösteren ve benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Fatih Kahrıman'a, deneysel çalışmaların yürütüldüğü sağlamış olduğu olanaklardan dolayı Çanakkale Onsekiz Üniversitesi'ne, hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya FYL-2020-3396 no'lu proje kapsamında maddi destek veren ÇOMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürü borç bilirim.

Gülizar PINAR

Çanakkale, Temmuz 2021

ÖZET

İNDİRGEYİCİ MISIRDA FARKLI İRİLİKTEKİ POLENLERİN KARAKTERİZASYONU VE POLEN İRİLİĞİNİN HAPLOİD TOHUM OLUŞUMUNA ETKİSİ

Gülizar PINAR
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Fatih KAHRIMAN
09/08/2021, 47

Bu çalışmada bir indirgeyici mısır hattından toplanan ve farklı boyutlara ayrılan polen örnekleri morfolojik, moleküler ve spektrofotometrik ölçümlerle incelenmiştir. Ayrıca farklı irilikteki polenler kullanılarak yapılan tozlamadan elde edilen örneklerin haploid indirgeme oranları (HIR) belirlenmiş ve haploid/diploid tohumların protein bantlarındaki farklar karşılaştırılmıştır. Araştırma 2021 yılında sera şartlarında yürütülmüş ve 3 donör (Hya, B73, Hya×B73) ile bir indirgeyici hat (CIM2GTAIL-P2) materyal olarak kullanılmıştır. İndirgeyici hattan toplanan polen örneklerinin 50 ve 100 mikronluk filtreler kullanılarak vakum yardımıyla ayrıştırılmıştır. Morfolojik ölçüm olarak polen çapı, canlılık durumu ışık mikroskobu yardımıyla tespit edilmiştir. Polen örneklerinde spektral ölçümler kızıl ötesi (NIR) ve Raman spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Polen ve tohum örneklerindeki protein bant farklılıkları SDS-PAGE analizleri ile incelenmiştir. Araştırma sonuçları farklı irilikteki polen örneklerinde spektral ve moleküler farklılıklar olduğunu göstermiştir. Polenlerde bulunan protein bantları 36 kDa-99 kDa arasında değişim göstermiş ve küçük çaptaki örneklerde bant sayısı ve yoğunluğu diğer gruptan düşük bulunmuştur. Donörlerde HIR değerleri %7,40 ile %18,9 arasında bulunmuştur. Bu değerler kullanılan polen iriliğine ve genotiplere göre değişim göstermiştir. Sonuçlar, indirgeyici hattan toplanmış küçük irilikteki polenlerin indüksiyon melezlemesinde kullanılmasının HIR değerini artırdığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Polen, Haploid indirgeme oranı, Spektroskopi, *Zea mays*

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF POLLENS WITH DIFFERENT SIZE IN INDUCER MAIZE AND EFFECT OF POLEN SIZE ON THE HAPLOID SEED FORMATION

Gülizar PINAR

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

09/08/2021, 47

In this study, pollen samples collected from an inducer maize line and separated into different sizes were examined by morphological, molecular and spectrophotometric measurements. In addition, haploid induction ratios (HIR) of the samples obtained from pollination using pollen of different sizes were determined and the differences in protein bands of haploid/diploid seeds were compared. The study was carried out in greenhouse conditions in 2021 and 3 donors (Hya, B73, Hya×B73) and an inducer line (CIM2GTAIL-P2) were used as material. Pollen samples collected from the inducer line were separated by vacuum using 50- and 100-micron filters. As a morphological measurement, pollen diameter and viability were determined with the help of a light microscope. Spectral measurements of pollen samples were made by infrared (NIR) and Raman spectroscopy. Protein band differences in pollen and seed samples were investigated by SDS-PAGE analyses. Research results showed that there are spectral and molecular differences in pollen samples of different sizes. The protein bands in the pollen ranged from 36 kDa to 99 kDa and the number and density of bands in small samples were lower than the other group. HIR values were between 7.40% and 18.9% in donors. These values varied according to the pollen size and genotypes used. The results showed that the use of small size pollen collected from the inducer line in induction crossing increases the HIR value.

Keywords: Pollen, Haploid induction ratio, Spectroscopy, *Zea mays*

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI……... i
ETİK BEYAN…… ii
TEŞEKKÜR…….. iii
ÖZET ……..…….. iv
ABSTRACT …….. v
İÇİNDEKİLER ……..…… vi
SİMGELER ve KISALTMALAR……..…… viii
TABLOLAR DİZİNİ…….…. ix
ŞEKİLLER DİZİNİ……..……...…….….. x

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ

1.1. Mısır ile İlgili Genel Bilgiler……. 1
1.2. Mısırda Haploid Bitki Elde Etme Yöntemleri……... 2
1.3. *In Vivo* Şartlarda Haploid Bitki Eldesi ve Mısırda Kullanımı……... 4
1.4. *In Vivo* Katlanmış Haploid Tekniğinde Haploid Tohumların Ayrımı ve Haploid İndirgenme Oranı……... 6
1.5. Mısır Poleninin Özellikleri ve *In Vivo* Haploid Tekniğindeki Önemi…….. 7
1.6. Çalışmanın Amacı…….. 10

İKİNCİ BÖLÜM
KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Polen Analizlerine Yönelik Çalışmalar……. 11
2.2. *In Vivo* Şartlarda Haploid Tohum Oluşumu ve Tanımlanmasına Yönelik İncelenen Çalışmalar…….. 15

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

3.1. Materyal……. 19

3.1.1. Denemenin Kurulması ve Uygulama Aşamaları…… 19
3.2. Yöntem……... 21
3.2.1. İndirgeyici Hattan Toplanan Polenlerin Farklı Boyutlara Ayrılması ve Tozlama İşlemlerinin Yapılması…….. 21
3.2.2. Polen Örneklerinin Morfolojik Karakterizasyonu…….. 22
3.2.3 Polen Örneklerinin Spektral Karakterizasyonu…….. 23
3.2.4 Polen Örneklerinin SDS-PAGE Analizleri…… 23
3.3. Tohum Karakterizasyonu……... 26
3.3.1. Haploid Tohumlarının Elde Edilmesi…… 26
3.3.2. Tohum Seleksiyonu ve Haploid İndüksiyon Oranlarının Belirlenmesi…. 28
3.3.3. Tohum Örneklerinin SDS-PAGE Analizleri…….. 29
3.3.4. Verilerin Değerlendirilmesi…… 29

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Polen Örneklerinin Farklı Teknikler Kullanılarak Karakterizasyonu…… 30
4.1.1. Polen Örneklerinin Morfolojik Verileri……. 30
4.1.2. Polen Örneklerinin Spektral Verileri…….. 31
4.1.3. Polen Örneklerinin SDS-PAGE Analiz Verileri…… 33
4.2. Tohum Karakterizasyonu……... 35
4.2.1. Farklı Polen Boyutlarından Elde Edilen Tohum Örneklerinin HIR Değerleri……. 35
4.2.2. Tohum Örneklerinin SDS-PAGE Analiz Sonuçları……... 36

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Polen Örneklerinin Morfolojik, Spektral ve Moleküler Karakterizasyonu……... 39
5.2. Polen İriliğinin HIR Değerleri Üzerine Etkisi ve Haploid/Diploid Tohum Örneklerinin Protein Bant Dizilerindeki Farklılıklar……. 40
KAYNAKÇA ..……. 41
ÖZGEÇMİŞ ….……..... I

SİMGELER VE KISALTMALAR

CIMMYT	Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırmalar Merkezi (International Maize and Wheat Improvement Center)
D	Diploid
DH	Double Haploid
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
g	Gram
g	Gravite
H	Haploid
HIR	Haploid İndirgeme Oranı
KH_0	İndüksiyon melezlenmesinden elde edilen bitki
kDa	Kilodalton
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
MW	Molecular Weight
nm	Nanometre
NIRS	Yakın kızıl ötesi spektroskopisi
R1-nj	R1-Navajo
Rm	Nisbi taşınım (Relative mobility)
rpm	Dakikada dönme sayısı (Revolutions-Per-Minute)
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
°C	Santigrat Derece
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TTC	Triphenyl Tetrazolium Chloride
%	Yüzde oranı

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyaller	19
Tablo 2	SDS-PAGE analizi için kullanılan solüsyonların hazırlanması	24
Tablo 3	SDS-PAGE analizi için kullanılan jellerin hazırlanması	25
Tablo 4	50 ve 100 mikron filtrelerle ayrılmış polen örneklerine ilişkin canlılık durumu ve morfolojik ölçüm sonuçları	30
Tablo 5	İndükleyici hattın 50 ve 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen numunelerinin protein bant profilleri	35
Tablo 6	Donör materyallerin haploid (H) ve diploid (D) tohumlarının protein bant profilleri	38

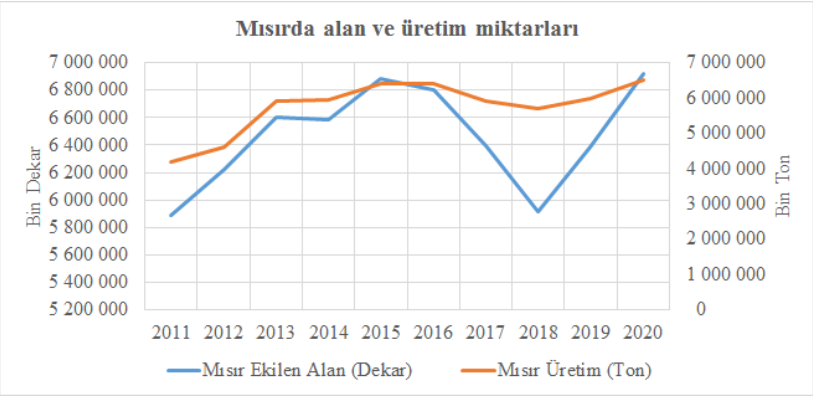
ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Türkiye'nin 2011-2020 yılları arasında mısır ekiliş alanı ve üretim miktarları	1
Şekil 2	Haploid-diploid-melez tohum ayrımı	6
Şekil 3	Sera kurulum aşaması	20
Şekil 4	Sera ışıklandırma	20
Şekil 5	Çalışmanın uygulama aşamaları	20
Şekil 6	Koçan püskülü kapatma işlemi	21
Şekil 7	Polenin filtreleme ile boyutlandırılması	21
Şekil 8	Polende TTC boyama ve görüntü analizleri	22
Şekil 9	Farklı iriliklere sahip polen örneklerine ait regresyon grafiği	26
Şekil 10	Sera koşullarında kontrollü tozlama işlemleri	27
Şekil 11	CIM2GTAIL-P2 indirgeyici hattı ile indüksiyon melezlemesi yapılmış koçanlar	27
Şekil 12	Haploid ve diploid olarak ayrılan tohum örneklerinden bir görüntü	28
Şekil 13	50 mikron ve 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinin NIR ölçümleri	32
Şekil 14	50 mikron ve 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinin Raman ölçümleri	33
Şekil 15	Polen örneklerinden yapılan SDS-PAGE' e ait jel görüntüsü	34
Şekil 16	Baba (toz verici) olarak kullanılan indirgeyici hattın genotipleri ile ana (toz alıcı) olarak kullanılan genotiplerin melezlenmesiyle oluşan HIR değerleri	36
Şekil 17	Tohum örneklerinden yapılan SDS-PAGE' e ait jel görüntüsü	37

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ

1.1. Mısır ile İlgili Genel Bilgiler

Poaceae familyasından olan mısır (*Zea mays*) aynı bitki üzerinde hem erkek hem dişi organa sahip olan ve yüksek oranda yabancı döllenen bir bitkidir. Mısır insan ve hayvan beslenmesinin yanı sıra sanayi için de hammadde olarak kullanılan önemli bir tahıldır (Prasanna vd., 2001). FAO 2019 verilerine göre dünyada yaygın olarak Amerika, Çin ve Brezilya'da yetiştiriciliği yapılan bu bitki, birim alan verimi ve üretim miktarı bakımından tahıllar içerisinde ilk sırada yer alır (FAO, 2019). Çeşitli endüstri dallarında hammadde olarak kullanılmasından dolayı mısır bitkisine olan talep dünya nüfusunun artışına paralel olarak artmaktadır. Bu talebi karşılamak için yüksek verimli ve kaliteli çeşitlerin ıslah edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Kahrıman vd., 2013). Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK, 2020) verilerine göre Türkiye' de 2018 yılında yaşanan ekim alanındaki azalma haricinde ekim alanı ve ürün miktarı artış göstermiş olup, tane amaçlı üretim alanı 692 bin hektar ve üretim miktarı 6,50 milyon ton seviyesindedir (Şekil 1).



Şekil 1. Türkiye'nin 2011-2020 yılları arasında mısır ekiliş alanı ve üretim miktarları

Mısırda verim artışının sağlanmasında yüksek verimli yeni çeşitlerin geliştirilmesinin önemli bir payı vardır. Dünyada hızlı nüfus artışı, hastalık, değişken iklim şartları ve bitki zararlılarının direnç kazanması gibi faktörler de yeni melez çeşitlerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Yüksek kaliteli ve verimli mısır melez çeşitlerin gelişitirilmesi için ise üstün nitelikli ebeveyn hatların ıslah edilmesine ihtiyaç vardır (Dwivedi vd., 2015). Klasik

yöntemlerle ebeveyn hatların geliştirme işlemi uzun zaman almaktadır. Mısır ıslah programlarında evebeyn hatların geliştirilme süresinin kısaltılması için farklı teknik ve teknolojilerden yararlanılmaktadır. Hızlı gelişen teknoloji, ıslahın genom düzeyindeki çalışmalara inmesi ve haploid bitki üretim teknolojileri bu maksatla kullanılan teknikler içerisinde öne çıkan yaklaşımlardır. Ülkemizde yürütülen mısır ıslah programlarında da yeni teknolojilerin ve tekniklerin kullanılması sayesinde çok daha etkin şekilde yürütülmeye başlanmıştır. Başarılı çeşit ıslahı ebeveyn hatların başarı oranı ile ilgili iken, ebeveynlerin yüksek homozigotluğa sahip olması ise F1 hibrit mısır üretiminin temel yaklaşımlarından birisidir. Bu bakımdan melez mısır çeşitlerinin geliştirildiği mısır ıslah programlarında ebeveyn hatların geliştirilmesi en önemli aşamalardan birisidir. Ebeveyn hat geliştirmede haploid bitkilerin elde edilmesi ve bu bitkilerin özel yöntemlerle kromozom katlamaya tabi tutulması ile %100 homozigot hatların geliştirilmesi mümkündür.

1.2. Mısırda Haploid Bitki Elde Etme Yöntemleri

Mısır yabancı tozlanan bir bitki olduğundan geleneksel yöntem ile saf hat elde etme işlemi oldukça uzun zaman almaktadır. Mısır ıslah programlarında geleneksel yöntemler ile saf hat oluşumunda en az 6-7 yıl süre gereklidir yine de geçen süre zarfında %100 homozigotluk seviyesi elde edilememektedir (Chase, 1969). Bitki ıslahçıları istenilen düzeyde homozigotluk oranını yakalamak zaman tasarrufu sağlamak, maliyetleri azaltmak için yeni ıslah teknolojilerine başvurmuşlardır (Cengiz ve Korkut., 2016). Bu yeni ıslah teknolojileri arasında haploid bitki oluşturma yöntemleri önemli avantajlara sahiptir (Cerit vd., 2016). Röber vd. (2005) hibrit mısır ıslah çalışmalarında katlanmış haploid (KH) hatları kullanmanın avantajlarını; uzun süren ıslah çalışmalarında çalışma süresini minimuma indirerek ıslah çalışmalarında zaman tasarrufu sağlaması, %100 homozigotluk düzeyine ulaşılması, istenilen genlere yönelik çalışmalar yapılabilmesi, kontrollü ve sayıca fazla haploid bitkiler elde edilebilmesi, deneysel çalışmalarda maksimum genetik varyans sağlaması, tohum partilerinin taşınması, nakliyesi ve ıslahı için daha az masraf gerektirmesi olduğunu belirtilmiştir. Bu tekniğe yönelik farklı çalışmalarda ise KH hatlarının; 2-3 sene içerisinde geliştirilen hatların ticari olarak kullanılabilmesi (Röber vd., 2005; Elver, 2018), KH bazlı ebeveyn hatlarının tam homozigotluğu ve homojenliği nedeniyle bitki çeşitlerinin korunması için DUS (farklılık, tekdüzelik, kararlılık) gereksiniminin yüksek oranda

karşılaması (Geiger ve Gordillo, 2009), moleküler belirteçlerle kombinasyon halinde KH teknolojisi hibrit çeşitlerin dişi ve erkek ebeveyn soylarında bulunan germplazmaya erişimi kolaylaştırması (Heckenberger vd., 2005), markör destekli gen introgresyonu (Forster ve Thomas, 2005) gibi çeşitli alanlarda kullanılması şeklinde belirtilmiştir.

Bitki ıslahçıları uzun zaman alan ıslah çalışmalarının süresini kısaltmak için *in vitro* ve *in vivo* şartlarda yürütülen yeni tekniklere başvurmaktadır (Chidzanga vd., 2017). *In vitro* haploid bitki eldesi laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmektedir. Günümüzde haploid bitkilerin üretimi için *in vitro* şartlarda; androgenik çalışmalar (anter ve mikrospor kültürü) ve ginogenik çalışmalardan; ovül (yumurta) ve ovaryum (yumurtalık) kültürü, ışın işlemi kullanılarak polenle tozlama yapılarak mısırda maternal haploid sayısının arttırılması (Mathur vd., 1976), farklı sıcaklık derecelerine maruz bırakılan polen örneklerinden haploid bitki eldesi (Mathur ve Sarkar, 1980), kimyasallarla indüklenen saf mısır hatlarının üretimi için maleichydracide uygulanması (Zuoyo ve Mingguang, 1984) ve herbisit uygulamaları gibi farklı tekniklerden yararlanılmaktadır. *In vitro* şartlarda polenden haploid tohum eldesi için mikrospor tekniği de yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrospor tekniği ilk olarak *Brassica oleraceae* x *Brassica alboglabra* ve *Brassica oleraceae* bitkilerinin melezlenmesiyle kullanılmış ve bu bitkilerden oluşan polenlerden koloniler oluşturularak mikrospor kültür tekniğiyle haploid bitki oluşturulmaya çalışılmış fakat tam başarı sağlanamamıştır (Kameya ve Hinata, 1970). Nageli vd. (1999) yürüttükleri çalışmada mısırda mikrospor tekniği ile haploid bitki oluşturabilmişlerdir. Mısırda haploidi, doku kültürü tekniği (*in vitro*) veya genetik indüksiyon (*in vivo*) yoluyla elde edilebilmektedir (Zhang, 2008). Ancak *in vitro* uygulamalarında genotip etkisi nedeniyle istenilen düzeyde sonuçlar alınamamakta olup ticari olarak geliştirilen mısır katlanmış hatları genellikle *in vivo* haploid tekniği ile elde edilmektedir (Geiger ve Gordillo, 2009).

1.3. *In Vivo* Şartlarda Haploid Bitki Eldesi ve Mısırda Kullanımı

Haploid bitkiler doğada çok düşük frekansta bulunmakta olup (Geiger, 2009), bu frekans indirgeyici hatların kullanımı ile artırılabilmektedir (Altuntaş, 2018). Bu kapsamda farklı metotlar kullanılarak haploid kromozom setine sahip eşey hücrelerinden (gametik hücrelerden) yararlanılıp haploid bitki elde edilmesi yöntemine haploidizasyon denilmektedir (Elver, 2018). Doğada bu olay bazı bitki türlerinde kendiliğinden ortaya çıkmasına karşın gerçekleşme frekansı oldukça düşüktür. Haploidizasyon sonrasında kromozom setlerinin katlanması ile %100 homozigot katlanmış haploid hat geliştirmek mümkündür. Haploidizasyon üzerine ilk çalışmalar Blakeslee vd. (1922) tarafından *Datura stramonium* bitkisi üzerinde yapılmıştır. Sonraki yıllarda Kostoff (1929), (*Nicotiana tabacum* x *N. langsdorfii*) melezlemelerinde haploid bitkilerin oluştuğunu rapor etmiştir. Bu bilgiler ışığında daha sonraları çeşitli bitki türlerinde doğal partenogenesis veya farklı deneysel analizler ile haploid bitkilerin oluşumu üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu amaçla *in vivo* şartlarda haploid bitki eldesi son zamanlarda geliştirilen ve günümüzde haploid bitkilerin elde edilebilmesi için mısırda yaygın olarak kullanılan tekniklerden birisidir. Esasen mısır ıslahında haploid tohum elde edilmesine yönelik çalışmalar uzun süre öncesine dayanmaktadır (Chase, 1969). Bu teknik 'indirgeyici hat' (inducer) adı verilen ve haploid tohum oluşumunu sağlayan özel hatların ıslah çalışmalarında kullanımına dayalıdır. Haploid indirgeyici hatlar tozlayıcı veya donör olarak kullanıldığında toz alıcı olarak kullanılan bitkinin koçanlarında haploid tohum oluşumuna olanak sağlamaktadır. Oluşan haploid tohumlardan seleksiyon işlemi gerçekleştirilip çimlendirildikten sonra çimlenen tohumlara kolçisin uygulanarak kromozom katlaması sağlanır ve %100 homozigot fertil katlanmış haploid hatlar oluşmuş olur (Cengiz ve Korkut., 2016).

Günümüzde, *in vivo* haploid metodu ıslahçılar tarafından yüksek başarı sağlaması, basit olması ve ucuzluğu nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. *In vivo* haploid metodu ile çok kısa zamanda saf hatlar elde edilmektedir. *In vivo* haploid tekniği ile haploid bitki oluşumunda paternal (androgenetic) haploid tekniği ve maternal (gynogenetic) haploid tekniği olmak üzere iki yöntem bulunmaktadır. Maternal haploid (gynogenetic) yönteminde indirgeyici genotiplerle tozlanan hatlardan haploid embriyolar elde edilmektedir (Dwivedi vd., 2015). İndirgeyici hattan gelen polen, yumurta hücresinin sadece haploid maternal genom içeren embriyo gelişimini tetiklemektedir. *In vivo* gynogenesis sayesinde indirgeyici genotiple tozlanan hatlardan haploid tohumlar elde edilebilmektedir (Yorgancılar vd., 2019;

Dwivedi vd., 2015). Paternal haploid (androgenetic) yönteminde indirgeyici hat polen alıcı yani ana olarak kullanılmaktadır. Paternal haploidlerin sitoplazması indirgeyici hattan meydana gelir fakat kromozomlar sadece donör bitkiye aittir. Maternal haploid yöntemi sonucu oluşan haploid indirgeme oranı, paternal haploid tekniğine kıyasla çok daha yüksektir (Lashermes ve Beckert 1988). Bu nedenle pratikte maternal haploid tekniği mısır ıslah programlarında paternal haploid tekniğinden daha fazla tercih edilmektedir. Maternal haploid tekniğinde kullanılan indirgeyiciler, diğer genotipleri tozlaştırmak için kullanıldıklarında haploid embriyolara sahip tohum üretme özelliğine sahiptir. Homozigot hat üretiminin *in vivo* katlanmış haploid tekniği ile yapılması, geliştirme sürecini kısaltır ve sonuç olarak genetik kazancı arttırır. Bu avantajları nedeniyle, bu teknik mısır ıslah programlarında geniş bir şekilde kullanım alanı bulmuştur.

Mısır bitkisinde haploid çalışmaları ve tanımlanması ilk olarak Randolph (1932) tarafından gerçekleştirilmiştir. Sonraki yıllarda Chase (1947), Amerika mısır kuşağındaki örneklerde haploid indirgeme oranını %0,1 olarak bulmuştur ve açıklanan bu oran oldukça düşük olduğundan ticari uygulamaya elverişli bulunmamıştır. Chase (1952) tarafından yürütülen çalışmada haploid bitkilerin mısır ıslahında ve genetik çalışmalarda büyük oranda potansiyel oluşturabileceğini vurgulanmıştır. Bu tekniğin kullanılması ile ticari hibritlerin geliştirilmesi ile de haploid bitki elde etme çalışmaları hız kazanmıştır. *In vivo* haploid indüksiyonunun temeli ticari olarak uygulanabilecek düzeyde geliştirilen %2,3'lük yüksek haploid indirgeme oranına sahip "Stock 6" hattı tanımladığında atılmıştır (Coe, 1959). Bu genetik kaynak, dünya çapındaki daha yüksek haploid indirgeme oranlarına (HIR) sahip yeni indirgeyicinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Prasanna vd., 2012). Toz verici (donör) olarak kullanılan indirgeyici hatların *in vivo* maternal haploid yöntemiyle Stock 6 indirgeyici hattından oluşturulan haploid bitki oluşum oranı %0,1 iken, bu hattan geliştirilen modern indirgeyici hatlarda gözlenen oran %6-14 olmuştur (Coe, 1959; Geiger, 2009). Hohenheim Üniversitesi Bitki Islahı Enstitüsü'nde geliştirilen RWK-76 ve RWS indirgeyici hatları, ülkemizde de kullanılan ve yüksek başarı sağlayan indirgeyici hatlardan bazılarıdır. Mısır ıslah çalışmalarında bu indirgeyici hatlar haploid tohum elde etmede kullanılmaktadır ve indirgeme oranı yaklaşık %8-12 civarlarındadır (Yorgancılar vd., 2019). Geçmişi Stock 6'ya dayanan KEMS, WS14 ve MHI yüksek haploid indirgeme oranlarına sahiptir (Röber vd.,

2005). Bu indirgeyici hatların ortalama indirgeme potansiyelleri %8 civarındadır (Prigge vd., 2011).

1.4. *In Vivo* Katlanmış Haploid Tekniğinde Haploid Tohumların Ayrımı ve Haploid İndirgenme Oranı

Haploid tohumlar tohumda antosiyanin oluşumu gibi fenotipik belirteçlerle diploid tohumlardan veya yetişkin aşamada bitki özelliklerindeki farklılıklardan kolaylıkla ayırt edilebilir (Chaikam vd., 2015). Bu amaçla, haploid indirgeyici hatlarla çaprazlamadan sonra haploid tohum ayrımında mor bir endosperm ve renksiz embriyo taşıyan haploid tohumların seçimi antosiyanin markör geni (R1-nj) kullanılarak tanımlanabilmektedir (Nanda ve Chase, 1966). Donör materyaller ile indirgeyici hatların melezlenmesi sonucu oluşturulan koçanlarda üç farklı şekilde tohum oluşumu gözlenmektedir. Birincisi haploid olmayan tohumlardır ve bunlar kontaminasyondan dolayı renksiz embriyo ve endosperme sahiptir. Bu tohumlar az miktarda oluşurlar. İkinci kategoride mor renkli endosperm ve embriyoya sahip tohumlar bulunmaktadır. Bu tohumlar ise indirgeyici hatların kullanımıyla oluşan diploid tohumlardır ve indüksiyon melezlemesi sonrası oluşan tohumlar içerisinde bu grup en yüksek orana sahiptir. Üçüncü tip tohumlar ise mor renkli endosperme ve renksiz bir embriyoya sahip olan ve haploid olarak kabul edilen tohumlardır (Şekil 2).



Şekil 2. Haploid-diploid-melez tohum ayrımı

R1-nj renk markörü ilk olarak Nanda ve Chase (1966) tarafından kullanılmıştır. İndirgeyici hatlarda gözlemlenen dominant R1-nj geni endosperm ve embriyoda mor-kırmızı bir renk oluşturarak ayırt edici özelliğe sahiptir. Tohum döneminde haploid genotipleri diploidlerden ayırmak için antosiyanin renkliliğine bağlı bu markör

kullanılmaktadır (Cengiz ve Korkut, 2016). Bu renklenme indüksiyon melezlemesi sırasında tohum aşamasında haploid tohumların kolay ve hızlı tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Chaikam vd., 2015). Göz ile renk markörüne dayalı olarak yapılan haploid-diploid tohum ayrımı flow sitometri cihazı ile, polen boylarının ölçülmesi, karyotipik çalışmalarla kromozom sayılarak belirlenmesi gibi farklı yöntemlerle de gerçekleşmektedir (Röber vd., 2005; Cerit vd., 2016). Haploidlerin indirgenme mekanizmasını anlaşılması, süper indirgeyici hatların seçilmesine yardımcı olabileceği ve böylece ıslah programlarının verimliliğini daha da arttırabileceği bildirilmiştir (Li vd., 2017). İlaveten *in vivo* haploid tekniğinde kromozom katlanmasındaki başarı oranlarının iyileştirilmesi, hat geliştirmede önemli maliyet tasarrufları sağlayabilir. Farklı kolçisin uygulama yöntemleri ile, ıslah programlarında işleme alınacak potansiyel haploidlerin sayısını azaltarak kaynak tasarrufu sağlanabilir (Chaikam vd., 2020).

İndüksiyon melezlemesi sonrasında oluşan ve genelde göz ile ayrılan tohum örneklerinde hesaplanan önemli parametrelerden birisi haploid indirgeme oranıdır (HIR). HIR değeri haploid olarak kabul edilen tohumların indüksiyon melezlemesinden elde edilen toplam tohum sayısına oranlanması ile bulunmaktadır. HIR değeri indirgeyici mısır hatları için önem arz etmektedir. Haploid indirgeme oranı yüksek indirgeyicilerin geliştirilmesi son yıllarda mısır ıslahında önemli amaçlardan birisi haline gelmiştir. Ancak geliştirilen indirgeyicilerden bazıları belirli çevre şartlarında yetişebildiğinden HIR değerinin artırılması için farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.5. Mısır Poleninin Özellikleri ve *In Vivo* Haploid Tekniğindeki Önemi

Polen, tohumlu bitkilerin (spermatofitler) yaşam evresinde önemli role sahip olan çok hücreli haploid gametofittir. Abiyotik ve biyotik tozlaşma vektörleri tarafından yüksek hareketliliklerinden dolayı polenler, bitki popülasyonları arasındaki gen akışında önemli bir paya sahiptir (Luna, 2001). Polen taneleri çeşitli şekillere, boyutlara ve yüzey özelliklere sahip olabilmektedir. Mısır poleni biyokimyasal bileşenler bakımından oldukça zengindir (Campos vd., 2015). Polen tanelerinde başlıca karbonhidratlar, proteinler, amino asitler, lipitler ve mineral maddeler gibi besinsel olarak gerekli maddeler bulunmaktadır. Yağlara

ve proteinlere ek olarak, polende karotenoidler, jasmonatlar (yağ türevli bileşikler), flavonoidler, fenolik asitler ve klasik fitohormonların çoğu gibi küçük aromatik moleküller tespit edilmiştir. Tüm bu bileşiklerden, yalnızca belirli bir flavonoid sınıfı olan flavonoller, polen çimlenmesinde önemli bir etkiye sahiptir (Bujang vd.,2021).

Mısır bitkisinde polen tanelerinin salınımı ortam sıcaklığına, nemine ve bitkinin genetik yapısına bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Polen taneleri canlıdır ve bitki yaşam döngüsünde önemli bir işlevi vardır. Çevre koşulları polenlerin hayatta kalma sürelerini etkiler bu nedenle polen çalışmaları, biyolojik çeşitlilik, bitki-tozlayıcı etkileşimlerine dikkat edilmesi önemlidir (Kendel ve Zimmermann, 2020). Mısırda polen üretimi günün farklı saatleriyle ilişkilendirilse de esasen günün saatinden ziyade ortam sıcaklığı ve bağıl nemin polen canlılığını etkileyen ana faktörler olduğu bilinmektedir (Kaefer vd., 2016). Polen taneleri çevresel etkilere karşı fazla dayanıklı değildir ve atmosfere salındıktan sonra bir ila dört saat içinde canlılığını kaybedebilir (Ferreira vd., 2007; Bujang vd., 2021). Mısır poleninin şekli yaygından küremsiye doğru değişim göstermektedir. Nem kaybı gözlendiğinde polen çevresi girintili çıkıntılı bir hal alarak rengi açık sarıdan kehribara değişerek prizmatik bir hal almaktadır. Ortamın yüksek sıcaklığı ve düşük nemi mısır polenlerini küçültür. Mısır poleni, yüksek sıcaklığa ve kurumaya karşı çok hassastır. Su kaybına uğrayıp büzülen polen, mısırın tohumlarına benzemektedir. Mısır poleni dehidrasyon ve rehidrasyona da duyarlıdır (Aylor, 2003). Polenin depolama ve kurutma sırasında bozulması, koku, tat, renk ve şekil değişiklikleri, hücre içi bütünlüğün bozulması, enzim aktivitelerinde azalma, yağ peroksidasyonu ve fenolik oksidasyon gibi birçok fiziksel ve kimyasal değişikliğe neden olmaktadır (Bujang vd., 2021).

Mısır bitkisinde polen üretimini ölçmek, kimyasal yapısını belirlemek, canlılığını test etmek için farklı yaklaşımlardan yararlanılmıştır (Fonseca vd., 2005). Mısır poleninde canlılığının belirlenmesine ilişkin yürütülen çalışmalara göre mısır poleni, nem içeriği azaldıkça canlılığını hızla kaybettiği için diğer türlerdeki polenlere göre kurumaya karşı toleranssız olarak kabul edilir. Polen canlılık kaybı, düşük bağıl nemde ve yüksek sıcaklıklarda daha hızlıdır (Fonseca vd., 2005). Mısır tahıl türleri içerisinde en büyük polen tanelerine sahip olup polen taneleri morfolojik olarak kabaca küreseldir ve ortalama çapı 90

μ civarındadır (Di-Giovanni vd., 1995). Mısırda polen gelişim evresi sürecinde ana hücresinden üç çekirdekli olgun evreye geçene kadar irilikleri değişkenlik göstermektedir. Mikrosporogenesis ve mikrogametogenesis süreçleri sırasında, polen taneleri (üç hücreli haploid erkek gametofitleri), büyük bir vejetatif tüp hücresi içerisinde iğ şeklindeki iki çekirdekten oluşur (Zhou vd., 2017). Bu gelişim evrelerine göre de polenin morfolojik özellikleri ve iriliği değişkenlik göstermektedir.

Polen tanımlaması için geleneksel yöntemler morfolojik bilgilerin analizine dayanmaktadır. Bu analizler, büyük ölçüde, polenlerin optik veya taramalı elektron mikroskopları ile gözlemlenmesi ve tane boyutlarının, şekillerinin ve yüzey yapılarının referans polenlerle karşılaştırılmasını içermektedir (Laucks vd., 2000). Haploid bitki polenleri daha küçük iriliğe sahiptir ve bu polenlerin spektral analizlere tabi tutularak ayrıştırılabileceği ortaya konulmuştur (Wang, 2018). Geçmişte, polenin kimyasal karakterizasyonu farklı spektrokimyasal yaklaşımlar kullanılarak araştırılmıştır. Bununla birlikte NIR ve Raman spektroskopisi, polenin farklı kimyasal bileşenlerinden gelen titreşim bilgisi sayesinde polen türleri arasında ayrım yapılmasını mümkün kılmaktadır (Ivleva vd., 2005). Raman spektroskopi teknikleri ile polen moleküllerinin kimyasal yapısıyla ilgili bilgi alınabildiğinden polenleri tespit etmek, kimyasal olarak karakterize etmek mümkündür (Kahraman, 2011). Literatürde Raman spektroskopisi kullanılarak proteinlerin, karbonhidratların, amino asitlerin, peptitlerin, DNA'nın, doku ve hücrelerin karakterizasyonu veya görüntülenmesi üzerine çok sayıda araştırma rapor edildiği gibi polen üzerine yapılan araştırmalar da mevcuttur. Yürütülen bu çalışmalarda moleküllerin direkt olarak parmak izi özelliğinden Raman spektrumları kullanılarak karakterizasyon ve görüntüleme işlemi yapılmaktadır. Farklı bitki türlerine ait polen örneklerinde de Raman spektroskopisi kullanılarak parmak izi benzeri kimyasal bilgiler ile karşılaştırmalı analizleri yapılabilmektedir (Schulte vd., 2008). Raman spektroskopisinde kullanılan Raman spektrumları her moleküle göre ayrı ayrı özgün olduğundan başarılı sonuç vermektedir (Sun vd., 2008). Yakın kızılötesi spektroskopiye (NIR) dayalı yöntemler, gıda ve tarım örneklerinin bileşenlerinin ve miktarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Costa vd., 2017). Yakın kızılötesi spektroskopisi (NIR) de mısır polen bileşenlerinin numune ön işlemine gerek kalmadan hızlı ve masrafsız bir şekilde ölçülmesine izin vermektedir. NIR spektroskopisi modern analiz yöntemleri arasında en çok kullanılanlardan

yöntemlerden birisidir (Hooton, 1978). Son on yılda, yakın kızılötesi dağınık yansıma spektroskopisi (NIR), tarımsal ürünlerin hızlı analizi için önde gelen bir yöntem haline gelmiştir (Calderon vd., 2007; Costa vd., 2017). NIR spektroskopisin de polen analizlerinde kullanım potansiyelinin ortaya konulması için farklı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

1.6. Çalışmanın Amacı

In vivo katlanmış haploid tekniği birçok bitkide olduğu gibi mısırda da yaygın olarak kullanılmaktadır. *In vivo* katlanmış haploid tekniğine yönelik yürütülen çoğu çalışmada indirgeyici hatların indirgeme oranları belirlenerek haploid tohum oluşturabilme kabiliyetine ve haploid-diploid tohum ayrımına odaklanılmıştır. Mısırda indirgeyici hattın polen örnekleri haploid tohum oluşturulmasında ana etmen olarak gösterilmektedir. İndirgeyici hattan toplanan polen örneklerinin farklı boyutlara sahip olması polenin gelişim evreleriyle yakından ilişkilidir. Farklı iriliklere ayrılan polenlerin de haploid tohum oluşturma kabiliyetlerinin değişip değişmeyeceğine yönelik bir araştırmaya da rastlanmamıştır.

Yukarıda açıklanan hususlara dayalı olarak bu tez çalışmasının amaçları;

i) indirgeyici hattan toplanan mısır polenlerinin farklı iriliklere ayrılarak morfolojik, moleküler ve spektral olarak polen örneklerini karakterize etmek,
ii) farklı boyutlara ayrılan polenlerin indüksiyon melezlemesinde kullanılması halinde polen iriliğine göre haploid indirgeme oranının (HIR) değişip değişmediğini araştırmak ve farklı irilikteki polenlerin kullanıldığı tozlamalardan elde edilen haploid ve diploid tohumlar arasında protein bant dizileri bakımından bir fark oluşup oluşmadığını incelemektir.

İKİNCİ BÖLÜM
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Polen Analizlerine Yönelik Çalışmalar

Daniel (1955) polen canlılığı üzerine yürüttüğü çalışmada düşük sıcaklıklar (-5°C ve -20°C) ve %50'den az nem bulunan bir ortamın polen canlılığı için zararlı olduğunu

belirtilmiştir. Mısır poleninde canlılığının belirlenmesine ilişkin yürütülen eski çalışmalara bakıldığında, polenin işlevsel ömrünün nispeten düşük sıcaklıklarda ve yüksek bağıl nemde daha uzun olduğu konusunda genel bir fikir birliği vardır (Johri ve Vasil, 1961). Raynor vd. (1970) polenin dağılımı ve birikmesi üzerinde polen iriliğinin büyüklüğünün niceliksel bir etkisini açıkça göstermiştir.

Mısırda, indirgeyici mısır hattının polen örneklerine yüksek ve düşük sıcaklık uygulamalarının haploid oluşumuna etkisi ele alınmıştır. Çalışma 3 yıl boyunca tekrar edilmiş ve erkek olarak kullanılan indirgeyici mısır hatların polenleri farklı tepe püsküllerinden toplanmıştır. Toplanan indirgeyici hattın polen örnekleri bir arada getirildikten sonra cam şişelerde dört eşit parçaya bölünmüştür. Bir şişedeki polen, kontrol olarak tozlaşmada kullanılıp diğer üç şişe, ayrı ayrı bir fırında 40 °C, 45 °C ve 50 °C'de 5 dakika süreyle ısıl işlemlere tabi tutulmuştur. Polenlerin 50 °C'de ısıl muamelesi tüm yıllar boyunca maternal haploidlerin sıklığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Daha düşük sıcaklık muamelelerinde ve kontrolde haploid frekanslarında önemli farklılıklar gözlemlenmemiştir. Mısırda haploidler ara sıra meydana gelse de maternal haploidlerin kökenine yol açan olaylar henüz net olarak belirlenmemiştir (Mathur vd., 1980).

Johnson ve Herrero (1982) polen canlılığının yüksek sıcaklıklarla büyük ölçüde azaldığını bildirmiştir. Bu durumu destekler nitelikte olan bir diğer çalışmada Schoper vd. (1986) mısır püskülü üzerindeki yüksek sıcaklık stresinin polen canlılığında büyük bir azalmaya neden olduğunu bildirmiştir.

Chay vd. (1992) yürüttükleri çalışmada mısır mikrosporlarından ve polenden, polen dış duvarını saflaştırarak bu yapılarda bulunan proteinleri analiz etmeyi amaçlamışlardır. Morfolojik olarak polenin farklı birkaç gelişim aşamasından yüksek oranda saflaştırılmış polen duvarları hazırlayabildiklerini göstermişlerdir. Başlangıç materyali olarak olgun mısır poleni kullanıldığında, toplam polen proteininin %0,2 ila 0,3'ü, saflaştırma boyunca polen duvarı fraksiyonu ile bağlantılı kalmıştır. Nihai fraksiyonda sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile moleküler ağırlığı 15 kDa ile 85 kDa arasında 7 adet protein saptanmıştır. 15 kDa moleküler ağırlığa sahip proteinde izole edilen en erken

aşamada genç mikro gözeneklerin varlığı gözlemlenmiştir. Olgun polende bulunan diğer proteinler, erken gelişim aşamalarında belirgin olarak gözlemlenmemiştir.

Roeckel-Drevet vd. (1995) mısır poleninin genellikle nispeten yüksek nem içeriğine sahip olduğunu (yaklaşık %60) ve dehidrasyonun ATP oluşumunu bozduğunu ve bunun neticesinde polen canlığında kayıp olduğunu gözlemlemiştir.

Laucks vd. (2000) tarafından yürütülen çalışmada çeşitli polen parçacıkları kullanılarak Raman spektroskopisi ile polen parçacıklarını kimyasal olarak karakterize etme yöntemlerine başvurulmuştur. Çalışmada kullanılan çevrimiçi Raman tekniği bir Raman spektrometresine bağlı bir elektrodinamik dengede tekli polen partiküllerinin yakalanmasını içerir. İncelenen çeşitli polenlerin yoğunluklarını ve aerodinamik boyutlarını aynı anda belirlemeyi amaç etmişlerdir. Çalışma sonucunda online sistemde elektrodinamik yaylanma noktası ölçümlerinden partikül yoğunluğu belirlenerek video mikroskobu ile geometrik polen boyutu ölçülmüştür. Analizler polenlerin optik veya taramalı elektron mikroskopları ile gözlemlenmesi ve tane boyutlarının, şekillerinin ve yüzey yapılarının referans polenlerle karşılaştırılmasını sağlamıştır.

Luna vd. (2001), sıcak ve kuru tarla şartlarına maruz kalan mısır poleninin canlılığının 1 saatte %20 oranda düştüğünü ve 2 saat içinde %100 cansız olduğunu bildirmişlerdir.

Aylor (2003) mısır poleninin bağıl nem içeriğinin, havadaki polenin hem canlılığında hem de hareketinde önemli bir rol oynadığını öne sürmüştür. Bu nedenle, polen kurumasının dinamiklerini ölçmek, polen dağılımını ve geçiş potansiyelini ilişkilendirmek için kritik öneme sahiptir. Mısır poleninin 7°C ve %50-70 bağıl nemde on gün boyunca canlı kaldığı bildirilmiştir.

Polen kuruma oranını ve sonraki canlılık kaybını simüle etmek için buhar basıncı açığının (VPD) kullanılıp kullanılamayacağını test eden Fonseca ve Westgate (2005) serada ve tarlada yetiştirilen bitkilerden polen toplayarak işlenen polenin canlılığını *in vitro* şartlarda test etmişlerdir. Bu testler, polen tanelerinin yaklaşık %55-60 nem içeriğinde anterlerden salındığını ve kurumanın hava sıcaklığı, bağıl nem ve zamanın fonksiyonel bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Bu faktörler, birkaç genotip için polen kuruma oranının tanımlanmasını sağlamıştır. Sonuçlara göre polen canlılığı %77 ile %93 arasında değişmiştir.

Raman spektroskopisi ölçümlerinin yapıldığı ve farklı bitki türlerine ait polen örnekleri kullanılarak yürütülen bir çalışmada, polen örneklerinde çeşitli molekül sınıfları aynı anda mikroskobik çözünürlükte analiz edilmiştir. Farklı türlerden polenlerin sınıflandırılması için parmak izi benzeri kimyasal bilgilerin elde edilmesi sağlanmıştır. Çalışmada 15 türün taze polen örneklerinden alınan spektrumların hiyerarşik küme analizi, türlerin tam Raman spektrumuna ve biyolojik sistematiğe göre ürün sınıflandırmasına dayalı olarak ayrıldığı gösterilmiştir. Raman spektroskopinin, polen biyokimyasının daha fazla aydınlatılması ve ayrıca kimya tabanlı çevrimiçi polen tanımlama yöntemlerinin geliştirilmesi için faydalı olacağı ileri sürülmüştür (Schulte vd., 2008).

Yu vd. (2014) protein profilleme teknikleri ile mısırda polen ve pistildeki (ga1; Ga1) yeni proteinleri tanımlamak, protein analizi gerçekleştirebilmek ve gametofitik etki mekanizmasının araştırılması için bir çalışma yürütmüşlerdir. Gametofitik faktör taşımayan ve izogenik bir hat olan W22 (Ga1) proteom araştırması için kullanılmıştır. W22 (ga1) ve W22 (Ga1) polen ve pistillerindeki proteinleri araştırmak SDS-PAGE analizleri yapılmıştır. SDS-PAGE analizi ile LTQ-FTICR MS kullanılarak polen ve pistilde toplam 44 adet farklı protein tanımlanmıştır. 44 protein arasında polende toplam 24 protein tanımlanırken pistilde 20 farklı şekilde eksprese edilmiş protein tanımlanmıştır. Bununla birlikte, W22 hattında (ga1) poleninde sadece 2 protein bulunurken, W22'nin (Ga1) poleninde 10 protein olduğu tespit edilmiştir. Pistil örneklerinin kullanıldığı analizlerde, W22 hattında (ga1) 10 protein ve W22 hattında (Ga1) 7 protein olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, gametofitik faktörlerin mekanizmasının ayrıntılı şekilde tanımlanmasının

ve belirlenmesinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara gerek olduğunu göstermiştir.

Li vd. (2017) maternal haploid tekniği ile tam genom dizilimi için bir polen tanesinden üç çekirdeği ve bir tetraddan dört mikrosporu izole etmek için bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada CAU5 indükleyici hattının polen ploidi seviyesi ölçülmüştür. Toplamda, CAU5'in 22 olgun polen tanesinden 66 çekirdek izole edilmiş, büyütülmüş ve tüm genom dizilenmiştir. Trifeniltetrazolyum klorür (TTC) boyaması ile indükleyici ve doğal hatlar arasında polen canlılığında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu çalışmada farklı polen gelişim evrelerindeki polen örneklerinin haploid indüksiyon oranı ile ilgili olabileceğini ileri sürülmüştür. Araştırmacılar indirgeyici haploid polenin üç çekirdekli evresinde anoploidi oranının tetrat evresinden daha fazla olduğunu raporlamışlardır.

Kendel ve Zimmermann (2020) çok değişkenli veri analizi ile spektroskopik analiz yöntemleri ile polenin kimyasal karakterizasyonu, tanımlanması ve sınıflandırılmasını belirlemek için çalışma yürütmüşlerdir. Tohumlu bitkilerin tüm ana taksonlarından 219 tür içeren bu çalışma, yüksek kaliteli Raman polen spektrumlarının Fourier dönüşümlü (FT) Raman spektroskopisi ile elde edilebileceğini göstermiştir. FT-Raman spektroskopisinin polen kimyası hakkında kapsamlı bilgi verdiği bildirilmiştir. Proteinler, yağlar, karbonhidratlar, karotenoidler ve sporopolleninler gibi polenin tüm ana biyokimyasal bileşenlerinin varlığı, spektrumlarda tanımlanmış ve tespit edilmiştir. Sonuçlar, FT-Raman spektroskopisinin, özellikle yüksek pigment içeriğine sahip polen numunelerinin ölçümü için, Raman spektroskopisine göre avantajlı olduğunu göstermiştir.

Bujang vd. (2021) yürüttüğü çalışmada mısır poleninin morfolojik özelliklerini, besinsel ve fitokimyasal özelliklerini incelemiştir. Malezya'da yürütülen çalışmada 20 adet D56 mısır hattı kullanılmıştır. Rastgele seçilen 5 bitkiden çiçeklenme zamanında taze polenler toplanmıştır. Taze veya -20°C'de saklanan polenlerin detaylı morfolojik yapıları 3 boyutlu mikroskopta incelenip antioksidan aktiviteleri, içerdiği mineral maddeleri, büyüklükleri ile toplam fenolik ve filavonoid içerikleri belirlenmiştir. Mevcut çalışma, mısır

poleninin daha yüksek besin değerlerine ve çoğunlukla fenolikler olmak üzere antioksidan bileşiklerin faydalı bir kombinasyonuna sahip olduğunu göstermiştir.

2.2. *In Vivo* Şartlarda Haploid Tohum Oluşumu ve Tanımlanmasına Yönelik İncelenen Çalışmalar

Haploid tohumları diploidlerden ayırmak için antosiyanin renkliliğine bağlı ticari anlamda kullanılabilecek markör Nanda ve Chase (1966) tarafından belirlenmiştir. Yürüttükleri çalışmada mısırda haploid tohumların saptanması için ticari değeri olan bir seçim yöntemi tanımlanmıştır. Bu yöntemde, mısır embriyosunda koyu mor bir pigment gözlemlenirken endosperminde kırmızı veya mor aleuron renk pigmenti gözlemlenmiştir. Antosiyanin markör geni olarak R1-nj genleri kullanılmıştır. Embriyoda mor renk sergilemeyen ancak endospermde kırmızı veya mor aleuron pigmenti olan taneler haploid tohum olduğundan saklanmıştır. Bu çalışmada, indirgeyici antosiyanin markör geni ile ticari değere sahip dokuz F1 hatlar tozlaştırılmıştır. Sınıflandırılan 194,157 tanenin çimlenmeden önce %98'den fazlasının atılması mümkün olmuştur ancak varsayımsal haploid tanelerin 201'i gerçek haploid oluşturmuştur.

Eder ve Chalyk (2002) yürüttükleri çalışmada maternal haploid tekniği ile haploid üretimi için iki haploid indükleyici MHI ve M741H hatlarını kullanmışlardır. Atdişi mısır, sert mısır ve sert mısır x atdişi mısır dahil olmak üzere deneyde yer alan tüm ana (toz alıcı) genotiplerinden haploid tohumlar elde edilmiştir. Maternal genotipin, elde edilen haploidlerin sıklığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Haploid sıklığı %2,7 ile %8,0 arasında değişim göstermiştir. Kromozom katlanması için, fideler kolçisin solüsyonu ile muamele edilmiş ve haploid bitkilerin %49,4'ü verimli polen üretmiş, %39,0'ı kendilenmiş ve %27,3'ü fertilizasyon sonrası tohum üretebilmiştir. Sonuçlar, maternal haploid bitkilerin kullanımının mısır ıslahı programları için büyük potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Röber vd. (2005) RWS indirgeyici hattının gelişimini ve özelliklerini açıklamış ve hibrit mısır ıslahında DH hatlarının kullanımının nicel genetik ve lojistik yönlerini tartışmışlardır. RWS indirgeyici hattı ile KEMSxWS14 indirgeyici hatları arasındaki oluşan

melezin 5 generasyon sonrasında elde edildiği raporlanmıştır. Haploid mısır taneleri, antosiyanin işaretleyici gen olan R1-nj markörü aracılığıyla ayırt edilmiştir. Bu işaretleyici gene dayalı yanlış sınıflandırma oranlarının genellikle düşük olduğu belirtilmektedir. Çeşitli indüksiyon ortamlarındaki testlerde RWS, değerlendirilen diğer indükleyicilere kıyasla tutarlı bir şekilde en yüksek indüksiyon oranını (ortalama olarak %8,1) göstermiştir.

Tang Qi-lin vd. (2009) haploid indirgeyici olan Stock 6 hattını kullanarak özel genotiplerde haploidlerin üretmeyi ve sitogenetik analizlerle üretilen bu hatları daha kapsamlı bir şekilde incelenmeyi amaçlamışlardır. Çalışmada materyal olarak Çin'in güneybatısında yetiştirilen Chuandan13 hattı indirgeyici Stock 6 hattı ile tozlaştırılmıştır. Haploid-diploid ayrımını gerçekleştirmek için Chase (1969) tarafından geliştirilen endosperm renk tarama tekniği kullanılmıştır. Bu teknik ile antosiyanin markör geni olan R1-nj ile yaklaşık 14 bin mısır tohumu haploidler için taranmıştır. Seçilmiş haploid mısırlar ile (n=x=10) üzerinde ayrıntılı mayotik çalışmalar yapılmıştır. Taranan haploid mısır tanelerinden 253 adeti çimlendirilerek somatik kromozom sayı tanımlaması için sitogenetik çalışmalar yapılmıştır. Sitogenetik analiz sonuçları mayoz I ve mayoz II' de yüksek sıklıkta mayotik anormallik olduğunu göstermiştir. Mayoz II evresindeki anormalliklerin bir sonucu olarak, çeşitli mikrosporlar ve farklı büyüklükteki polen taneleri oluşmuştur. Çalışma sonucuna göre antosiyanin markör geninin (R1-nj) zayıf ekspresyona sahip olduğu ve haploid bitkilerinin neredeyse tamamen steril olduğu açıklanmıştır.

Prigge vd. (2012) yürüttükleri çalışmada Uluslararası Mısır ve Buğday Geliştirme Merkezi'nde (CIMMYT) tropikal adaptasyona sahip haploid indirgeyici hatlar geliştirmeyi amaçlamaktadır. %8-10 haploid indüksiyon oranlarına (HIR) sahip ılıman indirgeyici hatlar ile tropikal CIMMYT mısır hatları (CML; HIR = %0) arasındaki çaprazlamalardan yeni nesiller geliştirmişlerdir ve bu yeni nesillerin tropikal arazi koşulları altında HIR oranlarını ve agronomik performans değerlerini belirlemişlerdir. Çalışma materyali olarak Orta Avrupa iklimine uyarlanmış üç indükleyiciyi (RWS, UH400 ve hibrit RWS × UH400) hat kullanılmıştır. Çaprazlamalar 2006/2007 kışında dişi ebeveynler olarak CIMMYT-Meksika'dan (CML494, CML451 ve CL02450) üç CML ve tozlayıcı olarak RWS × UH400 ve RWS × RWK arasında yapılmıştır. F2 bitkileri içerisinde toplu seleksiyon yöntemi

kullanılmıştır. Tropik adaptasyona sahip indirgeyicilerin HIR değerleri %10 bulunmuştur. Melezleme sonuçları yeni indükleyicilerin adaptasyonunu iyileştirmek için uygun olduğunu göstermiştir. Çalışmada tropikal haploid indirgeyici hat geliştirme aşamasında önemli ölçüde gelişme kaydedildiği raporlanmıştır.

Hu vd. (2014) farklı indirgeyici hatların haploid indüksiyon oranlarındaki farklılıkları analiz etmek için yaptığı çalışmada materyal olarak mor renkli 6 mısır indirgeyici hattı ile 10 farklı F1'i donör olarak kullanmıştır. İndirgeyiciler arasındaki ortalama HIR değer farkları anlamlı bulunmuştur. Sonuçlara göre HIR oranları %2,17-5,33 arasında değişim göstermiş olup indirgeyici hatların haploid indirgeme oranları küçükten büyüğe doğru KMS-3<WY-1<PR-2<YP-13<KMS-2 şeklinde sıralanmıştır. PR-2 haploid indirgeyici hattı yüksek haploid indükleme potansiyeline sahip seçkin bir haploid indükleyici olarak bulunmuştur.

Cerit vd. (2016) melez mısır ıslah çalışmalarında *in vivo* katlanmış haploid hat oluşumu için yürüttükleri çalışmada birbirinden değişik yapıdaki indirgeyici hattın haploid indirgeme oranlarını belirlemişlerdir. Yaptıkları denemede indirgeyici hat (baba) olarak RWK-76, RWS ile bunların melezlenmesiyle oluşan RWK-76 x RWS ve Stock-6 kullanılmıştır. Toz alıcı olarak 75 farklı genotip kullanılarak haploid tohum elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu genotipleri ıslah çalışmaları kapsamında F2 kademesinde olan 66 genotip ile açıkta tozlanan ticari hibrit çeşitleri arasından seçilen 9 farklı genotip oluşturmuştur. Elde edilen sonuçlara göre haploid tohum oluşturma oranları indirgeyiciden indirgeyiciye farklılık göstermiştir. Toz alıcı (ana) olan 75 genotipin 69 adedinden haploid tohum alınmış, 6 genotipte ise haploid tohum gözlenmemiştir. Haploid tohumların seleksiyonu antosiyanin markör geni olan R1-nj renk markörüne göre yapılmıştır. Melezleme sonucu oluşan ayırt edici marköre göre 1463 adet haploid tohum seçimi gerçekleşmiştir. RWK-76 indirgeyici hattında en yüksek haploid tohum oluşturma oranı gözlemlenirken (%7,80), Stock-6 indirgeyici hattan %1,28 oranında haploid tohum alınmıştır. HIR oranı ortalama %4,79 olarak saptanmıştır.

Kelliher vd. (2017) tarafından yürütülen çalışmada haritalama, genom dizileme, genetik tamamlama ve gen düzenleme tekniklerinden yararlanılarak, mısırda haploid indüksiyonun polene özgü bir fosfolipaz olan MATRILINEAL'deki (MTL) bir çerçeve kayması mutasyonu tarafından tetiklendiği tespit edilmiştir. Bu bulgunun haploid indirgeme sistemlerinin geliştirilmesi için faydalı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Haploid indirgenmesinin altında yatan gelişimsel genetiği açıklığa kavuşturmak için yürütülen çalışmada 2006 yılında Hohenheim Üniversitesi'nden Stock 6 türevi RWK (yaklaşık %13 HIR değerine sahip) elde edilip kendilenmiş olan NP2460 ve NP2391 hatları ile çaprazlanmıştır. HIR testi ve markör analizi, her iki haritalama popülasyonu setinde gerçekleştirilerek haploid indüksiyon deneyleri, varsayılan haploid indükleyici hatların NP2222 üzerinde çaprazlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. MTL'deki yeni düzenlemelerin %6,7 haploid indüksiyon oranını oluşturduğunu açıklanmıştır. Yabani tip MTL proteini, yalnızca sperm sitoplazmasında lokalize olduğunu ve polen RNA dizi profili oluşturma, haploid indüksiyon sırasında aşırı eksprese edilen ve bazıları haploid tohum oluşumuna aracılık edebilen polene özgü bir dizi gen tanımlamışlardır. Bu bulgular, erkek gamet sitoplazmik bileşenlerinin üreme başarısı ve erkek genom geçirgenliği üzerindeki önemini vurgulamaktadır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada bir indirgeyici hat ve üç donör genotip materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada indirgeyici hat olarak Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırma Merkezi'nden (CIMMYT) bilimsel çalışma amaçlı temin edilen CIM2GTAIL-P2 hattı kullanılmıştır. Bu hat navajo sistemine göre haploid tohum ayrımı sağlayan bir materyaldir. Donör materyaller ise Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (ÇOMÜ) Tarla Bitkileri bölümünde yürütülen ıslah çalışmalarında kullanılan HYA, B73 kendilenmiş hatları ile bu hatların melezlenmesi ile oluşturulan F1 hibritidir. Denemede kullanılmış olan bitkisel materyallerin genel bilgileri Tablo 1'de açıklanmıştır.

Tablo 1
Tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyaller

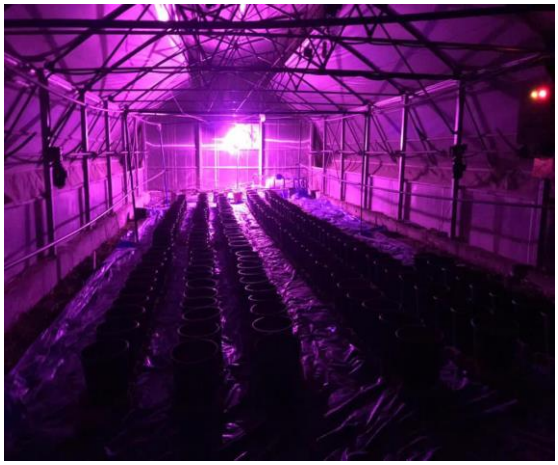
Genotip Adı/Kodu	Niteliği	Temin Edildiği Yer
HYA	Donör genotip	ÇOMÜ
B73	Donör genotip	ÇOMÜ
HYAxB73	Donör genotip	ÇOMÜ
CIM2GTAIL-P2	İndirgeyici hat	CIMMYT

3.1.1. Denemenin Kurulması ve Uygulama Aşamaları

Deneme (2020-2021) sonbahar-kış sezonunda Çanakkale ilinde ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dardanos Yerleşkesi Bitkisel Üretim Araştırma ve Uygulama Birimi'nde sera şartlarında yürütülmüştür. Genotipler, 3/1 tarla toprağı/ahır gübresi karışımında 18 litrelik 30'ar adet saksılarda yetiştirilmiştir (Şekil 3). Gruplar halinde 7'şer gün aralıklarla çimlendirilen genotipler hazırlanan saksılara şaşırtılmıştır. Damla sulama ile sulanan saksılara toplam 18 kg/da azot ve 8 kg/da fosfor hesabı ile gübreleme yapılmıştır. Sera şartlarında ışık ihtiyacının karşılanması için PlantGrow led aydınlatma sistemi kullanılmış 16/8 fotoperyot uygulanmıştır (Şekil 4).

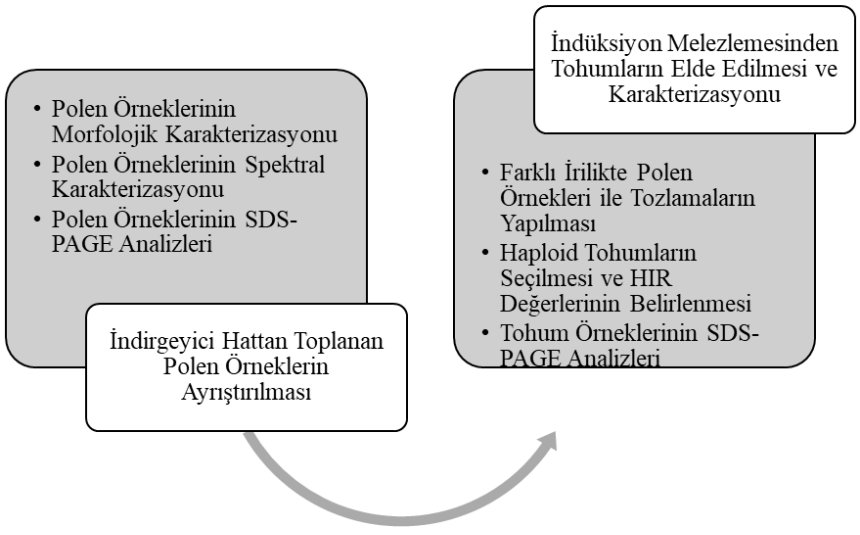


Şekil 3. Sera kurulum aşaması



Şekil 4. Sera ışıklandırma

Çalışma 2 ana aşama ve 3'er alt aşamaları olacak şekilde yürütülmüştür. Şekil 5'te bu aşamalar belirtilmiştir. Çalışmanın uygulama aşamaları ile ilgili detaylı bilgiler ise başlıklar halinde yöntem kısmında sunulmuştur.



Şekil 5. Çalışmanın uygulama aşamaları

3.2. Yöntem

3.2.1. İndirgeyici Hattan Toplanan Polenlerin Farklı Boyutlara Ayrılması ve Tozlama İşlemlerinin Yapılması

Saksılara şaşırtılan donör mısır genotiplerinin kendi polenlerini almasını engellemek amacıyla tepe püskülleri uzaklaştırılmıştır ve koçan püskülleri de koruma altına alınmıştır (Şekil 6). İndirgeyici hattın polen örnekleri 50-100-125 mikron çapında PE filtreler bulunduran özel bir vakum düzeneği ile toplanmıştır. 125 mikronluk filtre anterleri ve diğer kaba parçaları polenlerden ayırmak için, diğer filtreler ise polen örneklerini iki sınıfa ayırmak için kullanılmıştır (Şekil 7).



Şekil 6. Koçan püskülü kapatma işlemi

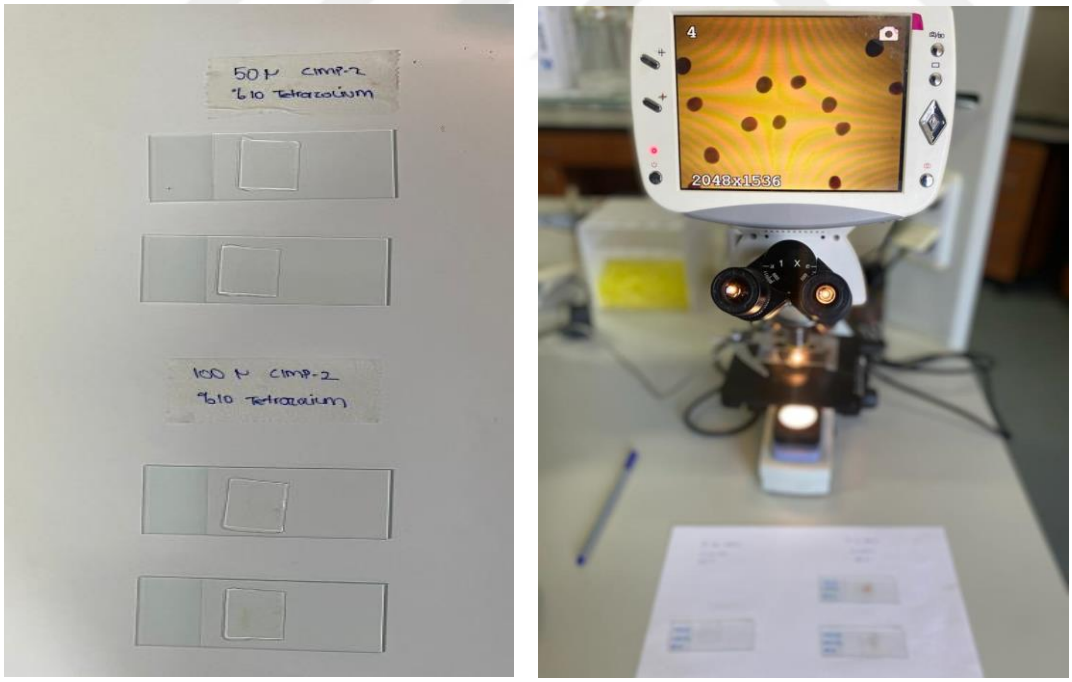


Şekil 7. Polenin filtreleme ile boyutlandırılması

İndirgeyici hattan toplanan polen örneklerinin bir kısmı laboratuvarlarda analiz işlemlerine tabi tutulmak için +4 °C'de saklanmıştır. Farklı irilikteki polen örneklerinin toplama işlemine bitkinin polen verme süresi sona erene kadar 1-2 hafta devam edilmiştir ve toplanan polenlerin bir kısmı da indirgeyici hat ile donör bitkilerin tozlanabilmesi için ayrılmıştır.

3.2.2. Polen Örneklerinin Morfolojik Karakterizasyonu

Yürütülen sera şartlarında indirgeyici hatlardan toplanan farklı irilikteki polen örneklerinin karakterize edilmesi için TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) boyama ve görüntü analizlerinden yararlanılmıştır. Bu amaçla 50 µ ve 100 µ filtrelerle ayrıştırılmış polen örnekleri için 2 adet görüntüleme slaytı hazırlanmıştır. Slayt hazırlama için 1-2 damla %1'lik TTC solüsyonu lam üzerine damlatılmıştır. Daha sonra solüsyon üzerine bir fırça yardımı ile polen örnekleri serpiştirilmiş ve lamel ile kapatılmıştır. Karanlık oda şartlarında 2 saat bekletilmesinin ardından 10x büyütme kapasitesi ile dijital mikroskop (CHEBIOS) altında görüntüler alınmıştır (Şekil 8). Alınan görüntülerin ölçümlerde kullanılması için aynı büyütme kapasitesinde kalibrasyon lamının (Motic, San Antonio, Amerika) görüntüsü alınmıştır. Bu görüntüler ImageJ programına aktarılmıştır (Schneider vd., 2012). Yazılımda partikül analizi yöntemi kullanılarak polen örneklerinde canlılık, çevre ve minimum-maksimum ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 8. Polende TTC boyama ve görüntü analizleri

3.2.3 Polen Örneklerinin Spektral Karakterizasyonu

İndirgeyici hattın polenlerinden toplanan örneklerin yaklaşık 50 mg'lık kısmı NIR spektroskopi cihazının (Spectrastar 2400D, USA) transflektans kabına konularak 1200-2400 nm arasında 1 nm sıklıkla spektrum toplanmıştır. Bu spektrumlar örnek gruplarına göre (50µ ve 100µ) 3'er örnekten alınmış ve alınan spektral veriler jdx dosyası olarak kaydedilmiştir. Kaydedilen sonuçlar Excel formatına dönüştürülmüş ve polen iriliklerine göre ortalamaları alınarak grafiksel olarak gösterilmiştir.

Polen örneklerinden ayrılan bir diğer kısımda ise Raman spektrumları toplanmıştır. Bu amaçla polen örneklerinden küçük bir kısım Raman spektroskopi cihazında (Witec Alpha 300 RA) 532 nm'lik lazer ve grating (600 g/mm BLZ:500 nm) kullanılarak görüntülenmiştir. Görüntüleme işleminde integrasyon süresi 0,5 s ve accumulation:10 olarak alınmak suretiyle 20x objektif kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Polen Örneklerinin SDS-PAGE Analizleri

Toplanan polen örnekleri SDS-PAGE analizine tabi tutularak protein bant analizlerindeki değişimler farklı polen iriliklerine göre incelenmiştir. Polen örneklerinin SDS-PAGE analizleri için ekstraksiyonu Iqbal vd. (2014) tarafından önerilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Sodyum Dodesil Sülfat ile Poli Akrilamid Jel Elektroforezi oluşumu için gerekli olan solüsyonlar hazırlanmıştır (Tablo 2).

Protein ekstraksiyonu için, farklı irilikteki polen örneklerinden 50 mg örnek 3 tekerrürlü olarak ayrı tüplere tartılmıştır. Tüplerdeki örneklerin her birinin üzerine 950 ml ekstraksiyon bufferi konulmuştur. Ardından örnekler vortekslenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Ekstraksiyondan sonra örnekler 10000 g'de +4℃'de santrifüjlenmiş ve üst fazlar ayrı tüplere alınmıştır.

Tablo 2
SDS-PAGE analizi için kullanılan solüsyonların hazırlanması

SOLÜSYONLAR	HAZIRLANIŞ
%10 Amonyum persülfat	1 g amonyum persülfat 10 ml saf su içerisinde çözdürülür.
4X Stacking jel solüsyon	60,5 g TRİS base 850 ml saf su içerisinde çözdürülerek pH'ı HCl ile 6,8'e ayarlanır ve 1000 ml'ye hacim tamamlanır.
%30 Acrylamide solüsyonu	29,22g acrylamide ve 0,78g bisacrylamide 100 ml saf su içerisinde çözdürülür.
4X Resolving jel solüsyon	181,5 g tris base 850 ml saf su içerisinde çözdürülüp pH HCl ile 8,8'e ayarlanarak hacim 1000 ml'ye tamamlanır.
Ekstraksiyon bufferı	%2,3 SDS, 62,5 mM Tris–HCl (pH 6,8), %5 2-ME, %10 glycerol, %0,1 bromophenol blue
10X Running bufferı	144 g glisin ,30 g TRİS base ve 10 g SDS tartılıp 1000 ml saf su içerisinde çözdürülür. 5 litre için 500 ml running buffer ve 4500 ml saf su karıştırılır ve elektroforez tankı doldurulur.
4X Stok yükleme tamponu	2 ml mercaptoethanol, 4 ml gliserol, 1,2 g SDS, 5 ml 4X stacking solüsyonu, 0,03 g bromofenol karıştırılarak -20℃'de saklanır.

Örneklerin elektroforez işlemleri için %12'lik resolving jeli ve jelin üst tarafına eklenecek %4 lük stacking jel solüsyonları hazırlanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3
SDS-PAGE analizi için kullanılan jellerin hazırlanması

KARIŞIMLAR	HAZIRLANIŞI
%4'lük Ayırma Jeli	16,8 ml saf su 2,6 ml %30 acrylamide solüsyonu, 6,4 ml 4X stacking jel tris solüsyonu, 201 µL amonyum persülfat, 26,8 µL TEMED
%12'lik Çözücü Jel	12,35 ml saf su 14,1 ml %30'luk stok acrylamide solüsyon, 18,8 ml 4X çözücü tris solüsyon, 350 µL %10 amonyum persülfat, 35 µL TEMED

İşlemin devamında elektroforez tankının içerisine %12 hazırlanan resolving jel yüklenmiş ve yaklaşık 30 dakika jelin katılaşması beklenmiştir. Üzerine %4'lük stacking jel dökülerek 1 saat katılaşması beklenmiştir. Jel tankının içerisine elektroforez işleminin yürütülmesi için 10x running buffer ilave edilmiştir.

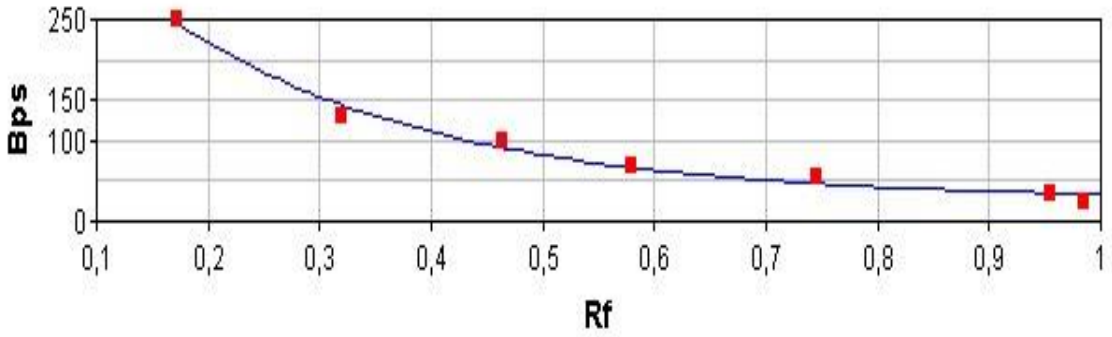
Hazırlanan jellere yükleme yapılmadan önce santrifüjde ekstrakte edilen örneklerin üst fazından eppendorf tüplere 300 µl alınmıştır. Üzerine 100 µl 4X loading buffer eklenerek vortekslenen örnekler 95 °C'de 5 dakika sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Her bir örnekten 15 µl alınarak ilk iki kuyucuğa standart, devamındaki kuyucuklara da örnekler yüklenecek şekilde işleme devam edilmiştir. Örneklerin tam ayrım işlemi için cihaz 100 V' a ayarlanarak yaklaşık yükleme tamponu içerisindeki mavi boya jelin son kısmına ulaşıncaya kadar koşturulmuştur.

Elektroforez sonrası tankın içerisinden alınan jeller 1 g Brilliant Blue, 60 g TCA ve 25 ml etanolün saf su ile 500 ml'ye tamamlanarak boya solüsyonunda gece boyu çalkalayıcıda bırakılıp boyanan jellerin görüntü kaydedilme işlemi gerçekleşmiştir. Kaydedilen görüntülerden bant analizleri Gelanalyzer programı ile yapılmıştır. Jelin ilk ve son kuyucuklara yüklenen standartların 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250 moleküler ağırlıklarına

sahip 7 bant belirlenerek Gelanalyzer programına tanımlanmıştır. Moleküler ağırlıkları (MW) program üzerinde tanımlanan standartların Rf (rölatif taşınım) değerleri hesaplanarak jel üzerinde oluşan diğer tüm bantların da Rf değerleri hesaplanmıştır. Moleküler ağırlıkları ve rölatif taşınım değerleri bilinen standartlarla çizilen eğrinin R^2 değeri 0,99'dur (Şekil 9). Oluşturulan exponential denklemine göre örnek bantlarının Rf değerleriyle moleküler ağırlıkları tanımlanmıştır.

$$MW = A(Rm^{B}) \, Exp[C(Rm)] \qquad (3.5)$$

MW: Moleküler ağırlık değerini; Exp: 2,718; A, B ve C: Üstel model parametrelerini ve Rm: Nispi taşınım göstermektedir.



$y = 449{,}268211 * \exp(-4{,}203871 * x) + 27{,}290316$

$R^2 = 0{,}988$

Şekil 9. Farklı iriliklere sahip polen örneklerine ait regresyon grafiği

3.3. Tohum Karakterizasyonu

3.3.1. Haploid Tohumlarının Elde Edilmesi

Haploid tohum oluşumu için *in vivo* maternal haploid yönteminden yararlanılmıştır. Ekilen genotipler çiçeklenme zamanına geldiğinde, indirgeyici hattan toplanan 50µ ve 100µ filtrelerle ayrıştırılmış polen örnekleri baba (toz verici) olarak kullanılmak üzere donör genotipe sahip bitkiler ile kontrollü olarak tozlanmıştır. Melezleme aşamasında Hya, B73, HyaxB73 toz alıcı (ana) ve CIM2GTAIL-P2 indirgeyici hat toz verici (baba) olarak

kullanılmıştır. Melezlemede öncelikle toz alıcı olarak seçilmiş olan hatların koçanları, koçan püskülü oluşum aşamasından önce koçan kağıtları kapatılıp kontrollü tozlama işlemi için yabancı bitkiden ve kendinden toz alması engellenmiştir. İndirgeyici hattın tepe püsküllerinden 50 mikron ve 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polenler, koruma altına alınan ana hatlara koçan püskülünün çıkış zamanlarında olacak şekilde ayrı ayrı verilerek tozlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tozlama işleminden sonra koçanlar kraft kâğıt torbayla hasat işlemine kadar koruma altında tutulmuştur (Şekil 10). Fizyolojik oluma ulaşan tanelerin hasat olgunluğuna geldiği siyah nokta döneminde koçanların el ile hasat işlemi gerçekleşmiştir. Hasat sonrası her bir donörün CIM2GTAIL-P2 indirgeyici genotip ile melezleri ayrı ayrı torbalara alınarak melez numarası ve melez yapıldığı indirgeyici genotip ismi yazılarak etiketlenmiştir (Şekil 11). Hasat edilen koçanlar tanelenerek laboratuvar ortamında haploid tohumların seleksiyon yöntemi ile haploid-diploid tohum ayrımı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 10. Sera koşullarında kontrollü tozlama işlemleri

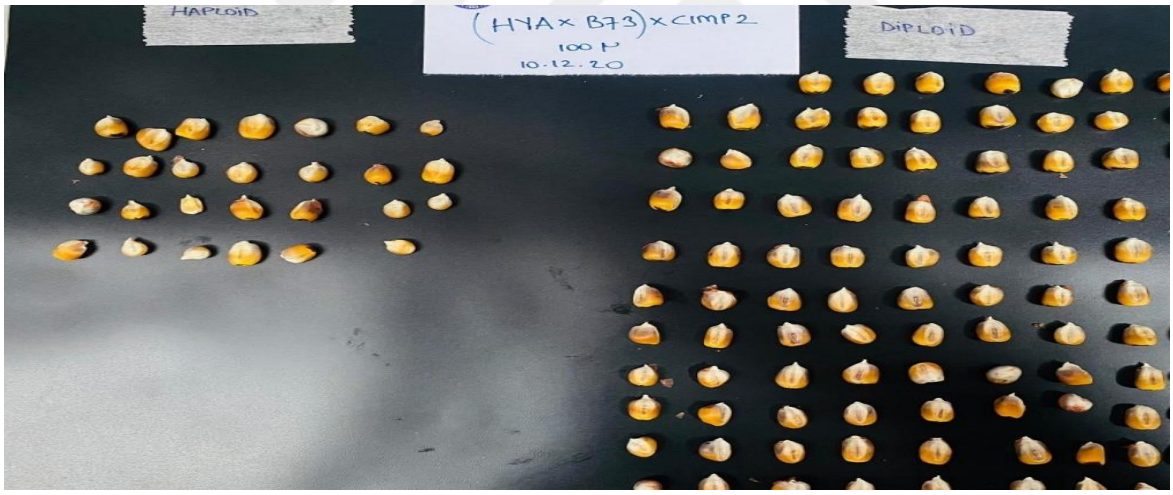


Şekil 11. CIM2GTAIL-P2 indirgeyici hattı ile indüksiyon melezlemesi yapılmış koçanlar

3.3.2. Tohum Seleksiyonu ve Haploid İndüksiyon Oranlarının Belirlenmesi

İndüksiyon melezlemesinden elde edilen koçan örnekleri ayrı ayrı tanelenmiştir. Tanelenen örnekler göz ile endosperm/embriyo bölgelerindeki renklenmelerine göre ayrılmış ve tohum sayıları belirlenmiştir. Haploid tohumların seleksiyon yöntemi ile haploid-diploid tohum ayrımı yapılmıştır. Bu ayrım üç kategoride sınıflandırılmıştır (Şekil 12).

- Renksiz endosperm ve embriyo özellikli tohumlar, dış faktörler nedeniyle kontamine olabileceğinden yabancı tozlaşmış olan haploid olmayan tohum grubudur.
- Mor renkli endosperm ve embriyo özellikli tohumlar diploid tohum grubundandır.
- Mor renkli endosperm ve renksiz embriyo özellikli tohumlarsa haploid tohum olarak kabul edilen gruptadırlar.



Şekil 12. Haploid ve diploid olarak ayrılan tohum örneklerinden bir görüntü

Farklı gruplardaki bu tohumlar ayrı düzeylerde incelenmiş ve üçüncü gruptaki haploid tohum elde oranları aşağıda belirtilen formül ile hesaplama yapılmıştır.

$$Haploid\ İndirgeme\ Oranı = \frac{Varsayılan\ Haploid\ Sayısı}{Toplam\ Mor\ Endospermli\ Tohum\ Sayısı} \quad (3.1)$$

3.3.3. Tohum Örneklerinin SDS-PAGE Analizleri

Farklı polen iriliklerindeki polenler ile indüksiyon melezlemesinden elde edilen tane örneklerinden 3-5 adedi öğütülmüştür. Öğütülen örneklerden 50'şer mg eppendorf tüplerine tartılmış ve üzerine ekstraksiyon bufferi konularak 1 saat oda sıcaklığında çalkalanmıştır. SDS-PAGE analizleri polen örneklerinin analizinde tarif edilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada polen morfolojisi ve canlılığına yönelik elde edilen veriler ile HIR değerleri bakımından örnek grupları arasındaki farklar t testi ile karşılaştırılmıştır. T testi analizleri R paket programında (R Core Team, 2019) gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan toplanan spektral verilerdeki farklılıklar grafiksel olarak gösterilmiş ve tarama yapılan spektral aralıkta polen örneklerine ait spektrumlardaki farklara göre değerlendirilmiştir. Protein bant analizlerine jel görüntülerine ait sonuçlar ise tablo olarak gösterilmiştir. Bu tablolarda polen ve tohum örneklerinde yapılan SDS-PAGE analizlerinde tespit edilen bantlar varlık/yokluk durumlarına göre +/- olarak belirtilmiştir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Polen Örneklerinin Farklı Teknikler Kullanılarak Karakterizasyonu

4.1.1. Polen Örneklerinin Morfolojik Verileri

İndirgeyici hattın farklı polen iriliklerine göre ayrılmış polen örneklerinin görüntü analizlerine dayalı ölçüm sonuçları Tablo 4'te gösterilmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinin canlı ve ölü polen oranları bakımından farklılık gösterdiği belirlenmiştir. 50 ve 100 mikronluk filtrelerle ayrılan polen örneklerinde ölçümlenen özelliklerin tamamında örnek grupları arasında istatistiki olarak önemli farkların olduğu görülmektedir. 100 mikronluk filtre üzerinde kalan polenlerin canlılık oranı (%89) 50 mikronluk filtre ile ayrılan örneklerden (%74) yüksek bulunmuştur. Ölü polen oranlarında da filtre çaplarına göre ayrılan farklı irilikteki polen örnekleri arasında da istatistiki olarak önemli bir fark olduğu saptanmıştır. Polen morfolojisine yönelik ölçüm sonuçlarına göre, 50 mikronluk filtre üzerinde kalan polen örneklerine ait ortalama çevre, minimum ve maksimum çap değerleri sırasıyla 278 µm, 79,9 µm ve 88,2 µm olarak hesaplanmıştır. 100 mikronluk filtre üzerinde kalan örneklerin ortalama çevre, minimum ve maksimum çap ölçüleri ise 311 µm, 88,7 µm ve 99,9 µm olarak bulunmuştur.

Tablo 4
50 ve 100 mikron filtrelerle ayrılmış polen örneklerine ilişkin canlılık durumu ve morfolojik ölçüm sonuçları

İncelenen Özellik	50 Mikron Filtre İle Ayrılmış Örnekler	100 Mikron Filtre İle Ayrılmış Örnekler	P değeri
Canlı Polen Oranı	%74	%89	0,041
Ölü Polen Oranı	%26	%11	0,041
Ortalama Çevre (µm)	278	311	0,001
Minimum Çap (µm)	79,9	88,7	0,001
Maksimum Çap (µm)	88,2	99,9	0,001

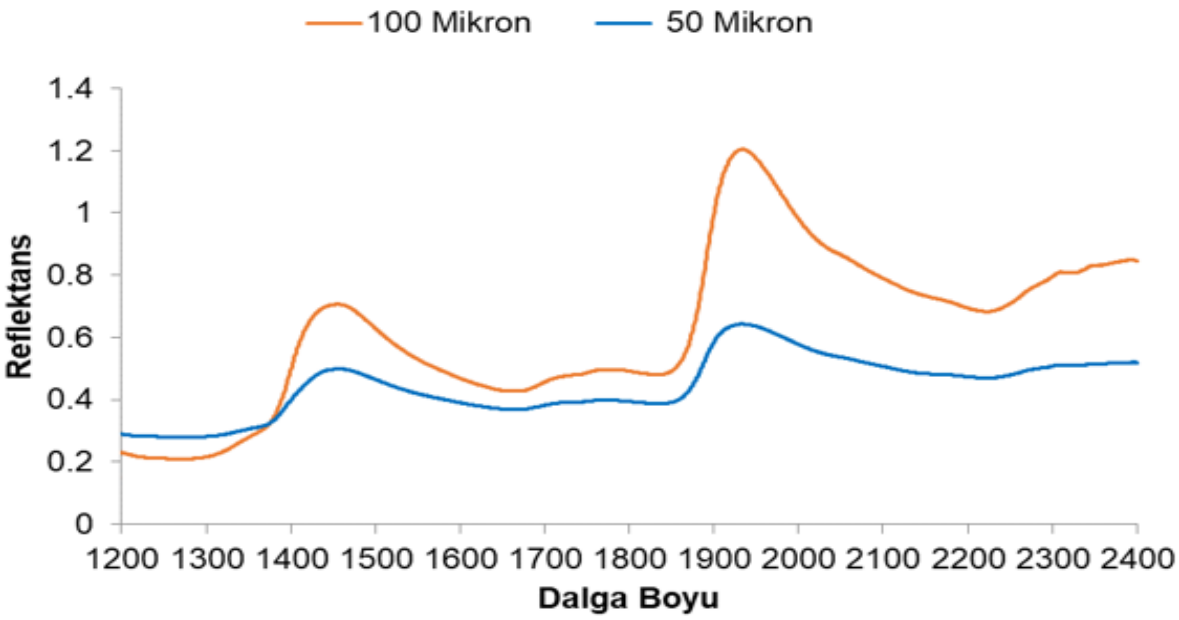
Diğer tahıl türleri ile kıyaslandığında mısır poleni iri yapıya sahiptir ve ortalama büyüklüğü 70-100 mikron arasında değişim göstermektedir (Fonseca vd., 2002). Oval yapıya sahip olan mısır poleninin dış zarı ise pürüzsüz bir yapıya sahiptir. Yürütülen çalışma sonuçlarına göre elde edilen veriler incelendiğinde polen çapı değerlerine ait minimum ve maksimum değerlerin literatürde belirtilen sınırların dışında yer aldığı görülmüştür.

Gözlemlenen bu durumun kullanılan ölçüm yönteminden kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Johnson-Brousseau vd. (2004) Arabidopsis üzerinde yürüttükleri çalışmada vakum filtrasyon tekniğinden yararlanmıştır. Araştırmacılar polen boyamada kullanılan boyaların farklı polen gelişim evrelerinde örneklerle farklı şekilde etkileşebileceğini bildirmiştir. Çalışmamızda indirgeyici mısır hattın polenleri toplama aşamasında vakum ile filtrasyon yapıldığından polen morfolojisinin de morfolojik ölçüm sonuçlarını etkileyebilecek şekilde değişim gösterebileceği düşünülmektedir. Farklı filtre çaplarında minimum ve maksimum çap değerleri bakımından 100 mikronluk filtrenin gözenek çapından daha küçük ebattaki polenleri geçirdiği anlaşılmaktadır. Bu durum polen filtreleme esnasında uygulanan vakumun etkisiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Nitekim vakumun etkisi ile filtre sınırlarına yakın büyüklükteki polen örnekleri bir alt kısma geçtiği anlaşılmaktadır. Yine vakumun etkisiyle bu örneklerin içerisinden nem kaybı meydana gelebilir bu da irilik ölçümlerine etki edebilir.

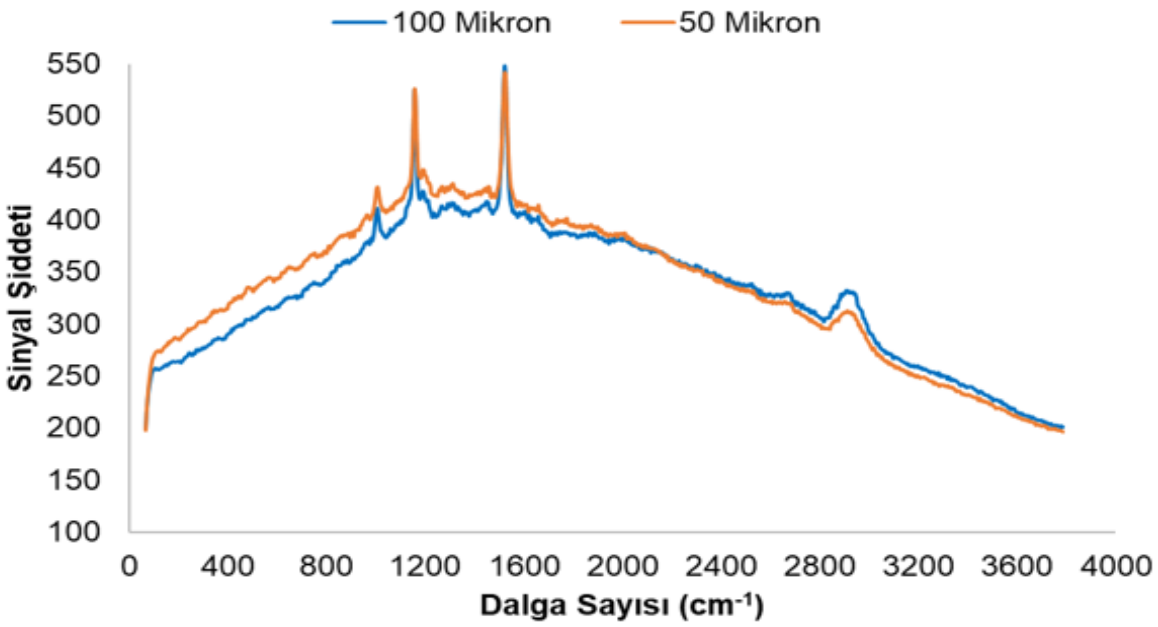
4.1.2. Polen Örneklerinin Spektral Verileri

İndirgeyici hattan toplanan farklı irilikteki polen örneklerinin spektral ölçümleri için NIR ve Raman cihazları kullanılmıştır. Yapılan NIR ve Raman ölçüm sonuçları incelendiğinde farklı irilikteki polen örneklerinin spektral verilerinde önemli farklar olduğu görülmektedir. 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinin NIR ölçümlerinin sonuçları incelendiğinde 1200-2400 nm arasında yansıma değerlerinin diğer gruptan yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 13). Raman ölçümleri 95-4000 cm^{-1} arasında gerçekleştirilmiştir. 95 ile 2115 cm^{-1} arasında 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinin 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerden daha yüksek sinyal şiddeti verirken 2115 cm^{-1}'den itibaren bu grupların sinyal şiddetinin benzer olduğu ve tarama aralığının son kısmında ise 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış örneklerden elde edilen sinyalin yükseldiği görülmüştür (Şekil 14). Polen örneklerinin biyokimyasal yapısındaki çeşitlilik, farklı irilikte yapılara sahip olması spektral ölçümlerden elde edilen sonuçlar üzerinde etkilidir. Yürütülen önceki çalışmalarda nem ve kuru madde içeriğinin NIR cihazları ile alınmış spektral ölçümlerde etkili olduğu bilinmektedir (Williams, 2016). Tarama yapılan aralıkta NIR cihazından alınan ortalama spektrumların 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinde daha yüksek bulunması bu örneklerdeki polen

hücrelerinin çapı, gelişmişlik durumu ve büyüklük-küçüklük değerleri ile ilişkili olabilir. Gelişim aşaması açısından bakıldığında 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış örnekler büyük çaplı ve gelişmişken, 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış örnekler daha küçük çaptaki polenlerdir ve gelişim evresinin erken dönemlerinde oldukları düşünülmektedir. NIR spektral verilerinden farklı olarak Raman spektrometresi ile tarama yapılan aralıkla, 100 mikron ve 50 mikron filtrelerle ayrıştırılmış örneklere ait spektral verilerdeki farklar değişkenlik göstermiştir. NIR ve Raman spektrumlarından yararlanarak polen karakterizasyonu tanımlamak literatürde yaygın olarak kullanılmıştır (Williams, 2016; Kendel ve Zimmermann, 2020). Bu çalışmalarda NIR için 1101–2503 nm dalga boyutundaki veriler değerlendirilmekte olup, Raman kayması sonuçlarına göre 1900-800 cm^{-1} ve 2000-500 cm^{-1} Raman spektrumları seçilmiştir. 810-860 cm^{-1} FTIR spektrumları için ve 1580-1650 cm^{-1} FT-Raman spektrumu için olan spektral bölgeler polen duvarında aromatik maddelerin kimyasal bileşiminin analizi için seçilmiştir. Bizim çalışmamızda elde edilen farkların tarama yapılan spektral aralıkta 1013 cm^{-1}, 1159 cm^{-1}, 1524 cm^{-1} ve 2929 cm^{-1} bölgelerinde dört pikin belirgin olduğu gözlemlenmiştir. 1013 cm^{-1} spektrumları karbonhidratlarla ilişkili, 1524 cm^{-1} spektrumu karotenoid ve proteinlerle bağlantılı piklerdir.



Şekil 13. 50 mikron ve 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinin NIR ölçümleri

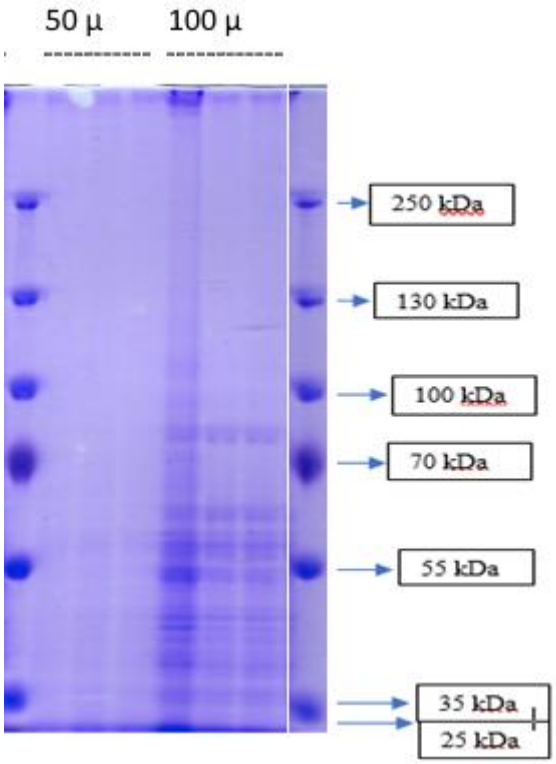


Şekil 14. 50 mikron ve 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinin Raman ölçümleri

4.1.3. Polen Örneklerinin SDS-PAGE Analiz Verileri

Polen örneklerinden SDS-PAGE' e ait jel görüntüsü Şekil 15'te sunulmuştur. Analiz sonuçlarına göre farklı iriliklerdeki polen örneklerinde bant sayıları ve bant yoğunlukları önemli farklar göstermiştir. 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış grupta tespit edilen bant sayısı 10 iken, 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerindeki bant 15 olarak belirlenmiştir. Tespit edilen bant büyüklükleri 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış örneklerde 36-75 kDa arasında hesaplanırken, 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış grupta 36-99 kDa arasında bulunmuştur. Farklı irilikteki polen örneklerinde belirgin farklar gözlenmiştir. 50 mikron filtre ile ayrılan polen örneklerinde 7 protein bandı (48 kDa, 54 kDa, 56 kDa, 67 kDa, 73 kDa, 84 kDa, 99 kDa) bulunmazken 100 mikron büyüklüğüne sahip polen örneklerinde varlığı gözlemlenmiştir. 44 kDa ve 52 kDa değerlerine sahip bantlar ise 100 mikronluk polen örneklerinde bulunmazken 50 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinde mevcuttur. Jel analizlerinde bantların varlığı ve yoğunlukları bakımından ortaya çıkan bu farklar spektral ölçümlerde elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinde 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerindeki farklılıkların nedeni (Tablo 5), küçük çaplı polenlerde protein birikiminin az olması ile ilişkilendirilebilir. Mısır poleni diğer bitki türlerinin polenleri ile kıyaslandığında düşük protein içeriğine sahiptir. İri yapılı olmasına rağmen, polende

bulunan diğer biyokimyasal bileşenler içerisinde %17 protein değeri ile üçüncü sırada yer almaktadır (Bujang vd., 2021). Çalışmamızda 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılan polen örnekleri polen gelişim evresi bakımından polen çapının küçük olduğu safhalardadır. Küçük çaplı polenlerde biyokimyasal bileşenlerin olgunluk evrelerinden kaynaklanan nedenlerle daha düşük olması beklenebilir. Bu durum ise SDS-PAGE analizlerinde tespit edilen bant sayısına ve bantların yoğunluğuna etki etmiştir. Yu vd. (2014) W22 ve bu hattın izogenik hattının polen ve pistil proteinlerinin çeşitliliğini ele aldıkları çalışmada, toplam 24 farklı proteinin var olduğunu raporlamışlardır. Çalışmamızda 15 bant tespit edilmekte olup bunlardan 8 farklı protein varlığı gözlemlenmiştir. Bunlardan 67 kDa, 60 kDa, 54 kDa, 48 kDa, 42 kDa moleküler ağırlığa sahip olan proteinler Yu vd. (2014) tarafından yapılmış olan çalışma ile benzerlik göstermiştir. Kalan proteinlerin ağırlık değerleri bant yoğunlukları bakımından farklılık göstermiştir. Jelin yürütülmesi sırasında 1-2 cm'lik kayması kDa sonucunu etkileyeceğinden farklılıklar gözlemlenmiştir.



Şekil 15. Polen örneklerinden SDS-PAGE' e ait jel görüntüsü

Tablo 5

İndükleyici hattın 50 ve 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen numunelerinin protein bant profilleri

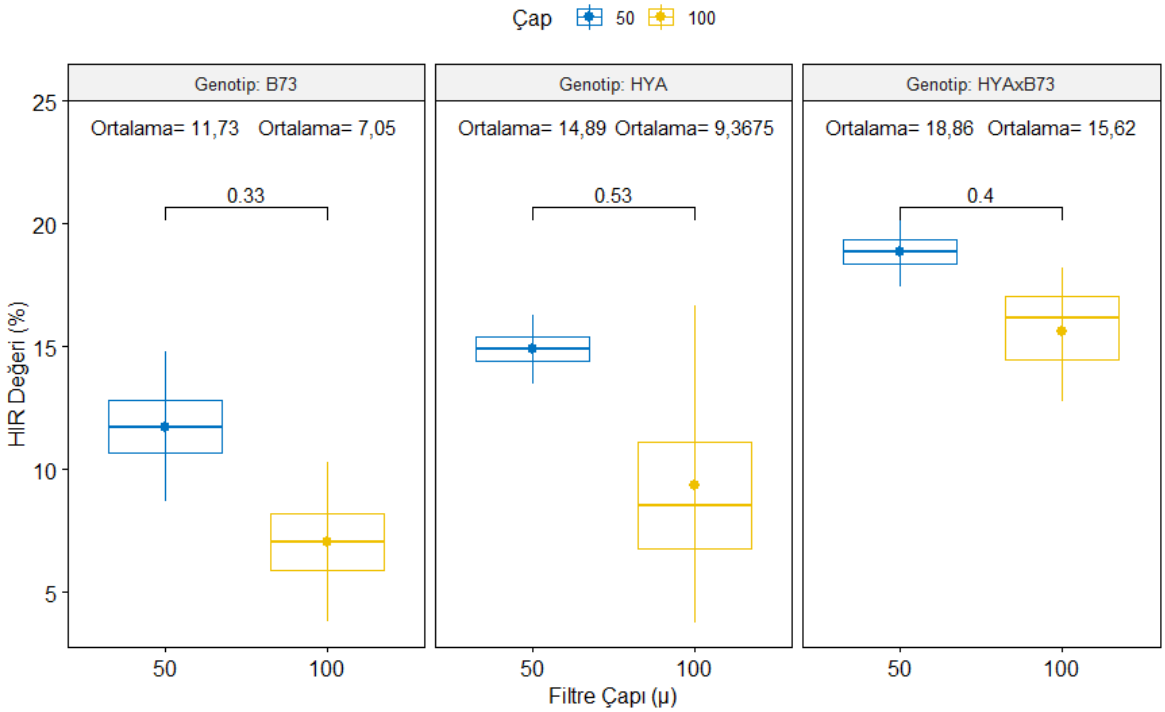
Moleküler Ağırlık	50 Mikronluk Filtre ile Ayrılmış Örnekler	100 Mikronluk Filtre ile Ayrılmış Örnekler
36 kDa	+	+
38 kDa	+	+
40 kDa	+	+
42 kDa	+	+
44 kDa	+	-
46 kDa	+	+
48 kDa	-	+
50 kDa	+	+
52 kDa	+	-
54 kDa	-	+
60 kDa	-	+
67 kDa	+	+
73 kDa	-	+
75 kDa	+	+
84 kDa	-	+
99 kDa	-	+

4.2. Tohum Karakterizasyonu

4.2.1. Farklı Polen Boyutlarından Elde Edilen Tohum Örneklerinin HIR Değerleri

Farklı polen iriliklerindeki örnekler ile yapılan tozlamalardan elde edilen tohum örneklerinde haploid ve diploid tohum sayıları önemli ölçüde değişim göstermiştir (Şekil 16). Verilere göre indirgeyici hat ile ana genotiplerin melezlenmesiyle oluşan haploid tohum sayıları polenlerin iriliklerine göre farklılık göstermektedir. Bu durum HIR değerlerine de yansımıştır. B73 ve HYA donörlerinde haploid tohum oluşumu incelendiğinde 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örnekleri ile tozlanan örnekler 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış örneklerden önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. HYA için hesaplanan 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinin kullanıldığı örneklerin HIR değeri ile 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerin kullanıldığı örneklerin HIR değeri arasında %5,52'lik bir fark oluşmuştur. B73 hattına bakıldığında bu fark %4,68 olarak belirlenmiştir. HYAxB73 hibritinde 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinin HIR değeri 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış örneklerle tozlanan koçanlarda tespit edilen HIR değerinden %3,24 daha yüksek bulunmuştur. Bahse konu olan bu farklara ait t testi sonuçları gruplar arasında istatistiki bir farkın olmadığını gösterse de pratikte haploid

tohum oluşumundaki bu farkların önemli olduğu değerlendirilmiştir (Şekil 16). Bu çalışmada yürütülen polen filtreleme tekniğine benzer bir araştırmaya rastlanmasa da literatürde CIM2GTAILP-2 kullanılarak haploid indirgeme oranına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Kelliher vd. (2017) mısır polenine yönelik yürüttükleri çalışmada mısırda haploid indüksiyonunun genetik temelini inceleyerek polene özgü bir fosfolipaz olan *MTL*'deki yeni düzenlemelerin %6,7 haploid indüksiyon oranına yol açtığını raporlamışlardır.

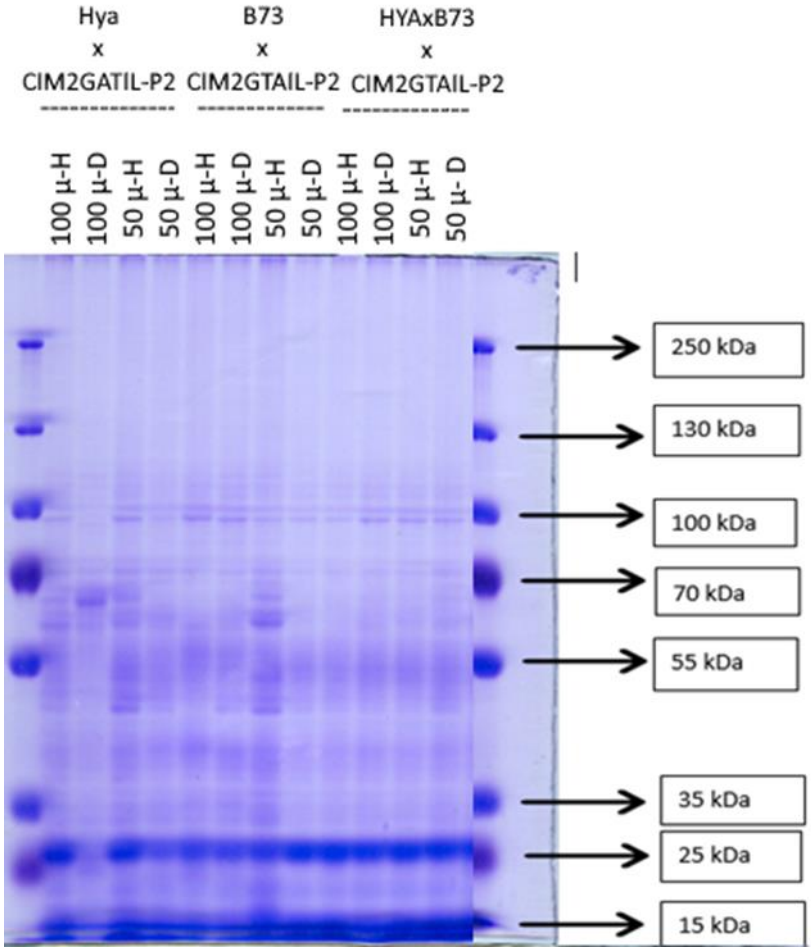


Şekil 16. Baba (toz verici) olarak kullanılan indirgeyici hattın genotipleri ile ana (toz alıcı) olarak kullanılan genotiplerin melezlenmesiyle oluşan HIR değerleri

4.2.2. Tohum Örneklerinin SDS-PAGE Analiz Sonuçları

Tohum örneklerinden yapılan SDS-PAGE' e ait jel görüntüsü Şekil 17'de sunulmuştur. Haploid ve diploid tohum örneklerinde depo protein fraksiyonları bakımından bazı farkların oluştuğu belirlenmiştir. Bu analizlerde toplam 20 adet bant tespit edilmiştir (Tablo 6). Tohumlardan elde edilen depo proteinlerinin büyüklükleri 23 kDa ile 117 kDa arasında değişim göstermiştir. Kullanılan materyallerin haploid-diploid tohumlarına ait protein bantlarının bazıları ayırt edici özelliklere sahiptir. HYA genotipinde 30kDa, 103 kDa ve 113kDa büyüklüğündeki bantların; B73 genotipinde 43 kDa ve 60 kDa büyüklüğündeki

bantların ve HYAxB73 genotipinde 103 kDa büyüklüğündeki bantın haploid tohum örneklerinde var iken diploid örneklerinde olmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bu bantların haploidlik durumunu tespit etmede ayırt edici olabileceğine işaret etmektedir. Mısır tohumunda SDS-PAGE kullanılarak proteinlerin belirlenmesine yönelik Iqbal vd. (2014) yürütmüş olduğu çalışma verilerinde ise molekül ağırlığı 10 kDa ila 122 kDa arasında değişen, 7'si (%39) monomorfik ve 11'i (%61) polimorfik olan toplam 18 protein alt birimi tespit edilmiştir. Kalıtımlar arasındaki benzerlik katsayıları 0,89 ile 1,00 arasında değişim göstermektedir. Çalışmada ıslah programlarının planlanması için biyokimyasal tekniklerin izlenebileceği sonucuna varılmıştır. Araştırmamızda da haploid ve diploid tohumların ayrımında bazı protein bantlarının varlık/yokluk durumlarından yararlanılabileceği görülmüştür.



Şekil 17. Tohum örneklerinden yapılan SDS-PAGE' e ait jel görüntüsü

Tablo 6

Donör materyallerin haploid (H) ve diploid (D) tohumlarının protein bant profilleri

Moleküler Ağırlık	Hya				B73				HyaxB73			
	50 µ		100 µ		50 µ		100 µ		50 µ		100 µ	
	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D
23 kDa	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
26 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 kDa	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
34 kDa	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
39 kDa	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
43 kDa	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
45 kDa	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
54 kDa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
60 kDa	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
69 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80 kDa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
87 kDa	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
90 kDa	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
94 kDa	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
98 kDa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
100 kDa	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
103 kDa	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
108 kDa	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
113 kDa	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
117 kDa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

50 µ: 50 mikronluk filtre ile ayrılmış örnekler, 100 µ: 100 mikronluk filtre ile ayrılmış örnekler, H: Haploid, D: Diploid.

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Polen Örneklerinin Morfolojik, Spektral ve Moleküler Karakterizasyonu

Polen örnekleri morfolojik açıdan değerlendirildiğinde 50 ve 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polenlerin maksimum ve minimum çap değerleri literatürde belirtilen sınırların dışında yer aldığı görülmüştür. Farklılıkların ayrım yöntemi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Spektral veri sonuçlarına bakıldığında, polen iriliklerine ait sonuçlarda spektral farkların olduğu görülmüştür. NIR ölçüm sonuçlarına göre 1200-2400 nm dalga boyu arasında 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polenlerin reflektans değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Raman kayması sonuçlarına göre de 2500-4000 cm^{-1} dalga boyu arasında 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinde, 95-2500 cm^{-1} aralığında ise 50 mikron filtrelerle ayrıştırılmış örneklerin yansıma değerleri yüksek bulunmuştur. Her iki spektral ölçümde de farklı iriliklere ayrıştırılmış polen örneklerinin spektral verisinde dikkat çekici farklar oluştuğu gözlenmiştir. Bu farklılıkların polen örneklerindeki biyokimyasal çeşitlilik, nem içerisindeki farklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Moleküler bant analizlerinde ise 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış örneklerde tespit edilen bant sayısı 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış örneklerden daha fazla bulunmuştur. 48 kDa, 54 kDa, 56 kDa, 67 kDa, 73 kDa, 84 kDa ve 99 kDa moleküler ağırlığa sahip bantlar 50 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinde bulunmazken 100 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinde bulunduğu gözlemlenmiştir. 44 kDa ve 52 kDa değerine sahip bantlar ise 100 mikronluk polen örneklerinde bulunmazken 50 mikron filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinde mevcuttur. Bu veriler spektral veri sonuçlarını destekler niteliktedir.

Sonuç olarak filtreleme yardımıyla polen ayrıştırma işleminin moleküler ve spektral farklılıklara neden olduğu görülmüştür. İleriki araştırmalarda tek polen düzeyinde inceleme

yapmayı mümkün kılan spektral cihazlar ile haploid tohum oluşturma potansiyeli olan polenlerin belirlenebilmesi ve ayrıştırılması mümkün olabilir. Bu prensibe dayalı olarak çalışan bir spektral ölçüm sistemin geliştirilmesi bilimsel çalışmalara önemli katkılar sağlayabilir.

5.2. Polen İriliğinin HIR Değerleri Üzerine Etkisi ve Haploid/Diploid Tohum Örneklerinin Protein Bant Dizilerindeki Farklılıklar

Çalışmada kullanılan donör materyallerde HIR değerleri %7,40 ile %18,9 arasında bulunurken, 50 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış polen örneklerinden 100 mikronluk filtrelerle ayrıştırılmış örneklere göre daha yüksek haploid tohum oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, indüksiyon melezlemesinde kullanılan polenlerin büyüklüklerine göre filtrelenmesi ve farklı iriliklere ayrıldıktan sonra tozlamada kullanılmasının haploid tohum oluşumunu desteklediğini göstermiştir.

Tohumdaki moleküler analiz sonuçlarında 20 bant belirlenmiştir. HYA genotipinde 30 kDa, 103 kDa ve 113 kDa büyüklüğündeki bantların; B73 genotipinde 43 kDa ve 60 kDa büyüklüğündeki bantların ve HYAxB73 genotipinde 103 kDa büyüklüğündeki bantın haploid tohum örneklerinde var iken diploid örneklerinde olmadığı belirlenmiştir. Bu bulgular protein bant analizlerine dayalı olarak haploid ve diploid tohum örneklerinin ayrılabileceği ve bu durumun genotip etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir.

İleriki çalışmalarda indirgeyici hat ve donör çeşitliliğinin arttırılmasıyla birlikte daha kapsamlı sonuçlar elde edilebilir. Filtreleme işleminde kullanılan vakumlu düzeneklerinin filtre çeşitliğinin artırılması ve örnek filtreleme kabiliyetlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. *In vivo* haploid tekniğinin uygulandığı farklı bitki türlerinde de bu çalışmada uygulanan polen boyutlandırma yaklaşımın kullanılması mümkün olabilir.

KAYNAKÇA

Altuntaş, Y. (2018). *Haploid ve diploid mısır tohumlarının imge analizi ve makine öğrenme algoritmaları kullanılarak sınıflandırılması*. Master's thesis, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Aylor, D.E. (2003). ‘‘Rate of dehydration of corn (Zea mays L.) pollen in the air’’. *Journal of experimental botany*, 54(391), 2307-2312.

Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E. ve Bergner, A.D. (1922). ‘‘A haploid mutant in the jimson weed," Datura stramonium"’’. *Science*, 55(1433), 646-647.

Bujang, J.S., Zakaria, M.H. ve Ramaiya, S.D. (2021). ‘‘Chemical constituents and phytochemical properties of floral maize pollen’’. *Plos one*, 16(2): e0247327.

Calderon, F. J., Reeves, III, J. B., Foster, J. G., Clapham, W. M., Fedders, J. M., Vigil, M. F. ve Henry, W. B. (2007). ‘‘Comparison of diffuse reflectance Fourier transform mid-infrared and near-infrared spectroscopy with grating-based near-infrared for the determination of fatty acids in forages’’. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8302-8309.

Campos, M.G., Almaraz-Abarca, N., Matos, M.P., Gomes, N.M., Arruda, V.A., Barth, O.M. ve Bicudo, L. (2015). ‘‘Zea mays L. pollen: An approach to its quality control’’. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, *5*(8), 513-522.

Cengiz, R. ve Korkut, K. Z. (2016). ‘‘Development of doubled haploid maize lines by using *in vivo* haploid technique’’. *Biotech Studies*, *29*(1), 1-7.

Cerit, İ., Cömertpay, G., Oyucu, R., Çakır, B., Hatipoğlu, R. ve Özkan, H. (2016). ‘‘Melez mısır 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.

Chay, C. H., Buehler, E. G., Thorn, J. M., Whelan, T. M. ve Bedinger, P. A. (1992). ‘‘Purification of maize pollen exines and analysis of associated proteins’’. *Plant physiology*, 100(2), 756-761.

Chase, S. S. (1947). ‘‘Techniques for isolating monoploid maize plants’’. In *American Journal of Botany*, 34(10), pp. 582-582.

Chase, S. S. (1952). ‘‘Monoploids in maize. *Heterosis’’*, 389-399.

Chase S.S. (1969). ‘‘Monoploids and monoploid derivatives of maize (Zea mays L.)''. *The Botanical Review*, 35: 117-167.

Chaikam, V., Nair, S. K., Babu, R., Martinez, L., Tejomurtula, J. ve Boddupalli, P. M. (2015). ‘‘Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for *in vivo* haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression’’. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(1), 159-171.

Chaikam, V., Gowda, M., Martinez, L., Ochieng, J., Omar, H. A. ve Prasanna, B. M. (2020). ‘‘Improving the efficiency of colchicine-based chromosomal doubling of maize haploids’’. *Plants*, 9(4), 459.

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 Jr, E. H. (1959). ‘‘A line of maize with high haploid frequency’’. *The American Naturalist*, *93*(873), 381-382.

Costa, M. C. A., Morgano, M. A., Ferreira, M. M. C. ve Milani, R. F. (2017). ‘‘Analysis of bee pollen constituents from different Brazilian regions: Quantification by NIR spectroscopy and PLS regression’’. *LWT- Food Science and Technology*, 80, 76-83.

Daniel, L. (1955). ‘‘Polleneltartas esir~izokopes fillapothan’’. l6s,4:315-322.

Di-Giovanni, F., Kevan, P. G. ve Nasr, M. E. (1995). ‘‘The variability in settling velocities of some pollen and spores’’. *Grana*, *34*(1), 39-44.

Dwivedi, S. L., Britt, A. B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H. D. ve Ortiz, R. (2015). ‘‘Haploids: constraints and opportunities in plant breeding’’. *Biotechnology advances*, *33*(6), 812-829.

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

Elver, E. (2018). *Allıum sandrasıcum'da in vitro kültür oluşturulması ve rejenerantların karakterize edilmesi*. Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Ferreira, C.A., Von Pınho, É.V.D.R., Alvım, P.D.O., De Andrade, V.I.N.Í.C.I.U.S., Sılva, T.T.D.A. ve Cardoso, D.L. (2007). ''Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho''. *Revista Brasileira De Milho E Sorgo*, 6(02).

FAO (2019). FAO Statistical Database. Erişim adresi: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL (Erişim Tarihi: 13.08.2021)

Fonseca, A. E., Westgate, M. E. ve Doyle, R. T. (2002). ''Application of fluorescence microscopy and image analysis for quantifying dynamics of maize pollen shed''. *Crop Science*, 42(6), 2201-2206.

Fonseca, A. E. ve Westgate, M. E. (2005). ''Relationship between desiccation and viability of maize pollen''. *Field crops research*, 94(2-3), 114-125.

Forster, B. P. ve Thomas, W. T. (2005). ''Doubled haploids in genetics and plant breeding''. *Plant Breeding Revievs*, *25*, 57-88.

Geiger, H. H. (2009). ''Doubled haploids''. *In: Handbook of maize* (pp. 641-657). *Springer*, New York, NY.

Geiger, H. H. ve Gordillo, G. A. (2009). ''Doubled haploids in hybrid maize breeding''. *Maydica*, 54(4), 485.

Heckenberger, M., Bohn, M. ve Melchinger, A.E. (2005). ''Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: I. Simple sequence repeat data from maize inbreds''. *Crop science*, *45*(3), 1120-1131.

Hootan, D.E. (1978). *The versatility of near infrared reflectance devices* (No. Research).

Hu, G. (2014). ''Study on haploid induction rates in different maize inducers. *Agricultural ScienceTechnology''*, 15(4), 554.

Ivleva, N.P., Niessner, R. ve Panne, U. (2005). ‘‘Characterization and discrimination of pollen by Raman microscopy’’. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 381(1), 261-267.

Iqbal, J., Shinwari, Z. K. ve Rabbani, M. A. (2014). ‘‘Investigation of total seed storage proteins of Pakistani and Japanese maize (Zea mays L.) through SDS-PAGE markers’’. *Pakistan Journal of Botany*, *46*(3), 817-822.

Johnson, R. R. ve Herrero, M. P. (1982). Corn pollination under moisture and high temperature stress. *In: Proceedings of the annual corn and sorghum industry research conference, American Seed Trade Association, Corn and Sorghum Division, Corn and Sorghum Research Conference.*

Johnson-Brousseau, S. A. ve McCormick, S. (2004). ‘‘A compendium of methods useful for characterizing Arabidopsis pollen mutants and gametophytically-expressed genes’’. *The Plant Journal*, 39(5), 761-775.

Johri, B. M. F. ve Vasil, I. K. (1961). ‘‘Physiology of pollen’’. *The botanical review*, 27(3), 325-381.

Kaefer, K.A.C., Chiapetti, R., Fogaça, L., Muller, A.L., Calixto, G.B. ve Chaves, E.I.D.O. (2016). ‘‘Viability of maize pollen grains *in vitro* collected at different times of the day’’. *African Journal of Agricultural Research*, *11*(12), 1040-1047.

Kahraman, M. (2011). *Proteinlerin yüzeyde zenginleştirilmiş raman saçılmasıyla tayini için yeni yöntemlerin geliştirilmesi* (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Kahrıman, F., Egesel, C.Ö. ve 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.

Kameya, T., Hinata, K. (1970). ‘‘Induction of haploid plants from pollen grains of Brassica’’. *Japanese Journal of Breeding*, 20: 82-87.

Kelliher, T., Starr, D., Richbourg, L., Chintamanani, S., Delzer, B., Nuccio, M. L. ve Martin, B. (2017). ‘‘MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction’’. *Nature*, 542(7639), 105-109.

Kendel, A. ve Zimmermann, B. (2020). ‘‘Chemical analysis of pollen by FT-Raman and FTIR spectroscopies’’. *Frontiers in plant science*, *11*, 352.

Kostoff, D. (1929). ‘‘An androgenic Nicotiana haploid’’. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, *9*(4), 640-642.

Lashermes, P. ve Becekert, M. (1988). ‘‘Genetic Control of maternal haploidy in maize (Zea mays L.) and selection of haploid ınducing lines’’. *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 405-410.

Laucks, M. L., Roll, G., Schweiger, G. ve Davis, A. E. (2000). ‘‘Physical and chemical (Raman) characterization of bioaerosols pollen’’. *Journal of Aerosol Science*, *31*(3), 307-319.

Li, X., Meng, D., Chen, S., Luo, H., Zhang, Q., Jin, W. ve Yan, J. (2017). ‘‘Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction’’. *Nature communications*, 8(1), 1-9.

Luna V, S., Figueroa M, J., Baltazar M, B., Gomez L, R., Townsend, R. ve Schoper, J. B. (2001). ‘‘Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control’’. *Crop Science*, *41*(5), 1551-1557.

Mathur, D.S., Sachan J.K.S. ve Sarkar K.R. (1976). ‘‘Radiation induced haploid and heterofertilization in maize’’. *Journal of Nuclear Agriculture and Biology*, 5: 76-77.

Mathur, M.A. ve Sarkar K.R. (1980). ‘‘Induction of maternal haploids in maize through heat treatment of polen’’. *Current Science*, 49: 744-746.

Nanda, D. K. ve Chase, S. S. (1966). ‘‘An embryo marker for detecting monoploids of maize (Zea Mays L.) ‘’*1. Crop Science*, *6*(2), 213-215.

Nageli, M., Schmid, J. E., Stamp, P. ve Büter, B. (1999). ‘‘Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: impact of carbohydrates, plating density and time of transfer’’. *Plant Cell Reports*, 19(2), 177-184.

Prasanna, B., Vasal, S., Kassahun, B. ve Singh, N. (2001). ‘‘Quality protein maize’’. *Current Science*, 81(10), 1308-1319. Erişim adresi: www.jstor.org/stable/24105845.

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. (2012). ‘‘Development of *in vivo* haploid inducers for tropical maize breeding programs’’. *Euphytica*, 185(3), 481-490.

R Core Team 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

Randolph, L.F. (1932). ‘‘Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize’’. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 18(3), 222.

Raynor, G.S., Ogden, E.C. ve Hayes, J.V. (1970). ‘‘Dispersion and deposition of ragweed pollen from experimental sources’’. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*, 9(6), 885-895.

Raynor, G.S., Ogden, E.C. ve Hayes, J.V. (1971). ‘‘Dispersion and deposition of timothy pollen from experimental sources’’. *Agricultural Meteorology*, *9*, 347-366.

Raynor, G.S., Ogden, E.C. ve Hayes, J.V. (1972). ‘‘Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources 1’’. *Agronomy Journal*, *64*(4), 420-427.

Roeckel-Drevet, P., Digonnet, C., Matthys-Rochon, E., Champiat, D. ve Dumas, C. (1995). ‘‘Fertility of *Zea mays* pollen during dehydration: physiological steps outlined by nucleotide measurements’’. *Plant physiology and biochemistry* (Paris), 33(3), 289-294.

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

Schneider, C. A., Rasband, W. S. ve Eliceiri, K. W. (2012). ‘‘NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis’’. *Nature methods*, *9*(7), 671-675.

Schoper, J.B., Lambert, R.J. ve Vasilas, B.L. (1986). ‘‘Maize pollen viability and ear receptivity under water and high temperature stress 1’’. *Crop Science*, 26(5), 1029-1033.

Schulte, F., Lingott, J., Panne, U. ve Kneipp, J. (2008). ‘‘Chemical characterization and classification of pollen’’. *Analytical chemistry*, 80(24), 9551-9556.

Sun, L., Yu, C. ve Irudayaraj, J. (2008). ‘‘Raman multiplexers for alternative gene splicing’’, *Analytical Chemistry*, 80, 3342-3349.

Tang, Q. L., Feng, Y. C., Han, X. L., Zheng, M. M. ve Rong, T. Z. (2009). ‘‘Study on haploid inducing and its meiotic abnormality in maize’’. *Agricultural Sciences in China*, 8(10), 1159-1165.

TUİK (2020). Erişim adresi: https://data.tuik.gov.tr (Erişim Tarihi: 12.05.2021)

Wang, Y., Lv, Y., Liu, H., Wei, Y., Zhang, J., An, D. ve Wu, J. (2018). ‘‘Identification of maize haploid kernels based on hyperspectral imaging technology’’. *Computers and Electronics in Agriculture*, 153, 188-195.

Williams, P. J. ve Kucheryavskiy, S. (2016). ‘‘Classification of maize kernels using NIR hyperspectral imaging’’. *Food chemistry*, *209*, 131-138.

Yorgancılar, M., Yaşar, M. A. ve Atalay, E. (2019). ‘‘Mısır ıslahında indirgeyici hatların kullanımı ve dihaploidizasyon’’. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, *8*(1), 170-177.

Yu, J., Roy, S.K., Kamal, A.H.M., Cho, K., Kwon, S-J., Cho, S-W., So, Y-S., Holland, J.B. ve Woo, S.H. (2014). ‘‘Protein profiling reveals novel proteins in pollen and pistil of W22 (ga1; ga1) in maize’’. *Proteomes*, 2, 258-271.

Zhang, Z., Qiu, F., Liu, Y., Ma, K., Li, Z. ve Xu, S. (2008). ‘‘Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (Zea mays L.)’’. *Plant cell reports*, *27*(12), 1851-1860.

Zhou, L.Z., Juranić, M. ve Dresselhaus, T. (2017). ‘‘Germline development and fertilization mechanisms in maize’’. *Molecular Plant*, Mar 6;10(3):389-401.

Zuoyo Z. ve Minguang G., (1984). ‘‘Production of pure lines of maize through parthenogenesis ınduced by chemicals’’. *Acta Genetica Sinica*, 11: 39-46.