

***IN VIVO* KATLANMIŞ HAPLOİD TEKNİĞİ İLE MISIR
GENOTİPLERİNİN (*Zea mays* L.) GELİŞTİRİLMESİ**

Sinem ZERE TAŞKIN



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***IN VIVO* KATLANMIŞ HAPLOİD TEKNİĞİ İLE MISIR GENOTİPLERİNİN
(*Zea mays* L.) GELİŞTİRİLMESİ**

Sinem ZERE TAŞKIN
0000-0002-2243-2993

Prof. Dr. Uğur BİLGİLİ
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Sinem ZERE TAŞKIN tarafından hazırlanan “*IN VIVO* KATLANMIŞ HAPLOİD TEKNİĞİ İLE MISIR GENOTİPLERİNİN (*Zea mays* L.) GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Uğur BİLGİLİ

Başkan	:	Prof. Dr. Uğur BİLGİLİ 0000-0003-0801-7678 Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı	İmza
Üye	:	Prof. Dr. Köksal YAĞDI 0000-0003-1567-9397 Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı	İmza
Üye	:	Prof. Dr. Ahmet İPEK 0000-0002-9136-3186 Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı	İmza
Üye	:	Prof. Dr. Ali KOÇ 0000-0001-5072-462x Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı	İmza
Üye	:	Prof. Dr. Behçet KIR 0000-0002-7282-7010 Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı	İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü
.././2023

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

17/04/2023

Sinem ZERE TAŞKIN

TEZ YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Prof. Dr. Uğur BİLGİLİ

Sinem ZERE TAŞKIN

Tarih

Tarih

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

ÖZET

Doktora Tezi

IN VIVO KATLANMIŞ HAPLOİD TEKNİĞİ İLE MISIR GENOTİPLERİNİN (*Zea mays* L.) GELİŞTİRİLMESİ

Sinem ZERE TAŞKIN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Uğur BİLGİLİ

Katlanmış haploid teknolojisi, yeni mısır hatları (*Zea mays* L.) geliştirmek için günümüzde giderek daha popüler ve önemli bir araç haline gelmiştir. Konvansiyonel mısır ıslahında homozigot kendilenmiş hatlar elde etmek yaklaşık altı ile on nesil boyunca tekrarlanan kendileme gerektirmektedir. Bu nedenle önemli ölçüde zaman alıcıdır ve daha fazla işgücü ve finansal kaynak kullanılması gibi dezavantajlara sahiptir. Ancak katlanmış haploid teknolojisi kullanılarak sadece iki generasyonda tamamen homozigot hatlar üretilebilmektedir. Bu araştırma; 2019-2021 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütülmüştür. Araştırmada katlanmış haploid hatlar üretmek için *in vivo* maternal haploid yöntemi kullanılmıştır. Donör ebeveyn olarak FAO olum grubu 500-750 arasında değişen 32 farklı genotip, tozlayıcı olarak Stock6 indirgeyici hattı kullanılmıştır. Tüm donör genotipler atdışı tane yapısına sahiptir. Haploid tohumlar, *R1-nj* renk markörü dikkate alınarak görsel olarak tanımlanmıştır. Haploid indirgeme (HİO) ve kromozom katlama oranları belirlenmiştir. Araştırmada 488 haploid kabul edilen tohum elde edilmiştir. Katlanmış haploid hat elde etmek için haploid hatlara ait tohumlar 23°C’de karanlık iklim odasında çimlendirilmiştir. Çimlenen haploid fideler %0,06 kolhisin ve %0,5 dimetil sülfoksitten oluşan çözeltide 18°C’de, 12 saat boyunca muamele edilmişlerdir. Daha sonra yıkanan fideler torf doldurulmuş plastik kaplara aktararak sera koşullarında büyütülmüştür. 3-4 yapraklı aşamadaki fideler tarlaya aktarılmış, büyütülen bitkilerde kendileme yapılmıştır. Katlanmış haploid bitkilerde bazı ölçüm ve gözlemler alınmıştır. Ortalama haploid indirgeme oranı %2,03 olarak, ortalama kromozom katlama oranı %50 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, 20 adet katlanmış haploid hat üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: haploid indirgeme oranı, *in vivo*, katlanmış haploid, mısır ıslahı.
2023, vii + 86 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

DEVELOPMENT OF MAIZE GENOTYPES (*Zea mays* L.) BY USING *IN VIVO* DOUBLED HAPLOID TECHNIQUE

Sinem ZERE TAŞKIN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Uğur BİLGİLİ

Doubled haploid technology has become an increasingly popular and important tool for developing new maize lines (*Zea mays* L.) breeding. Conventional maize breeding requires repeated self-pollination for six to ten generations to obtain homozygous inbred lines. Therefore, it is significantly time-consuming and has disadvantages such as using more labor and financial resources. However, completely homozygous lines can be produced in only two generations by using doubled haploid technology. This study was conducted at Bursa Uludag University Agriculture Faculty Research and Training Centre in Bursa, Turkey in 2019–2021. In this research, *in vivo* induction of the maternal haploid method was used to produce doubled haploid lines. 32 different genotypes ranging from FAO maturity group 500-750 were used as donor parents, and the Stock6 inducer line was used as a pollinator. All genotypes have a dent kernel type. Haploid seeds were identified visually by using dominant anthocyanin color marker genes *R1-nj*. 488 putative haploid seeds were obtained. Seeds considered haploid were germinated at 23 °C in a dark climate chamber for chromosome doubling treatment. Seedlings were immersed in a 0.06% colchicine solution plus 0.5% DMSO (dimethyl sulfoxide) for 12 h at 18 °C. Afterward, the washed seedlings were transferred to plastic cups filled with peat and grown under greenhouse conditions. Seedlings at the 3-4 leaf stage were transferred to the field, and the grown plants were self-pollination. Some measurements and observations were taken in doubled haploid plants Haploid induction rates (HIR) and chromosome doubling rate (CDR) were determined. The average haploid induction rate was calculated as 2.03%, the average chromosome doubling rate was 50%. Results of this study 20 doubled haploid lines were developed.

Key words: doubled haploid, haploid induction rate, *in vivo*, maize breeding.
2023, vii + 86 pages.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimimin tüm aşamalarında bilgi ve tecrübesiyle her türlü desteği benden esirgemeyen, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Uğur BİLGİLİ'ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: FDK-2021-491) tarafından desteklenmiştir.

Doktora eğitimim süresince TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı ve YÖK 100/2000 Doktora Bursları kapsamında verdikleri destek için TÜBİTAK ve YÖK'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, enerji ve moral kaynağım canım dostum Dr. Öğr. Üyesi Nurcan KARSLIOğLU KARA'ya tüm desteği için teşekkür ederim. Bu zorlu süreçte benden desteğini esirgemeyen canım eşim Salih TAŞKIN'a yardımları, anlayışı ve sabrı için teşekkür ederim. Hayatımın her anında beni her zaman destekleyen, hedeflediğim yolda yürümemi sağlayan çok kıymetli annem Ayőe ZERE ve babam Mehmet ZERE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Sinem ZERE TAŞKIN
17/04/2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Deneme alanı ve bitki materyali	24
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Donör genotipler ve indirgeyici genotipin yetiştirilmesi.....	29
3.2.2. Haploidlerin tanımlanması.....	32
3.2.3. Haploid indirgeme oranının (HİO) hesaplanması.....	34
3.2.4. Yapay kromozom katlama.....	35
3.2.4.1. Yapay kromozom katlama uygulamasının basamakları.....	36
3.2.5. Katlanmış haploid bitkilerin (KH0) yetiştirilmesi ve kendileme işlemi.....	41
3.2.6. Kendilenen katlanmış haploid hatların (KH1) yetiştirilmesi ve tohum çoğaltımı...45	45
3.2.7. Kendilenen katlanmış haploid (KH1) hatlarda alınan ölçüm ve gözlemler.....	46
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	51
5. SONUÇ.....	66
KAYNAKLAR	67
EKLER.....	76
ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
pH	Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
°C	Santigrat derece
Kısaltmalar	Açıklama
<i>BI</i>	Booster 1
DMSO	Dimetil sülfoksit
FAO	Food and Agriculture Organisation
FYD	Farklılık Yeknesaklık Durulmuşluk
HİO	Haploid indirgeme oranı
HIR	Haploid inducction rate
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
KH	Katlanmış haploid
P	Fosfor
K	Potasyum
N	Azot
cm	Santimetre
kg	Kilogram
da	Dekar
m ²	Metrekare
mm	Milimetre
ml	Mililitre
EC	Elektriksel Kondüktivite
µS	Mikrosiemens
mg	Miligram
h	Hektar
<i>PII</i>	Purple 1
<i>R1-nj</i>	R1-Navajo
TAGEM	Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
CMS	Sitoplazmik erkek kısır
UPOV	The International Union for the Protection of New Varieties of Plants
USDA	United States Department of Agriculture

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Genetik homozigotluğa ulaşan nesillerin sayısı: (A) Konvensiyonel kendileme; (B) Katlanmış haploid tekniği.....	4
Şekil 2.1. Katlanmış haploid hatların yoklama melezlemesi seleksiyonu ile geliştirilmesinin standart ve hızlandırılmış ıslah şeması. A, B, C, D: Homozigot hatlar, F1: Melez, H: Haploid, KH: Katlanmış haploid, KH tek sıra GB: Katlanmış haploidlerin tek sıralı gözlem bahçesi, T ve T': Test edici hatlar, YM1 ve YM2: Yoklama melezi verim denemeleri.....	12
Şekil 2.3. (a) Geleneksel kendilenmiş hat gelişimi. Her kendileme neslindeki homozigotluk oranı (%) ve her ilerleme aşamasına ulaşmak için geçen süre, (b) Mısırdaki kendilenmiş haploid hattı gelişimi. Kaynak popülasyonun homozigotluğunun (%) %50 olduğu varsayılmıştır.....	21
Şekil 3.1. (A) Stock6 indirgeyici hattının tepe püskülü görünümü. (B) Stock6 indirgeyici hattının bitki görünümü.....	27
Şekil 3.2. Katlanmış haploid hat üretiminin aşamaları.....	28
Şekil 3.3. Ekim sonrası deneme alanında sulama işlemi.....	29
Şekil 3.4. (A) Melezleme öncesi donör ebeveynler, (B) Polen verilmeden önce donör genotipe ait koçan püskülü, (C) Donör genotip koçanının Stock6 indirgeyici hattın polen tozuyla döllenmesi, (D) Melezleme işlemi tamamlanmış olan bir donör genotip koçanının izolasyon torbası ile izole edilmesi.....	31
Şekil 3.5. Haploid indirgeme melezlerinden kaynaklanan haploid embriyolu taneleri tanımlamak için R1-nj haploid tanımlayıcı markörünün kullanımı	33
Şekil 3.6. Çimlendirme sonrası haploid (n) ve diploid (2n) tohumların kök renkliliğine göre seçilmesi.....	34
Şekil 3.7. (A) Çimlendirme kâğıdı üzerine yayılmış haploid tohumlar, (B) İklim kabinine yerleştirilmiş materyaller	37
Şekil 3.8. (A) Haploid fidenin kök ve sürgün uçlarından kesilerek kolhisin muamelesi için hazırlanması, (B), (C) Kolhisin muamelesi öncesi farklı genotiplere ait fidelerin ayrı ayrı tül torbalara yerleştirilmesi	39
Şekil 3.9. (A) Tül torbaların kolhisin solüsyonu ile dolu plastik tanka yerleştirilmesi, (B) Plastik tankın iklim kabinine yerleştirilmesi....	40
Şekil 3.10. Serada 3-4 yapraklı evreye kadar yetiştirilmek üzere plastik kaplara dikkatli bir şekilde dikimi yapılmış katlanmış haploid bitkiler.....	41
Şekil 3.11. (A) Fidelerin araziye aktarılması, (B) Dikime hazır bir katlanmış haploid hat, (C) Katlanmış haploid fidelerinin tarlaya dikilmesi, (D) Dikim sonrası fidelerin tarladaki görünüşleri.....	42
Şekil 3.12. Katlanmış haploid bitkilerde çapalama işlemi.....	43
Şekil 3.13. (A, B, C, D) Katlanmış haploid bitkilerde kendileme işlemi.....	44

Şekil 3.14.	Kendilenen katlanmış haploid (KH1) hatların görünüşleri.....	45
Şekil 4.1.	(A, B, C, D) R1-nj renk markörüne sahip indirgeyici Stock6 hattı ile donör genotiplerin indirgeme melezlemesi sonucu oluşan koçanları.....	52
Şekil 4.2.	Melezlemelerden elde edilen farklı kategorideki tohumlar.....	53
Şekil 4.3.	Tarlada farklı katlanmış haploid bitkilere ait steril tepe püskülleri.	60
Şekil 4.4.	G26 donörüne ait haploid bitkinin kendilenmesi sonucu elde edilen koçan.....	61
Şekil 4.5.	G37 donörüne ait katlanmış haploid bitkilerin kendilenmesi sonucu elde edilen koçan.....	61
Şekil 4.6.	G40 donörüne ait katlanmış haploid bitkinin kendilenmesi sonucu elde edilen koçan.....	62
Şekil 4.7.	G46 donörüne ait katlanmış haploid bitkilerin kendilenmesi sonucu elde edilen koçanlar.....	62
Şekil 4.8.	G3 genotipinden gelen kendilenen katlanmış haploid hattın (KH1) tarladaki görünümü.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü Bursa İli'nde 2019, 2020, 2021 ve uzun yıllar ortalaması (UYO)'na ait sıcaklık (°C), yağış (mm) ve nem (%) değerleri.....	24
Çizelge 3.2. Çalışmanın yürütüldüğü Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki deneme alanının toprak analiz sonuçları.....	25
Çizelge 3.3. Kendilenen katlanmış haploid hatlarda (KH1) alınan ölçüm ve gözlemler.....	46
Çizelge 4.1. İndirgeme melezlemesi sonucu oluşan koçan sayıları ve haploid, F1, tip dışı ve melez dışı tohum sayıları (adet).....	54
Çizelge 4.2. İndirgeme melezlemesi sonucu oluşan haploid, F1, tip dışı ve melez dışı tohum oranları (%)......	57
Çizelge 4.3. KH0 genotiplerine ait çimlenmeye konulan haploid tohum sayısı, kolhisinle muamele edilen fide sayısı, kolhisin sonrası kaplara dikilen fide sayısı, arazide canlı kalan bitki sayısı, kendileme yapılan bitki sayısı ve hasat edilen koçan sayısı.....	59
Çizelge 4.4. Hasat sonrası elde edilen kendilenen KH1 tohum sayıları (adet)...	63

1. GİRİŞ

Mısır (*Zea mays* L.), değişik iklim koşullar altında yüksek adaptasyon kabiliyetine sahip bir sıcak iklim tahılıdır. Dünyada gıda, hayvan yemi, endüstriyel hammadde ve enerji arzının sağlanmasında kritik bir rol oynaması sebebiyle ekiliş, üretim ve tüketim açısından önemli bir kültür bitkisidir (Cerit vd., 2016; Başer vd., 2022).

Ülkemizde 2022 yılı itibariyle yem bitkileri ekim alanı 2,7 milyon ha, yeşil ot üretimi ise 66,9 milyon tondur. Yem bitkileri içerisinde silajlık mısır %19,3 ekim alanı ve %42,7 yeşil ot üretimi ile yüksek bir orana sahiptir (TÜİK, 2023).

Mısır tüketiminin sektörel dağılımı incelendiğinde, mısır kullanım alanları içerisindeki en yüksek pay dünyada %63,5 ve ülkemizde %83 olmak üzere yem sanayisine aittir (Taşdan, 2021). Mısırın birim alan veriminin yüksek olması, silaj yapımına uygunluğu ve elde edilen silajın besleme değerinin yüksek olması yem bitkisi olarak yüksek oranda tercih edilmesini sağlamaktadır. Hayvancılık sektöründe kaliteli kaba yem ihtiyacının artış göstermesi ve hayvancılığa verilen destekler ile ülkemizde silajlık mısır ekimi artmıştır. Türkiye’de bugüne kadar 281 adet mısır çeşidi tescil edilmiş olup bu çeşitlerin içinde silajlık mısırın çeşit oranı %4,9’dur (TÜİK, 2020). Mısır silajı üretimimiz için yeterli sayıda silajlık mısır çeşidinin bulunmaması, talebin silajlık olmayan mısır çeşitleri ile karşılanmasına neden olmaktadır.

Türkiye’de kaliteli kaba yem açığı 27 milyon ton civarındadır (TAGEM, 2023). Ülkemizde birim alan veriminin 5 ton/da civarında olduğu silajlık mısırdaki verimin dekar başına 8-10 tonlara çıkartılması, yem bitkileri açığımızın kapatılmasına, dolayısıyla birim hayvandan elde edilecek veriminde artırılmasına katkı sağlamada büyük bir potansiyele sahiptir.

Yerli mısır çeşitlerinin üretimdeki payını arttırmak için verimli ve yüksek kaliteli yerli çeşit sayısının artırılması gerekmektedir. Milli çeşitlere sahip olmak stratejik bir konu olup sürdürülebilir üretimi sağlayabilmenin en temel koşuludur. Bu sorunların

giderilmesi ve taleplerin karşılanabilmesi için kaliteli ve verimli milli silajlık melez mısır çeşitlerinin geliştirilmesi ve çiftçi kullanımına sunulması gerekmektedir.

Uluslararası Tarımsal Araştırma Danışma Grubu'na (CGIAR) göre gelişmekte olan dünyada mısır talebinin 2050 yılına kadar ikiye katlanması öngörülmektedir (CGIAR, 2023). Mısır ve mısır bazlı ürünlerin gelecekteki taleplerini karşılamak için iki ana araç; kaynak tasarrufu sağlayan ekim sistemleri ve verimi yüksek ıslah edilmiş ürün çeşitlerini kullanmaktır (Pixley ve Banziger, 2004). Artan dünya nüfusu ve iklim değişikliği, diğer tüm kültür bitkilerinde olduğu gibi agresifliği artan biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklı ve yüksek verimli yeni mısır çeşitlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Cerit vd., 2016). Sınırlı kaynaklar, azalan ekilebilir alanlar, küresel iklim değişikliği göz önüne alındığında mısır üretimi ve sürdürülebilirliğinin sağlanması günden güne daha da önemli hale gelmektedir (Kumar vd., 2022).

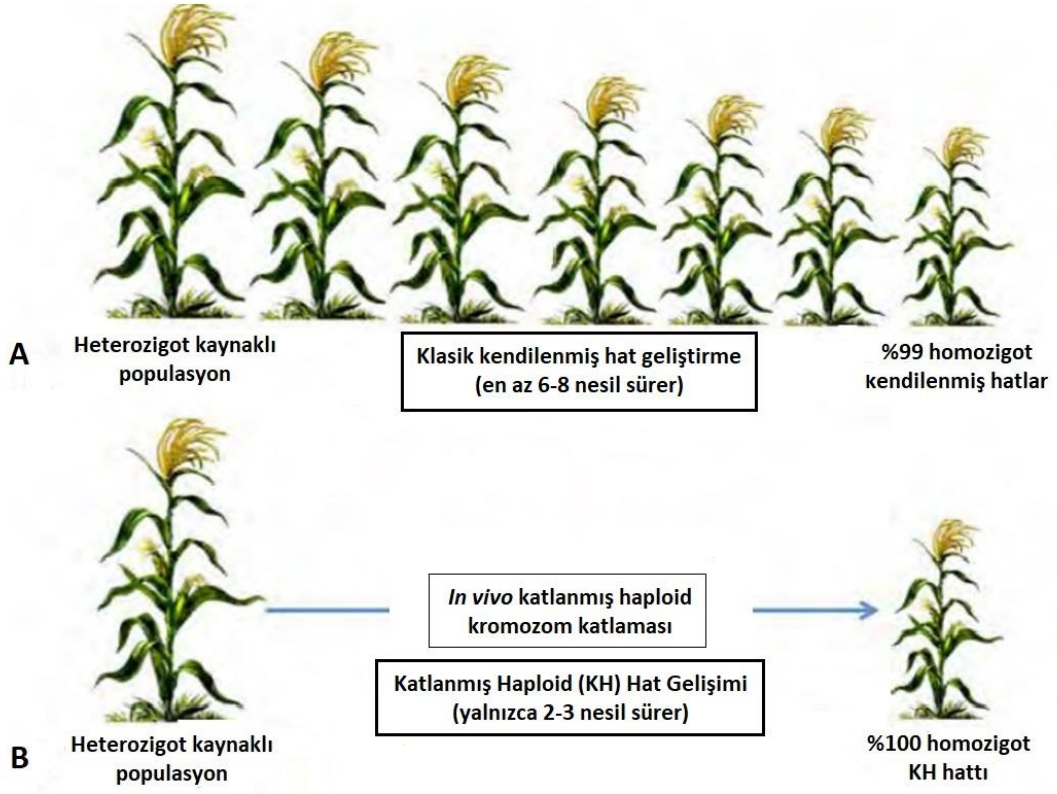
Mısır yabancı döllen bir bitki olduğundan, her generasyonda yabancı döllenme sonucunda heterozigotluk oranı artmaktadır. Mısır ıslah programlarında ilk aşama melez çeşitlere ebeveyn olacak homozigot hatların geliştirilmesidir (Cerit vd., 2016). Daha sonra homozigot yapıdaki materyaller arasında melezlemeler yapılır.

Homozigot saf hatları elde etmenin bir yolu haploidi özelliğinden yararlanmaktır. Haploidler ve katlanmış haploidler (KH), modern mısır ıslahında ıslah sürecini kısalttıkları ve ıslah etkinliğini arttırdıkları için büyük öneme sahiptirler (Chase ve Nanda, 1969). Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler adı verilmektedir (Şehirli ve Özgen, 2013). İlk haploid mısır bitkisi Stadler ve Randolph tarafından 1929'da tanımlanmıştır. Chase 1947'de mısırdaki %0,1 haploid oranını tespit etmiş ve bu oranın ıslahta hat geliştirmek için kullanılabileceğini gözlemlemiştir (Chase, 1947). Coe 1959'da genetik tabanda antosiyanin renk markörünü keşfetmiş ve daha yüksek haploid indirgeme oranına (%2,3) sahip indirgeyici hat olan Stock6 adlı hattı bulmuştur. Bu hat günümüz mevcut indirgeyici hatların atası olarak kabul edilmektedir (Coe, 1959).

Katlanmış haploid (KH) tekniği, haploid hücrelerin yapay olarak katlanması işlemidir. Tekniğin temelini haploidi özelliğinden yararlanmak oluşturmaktadır. Katlanmış haploid elde edebilmek için kaynak genotip, indirgeyici denilen özel bir mısır hattıyla melezlenir. İndirgeyici hat haploid tanelerde özel bir renklenmeye sebep olarak haploid tanelerin tanımlanmasına olanak sağlar. Fertil olmayan haploid taneler fertilitte kazanmaları için çimlendirildikten sonra kromozomları ikiye katlanır. Elde edilen katlanmış haploid bitkilerinin çoğaltımı için kendileme işlemi yapılır (Geiger, 2009; Trentin vd., 2020).

Konvansiyonel bitki ıslahı, mısır gelişimine önemli ölçüde katkı sağlasada, önemli ölçüde zaman alıcıdır ve fazla işgücü ve finansal kaynak kullanılması gibi dezavantajlara sahiptir. Zira klasik kendileme metodu ile kendilenmiş hatların elde edilmesi 6-8 generasyon sürmekte, bu sürenin sonunda ancak %99 oranında homozigot hatlar elde edilebilmektedir. Katlanmış haploid tekniğinde ise sadece 2 nesilde %100 homozigot hatlar elde edilebilmektedir. Bu teknik homozigot hat elde edilmesi için harcanan zamanı önemli ölçüde kısaltmakta, daha az iş gücü ve maddi kaynak kullanımı gibi avantajlar sağlamaktadır (Geiger ve Gordillo, 2009; Prasanna vd., 2012; Chaikam vd., 2019).

Katlanmış haploid tekniğinin ilk adımı olan haploid indirgeme *in vivo* ya da *in vitro* yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir (De La Fuente vd., 2018). Ancak *in vitro* yönteminin başarısı iyi bir laboratuvar ve uzman çalışanlara bağlı olduğundan dolayı kısıtlı olmuştur. Buna karşılık, *in vivo* haploid indirgeme katlanmış haploid hat geliştirmede sıklıkla tercih edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Chaikam vd., 2019). *In vivo* yöntemde kullanılan indirgeyici hattın genetik tabanında antosiyanin renk markörü bulunması hem tohum hem de fide aşamalarında haploidlerin kolay tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle *in vivo* yöntemi *in vitro*'ya nispeten daha kolaydır (Chase, 1969; Chaikam vd., 2019).



Şekil 1.1. Genetik homozigotluğa ulaşan nesillerin sayısı: (A) Konvensiyonel kendileme; (B) Katlanmış haploid tekniği (Prasanna, 2023).

Mısırdaki katlanmış haploid tekniğinin kullanımının avantajları (Röber vd., 2005);

1. İki generasyonda tamamen homozigot hatların geliştirilmesi,
2. Yeni ıslah hatlarını geliştirmek için daha az zaman, işgücü ve maddi kaynak kullanımı,
3. Özellikle moleküler markörlerin kullanılmasıyla seleksiyonun daha etkin ve kesin bir biçimde yapılması (Röber vd., 2005; Geiger ve Gordillo, 2009),
4. Katlanmış haploid ebeveyn hatlarda mükemmel bir homozigotluk sağlayarak bitki çeşidini korumak için gerekli olan FYD (farklılık, yeknesaklık ve durulmuşluk) gereksinimlerini karşılaması (Geiger ve Gordillo, 2009) olarak sayılabilir.

Katlanmış haploid tekniğinin bu avantajları son 20 yılda mısır ıslahı ve genetiğine olan ilginin artmasına neden olmuştur (Geiger, 2009).

Ülkemizde son 10 yılda mısır ıslah çalışmaları yürüten kamu ve özel kuruluşlarda katlanmış haploid tekniği uygulamaları popüler hale gelmiştir. Ülkemizde de dünyaya benzer şekilde haploid yetiştirme programları maternal haploidlerin in vivo indirgemesine dayanmaktadır.

Bu çalışmada; in vivo katlanmış haploid tekniği kullanılarak 2 generasyon gibi kısa bir zaman içerisinde homozigot mısır hatlarının elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

İlk haploid mısır bitkileri Stadler ve Randolph tarafından tanımlanmıştır (Randolph, 1932).

Chase (1949), mısır (*Zea mays* L.)'ın diploid ($2n=20$) bir bitki olduğunu ancak haploid bireylerin ($n=10$) doğal olarak 1000 tohumda bir oranında oluştuğunu bildirmiştir.

Coe (1959), normale kıyasla haploid üretim sıklığını artıran bir haploid indirgeyici olan Stock6'yı keşfetmiştir. Araştırmacı bir genotipin en az %2'lik bir haploid indirgeme oranına (HİO) sahipse indirgeyici olarak kabul edileceğini bildirmiştir.

R1-nj renk markör sistemin bazı sınırlamalarından dolayı, araştırmacılar maternal haploidlerin güvenilir bir şekilde ayrımı için özellikle çimlenme döneminde kök ve sapa renk oluşturan başka renk markörlerini keşfetmişlerdir (Rotarencu vd., 2010). *P11* (güneş ışığına bağlı olmadan bitki dokusunda mor renklilik oluşturur) ve *B1* (güneş ışığına bağlı olarak bitkinin toprak üstündeki aksamında renk oluşturur) bitki dokusuna mor veya kırmızı rengi verebilen iki alleldir. *B1* ve *P11* allelleri, *R1-nj* markör sistemine sahip indirgeyici hatlara entegre edilebilmektedirler. Böylece, *R1-nj* (*R-Navajo*) renkliliği tanelerde ortaya çıkmadığı zaman çimlendirilmiş haploid tohumlar kök renkliliğinden veya tarlada sap renkliliğinden ayrılabilirler. Böyle bir indirgeyici hat ile kaynak materyal melezlendiğinde elde edilen tohumlarda, diploid olanlar renkli (mor) kök ve sapa sahip olacaktır. Haploid olduğu kabul edilenlerde ise bu renklilik olmayacaktır (Coe ve Sarkar, 1964).

Lashermes ve Beckert (1988), maternal haploid yöntemi ile elde edilen haploid oranının, paternal haploid yöntemine göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Zabirova vd. (1993), 3-4 yapraklı evrede olan mısır fidelerine %0,125 kolhisin ve %0,5 dimetil süfoksit 3-5 mm enjekte etmişlerdir. Bu yöntemle arazi koşullarında %88,6, sera koşullarında ise %92,8 canlı bitki elde edilmiş ve sera koşulları daha başarılı bulunmuştur. Canlı kalan bitkilerin %42,4'ünden polen üretmiş, polen üretebilen bitkilerden %30,5'i kendilenebilmiştir. Araştırmacılar haploidlerin polen oranı üzerine

donör genotiplerin büyük etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmada bir donör hattın elde edilen haploidler %33 oranında başarılı bir şekilde kendilenmiştir.

Gayen vd. (1994), n=10 kromozumlu steril haploid tohumların kromozom katlama ile fertil duruma gelebilmeleri için bir teknik geliştirmişlerdir. Bu amaçla haploid tohumları 2-3 gün süreyle 26 °C’de petrilere sera koşullarında çimlendirmişlerdir. Çimlendirilmiş haploid kabul edilen mısır tohumlarının koleoptil uzunluğu 20-30 mm ulaştığında uçlarından keserek %0,06 kolhisin ve %0,5 dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltisinde 12 saat 18 °C’de bekletmiştir. Geliştirilen bu tekniğin mısırdaki kromozom katlamada oldukça etkili olduğunu ve muameleden sonra bitkilerin kendilenebildiğini bildirmişlerdir.

Deimling vd. (1997), n=10 kromozoma sahip olan haploid tohumların kromozom katlama ile $2n=20$ kromozumlu fertil duruma gelebilmeleri için çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla haploid tohumları 2-3 gün süreyle 26 °C’de petrilere sera koşullarında çimlendirmişlerdir. Çimlendirilmiş haploid mısır fidelerini %0,06 colchicine ve %0,5 dimetil sülfoksit çözeltisi ile muamele etmeden önce kolhisinin daha iyi nüfus etmesi için koleoptilin yanı sıra köklerinde uç kısımlarını kesmişlerdir. Ayrıca muamele sırasında karanlık ortam oluşturulmuştur. Böylece kromozom katlama uygulamasının etkinliğini daha da artırmışlardır. Yapay kromozom katlamasından sonra fideler dikkatli bir şekilde su ile yıkanmış ve 5-6 yapraklı evreye kadar serada ilk günler yüksek nem altında yetiştirilmiştir. Bu yöntemle bitkilerin %72,5’u kolhisin muamelesinden sağ çıkmıştır. Sağ kalan bitkilerden %50’sinin fertil bitki, fertil bitkilerden %39’unun kendileme yapılabilecek bitki ve %27,3’ünün kendileme yapılarak tohum alınabilen bitki olduğu tespit edilmiştir.

Roux (1995), çalışmasında Stock6, WS14 ve W23ig indirgeyici hatlarının maternal haploid indirgeme oranlarını test etmiştir. W23ig indirgeyici hattı, W23 atdışı hattının izogenik bir formudur. W23ig hattı paternal haploidlerin üretilmesini sağlamaktadır. W23 hattı ise ne paternal ne de maternal haploid indirgemeyi sağlamaktadır. İndirgenme oranları WS14 indirgeyici hattı için %7,3, Stock6 için %2 ve W23ig için %0,2 olarak bildirilmiştir.

Haploid bitkiler diploid homozigot hatlara göre daha küçük ve daha güçsüzdürler (Chase, 1952; Auger vd., 2004).

Eder ve Chalyk (2002), *in vivo* maternal haploid tekniği kullanarak yürüttükleri araştırmalarında, iki farklı indirgeyici hat (MHI ve Stock6) ile 20 farklı donörün (sert, atdışi ve sert x atdışi mısır grubu) kullanmışlardır. Kromozom katlama için fideler kolhisin çözeltisi ile muamele edilmiştir. İndirgeme melezlemesi sonrası haploid indirgeme oranının %2,7 ile %8,0 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Muamele sonucunda haploid bitkilerin %49,4'ü fertil polen üretmiş, fertil bitkilerden %39'u kendilenebilmiş ve %27,3'ü kendileme sonucu tohum üretebilmiştir. Araştırmacılar maternal haploid bitkilerin kullanımının mısır ıslahı ve mısır genetiği için büyük bir potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Katlanmış haploid tekniği, mısır ıslah programları için tamamen homozigot hatların üretilmesinde en hızlı ve en verimli yolu sunmaktadır. Katlanmış haploid tekniği ile homozigot mısır hatlarının elde edilmesi ve kendilemeyle bu hatların nesillerinin devamının sağlanması mümkündür. Maternal haploid üretiminde indirgeyici hat tozlayıcı olarak kullanılmakta ve elde edilen haploidlerin stoplazma ve kromozomları donör bitkiden gelmektedir. Konvensiyonel ıslah yöntemine kıyasla, bir yılda homozigot kendilenmiş hatların geliştirilmesine olanak tanır. Konvensiyonel yöntemle elde edilen kendilenmiş hatlarda %100 homozigotluk elde edilemediğinden çeşit tescilinde sorunlar yaşanabilmektedir. Ancak katlanmış haploid hatlar tamamen homozigot olmaları nedeniyle farklılık, yeknesaklık ve durulmuşluk (FYD) ölçütlerini tam olarak sağlamaktadırlar. Bu özellikler haploidleri çeşit tescili ve çeşit safiyetinin korunması için avantajlı kılmaktadır (Röber vd., 2005).

Röber vd. (2005), çevrenin indirgeme oranına etkisini belirlemek için KEMS ve RWS indirgeyici hatlarını ve bir yakacıksız, resesif mutant işaretli donör genotip kullanmışlardır. Araştırmacı, melezlemeler sonucunda en kötü çevrede indirgeme oranını %2, en iyi çevrede ise %16,4 olarak saptamışlardır.

Mısırdaki haploid indirgeme yöntemi yaygın olarak kullanılmasına rağmen tam olarak anlaşılammıştır. İki rakip hipotez mevcuttur. Bu hipotezlerden ilkinde göre indirgeyici hattın gelen iki sperm hücresinden biri kusurludur ama yumurta hücresi ile kaynaşabilmektedir. Sonraki hücre bölünmesi boyunca, indirgeyici hattın kromozomları dejenere olur. İkinci sperm hücresi merkez hücre ile birleşir ve triploid endosperm oluşturur (Belicuas vd., 2007). Bir diğeri hipotezde indirgeyici hattın gelen sperm ile döllenme normal olarak gerçekleşir. Ancak döllenmeden sonra indirgeyici hattın kromozomları bozulur. Bozulan kromozomlar elimine edilirler ve böylece haploid embriyo oluşur (Gernand vd., 2005; Zhang vd., 2008).

Tek kromozom setine sahip olan haploidler diploid bitkilerden oluşurlar. Haploidler, her bir lokustaki allellerden sadece bir seriyi bulundurmalarından dolayı saf hatların kısa sürede geliştirilmesine olanak sağlarlar. Haploid bitkiler, morfolojik olarak normal bitkilerde bulunan tüm organlara sahiptirler. Ancak diploid bitkilere oranla hücreleri daha küçüktür. Bu nedenle boyları daha kısa, yaprakları daha küçük ve verimli değildirler (Yılmaz, 2005).

Seçici yetiştirme yoluyla, WS14 (Lashermes ve Beckert, 1988), ZMS (Chalyk, 1994), KMS (Tyrnov ve Zavalishina, 1984) MHI (Eder ve Chalyk, 2002) gibi bir dizi yeni indirgeyici hat geliştirilmiştir. En etkili indirgeyicilerden biri, Hohenheim Üniversitesi tarafından geliştirilmiştir. Kendilenmiş hat kökenli Rus sentetik inducer KEMS (Shatskaya vd., 1994) ve Fransız inducer hattı WS14 (Lashermes ve Beckert, 1988) aralarında melezlenerek RWS hattı elde edilmiş ve Orta Avrupa'nın ılıman iklimine adapte olmuştur. Bu hat ayrıca tropik iklimlerde de etkilidir. RWS hattı %8-23 aralığında indirgeme oranına sahiptir. Çevresel faktörler sebebiyle haploid üretim oranında önemli farklılıklar meydana gelebilmektedir (Röber vd., 2005)

Rotarenco vd. (2007), haploid embriyo tanelerinin F1 embriyoya göre önemli ölçüde daha düşük yağ konsantrasyonuna sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu fark sayesinde haploid embriyolarla F1 embriyolar birbirleriyle kıyaslanabilirler. İndirgeyici hatların ortalamasının üzerinde bir yağ konsantrasyonuna sahip olması bu yaklaşım için onları uygun kılmaktadır.

Barret vd. (2008), donör ebeveynler üzerinde tozlayıcı olarak Fransız inducer hat PK6 gibi çeşitli kendilenmiş hatlar kullanarak, *in vivo* haploid indirgemelerini etkileyen kromozom 1 üzerinde eşlenmiş lokusu tespit etmiştir. Araştırmacılar, PK6 allelinin önemli ölçüde kombinasyonların çoğunda indigeme oranını arttırdığını bildirmiştir.

Kato ve Geiger (2008), kromozom katlaması için sekiz farklı genotipten elde edilen haploid mısır fidelerini, nitroz oksit gazıyla (600 kPa'da 2 gün) muamele etmişlerdir. Çalışmada donör bitkilerin %44'ünden kendileme ile tohum alınabilmiştir. Donör genotiplerin kromozom katlama oranı üzerinde güçlü bir genotipik etkisi gözlenmiştir. Yöntemin, mısır ıslah programlarında kendilenmiş hat gelişimi için kullanılabilceği belirtilmiştir.

Mısır ıslahında daha fazla ilerlemenin katlanmış haploid hatların genetik, metodolojik ve lojistik avantajlarının geliştirilmesi ile önemli ölçüde artırılması beklenmektedir. Katlanmış haploid hatların başarısı sağlam ve verimli bir haploid üretim tekniğinin yanı sıra; genetik, teknik ve parasal kaynakların optimum kullanımından oluşan ıslah stratejilerine bağlıdır (Gordillo ve Geiger, 2008a-c).

Bilinen kadarıyla mevcut tüm ticari katlanmış haploid yetiştirme programları, maternal haploidlerin *in vivo* indirgemesine dayanmaktadır (Barret vd., 2008; Rotarenko vd., 2009).

Katlanmış haploid (KH), haploid hücrelerin yapay olarak kromozom katlaması ile oluşmuş bir genotiptir. KH tekniği yerine klasik kendilenmiş hatlar kullanarak %99 homozigot hatlar elde etmek en az 6-8 nesil sürmektedir. KH tekniğinde ise tamamen homozigot hatların hızlı gelişimi sayesinde ıslah döngüsü 2-3 nesile kısalmaktadır (Forster ve Thomas, 2005; Geiger ve Gordillo, 2009; Chang ve Coe, 2009).

Mısırdaki yüksek kaliteli, verimli ve adaptasyon kabiliyeti yüksek çeşitlerin geliştirilmesi, sürekli olarak yüksek kombinasyon kabiliyetine sahip homozigot kendilenmiş hatların elde edilmesiyle mümkündür. Hibrit mısır ıslahının ana konusu olan kendilenmiş hat geliştirme klasik yöntemlerde 6-10 yıl sürmekte ve bu süre sonunda ise %100 homozigot

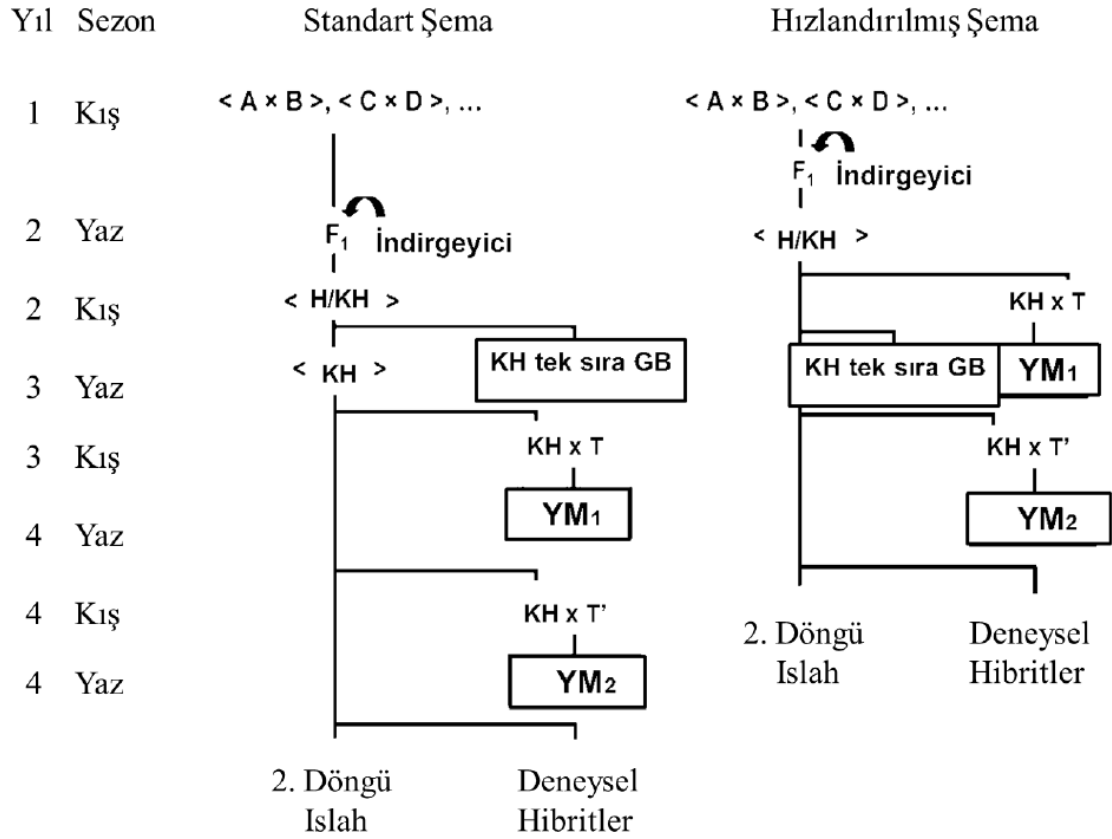
hatlar elde etmek mümkün olmamaktadır. Katlanmış haploid tekniği bir nesilde genetik homozigotluk sağlamaktadır. Haploidlerin her genin yalnızca tek bir kopyasını taşıması, resesif mutasyonların ortaya çıkmasına olanak tanımaktadır. Zararlı genlere sahip olan haploid bitkiler ya ölürlere ya da zayıf ve kısır olup tohum oluşturmazlar. Bu sayede haploid evrede istenmeyen zararlı genlerin sıklığı hızla ortadan kalkmaktadır. Bu süreç, doğal seleksiyona benzemektedir. İstenmeyen genleri ortadan kaldırmak, genetik havuzu hızla geliştirmek ve iyi genleri zenginleştirmek için etkili bir araç sağlamaktadır. Haploidlerin kromozomlarının katlanmasıyla %100 genetik homozigotluğa sahip katlanmış haploid hatlar elde edilmektedir (Chang ve Coe, 2009).

Katlanmış haploid tekniğinin başarılı olması donörün (kaynak materyal) renksiz tohumlara sahip olmasına, indirgeyici hattın *R1-nj* geni bakımından homozigot olmasına ve tercihen baskın renk genlerine (*A1* veya *A2* ve *C2*) sahip olmasına bağlıdır. Donör genomu *R1* veya *C1-I*, *C2-Idf* ve *In1-D* gibi baskın antosiyanin inhibitör genleri için homozigotsa *R1-nj*'nin ifadesini inhibe eder. Sert, subtropikal, tropikal ve şeker mısır gruplarının bu alellere yüksek oranda sahip olması haploidlerin yanlış sınıflandırılmasına neden olmaktadır. *In vivo* haploid üretimine dayalı katlanmış haploid tekniği, mısır ıslahında dünya çapında ıslah verimliliğini artırmak için önemli bir yöntem olarak tanınmaktadır (Geiger, 2009).

Geiger ve Gordillo (2009) katlanmış haploid hat geliştirmede standart ve hızlandırılmış olmak üzere iki ıslah şeması ortaya koymuşlardır. Standart ıslah şemasının aşamaları;

- Seçilmiş hatlar arasında melezleme yapılarak yeni varyasyon yaratmak,
- F1 generasyonunda *in vivo* haploid indirgeme yöntemini uygulamak,
- Elde edilen tohumlarda haploidlerin belirlenmesi, belirlenen haploidlerde kromozom katlamasının yapılması, katlanmış haploid 0 (KH0) bitkilerinde kendileme yapılarak katlanmış haploid hatların elde edilmesi,
- Katlanmış haploid hatların tek sıra denemelerinin yapılmasının yanısıra tohum çoğaltımının yapılması,
- Tek sıra denemelerinden seçilen KH hatlarda bir veya birden fazla test edici hat ile yoklama melezi yapılması,

- Çoklu lokasyonlarda yoklama melezi verim denemelerinin yapılması ve kombinasyon yeteneği yüksek, verimli katlanmış haploid hatların seçilmesi aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Katlanmış haploid hatların yoklama melezlemesi seleksiyonu ile geliştirilmesinin standart ve hızlandırılmış ıslah şeması. A, B, C, D: Homozigot hatlar, F₁: Melez, H: Haploid, KH: Katlanmış haploid, KH tek sıra GB: Katlanmış haploidlerin tek sıralı gözlem bahçesi, T ve T': Test edici hatlar, YM₁ ve YM₂: Yoklama melezi verim denemeleri (Geiger ve Gordillo 2009; Cengiz, 2016).

Farklı çevre ve donörlerde WS14'ün indirgeme oranı %8 olarak tespit edilmiştir. RWSxRWK-76 melezi akraba ebeveynlere sahip olmasına rağmen %9-10 indirgeme oranına sahip olup anaçlarına göre daha fazla polen verme yeteneğine sahiptir. Canlı ve gür bitki özelliği ile kötü çevrelerde RWSxRWK-76 indirgeyici hattının kullanılması polen verimi ile ilgili sorunları en az düzeye indirmektedir. Haploidleri diploidlerden ayırt etmek indükleyicinin taşıdığı dominant *R-nj* (R-Navajo) geni kullanılarak yapılan bir görsel seçim sürecidir. *R-nj* geninin yardımıyla, F1 (diploid)'ler mor endosperm ve embriyo fenotipi sergilerken, haploidler mor endosperm ancak renksiz bir embriyoya sahip olmaktadır. Tipdışı tohumlar, perikarp renklenmesinin olmaması ile ayırt edilebilmektedirler (Geiger, 2009).

Haploidler mısırdaki *in vitro* veya *in vivo* teknikler kullanılarak üretilebilirler. Mısırdaki *in vitro* haploid üretimi zaman alıcı ve maliyetli bir süreçtir. Bununla birlikte, haploidin hem tohum hem de fide aşamasında kolay tanımlanmasını sağlamak için indirgeyicinin genetik tabanında antosiyanin renk markörünün varlığı nedeniyle *in vivo* temelli katlanmış haploid hattı geliştirme *in vitro*'dan daha kolaydır. Antosiyanin renk geninin dominant mutant aleli *RI-nj* en etkili haploid tanımlayıcı markördür. *RI-nj* geni, endosperm (aleurone) ve embriyo dokusu (scutellum) 'nda derin bir renklenmeye neden olmaktadır (Geiger ve Gordillo, 2009).

Prigge vd. (2011), üç farklı tropikal lokasyonda haploid indirgeme oranına (HİO) çevrenin etkisini belirlemek için bir araştırma yürütmüşlerdir. Çalışmada RWS, UH400 ve RWSxUH400 indirgeyici hatları ve 120 donör kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre ılıman indirgeyici hatlar, tropikal koşullarda da ılıman koşullara benzer haploid indirgeme oranı sağlamışlardır. Ancak bitkilerin boyları kısalmış ve polenleri azalmıştır. Melezlemelerin elle yapılması gerekliliği olduğundan dolayı tropikal çevrelere uygun indirgeyici hatların geliştirilmesi önerilmiştir.

Kebede vd. (2011), mısırdaki katlanmış haploid hatların *in vivo* üretiminde HİO'nun çok önemli olduğunu ve HİO'nun öncelikle tozlayıcı olarak kullanılan indirgeyiciye bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte ana ebeveyn olarak kullanılan kaynak germplazm ve çevresel koşullarda haploid indirgeme oranını etkileyebilmektedir.

Tropikal mısırdada; (i) HİO'nun belirlenmesi, (ii) genel ve özel kombinasyon yeteneklerinin belirlenmesi, (iii) genotip x çevre interaksiyonunun bu özellik üzerindeki etkisini araştırmak için bir çalışma yürütülmüştür. 10 kendilenmiş hat yarım diallel düzeninde melezlenmiş ve elde edilen 45 adet F1 tek melezi haploid indirgeyici hibrit hattı RWS x UH400 ile tozlanmıştır. Mevsimler boyunca ortalaması alınan tek melezlerin haploid indirgeme oranları %2,90 ile %9,66 arasında değişmekle birlikte, ortalama %6,74 olarak tespit edilmiştir. Ortalama HİO, kış aylarında önemli ölçüde ($P \leq 0,01$) daha yüksek bulunarak (%7,37) yaz sezonuna (%6,11) göre daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar, tropik mısırdada daha yüksek bir HİO'nun, uygun kaynak germ-plazmı seçilerek ve uygun çevresel koşullar altında tozlaşma gerçekleştirilerek elde edilebileceğini belirtmişlerdir.

Chaikam ve Mahuku (2012), birçok donör genotip *BI* ve *PII* allelerini içermesinden dolayı *BI* ve *PII* renk markörlerinin kullanımında bazı kısıtlamaların mevcut olduğunu belirtmişlerdir. Bu alleleri içeren genotiplerden elde edilen haploidlerde kök ve saptan renklenme gözlemleneceğinden, haploidlerin tanımlanması imkânsız hale gelmektedir. Araştırmacılar, *BI* ve *PII* allellerinin ortaya çıkışının gün ışığı ve sıcaklık gibi çevre koşullarından etkilendiğini, en iyi mor renklenmenin düşük sıcaklık koşullarında meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Lübberstedt ve Frei (2012), araştırmalarında ıslahta hedeflenen genleri bir genotipte toplama konusunda katlanmış haploid tekniği ile klasik kendileme yöntemini karşılaştırmışlardır. KH tekniğinde klasik kendileme tekniğine göre daha az popülasyon büyüklüğüne ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmada bir çift istenen hedef genin genetik uzaklığı ve hedef genlerin sayısı geri melez programlarının son adımı olan BC_nF₂ popülasyonunda ve katlanmış haploid hatlarda belirlenmiştir. Geri melez yönteminde kendileme generasyonlarında hedef genlerin birbirleriyle ilişkisiz açılımlarının hızla artmasıyla karşılaştırıldığında özellikle hedef genlerde yakın bağlantı (linkage) olması halinde KH hatların kullanılmasının avantajlarını bulmuşlardır.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan haploid indirgeyici hatlardaki *R1-nj* alleli, antosiyanin biyosentezi için gerekli diğer allellerle birleştirilmiştir. İslah programlarında

kullanılan çoğu mısır germ-plasmı tane veya bitki dokusunda kırmızı-mor rengi veren antosiyanin biyosentezleyen allellere veya *RI-nj* alleleline sahip değildir. Antosiyanin renk geni içermeyen genotipler ile baba olarak kullanılan indirgeyici hatlar melezlendiğinde *RI-nj* alleli, renksiz *rl* alleleline dominant olduğundan elde edilen tüm tohumlarda embriyo ve endospermde Navajo fenotipinin (*RI-nj*) ortaya çıkması beklenir. Yüksek haploid indirgeme oranına sahip indirgeyici hatlar indirgeme melezlemesinde kullanıldığı zaman, genellikle %6-10 arasında maternal haploidler meydana gelmektedir (Chaikam ve Mahuku, 2012).

Haploid bitkiler; flowsitometri cihazı, çiçek tozlarının boylarının ölçülmesi, epidermis hücrelerinde kloroplastların sayılması, karyotipik çalışmalarla kromozom sayılması gibi yöntemlerle belirlenebilmektedir. *RI-nj* renk markörü vasıtasıyla haploid bitkilerin belirlenmesi ise çok daha kolay, hızlı ve pahalı olmayan bir yoldur (Dang vd., 2012).

Haploid tohumlar $n=10$ kromozomlu yapıdadırlar ve geliştiklerinde steril bitkiler meydana getirirler. Haploid bitkilerin $2n=20$ kromozoma sahip fertil bitkiler oluşturması için kromozom katlama uygulamasının yapılması gerekmektedir. Kromozom katlayıcı olarak kolhisin, kloral hidrat, eter, kloroform, fenil üretan gibi maddeler kullanılır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan kolhisin, mitotik bir inhibitördür ve mitoz bölünme sırasında iğ iplikçiklerinin oluşumunu engeller ve kromozomların ayrılmasını inhibe eder (Şehirli ve Özgen, 2013).

Haploidler, gamet oluşturamadıkları için kısırdırlar ve tohum oluşturamazlar. Haploid bitkilerin ıslah programlarında kullanılabilmesi için yeniden verimli diploid bitkilere dönüştürülmesi gerekmektedir (Yaralı ve Yanmaz, 2013).

Junxiong vd. (2013), haploid tohumların genellikle elle seçildiğini ve elle seçimin verimi düşürdüğünü belirtmişlerdir. Emek, zaman tasarrufu sağlayan ve yüksek doğruluk oranına sahip bir haploid sınıflandırma yönteminin bulunması gerektiğini belirtmişlerdir. Günümüzde yapay görme teknolojisi daha da geliştirilerek tarım ürünlerinin işlenmesi, tanımlanması ve sınıflandırılmasında yaygın olarak uygulanmaktadır. Araştırmacılar haploid tohumların ayırımında da yapay görme teknolojisinin kullanılabileceğini

belirtmişlerdir. Araştırmacılar, Navajo renk markörünün (*RI-nj*) endosperm ve embriyoda ortaya çıkmasına bağlı olarak haploid ve F1 olan tohumlar belirlendiğinden, otomatik görsel seleksiyonun temelini bu karakterlere bağlı olarak planlamışlardır. Tohumların embriyolarını fotoğraflayarak renk markörünü belirlemişlerdir. Araştırmacılar, test sonucunda tanımlama oranını haploid tohumlar için %98,04 ve F1 tohumlar için %94,44 olarak tespit etmişlerdir. Testte tanımlama sonucunu etkileyen ana faktörler analiz edilmiştir. Algoritma ve haploid mısır ayıklama platformu dâhil olmak üzere haploid tohumlar için dinamik bir ayıklama sistemi oluşturulmuş ve bunun mısırdaki haploidleri ayıklamanın otomatik olarak gerçekleştirilmesi için yararlı bir öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Melchinger vd. (2014), *RI-nj* renk markörüne ve yüksek yağ oranına sahip UH600 ve UH601 indirgeyici hatlarını geliştirmişlerdir. Bu indirgeyici hatlar %10 haploid indirgeme oranına sahip olup tanelerinde %11-12 yağ içermektedirler. Donör olarak tek melezler, sentetikler ve yerel ırklar, indirgeyici olarak UH600 indirgeyici hattı kullanılarak bir çalışma yürütülmüştür. Çalışmada haploid tohumlar, tane ağırlığına ve toplam yağ içeriğine göre nükleer manyetik rezonans yöntemiyle belirlenmişlerdir. Araştırmacılar bu yöntemde donörün yüksek yağ oranına sahip olmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

Hu (2014), 6 adet indirgeyici hat ve 10 farklı F1'i donör olarak kullanarak farklı indirgeyici hatların indirgeme oranlarını belirlemek için bir araştırma yürütmüştür. Araştırma sonuçlarına göre hatların haploid indirgeme oranları (HİO) düşükten yükseğe doğru KMS-3<WY-1<PR-2<YP-13<KMS-2<KMS-1 olarak tespit etmiştir. İndirgeyici hatların haploid indirgeme oranı %2,17-5,33 arasında değişmiştir. Araştırmacı donörden donöre haploid indirgeme oranının %1,26-10,27 arasında değiştiğini bildirmiştir.

Cengiz (2016), *in vivo* katlanmış haploid tekniği ile haploid mısır hatlarının geliştirilmesi için yürüttüğü çalışmada RWS, RWK-76, RWS x RWK-76 ve WS14 indirgeyici hatlarını baba ebeveyn olarak, 30 tek melezi ise donör ebeveyn olarak kullanılmıştır. Donör ile indirgeyici hatlar arasında yapılan indirgeme melezlemesinden 15 911 adet tohum elde edilmiş, bu tohumlardan *RI-nj* renk markörüne göre 3012 adet haploid kabul

edilen tohum seçilmiştir. En yüksek haploid indirgeme oranı %20,42 ile RWK-76 indirgeyici hattından, en düşük haploid indirgeme oranı ise %17,75 ile WS14 hattından elde edilmiştir. Araştırmacı, kromozom katlamasından sonra tarlaya dikilen 2178 fideden %89'unun canlı bitki, canlı bitkilerin %57'sinin fertil bitki, fertil bitkilerin %31,23'ünün kendileme yapılabilecek bitki ve kendileme yapılan bitkilerden %7,8'inin kendileme sonrası tohum alınabilen bitki olduğunu tespit etmiştir. Araştırmada sonuç olarak 27 adet katlanmış haploid hat elde edilmiştir.

Cerit vd. (2016), hibrit mısır ıslahında *in vivo* katlanmış haploid hatların elde edilmesi ve farklı indirgeyici genotiplerin indirgeme oranlarını belirlemek amacıyla Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde bir araştırma yürütmüşlerdir. Çalışmada baba ebeveyn olarak RWS, RWK-76, RWSxRWK-76 ve Stock6 indirgeyici hatları kullanılmıştır. Donör ebeveyn olarak 66'sı F2 kademesinde materyal ve 9'u ticari hibrit olmak üzere 75 farklı genotip kullanılmıştır. İndirgeyici genotiplerin haploid indirgeme oranları genotipten genotipe değişiklik göstermiştir. Ana olarak kullanılan 75 genotiptin 69'undan haploid tohum alınmış, 6 genotipten alınamamıştır. 75 genotipin 69'undan toplam 1463 adet haploid tohum elde edilmiştir. İndirgeyici hatların haploid tohum sayıları; RWS'de 271, RWK-76'da 246, RWSxRWK-76'da 397 ve Stock6'da 549 olmak üzere toplam 1463 olarak tespit edilmiştir. Haploid tohumların tanımlanması *RI-nj* renk markörüne göre yapılmıştır. En yüksek haploid tohum oranı %7,80 ile RWK-76 indirgeyici hattından, en düşük haploid tohum oranı ise %1,28 ile Stock6 indirgeyici hattından elde edilmiştir. Araştırmacılar ortalama haploid tohum elde etme oranını %4,79 olarak saptamışlardır.

Dünyada hibrit mısır çeşit geliştirme çalışmalarında önemli bir konumda olan Pioneer Tohumculuk firmasının 2011 yılı içerisinde katlanmış haploid teknolojisi ile geliştirdiği hat sayısı, geçmişindeki 80 yıllık ıslah programı kapsamında geliştirilen hat sayısından daha fazla olmuştur (Cerit vd., 2017).

De La Fuente vd. (2018), haploid tohumların yanlış sınıflandırma oranları eğer çok yüksekse bir sorun haline gelebileceğini belirtmişlerdir. Eğer yanlış sınıflandırma oranı yüksekse tarladaki bitkilerin birçoğu diploid (hibrit) olacaktır ve uzaklaştırılmaları

gerekecektir. Bu ıslah programları için maliyet, zaman ve alan kaybıdır. Katlanmış haploidlerin amacı hız ve verimlilik. Genel bir kanı olarak, yanlış sınıflandırma oranlarının en iyimser şekilde %10'un altında olması istenir. Ancak bu tohumları sınıflandıran kişi ve tohum üzerindeki renklemenin derinliği gibi faktörlerden büyük ölçüde etkilenebilir. Araştırmacılar yürüttükleri çalışmalarında düzeltilmiş indüksiyon hızını ($IR_c - \text{The corrected induction rate}$) = haploid tohum sayısı * (1 - yanlış sınıflandırma oranı) / toplam ekilen tohum oranı şeklinde hesaplamışlardır. Diploid bitkiler yanlış sınıflandırılmış haploidler olarak sayılmış ve toplam ekilen tohum sayısına bölünmüş, çimlenmeyen tohumlar haploid olarak varsayılmıştır. Çalışmada yanlış sınıflandırma oranları %0-45,2 arasında bulunmuştur. Çalışmaya dâhil edilen belirli hatlar (A427, A637 ve CR1HT) kabul edilebilir sınırlar içinde %4,5-5,8 olan yanlış sınıflandırma oranlarına sahipken, WF9'un tüm melezlemelerde kabul edilebilir sınırların dışında bir haploid oranına (%16) sahip olduğu hesaplanmıştır.

Molenaar ve Melchinger (2019), *in vivo* katlanmış haploid teknolojisinin Avrupa, Kuzey Amerika ve Çin'deki birçok ticari mısır yetiştirme programı tarafından benimsendiğini bildirmişlerdir.

Son yirmi ile otuz yılda, katlanmış haploid (KH) tekniği, geleneksel kendilenmiş hat geliştirme yöntemine etkili bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemle, genellikle iki ebeveynli bir hibrit veya bir populasyon olan kaynak germ-plazmanın ayrışan gametlerini örnekler ve bir adımda tamamen homozigot hatlar elde edilmesini sağlar. Mısırdaki KH hatları geliştirmek için hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemler kullanılabilir. Bununla birlikte, *in vivo* yöntemlerin, KH hatların büyük ölçekli üretiminde daha güvenilir ve verimli olduğu kanıtlanmıştır ve bu nedenle mısırdaki yaygın olarak kullanılmaktadır (Chaikam vd., 2019).

Hohenheim Üniversitesi tarafından geliştirilen ve indirgeme oranları yaklaşık %8-12 arasında olan RWS ve RWK-76 indirgeyici hatları günümüzde modern indirgeyici hatlar olarak bilinmektedir. Bu hatlar KEMS ve WS14 indirgeyici hatlarının melezlenmesi sonucu elde edilmiş olup mısır ıslahında haploid tohum eldesinde indirgeyici hat olarak kullanılmaktadır. Ilıman ve tropikal iklimlere uyum sağlayabilen bu hatlar dünyada

yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hatların yanı sıra WS14, W23, Stock 6 (Lashermes ve Beckert, 1988), ZMS (Chalyk, 1994), CAUHOI (Liu ve Song, 2000), MHI, M741H (Eder ve Chalyk, 2002), KEMS (Röber vd., 2005), UH400 (Kebede vd., 2011) JAAS3 (Cai vd., 2007), CAU-5 (Xu vd., 2013) gibi birçok indirgeyici hat geliştirilmiştir (Yorgancılar vd., 2019).

Haploid olduğu varsayılan tohumlar, kontaminasyon riskine karşı fungusitle ilaçlanır ve petri kabı içerisinde 2-3 gün süre ile 26 °C'de çimlendirilir. Kolhisinin daha iyi nüfus etmesi için koleptil uzunluğu 2-3 cm'ye ulaştığında koleoptil ve kök ucu kesilir. Hazırlanan fideler %0,06 kolhisin ve %0,5 dimetil sülfoksitten oluşan çözeltide 18 °C'de 12 saat muamele edilir. Kolhisin uygulaması sırasında koruyucu giysi, eldiven ve gaz maskesi kullanılarak yüksek derece güvenlik önlemleri alınmalıdır. Kolhisin muamelesinden sonra fideler saksılara şaşırtılır ve 26 °C'de uygun nem içeren ortamda 2 hafta süre yetiştirilir. 2 hafta sonra toprak hazırlığı yapılan tarlaya dikim işlemi gerçekleştirilir. Eğer kolhisin uygulaması başarılı olup fidelerde kromozom katlama gerçekleşmiş ise kendileme sonrasında elde edilen tohumlar katlanmış hatları oluşturmaktadır (Yorgancılar vd., 2019).

Haploidlerin frekansını artırabilen genotiplere genellikle "haploid indirgeyiciler" denir. Haploid indirgeyiciler, paternal (babaya bağlı) ve maternal (anaya bağlı) indirgeyiciler olmak üzere iki tipe ayrılır. Paternal haploid indirgeme, haploid indirgeme oranının düşük olması nedeniyle mısır ıslah programlarında yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ancak paternal haploid indirgeme, kendilenmiş bir hattın sitoplazmik erkek kısır (CMS) versiyona dönüştürülmesi için kullanılabilir (Chaikam ve Prasanna, 2020).

Chaikam ve Prasanna (2020), kapsamlı değerlendirmeye uygun kendilenmiş hatlar geliştirmek için 6 ile 8 kuşak arasında kendilemeye gereksinim olduğunu belirtmişlerdir. Son yirmi yılda katlanmış haploidler hibrit mısır ıslahında kendilenmiş hat geliştirmede, geleneksel yollarla elde edilen kendilenmiş hatların yerine alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Homozigot hatların elde edilmesi iki nesilde tamamlanabilir.

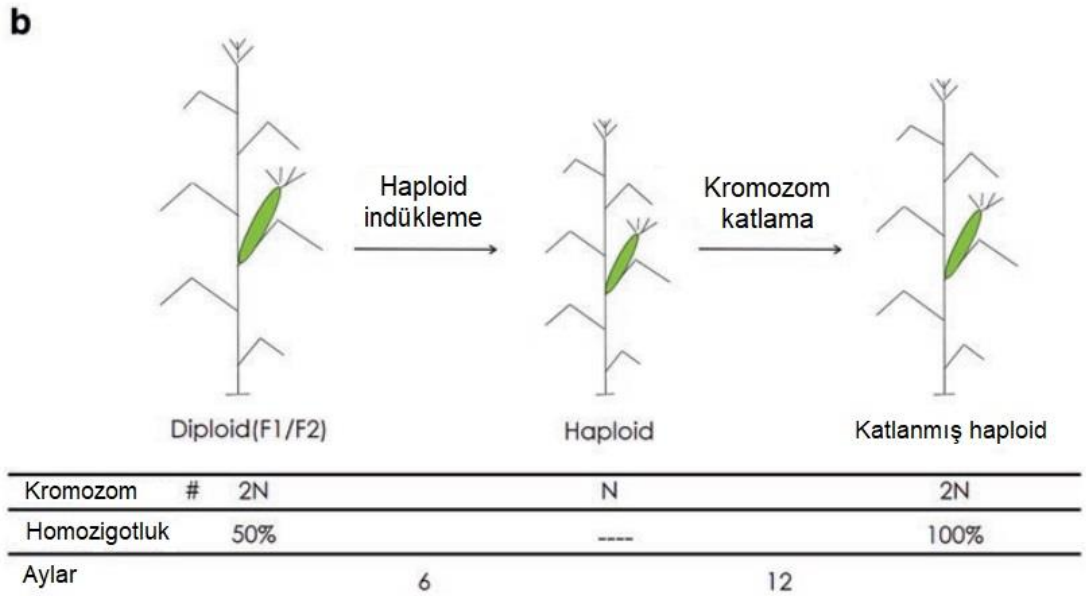
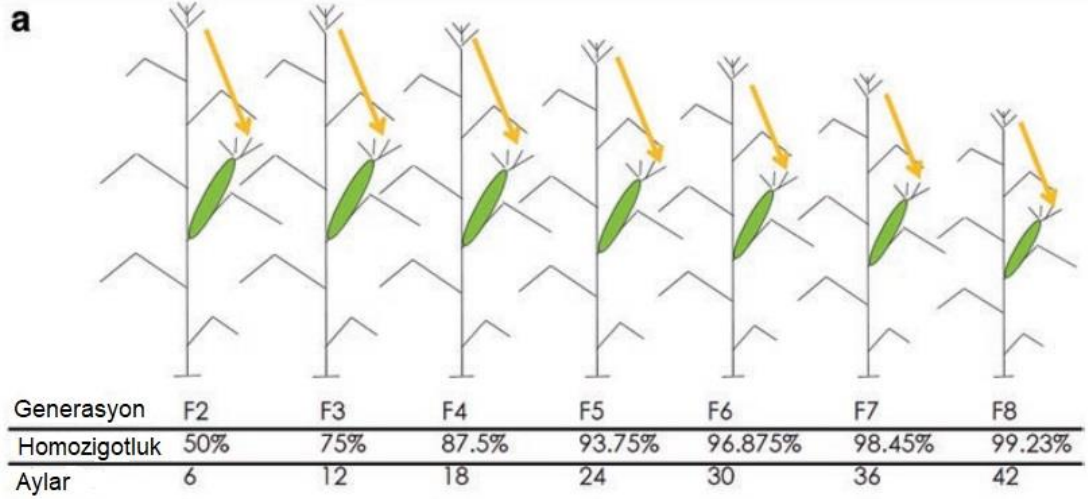
Bayhan vd. (2021), *in vivo* katlanmış haploid tekniği ile yerel çeşitlerden elde edilen haploid bitkilerin saf hat olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla yürüttükleri çalışmalarında 12 adet katlanmış haploid tekniği ile geliştirilen haploid genotipini incelemişlerdir. Çalışmada çimlendirmeye alınan haploid tohumlardan %77'si çimlendirme ve kromozom katlaması sonrası seraya aktarılmış, %17'sinin steril olması nedeniyle kendileme işlemi yapılamamıştır. Geriye kalan bitkilerin %41'inden kendileme sonucu tohum elde edilmiştir. KH ile bitki elde etme oranının %40'ın üzerinde olduğu hesaplanmıştır. Çalışmada indirgeyici hat ile melezlenen yerel mısır genotiplerinden başarılı bir şekilde katlanmış haploid bitkiler elde edebileceği ortaya konmuştur. Araştırmacılar anaç olarak kullanılacak KH bitkileri agronomik performansları yönünden sıralayarak DZM-45 ve DZM-7 yerel genotiplerinin diğerlerine üstünlük sağladığını tespit etmiştir.

Cengiz ve Esmeray (2021), mısır ıslahında *in vivo* maternal haploid tekniğini uygulamak için kullanılan haploid indirgeyici hatlar, Türkiye'de kamu ve özel sektör tarafından ithal edildiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle *R1-nj* renk markörünün Türkiye'deki yerel kendilenmiş mısır hatlarına aktarılması için çalışma yürütülmüştür. RWS ve RWK-76 haploid indirgeyici hatları donör olarak kullanılmıştır. İndirgeyici hatları geliştirmek için pedigree metodu uygulanmıştır. Bitkilerin antosiyanin renklenmesi, püskül uzunluğu, püskül dal sayısı, bitki boyu, çiçeklenme günleri, embriyo-endosperm renkliliği ve haploid indirgeme oranları (HİO) belirlenmiştir. Geri melez (BC1) popülasyonlarından %8'in üzerinde HİO'ya sahip genotipler seçilmiştir. in-1021 ve in-1076 isimli aday haploid indirgeyici hatların HİO'ları %10.5 ve %12.3, bitki boyları 195 ve 200 cm ve çiçeklenme günleri değerleri sırasıyla 69 ve 68 gün olmuştur. RWS donör haploid indirgeyicisinin HİO değeri %8,9 ile %11,3 ve RWK-76 için %7,3 ile %9,8 arasında değişmiştir. Mısır Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen hatlar ADAIL-1 ve ADAIL-2 olarak tescil ettirilmiştir.

Flowsitometri cihazı ile kromozom sayımı yapılarak haploid bitkilerin belirlenmesi mümkündür. Ancak tohum sayısı göz önüne alındığında oldukça zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Buna karşılık *R1-nj* renk markörü yardımıyla haploidlerin tanımlanması çok daha hızlı, basit ve ucuz bir şekilde yapılabilmektedir (Cerit ve Cengiz, 2022).

Kahrıman vd. (2022), yerel mısır popülasyonundan tane kalitesi bakımından farklılık gösteren homozigot hatlar geliştirmek amacıyla çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada donör materyal olarak 12 farklı yerel mısır çeşidi kullanılmıştır. Bu popülasyonlar, Eylül 2020'de ADAİL-I indirgeyici hattı ile sera koşullarında indirgeme melezine tabi tutulmuştur. Eylül 2021'de sera koşullarında toplam 12 adet haploid hat elde edilmiştir. Elde edilen hatlarda; bitki boyu, ilk koçan yüksekliği, sap çapı, oleik asit içeriği, linoleik asit içeriği, protein içeriği gibi özellikler incelenmiştir. Homozigot hatların bitki boyu değerleri 123 cm ile 250 cm arasında; ilk koçan yüksekliği 54 cm ile 120 cm arasında; gövde çapı 0,7 cm ile 1,2 cm arasında; yağ içeriği %2,39 ile %7,54 arasında; oleik asit içeriği %15,34 ile %30,98 arasında; linoleik asit içeriği %50,4 ile %67,8 arasında; protein içeriği %6,75 ile %13,74 arasında ve zein içeriğinin %4,58 ile %5,04 arasında olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda donör materyallerin haploid indüksiyon oranları (HİO) %6,08 ile %11,71 arasında değiştiği tespit edilmiştir. ADAİL-I indirgeyici hattının ortalama HİO değeri %8,20 olarak belirlenmiştir.

Trentin vd. (2023), haploid indirgeme sistemlerinin etkinliğinin yalnızca yüksek haploid indirgeme oranı için değil, aynı zamanda kaynak tasarrufu içinde önemli olduğunu vurgulamışlardır. Hibritlerin indirgemesi için izole alanlar önerilmektedir. Bununla birlikte, haploid hat üretiminde yüksek HİO, bol polen üretimi ve uzun bitkilerin elde edilmesi indirgeyici hattın özelliklerine bağlıdır. Araştırmacılar tarafından, yedi adet hibrit indirgeyici hat ve ilgili ebeveynlerin üç yıl süresince; haploid indirgeme oranları, bitki ve koçan yüksekliği, tepe püskülü boyutu ve dallanması gibi özellikleri ölçülmüştür. Araştırmacılar hibrit indirgeyicilerin HİO'dan ödün vermeden bitki gücünü iyileştirerek haploid indirgeme için kolaylık ve kaynak kullanım etkinliği sunduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 2.3. (a) Geleneksel kendilenmiş hat gelişimi. Her kendileme neslindeki homozigotluk oranı (%) ve her ilerleme aşamasına ulaşmak için geçen süre, (b) Mısırdaki kendilenmiş haploid hattı gelişimi. Kaynak popülasyonun homozigotluğunun (%) %50 olduğu varsayılmıştır.

CIMMYT (2023)'e göre, indirgeyici hatlar ile başlangıç materyallerinin melezleme işleminden sonra elde edilen koçanlarda 3 farklı kategoride tohum oluşması beklenmektedir. Birinci kategoride renksiz embriyo ve renksiz endosperme sahip tohumlar yer almakta olup, bunlar kontaminasyondan dolayı yabancı toz alma veya kendileme sonucu oluşan haploid olmayan tohumlardır. Bu kategorideki tohumlar çok az bir orana sahiptir. İkinci kategoride mor renkli embriyo ve mor renkli endosperme sahip tohumlar yer almakta olup, bunlar indirgeyici hattın çiçek tozlarının ana bitkilerin

çiçeklerini döllemesi sonucu oluşan tohumlardır ve haploid değildirler. Bu kategorideki tohumlar toplamda en yüksek orana sahip tohumlardır. Üçüncü kategoride ise renksiz embriyo ve mor renkli endosperme sahip tohumlar yer alır ve bunlar indirgeyici hattın ana bitkilerin çiçeklerini döllemesi sırasında ortaya çıkan anormal dölleme sonucu haploid embriyodan parthogenetik olarak oluşan haploid tohumlardır Haploid olarak seçilen tohumların embriyoları $n=10$ kromozoma sahiptir ve bu tohumlardan oluşacak bitkiler fertil değildirler.

Poliploid bitki elde etmek için kullanılan kromozom katlama yöntemleriyle ilgili ilk çalışmalar 1931 yılında başlamış, bu konuda esas çalışmalar ise 1937 yılından sonra "kolkisin" (colchicine) maddesinin bulunmasıyla hızlanmıştır. Kolkisin, güz çiğdemi (*Colchicum autumnale*) bitkisinden elde edilen kuvvetli bir alkaloiddir. Bu maddenin kromozom sayılarını iki katına çıkarması, mitoz bölünme sırasında iğ ipliklerinin geçici bir süre tahrip etmesi ve anafaz hareketinin engellenmesiyle açıklanmaktadır. Böylelikle, hücre bölünmeden kromozomlar bölünmekte ve bölünen kromozomlar aynı hücre içerisinde kalarak kromozom sayısı katlarına çıkmaktadır. Kolkisin maddesi genellikle tohum, kök ve sürgünlere uygulanmaktadır. Uygulamanın süresi ve hazırlanan eriyeğin yoğunluğu, uygulanacak bitkinin türüne ve kullanılacak yönteme bağlı olmaktadır. Tohum ve çimlere genel olarak %0,1-0,4'lük kolkisin uygulanmakta ve bunun süresi 30 dakika ile üç saat arasında değişmektedir. Yoğunluğun %0,05'e inmesi halinde, süre 24 saate kadar çıkabilmektedir (Anonim, 2023).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deneme alanı ve bitki materyali

Bu çalışma; Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde 2019-2021 yılları arasında yürütülmüştür. Çalışmanın yürütüldüğü Bursa ili geçiş iklimi kuşağındadır. Akdeniz ve Karadeniz iklimlerinin özelliklerini taşıyan ilde yaz mevsiminde şiddetli kuraklıklar görülmezken kış mevsimi de çok sert geçmez.

Çalışmanın yürütüldüğü yıllara ait iklim verileri ve uzun yıllar ortalaması Çizelge 3.1'de verilmiştir. Sıcaklıkla ilgili veriler incelendiğinde, tüm yıllarda sıcaklık ortalamasının uzun yıllar ortalamasına benzer olduğu görülmektedir. Toplam yağışla ilgili veriler incelendiğinde tüm yılların yağış değerlerinin uzun yıllar ortalamasının altında kaldığı görülmektedir. Oransal neme ilişkin verilere bakıldığında, denemenin tüm yıllarında ortalama oransal nemin uzun yıllar ortalamasından yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü Bursa İli'nde 2019, 2020, 2021 ve uzun yıllar ortalaması (UYO)'na ait sıcaklık (°C), yağış (mm) ve nem (%) değerleri.

Yıllar	Aylar						Top./Ort.
	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	
	Ortalama Sıcaklık (°C)						
2019	19.3	23.6	23.7	24.4	20.9	17.1	21,5
2020	17.5	21.7	24.8	24.7	23.0	18.4	21,7
2021	18.6	20.9	25.5	25.9	20.3	14.7	21,0
UYO*	18,0	22,5	25,1	25,1	20,8	15,9	21,2
	Toplam Yağış (mm)						
2019	45.9	46.8	27.9	38.5	10.3	28.3	197,7
2020	93.7	40.5	1.3	1.8	6.5	68.7	212,5
2021	14.5	61.7	32.8	0.1	10.9	42.0	162,0
UYO	48,5	42,1	15,1	16,9	50,3	84,2	257,1
	Ortalama Nem (%)						
2019	67.3	68.6	64.6	64.3	63.5	75.4	67,3
2020	68.8	67.9	64.1	62.0	67.3	71.8	67,0
2021	67.1	73.0	66.1	60.6	64.5	72.8	67,4
UYO	66,9	62,7	59,4	61,3	67,4	74,7	65,4

*: UYO: Uzun yıllar ortalaması (1990-2020)

Deneme alanının farklı yerlerinden 0-20 cm derinlikten alınan toprak örneklerinin fiziksel ve kimyasal analizleri Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Toprak Analiz Laboratuvarı'nda yaptırılmış ve sonuçlar Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Çalışmanın yürütüldüğü Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki deneme alanının toprak analiz sonuçları.

% Kum	48,16
% Silt	21,52
% Kil	30,32
Tekstür	Kumlu - Killi - Tın
pH	7,89
EC, $\mu\text{S cm}^{-1}$	779,0
Kireç, %	0,88
Org.madde %	2.016
% N	0.113
Alınabilir P, mg kg^{-1}	12,18
Alınabilir K, g kg^{-1}	0,504

Toprak analiz sonuçlarına göre, deneme alanı toprağı ağır ve orta bünyeli olup organik madde yönünden fakirdir. Tekstür bakımından kumlu-killi-tın gruba girmektedir. Azot içeriğı yeterli seviyede olup, fosfor ve potasyum içeriğı bakımından zengindir.

Çalışmada ticari 32 adet genotip donör ebeveyn kullanılmıştır. Donör ebeveyn olarak kullanılan 32 genotipe ait bazı özellikler Çizelge 3.3'te verilmiştir. Tüm donör genotipleri atdışı tane yapısında olup, renksiz aleuron ve embriyo dokusuna sahiptir. Donör genotiplerin FAO olum grupları 500-750 arasında değişmektedir. Tüm donör genotiplerin çiçeklenme tarihleri belirlenmiştir ve çizelge 3.3'de sunulmuştur. Çalışmada baba ebeveyn olarak Maize Genetics Cooperation-Stock Center (USDA/ARS)'dan temin edilen Stock6 (*Zea mays ssp. mays*) indirgeyici mısır hattı kullanılmıştır. Stock6, *in vivo* maternal haploidlerin üretilmesinde tozlayıcı olarak kullanılmakta ve *A1*, *A2*, *B1*, *C1*, *C2*, *P11* ve *R1-nj* alellerini birlikte içermektedir (MaizeGDB, 2023). Baba ebeveyn olarak kullanılan Stock6 indükleyici hattına ait bitki görünümü Şekil 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Araştırmada kullanılan donör genotiplerin özellikleri.

No	Genotipler	Genotipler	Tane yapısı	Çiçeklenme tarihi (gün)	FAO olum grubu
1	G3	P.2088	Atdışi	70	700
2	G5	FAMOSO	Atdışi	70	700
3	G6	DKC-7240	Atdışi	78	750
4	G8	DKC-6876	Atdışi	70	700
5	G9	DKC-5783	Atdışi	70	500
6	G10	DKC-6761	Atdışi	74	650
7	G12	TK-6063	Atdışi	70	650
8	G13	SABIA	Atdışi	70	700
9	G14	P.31A34	Atdışi	70	700
10	G16	P.3394	Atdışi	74	580
11	G17	KERBANIS	Atdışi	61	550
12	G18	DKC-6441	Atdışi	78	650
13	G19	P.0729	Atdışi	70	550
14	G21	P.1921	Atdışi	61	700
15	G22	P.0937	Atdışi	70	550
16	G24	P.31Y43	Atdışi	70	680
17	G26	DKC-6589	Atdışi	70	700
18	G30	KİLOWAT	Atdışi	70	700
19	G34	SAMADA-07	Atdışi	70	700
20	G35	KONTİGOS	Atdışi	61	600
21	G37	P.1241	Atdışi	70	650
22	G38	SAKARYA	Atdışi	70	700
23	G40	ZP 707	Atdışi	74	700
24	G41	ADA-523	Atdışi	50	700
25	G42	P.32W86	Atdışi	78	550
26	G43	KATONE	Atdışi	50	650
27	G44	AGA	Atdışi	50	700
28	G45	KERMES	Atdışi	78	600
29	G46	HACIBEY	Atdışi	74	650
30	G47	P.1574	Atdışi	70	700
31	G49	P.3167	Atdışi	50	600
32	G51	KOPIAS	Atdışi	70	700

Kromozom katlama uygulaması için kolhisin ve dimetil sülfoksit (C₂H₆OS) kullanılmıştır. K suda çözünür bir alkaloiddir. Dimetil sülfoksit renksiz, sıvı haldedir ve kimyasal reaksiyonlar için çözücü olarak kullanılmaktadır.



(A)

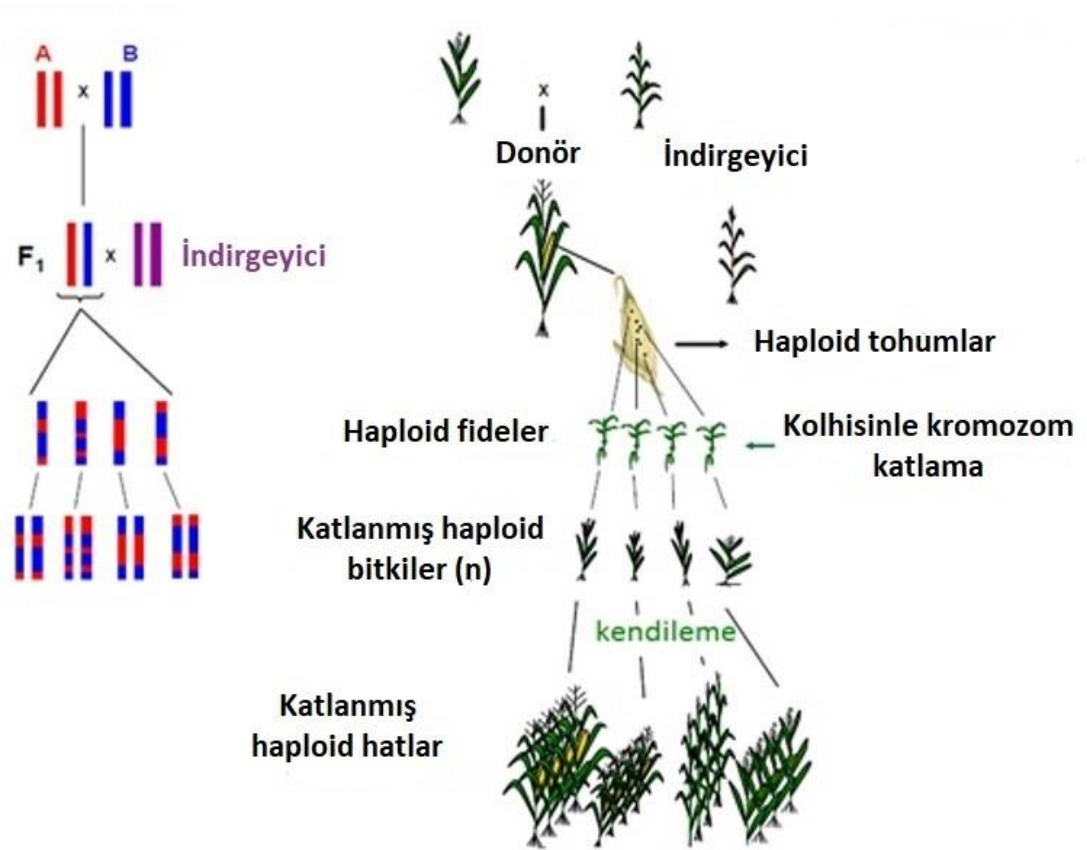


(B)

Şekil 3.1. (A) Stock6 indirgeyici hattının tepe püskülü görünümü. (B) Stock6 indirgeyici hattının bitki görünümü.

3.2. Yöntem

Mısırdaki katlanmış haploid hatları geliştirmek için *in vitro* ya da *in vivo* yöntemler kullanılabilir. Bu tez çalışmasında, KH hatların üretiminde daha güvenilir ve verimli olduğu, ayrıca yaygın olarak kullanıldığı için *in vivo* yöntemi (Chaikam vd., 2019) tercih edilmiştir. Bu teknikte haploidlerin üretilmesi için kaynak genotip, indirgeyici denilen özel bir mısır çeşidiyle tozlanmaktadır (Röber vd., 2005). Baba hat olarak kullanılan indirgeyici mısır çeşidi haploid tanelerin ayırt edilebilmesi için özel bir renk markör özelliğine sahiptir (Geiger, 2009). Oluşan haploid taneler indirgeyici mısır hattının kromozomlarını içermezler. Sadece ana hat olarak kullanılan kaynak materyalin kromozomlarını taşırlar. Bu nedenle kaynak materyaller donör olarak isimlendirilirler (Cengiz, 2016).



Şekil 3.2. Katlanmış haploid hat üretiminin aşamaları (Geiger, 2009)

Şekil 3.2’de bu çalışmada izlenen katlanmış haploid hat üretiminin adımları özetlenmiştir. Çalışmanın ilk yılı indirgeme melezlemeleri yapılmıştır. Elde edilen tohumlardan haploid tohumlar belirlenmiştir. İkinci yıl elde edilen haploid tohumlar çimlendirilmiş ve kromozom katlama uygulaması gerçekleştirilerek katlanmış haploid bitkiler elde edilmiştir. Elde edilen katlanmış haploid bitkilerde katlanmış haploid hat üretimi için kendileme işlemi yapılmıştır. Çalışmanın üçüncü ve son yılında tohum çoğaltımı için katlanmış haploid hatlarda kendileme işlemi yapılmıştır (Chaikam vd., 2019).

3.2.1. Donör ve indirgeyici genotiplerin yetiştirilmesi

Donör ve indirgeyici genotiplerin ekileceği arazi pullukla sürülmüş, ardından rotavatörle işlenerek tohum yatağı hazırlığı tamamlanmıştır. Melezlemede yer alacak olan tüm genotipler; sıra arası 70 cm ve sıra üzeri 20 cm olacak şekilde 5 m uzunluğundaki sıralara 15.06.2019 tarihinde ekilmişlerdir. De La Fuente vd. (2018), yüksek miktarda haploid tohum elde etmek için indirgeyiciler için çoklu ekim tarihlerinin kullanılmasını önermektedirler. Bu amaçla indirgeyici hat 22.06.2019 tarihinde bir kez daha ekilmiştir. Araştırmamızda iki farklı tarihte indirgeyici hattın ekiminin gerçekleştirilmesi uzun bir süre polen alımını sağlamış, dolayısıyla donör ve indirgeyici hat arasında tozlaşma tarihi uyumsuzluğu yaşanmasının önüne geçilmiştir. Her iki tarihte de indirgeyici hattın 6 sıra, toplamda ise 12 sıra ekim yapılmıştır. İndirgeyici hat ekimlerinde her bir ocağa bir tohum bırakılmıştır. Ekimlerle birlikte deneme alanına 15-15-15 taban gübre uygulanmıştır.



Şekil 3.3. Ekim sonrası deneme alanında sulama işlemi

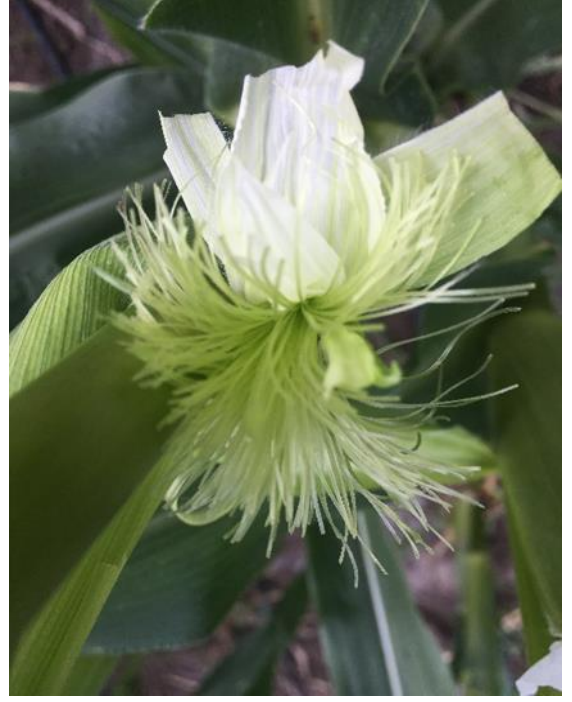
Bitkilerin çimlenmesinden 4-5 yapraklı döneme kadar elle yabancı ot mücadelesi yapılmıştır. Bitkilerin birinci çapası 15-20 cm boylandıkları 4 yapraklı dönemde, ikinci çapa bitki boyları 40-50 cm olduğu 6-8 yapraklı dönemde yapılmıştır. Birinci çapa esnasında her tohum yatağında bir bitki kalacak şekilde tekleme yapılmıştır. Yabancı otlara karşı ayrıca pülverizatörle herbisit uygulanmıştır.

İkinci çapayla birlikte 7 kg/da, tane doldurma dönemi öncesinde ise 8 kg/da azot (%46 üre) verilmiştir. Sulama için her bir sıraya damla sulama sistemi çekilerek sulama yapılmıştır (Şekil 3.3).

Donör genotiplerde koçan taslakları püskül çıkışından önce beyaz izolasyon torbası ile izole edilmiştir. İndirgeyici hatlarda ise tepe püskülü, anterler %50 polen tozu vermeye başladığı zaman izolasyon torbası ile kapatılmıştır. Melezleme işlemi daha fazla tohum tutumunun sağlanması için koçan püskülü görüldükten 2-3 gün sonra elle yapılmıştır (Rotarenco vd., 2002). Her bir donör genotipten seçilen üç adet bitkiye Stock6 indirgeyici hattından alınan polenler verilmiştir (Şekil 3.4).



A



B



C



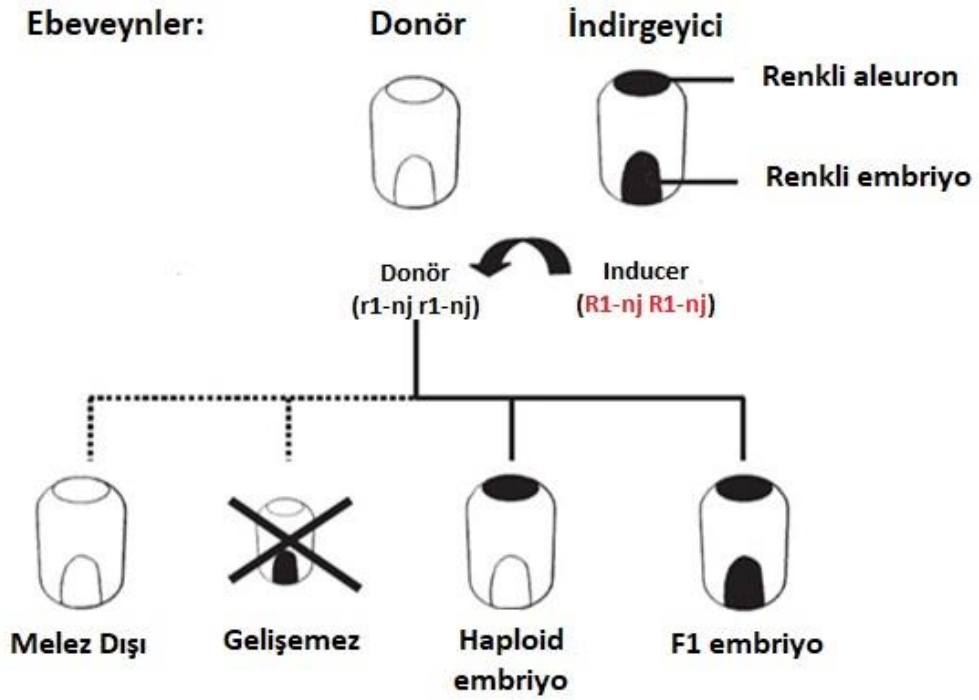
D

Şekil 3.4. (A) Melezleme öncesi donör ebeveynler, (B) Polen verilmeden önce donör genotipe ait koçan püskülü, (C) Donör genotip koçanının Stock6 indirgeyici hattın polen tozuyla döllenmesi, (D) Melezleme işlemi tamamlanmış olan bir donör genotip koçanının izolasyon torbası ile izole edilmesi.

Çalışmanın ilk yılı her bir genotipin çiçeklenme tarihleri belirlenmiştir. Zamanla taneye yapraklardan fotosentez asimilantlarını taşıyan iletim demetleri fizyolojik olarak yaşlanır ve ölümler (apoptosis = programlanmış hücre ölümü). Taneler koçandaki dişi çiçeğe sap (pedicel) ile bağlıdırlar. Sap ile iletim demetleri arasında karbon birikimi meydana gelir ve birikmiş karbon siyahlaşarak bir tabaka meydana getirir. Siyah tabaka oluşumu ilk olarak koçanın uç kısımlarındaki tanelerden başlar daha sonra koçanın orta kısmındaki tanelerde ve en son dip kısımlarındaki tanelerde oluşur. Koçanda tanelerin en az %75'inde siyah tabaka oluşumunun gözlemlenmesi, fizyolojik olum dönemine girildiğinin işaretidir. Tanenin hem süt çizgisinde hem de koçana bağlandığı dip ucunda siyah tabaka oluşumu olup olmadığına bakılır. R6 dönemi 4 ila 7 gün sürmekte, tane bu dönemde maksimum kuru madde ağırlığına ulaşmaktadır. Fizyolojik olgunluğa ulaşma tanenin gelişimini tamamlaması anlamına gelmektedir (Nielsen, 2023). Tez çalışmasında hasat için fizyolojik olum dönemi takip edilmiştir. Fizyolojik olum dönemine (R6) erişen bitkilerde 08.11.2019 tarihinde elle hasat yapılmıştır.

3.2.2. Haploidlerin tanımlanması

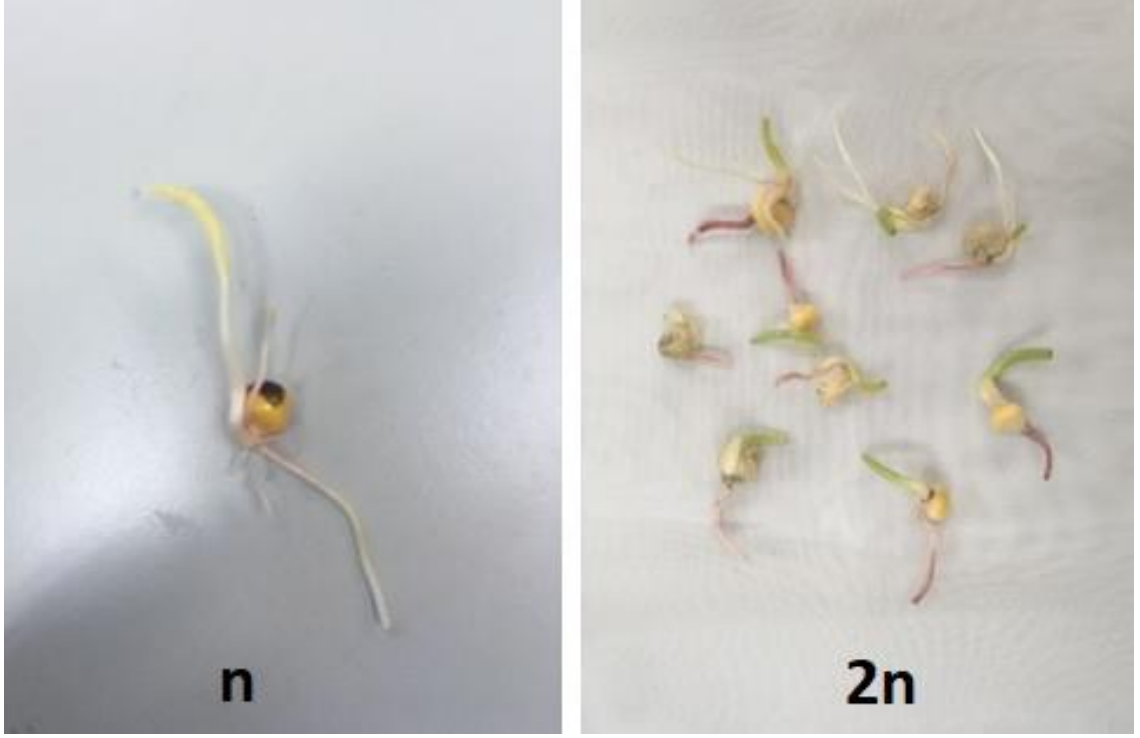
En etkili haploid tanımlayıcı markör, dominant kırmızı tane rengi geni *R1-nj* (*R-navajo*)'dir. *R1-nj* geni (*A1* ya da *A2* ve *C2* geni ile birlikte), aleuron (endosperm parçası) ve scutellum (embriyo parçası)'da derin renklenmeye sebep olur. Renklenme, donör ve indirgeyici hattın genetik geçmişine bağlı olarak kapsam ve yoğunluk bakımından değişebilir. *P11* (*Mor 1*) ve *B1* (*Booster 1*), bitki dokusunda (koleoptil ve kök) güneş ışığından bağımsız mor renklenmeye sebep olan iki alleldir. Kuru tohum aşamasında *R1-nj*'nin scutellumda zayıf bir renklenme göstermesi yanlış tanımlanan haploid tohumlara sebebiyet verebilmektedir. (Geiger ve Gordillo, 2009). *B1* ve *P11* allellerinin kökte veya gövdede oluşturduğu renklenme sayesinde, haploid tohumların çimlendirildikten sonra daha etkili bir ayrımı yapılabilir (Coe ve Sarkar, 1964; Rotarencu vd., 2010).



Şekil 3.5. Haploid indirgeme melezlerinden kaynaklanan haploid embriyolu taneleri tanımlamak için $R1-nj$ haploid tanımlayıcı markörünün kullanımı (Geiger, 2009).

Mezlemelerden sonra oluşan tohumların içinden haploid tanelerin tanımlanması, antosiyanin markör geni $R1-nj$ (Chase, 1969) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. İndirgeme mezlemesi sonucunda belli bir oranda normal F1 taneleri, haploid embriyo ve triploid endosperm oluşmaktadır. F1 tanelerinde hem endosperm hem embriyoda renklenme vardır. Haploid taneler ise renkli endosperm ve renksiz embriyo dokusuna sahiptir (Geiger, 2009). Hasat edilen tohumlar üzerinde $R1-nj$ renk markörü dikkate alınarak her bir genotipin tohumları kategorize edilmiştir (Şekil 3.5).

$R1-nj$ aynı zamanda ek renk genleri $B1$ ve $P11$ ile bağlantılı olarak, koleoptil ve kökte renklenme sağladığından haploid tohumların nihai tanımlanması, çalışmanın ikinci yılı tohumlar çimlendirildikten sonra kök renkliliğine göre yapılmıştır (Geiger, 2009). Renkli (mor) kök ve gövdeye sahip olanlar diploid olarak, herhangi bir renklenmeye sahip olmayanlar haploid olarak kabul edilmiştir (Coe ve Sarkar, 1964; Rotarencu vd., 2010).



Şekil 3.6. Çimlendirme sonrası haploid (n) ve diploid (2n) tohumların kök renkliliğine göre seçilmesi (Rotarencó vd., 2010).

3.2.3. Haploid indirgeme oranının (HİO) hesaplanması

İn vivo maternal haploid yönteminde indirgeme melezlemesinden sonra pratikte 4 farklı kategoride tohum oluşmaktadır;

1. Haploid Tohumlar: Endospermi renkli, embriyosu renksiz olan tohumlar,
2. Diploid Tohumlar (F1): Hem endosperm hem de embriyosunda renklenme olan tohumlar,
3. Tıpdışı Tohumlar: Embriyosu renkli, endospermi renksiz olan tohumlar ve
4. Melez Dışı Tohumlar: Melezleme sırasında istenmeden donörün kendi polen tozunu alması veya dışarıdan başka bir renksiz donörden polen alması sonucu oluşan ve herhangi bir renklenmeye sahip olmayan tohumlar olarak kategorize edilmiştir (Şekil 3.5) (Geiger, 2009; Cengiz, 2016).

R1-nj renk markörü dikkate alınarak çalışmanın ilk yılı hasat edilen her bir genotipin tohumları 4 farklı kategoriye göre ayrıldıktan sonra her bir kategorinin tohum sayıları belirlenmiştir. Tohum sayıları belirlenen her bir genotipin haploid indirgeme oranı (HİO) ve kromozom katlama oranları (KKO) aşağıdaki formülere göre hesaplanmıştır.

HİO = (Haploid olduğu varsayılan tohum sayısı/Koçandaki toplam tohum sayısı) x 100 (Dong vd., 2013; Trentin vd., 2023).

KKO = (Fertil bitki sayısı / Kolhisin uygulanan bitki sayısı) x 100 (Zararsız vd., 2019)

3.2.4. Yapay kromozom katlaması

Kromozom katlaması, katlanmış haploid üretiminde gerekli bir işlemdir. Diploid bitkiler hücrelerinde her bir kromozomun iki kopyasını içerirler. Bu iki kromozomun bir kopyası erkek ebeveynden, diğeri dişi ebeveynden alınır. Haploid bitkiler, hücrelerinde her bir kromozomun yalnızca bir kopyasını içerirler. *In vivo* maternal indirgemeyle üretilen haploidler, yalnızca dişi ebeveynden gelen kromozomları içermektedirler. Haploid bitkilerin üreme yapılarında homolog kromozom çiftleri oluşamadığı için mayotik hücre bölünmeleri ilerleyememekte, bunun sonucunda erkek ve dişi gametik hücreler üretilmemektedir. Yani haploid bitkiler genellikle kısırdır. Kromozom katlamasının amacı, bir haploidden (n) double haploid (2n) bitki üreterek haploid bitkilerde fertilitiyi elde etmektir. Bu sayede katlanmış haploid bitkilerde kendileme işlemi yapılarak katlanmış haploid hatların üretimi yapılabilmektedir. Kromozom katlaması için yaygın olarak kullanılan kimyasal kolhisindir. Kolhisin varlığında kromozom katlaması interfaz safhasında normal olarak meydana gelir. Kolhisin mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller. Anafaz sırasında, iki kardeş kromatidlerin katlanmış kromozomları ayırır, ancak hücrenin farklı kutuplarına taşınamaz, bunun yerine hücrenin merkezinde kalırlar. Telofazda ise çekirdek membranı ayrılmamış kromozom etrafında oluşturulur. Böylece mitoz bölünme çift kromozomlu bir hücre ile sonuçlanır (Chaikam ve Mahuku, 2012).

3.2.4.1. Yapay kromozom katlama uygulamasının basamakları

Tohum çimlendirme ve fidelerin kolhisin muamelesine hazırlanması için gerekli ekipmanlar;

- Çimlendirme kâğıdı
- Plastik tank
- İklim kabini
- Tül torbalar
- Alüminyum folyo
- Etiketler
- Bistüri
- Hassas terazi
- Ölçme silindirleri: 5.000 ml; 1.000 ml; 500 ml; 100 ml
- Pipetler: 1.000 mikrolitre; 200 mikrolitre; 100 mikrolitre
- Koruyucu kıyafetler
- Eldiven ve maskeler

Kimyasal uygulamalar için;

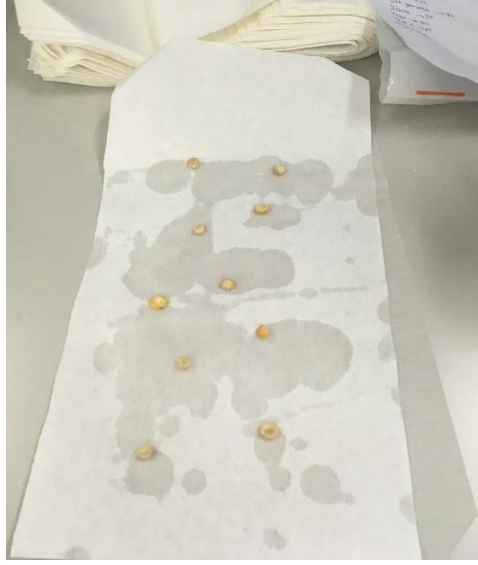
- Kolhisin (Sigma-C9754 powder)
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Sodyum hipoklorit (NaClO)

Kromozom katlama uygulaması Chaikam & Mahuku (2012)'e göre yapılmıştır. Aşamalar; tohum çimlendirme, kolhisin muamelesi, fidelerin plastik kaplara alınması, fidelerin seraya aktarılması, bitkilerin tarlaya dikiminden oluşmaktadır. Tüm aşamalar sırasıyla detaylı olarak aşağıda açıklanmıştır.

Tohum çimlendirme;

- Çimlendirme kağıtları kontaminasyonu önlemek için %0,05 çamaşır suyu çözeltisi ile nemlendirilmiştir,
- Her bir genotipten haploid kabul edilen belirli miktarda tohum düzgün bir şekilde çimlendirme kağıdının üzerine dizilmiştir (Çizelge 4.2),

- İki adet çimlendirme kâğıdı kullanılarak biri diğerinin üstüne örtülmüş ve çimlendirme kağıtları rulo haline getirilmiştir. Daha sonra saf su ile ıslatılmıştır,
- Rulolar çimlenmenin sağlanması için 23 °C sıcaklığa ayarlanmış iklim kabiniinde 72 saat bekletilmiştir.
- Çimlenme gerçekleşene kadar kurutma kâğıtları saf su ile ıslatılmaya devam edilmiştir.



A



B

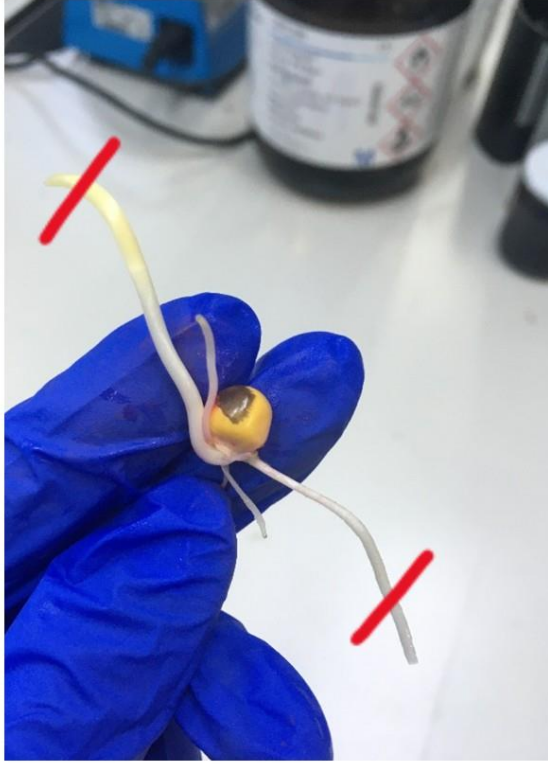
Şekil 3.7. (A) Çimlendirme kâğıdı üzerine yayılmış haploid tohumlar, **(B)** İklim kabinine yerleştirilmiş materyaller

Fidelerin hazırlanması;

- 72 saat sonra fideler kolhisin muamelesi için ideal olan 3-5 cm kök ve yaklaşık 2 cm koleoptil boyuna erişmiştir,
- Kolhisin muamelesinden önce kolhisinin daha iyi nüfus etmesi için koleoptil ve kök uçlarından yaklaşık olarak 1 cm olacak şekilde steril bistüri yardımıyla kesilmiştir (Zabirova vd., 1996; Deimling vd., 1997)
- Aynı popülasyondan gelen kesilmiş fideler aynı tül torbalara yerleştirilmiştir,
- Kolhisin muamele tankına konmadan önce fideler birkaç saat saf suda bekletilmiştir.

Kolhisin muamelesi;

- Kolhisin muamelesi için %0,06 kolhisin ve kolhisinin daha iyi nüfus etmesi için %0,5 dimetil sülfoksit (DMSO) olacak şekilde solüsyon hazırlanmıştır (Gayen vd., 1994; Zabirova vd., 1996). İki litre solüsyon için 1200 mg kolhisin, 10 ml dimetil sülfoksit ve 1990 ml saf su kullanılmıştır.
- Kolhisin tozu hassas terazide tartılmış ve su içinde çözündürülmüştür.
- Fideler dikkatli bir şekilde çözeltiye yerleştirilmiş ve yöntemin daha etkili olması için plastik tank alüminyum folyo ile kaplanarak karanlık ortam sağlanmış ve iklimlendirme kabinine yerleştirilerek 12 saat 18 °C'de bekletilmiştir (Deimling vd., 1997).



(A)

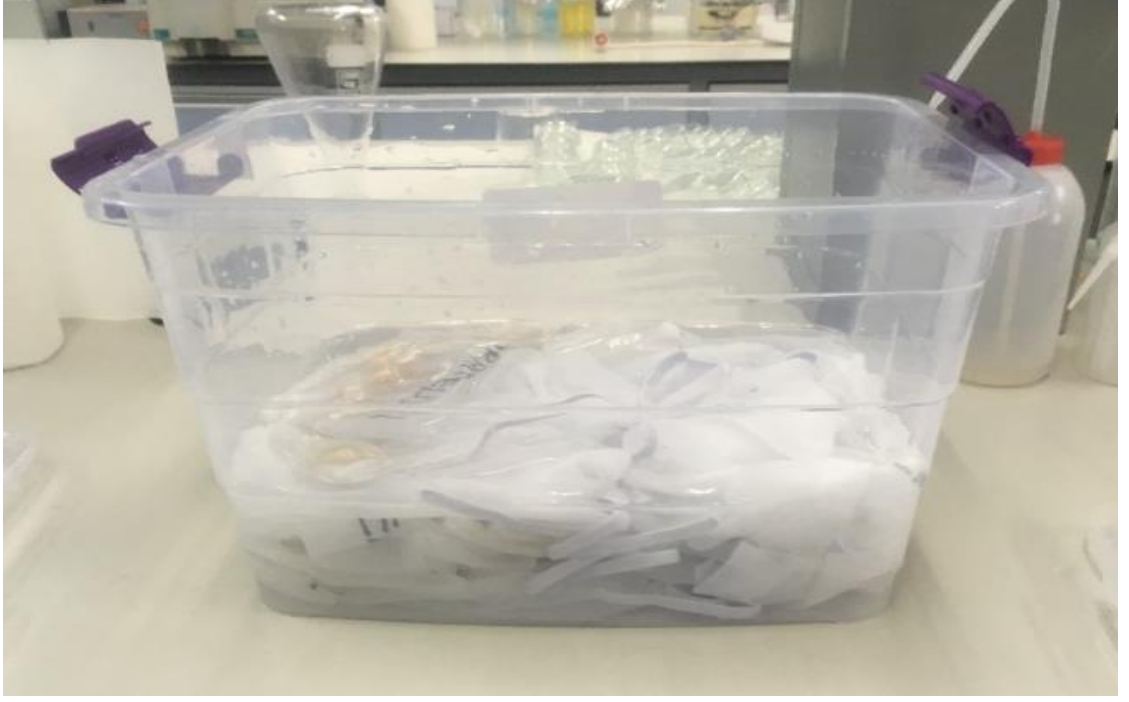


(B)



(C)

Şekil 3.8. (A) Haploid fidenin kök ve sürgün uçlarından kesilerek kolhisin muamelesi için hazırlanması, (B), (C) Kolhisin muamelesi öncesi farklı genotiplere ait fidelerin ayrı ayrı tül torbalara yerleştirilmesi



(A)



(B)

Şekil 3.9. (A) Tül torbaların kolhisin solüsyonu ile dolu plastik tanka yerleştirilmesi, (B) Plastik tankın iklim kabinine yerleştirilmesi

Fidelerin seraya aktarılması;

- 12 saat sonunda tank boşaltılmış ve fideler akan su altında dikkatlice yıkanmıştır.
- Kolhisin muamelesinden dolayı çok kırılğan halde olan fidelerin plastik kaplara dikimi dikkatli bir şekilde gerçekleştirilmiştir.
- Fidelerin sulama suyuna 15-15-15 içerikli gübre ilave edilmiştir.
- Fideler serada 3-4 yapraklı aşamaya kadar büyütülmüştür (Geiger, 2009).



Şekil 3.10. Serada 3-4 yapraklı evreye kadar yetiştirilmek üzere plastik kaplara dikkatli bir şekilde dikimi yapılmış katlanmış haploid bitkiler

3.2.5. Katlanmış haploid bitkilerin (KH0) yetiştirilmesi ve kendileme işlemi

Fidelerin yetiştirileceği tarla diskaro ve rotavatör aletleriyle işlenmiştir. Dikimle birlikte dekara 50 kg 15-15-15 kompoze gübre verilmiştir. Dikim öncesi fide çukurları açılmış ve bitki materyallerinin 08.07.2020 tarihinde tarlaya dikimi yapılmıştır. Haploid bitkiler darbelere karşı hala çok hassas olduklarından kırılabilirler. Bu nedenle araziye nakil ve dikim sırasında bitki kayıplarını önlemek için özen gösterilmiştir.



(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 3.11. (A) Fidelerin araziye aktarılması, (B) Dikime hazır bir katlanmış haploid hat, (C) Katlanmış haploid fidelerinin tarlaya dikilmesi, (D) Dikim sonrası fidelerin tarladaki görünüşleri

Damla sulama boruları her sıraya çekilmiş ve düzenli olarak sulama yapılmıştır. Birinci çapayla birlikte dekara 20 kg olacak şekilde üre gübresi uygulanmıştır. Yabancı otlar ile mücadele el çapası yapılarak gerçekleştirilmiştir.

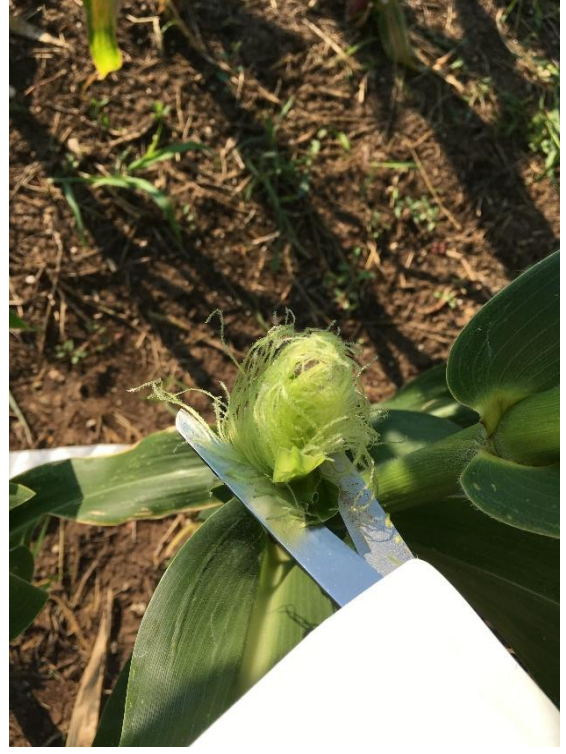


Şekil 3.12. Katlanmış haploid bitkilerde çapalama işlemi

Toz verme aşamasına gelmiş olan katlanmış haploid bitkilerde kendileme işlemine başlanmıştır. Koçan taslağı çıkışı öncesi izolasyon kağıtları ile koçan taslakları izole edilmiştir. Tepe püskülü anterleri ana eksende %50 toz vermeye başladığı zaman izolasyon torbası ile kapatılmıştır. Kendileme işlemi yapılırken bir bitkiden diğer bitkiye geçişte polen bulaşmasını önlemek için eller ve kullanılan gereçler %70'lik etil alkol (Ek-A) ile steril edilmiştir. Polenlerin püskül tepesi üzerine üniform dağılarak döllenmenin eşzamanlı olmasının sağlanması için kendilemeden 2-3 gün önce koçan püskülleri koçan ucunun 2 cm üzerinden makas yardımıyla kesilmiştir. 2-3 gün sonra tepe püskülü izolasyon torbası içerisinde biriken polenler hızlı bir şekilde koçan üzerine dökülmüş ve yeniden izole edilerek kendileme işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.13).



(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 3.13. (A, B, C, D) Katlanmış haploid bitkilerde kendileme işlemi

KH0 aşamasında; arazide canlı kalan bitki yüzdesi, canlı kalanlardan fertil bitki yüzdesi, kendileme yapılabilen bitki yüzdesi, kendilenen bitkilerden tohum alınabilme yüzdeleri belirlenmiştir. Katlanmış haploid bitkilerin hasadı tanede fizyolojik olum tamamlandığında gerçekleştirilmiştir. Her bir bitki bir mısır hattını temsil ettiğinden hasat sırasında her bir bitkinin koçanları ayrı ayrı file torbalara konularak etiketleri yazılmıştır. Hasat edilen koçan ve tane sayıları belirlenmiştir.

3.2.6. Kendilenen katlanmış haploid hatların (KH1) yetiştirilmesi ve tohum çoğaltımı

Çalışmanın üçüncü yılında genotiplerin tohum çoğaltımı ve morfolojik özellikler bakımından karakterizasyonunun yapılması için 27.05.2021 tarihinde ekilmişlerdir. Katlanmış haploid hatlarda tohum çoğaltımı kendileme yapılarak sağlanmıştır.



Şekil 3.14. Kendilenen katlanmış haploid (KH1) hatların görünümü

3.2.7. Kendilenen katlanmış haploid (KH1) hatlarda alınan ölçüm ve gözlemler

Katlanmış haploid hatlarda UPOV (Yeni Bitki Çeşitlerinin Korunması Uluslararası Birliği) prensipleri dikkate alınarak, mısır özellik belgesindeki her bir karakter için en uygun dönemde ölçüm ve gözlemleri yapılmıştır. Çizelge 3.4'te UPOV özellik belgesinde yer alan 34 özellik ve değerlendirme kriterleri sunulmuştur (UPOV, 2023).

Çizelge 3.4. Kendilenen katlanmış haploid hatlarda (KH1) alınan ölçüm ve gözlemler.

Özellikler	Gözlem Dönemi	Değerlendirme
1. İlk yaprak: Yaprak kımında antosiyanin renkliliği	İki yapraklı dönemde	Yok veya çok az: 1 Az: 3 Orta: 5 Koyu: 7 Çok koyu: 9
2. İlk yaprak: Yaprak ucu şekli	Dört yapraklı dönemde	Sivri:1 Sivri-yuvarlak: 3 Yuvarlak: 5 Yuvarlak-kaşık: 7 Kaşık: 9
3. Yaprak: Gövde ile yaprak arasındaki açı (Sadece üst koçanın üzerindeki yaprak)	Anterlerin oluşmaya başlama zamanı	Çok dar (<5°): 1 Dar (5°-50°): 3 Orta (50°-75°): 5 Geniş (75°-90°): 7 Çok geniş (>90°): 9
4. Yaprak: Yaprak ayası duruşu (Sadece üst koçanın üzerindeki yaprak)	Anterlerin oluşmaya başlama zamanı	Düz: 1 Hafifçe aşağı doğru: 3 Aşağı doğru: 5 Kuvvetlice aşağı doğru: 7 Çok kuvvetli aşağı doğru: 9
5. Gövde: Gövdedeki boğumdan boğuma zigzag derecesi	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Yok veya çok az: 1 Hafif: 2 Kuvvetli: 3
6. Gövde: Destek köklerde antosiyanin renkliliği	Anterlerin %50'si oluştuğunda-Süt olum zamanı	Yok veya çok az: 1 Az: 3 Orta: 5 Kuvvetli: 7 Çok kuvvetli: 9

Çizelge 3.4. Katlanmış haploid hatlarda UPOV özellik belgesindeki 34 özelliğe göre alınan ölçüm ve gözlemler (devam)

<p>7. Tepe püskülü: Tepe püskülü çıkış zamanı (Bitkilerin %50'sinde)</p>	<p>Anterlerin %50'si oluştuğunda</p>	<p>Çok erken (<45): 1 Çok erken-erken (45-50): 2 Erken (51-55): 3 Erken-orta (56-60): 4 Orta (61-65): 5 Orta-geç (66-70): 6 Geç (71-75): 7 Geç-çok geç (76-80): 8 Çok geç (>80): 9</p>
<p>8. Tepe püskülü: Tepe püskülü kavuzu tabanındaki antosiyanin renkliliği (Ana eksenin ortadaki 1/3 'ünde)</p>	<p>Anterlerin %50'si oluştuğunda</p>	<p>Yok veya çok az: 1 Az: 3 Orta: 5 Kuvvetli: 7 Çok kuvvetli: 9</p>
<p>9. Tepe püskülü: Tepe püskülü kavuzlarında antosiyanin renkliliği (Ana eksenin ortadaki 1/3 'ünde)</p>	<p>Anterlerin %50'si oluştuğunda</p>	<p>Yok veya çok az: 1 Az: 3 Orta: 5 Kuvvetli: 7 Çok kuvvetli: 9</p>
<p>10. Tepe püskülü: Anterlerde antosiyanin renkliliği (Ana eksenin ortadaki 1/3 'ünde)</p>	<p>Anterlerin %50'si oluştuğunda</p>	<p>Yok veya çok az: 1 Az: 3 Orta: 5 Kuvvetli: 7 Çok kuvvetli: 9</p>
<p>11. Tepe püskülü: Başakçık yoğunluğu (Ana eksenin ortadaki 1/3 'ünde)</p>	<p>Anterlerin %50'si oluştuğunda</p>	<p>Seyrek: 3 Orta: 5 Yoğun: 7</p>
<p>12. Tepe püskülü: Ana eksen ile yan dallar arasındaki açı (püskülün dipten itibaren 1/3'ünde)</p>	<p>Anterlerin %50'si oluştuğunda</p>	<p>Çok dar (<5°): 1 Dar (5°-50°): 3 Orta (50°-75°): 5 Geniş (75°-90°): 7 Çok geniş (>90°): 9</p>
<p>13. Tepe püskülü: Yan dalların duruşu (12.kriterdeki gibi)</p>	<p>Anterlerin %50'si oluştuğunda</p>	<p>Düz: 1 Hafif aşağı doğru: 3 Aşağı doğru: 5 Kuvvetlice aşağı doğru: 7 Çok kuvvetli aşağı doğru: 9</p>
<p>14. Tepe püskülü: İlk yan dal sayısı</p>	<p>Anterlerin %50'si oluştuğunda</p>	<p>Yok veya çok az (0-3): 1 Az (4-10): 3 Orta (11-15): 5 Fazla (16-20): 7 Çok fazla (>20): 9</p>

Çizelge 3.4. Katlanmış haploid hatlarda UPOV özellik belgesindeki 34 özelliğe göre alınan ölçüm ve gözlemler (devam)

15. Koçan: Püskül çıkış zamanı (Bitkilerin %50'si)	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Çok erken (<45): 1 Çok erken-erken (45-52): 2 Erken (53-57): 3 Erken-orta (58-62): 4 Orta (63-67): 5 Orta-geç (68-72): 6 Geç (73-77): 7 Geç-çok geç (78-82): 8 Çok geç (>83): 9
16. Koçan: Püskül antosiyanin renkliliği	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Yok: 1 Var: 9
17. Koçan: Püskülde antosiyanin yoğunluğu	Anterlerin %50'si oluştuğunda	Çok zayıf: 1 Zayıf: 3 Orta: 5 Kuvvetli: 7 Çok kuvvetli: 9
18. Yaprak: Yaprak kınındaki antosiyanin renkliliği (Bitkinin orta kısmında)	Koçanda daneler sulu iken	Yok veya çok zayıf: 1 Zayıf: 3 Orta: 5 Kuvvetli: 7 Çok kuvvetli: 9
19. Tepe püskülü: En alt yan daldan itibaren eksen uzunluğu	Koçanda daneler sulu iken	Çok kısa (<30 cm): 1 Kısa (30-35 cm): 3 Orta (36-40 cm): 5 Uzun (41-45 cm): 7 Çok uzun (>45 cm): 9
20. Tepe püskülü: En üst yan daldan itibaren eksen uzunluğu	Koçanda daneler sulu iken	Çok kısa (<20 cm): 1 Kısa (20-25 cm): 3 Orta (26-30 cm): 5 Uzun (31-35 cm): 7 Çok uzun (>35 cm): 9
21. Tepe püskülü: Yan dalların uzunluğu	Koçanda daneler sulu iken	Çok kısa (<15 cm): 1 Kısa (15-20 cm): 3 Orta (21-25 cm): 5 Uzun (26-30 cm): 7 Çok uzun (>30 cm): 9
22. Bitki: Boyu (tepe püskülü dahil) (Sadece saf hatlar için)	Süt olum zamanı	Çok kısa (120 cm): 1 Kısa (120-160 cm): 3 Orta (160-200 cm): 5 Uzun (200-240 cm): 7 Çok uzun (>240 cm): 9

Çizelge 3.4. Katlanmış haploid hatlarda UPOV özellik belgesindeki 34 özelliğe göre alınan ölçüm ve gözlemler (devam)

23. Bitki: Üst koçanın bitkiye bağlandığı yerin bitkinin toplam yüksekliğine oranı	Süt olum zamanı	Çok küçük (<0.30): 1 Küçük (0.31-0.40): 3 Orta (0.41-0.50): 5 Büyük (0.51-0.60): 7 Çok büyük (>0.60): 9
24. Yaprak: Yaprak ayası genişliği (üst koçan için)	Süt olum zamanı	Çok dar (<5 cm): 1 Dar (6-8 cm): 3 Orta (9-11 cm): 5 Geniş (12-14 cm): 7 Çok geniş (>14 cm): 9
25. Koçan: Sap uzunluğu	Tane yumuşak hamurumsu iken	Çok kısa (<3 cm): 1 Kısa (4-6 cm): 3 Orta (7-9 cm): 5 Uzun (10-12 cm): 7 Çok uzun (>12 cm): 9
26. Koçan: Koçan uzunluğu (koçan kavuzu hariç)	Tanelerin tam olumu	Çok kısa (<15 cm): 1 Kısa (16-19 cm): 3 Orta (20-23 cm): 5 Uzun (24-27 cm): 7 Çok uzun (>27 cm): 9
27. Koçan: Koçan çapı (orta kısımda)	Tanelerin tam olumu	Çok küçük (<4 cm): 1 Küçük (4.1-5 cm): 3 Orta (5.1-6): 5 Geniş (6.1-7): 7 Çok geniş (>7): 9
28. Koçan: Koçan şekli	Tanelerin tam olumu	Konik: 1 Konik-silindirik: 2 Silindirik: 3
29. Koçan: Koçandaki sıra sayısı	Tanelerin tam olumu	Çok az (<10): 1 Az (10-12): 3 Orta (13-14): 5 Fazla (15-16): 7 Çok fazla (>16): 9
30. Koçan: Tane tipi (Koçan ortası 1/3'lük kısımda)	Tanelerin tam olumu	Sert: 1 Sert gibi: 2 Orta: 3 At dişi gibi: 4 At dişi: 5 Tatlı: 6 Cin mısır: 7

Çizelge 3.4. Katlanmış haploid hatlarda UPOV özellik belgesindeki 34 özelliğe göre alınan ölçüm ve gözlemler (devam)

31. Koçan: Tane ucu rengi	Tanelerin tam olumu	Beyaz: 1 Sarımsı beyaz: 2 Sarı: 3 Sarı-portakal: 4 Portakal: 5 Kırmızı-portakal: 6 Kırmızı: 7 Koyu kırmızı: 8 Mavi siyah: 9
32. Koçan: Tane sırt rengi	Tanelerin tam olumu	Beyaz: 1 Sarımsı beyaz: 2 Sarı: 3 Sarı-portakal: 4 Portakal: 5 Kırmızı-portakal: 6 Kırmızı: 7 Koyu kırmızı: 8 Mavi siyah: 9
33. Koçan: Somakta antosiyanin renkliliği	Taneler seyrek ve gevşek iken	Yok: 1 Var: 9
34. Koçan: Somakta antosiyanin yoğunluğu	Taneler seyrek ve gevşek iken	Çok zayıf: 1 Zayıf: 3 Orta: 5 Kuvvetli: 7 Çok kuvvetli: 9

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Haploid bitkilerin elde edilmesi amacıyla 32 adet donör genotipin Stock6 indirgeyici hattı ile melezlenmesi sonucunda 81 adet koçan elde edilmiştir. Melezleme sonucu oluşan bazı koçanların görünüşleri Şekil 4.1.'de sunulmuştur.

RI-nj renk markörü tohumların endosperm ve embriyo dokusu üzerinde renklenmeye neden olmaktadır. Araştırmada *RI-nj* renk markörünün yoğunluğu ve şekli genotipten genotipe varyasyon göstermiştir. Bazı genotiplerde endospermin taç kısmında sadece küçük bir nokta şeklinde renklenme gözlemlenirken (Şekil 4.1. C), bazı genotiplerde endospermin taç kısmını kaplayan belirgin bir renklenme gözlemlenmiştir (Şekil 4.2. A). Renklenme koyuluğu ise açıktan çok koyuya doğru çeşitlilik göstermiştir. Geiger (2009), renklenmenin donör ve indirgeyicinin genetik geçmişine bağlı olarak kapsam ve yoğunluk bakımından değişebileceğini bildirmiştir. İndirgeme melezlerinde haploidleri tanımlamaya yönelik; moleküler markörler (Belicuas vd., 2007), flowsitometri (Couto vd, 2013), fenotipik markörler (*RI-nj*) (Nanda ve Chase, 1966), tohum yağ içeriği (Melchinger vd., 2013), kırmızı kök markörleri (Chaikam vd., 2016), mor kın (Prigge vd., 2012; Röber vd., 2005) ve fide özellikleri (Chaikam vd., 2017) gibi çeşitli teknikler mevcuttur. Ancak *RI-nj* renk markörü, haploidlerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmakta ve dünya çapındaki tüm haploid indirgeyicilerde bulunmaktadır (Prasanna vd., 2012; Chaikam vd., 2019).

Katlanmış haploid tekniğinin başarılı olması; donörün renksiz tohumlara sahip olmasına, indirgeyici hattın *RI-nj* için homozigot olmasına ve tercihen baskın renk genlerine (*A1* veya *A2* ve *C2*) bağlıdır. *RI-nj* renk markörünün tohum seleksiyonunda bazı kısıtlamalarının olduğu bildirilmektedir. Donör genomu *C1-I*, *C2-Idf* ve *In1-D* gibi baskın antosiyanin inhibitör genleri bakımından homozigotsa *RI-nj*'nin renk oluşturmasını engellemektedir. Bu alleller sert, subtropikal, tropikal ve şeker mısır gruplarında yüksek oranda bulunmaktadır (Röber vd., 2005; Geiger, 2009). Çalışmada kullanılan tüm donör genotipleri atdışi tane tipinde olduğundan indirgeme melezlemeleri sonucu oluşan tüm koçanlarda *RI-nj* renk markörünün sebep olduğu renk gözlenmiştir.



A



B



C



D

Şekil 4.1. (A, B, C, D) *R1-nj* renk markörüne sahip indirgeyici Stock6 hattı ile donör genotiplerin indirgeme melezlemesi sonucu oluşan koçanları

Elde edilen tohumlar *RI-nj* renk markör sistemine göre kategorize edilmiştir. Renkli bir endosperm ve renksiz bir embriyoya sahip olan tohumlar haploid olarak sınıflandırılmıştır. Hem embriyo hem de endospermde renklenme olan tohumlar F₁ olarak, embriyosunda renklenme olup renksiz bir endosperme sahip olan tohumlar ise tip dışı olarak seçilmiştir. İstenmeden kendileme veya kendi soyu dışında dışarıdan polen alma sonucu oluşan tohumlarda belirlenmiş ve melez dışı olarak kategorize edilmiştir. Bu tohumlar renksiz bir embriyo ve endosperme sahip olmalarından selekte edilmişlerdir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Melezlemelerden elde edilen farklı kategorideki tohumlar

Haploid tohum seçiminin doğruluğu, haploid tanımlamasında markör olarak kullanılan embriyo ve endosperm üzerindeki *RI-nj* renklenmesini iyi kavrayan araştırmacılara bağlıdır (Cengiz, 2016). Cengiz ve Korkut (2020), tohumları selekte eden araştırmacıların tecrübeli olmasını, yüksek ışık altında çalışılmasını ve 4 saatten fazla tohum seçiminin yapılmamasını önermişlerdir. Araştırmamızda ise tohum seçimleri yüksek ışık altında ve 2 saati geçmeyecek şekilde yapılmıştır.

Çizelge 4.1'de indirgeme melezlemesi sonucu oluşan haploid, F₁, tip dışı ve melez dışı tohum sayıları sunulmuştur.

Çizelge 4.1. İndirgeme melezlemesi sonucu oluşan koçan sayıları ve haploid, F1, tip dışı ve melez dışı tohum sayıları (adet).

Genotipler	Koçan sayıları	Haploid tohum	F1	Tip dışı	Melez dışı	Toplam
G3	3	10	389	30	265	694
G5	3	2	656	20	278	956
G6	3	16	411	12	101	540
G8	2	17	407	7	112	543
G9	2	4	105	5	31	145
G10	2	10	213	3	53	279
G12	3	15	1051	114	208	1388
G13	3	46	977	7	405	1435
G14	3	12	936	52	321	1321
G16	2	9	150	2	108	269
G17	3	19	571	27	395	1012
G18	2	3	504	4	173	684
G19	3	19	1200	32	497	1748
G21	3	51	871	76	564	1562
G22	2	25	409	42	280	756
G24	2	10	573	9	232	824
G26	2	1	440	2	157	600
G30	3	6	683	35	244	968
G34	3	11	383	6	860	1260
G35	3	34	539	53	523	1149
G37	3	10	629	20	518	1177
G38	3	38	712	35	389	1174
G40	2	8	238	12	183	441
G41	2	17	233	8	310	568
G42	3	3	878	12	308	1201
G43	1	6	90	0	114	210
G44	3	24	325	43	353	745
G45	2	1	19	0	28	48
G46	3	34	643	59	315	1051
G47	3	5	772	52	146	975
G49	1	2	25	0	64	91
G51	3	20	398	31	149	598
Toplam	81	488	16 430	810	8684	26 412

Tüm kategorilerden toplam 26 412 adet tohum elde edilmiştir. İndirgeme melezlemeleri sonucu 488 adet haploid olduğu varsayılan tohum elde edilmiştir. En fazla tohum sayısı F1 (16 430) tohum kategorisinden, en az tohum sayısı ise tip dışı (810) tohum kategorisinden elde edilmiştir. Melez dışı tohum sayısı ise 8684 adet olmuştur (Çizelge 4.1).

Cerit vd. (2016), genotiplerin dört farklı indirgeyici hatla (RWS, RWK-76, RWSxRWK-76 ve Stock6) melezinden toplam 62 913 adet tohum elde etmişlerdir. Araştırmada en yüksek tohum sayısı 55 746 adet ile F1 kategorisinden elde edilmiştir. Cengiz (2016), genotiplerin dört farklı indirgeyici hat (RWS, RWK-76, RWSxRWK-76 ve WS14) ile melezlenmesi sonucu toplam 15 911 adet tohum elde etmiş, en yüksek tohum elde edilen kategori F1 olarak belirlenmiştir. Araştırmacıların bulgularına benzer şekilde çalışmamızda en yüksek tohum oranı F1 kategorisinden elde edilmiştir.

Çizelge 4.2’de indirgeme melezlemesi sonucu oluşan haploid indirgeme oranı (HİO), F1, tip dışı ve melez dışı tohum oranları sunulmuştur. Stock6 indirgeyici hattının haploid indirgeme oranı en düşük G26 genotipinde %0,16 olarak, en yüksek ise G10 genotipinde %3,58 olarak tespit edilmiştir. Tüm genotiplerin ortalama haploid indirgeme oranı (HİO) ise %2,03 olarak hesaplanmıştır. Bu tez çalışmasında 15 adet genotipin indirgeme oranı 2’nin altında kalmıştır. Coe (1959)’nun belirttiğine göre, Stock6 haploid indirgeyici hattı %2-3 arasında maternal haploid indirgeme oranına sahiptir. Dolayısıyla araştırmacının ifadesi ile bulgularımız arasında bir uygunluk bulunmaktadır.

Her bir donör genotipin haploid indirgeme oranlarının farklı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Bazı araştırmacılar, donör germ-plazmalarının haploid indirgeme oranlarının farklı olduğunu ve bunların haploid indirgeme oranı üzerindeki etkilerinin çok yüksek olabileceğini uzun süredir bildirmektedir (Lashermes, 1988; Eder ve Chalyk, 2002; De La Fuente vd., 2018). Trentin vd. (2022), donör ve indirgeyici hatların genetik yapısının haploid indirgeme oranı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Birçok kalıtım çalışması, maternal haploidlerin *in vivo* indirgemesinin çoklu genler tarafından kontrol altında tutulduğunu göstermektedir (Lashermes ve Beckert

1988; Deimling vd., 1997; Röber vd., 2005). Araştırmacılar ayrıca atdışı mısırın, şeker ve sert mısıra göre daha yüksek indirgenebilirlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Eder ve Chalyk (2002), *in vivo* maternal haploid tekniği kullanarak yürüttükleri araştırmalarında, iki farklı indirgeyici hat (MHI ve Stock6) ile 20 farklı donörün (sert, atdışı ve sert x atdışı mısır grubu) indirgeme melezlemesi sonrası haploid indirgeme oranının %2,7 ile %8,0 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Cerit vd. (2016), farklı indirgeyici hatların haploid indirgeme oranlarını belirlemek için Adana koşullarında yürüttükleri araştırmalarında Stock6'nın %1,28 haploid indirgeme oranına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında Cerit vd. (2016)'den daha yüksek HİO elde edilmiştir. Bu durum aşırı yüksek yaz sıcaklıklarının görülmediği Bursa koşullarında mısır bitkisinin döllenmesi ve gelişimi açısından optimum koşulların daha fazla sağlandığıyla ilişkilendirilmiştir. Nitekim stres koşullarının en az düzeyde olduğu ve optimum büyüme koşullarının sağlandığı durumlarda haploid indirgeme oranının yükseldiği bildirilmektedir (Geiger, 2009).

Çevresel koşullar *in vivo* haploid tekniğinde başarıyı etkilemektedir. Röber vd. (2005), iyi ve kötü çevrelerin haploid indirgeme oranına etkisini belirlemek için KEMS ve RWS indirgeyici hatlarını kullanarak yürüttüğü çalışmasında kötü çevrede indirgeme oranını %2, iyi çevrede %16,4 olduğunu saptamıştır.

Bu çalışmada koçan püskülü çıkışından üç gün sonra elle tozlaşma yapılması sonucu yüksek oranda tohum tutmuş koçanlar elde edilmiştir. Rotareno vd. (2002), yürüttükleri araştırmada koçan püskülü çıkışından üç gün sonra elle yapılan tozlaşmanın, izole bir alanda açık tozlaşmaya göre daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Araştırmamızda ortalama kromozom katlama oranı (KKO) %50 olarak hesaplanmıştır. Kromozom katlama oranı donörden donöre farklılık göstermiştir. En düşük KKO %0, en yüksek KKO ise %100 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Zararsız vd. (2019), donörden donöre kromozom katlama oranının farklı olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar donörlerin kromozom katlama oranlarının 22,5 ile 48,3 arasında olduğunu ve ortalama KKO'yu %34,3 olarak bildirmişlerdir.

Çizelge 4.2. İndirgeme melezlemesi sonucu oluşan haploid, F1, tip dışı ve melez dışı tohum oranları (%).

Genotipler	HİO*	F1	Tip dışı	Melez dışı	KKO**
G3	1,44	56,1	4,3	38,2	40
G5	0,20	68,6	2,1	29,1	100
G6	2,96	76,1	2,2	18,7	63
G8	3,13	75,0	1,3	20,6	43
G9	2,75	72,4	3,4	21,4	25
G10	3,58	76,3	1,1	19,0	20
G12	1,08	75,7	8,2	15,0	43
G13	3,20	68,1	0,5	28,2	50
G14	0,90	24,3	3,9	70,9	0
G16	3,34	55,8	0,7	40,1	50
G17	1,87	56,4	2,7	39,0	44
G18	0,43	73,7	0,6	25,3	33
G19	1,08	68,6	1,8	28,4	40
G21	3,26	55,8	4,9	36,1	40
G22	3,30	54,1	5,6	37,0	67
G24	1,21	69,5	1,1	28,2	50
G26	0,16	73,3	0,3	26,2	100
G30	0,61	70,6	3,6	25,2	25
G34	0,87	30,4	0,5	68,3	80
G35	2,95	46,9	4,6	45,5	29
G37	0,84	53,4	1,7	44,0	50
G38	3,23	60,6	3,0	33,1	46
G40	1,81	54,0	2,7	41,5	25
G41	2,99	41,0	1,4	54,6	0
G42	0,24	73,1	1,0	25,6	67
G43	2,85	42,9	0,0	54,3	50
G44	3,22	43,6	5,8	47,4	62
G45	2,08	39,6	0,0	58,3	0
G46	3,23	61,2	5,6	30,0	67
G47	0,51	79,2	5,3	15,0	50
G49	2,19	27,5	0,0	70,3	50
G51	3,34	66,6	5,2	24,9	50
Ortalama	2,03	59,1	2,7	36,2	50

* HİO: Haploid indirgeme oranı, ** KKO: Kromozom katlama oranı.

Vanous (2011) ve Prasanna vd. (2012) KKO'ları sırasıyla %50 ve %55,31 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar; KKO'nun farklı olmasını genotiplerin genetik yapısının ve

uygulanan yöntemlerin farklılığı ile ilişkilendirmişlerdir. Araştırmamızda ortalama KKO'ları yukarıdaki araştırmacıların sonuçlarıyla benzer bulunmuştur.

Kromozom katlama işlemi için haploid olduğu kabul edilen 245 tohum çimlendirmeye konulmuş, bu tohumlardan 191 adedi çimlenmiştir. 191 fide kolhisin ile muamele edilmiştir (Çizelge 4.3). Bayhan vd. (2021) kromozom hatlaması için çimlendirmeye bırakılan 240 haploid tohumdan toplamda 195'inin çimlendiğini bildirmiştir. Araştırmamızda haploid kabul edilen tohumların çimlenme oranı (%78), Bayhan (2021)'ın bildirdiği %81,3 orana yakın bulunmuştur. Kromozom katlama muamelesinden sonra arazide katlanmış haploid bitkilerin (KH0) %63,8'inin canlı kaldığı, canlı kalan KH0 bitkilerinin %70,5'inin fertil olduğu belirlenmiştir. Fertil olan KH0 bitkilerde kendileme işlemi yapılmış ve kendilenen bitkilerin %28'inden tohum alınabilmektedir (Çizelge 4.3). Deimling vd. (1997), kromozom katlama muamelesinden sonra katlanmış haploid bitkilerin %72,5'inin canlı kaldığını, canlı kalanlardan %50'sinin fertil olduğunu, fertil bitkilerde %39 oranında kendileme yapılabilecek bitkilerin olduğunu ve kendilenen bitkilerden %27,3'ünden tohum alınabildiğini bildirmiştir. Eder ve Chalyk (2002), kromozom katlama muamelesi için kolhisinle muamele ettikleri haploid bitkilerin %49,4'ünün fertil olduğunu, %39,0'unun kendilenebildiğini ve kendilenen bitkilerden %27,3'ünün tohum ürettiğini tespit etmişlerdir. Röber vd. (2005), kromozom katlama muamelesi sonrası katlanmış haploid fidelerin yaklaşık %70-80'inin sağ çıktığını ve bunların %20-30'unun kendileme ile tohum ürettiğini belirtmiştir. Sunulan literatürlerden de görüldüğü gibi elde ettiğimiz sonuçlar araştırmacıların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4.3. KH0 genotiplerine ait çimlenmeye konulan haploid tohum sayısı, kolhisinle muamele edilen fide sayısı, kolhisin sonrası kaplara dikilen fide sayısı, arazide canlı kalan bitki sayısı, kendileme yapılan bitki sayısı ve hasat edilen koçan sayısı

Genotipler	Haploid tohum sayısı (adet)	Kolhisinle muamele edilen fide sayısı (adet)	Kolhisin sonrası kaplara dikilen fide sayısı (adet)	Arazide canlı kalan bitki sayısı (adet)	Kendileme yapılan bitki sayısı (adet)	Hasat edilen koçan sayısı (adet)
G3	7	5	4	4	2	1
G5	2	2	2	2	2	0
G6	10	8	8	7	5	1
G8	11	7	6	4	3	0
G9	4	4	3	2	1	0
G10	6	5	5	2	1	0
G12	8	7	7	4	3	0
G13	10	10	9	6	5	1
G14	9	4	0	0	0	0
G16	4	2	2	1	1	1
G17	11	9	7	6	4	3
G18	3	3	3	1	1	0
G19	9	5	3	3	2	0
G21	24	15	13	13	6	1
G22	10	9	7	7	6	2
G24	5	4	2	2	2	1
G26	1	1	1	1	1	1
G30	6	4	4	1	1	1
G34	5	5	5	4	4	0
G35	13	7	5	3	2	0
G37	8	6	4	4	3	1
G38	16	11	7	7	5	2
G40	5	4	2	2	1	1
G41	7	7	0	0	0	0
G42	3	3	3	2	2	1
G43	8	8	7	7	4	0
G44	13	13	13	10	8	1
G45	1	1	0	0	0	0
G46	7	6	6	6	4	3
G47	5	4	3	3	2	0
G49	2	2	2	2	1	0
G51	12	8	8	6	4	2
Toplam	245	191	151	122	86	24

Kromozom katlama uygulamasından sonra 3 genotipin (G14, G41, G45) fideleri gelişim gösterememiştir. (Çizelge 4.3). Birçok araştırmacı kolhisin uygulamasının toksik etkisi nedeniyle uygulama sonrası bitki ölümlerini rapor etmişlerdir (Eder ve Chalyk, 2002; Röber, 2005; Deimling vd. 1997; Chaikam ve Mahuku, 2012). Dolayısıyla G14, G41 ve G45 genotiplerine ait fidelerin gelişim gösterememesinin sebebi olarak kolhisinin toksik etkisi gösterilebilir.



Şekil 4.3. Tarlada farklı katlanmış haploid bitkilere ait steril tepe püskülleri.

Tarlada haploid olduğu varsayılan ancak diploid olan bitkiler sap renklenmesinden belirlenmiş ve bu bitkiler çiçeklenme öncesi tarladan uzaklaştırılmıştır. Bazı katlanmış haploid (KH) bitkilerin tamamen steril püsküllere sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Bu tez çalışmasında 86 adet katlanmış haploid bitkide kendileme yapılmış ve hasat zamanı 24 adet koçan hasat edilmiştir (Çizelge 4.3). Hasat edilen katlanmış haploid hatlara (KH0) ait koçanlara ait resimler Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de sunulmuştur.



Şekil 4.4. G26 donörüne ait haploid bitkinin kendilenmesi sonucu elde edilen koçan



Şekil 4.5. G37 donörüne ait katlanmış haploid bitkilerin kendilenmesi sonucu elde edilen koçan



Şekil 4.6. G40 donörüne ait katlanmış haploid bitkinin kendilenmesi sonucu elde edilen koçan



Şekil 4.7. G46 donörüne ait katlanmış haploid bitkilerin kendilenmesi sonucu elde edilen koçanlar

Tez çalışmasının üçüncü yılında katlanmış haploid bitkiler (KH0) ekilerek kendileme yapılmış ve kendilenen katlanmış haploid hatlar (KH1) elde edilmiştir. Kendilemeler sonucunda 35 koçan hasadı gerçekleştirilmiştir. Hasat sonrasında her bir kendilenen katlanmış haploid hattın elde edilen tohum sayıları Çizelge 4.4’de sunulmuştur. KH1 hatlardan en düşük 2, en yüksek 386 tohum elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Hasat sonrası elde edilen kendilenen KH1 tohum sayıları (adet)

KH1 No	Genotipler (KH1)	Tohum (adet)
1	G3	186
2	G6	199
3	G13	115
4	G16	151
5	G17 (1)	2
6	G17 (2)	174
7	G21	122
8	G22 (1)	169
9	G22 (2)	172
10	G24	225
11	G26	73
12	G37	167
13	G38 (1)	37
14	G38 (2)	145
15	G42	386
16	G44	187
17	G46 (1)	128
18	G46 (2)	361
19	G46 (3)	12
20	G51	91

Araştırmamızda üç donör genotipten (G17, G22 ve G38) 2, bir donör genotipten (G46) ise 3 ayrı katlanmış haploid hat elde edilmiştir. Araştırmacılar uygun koşullar altında bir donör bitkiden 1 ile 5 arasında katlanmış haploid hat meydana gelebileceğini belirtmektedirler (Eder ve Chalyk, 2002; Röber vd., 2005).



Şekil 4.8. G3 genotipinden gelen kendilenen katlanmış haploid hattın (KH1) tarladaki görünümü

Mısır bitkisinde hatların tanımlanması morfolojik veya moleküler olarak yapılabilmektedir. Morfolojik tanımlama, UPOV'un belirlediği 34 morfolojik özelliğin gözlemlenmesiyle yapılır ve hatların tanımlanması ile ilgili veri sağlar (Esmeray, 2016). Bu bakımdan 20 adet KH1 hattın morfolojik özellikler bakımından karakterizasyonu yapılmıştır. Katlanmış haploid hatların UPOV özellik belgesindeki 34 özelliğe göre alınan ölçüm ve gözlem sonuçları EK 2'de verilmiştir.

EK 2 incelendiğinde, KH1 mısır hatlarının geniş bir fenotipik varyasyon sergilediği görülmektedir. İlk yaprak kınında antosiyanin renklenmesi 10 adet KH1 hattında gözlemlenirken diğer 10 adet KH1 hattında gözlemlenmemiştir. Bir KH1 hattı hariç diğer tüm KH1 hatlarında destek köklerde antosiyanin renkliliği gözlemlenmiştir. İlk yaprak kınındaki renklenme verimlilik, destek köklerdeki renklenme ise sap sağlamlığı açısından önemli olup ıslah çalışmalarında genellikle renklenme bulunan genotipler tercih edilmektedir.

Gövde ile yaprak arasındaki açının dar olması sık ekim ve bitkinin maksimum olarak gün ışığından faydalanması açısından önemli bir özelliktir. Gövde ile yaprak arasındaki açı 15 KH1 hattında dar, beş KH1 hattında ise orta olarak gözlemlenmiştir. Çoğu KH1 hattının dar yaprak açısına sahip olması olumlu bir özelliktir.

KH1 hatları tepe püskülü çıkış zamanı gözlemlerine göre; 3 tanesi erkenci, 2 tanesi orta, 10 tanesi orta-geç, 4 tanesi geç ve 1 tanesi geç-çok geç olarak tanımlanmıştır. Ülkemizde silajlık mısır çeşitlerinin çoğunu geççi çeşitler oluşturmakta olup erkenci çeşitlere yoğun bir talep bulunmaktadır. KH1 hatlarının olum gruplarının varyasyon göstermesi gelecekte taleplere uygun silajlık mısır geliştirilmesine olanak tanınması açısından önem arz etmektedir.

Genotiplerin bitki boyları 13 tanesinde orta ve 7 tanesinde uzun olarak tanımlanmıştır. Bitki boyunun uzun olması özellikle silajlık mısır ıslahında silaj verimini arttırması açısından fayda sağlamaktadır. Dolayısıyla araştırmanın temel hedefi olan silajlık mısır ıslahı bakımından KH1 hatlarından ümitvar sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

Koçandaki sıra sayısı; 3 tanesi az, 12 tanesi orta, 4 tanesi fazla ve 1 tanesi çok fazla gruplarından oluşmaktadır. Koçan sıra sayısı gruplarının fazla olması tane verimi için yapılacak melezleme çalışmalarında daha fazla ümitvar melezlerin elde edilebileceğine işaret etmektedir.

Araştırmamızda yer alan 20 adet KH1 hattın tane tipi atdışı grubunda yer almaktadır.

Tüm bu bulgular KH1 hatları ile yürütülecek ıslah programında en ideal kombinasyonların yakalanabilme ihtimalini arttırmaktadır.

5. SONUÇ

Araştırma sonuçlarına göre haploid indirgeme oranı ve kromozom katlama oranlarının her bir donör genotipe göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmada *in vivo* tekniğinin kullanılması, indirgeyici hattın genetik tabanında antosiyanin renk markörü bulunması nedeniyle hem tohum hem de fide aşamalarında haploidlerin kolayca tanımlanmasına olanak sağlamıştır. İndirgeme melezlemeleri sonucu 488 haploid kabul edilen tohum elde edilmiştir. Ortalama haploid indirgeme oranı %2,03 olarak, ortalama kromozom katlama oranı ise %50 olarak belirlenmiştir.

Mısır bitkisinde yeni hibrit çeşitlerin geliştirilmesi, kombinasyon yeteneği yüksek homozigot hatların elde edilmesi ile mümkündür. Konvansiyonel ıslah yönteminde yeni homozigot hatların geliştirilmesi işlemi en az 6-8 generasyon sürmektedir. *İn vivo* katlanmış haploid tekniği ise kısa sürede ve daha az maliyetle homozigot mısır hatlarının elde edilebilmesi açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Bu doktora tez çalışması kapsamında *in vivo* katlanmış haploid tekniği ile 20 adet homozigot mısır hattı elde edilmiştir. Ancak tez süresi içerisinde gerçekleştirilemeyen kombinasyon melezlemelerine tez sonrası devam edilecektir. Böylece ülkemizin ihtiyaç duyduğu yüksek hasıl verimine ve kalitesine sahip yeni yerli ve milli mısır çeşitlerinin geliştirilmesine çalışılacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim. (2023). *Poliploidi*
https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/178325/mod_resource/content/0/%C3%96BI13.pdf
- Auger, D.L., Ream, T. S. & Birchler, J. A. (2004). A test for a metastable epigenetic component of heterosis using haploid induction in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 1017-1023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15067387/>
- Barret P., Brinkmann, M., & Beckert, M. (2008). A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 117, 581-594. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18516584/>
- Başer, İ., Özdüven, M. L., Bilgin, O., & Balkan A. (2022). Silajlık Mısır (*Zea Mays* L.) ve Kalite Özellikleri. *MISIR; Islah Teknikleri ve Yetiştiriciliği*, Dr. Öğretim Üyesi Rahime Cengiz (editör), (s. 161), İksad Yayınevi. <https://iksadyayinevi.com/wp-content/uploads/2022/04/MISIR-Islah-Teknikleri-ve-Yetistiriciligi.pdf>
- Bayhan, M., Özkan, R., Albayrak, Ö., Yıldırım, R., & Akıncı, C. (2021). *In vivo* double haploid tekniği ile yerel çeşitlerden elde edilen haploid hatların saf hat olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg.*, 24(5), 1029-1036. <http://dogadergi.ksu.edu.tr/tr/pub/issue/63222/825121>
- Belicuas, P. R., Guimarães, C. T., Paiva, L. V., Duarte, J. M., Maluf, W. R., & Paiva, E. (2007). Androgenetic haploids and SSR Markers as tools for the development of tropical maize hybrids. *Euphytica*, 156, 95-102. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-007-9356-z>
- Cai, Z., Xu, G., Liu, X., Dong, Y., Dai, Y., & Li, S. (2007). The breeding of JAAS3-haploid inducer with high frequency parthenogenesis in maize. *J Maize Sci.*, 15(1), 1-4.
- Cengiz, R. (2016). *In Vivo* tekniği ile katlanmış mısır hatlarının elde edilmesi. *Doktora Tezi*. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Tekirdağ. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>
- Cengiz, R., & Esmeray, M. (2021). Development of late temperate in vivo haploid inducers. *Genetika*, 53(1), 51-64. <https://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0534-0012/2021/0534-00122101051C.pdf>
- Cengiz, R., & Korkut, K. Z. (2020). Development of doubled haploid maize lines by using *in vivo* haploid technique. *Biotech Studies*, 29(1), 1-7. https://www.biotechstudies.org/uploads/pdf_501.pdf

- Cerit, İ., Cömertpay, G., Oyucu, R., Çakır, B., Hatipoğlu, R., & Ozkan, H. (2016). Melez mısır ıslahında *in-vivo* katlanmış haploid tekniğinde kullanılan farklı inducer genotiplerin haploid indirgeme oranlarının belirlenmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25 (özel sayı), 52-57. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tarbitderg/issue/25622/280162>
- Cerit, İ., Cömertpay, G., Oyucu, R., & Çakır, B. (2017). *Melez Mısır Islahında In-Vivo Katlanmış Haploid Tekniği ile Homozigot Hatların Geliştirilmesi*. TÜBİTAK 113O916 Nolu Proje Sonuç Raporu. <https://search.trdizin.gov.tr/tr/yayin/detay/620266>
- Cerit, İ., & Cengiz, R. (2022). *In vivo* tekniklerinin mısır ıslahında kullanımı. Rahime Cengiz (Editör), *Mısır; Islah Teknikleri ve Yetiştiriciliği*, (s. 81), İksad Kitabevi. <https://iksadyayinevi.com/wp-content/uploads/2022/04/MISIR-Islah-Teknikleri-ve-Yetistiriciligi.pdf>
- Chalyk, S. T. (1994). Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. *Euphytica*, 79, 13-18. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00023571>
- Chang, M. T., & Coe, E. H. (2009). Doubled haploids. In: *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*, Kriz, A. L. and Larkins, B. A., (eds.), (pp. 127–142). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-68922-5_10
- Chase, S. S. (1947). Techniques for isolating monoploid maize plants. *J. Bot.*, 34, 582.
- Chase, S. S. (1949). Monoploid frequencies in commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines. *Genetics* 34: 328–332. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17247318/>
- Chase, S. S. (1952). Monoploids in maize. Iowa State College Press, Ames, Iowa, pp. 389-399.
- Chase, S. S. (1969). Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *Botanical Review*, 35(2), 117–167. <http://www.jstor.org/stable/4353768>
- Coe, E. H., (1959). A line of maize with high haploid frequency. *Am. Nat.* 93: 381-382. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/282098>
- Coe, E. H., & Sarkar, K. R. (1964). The detection of haploids in maize. *Journal of Heredity*, 55(5), 231-233. <https://academic.oup.com/jhered/article-abstract/55/5/231/900475>
- CGIAR (2023). Uluslararası Tarımsal Araştırma Danışma Grubu (Maize-Global Alliance for Improving Food Security and the Livelihoods of the Resource-Poor in the Developing World). https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10947/2556/crp_3.2_crp_report_june_1_2011.pdf?sequence=1

- Chaikam, V., & Mahuku, G. (2012). Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice. BM Prasanna, V. Chaikam ve G Mahuku (Eds.), *Chromosome Doubling of Maternal Haploids*. Mexico, D.F.: CIMMYT. <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1351/97066.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chaikam, V., Martinez, L., Melchinger, A. E., Schipprack, W., & Boddupalli, P. M. (2016). Development and validation of red root markerbased haploid inducers in maize. *Crop Science*, 56(4), 1678–1688. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.10.0653>
- Chaikam, V., Lopez, L. A., Martinez, L., Burgueno, J., & Boddupalli, P. M. (2017). Identification of *in vivo* induced maternal haploids in maize using seedling traits. *Euphytica*, 213, 8. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1968-3>
- Chaikam, V., Molenaar, W., Melchinger, A. E., & Boddupalli, P. M. (2019). Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theor. Appl. Genet.*, 132, 3227-3243. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00122-019-03433-x>
- Chaikam, V., & Prasanna, B. M. (2020). Doubled Haploid Technology for Rapid and Efficient Maize Breeding. In: Gosal, S., Wani, S. (eds) *Accelerated Plant Breeding*, Volume 1. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41866-3_11
- Chase, S. S., & Nanda, D. K. (1969). Rapid inbreeding in maize. *Econ. Bot.*, 23, 165-173, <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02860622>
- Couto, E. G. de O., Davide, L. M. C., Bustamante, F. d. O., Pinho, R. G. V., & Silva, T. N. (2013). Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. *Ciência e Agrotecnologia*, 37(1), 25–31. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542013000100003>
- CIMMYT, (2023). *Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice*. <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/1351/97066.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- De La Fuente, G. N., Frei, U. K., Trampe, B., Nettleton, D., Zhang, W., & Lubberstedt, T. (2018). A Diallel analysis of a maize donor population response to *in vivo* maternal haploid induction I: Inducibility. *Crop Sci.*, 58, 1830-1837. <https://dr.lib.iastate.edu/server/api/core/bitstreams/8ed4bd17-275f-4b78-aa25-7267840fef17/content>
- Deimling S., Röber, F., & Geiger, H. H. (1997). Methodik und Genetik der *in vivo* Haploideninduktion bei mais. *Votr Pflanzenzüchtg.*, 38, 203-224.
- Dang, N. C., Munsch, M., Aulinger, I., Renlai, W., & Stamp, P. (2012). Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, 183(2), 153-160.

- Dong, X., Xu, X., Miao, J., Li, L., Zhang, D., Mi, X., Liu, C., Tian, X., Melchinger, A. E., & Chen, S. (2013). Fine mapping of qhr1 influencing *in vivo* haploid induction in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 126, 1713–1720. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23539086/>
- Eder, J., & Chalyk, S. T. (2002). *In vivo* haploid induction in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 703-708. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12582677/>
- Esmeray, M. (2016). Mısır heterotik gruplarında genetik analizler. *Doktora Tezi*. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Tekirdağ. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>
- Forster, B. P., & Thomas, W. T. B. (2005). Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev.*, 25, 57-88.
- Gayen, P., Madan, J. K., Kumar, R., & Sarkar, K. R. (1994). Chromosome doubling in haploids through colchicine. *Maize Genet. Coop. Newsletter*, 68, 65.
- Geiger, H. H. (2009). Maize Handbook-Volume II: Genetics and Genomics, Bennetzen, J.L. and Hake, S., (Eds.), *Doubled haploids*. 641-657, Springer Science and Business Media, New York. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-77863-1>
- Geiger, H. H., & Gordillo, G. A. (2009). Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*, 54, 485-499. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103132631>
- Gernand, D., Rutten, T., Varshney, A., Rubtsova, M., Prodanovic, S., Brüss, C., Kumlehn, J., Matzk F., & Houben, A. (2005). Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *Plant Cell.*, 17(9), 2431-2438. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16055632/>
- Gordillo, G. A. & Geiger, H. H. (2008a). Optimization of DH-line based recurrent selection procedures in maize under a restricted annual loss of genetic variance. *Euphytica*, 161, 141-154. https://www.researchgate.net/publication/225113825_Optimization_of_DH-based_recurrent_selection_procedures_in_maize_under_a_restricted_annual_loss_of_genetic_variance
- Gordillo, G. A., & Geiger, H. H. (2008b). Alternative recurrent selection strategies using doubled haploid lines in hybrid maize breeding. *Crop Sci.*, 48, 911-922. <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2135/cropsci2007.04.0223>
- Gordillo, G. A., & Geiger, H. H. (2008c). MBP (version 1.0) A software package to optimize maize breeding procedures based on doubled haploid lines. *J Hered.*, 99, 227-231. <https://academic.oup.com/jhered/article/99/2/227/2187776>

- Hu, G. (2014). Study on haploid induction rates in different maize inducers. *Agricultural Science & Technology*, 15(4): 554-556. <https://www.proquest.com/openview/c23ae236d1e0c2e3702d07edf0224c8f/1?cbl=1596357&pq-origsite=gscholar&parentSessionId=07VKK1cCHFMZnkQrrFtQ%2B6Kc8ZSiRm8HPguBz90kGvY%3D>
- Junxiong, Z., Zhanyuan, W., Peng, S., Wei, L., Shaojiang, C., & Jin, L. (2013). Embryo feature extraction and dynamic recognition method for maize haploid seeds. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 29, 4. <https://www.ingentaconnect.com/content/tcsae/tcsae/2013/00000029/00000004/art00025>
- Kahrıman, F., Kahrıman, A., Güz, A. M., & Yüksel, N. N. (2022). Development of homozygous maize lines differing in oil and zein content using *in-vivo* maternal haploid technique. *Biotech Studies*, 31(2), 79-86. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/2842232>
- Kato, A. & Geiger, H. H. (2008). Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant Breed.*, 121, 370-377. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0523.2002.743321.x>
- Kebede, A. Z., Dhillon, B. S., Schipprack, W., Araus, J. L., Banziger, M., Kassa, S., Alvarado, G., & Melchinger A. E. (2011). Effect of source germplasm and season on the *in vivo* haploid induction rate in tropical maize. *Euphytica*, 180, 219-226. <https://doi.org/10.1007/s10681-11-0376-3>
- Kumar, K., Jha, A. K., Kumar, B., Karjagi C. G., Abhishek, A., Gambhir, G., Aggarwal, C., Tyagi A., Sharma, P., Pandey, P., & Rakshit, S. (2022). Development of an efficient and reproducible *in vitro* regeneration and transformation protocol for tropical maize (*Zea mays* L.) using mature seed-derived nodal explants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 148, 557-57. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02207-y>
- Lashermes, P., & Beckert, M. (1988). Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theor. Appl. Genet.*, 76, 405-410. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24232205/>
- Liu, Z., & Song, T. (2000). The breeding and identification of haploid inducer with high frequency parthenogenesis in maize. *Acta Agronomica Sinica*, 26(5), 570-574.
- Lübberstedt, T., & Frei, U. K. (2012). Application of doubled haploids for target gene fixation in backcross programmes of maize. *Plant Breed.*, 131, 449-452.
- MaizeGDB. (2023). Maize genetics and geomics database, M741H. https://www.maizegdb.org/data_center/stock?id=109599
- Melchinger, A. E., Schipprack, W., Würschum, T., Chen, S., & Technow, F. (2013). Rapid and accurate identification of *in vivo*-induced haploid seeds based on oil content in maize. *Scientific Reports*, 3, 1-5. <https://doi.org/10.1038/srep02129>

- Melchinger, A. E., Schipprack, W., Friedrich, H. U., & Mirdita, V. (2014). *In vivo* haploid induction in maize: identification of haploid seeds by their oil content. *Crop Sci.*, 54(4), 1497-1504. <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2135/cropsci2013.12.0851>
- Molenaar, W. S., & Melchinger, A. E. (2019). Production of doubled haploid lines for hybrid breeding in maize. In *Advances in breeding techniques for cereal crops* (pp. 143-172). Burleigh Dodds Science Publishing. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780429275463-6/production-doubled-haploid-lines-hybrid-breeding-maize-willem-molenaar-albrecht-melchinger>
- Nanda, D. K., & Chase, S. S. (1966). An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science*, 6(2), 213–215. <https://doi.org/10.2135/cropsci1966.0011183X000600020036x>
- Nielsen, B. (2023). *Grain Fill Stages in Corn*. Purdue. <https://www.agry.purdue.edu/ext/corn/news/timeless/grainfill.html>
- Randolph, L. F. (1932). Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. *Genetics*, 18, 222-229. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1076195/>
- Pixley, K. V., & Bangizer, M. (2004). Open-pollinated maize varieties: A backward step or valuable option for farmers? p. 22–29. In: Friesen DK, Palmer AEF (eds.) *Integrated approaches to higher maize productivity in the new millennium*. Proc. Of the 7th Eastern and Southern Africa Regional Maize Conf, Nairobi, Kenya. 5-11 Feb. 2004. [https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=dRoOfAh6VjAC&oi=fnd&pg=PA22&dq=Pixley,+K.+V.,+%26+Bangizer,+M.+\(2004\).+Open-pollinated+maize+varieties:+A+backward+step+or+valuable+option+for+farmers%3F+p.+22%E2%80%9329.+In:+Friesen+DK,+Palmer+AEF+\(eds.\)+Integrated+approaches+to+higher+maize+productivity+in+the+new+millennium.+Proc.+Of+the+7th+&ots=hZeab3FhEs&sig=vhs6HU5OZra516MAc52XxN87W0Q&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=dRoOfAh6VjAC&oi=fnd&pg=PA22&dq=Pixley,+K.+V.,+%26+Bangizer,+M.+(2004).+Open-pollinated+maize+varieties:+A+backward+step+or+valuable+option+for+farmers%3F+p.+22%E2%80%9329.+In:+Friesen+DK,+Palmer+AEF+(eds.)+Integrated+approaches+to+higher+maize+productivity+in+the+new+millennium.+Proc.+Of+the+7th+&ots=hZeab3FhEs&sig=vhs6HU5OZra516MAc52XxN87W0Q&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Prasanna, B. M., Chaikam, V., & Mahuku, G. (Eds.). (2012). *Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice*. Mexico, D.F.: CIMMYT. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123393339>
- Prasanna, B. M. (2023). Doubled Haploid (DH) Technology in Maize Breeding: An Overview, Prasanna, B. M., Chaikam, V., & Mahuku, G. (Eds.), *Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice*. 1-8, Mexico, D.F.: CIMMYT. <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/1351/97066.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Prigge, V., Sanchez, C., Dhillon, B.S., Schipprack, W., Araus, J. L., Banziger, M., & 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, 1498-1506. <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2135/cropsci2010.10.0568>

- Prigge, V., Schipprack, W., Mahuku, G., Atlin, G. N., & Melchinger, A. E. (2012). Development of *in vivo* haploid inducers for tropical maize breeding programs. *Euphytica*, 185(3), 481–490. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0657-5>
- Rotarencu, V. A. (2002). Production of matroclinous maize haploids following natural and artificial pollination with a haploid inducer. *Maize Genet. Coop. News Lett.*, 76, 16. <https://mnl.maizegdb.org/mnl/76/69rotarencu.html>
- Rotarencu, V. A., Kirtoca, I. H., & Jacota, A. G. (2007). Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 81, 11. <https://mnl.maizegdb.org/mnl/81/mnl81.pdf>
- Rotarencu, V. A., Dicu, G., State, D., & Fuiua, S. (2010). New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop. News Lett.*, 84, 15. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113296021>
- Roux, S. R. (1995). Züchterische Untersuchungen zur in-vivo-Haploideninduktion bei Mais. *Ph.D. thesis*, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Röber, F. K., Gordillo, G. A., & 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. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT2006602235>
- Shatskaya, O. A., Zabirowa, E. R., Shcherbak, V. S., & Chumak, M. V. (1994). Mass induction of maternal haploids in corn. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 68: 51. <https://www.researchgate.net/publication/264619608> Mass induction of maternal haploids in corn
- Şehirli, S., Özgen, M. (2013). *Bitki Islahı* (5. Baskı), Ankara Üniversitesi Basımevi, Yayın No: 1582, 270 Sayfa, Ankara.
- TAGEM, (2023). “*Yem Bitkileri Üretimi, Mevcut Durumu ve İklim Değişikliği Kapsamında Alınacak Önlemleri Değerlendirme*” Çalıştay Sonuç Raporu, 22-23 Mart 2022. [https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/C%CC%A7MYB%20C%CC%A7al%C4%B1s%CC%A7tay%20Raporu%20\(1\).pdf](https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/C%CC%A7MYB%20C%CC%A7al%C4%B1s%CC%A7tay%20Raporu%20(1).pdf)
- Trentin, H. U., Frei, U. K., & Lubberstedt, T. (2020). Breeding maize maternal haploid inducers. *Plants*, 9, 614. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7285223/>
- Trentin, H. U., Batiru, G., Frei, U. K., Duttaand, S., & Lubberstedt, T. (2022). Investigating the effect of the interaction of maize inducer and donor backgrounds on haploid induction rates. *Plants*, 11, 1527. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35736679/>
- Trentin, H. U., Yavuz, R., Dermail, A., Frei, U. K., Dutta, S., & Lübberstedt, T. A. (2023). Comparison between inbred and hybrid maize haploid inducers. *Plants*, 12, 1095. <https://doi.org/10.3390/plants12051095>

- UPOV. (2023). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/twv/38/tg_02_06.pdf
- Taşdan, K. (2021). *Durum ve Tahmin Mısır*. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Durum-Tahmin%20Raporlar%C4%B1/2021%20Durum-Tahmin%20Raporlar%C4%B1/M%C4%B1s%C4%B1r%20Durum%20Tahmin%20Raporu%202021-347%20TEPGE.pdf>
- Tyrnov, V. S., & Zavalışhina, A. N. (1984). Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 276, 735-738.
- TÜİK (2020). Türkiye İstatistik Kurumu. <https://www.tuik.gov.tr/>
- TÜİK (2023). *İstatistik veri portalı*. <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=Tarim-111>
- Xu, X., Li, L., Dong, X., Jin, W., Melchinger, A. E., & Chen, S. (2013). Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize. *J Exp Bot.*, 64(4), 1083-1096. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3580820/>
- Vanous, A. E. (2011). Optimization of doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.). *Graduate Theses and Dissertations*. Paper 12974
- Yaralı, F., & Yanmaz, R. (2013). Allium türlerinin ıslahında haploidi tekniğinden yararlanma. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 45-52. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/417890>
- Yılmaz, Ö. E. (2005). Yazlık Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Ovaryum Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Edilmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, syf: 5. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>
- Yorgancılar, M., Yaşar, M. A. & Atalay, E. (2019). Mısır ıslahında indirgeyici hatların kullanımı ve dihaploidizasyon. *Journal of Bahri Dagdas Crop Research*, 8(1), 170-177. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/769093>
- Zabirova, E. R., Shatskaya, O. A., & Shcherbak, V. S. (1993). Line 613/2 as a source of a high frequency of spontaneous diploidization in corn. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 67, 67.
- Zabirova, E. R, Chumak, M. V, Shatskaia, O. A, & Scherbak, V. S. (1996). Technology of the mass accelerated production of homozygous lines (in Russian). *Kukuruza i sorgo N*, 4, 17-19.
- Zararsız, D., Yanıkoğlu, S., Öztürk, L., Turgut, İ., Kızılk, S., & Bilgin, B. (2019). Production of double haploid plants using *in vivo* haploid techniques in maize. *Journal of Agricultural Sciences* 25(1), 62-69.

Zhang, Z. L., Qiu, F. Z., Liu, Y. Z., Ma, K. J., Li, Z. Y., & Xu, S. Z. (2008). Chromosome elimination and *In vivo* haploid production induced by stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.*, 27, 1851-1860. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18807046/>

EKLER

EK 1 %70'lik Etil alkol çözeltilisi eldesi

Sırasıyla 0,7 litre etil alkol üzerine 0,3 litre steril saf su eklenerek karıştırılır ve %70'lik etil alkol çözeltilisi elde edilir.

EK 2 Katlanmış haploid hatların UPOV özellik belgesindeki 34 özelliğe göre alınan ölçüm ve gözlem sonuçları.

Özellikler	Bitki Kodu																			
	G3	G6	G13	G16	G17 (1)	G17 (2)	G21	G22 (1)	G22 (2)	G24	G26	G37	G38 (1)	G38 (2)	G42	G44	G46 (1)	G46 (2)	G46 (3)	G51
1. İlk yaprak: Yaprak kınında antosiyanin renkliliği	1	3	1	3	1	1	5	3	3	1	1	3	1	1	5	5	3	1	1	3
2. İlk yaprak: Yaprak ucu şekli	5	7	3	5	5	5	5	3	3	3	5	5	3	3	5	5	5	5	5	5
3. Yaprak: Gövde ile yaprak arasındaki açı	3	3	3	3	3	3	3	3	5	3	3	3	5	5	5	3	5	3	3	3

EK 2 (devam)

4. Yaprak: Yaprak ayası duruşu	1	3	1	1	3	1	1	3	5	1	3	1	5	5	5	1	5	1	3	1
5. Gövde: Gövdedeki boğumdan boğuma zigzag derecesi	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2
6. Gövde: Destek köklerde antosiyenin renkliliği	3	5	3	3	3	7	3	3	7	5	5	1	5	3	5	3	3	3	3	3
7. Tepe püskülü: Tepe püskülü çıkış zamanı	6	8	6	7	5	5	7	6	6	6	6	3	7	7	3	3	6	6	6	6

EK 2 (devam)

8. Tepe püskülü: Tepe püskülü kavuzu tabanındaki antosiyanin renkliliği	1	1	1	1	1	3	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9. Tepe püskülü: Tepe püskülü kavuzlarında antosiyanin renkliliği	1	3	1	3	1	1	1	1	7	3	3	1	1	1	5	1	1	1	1	1
10. Tepe püskülü: Anterlerde antosiyanin renkliliği	3	3	1	1	1	5	3	3	3	3	5	5	3	1	3	3	1	1	5	1

EK 2 (devam)

08

11. Tepe püskülü: Başakçık yoğunluğu	5	7	7	7	7	7	7	5	5	5	5	7	7	7	7	7	7	7	7	7
12. Tepe püskülü: Ana eksen ile yan dallar arasındaki açı	5	5	3	3	5	5	5	5	3	3	5	3	7	7	5	5	5	5	5	5
13. Tepe püskülü: Yan dalların duruşu	1	3	3	3	5	3	1	5	5	1	3	3	5	3	3	3	3	3	3	3
14. Tepe püskülü: İlk yan dal sayısı	2	2	1	2	1	2	3	2	2	1	2	2	3	2	2	2	1	2	1	2

EK 2 (devam)

15. Koçan: Püskül çıkış zamanı	6	8	6	7	5	5	7	6	6	6	6	3	7	7	3	3	6	6	6	6
16. Koçan: Püskül antosiyenin renkliliği	1	1	9	9	1	9	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9
17. Koçan: Püskülde antosiyenin yoğunluğu	1	1	3	3	1	3	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3
18. Yaprak: Yaprak kınındaki antosiyenin renkliliği	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

EK 2 (devam)

19. Tepe püskülü: En alt yan daldan itibaren eksen uzunluğu	3	3	5	5	5	5	7	7	5	5	6	7	5	5	5	7	5	5	5	5
20. Tepe püskülü: En üst yan daldan itibaren eksen uzunluğu	5	3	5	5	5	3	7	5	5	3	5	5	3	5	5	5	5	5	5	5
21. Tepe püskülü: Yan dalların uzunluğu	3	3	3	5	3	3	5	3	5	3	3	3	3	6	3	5	3	3	3	3
22. Bitki: Boyu (tepe püskülü dahil)	5	7	7	5	5	5	7	5	5	7	5	7	5	5	5	7	5	5	5	7

EK 2 (devam)

83

23. Bitki: Üst koçanın bitkiye bağlandığı yerin bitkinin toplam yüksekliğine oranı	5	7	7	5	5	5	7	5	5	7	5	5	5	5	5	7	5	5	5	7
24. Yaprak: Yaprak ayası genişliği	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
25. Koçan: Sap uzunluğu	5	3	3	5	5	5	3	3	3	3	7	5	3	3	5	3	5	5	3	3
26. Koçan: Koçan uzunluğu	3	5	3	3	3	3	5	3	3	3	7	3	3	1	5	3	3	3	3	3

EK 2 (devam)

27. Koçan: Koçan çapı	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	5	3	3	3	3	3	3
28. Koçan: Koçan şekli	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
29. Koçan: Koçandaki sıra sayısı	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	3	9	5	3	7	7	3	5	
30. Koçan: Tane tipi	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
31. Koçan: Tane ucu rengi	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4	4	3	4	3	4	

EK 2 (devam)

32. Koçan: Tane sırt rengi	5	5	5	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
33. Koçan: Somakta antosiyenin renkliliği	9	9	1	1	9	9	9	9	9	9	9	9	1	1	1	1	9	9	9	9
34. Koçan: Somakta antosiyenin yoğunluğu	7	7	1	1	7	7	7	3	3	7	7	7	1	1	1	1	5	1	7	7

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sinem ZERE TAŞKIN
Doğum Yeri ve Tarihi : Giresun / 21.01.1990
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Bulancak Anadolu Lisesi
Lisans : Bursa Uludağ Üni. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üni. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : B.U.Ü, YÖK 100/2000 ve TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi
Doktora Burs Programı Bursiyeri

İletişim (e-posta) : sinemzere@uludag.edu.tr

Yayımları :

1. Yönter, F., Zere Taşkın, S., Kesici, M., Candoğan, B. N., Cansev, A. & Bilgili, U. (2023). The Effects of Different Irrigation Levels and Nitrogen Doses on Growth, Quality and Physiological Parameters of Warm-season Turfgrasses. *Journal of Agricultural Sciences*, 29 (1), 272-286.
2. Z. Taşkın, S. & Bilgili, U. (2022). Effects of different nitrogen sources on turf quality and plants growth of some warm-season turfgrasses. *Turkish Journal of Field Crops*, 27 (1), 167-174.
3. Yönter, F., Zere Taşkın, S. & Bilgili, U. (2022). Effects of Different Nitrogen Doses on Forage Yield of Some Sweet Sorghum [*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenb.] Varieties. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36 (1), 119-128.
4. Zere Taşkın, S. & Bilgili, U. (2020). Mikrobiyal Gübrenin Bazı Sıcak İklim Çim Bitkilerinin Genel Çim Performansı Üzerine Etkileri. *Bursa Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 34 (Özel Sayı), 139-158.
5. Zere Taşkın, S. & Bilgili, U. (2020). Çevre ve İnsan Sağlığı Açısından Çim Bitkilerinin Faydaları. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34 (2), 417-425.
6. Bilgili, U., Zere, S. & Yönter, F. (2017). Farklı Azot Dozlarının Bermuda Çimi (*Cynodon* sp.)'nin Gelişimi ve Çim Kalitesi Üzerine Etkileri. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, Cilt: 20 Sayı: Özel Sayı, 52-59.
7. Zere, S., & Bilgili, U. (2016). Efficiency of Different Sewage Sludge on Growth and Turf Quality to Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 2016, Volume: 30, Number: Special Issue, 430-435.