



## Alternatif Mutajenlerin Maternal Haploidlerin Çimlenme Döneminde Kromozom Katlaması Üzerine Etkileri

Merve ÇAKIR<sup>1</sup>, Rahime CENGİZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Sakarya

\*Sorumlu Yazar (Corresponding author): rahimecengiz@subu.edu.tr

### Özet

İslah çalışmalarının, yıllardır artan nüfusun istek ve arzularına paralel olarak değeri ve önemi her geçen gün daha da iyi anlaşılmaktadır. Gelişen teknoloji ve imkanlar doğrultusunda ıslah tekniklerine yeni teknolojiler dahil edilmiştir. İslah süresini kısaltmak amacıyla kullanılan haploid teknikleri, mısır hatlarının 1-2 yıl gibi kısa sürede geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Kromozom katlaması için çoğunlukla colchicine mutajeni kullanılmaktadır. Colchicine insanlar ve hayvanlar için toksik bir maddedir. Colchicine alternatifi, daha az toksik ve daha ekonomik herbisitleri belirleyebilmek amacıyla pronamid, trifluralin ve oryzalin etken maddeleri ile çalışılmıştır. Colchicine uygulaması pozitif kontrol grubunu, Dimetil sülfoksit uygulaması ise negatif kontrol grubunu oluşturmuştur. Haploid tohumlar çimlendirilerek koleoptil ve kökükte kısaltma-yaralama yapılmıştır. Kromozom katlaması için çimlendirilmiş tohumlara 3 farklı herbisit etken madde, pozitif kontrol ve negatif kontrol uygulanmıştır. Canlı kalan bitki oranı, erkek ve dişi çiçek oluşturma oranları, fertil erkek çiçek oranı, kendileme yapılan bitki oranı ve bitki başına düşen tohum sayısı parametrelerinin tamamı için uygulamalar arasında fark %0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Pronamid ve trifluralin fertil erkek çiçek oranında, oryzalin bitki başına tohum sayısında başarılı olurken kendileme yapılan bitki oranında mutajenlerin tamamı başarılı olmuştur. Çimlenme döneminde uygulama yapılan herbisit etken maddelerinin colchicine oranla canlı bitki oluşturmada letal etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

## Effects of Alternative Mutagens on Chromosome Doubling during the Germination Period of Maternal Haploids

### Abstract

The value and importance of breeding studies, in parallel with the demands and desires of the population that has been increasing for years, is understood better every day. New technologies have been included in breeding techniques in line with developing technology and opportunities. Haploid techniques used to shorten the breeding period have allowed the development of maize lines in a short time of 1-2 years. Colchicine mutagen is mostly used for chromosome doubling. Colchicine is a toxic substance to humans and animals. The active ingredients propanamide, trifluralin, and oryzalin were studied to identify less poisonous and more economical herbicides as alternatives to the chemical substance colchicine. Colchicine application constituted the positive control group, and dimethyl sulfoxide application constituted the negative control group. Haploid seeds were germinated and shortening-wounding was done in the coleoptile and radicle. Three different herbicide active ingredients, positive control, and negative control, were applied to the germinated seeds for chromosome doubling. The difference between treatments was significant at 0.01% for all parameters such as the rate of surviving plants, rates of male and female flower formation, rate of fertile male flowers, rate of selfed plants, and number of seeds per plant. Propanamide and trifluralin were successful for the fertile male flower rate, oryzalin for the number of seeds per plant, and all mutagens were successful for the selfed plant rate. It has been determined that the herbicide active ingredients applied during the germination period have a more lethal effect on creating viable plants than colchicine.

### Araştırma Makalesi

### Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi :25.04.2024

Kabul Tarihi :30.05.2024

### Anahtar Kelimeler

Mısır  
ıslah  
haploid  
kromozom katlaması  
mutajen  
herbisit

### Research Article

### Article History

Received :25.04.2024

Accepted :30.05.2024

### Keywords

Maize  
breeding  
haploid  
chromosome doubling  
mutagen  
herbicide

## 1. Giriş

Klasik bitki ıslahı hem genetik faktörler hem de çevresel koşullar etkisinde olduğundan sonuca ulaşmak çok uzun zaman almaktadır. Bitki türüne göre değişmekle beraber bir çeşidin ıslah edilebilmesi yaklaşık 10 ile 14 generasyon sürmektedir. Kendilenmiş hat geliştirme, melez mısır ıslah programlarının temel konusudur. Geleneksel metotlarla bu saf hatların elde edilmesinde (çeşitlere göre farklılık göstermekle beraber) en az 6-7 generasyona ihtiyaç duyulmakta ve bu sürenin sonunda yine de % 100 homozigotluk düzeyine ulaşmak mümkün olmayabilmektedir. Islah çalışmalarında haploid bitki elde etme tekniklerinin kullanılmasıyla birlikte kısa sürede % 100 homozigot hatlar elde edilebilmekte ve böylece ıslah çalışmalarında süreç kısalmakta, ıslah çalışmalarının hızlı ve güvenilir bir şekilde etkinliği arttırılmaktadır (Cerit ve ark., 2016).

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

Günümüzde yaygın kullanılan haploid indirgeyici hatlarda R1-nj alleli antosiyanin biyosentezi için gerekli diğer genlerle birleştirilmiştir. Islah programlarında kullanılan çoğu mısır germplasmı tane veya bitki dokusunda kırmızı-mor rengi veren antosiyanin biyosentezleyen genlere veya R1-nj alleleline sahip değildir. Antosiyanin renk geni içermeyen kaynak materyal ile baba olarak kullanılan indirgeyici hatlar melezlendiğinde R1-nj geni renksiz r1 alleleline dominant olduğundan elde edilen tüm tohumlarda embriyo ve endospermde Navajo fenotipinin ortaya çıkması beklenir. Fakat R1-nj allelinin farklı ifadeleri maternal haploidlerin diploidlerden ayırımına olanak

sağlar (Chaikam ve Boddupalli, 2012). İndirgeyici hatlar kullanılarak in vivo tekniği ile haploid bitki elde etme başarısı, kullanılan indirgeyici hattın özelliklerine göre %2-15 arasında değişmektedir (Röber ve ark., 2005). Haploid bitkilerin tanımlanmasında; flowsitometrik yöntem, çiçek tozlarının boyutlarının ölçülmesi, epidermis hücrelerinde kloroplastların sayılması, karyotipik çalışmalarla kromozom sayılması kullanılması yanı sıra R1-nj renk markörü ile morfolojik düzeyde çok daha hızlı, basit ve ucuz bir şekilde tanımlama yapılmaktadır.

Haploid bitkilerin üreme organlarında mayoz bölünme esnasında homolog kromozom çiftleri oluşturma gibi ilerleyemediğinden, erkek ve dişi gametler üretken değildir. Haploid bitkilerin  $2n=20$  kromozomlu fertil bitki oluşturacak duruma gelebilmesi için kromozom katlaması yapılması gerekmektedir. Kromozom katlayıcı ajan olarak colchicine (*Colchicum autumnale* L.), kloral hidrat, eter, kloroform, fenil ürean gibi maddeler kullanılmaktadır (Yaralı ve Yanmaz, 2013). Yapay kromozom katlama, haploid bitkilerin anti-mikrotübül aktivite sergileyen mutajenlerle işlenmesiyle elde edilir. Colchicine kimyasal maddesi, yapay kromozom katlama işlevi neticesinde doubled haploid (DH) hattı üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Chaikam ve Mahuku, 2012; Melchinger ve ark., 2016b). Colchicine,  $\beta$ -tübüline bağlanarak tübülün dimerlerinin oluşumunu önleyerek mikrotübül oluşumunu engeller. Sürgün apeksindeki meristematik hücrelerde mitoz sırasında mikrotübüllerin bulunmaması, kopyalanan kromozomların ayrılmasını, polar migrasyonu ve hücre bölünmesini önler bu da iki kat kromozom sayısına sahip bir hücreye dönüşmesine neden olur (Chaikam ve ark., 2019). Kısacası mitotik bir inhibitör görevi gören colchicine, mitoz bölünme sırasında iğ iplikçiklerinin oluşumunu engellemekte dolayısıyla kromozomların ayrılmasını inhibe ederek kromozomları katlama işlevini gerçekleştirmektedir (Şehirali ve Özgen, 2013; Özgören, 2015).

Haploid bitkiler in vitro ve in vivo olarak elde edilebilmektedir. Haploidler, döllenmemiş dişi yumurtadan (gynogenesis) veya erkek hücrenden (androgenesis) geliştirilir. In vitro androgenesis metodu anter kültürü ile yapılır. İndirgeyici hatların tozlayıcı olarak kullanıldığı yöntem in vivo olarak tanımlanır (Cengiz ve Korkut, 2016). In vitro haploid bitki elde etme teknikleri laboratuvar şartlarında örneğin, anter veya mikrospor kültürü, polenlerin farklı derecelerde sıcaklığa maruz bırakılarak haploid bitkilerin elde edilmesi (Mathur ve ark., 1980), polenlerin ışınlanması (Mathur ve ark., 1976), koçan püsküllerine maleic hydracide uygulaması (Zuoyo ve Mingguang, 1984) ve çeşitli herbisitlerin uygulanması şeklinde yapılmaktadır. Ancak mısır bitkisinde bu tür in vitro uygulamalarda genotip etkisi nedeniyle yeterli oranda sonuç alınamamaktadır. Ticari olarak geliştirilen mevcut katlanmış hatların birçoğunun in vivo haploid tekniği ile elde edildiği, diğer tekniklerin ise katlanmış hat geliştirmede daha az etkili olduğu bildirilmektedir (Geiger ve Gordillo, 2009).

Prigge ve ark. (2012) anti-mitotik aktivite sergileyen kimyasallar ya da çeşitli herbisitler ile standart bir protokol eşliğinde haploid bitkilere uygulanarak, diploid fertil bitki haline dönüştürüldüğü bildirilmiştir.

Colchicine, DH indüklenmesinde en sık kullanılan kimyasal ajandır. Ancak bu mutajen, yüksek toksisite dezavantajına sahiptir. Colchicine ile aynı etkiye sahip olması gereken fakat toksik olmayan veya düşük toksik ikame maddeleri bulmak gereklidir. Dhooghe ve ark. (2011) çalışmalarında birincil etki mekanizması olarak mitozu hedefleyen anti-mikrotübül etkideki çeşitli herbisitlerin, colchicine kimyasalına alternatif olabileceğini bildirmişlerdir. Bunların dinitroanilinler (trifluralin ve oryzalin), fosforotioamidatlar (amiprofos-methyl (APM)), benzamidler (pronamid), karbamatlar (klorpropham ve izopropil N -3-klorofenil karbamat) ve diğerleri olmak üzere çeşitli gruplarda sınıflandırıldığını açıklamışlardır. Ayrıca mitoz bölünme esnasında hücre bölünmesinin

inhibe edildiği ve etkilenen hücrelerde poliploid çekirdekler içerdiği belirtilmiştir.

APM ve oryzalin, farklı uygulama koşulları altında haploidleri ikiye katlamak için kullanılmış ve iki katına çıkma etkileri colchicine ile karşılaştırılmıştır. APM tarafından indüklenen en yüksek iki katına çıkma oranının 20  $\mu$ M 24 saat koşulunda yaklaşık % 45 olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, gerçek iki katına çıkma oranını (hayatta kalma oranı  $\times$  iki katına çıkma oranı) hesaplamış; % 38.23 APM, % 20.64 colchicine ve % 19.4 oryzalin olarak belirlemişlerdir. Hem APM hem de oryzalin, gerçek ikiye katlama oranıyla karşılaştırıldığında mısır bitkisinde haploidlerin ikiye katlanmasını indükleyebilse de APM colchicinden daha iyi olmuştur. Düşük toksik bir mitotik indükleyici olarak APM'nin, DH tabanlı mısır ıslahının uygulaması için mısır haploidlerini ikiye katlamada colchicine mutajenine iyi bir ikame olacağı belirtilmiştir (Ren ve ark., 2018).

Trifluralin uygulamalarının kromozom katlaması üzerindeki etkileri, 10  $\mu$ M'ye kadar artan herbisit konsantrasyonuyla yenilenen diploid bitkilerin yüzdeleri için yaklaşık olarak doğrusal bir artış gösterirken, 10  $\mu$ M'den fazla herbisit ile muameleden sonra şiddetli toksisite etkisinden dolayı bitki oluşumunu engellediği bilinmektedir (Hansen ve ark., 1996).

Oryzalin ve APM'nin mekanizması üzerine yapılan çalışmalarda, tübülün proteinlerine bağlandıklarını, mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ettiklerini ve anafaz içinin depolimerizasyonunu teşvik ettiklerini bildirmişlerdir (Morejohn ve ark., 1987; Murthy ve ark., 1994). Pronamidin ise diğer herbisitlerden farklı olarak mikrotübülleri engellemek yerine kısalttığından bahsedilmektedir (Singh ve ark., 2023). Farklı çalışmalarda benzer yaklaşımlar gözlemlenmiştir. APM, trifluralin, oryzalin ve pronamid gibi herbisitler, tübülüne bağlanarak iğ oluşumunu önlemiş ve kardeş kromatidlerin zıt kutuplara doğru ayrılmasını kesintiye uğratarak kromozomal ikiye katlanmanın gerçekleşmesini mümkün kılmıştır (Bartels ve Hilton, 1973; Morejohn ve Fosket, 1984; Singh ve ark., 2023).

Melchinger ve ark. (2016a) ise colchicine'nin bitki tübülünlerine karşı afinitesinin anti-mikrotübül herbisitlerden daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu bilgi eşliğinde colchicine milimolar miktarlarda kullanılması gerekirken, anti-mitotik herbisitlerin ise mikromolar konsantrasyonlarda uygulanması gerektiği kanaatine varılmıştır (Bartels ve Hilton, 1973; Morejohn ve Fosket, 1984; Singh ve ark., 2023).

Trifluralin, oryzalin ve APM buğday (Hansen ve Andersen, 1998), mısır ve (Wan ve ark., 1991), mantar meşesi (Pintos ve ark., 2007) androjenz sırasında kromozom katlaması için kullanılmıştır. Birçok araştırmacı bu herbisitlerin bitki mikrotübüllerinde colchicine'den çok daha yüksek çekime sahip olduklarını ve mikromolar konsantrasyonlarda uygulanabilir olduklarını bildirmişlerdir (Morejohn ve ark., 1987; Bajer ve Mole-Bajer, 1986). Ayrıca bu herbisitler hayvan mikrotübüllerine bağlanamazlar (Morejohn ve ark., 1987; Murthy ve ark., 1994; Bajer ve Mole-Bajer, 1986), bu yüzden de insanlar için toksisite riskini azaltmış oldukları belirtilmiştir.

Chaikam ve ark. (2019) anti-mitotik herbisitlerin, colchicine kimyasalının uygulandığı protokollere kıyasla biraz daha düşük verimlilik gösterecek de bu herbisitlerin kullanımının, hayvan mikrotübülüne bağlanmadığı için daha az toksik olduklarını ve katı bir imha kurallarına uymaya ihtiyaç duyulmadığı için kromozom katlamasını uygulayan kişilerde sağlık risklerini en aza indirebildiğini ve kromozomal ikiye katlama maliyetlerini azaltabileceğini bildirmişlerdir.

Hansen ve Andersen (1998) trifluralin herbisit konsantrasyon uygulamalarının, kromozom katlaması üzerindeki etkileri 10  $\mu$ M'ye kadar artan konsantrasyonlarda denediklerini ve yenilenen diploid bitkilerin yüzdeleri yaklaşık olarak doğrusal bir artış gösterirken, 10  $\mu$ M'den fazla herbisit muamelesinden sonra şiddetli toksisite etkisinden dolayı bitki oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir.

Bu çalışma; in vivo maternal haploid tekniğinde kromozom katlaması için kullanılan oldukça zehirli bir kimyasal olan colchicine kimyasalına alternatif ve daha ekonomik bir mutajen belirlemek amacıyla planlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Çalışma Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesinde tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak laboratuvar koşullarında ve sera koşullarında yürütülmüştür. In vivo maternal haploid tekniği ile elde edilmiş haploid tohumlar bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Tek bir donörden elde edilen haploidler kullanılarak, kromozom katlamasına donörün etkisi ortadan kaldırılmıştır. Kromozom katlaması için colchicine, trifluralin, oryzalin ve pronamid etken maddeleri kullanılmıştır.

### 2.1. Konsantrasyonların hazırlanması

Kromozom katlaması için kullanılan colchicine uygulaması pozitif kontrol grubunu DMSO (Dimetil sülfoksit- Kromozom katlamasına etkili değildir) uygulaması ise negatif kontrol grubunu oluşturmuştur. Pronamid, trifluralin ve oryzalinin her biri için 3 mM ve % 2 DMSO ile karıştırılıp stok solüsyonları hazırlanmıştır. Nihai konsantrasyonlar pronamid 10  $\mu$ M, trifluralin 10  $\mu$ M ve oryzalin 20  $\mu$ M olacak şekilde % 2'lik DMSO kullanılarak ayarlanmıştır. Colchicine solüsyonu, % 0.04 colchicine % 0.5 DMSO ile çözdürülerek su ile 1.5  $\mu$ M konsantrasyonu ayarlanarak hazırlanmıştır. %2 DMSO hazırlanırken distile su kullanılmıştır.

### 2.2. Mutajenlerin uygulanması

Haploid tohumlar; petri kaplarına konularak inkübatörde, karanlıkta ve 23 °C'de çimlendirilmiştir. Bu çalışmada kromozom katlaması için colchicine uygulamasında Deimling metodu (Deimling ve ark., 1997) kullanıldığından ve diğer mutajenler de aynı dönemde uygulandığından yöntemle göre koleoptil uzunluğu 1.5-2 cm olduğunda materyaller inkübatörden alınmıştır. Koleoptil ve kökçüğün uçlarından bistüri ile kesilerek

yaralama yapılmıştır. Her bir mutajen ve DMSO için ayrı cam kavanozlara alınan çimlenmiş haploid tohumlara uygulama yapılmıştır. Koruyucu önlemler dikkate alınmış ve tüm uygulamalar 24 saat süre ile 20 °C'de inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda saf su ile 3 kez yıkanmış ve ayrı viyollere ekilmiştir.

### 2.3. Bitkilerin büyütülmesi ve kendileme

Viyollere ekilen bitkiler 3-4 yapraklı döneme gelene kadar sera içinde plastik tünellerde büyütülmüştür. Her mutajen için fideler 5 m sıra uzunluğu, 70 cm sıra arası ve 20 cm sıra üzeri olacak şekilde sera içinde toprağa ayrı sıralara dikilmiştir. Gerekli gübreleme ve bakım şartları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada; canlı kalan bitki oranı, erkek ve dişi çiçek oluşturma oranları, fertil erkek çiçek oranı, kendileme yapılan bitki oranı ve bitki başına düşen tohum sayısı parametreleri alınmıştır. Çiçeklenme döneminde bitkilerde koçan nüveleri henüz püskül çıkarmadan izolasyon kâğıdı ile kapatılmıştır. Aynı bitkide tepe püskülü kontrol edilerek fertil olanlarda ana eksen % 50 anter çıkarıp polen dökmeye başladığında izolasyon kâğıdı ile kapatılmıştır. Koçan püskülü 2-3 cm olduğunda aynı bitkideki tepe püskülünden alınan polen koçan püskülüne dökülerek kendileme yapılmış ve izolasyon kâğıdı ile kapatılmıştır. Koçana kapatılan izolasyon kağıtları hasada kadar muhafaza edilmiştir.

### 2.4. İstatistik analizler

Parametrelerden elde edilen veriler JMP istatistik paket programı kullanılarak tesadüf parselleri deneme desenine göre varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizlerinde önemli farklılıklar tespit edilen parametreler için Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanarak gruplandırılmıştır (Düzgüneş ve ark., 1987).

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. Canlı kalan bitki oranı

Negatif kontrol (DMSO), pozitif kontrol (colchicine) ile pronamid, oryzalin ve trifluralin herbisitleri uygulanmış

çimlendirilmiş haploid tohumlar 3-4 yapraklı olana kadar viyollerde büyütülmüştür. 3-4 yapraklı fide olan bitki sayıları uygulama yapılan tohum sayısına oranlanarak elde edilen verilere yapılan istatistik analize ait değerler ve Duncan grupları Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre en yüksek canlı kalan bitki oranı negatif kontrol DMSO'da % 88.9 olarak belirlenmiştir. DMSO'nun kromozom katlaması üzerine etkisi olmadığı gibi uygulama sonrası mortalite oluşturma durumu da düşük olmuştur. Pozitif kontrol colchicine'in uygulandığı çimlendirilmiş tohumların % 56.7'si canlı bitki oluşturmuştur. Pronamid, oryzalin ve trifluralin uygulamaları düşük değerler vermiştir. Çimlenme döneminde herbisit uygulamasının canlı bitki oluşumuna olumsuz etki ettiği görülmüştür. Chaikam ve ark. (2019) anti-mikrotübül herbisitlerin, colchicine kimyasalının uygulandığı protokollere kıyasla biraz daha düşük verimlilik gösterdiğini belirtmişlerdir.

### 3.2. Erkek çiçek oluşturma oranı

Canlı kalan bitkiler seraya dikilmiş ve çiçeklenme döneminde erkek çiçek oluşturma durumları gözlemlenmiştir. Erkek çiçek sayıları uygulama yapılan tohum sayısına oranlanarak elde edilen erkek çiçek oluşturma oranı verileri ve Duncan grupları Tablo 1'de verilmiştir. En yüksek erkek çiçek oluşturma oranı DMSO'da % 88.9 olarak belirlenmiştir. Colchicine uygulaması ikinci sırada ve % 56.7 olarak bulunmuştur. Pronamid, oryzalin ve trifluralin uygulamalarında erkek çiçek oluşturma oranı canlı kalan bitki sayısına bağlı olduğundan düşük değerler vermiş ve c grubunda yer almışlardır.

### 3.3. Dişi çiçek oluşturma oranı

Çiçeklenme döneminde dişi çiçek oluşturma durumları gözlemlenmiştir. Dişi çiçek sayıları uygulama yapılan tohum sayısına oranlanarak elde edilen dişi çiçek oluşturma oranı verileri ve Duncan grupları Tablo 1'de verilmiştir. En yüksek dişi çiçek oluşturma oranı DMSO'da % 77.8 olarak belirlenmiş ve a grubunda yer almıştır. Colchicine uygulaması ikinci sırada % 56.7 olarak bulunmuştur.

Pronamid, oryzalin ve trifluralin uygulamalarında dişi çiçek oluşturma oranı düşük değerler vermiş ve c grubunda yer almıştır.

### 3.4. Fertil erkek çiçek oranı

Erkek çiçek oluşturan bitkilerde polen üretimi gerçekleşen tepe püskülleri belirlenmiştir. Bu çalışmada kromozom katlamasının gerçekleştiğine dair en net bilgileri oluşturan parametrelerden biri olan fertil erkek çiçek oranı değerleri ve Duncan grupları incelendiğinde en yüksek değer; pronamid ve trifluralin uygulamalarında % 100 olarak belirlenmiş, a grubunda yer almışlardır. Oryzalin uygulamasında % 91.7 ve colchicine

uygulamasında ise % 85.9 olarak belirlenmiştir. Kromozom katlamasına etkisi olmayan DMSO uygulamasında erkek çiçeklerin steril oldukları gözlemlenmiştir. Anti-mitotik aktivite sergileyen kimyasallar ya da çeşitli herbisitler ile standart bir protokol eşliğinde haploid bitkilere uygulanması ile diploid fertil bitki elde edilebildiği bildirilmiştir (Prigge ve ark. 2012). Trifluralin, oryzalin ve pronamid herbisitlerinin, tübülüne bağlanarak iğ oluşumunu önlediği ve kardeş kromatidlerin zıt kutuplara doğru ayrılmasını kesintiye uğratarak, kromozom katlamasının gerçekleşmesini mümkün kıldığı bilinmektedir (Singh ve ark., 2023).

**Tablo 1.** Canlı kalan bitki oranı, erkek çiçek oluşturma oranı, dişi çiçek oluşturma oranı, fertil erkek çiçek oranı ve duncan gruplandırmaları

Uygulama	Canlı kalan bitki oranı (%)	Erkek çiçek oluşturma oranı (%)	Dişi çiçek oluşturma oranı (%)	Fertil erkek çiçek oranı (%)
DMSO	88.9 a	88.9 a	77.8 a	0
Colchicine	56.7 b	56.7 b	56.7 b	85.9 b
Oryzalin	11.1 c	11.1 c	11.1 c	91.7 ab
Pronamid	8.9 c	8.9 c	8.9 c	100 a
Trifluralin	10.0 c	10.0 c	10.0 c	100 a
CV (%)	15.7	15.7	11.4	9.5

### 3.5. Kendileme yapılan bitki oranı

Erkek ve dişi çiçeği oluşturan ve fertil tepe püskülüne sahip bitkilerde kendileme yapılmıştır. Kendileme yapılan bitki sayısının canlı kalan bitki sayısına oranlanması ile bulunan kendileme yapılan bitki oranı değerleri ve Duncan grupları Tablo 2’de verilmiştir. Tablo incelendiğinde kromozom katlaması için kullanılan mutajenlerin tamamında % 100 olarak gerçekleşmiştir. Kromozom katlamasına etkisi olmayan DMSO fertil tepe püskülü oluşturmadığından kendileme yapılamamıştır. Colchicine kimyasalına alternatif olarak kullanılan oryzaline, pronamid ve trifluralin uygulamalarının fertil tepe püskülü oluşturmaları bitkilerde kendileme yapılmasını mümkün kılmıştır.

### 3.6. Bitki başına tohum sayısı

Kendileme yapılarak elde edilen tohumlar

bitki sayısına oranlanarak bitki başına tohum sayısı bulunmuştur. Bitki başına tohum sayısı verileri ve Duncan grupları incelendiğinde oryzalin uygulamasından elde edilen fertil bitkilerde yapılan kendileme sonucu daha fazla tohum elde edildiği görülmektedir. Trifluralin uygulamasında ise 17.1 adet bitki başına düşen tohum elde edilmiş ve colchicine uygulamasından elde edilen veri ile aynı grupta yer almıştır. Pronamid uygulamasında 12.4 bitki başına tohum elde edilmiştir. DH hatların ilk generasyonunda bitkiler diploid homozigot hatlara göre daha küçük ve daha zayıf olmaktadır. Tepe püsküllerinin fertilitesi değişkenlik göstermekte bir veya birkaç anterin polen üretmesinden püskülün tamamının verimli hale gelmesine kadar değişebildiği bildirilmiştir (Chaikam ve ark., 2019). Bitki başına düşen tohum sayısının azlığı kromozom katlaması sonrası ilk generasyonun üretkenliğinin sınırlı olması ile açıklanabilir.

**Tablo 2.** Kendileme yapılan bitki oranı, bitki başına tohum sayısı ve duncan gruplandırmaları

Uygulama	Kendileme yapılan bitki oranı	Bitki başına tohum sayısı
DMSO	0	0
Colchicine	100 a	14.5 ab
Oryzalin	100 a	36.9 a
Pronamid	100 a	12.4 b
Trifluralin	100 a	17.1 ab
CV (%)	9.9	24.4

#### 4. Sonuçlar

Mısır bitkisi hem Dünya’da hem de Türkiye’de oldukça önemli oranda üretilmektedir. Yüksek adaptasyon kabiliyeti sayesinde ülkemizin birçok bölgesinde iklim ve toprak şartlarına uyum göstererek yetiştirilebilmektedir (Kolay ve ark., 2023). Türkiye’de mısır üretiminin artırılması konusunda yapılacak pek çok çalışma olmakla birlikte, bunların başında birim alan veriminin yükseltilmesi gelmektedir (Temiz ve Gökmen, 2023). Yüksek verimli yerli ve milli çeşitlerin geliştirilebilmesi için hızlı ve etkili bir ıslah programı yürütülmelidir. Melez mısır ıslahında homozigot hatların elde edilmesinde etkili bir yöntem olan in vivo maternal haploid tekniği yaygınlaşmaya başlamıştır. Maternal haploidlerin kromozom katlamasında tüm dünyada yaygın olarak kullanılan colchicine mutajeninin insan ve hayvanlar için zararlı etkileri nedeniyle uygulamanın özel ekipmanlar ve mekanlar gerektirmesi, atıkların bertarafında yaşanan güçlükler ve ekonomik olmaması araştırmacıları alternatif uygulamalar üzerinde çalışmaya yönlendirmiştir. Bazı anti-microtübül herbisitler ile yapılan kromozom katlaması çalışmaları önemli sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Ülkemizde in vivo maternal haploid tekniğinde colchicine mutajeni yerine kromozom katlaması için kullanılacak herbisitlerin belirlenmesi amacıyla bu çalışma yürütülmüştür. In vivo maternal haploidlerin kromozom katlamasında colchicine uygulaması Deimling ve ark. (1997)’e göre yapıldığından bu çalışmada da uygulama dönemi olarak tüm mutajenler için haploid tohumların çimlendirilip koleoptil ve kökçük oluşturduğu dönem seçilmiştir. Canlı kalan bitki oranı verileri değerlendirildiğinde oryzalin, pronamid ve trifluralin herbisitlerinin bu

dönemde uygulanmasının letal etkisinin yüksek olduğu söylenebilir. Anti-microtübül herbisitlerinin uygulama dönemleri için yeni çalışmaların yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Aynı herbisitler kullanılarak kromozom katlaması için fide döneminde yeni çalışmaların yapılması önerilmektedir. Sonuç olarak; kromozom katlamasının etkinliğini ifade eden parametrelerden fertil erkek çiçek oranı, kendileme yapılan bitki oranı ve bitki başına düşen tohum sayısı verilerine dayanarak oryzalin, pronamid ve trifluralin herbisitlerinin colchicine uygulaması kadar etkili olduğu saptanmıştır.

#### Yazarların Katkı Beyanı

Yazarlar makaleye eşit katkıda bulduklarını, makalenin yayına hazır son halini gördüklerini/okuduklarını ve onayladıklarını beyan ederler.

#### Çıkar Çatışması Beyanı

Tüm yazarlar, bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

#### Finansman

Bu çalışma Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığınca “128-2023” numaralı proje ile desteklenmiştir.

#### Açıklama

Bu çalışma ilk yazarın yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

#### Kaynaklar

Bartels, P.G., Hilton, J.L., 1973. Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham, and colchicine treatments on microtubules. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 13:462-472.

- Bajer, A.S., Molè-Bajer, J., 1986. Drugs with colchicine-like effects, specifically those that break down plant but not animal microtubules. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 466: 767-784.
- Cengiz, R., Korkut, K.Z., 2016. In vivo tekniği ile katlanmış haploid mısır hatlarının elde edilmesi. Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Cerit, İ., Cömertpay, G., Oyuncu, R., Çakır, B., Hatipoğlu, R., Özkan, H., 2016. Melez mısır ıslahında in vivo katlanmış haploid tekniğinde kullanılan farklı inducer genotiplerin haploid indirgeme oranların belirlenmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(1):52-57.
- Chaikam, V., Boddupalli, P.M., 2012. Doubled Haploid Technology In Maize Breeding: Theory And Practise. CIMMYT, Mexico, pp. 20-23.
- Chaikam, V., Mahuku, G., 2012. Doubled Haploid Technology In Maize Breeding: Theory And Practise. CIMMYT, Mexico, pp. 24-29.
- Chaikam, V., Molenaar, W., Melchinger, A.E., Boddupalli, P.M., 2019. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theoretical and Applied Genetics*, 132:3227-3243.
- Coe, E.H., Sarkar K.R., 1964. The detection of haploids in maize. *Journal of Heredity*, 55: 231-233.
- Deimling, S., Röber, F., Geiger, H.H., 1997. Methodik and genetik der in-vivo-haploideninduktion bei mais. *Vortr Pflanzenzüchtg*, 38: 203-224.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. Gürbüz, F., 1987. Araştırma ve Deneme Metotları. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları. No. 295. Ankara.
- Geiger, H.H., Gordillo, G.A., 2009. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*. 54:485- 499.
- Hansen, N.J.P., Andersen, S.B., 1998. In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* L. microspore culture. *Plant Breeding*, 117: 401-405.
- Kolay, B., Avşar, Ö., Bilge, U., Berekatoğlu, K., Kılınç, S., Oğurlu, F., Atakul, Ş., Çelik, Y., Eren, A., Öztürkmen, A.R., 2023. Killi bir toprakta yetiştirilen ana ürün mısırdaki farklı dar sıra ve çift sıra ekim yöntemlerinin mısır tanesinin kalite özelliklerine etkisi. *ISPEC Tarım Bilimleri Dergisi*, 7(3): 572-586.
- Mathur, D.S., Sachan, J.K.S., Sarkar, K.R., 1976. Radiation induced haploid and hetero-fertilization in maize. *Journal of Nuclear Agriculture and Biology*, 5: 76-77.
- Mathur, M.A., Sarkar K.R., 1980. Induction of maternal haploids in maize through heat treatment of pollen. *Current Science*, 49:744-746.
- Melchinger, A.E., Molenaar, W.S., Mirdita, V., Schipprack, W., 2016a. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled-haploid production. *Crop Science*, 56:559-569.
- Melchinger, A.E., Brauner, P.C., Böhm, J., Schipprack, W., 2016b. In vivo haploid induction in maize: comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. *Crop Science*, 56,1127–1135.
- Morejohn, L.C., Büro, T.E., Molè-Bajer, J., Bayer, A.S., 1987. Oryzalina dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta*, 172: 252-264.
- Morejohn, L.C., Fosket, D.E., 1984. Inhibition of plant microtubule polymerization in vitro by the phosphoric amide herbicide amiprofos-methyl. *Science*, 224:874-876.
- Murthy, J.V., Kim, H., Hanesworth, V.R., Hugdahl, J.D., Morejohn, L.C., 1994. Competitive inhibition of high-affinity oryzalin binding to plant tubulin by the phosphoric amide herbicide amiprofos-methyl. *Plant Physiology*, 105(1):309-320.



- Özgören, B., 2015. Mısırdaki doubled haploid bitki üretimi, <https://genetiksel.blogspot.com/2015/10/msrda-doubled-haploid-bitki-uretimi-i.html> (Erişim tarihi: 10.02.2024).
- Prigge, V., Xu X., Li L., Babu, R., Chen, S., Atlin, G.N., Melchinger, A.E., 2012. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics*, 190: 781-793.
- Pintos, B., Manzanera, J.A., Bueno, M.A., 2007. Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. *Journal of Plant Physiology*, 164:1595-1604.
- Ren, j., Ci, J., Ciu, X., Yang W., 2018. Doubling effect of anti-microtubule herbicides on the maize haploid. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(10):903-908.
- 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.
- Singh, P., Karnwal, M.K., Sahoo, S., Varalakshmi, S., Adhikari, S., Singh, N.K., 2023. Haploid-doubled haploid technology for accelerating hybrid development in maize (*Zea mays* L.). *Tropical Plant Biology*, 16:244-258.
- Şehirli, S., Özgen, M., 2013. Bitki Islahı (no. 1553), Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Temiz, A., Gökmen, S., 2023. Atıdışı mısırının F1 ve F2 generasyonlarında verim ve verim unsurlarının belirlenmesi. *ISPEC Tarım Bilimleri Dergisi*, 7(3):489-507.
- Zuoyo, Z., Minguang, G., 1984. Production of pure lines of maize through parthenogenesis induced by chemicals. *Acta Genetica Sinica*, 11:39-46.
- Yaralı, F., Yanmaz, R., 2013. Allium türlerinin ıslahında haploidi tekniğinden yararlanma. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2): 45-52.
- Wan, Y., Duncam, D.R., Rayburn, A.L., Petolino, J.F., Widholm, J.M., 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics*, 81:205-211.

**Atf Şekli**

Çakır, M., Cengiz, R., 2024. Alternatif Mutajenlerin Maternal Haploidlerin Çimlenme Döneminde Kromozom Katlaması Üzerine Etkileri. *ISPEC Tarım Bilimleri Dergisi*, 8(3): 747-755.

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.12787118>.

**To Cite**

Çakır, M., Cengiz, R., 2024 Effects of Alternative Mutagens on Chromosome Doubling during the Germination Period of Maternal Haploids *ISPEC Journal of Agricultural Sciences*, 8(3): 747-755.

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.12787118>.