

Haploid ve Diploid Mısır Bitkilerinde Karyotipleme için Kromozom Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Fatih KAHRIMAN^{1*}  Umut SONGUR²  Taha BAŞTUĞ³  Mehmet OVALI⁴ 

^{1,2,4}Tarla Bitkileri Bölümü, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale/ TÜRKİYE
³Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi,, Çanakkale/ TÜRKİYE

¹<https://orcid.org/0000-0001-6944-0512>

²<https://orcid.org/0000-0001-7035-9607>

³<https://orcid.org/0000-0002-2382-6302>

⁴<https://orcid.org/0009-0001-9644-9528>

* Corresponding author (Sorumlu yazar): fkahriman@hotmail.com

Received (Geliş tarihi): 20.11.2023

Accepted (Kabul tarihi): 23.01.2024

ÖZ: *In vivo* katlanmış haploid tekniği mısır ıslah çalışmalarında homozigot hatların geliştirilmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. *In vivo* katlanmış haploid tekniği kullanılarak oluşturulan haploid ve diploid bitkileri sınıflandırmak için çeşitli analiz tekniklerinden yararlanılmaktadır. Bu çalışmada *in vivo* katlanmış haploid tekniği ile elde edilen örneklerin plodi seviyesini belirlemek amacıyla farklı kromozom boyama yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, iki farklı donör (B73, HyaxB73) ile bir indirgeyicinin (CIM2GTAIL-P2) melezlenmesinden elde edilen haploid ve diploid mısır tohumları kullanılmıştır. Çimlendirilmiş tohumların kök meristemlerindeki plodi seviyelerini belirlemek için farklı ön işlemler (Soğuk su, Carnoy, Colchicine, ve Kontrol) ile iki boyama yönteminin (Acetocarmin, Feulgen) altı kombinasyonu karşılaştırılmıştır. Uygulanan muameleler; Ön işlem yok + Acetocarmin (T1), Ön işlem yok + Feulgen (T2), Soğuk su + Carnoy + 1N HCl + Acetocarmin (T3), Soğuk su + Carnoy + 1N HCl + Feulgen (T4), Colchicine + Carnoy + 1N HCl + Acetocarmin (T5), Colchicine + Carnoy + 1N HCl + Feulgen (T6) şeklinde düzenlenmiştir. İki donör materyalden elde edilen toplam 120 adet tohum örneği çimlendirilerek kök ucu örnekleri elde edilmiştir. Bu numunelere Acetocarmin ve Feulgen boyama yöntemleri uygulanarak toplam 6 farklı işlem uygulanmıştır. Hazırlanan slaytların dijital görüntüleri kaydedilmiş ve ImageJ yazılımı kullanılarak karyotip analizleri yapılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre 1N HCl uygulamasının Feulgen boyaması için kritik bir adım olduğu belirlenmiştir. Çalışmada test edilen kombinasyonlar arasında en başarılı sonuçlar T3 ve T4'ten elde edilmiştir. Bu uygulamanın görüntü analizlerine dayalı karyotip analizi sonrasında haploid numunelerde uzun kol/kısa kol oranlarının 1,86 ile 2,57 arasında değiştiği, diploid numunelerde ise 1,50 ile 3,42 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Haploid ve diploid örneklerin kromozomlarının farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Haploid örneklerin tüm kromozomları metasentrik iken diploid örneklerde metasentrik, sub-metasentrik ve sub-telosentrik kromozomlar tespit edilmiştir. Araştırmada farklı ön işlemlerin karyotip analizlerinde kullanılan dijital görüntülerin kalitesi üzerinde önemli bir etkisi olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Plodi, ön işlem, feulgen, acetocarmin, *Zea mays*.

Comparison of Chromosome Staining Methods for Karyotyping in Haploid and Diploid Maize Plants

ABSTRACT: *In vivo* doubled haploid technique is one of the methods employed in maize breeding studies for the development of homozygous lines. Various analysis techniques are utilized to distinguish between the haploid and diploid plants obtained using the *in vivo* haploid technique. The aim of this study was to compare different chromosome staining methods to determine the ploidy level of samples obtained by this technique. Haploid and diploid maize seeds obtained from the hybridization of two different donors (B73, HyaxB73) and an inducer (CIM2GTAIL-P2) were used in the study. Different pretreatments (Cold water, Carnoy, Colchicine and Control) and two staining methods (Acetocarmine, Feulgen) were compared in six combinations to determine ploidy levels in root meristems of germinated seeds. The treatments were: no pretreatment + Acetocarmine (T1), no pretreatment + Feulgen (T2), Cold water + Carnoy + 1N HCl + Acetocarmine (T3), Cold water + Carnoy + 1N HCl + Feulgen (T4), Colchicine + Carnoy + 1N HCl + Acetocarmine (T5), Colchicine + Carnoy + 1N HCl + Feulgen (T6). A total of 120 seed samples obtained from two donor materials were germinated, and root tip samples were collected. In these samples, the Acetocarmine and Feulgen staining methods were applied, resulting in a total of 6 different treatments. Digital images of the prepared slides were recorded, and karyotype analyses were conducted using ImageJ software. According to the study results, the application of 1N HCl was identified as a critical step for Feulgen staining. Among the tested combinations in the study, the most successful results were obtained from T3 and T4. After karyotype analysis of these treatments, it was found that the long arm to short arm ratios in haploid samples ranged from 1,86 to 2,57, while in diploid samples, they ranged from 1,5 to 3,42. It was detected that the chromosomes of haploid and diploid samples have different morphometric characteristics. All chromosomes of haploid samples were metacentric, while diploids had metacentric, sub-metacentric and sub-telocentric chromosomes. It was concluded that the pretreatment method has a significant effect on the quality of digital images used in karyotype analyses.

Keywords: Ploidy, pretreatment, feulgen, acetocarmine, *Zea mays*.

GİRİŞ

Mısırdaki *in vivo* katlanmış haploid tekniği homozigot hatların geliştirilmesi amacıyla kullanılan yaygın bir yöntem haline gelmiştir. Bu tekniğin en önemli aşamalarından biri haploid ve diploid tohumların sınıflandırılmasıdır (Prasanna ve ark., 2012). Haploid ve diploid tohum ayrımı tohumdaki antosiyanin renklenmesine göre yapılmaktadır. Tohumun sadece taç bölgesinde renklenme var ise haploid, hem taç bölgesi hem embriyo kısmında renklenme var ise diploid olarak sınıflandırılmaktadır (Prasanna ve ark., 2012). *In vivo* katlanmış haploid tekniği ebeveyn hatların geliştirilmesinde kullanılmaktadır ve bu teknikte haploid kabul edilen başlangıç tohumlarının kromozom katlama öncesi veya sonrasında ploidi seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Kromozomların yapısal ve sayısal analizlerinin yapılması özellikle *in vivo* katlanmış haploid tekniğinde önemli işlemlerdendir. Bu amaçla, kromozomları görünür hale getiren veya özel boyalar ve cihazlar yardımıyla ayırabilen farklı teknikler geliştirilmiştir (Maluszynska, 2003). Bu teknikler içerisinde sitogenetik yöntemlerle kromozom analizleri bilimsel çalışmalarda halen aktif olarak kullanılan eski yöntemler arasındadır (Shabir ve ark., 2017). Bu analizler ile aynı zamanda kromozomların yapısal özellikleri de incelenmekte olup, bu işleme karyotip analizi adı verilmektedir. Karyotipleme kromozom sayısı ve yapısını görmek, farklı bireylerde veya organizmalarda karşılaştırma yaparak varyasyonu gözlemlemek için kullanılan bir yöntemdir. Karyotip analizi bitkilerde fenotipik ve genotipik düzeyde meydana gelen varyasyonun kromozomal düzeyde anlaşılmasını sağlamaktadır. Bitkilerde zaman zaman gözlenebilen kromozom sayısındaki varyasyonlar (anöploidi ve/veya poliploidi) karyotipleme ile kolaylıkla incelenebilir (Guerra, 2008). Özellikle homozigot hatların geliştirilmesini konu edinen ıslah programlarında örneklerin ploidi seviyelerinin belirlenmesi ve kromozomal düzeyde herhangi bir anormallik olup olmadığının belirlenmesi kritik öneme sahiptir. Bu nedenle klasik veya modern ıslah tekniklerinde karyotip analizi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Karyotip analizlerinin gerçekleştirilmesi için kromozomların görünür hale getirilmesi ve hücre

içerisindeki diğer kısımlardan ayrıştırılması gerekmektedir. Bu amaçla farklı yöntemler kullanılmakta olup, kromozomların boyanması, DNA miktarının akış sitometrisi ile ölçümü yaygın olarak kullanılan tekniklerdendir. Akış sitometrisi hızlı ve güvenilir sonuç vermesine karşın cihaz maliyetinin yüksek olması, teknik deneyime ihtiyaç duyması, kullanılan kimyasalların tehlikeli sınıfta yer alması ve incelenen örneklerde anöploidlerin ayrımının gerçekleştirilememesi gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle ploidi tespiti gerektiren çalışmalarda maliyeti düşürmek için eski yöntemlerden olan kromozom boyama teknikleri ıslah programlarında halen aktif olarak kullanılmaktadır (Ribeiro ve ark., 2018). Kromozomların boyanmasında kullanılan yaygın metotlar, kullanılan boya veya boyamanın şekline göre isimlendirilmekte olup Acetocarmin, Acetoorcein, Feulgen, Giemsa bantlama, FISH (Flourecence *In situ* Hybridization) ve GISH (Genomic *In situ* Hybridization) gibi farklı adlar almaktadır. Bu metotlar içerisinde Acetocarmin ve Feulgen pratikte en fazla kullanılan yöntemlerdendir. Acetocarmin boyama yöntemi alglerden başlayarak (Godward, 1948) tüm hayvan ve insan dokuları da dahil olmak üzere diğer tüm gelişmiş gruplara uygulanabilen bir yöntemdir. Kromozom boyamada kullanılan Acetocarmin boyası asetik asit ve karminik asidin karışımından elde edilen bir maddedir. Karminik asit kaktüs bitkilerinin üzerinde yaşayan dişi *Dactylopius coccus* cinsi böceklerinden elde edilir (Hiremath ve Chinnappa, 2015). Karminik asit, kokinealin kaynar su ile ekstrakte edilmesinin ardından kurşun asetat ile muamele edilmesi ve kurşun karminatın sülfürik asit ile ayrıştırılmasıyla elde edilmektedir (Gatenby ve Beams, 1950). Bu boya, antrakinon grubuna aittir ve $C_{22}H_{20}O_{13}$ formülüne sahiptir. Acetocarmin boyası ise genel olarak %45'lik asetik asit içerisinde bu maddenin çözündürülmesi ile elde edilmektedir (Gurr, 1960). Feulgen boyası ilk kez Robert Feulgen tarafından bulunmuş ve DNA veya kromozomal materyallerin boyanması için kullanılmıştır. Feulgen nükleer reaksiyonu DNA'nın *in situ* lokalizasyonu için spesifik bir boyama yöntemi olarak yaygın kabul görmesine rağmen bazı araştırmacılar yöntemin spesifik olarak DNA'yı boyamadığını ileri sürmüştür (Stowel, 1946; Gomori, 1952; Lessler, 1953; Kurnick, 1955; Kasten 1956, 1960).

Feulgen boyama yönteminde yaygın olarak kullanılan reaktif Schiff reaktifi (Schiff's Reagent) olarak da bilinmektedir. Bu reaktifin asıl boyar maddesi Fuchsin veya rosaniline hydrochloride olarak bilinen morumsu kırmızı renkte bir madde olup, kimyasal formülü $C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$ 'dir. Schiff reaktifinin renginin kromozom yüzeyinde adsorpsiyon yoluyla yeniden oluştuğu ilk olarak Carr (1945) tarafından belirtilmiştir. Ayrıca kromozomlarda renklenmenin olabilmesi için sitoplazmik bileşenlerin asit hidrolizi ile yok edilmesi gerektiğini öne sürmüştür. Yaygın olarak kullanılan her iki kromozom boyama yönteminin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Nihai olarak boyama temelde bir adsorpsiyon sürecidir (Baker, 1958).

Kromozom boyamada bir diğer önemli husus, boyama öncesi örnekler yapılıp ön uygulamalardır. Bunların başlıcaları, soğuk su, Colchicine, 8-hydroxyquinoline gibi uygulamalardır. Bu uygulamaların ardından Feulgen gibi bazı boyama yöntemlerinde örneklerin asit içerisinde bekletilmesi gibi ilave uygulamalar da mevcuttur. Ön işlemlerin farklı kombinasyonlar halinde kromozom boyama ve karyotip analizlerinde kullanımını konu edinen çeşitli araştırmalar mevcuttur (Warmke, 1935; Swaminathan, 1954; Snow, 1963). Bu araştırmalarda farklı bitki türlerinde ön işlem ve kromozom boyama yöntemlerinin uyumu ele alınmış ve bitki türüne göre başarı oranının değişebileceği ortaya konulmuştur. Mısır bitkisinde de farklı boyama yöntemleri ile karyotip analizlerinin gerçekleştirildiği farklı araştırmalar yapılmıştır (Sadder ve Weber, 2001; Silva ve ark., 2018). Ancak yapılan literatür taramasında haploid ve diploid olarak ayrılmış mısır bitkilerinin kök ucu örneklerinde farklı kromozom

boyaları ile ön işlem kombinasyonlarının denendiği bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada farklı kromozom boyama yöntemleri kullanılarak haploid ve diploid olarak ayrılmış mısır bitkilerinin kök ucu dokularında kromozom analizlerinin yapılması ve en iyi sonuç veren ön işlem-boyama yöntemi kombinasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışma materyali

Çalışmada bitkisel materyal olarak iki donör [Hya-Elit Hat (G1), HyaxB73-Deneysel Hibrit (G2)] ve bir indirgeyici hattın (CIMG2TAILP2) induksiyon melezlemesinden elde edilen haploid ve diploid olmak üzere toplamda 120 tohum incelenmiştir. Çalışmada kullanılan haploid ve diploid materyaller ilk olarak sırası karışmayacak şekilde çimlendirme kağıtlarına dizilmiştir. Çimlendirmenin 7. gününde çimlenen tohumların birincil ve ikincil köklerinin tamamı 2-3 cm uzunluğunda kesilerek boyama işlemine alınmıştır. Bu aşamada 2 farklı kromozom boyama metodu kullanılarak toplamda 240 adet örnek üzerinde çalışılmıştır.

Uygulanan metotlar

Kök örnekleri 3 ön uygulama ve carnoy solüsyonu ile fikse edilerek toplamda 4 ön işleme tabi tutulmuştur. Ardından sitogenetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan 2 boyama metodu (Feulgen ve Acetocarmin) uygulanmıştır. Bu aşamada uygun laboratuvar şartlarında preparat öncesi yumuşatma için 1 N HCl bulunduran tüplere kök örnekleri konulmuştur daha sonra kromozom görüntüleri alınmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Araştırmada örneklerin hazırlanması ve ploidi düzeylerinin tespitinde kullanılan boyama uygulamalarının aşamaları
Table 1. Preparation of the samples and the stages of the staining applications used in the determination of ploidy levels.

Kod	1. Adım/1 th Stage (Ön İşlem/Pretreatment)	2. Adım/ 2 nd Stage (Fiksasyon/ Fixation)	3. Adım/3 rd Stage (Boyama öncesi yumuşatma/ Softening before staining)	4. Adım/4 th Stage (Boyama/Staining)
T1	Yok	Carnoy Solüsyonu	Yok	Acetocarmin
T2	Yok	Carnoy Solüsyonu	Yok	Feulgen
T3	Soğuk Su	Carnoy Solüsyonu	1 N HCl	Acetocarmin
T4	Soğuk Su	Carnoy Solüsyonu	1 N HCl	Feulgen
T5	Colchicine	Carnoy Solüsyonu	1 N HCl	Acetocarmin
T6	Colchicine	Carnoy Solüsyonu	1 N HCl	Feulgen

Uygulanan ön işlemler

Çalışmada ön işlem olarak üç farklı uygulama (Ön işlemsiz, Soğuk su uygulaması, %0,1'lik Colchicine) ve tüm örneklerde fiksasyon işlemi gerçekleştirilerek toplamda 4 ön işlem uygulanmıştır. Ön işlemsiz uygulamada kökler boyama öncesinde doğrudan Carnoy solüsyonu içerisine alınmış ve her iki boyama yöntemi için de bu uygulama (T1 ve T2) kontrol olarak kabul edilmiştir. Soğuk su uygulamasında ise kesilen kök örnekleri en az 16 saat buzlu su içerisinde +4 °C'de bekletilmiştir. Colchicine uygulaması kök örneklerinin %0,1'lik Colchicine solüsyonunda 24 saat bekletilmesi ile uygulanmıştır. Colchicine solüsyonunun hazırlanması için 0,1 gr Colchicine 100 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür. Kesilen örnekler ayrı ve işaretlenmiş tüplerde bulunan Colchicine solüsyonu içerisine alınarak ön işlem gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin fiksasyonu

Ön işlemde geçirilen örnekler Carnoy solüsyonu (3 Etanol:1 Asetik asit) bulduran santrifüj tüplerine alınmıştır. Örnekler bu tüplerde 12 saat bekletilmiştir.

Carnoy solüsyonu: 1 litre Carnoy solüsyonu hazırlamak için 750 ml Etanol ile 250 ml Asetik asit (3 Etanol:1 Asetik asit) 1 litrelik cam şişe içerisinde dikkatli bir şekilde karıştırılmıştır. Carnoy solüsyonu taze olarak hazırlanmıştır. Ön işlemde geçirilen örnekler Carnoy solüsyonu bulduran santrifüj tüplerine alınmıştır. Örnekler bu tüplerde 12 saat bekletilerek bir sonraki adıma geçilmiştir.

Yumuşatma işlemi

T1 ve T2 uygulamalarında örneklere ön işlem uygulanmadan yumuşatma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu adım için ikinci uygulama örneklerinde 6-8 dakika 60 °C'de 1 N HCl bulduran tüplerde tutulması ile uygulanmıştır. 1 N HCl hazırlanması için 82,81 ml %37'lik HCl 918 ml distile su ile karıştırılmıştır.

Kromozom boyama yöntemleri

Çalışmada boyama yöntemi olarak sitogenetik çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan boyalardan Feulgen ve Acetocarmin metodu uygulanmıştır.

Feulgen boyama metodu: 1 g bazik fuksin, 200 ml kaynayan saf suda yavaş yavaş eritilip

çalkalanmıştır. Hazırlanan bu solüsyon 50 °C kadar soğutulup filtrelenmiştir. Süzüntüye 30 ml 1 N HCl ve ardından 1 gr sodyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) eklenmiştir. Kabın ağzı tıpa ile kapatılmış ve ardından parafilm ile sarılmıştır. Kap alüminyum folyo ile sarılıp, karanlık bir odada oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Çözelti soluk saman rengi verdiğinde 0,5 g aktifleştirilmiş odun kömürü ilave edilerek iyice çalkalanmış ve 4 °C'de buzdolabında bir gece bekletilmiştir. Ardından tekrardan filtreleme işlemi yapılmış ve renkli bir şişede buzdolabında kullanıma hazır bir şekilde saklanmıştır. Bu yöntemde boyama için fiksasyon işleminden geçirilen kök örneklerinden birer adedi Feulgen boyasının içerisine alınmıştır. Boyama esnasında tüm kök ucunun boyandığına dikkat edilmiş ve 1-2 saat boya içerisinde bekletilmiştir.

Acetocarmin boyama metodu: %1'lik Acetocarmin boyası hazırlamak için 1 gr Karmin boyası kaynamakta olan 100 ml asetik asit (%45'lik) içerisinde çözdürülmüştür. Çözülen boya oda sıcaklığına geldiğinde süzülerek koyu renkli bir şişede +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Ön işlemde geçirilen kök örnekleri bu boya içerisinde 12 saat bekletilmiştir. Ardından karyotipleme aşamasına geçilmiştir.

Boyama sonrası kök uçlarından Singh (2016) tarafından önerilen ezme metodu ile preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar trinoküler mikroskopta (Olympus, ABD) 10x ila 100x büyütme aralığında incelenerek metafaz safhasında olan hücrelerin görüntüleri mikroskoba bağlanan dijital görüntü aktarım cihazı ile kayıt altına alınmıştır. Aynı büyütme kapasitelerinde kalibrasyon slaytı görüntüleri (Motic Europe, Spain) alınarak görüntü analizlerinde kullanılmak üzere jpeg uzantılı olarak kaydedilmiştir.

Karyotip analizleri

Kromozom sayısı ve yapısı ile ilgili ölçümler ise dijital görüntülerin İmageJ programında (Abramoff ve ark., 2004) işlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon slaytı ile kalibre edilen görüntü analiz programında metafaz safhasındaki hücrelerde kromozom sayıları, kol uzunlukları, sentromer bölgelerine göre kromozom türü ve telomerik bölge buldurup buldurmama gibi Green ve Sessions (1991) tarafından önerilen sınıflama kriterleri dikkate alınmıştır (Çizelge 2).

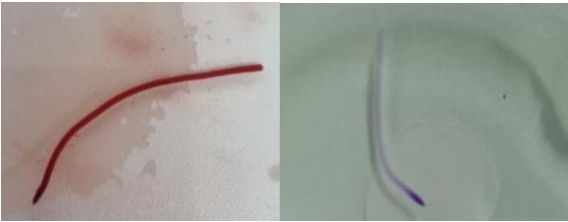
Çizelge 2. Karyotip analizinde kullanılan morfolojik ayırım kriterleri.

Table 2. Morphological discrimination criteria used in karyotype analysis

Kol Oranı Arm ratio	Kromozom morfolojisi Chromosome morphology
1,0 < 1,7	Metasentrik
1,7 < 3,0	Submetasentrik
3,0 < 7,0	Subtelosentrik
7,0 < ∞	Telosentrik

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada hem diploid hem de haploid örneklerde T2 uygulamasında (Carnoy-Feulgen) kök ucunun boyanmadığı görülmüştür. Bu uygulamada 1N HCl olmadan Feulgen boyasının sonuç vermediği anlaşılmıştır. Çalışmada Acetocarmin ve Feulgen ile boyanmış kök uçlarının görüntüsü Şekil 1.'de sunulmuştur. Her iki boyama yönteminde de kök ucu meristemi yoğun şekilde boyanmıştır. Buna karşın Feulgen boyama yönteminde yalnızca meristem bölgesinin yoğun şekilde boyandığı izlenmiştir. Acetocarmin yönteminde ise meristem dışındaki kısımlar daha açık renktedir (Şekil 1).



Şekil 1. Acetocarmin (solda) ve Feulgen (sağda) boyama yöntemleri ile muamele edilen kök uçlarının görünümü.

Figure 1. Appearance of root tips treated with Acetocarmin (left) and Feulgen (right) staining methods.

Haploid örneklerin kök ucu örneklerinin boyama sonrası görüntüleri Şekil 2'de sunulmuştur. Bu Şekillerde de görüleceği üzere T2 uygulamasından Feulgen boyama yöntemi ile sonuç alınamamıştır. Bu durumun boyama öncesinde kök ucu meristeminde daha önce renklenme olmamasından dolayı olduğu anlaşılmıştır. Diğer ön işlem ve boyama yöntemlerinden ise farklı kalitede görüntü elde edilmiştir (Şekil 2). Bu uygulamalar içerisinde özellikle T3 ve T4 uygulamalarındaki kombinasyonlardan hem Acetocarmin hem de Feulgen boyama yöntemleri ile daha yüksek kalitede görüntü elde edildiği dikkat çekmiştir. Özellikle T3 uygulamasında Acetocarmin ile boyanan kök

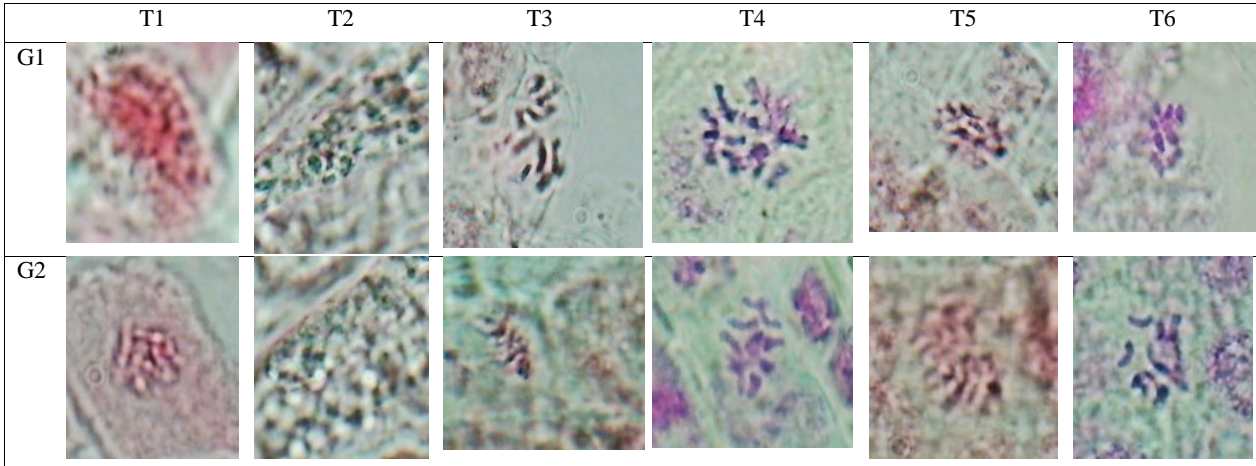
uçlarından alınan dokulardaki kromozomların oldukça belirgin olduğu görülmüştür (Şekil 2).

Diploid örneklerin kök uçlarından alınan dijital görüntüler Şekil 3'te gösterilmiştir. Haploid örneklerde olduğu gibi diploid örneklerin de T2 (Carnoy+Feulgen) uygulamasında kök örneklerinde kromozom ya da diğer dokuların boyanmadığı görülmüştür. Diploid örneklerde boyama sonrası en iyi görüntüler T3, T4 ve T6 uygulamalarından elde edilmiştir. Diğer uygulamalardan dijital görüntülerle yapılan analizlere uygun kalitede kayıt alınamamıştır (Şekil 3).

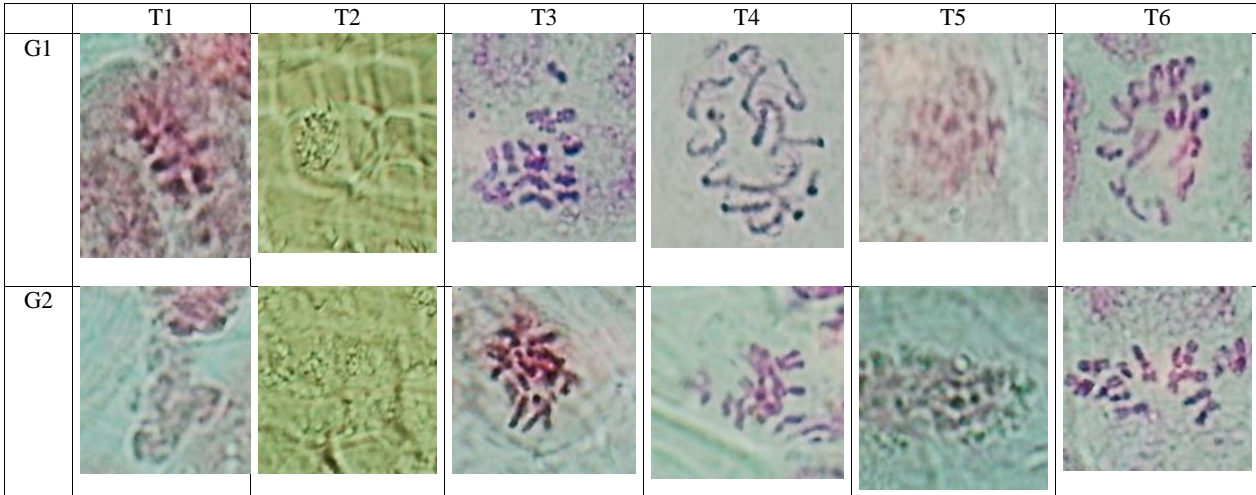
Boyamada kullanılan ön işlemlerden elde edilen sonuçlar dikkate alındığında mısır kök ucu dokularından kromozom görüntüleme soğuk su ön işleminin ardından fiksasyon ve 1 N HCl uygulamasının diğer ön işlemlerden daha başarılı sonuç verdiği belirlenmiştir. Boyama yöntemlerinden Feulgen yöntemi Acetocarmin yöntemine kıyasla daha belirgin kromozom görüntüleri sağlamıştır. Hem haploid hem diploid örneklerde 1 N HCl uygulaması yapılmadan Feulgen boyama yapıldığında boyanın dokulara nüfuz etmediği belirlenmiştir.

Bu bakımdan 1 N HCl uygulamasının Feulgen boyamada kritik bir adım olduğu görülmüştür. Bu işlem olmaksızın Feulgen boyasının kromozomların boyanmasında etkili olmadığı saptanmıştır. Karyotip analizlerinde kullanılan bazı boyalar kromozomlara bağlanmak için kimyasal reaksiyon gerektiren bazıları gerektirmez. Feulgen boyamada kromozomların boyanması için Schiff reaksiyonuna bağlı bir dizi kimyasal adıma dayalı olarak gerçekleşmektedir (Eng ve ark., 2020). Feulgen ile boyamada HCl ile yumuşatma işlemi kritik bir adımdır. Bu işlem DNA'daki pürini şekerden ayırmakta ve aldehit grubunu açığa çıkarmaktadır. Daha sonra Feulgen'den gelen Fuchsin sülfür asidi aldehit ile reaksiyona girerek kromozomlarda macenta rengini oluşturmaktadır (Sharma ve Sharma, 2019).

Feulgen boyasının kromozomları boyamada oldukça etkili olduğu ve kromozomların etrafındaki sitoplazmayı boyamadığı bildirilmiştir (Eng ve ark., 2020).



Şekil 2. Haploid olarak ayrılan örneklerin farklı ön işlem ve boyama yöntemleri ile muamelesi sonrasında alınan görüntüleri.
Figure 2. Images of haploid samples after application with different pretreatment and staining methods.



Şekil 3. Diploid olarak ayrılan örneklerin farklı ön işlem ve boyama yöntemleri ile muamelesi sonrasında alınan görüntüleri.
Figure 3. Images of diploid samples after application with different pretreatment and staining methods.

Çalışmada boyama sonrasında alınan dijital görüntülerden analiz edilebilecek kalitede olanlardan elde edilen karyotip analizi sonuçları aşağıda sunulmuştur. Diploid örneklere ait kol oranları 1,50 ile 3,42 arasında değişkenlik göstermiştir. Bu oranlara göre kromozom morfolojileri bakımından üç farklı sınıf olduğu gözlenmiştir. Görüntüde tespit edilebilen kromozom çiftleri içerisinde 3 adedinin subtelosentrik, 6 adedinin submetasentrik ve 1 adedinin ise metasentrik olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). Haploid örneklere ait kol oranları 1,86 ile 2,57 arasında değişmiştir. Kromozom morfolojilerinin tamamı submetasentrik olarak sınıflanmıştır (Çizelge 4).

Çizelge 3. Diploid örnekte dijital görüntüleri dayalı karyotip analizi sonuçları.

Table 3. Karyotype analysis results based on digital images in diploid sample.

Kromozom Chromosome	Kol Oranı Arm ratio	Kromozom Morfolojisi Chromosome morphology
1-4	3,20-3,42	Subtelosentrik
2-20	3,00-3,01	Subtelosentrik
3-16	3,05-3,04	Subtelosentrik
5-17	2,69-2,65	Submetasentrik
8-11	2,62-2,61	Submetasentrik
7-9	2,56-2,59	Submetasentrik
14-19	2,30-2,24	Submetasentrik
10-15	2,11-2,10	Submetasentrik
6-13	1,73-1,79	Submetasentrik
12-18	1,53-1,50	Metasentrik

Çizelge 4. Haploid örnekte dijital görüntülere dayalı karyotip analizi sonuçları.

Table 4. Karyotype analysis results based on digital images in haploid sample

Kromozom Chromosome	Kol Oranı Arm ratio	Kromozom Morfolojisi Chromosome morphology
1	2,43	Submetasentrik
2	2,44	Submetasentrik
3	2,27	Submetasentrik
4	1,89	Submetasentrik
5	1,86	Submetasentrik
6	2,36	Submetasentrik
7	2,19	Submetasentrik
8	2,37	Submetasentrik
9	2,09	Submetasentrik
10	2,57	Submetasentrik

Haploid ve diploid örneklerden alınan görüntülere dayalı karyotip analizinde kromozom sayıları net şekilde tespit edilmesine rağmen, bu örnek gruplarının kromozom morfolojilerinde farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Aynı tür içerisinde ploidi seviyesine bağlı olarak kromozom yapısında farklılık olmayacağı beklenmesine rağmen kullanılan boyama yöntemi, morfolojik tanımlama ve sınıflama kriterlerinde kullanılan sınır değerlerin farklı olması gibi hususlara bağlı olarak bilimsel çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Nitekim Silva ve ark. (2018) tarafından yürütülen araştırmada iki adet metasentrik, ve sekiz çift submetasentrik kromozom çifti tespit edilirken, mısır bitkisi üzerinde yürütülen bir diğer araştırmada üç metasentrik, 6 submetasentrik, ve bir akrosentrik kromozom çifti olduğu raporlanmıştır (Sadder ve Weber, 2001). Her iki çalışmada da boyama yöntemi olarak farklı tekniklerden yararlanılmıştır. Ayrıca kullanılan genetik materyaller de farklılık göstermektedir. Diğer taraftan Silva ve ark (2018) mısır kromozomlarından 5 kromozom çiftinin çalışmalara göre farklı sınıfta yer aldığını vurgulamıştır. Bu sonuçlar kullanılan boyama tekniği ve genotipe göre farklı bulgular elde edilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda da kol uzunluklarına göre kromozom morfometrilere yönelik sınıflarında farklılıklar olduğu görülmüştür. Bu durumun kullanılan dijital görüntü kalitesi ile yüksek oranda ilişkili olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca karyotip analizinde kullanılan ImageJ yazılımına ait

eklentinin hassasiyetinin de sonuçlar üzerine etkili olduğu düşünülmektedir.

SONUÇ

Kromozom sayımı ve karyotipleme çalışmaları genetik ve ıslah çalışmaları açısından temel uygulamalardandır. Bu çalışmada *in vivo* katlanmış haploid tekniğinin önemli basamaklarından olan haploid tespiti ve ayırımında sitolojik metot olarak farklı boyama yöntemlerinin etkinliği karşılaştırılmıştır. Ayrıca iyi sonuç alınan uygulamalara ait dijital görüntüler üzerinden kartoyip analizi gerçekleştirilmiştir. Acetocarmin ve Feulgen yöntemleri genetik ve ıslah çalışmalarında kromozom sayısı ve yapısı ile ilgili analizlerde halen kullanılan en hesaplı yöntemlerdendir. Bu çalışmada denenen yöntemler içerisinde haploid ve diploid örneklerde her iki boyama yöntemi için de soğuksu+Carnoy+1N HCl ön işlem kombinasyonunun önerebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Diğer taraftan ileriki çalışmalarda farklı kimyasallar ile ön işlemlerin uygulanmasının yanı sıra daha yüksek çözünürlüklü dijital kameralar kullanılarak karyotip analizi ve kromozom sayımında daha başarılı sonuçların elde edilmesi de mümkün olabilir.

Bu araştırmada, mısırın kök ucu dokularında soğuk su (+4 °C) uygulamasının ardından fiksasyon ve 1 N HCl ile yumuşatma işleminden sonra boyama yapılması halinde hem haploid hem diploid örneklerde görüntü işleme yazılımları ile analiz edilebilecek çıktılar elde edilebileceğini gösterilmiştir. Diğer uygulamalardan elde edilen sonuçlar içerisinde T6 dışındaki (Colchicine+Carnoy Solüsyonu+1 N HCl ve Feulgen boyama) uygulamalardan kaliteli görüntü elde edilememiştir. Bu durumun yalnızca uygulanan yöntemle ilişkili olmadığı, aynı zamanda görüntüleme için kullanılan dijital kameranın da çok önemli etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Araştırmada kullanılan dijital kamera göz ile tespit edilen görüntülerden daha düşük çözünürlükte dijital görüntü sağlamıştır. Dijital çözünürlüğü 5 MP olan bu kameranın da boyama yöntemlerinden elde edilen görüntülerin bilgisayar destekli olarak analiz edilmesini güçleştirdiği görülmüştür.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Abramoff, M. D., P. J. Magalhães, and S. J. Ram. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11(7): 36-42.
- Baker, J. R. 1958. *Principles of Biological Microtechnique. A study of Fixation and Dyeing.* Methuen & Co. Ltd., London, John Wiley & Sons Inc.
- Carr, J. G. 1945. Mechanics of the Feulgen reaction. *Nature* 156(3953):143-144.
- Eng, W. H., W. S. Ho, and K. H. Ling. 2020. Chromosome count improvement and digitalization of *Neolamarckia cadamba*. *Not. Sci. Biol.* 13(3): 10995.
- Gatenby, J. B., and H. W. Beams. 1950. *The Microtome's Vademecum.* (11th ed.).
- Godward, M. 1948. The iron alum acetocarmine method for algae. *Nature* 161(4084): 203-203.
- Gomori, G. 1952. The histochemistry of esterases. *Internat. Rev. Cytol.* 1:323-335.
- Green, D. M., and S. K. Sessions. 1991. Nomenclature for chromosomes. pp. 431-432. *Amphibian Cytogenetics and Evolution.* Academic Press, San Diego.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research* 120(3-4): 339-350.
- Gurr, E. 1960. *Encyclopaedia of Microscopical Stains.* Ohio University. Leonard Hill (Books) Ltd., London, England.
- Hiremath, S. C., and C. C. Chinnappa. 2015. Plant chromosome preparations and staining for light microscopic studies. *Plant Microtechniques and Protocols* 263-286.
- Kasten, F. H. 1956. Chromosomin and the Feulgen reaction. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 4(4): 310-317.
- Kasten, F. H. 1960. The chemistry of Schiff's reagent. *Internat. Rev. Cytol.* 10: 1-100.
- Kurnick, N. B. 1955. Histochemistry of nucleic acids. *Internat. Rev. Cytol.* 4: 221-268.
- Lessler, M. A. 1953. The nature and specificity of the feulgen nuclear reaction. *Internat. Rev. Cytol.* 2: 231-247.
- Maluszynska, J. 2003. Cytogenetic tests for ploidy level analyses-chromosome counting. pp. 391-395. *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual.* Dordrecht: Springer Netherlands.
- Prasanna, B. M., V. Chaikam, and G. Mahuku. 2012. *Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice.* Mexico D.F., CIMMYT.
- Ribeiro, C. B., F. D. C. Pereira, L. D. Nóbrega Filho, B. A. Rezende, K. O. D. G. Dias, G. T. Braz, M. C. Ruy, M. B. Silva, G. Cenzi, V. H. Techio, and J. C. D. Souza. 2018. Haploid identification using tropicalized haploid inducer progenies in maize. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 18: 16-23.
- Sadder, M. T., and G. Weber. 2001. Karyotype of maize (*Zea mays* L.) mitotic metaphase chromosomes as revealed by fluorescence in situ hybridization (FISH) with cytogenetic DNA markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 117-123.
- Shabir, P. A., A. A. Wani, and I. A. Nawchoo. 2017. Banding techniques in chromosome analysis. *Chromosome Structure and Aberrations* 167-180.
- Sharma A. K., and S. Sharma. 2019. *Plant Chromosomes. Analysis, Manipulation and Engineering.* London: CRC Press.
- Silva, J. C., C. R. Carvalho, and W. R. Clarindo. 2018. Updating the maize karyotype by chromosome DNA sizing. *Plos One* 13(1): e0190428.
- Singh, R. J. 2016. *Plant Cytogenetics.* London: CRC Press.
- Snow, R. 1963. Alcoholic hydrochloric acid-carmine as a stain for chromosomes in squash preparations. *Stain Technology* 38(1): 9-13.
- Stowel, R. E. 1946. The specificity of the feulgen reaction for thymonucleic acid. *Stain Technology* 21(4): 137-148.
- Swaminathan, N. S. 1954. Simple propionocarmine PMC smear method for plants with small chromosomes. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 14: 87-88.
- Warmke, H. E. 1935. A permanent root tip smear method. *Stain Technology* 10(3): 101-103.