

## Örnekleme Yöntemi Mısır Tohumlarından İzole Edilen DNA Miktarı ve Kalitesini Nasıl Etkiler?

Fatih KAHRIMAN<sup>1\*</sup> Umut SONGUR<sup>2</sup> Ezgi ALACA YILDIRIM<sup>3</sup> Cem Ömer EGESSEL<sup>4</sup>

<sup>1,2</sup>Tarla Bitkileri Bölümü, Ziraat Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale/ TÜRKİYE

<sup>3</sup>Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir/ TÜRKİYE

<sup>4</sup>Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Ziraat Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale/ TÜRKİYE

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

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

<sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0002-4467-5603>

<sup>4</sup><https://orcid.org/0000-0003-0255-5678>

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

Received (Geliş tarihi): 21.11.2023

Accepted (Kabul tarihi): 28.03.2024

**ÖZ:** DNA izolasyonu, moleküler analizler için temel adımlardan biridir. Bu adımda elde edilen DNA'nın miktarı ve saflığı, moleküler analiz içeren çalışmalarda önemlidir. Mısır genetik çalışmalarından elde edilen sonuçlar, tohumun endosperm kısmından alınan doku örnekleri üzerinde moleküler analizler yapılabileceğini ve güvenilir sonuçlar alınabileceğini ortaya koymuştur. Ancak, açıkta tozlanma nedeniyle yüksek oranda genetik çeşitlilik gösteren mısır popülasyonları için tohum örnekleme sayısının ve yöntemi konusunda hala farklı öneriler bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı i) tohum dokusu örneklerinden izole edilen DNA miktarını ve kalitesini örnek sayısına bağlı olarak karşılaştırmak ve ii) örnekleme tohumlardaki canlılık durumunu belirlemektir. Çalışmada 11 yerel mısır genotipi ve 2 standart hat (B73 ve Mo17) tohum materyali olarak kullanılmıştır. Genotiplere ait 30'ar adet tohum örneğinin endosperm kısmından ayrı ayrı kesilerek alınan (çipleme) parçalar ile tekli, 10'lu, 20'li ve 30'lu olmak üzere 4 alt örnek grubu oluşturulmuştur. Bu örnekler üzerinde CTAB metodu kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Örneklerin DNA içeriği ve saflıkları Nano-Drop cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Araştırma bulgularına göre, örneklerin DNA miktarları 2,2 ng ile 1243 ng arasında değişmiştir. Saflık değerleri ise 1,41 ile 2,03 arasında (A260/A280) değişmiştir. Tek tohum örneklerinden elde edilen DNA saflığı diğer gruplardan daha düşük olmasına rağmen, bir araya getirilmiş örneklerde DNA saflığı benzerlik göstermiştir. Örnekleme tohumlarının çimlenme oranları %55 ile %100 arasında değişmiştir. Bu örnekleme yönteminin küçük tohumlu popülasyonlarda risk taşıyabileceği belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen DNA örnekleri, SSR primerleri kullanılarak genetik benzerlik analizlerine tabi tutulacak ve elde edilen sonuçlar bu alanda çalışan araştırmacılarla paylaşılacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Moleküler analiz, tohum kesme, çipleme, Zea mays L.

### How Does Sampling Method Affect the Quality and Quantity of DNA Extracted from Maize Seeds?

**ABSTRACT:** DNA isolation is one of the fundamental steps in various molecular analyses. The quantity and purity of the obtained DNA in this step are crucial considerations for studies utilizing molecular analyses. The results from maize genetic studies have demonstrated that molecular analyses can be performed on tissue samples taken from the endosperm part of the seed, yielding reliable results. However, there are still various recommendations regarding the number and method of seed sampling for maize populations showing a high level of genetic diversity due to open pollination. This study aims i) to compare the quantity and quality of DNA isolated from seed tissue samples depending on the number of samples and ii) to monitor the viability status in the sampled seeds. Eleven local maize landraces and two standard lines (B73 and Mo17) were used as seed material in the study. Four sub-sample groups (single, 10, 20 and 30) were formed by cutting (chipping) separately from the endosperm of 30 seed samples of each genotype. DNA isolation was performed on these samples using the CTAB method. The DNA contents and purities of the samples were determined using a Nano-Drop device. According to the research findings, the DNA quantities of the samples ranged from 2,2 ng to 1243 ng. Purity values ranged between 1,41 and 2,03 (A260/A280). Although the DNA purity obtained from single seed samples was lower than the other groups, the bulked samples showed similarity in terms of DNA purity. The germination rates of the sampled seeds ranged from 55% to 100%. It was determined that this sampling method might have a risk for small-seeded populations. DNA samples obtained from the study will undergo genetic similarity analyses based on SSR markers, and the results will be shared with researchers working in this field.

**Keywords:** Molecular analysis, seed cutting, chipping, Zea mays L.

## GİRİŞ

İçerdiği farklı varyete grupları ile farklı kullanım alanlarına hitap eden ve dünyanın birçok bölgesinde en önemli kültür bitkisi konumunda bulunan mısır aynı zamanda genetik ve ıslah çalışmaları için model bitkilerden birisidir (Koca ve ark., 2010, Kahrıman ve ark., 2013, Öztürk ve ark., 2019, Ranum ve ark., 2024). Bu çalışmalarda moleküler analizlere dayalı olan modern yöntemlerin kullanımı gitgide yaygınlaşmaktadır. Bu nedenle diğer bitkilerde olduğu gibi mısırdaki moleküler analizler için geliştirilen yöntem ve adımlar önemli ve hızla gelişmekte olan bir çalışma alanını oluşturmaktadır. Moleküler analizlerin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle hedef türden analizde kullanılacak kalıtım materyalinin (RNA veya DNA) izole edilmesi gerekmektedir. Mısır araştırmalarının büyük kısmında bu materyal DNA olup, spesifik çalışmalar dışında yöntem geliştirme çalışmalarının büyük kısmı DNA izolasyonuna dayanmaktadır (İrfan ve ark., 2013). İzolasyonda kullanılacak dokunun özellikleri elde edilecek DNA miktarına önemli ölçüde etki edebilmektedir. Ekstraksiyonun başarısı açısından DNA miktarı ve kalitesi yapılacak çalışmalar için en önemli iki kriter olarak kabul edilmektedir (Abdel-Latif ve Osman, 2017).

Mısır bitkisi üzerinde yapılan çalışmaların büyük kısmında DNA izolasyonu yeşil dokulardan veya tohumdan gerçekleştirilebilmektedir. Bilimsel literatürde bu dokulardan elde edilen DNA miktarı ve kalitesini karşılaştıran farklı çalışmalar yapılmış ve bu amaçla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu alanda öne çıkan iki araştırma mevcuttur. Gao ve ark. (2008) tarafından geliştirilen yöntem ekstraksiyonda kullanılacak tohumların öncelikle nemlendirilerek yumuşatılması aşamasını içermektedir. Mills ve ark. (2020) tarafından geliştirilmiş yöntem ise kuru tohumun taç kısmında endosperm dokusundan örneklemeye yapılmasına (çipleme) dayanmaktadır. Bu yöntemin avantajları genotipleme işleminin daha hızlı yapılmasına olanak sağlaması ve alınan tohum örneklerinin çipleme için uygun yapıldığı sürece tohum çimlenmesinde etkisinin olmamasıdır. Bu sayede genotipleme yapılan örneklerden ileriki çalışmalarda yalnızca istenen örneklerin çimlendirilmesi gerçekleştirilebilmekte ve yetiştirme maliyeti daha düşük seviyelerde tutulabilmektedir. Gao ve ark. (2008)'nin tohumu önceden suda

bekleterek kesiyor olması çipleme aşamasında araştırmacı açısından kolaylık sağlasa da, nemlendirilen tohum örneklerinin kontaminasyona daha dayanıksız olması ve istenmeyen bir zamanda çimlenmenin gerçekleşebilmesi sebebiyle kuru tohumdan yapılan çiplemenin daha uygun olduğu değerlendirilmektedir (Mills ve ark., 2020).

Mısır ıslah çalışmalarında DNA analizleri için tohumun ve özellikle endosperm dokusunun materyal olarak kullanılma gereği genotipleme sonrasında bu tohumun ekilerek yetiştirilebilmesidir. Ayrıca, tohumdan gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi araştırmacılar için zaman ve maliyet açısından daha avantajlıdır. Halilu ve ark. (2013) tohum ve yapraktan ekstrakte edilen DNA'nın miktarı ve saflığının karşılaştırmıştır. Çalışmada yapraktan 1575 ng/ul, tohumdan ise 526 ng/ul DNA elde edilmiş olup iki çalışma grubundan elde edilen değerler de 1,6-1,8 aralığına giren yeterli saflık derecesinde (A260/A280) gerçekleşmiştir. Buna karşın, yapraktan DNA ekstraksiyonu için 2 hafta yaprak oluşumunun beklenmesi gerekirken, tohumdan örnekleme yapılan çalışma bir günde tamamlanmıştır. Tohumdan DNA izolasyonu bu avantajı nedeniyle mısır ıslah çalışmalarında ve özellikle moleküler destekli çalışmalarda tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Normal mısır çeşitlerinde veya genetik kaynak karakterizasyonunda bu yöntemden yararlanmasına rağmen, açıkta tozlanan popülasyonlar gibi genetik kaynakların moleküler karakterizasyon çalışmalarında tohumdan DNA ekstraksiyon yöntemi üzerine örnekleme sayısının etkisini ele alan bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu durum özellikle yerel mısır popülasyonlarında popülasyon içi varyasyon nedeniyle moleküler analiz sonuçlarının güvenilirliği ve geçerliliği açısından yüksek öneme sahiptir. Yerel mısır popülasyonları ve açıkta tozlanan materyalleri kullanan bazı çalışmalarda moleküler analizler için 30 (Arafayne ve ark., 2018), 15 (Cömertpay ve ark., 2012) ve 10 (Eschholz ve ark., 2008) adet bitkiden alınarak bir araya getirilen örneklerin kullanıldığı bildirilse de, bu durumun bilimsel literatürde detaylı şekilde ele alınmadığı dikkat çekmiştir. Mills ve ark. (2020) tarafından önerilen kuru tohumdan kesilen endosperm parçasından DNA ekstraksiyon yönteminin yerel mısır popülasyonlarında uygulanması ve bu materyallerde örneklenen tohum sayısına göre elde edilen DNA miktarı ve DNA

kalitesinin karşılaştırılmasını ele alan bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu araştırmanın amacı farklı varyete gruplarına dahil yerel mısır popülasyonlarında tekli, 10'lu, 20'li ve 30'lu örnekleme kuru tohumdan CTAB DNA ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA'nın miktar ve kalitesi üzerine etkisinin ve örneklemede kullanılmış olan tohumların daha sonraki çimlenme başarılarının tespit edilmesidir. Çalışmamızda Mills ve ark. (2020) tarafından önerilen metot ile tohumdan alınan parçanın alt örneklere ayrılması ve bu parçaların farklı sayılarda (10, 20, 30 tohumdan alınan parçalar) birleştirilmesiyle oluşturulan örneklerden elde edilen DNA miktarı ve kalitesinin değişimi ele alınmıştır. Böylelikle yerel mısır popülasyonlarında popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik varyasyonu ele alan çalışmalar için tohumdan DNA

ekstraksiyon yönteminin uygulanması ile ilgili temel bilgilerin elde edilmesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Çalışma materyali

Çalışmada 11 farklı yerel mısır popülasyonu ve 2 standart hat (B73 ve Mo17) materyal olarak kullanılmıştır (Çizelge 1). Bu materyaller daha önce Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünde yürütülen Ar-Ge projeleri ve ıslah çalışmaları için farklı kaynaklardan temin edilmiş materyallerdir. Çalışmada kullanılan materyaller daha önce yürütülen bir ön çalışmadan tane rengi bakımından farklılık gösteren yerel popülasyonlardan seçilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan materyaller ve tane özellikleri.

Table 1. Materials used in the study and grain properties.

Kod Code	Tohum Rengi Seed Color	Endosperm Tipi Endosperm Type
COMU1	Kırmızı	Sert mısır
COMU2	Kırmızı	Sert mısır
COMU3	Kırmızı	Sert mısır
COMU4	Kırmızı	Sert mısır
COMU5	Kırmızı	Cin mısır
COMU6	Mor	Sert mısır
COMU7	Mor	Sert mısır
COMU8	Mor	Sert mısır
COMU9	Mor	Sert mısır
COMU10	Açık Mor	Cin mısır
COMU11	Açık Mor	Cin mısır
B73	Sarı	At dişi mısır
Mo17	Sarı	At dişi mısır

### Tohumdan örnek alınması ve tohumların çimlendirilmesi

Çalışmada materyal olarak kullanılan genotiplerin her birinden tesadüfi olarak alınan 30 adet tohumdan Mills ve ark. (2020) tarafından önerilen örnekleme yöntemine göre tek tohum düzeyinde örnekler alınmıştır. Ancak örnekleme yönteminde kesim işlemi aynı şekilde uygulanmasına rağmen tek tohumdan alınan örnek sayısı ve alt grup sayısı bakımından bazı değişiklikler yapılmıştır. Mills ve ark. (2020) tohumun taç kısmının yalnızca bir yönünden kesit alınırken bu çalışmada tek tohum örnekleri alınırken tohumun taç kısmının iki yönünden örnek alınmıştır (Şekil 1).

Tek tohum örnekleme yapılırken genotiplere ait 30 tohumdan bir tanesi tesadüfi olarak seçilmiş ve bu tohumun taç kısmının sağ ve sol kısmının iki yönünden kesit alınmış, bu kesitlerin bir tanesi olduğu gibi bırakılmış diğeri (tek) ise mümkün olduğunca eşit olacak şekilde 3 alt parçaya (10, 20, 30) ayrılmıştır (Şekil 1).

Kalan 29 tohumun yalnızca bir yönünden kesit alınmış ve bu işlemde elde edilen parça da yine üç alt parçaya (10, 20, 30) ayrılmıştır (Şekil 1). Alt parçalara ayrılan kısımlardan birisi 10, birisi 20, diğeri 30 tohumdan alınmış alt grupların oluşturulmasında kullanılmıştır (Şekil 1). Örneklenen tohumlardan tohumun kalan kısmı yani embriyonun olduğu kısım viyollere aktarılıp çimlendirilmiştir (Şekil 2). Ardından çimlenen tohumların çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir (Şekil 3).

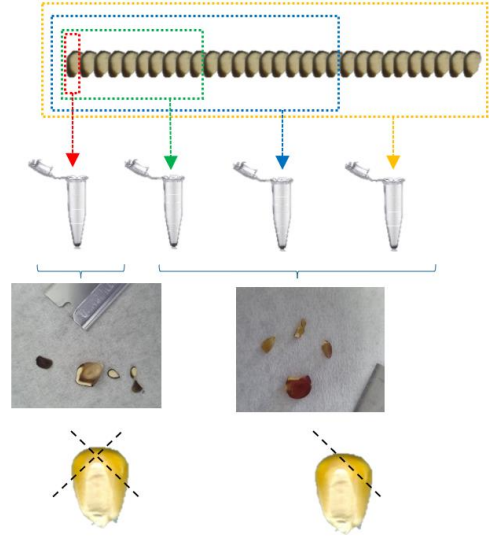
### DNA ekstraksiyonu, DNA miktarı ve safiyet ölçümleri

Çiçleme işleminden sonra örneklenen tohumlar tekli 10'lu 20'li ve 30'lu olarak alt gruba ayrılan örnekler havan içerisinde sıvı azot ile örnek kaybı olmayacak şekilde öğütülmüştür. Öğütülen örneklerin ağırlıkları kaydedilmiştir. DNA izolasyonu için CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) yönteminden yararlanılmıştır (Abdel-Latif ve Osman, 2017). Bu yöntemde göre izlenen adımlar aşağıda belirtilmiştir.

1. Öğütülen tohum örneğinden yeterli olan örneklerden 100 mg alınmış, yeterli olmayan örneklerin ise tamamı 1,5 mL'lik ependorf tüpe konulmuştur.
2. Örneklere 1 mL 65 °C'ye kadar ısıtılmış CTAB buffer, 20 µL %2'lik Beta merkaptolan ve 10 µL (20 mg/mL) RNAase A eklenmiştir. Ardından örnekler 1 dk vortekslenmiştir.
3. Vortekslenildikten sonra hücre zar ve çeperinin daha etkili parçalanması amacıyla 30 dk buzlukta bekletilmiştir.
4. Bu sürenin ardından örnekler yeniden vortekslenmiş ve 20 µL (20 mg/mL) Proteinaz K eklenmiştir.
5. Ardından 30 dakika 65 °C'de inkübe edilmiştir. Her 5 dakikada bir örnekler vortekslenmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler 10.000 rcf'de 6 dakika santrifüje konulmuştur. DNA içeren üst fazdan 500 µL alınıp yeni 1,5 mL'lik ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 500 µL 24:1 oranında hazırlanmış kloroform:isoamil alkol eklenmiştir. Örnekler altüst edilip kısa süreli vortekslenmiş ve ardından 10.000 rcf'de 6 dakika santrifüje konulmuştur.

6. 250 mikrolitre üst faz alınıp yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 175 µL isopropanol eklenmiştir.
7. Ardından 12.000 rcf'de 10 dakika santrifüje konulmuştur ve santrifüjleme işleminden sonra dipteki peleti bozmadan üst fazdan alınmıştır.
8. Dipteki peletin üzerine yıkamak amacıyla 750 µL %70'lik alkol eklenip 5 dk 8000 rcf'de santrifüj edilmiş ve üst sıvı tekrar alınmıştır. Peletin kalan alkolden arındırılması amacıyla tekrar 1 dk santrifüj edilmiş üst kısımdaki alkol dökülmüştür.
9. Kalan dipteki peletin üzerine (nükleik asitleri) çözdürmek amacıyla 40 µL ddH<sub>2</sub>O eklenmiş ve düşük devirde vortekslenmiştir. Ardından bir sonraki aşamada kullanılmak üzere izole edilmiş DNA uygun ortamda muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyon işleminden sonra örneklerin saflık oranları ve miktar düzeyleri (A<sub>260</sub>:280 nm) her numuneden 1 µL kullanılarak Thermo Scientific, NanoDrop™ One (Thermo Scientific, USA) ile ölçülmüştür.



Şekil 1. Çalışmada tekli ve toplu (10, 20, 30 tohum) örneklerin oluşturulması.

Figure 1. Creating single and bulk (10, 20, 30 seeds) samples in the study.



Şekil 2. Tohumların çimlendirilmesi.  
Figure 2. Germination of the seeds.



Şekil 3. Çimlenen örneklerin tespiti.  
Figure 3. Detection of germinated samples.

### Veri analizi

Çalışmadan elde edilen veriler R istatistik paket programında (R Core Team, 2021) değerlendirilmiştir. Araştırmada örnekler tohum düzeyinde örnekleme yapıldığından DNA ölçümleri ve çimlenme oranlarına ilişkin sonuçlar çizelge olarak sunulmuş, örnekleme sayısına göre değişimler ise grafiksel olarak gösterilmiştir. İncelenen özelliklere ait verilerde yüksek oranda değişim olması nedeniyle gruplar arası karşılaştırmada parametrik olmayan testlerden olan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır (McKight ve Najab, 2010).

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Çiçleme işlemi sonrası örnekleme yöntemine göre alt örnek gruplarının ağırlıkları Çizelge 2'de sunulmuştur. Alt örnek ağırlıkları 7 mg ile 527 mg aralığında değişim göstermiştir. En düşük örnek ağırlığı tekli örneklemede COMU3 genotipinde en yüksek alt örnek miktarı ise 30'lu örneklemede COMU6 genotipinde ölçülmüştür. Nano-Drop ölçümlerine göre DNA miktarları Çizelge 3'te sunulmuştur. DNA miktarları 2,2 nanogram ile 1243,2 nanogram arasında değişmiştir. Toplam DNA miktarları tohum sayısına bağlı olarak genotiplere göre değişkenlik göstermiştir. Örnek sayısı arttıkça DNA miktarının artması beklense de, örnek ağırlığı çizelgelerinde de görüleceği üzere tohum sayısı arttıkça bazı genotiplerde örnek ağırlığı artmamıştır. Bu durum örneklerin DNA içeriklerinin değişimi üzerine etkili olmuştur. Tek tohumdan alınan örneklerin ağırlıkları diğer toplu örnek gruplarından daha düşük

olduğundan, bu örneklerin DNA içerikleri de daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 2. Örnekleme sonrası oluşturulan alt örnek gruplarının ağırlıkları (mg).

Table 2. Weights (mg) of sub-sample groups after sampling.

Genotipler Genotypes	Tek Single Seed	10'lu Örnek 10-seed sample	20'li Örnek 20-seed sample	30'lu Örnek 30-seed sample
COMU1	22	117	230	340
COMU2	22	104	212	352
COMU3	7	140	275	304
COMU4	12,8	66	128	232
COMU5	7,5	69	160	298
COMU6	18	103	359	527
COMU7	36	157	446	470
COMU8	9,6	137	209	321
COMU9	15,2	103	192	314
COMU10	29,6	133	242	319
COMU11	36,3	144	325	492
B73	49,6	136	272	401
Mo17	20,6	218	328	440

Nanodrop ölçümlerine ilişkin safiyet değerleri sonuçları Çizelge 4'de sunulmuştur. Genel olarak 1,8 değerine yakın değerler elde edilmiş olsa da bazı örneklerde daha düşük veya 2'ye yakın değerler olduğu saptanmıştır. Hemen hemen tüm örneklerde DNA safiyetinin yeterli düzeyde olduğu ancak tekli alt örnekleme göre çoklu örneklemlerde safiyet düzeyinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Tohum izolasyonunda kullanılan CTAB yönteminin yeterli safiyette DNA sağladığı görülmüştür. Abdel-Latif ve Osman (2017) mısır tanelerinden yüksek kaliteli genomik DNA izolasyonu için örnek başına 100 mg kullanarak 3 farklı DNA ekstraksiyon metodu (Qiagen yöntemi-DNA kiti, CTAB bazlı ekstraksiyon, Mericon ekstraksiyon-DNA kiti) kullandıkları çalışmalarında maksimum DNA miktarını 23,6 ng/µL ile 386,9 ng/µL arasında bulmuş ve en yüksek DNA miktarını Mericon ekstraksiyon metodunda gözlemiştir. DNA safiyeti ise CTAB metodunda 1,6 ile 2,0 aralığında gözlenirken DNA kitinin kullanıldığı Qiagen yönteminde bu oran 1,2-1,95 aralığında değişmiştir.

Çizelge 3. Nano-Drop ölçüm sonuçlarına göre DNA miktarları (ng).

Table 3. DNA amounts (ng) according to Nano-Drop measurement results.

Genotipler Genotypes	Tek Tohum Single Seed	10'lu Örnek 10-seed sample	20'li Örnek 20-seed sample	30'lu Örnek 30-seed sample
COMU1	2,9	214,7	95,9	249,6
COMU2	5,2	35,9	309,8	140,9
COMU3	17,4	113,9	2,2	237,3
COMU4	5,4	56,1	160,3	484,6
COMU5	41	167,9	1243,2	579,2
COMU6	26	107,5	59,6	124,8
COMU7	52,5	411	244	325
COMU8	11,6	588,3	50	205,1
COMU9	35	96,6	153,3	81,4
COMU10	46,9	209,9	158,2	50,5
COMU11	92,1	69,4	21	57,5
B73	165,2	283,4	64,7	139,6
Mo17	14,8	77,6	151,9	49,9

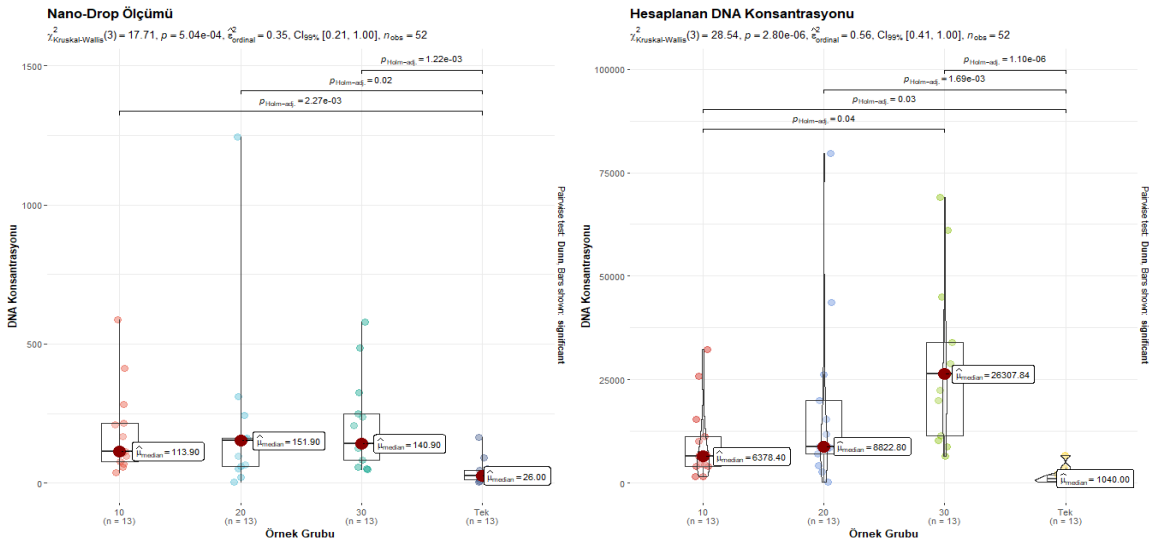
Çizelge 4. Nano-Drop ölçüm sonuçlarına göre DNA safiyetleri (A260/A280).

Table 4. DNA purities according to Nano-Drop measurement results (A260/A280).

Genotipler Genotypes	Tek Tohum Single Seed	10'lu Örnek 10-seed sample	20'li Örnek 20-seed sample	30'lu Örnek 30-seed sample
COMU1	1,60	1,94	1,81	1,81
COMU2	1,46	1,86	1,95	2,03
COMU3	1,80	1,75	1,41	1,90
COMU4	1,70	1,85	1,90	1,96
COMU5	1,71	1,81	1,73	1,93
COMU6	1,71	1,81	1,89	1,57
COMU7	1,83	1,95	1,89	1,89
COMU8	1,67	1,88	1,79	1,88
COMU9	1,65	1,81	1,86	1,81
COMU10	1,76	1,82	1,89	1,77
COMU11	1,82	1,86	1,84	1,80
B73	1,72	1,95	1,86	1,85
Mo17	1,63	1,77	1,83	1,76

Çalışmamızda yalnızca CTAB metodu kullanılmış olup, DNA safiyet değerleri belirtilen sınırlara benzerlik göstermiş, buna karşın genotiplere göre elde edilen DNA miktarının değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Bu durum çalışmalarda materyal olarak kullanılan genotiplerin tohum özellikleri ve araştırmada kullanılan örnekleme yöntemindeki (çoklu veya tekli örnekleme) farklılıklardan kaynaklanabilir. Diğer taraftan mısır genotiplerinde DNA konsantrasyonunun genotipik faktörlere (Cömertpay, 2019) ve yetiştiricilik yapılan yükseltiye (González ve ark., 2022) bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar da tohumdan yapılan örneklemedeki DNA miktarının özellikle genotipe bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Araştırmada örnek gruplarına göre DNA konsantrasyonunun değişimi Şekil 4'te sunulmuştur. Nano-Drop ölçümlerinde 1 µL'lik örnekteki DNA içeriği bakımından tek tohum grubu ile diğer çoklu gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir fark oluşurken, 10'lu, 20'li, 30'lu örneklerin yer aldığı gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 4). Buna karşın kesilen parça ağırlığı üzerinden elde edilebilecek DNA miktarı hesaplandığında gruplar arasındaki farklarda değişimler olduğu gözlenmiştir. Bu karşılaştırmaya göre 10'lu örnekler ile 30'lu grup arasında istatistiki bir fark olduğu izlenmiştir. Yine tek tohum örneklemesinden elde edilebilecek DNA konsantrasyonunun diğer gruplardan beklendiği gibi daha düşük olduğu ve diğer gruplarla olan farkların da istatistiki olarak önemli olduğu görülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. Örnek gruplarına göre Nano-Drop ile belirlenen DNA konsantrasyonu ve kesilen örnek ağırlığı üzerinden hesaplanan DNA konsantrasyonundaki değişimler.

Figure 4. Changes in DNA concentration were determined by NanoDrop, and DNA concentration was calculated from the weight of the cut sample according to sample groups.

Örnekleme yapılan tohumların genotiplere göre çimlenme oranları Çizelge 5’te sunulmuştur. Tek tohum örnekleme gerçekleştirilen tohumların tamamı (%100) çimlenmiştir. 10’lu örnek gurubunu oluşturan tohum örneklerinin çimlenme oranları bir miktar düşüş göstermiştir. 20 ve 30 tohumdan alınan endosperm parçaları ile oluşturulan tohumların çimlenme oranında ise belirgin bir düşüş gözlenmiştir. COMU5 ve COMU7 gibi genotiplere ait örnekleme sonrasında tüm tohumların çimlendiği görülmüştür (Çizelge 5).

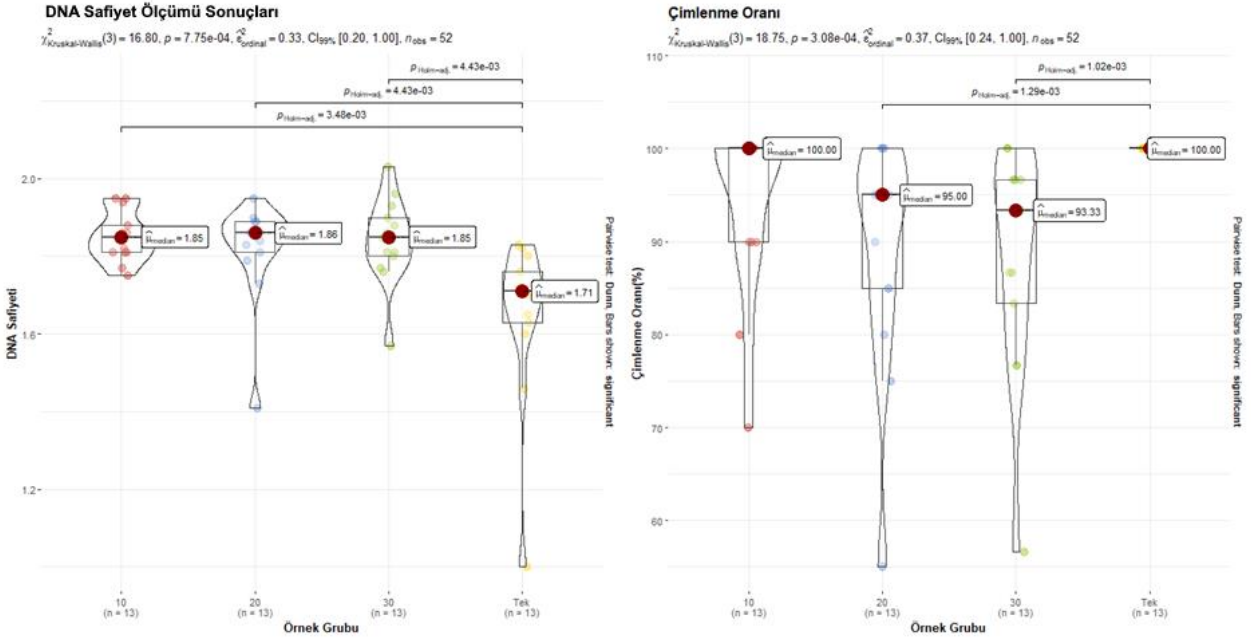
Çalışmada örnek grupları arasında DNA safiyeti ve tohumların çimlenme oranları bakımından farklılıklar Şekil 5’te sunulmuştur.

DNA safiyeti bakımından örnek grupları içerisinde tek tohum örneklerinin diğer gruplara göre daha düşük medyan değerine sahip olduğu görülmüştür. Diğer gruplar arasında ise istatistiki olarak önemli bir fark oluşmamıştır. Çimlenme oranı bakımından 10’lu ve tek tohum örneklerinin çimlenme oranları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık gözlenmez iken, 20’li ve 30’lu örnekler ile tek tohum örneklerinin çimlenme oranları arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. 20’li ve 30’lu örnekleme yapılan örneklerin çimlenme oranı ortalamaları tek tohumdan yapılan örnekleme ortalamasından daha düşük bulunmuştur (Şekil 5).

Çizelge 5. Örneklenen tohumların çimlenme oranları (%).

Table 5. Germination rates of the sampled seeds (%).

Genotipler Genotypes	Tek Tohum Single Seed	10’lu Örnek 10-seed sample	20’li Örnek 20-seed sample	30’lu Örnek 30-seed sample
COMU1	100	90	75	76,67
COMU2	100	70	55	56,67
COMU3	100	100	95	96,67
COMU4	100	100	85	83,33
COMU5	100	100	100	100
COMU6	100	100	95	96,67
COMU7	100	100	100	100
COMU8	100	90	95	96,67
COMU9	100	100	100	93,33
COMU10	100	90	95	96,67
COMU11	100	80	80	86,67
B73	100	100	85	76,67
Mo17	100	100	90	86,67



Şekil 5. Örnek gruplarına göre DNA safiyeti ve tohumların çimlenme oranlarındaki değişimler.  
 Figure 5. Changes in DNA purity and germination rates of the seeds by sample groups.

Gao ve ark. (2008) mısır tohumlarını suda bekletilerek çikleme işlemi yapmış ve çikleme oranlarını hesaplamıştır. Her birinde 75 tohum bulunan 5 F<sub>2</sub> popülasyonunun çimlenme oranları %84 ile %96 arasında seyretmiştir. Mills ve ark. (2020) ise çikleme işlemi tohumları suda bekletmeden gerçekleştirmiş ve her birinde 30 tohum bulunan 3 popülasyonda %90 ile %100 arası çimlenme başarısı gözlemiştir. İki çalışmada da genotip etkisi ile çimlenme başarısı arasında bağlantı incelenmemiştir. Bizim çalışmamızda örnekleme yapılan tohumlarda tek tohumların tamamında çimlenme gözlenirken, genotiplere göre çimlenme oranlarının değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle canlılık ve çimlenme durumunun doğrudan örnekleme sayısı ile ilgili olduğunu söylemek güçtür. Zira, COMU5 ve COMU7 kodlu genotiplerde kullanılan tüm örnekler çimlenirken diğer tüm genotiplerde çimlenme oranının örnekleme sayısına göre değişkenlik gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 5). Bu durum kullanılan genotiplerin tohum iriliklerindeki ve embriyo büyüklüklerindeki farklılıklarla ilişkilendirilebilir. Zira bu çalışmada kullanılan genotiplerin büyük kısmı yerel mısır popülasyonlarından oluşmaktadır. Bu materyaller hibrit çeşitlerle veya saf hatlarla kıyaslandığında

tohum iriliklerinde daha yüksek varyasyona sahiptirler. Dolayısıyla çikleme için kullanılan ve tesadüfi olarak seçilen tohum örneğinin büyüklüğü, embriyo iriliği ve endosperm sertliğinde de önemli varyasyonlar olabilmektedir. Diğer taraftan çikleme işleminde tohumun kesilmesi ile yapıldığından, tüm örnekleme homojen bir kesim işleminin yapılması mümkün değildir. Meru ve ark. (2013) kavunda yürüttükleri çalışmalarında tohumun %30'unu kestiklerinde çimlenme oranının %95 olduğunu, tohumun %50'sini keserek çikleme yaptıklarında çimlenme oranının %43'e düştüğünü bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda tek tohum örneklerinde tohumun taç kısmının her iki tarafından kesit alınmasına rağmen çimlenme kaybının olmadığı görülmüştür. Bu durum çalışmada tesadüfi örnekleme yapılmasına ve tohumun taç kısmının iki tarafından yapılan kesim işleminde daha hassas davranılmış olmasına bağlanabilir. Tek tohum örneklerinin ağırlıkları ile 10,'lu 20'li ve 30'lu alt örnek gruplarının ağırlıkları kıyaslandığında (Çizelge 2), tek tohum örneklerinin oransal olarak beklenenden daha düşük ağırlığa sahip olduğu söylenebilir. Çimlenme ve canlılık kaybı kesilen tohumun endosperm büyüklüğünden daha ziyade kesme işleminde embriyonun zarar görmesi ile ilişkilendirilebilir. Zira



tohumun embriyosu zarar görmedikçe tohum çimlenebilmektedir. Tek tohum örnekleme yapılan tohumlarda da tüm örneklerin çimlenmiş olması bu duruma bağlanabilir ve kesme işlemi esnasında bu örneklerde embriyosunun zarar görmediği anlaşılmaktadır. Diğer taraftan her genotipe ait 30 örnekten yalnızca bir tohumun tek tohum örneklemeinde kullanılmış olması da elde edilen sonuca etki etmiş olabilir. Nitekim tohum parçalarının alındığı tohumlar aynı tohumlar olmasına rağmen alt grupların oluşturulduğu tohum arttıkça nispeten çimlenme oranının düştüğü görülmüştür.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonuçlarına göre DNA miktar ve kalitesinin tohumdan yapılan endosperm çipleme işleminde örnek sayısına göre değişken sonuçlar verdiği görülmüştür. Örnekleme sayısının artmasıyla örnek ağırlığı artış gösterse de bazı genotiplerde DNA miktarı ve yoğunluğunun örnek miktarının artışı ile doğrusal bir artış göstermediği saptanmıştır. Bu durumun söz konusu genotiplerin tane ve endosperm yapısından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Sert endosperm karakterine sahip ve küçük tohumlu

## LİTERATÜR LİSTESİ

- Abdel-Latif, A., and G. Osman. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods* 13: 1-9.
- Arafayne, G., A. Menkir, V. O. Adetimirin, and M. Gedil. 2018. Optimizing sample size for molecular characterization of open-pollinated maize (*Zea mays* L.) varieties using simple sequence repeat markers. *Cereal Research Communications* 46(4): 569-579.
- Cömertpay, G., F. S. Baloch, B. Kilian, A. C. Ülger, and H. Özkan. 2012. Diversity assessment of Turkish maize landraces based on fluorescent labelled SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 261-274.
- Cömertpay, G. 2019. Assessment of nuclear DNA contents variation and their relationship with flowering in corn genotypes. *Turkish Journal of Field Crops* 24(1): 39-45.
- Eschholz, T. W., R. Peter, P. Stamp, and A. Hun. 2008. Genetic diversity of Swiss maize (*Zea mays* L. *spp.* *mays*) assessed with individuals and bulks on agarose gels. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 971-983.
- Gao, S., C. Martinez, D. J. Skinner, A. F. Krivanek, J. H. Crouch, and Y. Xu. 2008. Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize. *Molecular Breeding* 22:477-494.

genotiplerde DNA miktar ve kalitesinde düzenli bir artış olmadığı görülmüştür. Ayrıca tek taraftan örneklenen tohumların tamamı çimlenirken, birden fazla kısmından parça alınan tohumlarda çimlenme sorununun olabileceği belirlenmiştir. Bu örneklerin çimlendirilmesi ve sonrasındaki süreçlerde kullanılmasının güç olduğu değerlendirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen DNA örnekleri SSR-PCR analizlerine tabi tutularak örneklemeyle ilgili olarak popülasyon içi ve popülasyonlar arasındaki genetik varyasyonda farklılık olup olmayacağına dair analizler yapılacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: FBA-2023-4344.

- González, G. E., M. F. Realini, M. F. Fourastié, and L. Poggio. 2022. Causes and consequences of DNA content variation in *Zea*. *J. Basic Appl Genet.* 33(1): 43-49.
- Halilu, A. D., S. G. Ado, I. S. Usman, and D. Appiah-Kubi. 2013. Prospects of endosperm DNA in maize seed characterization. *Maydica* 58:288-290.
- Irfan, M., Z. T. Ting, W. Yang, Z. Chunyu, M. Qing, Z. Lijun, and L. Feng. 2013. Modification of CTAB protocol for maize genomic DNA extraction. *Research Journal of Biotechnology* 8(1):41-45.
- Koca Y. O., İ. Turgut ve O. Ereku. 2010. Tane üretimi için yetiştirilen mısırın birinci ve ikinci üründeki performanslarının belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 47 (2): 181-190.
- Kahrıman, F., C. Ö. Egesel ve A. Demir. 2013. Türkiye’de mısır ıslahı çalışmalarının geçmişi ve bugünü. *Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi*. 10-13 Eylül 2013. Konya. s. 545-550.
- McKight, P. E., and J. Najab. 2010. Kruskal-Wallis Test. *The Corsini Encyclopedia of Psychology* 1:1-10.
- Meru, G., D. McDowell, V. Waters, A. Seibel, J. Davis, and C. McGregor. 2013. A non-destructive genotyping system from a single seed for marker-assisted selection in watermelon. *Genet Mol Res.* 12:702-709.

- Mills, A. M., L. A. Allsman, S. Leon, and C. G. Rasmussen. 2020. Using seed chipping to genotype maize kernels. *Bio-101*: e3553.
- Öztürk, A., E. Özata, Ş. Erdal ve M. Pamukçu. 2019. Türkiye’de özel mısır tiplerinin kullanımı ve geleceği. *International Journal of Eastern Mediterranean Agricultural Research* 2(1): 75-90.
- Ranum, P., J. P. Peña-Rosas, and M. N. Garcia-Casal. 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1312(1): 105-112.
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.