

3358

KAMIŞSI YUMAK (FESTUCA ARUNDINACEA SCHREB.) X ÇOK YILLIK
ÇİM (LOLIUM PERENNE L.) DOĞAL MELEZİNDEN KOLKİSİN
ETKİSİ İLE AMFİDİPLOİD ELDE EDİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
(BİYOLOJİ)

FATMA ÜNAL
OCAK 1988

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Y. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.



Prof. Dr. Şahabettin-ELÇİ

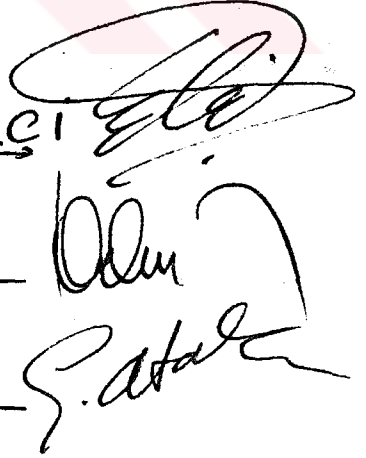
Danışman

Sınav Jürisi

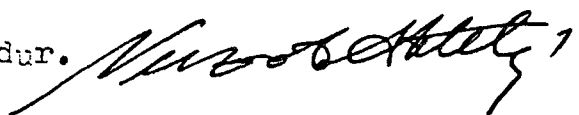
Başkan : Prof. Dr. Şahabettin ELÇİ

Üye : Doç. Dr. Orhan Arslan

Üye Yek. Doç. Dr. Çimen Atak



Bu Tez Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tez Yazım Esaslarına Uygundur.



ÖZET

KAMIŞSI YUMAK (*FESTUCA ARUNDINACEA* SCHREB.) x ÇOK YILLIK
ÇİM (*LOLIUM PERENNE* L.) DOĞAL MELEZİNDEN KOLKİSİN
ETKİSİ İLE AMFİDİPLOİD ELDE EDİLMESİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

FATMA ÜNAL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OCAK 1988

Bu çalışmada, kemişsi yumak (*Festuca arundinacea* Schreb.) x çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.) doğal melezinden, kolkisin etkisi ile amfidiploid bitki elde edilmesi amaçlanmıştır.

Kromozom sayıları, kemişsi yumakta $2n = 42$, çok yıllık çimde $2n = 14$, bu iki bitkiden meydana gelen *Festuca* x *Lolium* melezinde $2n = 28$ bulunmuştur.

Doğal melezlemeden elde edilen kısır bitki, % 0.4 kolkisin çözeltisinde, $18-20^{\circ}\text{C}$ 'ta 24 saat bekletilmiş ve % 20-30 oranında $2n = 56$ kromozomlu amfidiploid klonlar elde edilmiştir. Klonların büyüme bölgesinde üçgen şeklinde yarıklı açılmış ve yukarıdaki işlemler, % 2 dimetil sulfoksid (DMSO) içinde çözülen % 0.4 kolkisin çözeltisinde tekrarlanmıştır. Sonuçta, % 80 oranında $2n = 56$ kromozomlu amfidiploid klonlar elde edilmiştir.

Preparatların hazırlanmasında, kök uçları, ilk işlemlerde, doymuş α -monobromo naftalin çözeltisinde 16-17

saat 4°C'ta bekletilmiştir. Tesbit ve hidroliz işlemi sırasıyla; oda sıcaklığında glasiyal asetik asitte 30 dakika ve 1 N HCl içerisinde 10-12 dakika yapılmıştır. Ezme tekniğine göre yapılan preparatlar, alkol buharı değiş-tokuşu ile Euparalda devamlı hale getirilmiştir.

Kromozom boyları; F. arundinaceae 4.826-2.472 μ ; L. perennede 4.761-2.838 μ ; doğal Festuca x Lolium melezinde 5.669-2.561 μ ; amfidiploid bitkide 5.196-2.772 μ bulunmuştur. Anaçlar, melez ve amfidiploid bitkilerin karyotipleri analiz edilmiş ve kromozomların karyogramları ve idiogramları yapılmıştır.

ABSTRACT
PRODUCTION OF AMPHIDIPLOID WITH EFFECT OF COLCHICINE
IN NATURAL HYBRID OF
TALL FESCUE (*FESTUCA ARUNDINACEA* SCHREB.) X
PERENNIAL RYEGRASS. (*LOLIUM PERENNE* L.)
(M. Sc. THESIS)
FATMA ÜNAL
GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
JANUARY 1988

In this study it was investigated to obtain amphidiploid plant with effect of colchicine in natural hybrid of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) x perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.).

The chromosome numbers have been found $2n=42$ in tall fescue, $2n=14$ in perennial ryegrass and $2n=28$ in hybrid which was obtained from these two plants.

The sterile plant which was obtained from natural hybridization has been treated with colchicine solution for 24 hours at $18-20^{\circ}\text{C}$. Amphidiploid clones with $2n=56$ chromosomes have been obtained at the ratio of 20-30 %. Triangular incision has been made at the base of the clones and the same applications have been repeated in 0.4 % colchicine solution which was dissolved in 2 % dimethyl-sulphoxide (DMSO). Finally, amphidiploid clones with $2n=56$ chromosomes, have been obtained at the ratio of 80 % .

During the preparation of the slides, the pretreatment of root tips have been treated with saturated α -monobromonaphthalene solution at 4°C for 16-17 hours. The fixation and hydrolysis have been made in glacial acetic acid at the room temperature for half an hour and in 1 N HCl at 60°C for 10-12 minutes, respectively. The slides have been made according to squash technique. After the treatment of alcohol steam, they were mounted in Euparal.

The measurements of chromosomes length are given below: 4.826-2.472 μ in tall fescue, 4.761-2.838 μ in perennial ryegrass, 5.669-2.561 μ in natural hybrid, 5.196-2.772 μ in amphidiploid. The karyotype analysis and idiograms of parents, hybrid and amphidiploid plants were made.

TEŞEKKÜR

"Kamışsı yumak (Festuca arundinacea Schreb.) x Çok yıllık çim (Lolium perenne L.) Doğal Melezinden Kolkisin Etkisi İle Amfidiploid Elde Edilmesi" konulu araştırmayı öneren, tecrübelerinden ve metodundan yararlandığım, çalışmalarım boyunca yakın ilgi ve desteğini gördüğüm tez danışmanım sayın Prof. Dr. Şahabettin Elçi'ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım sırasında, sera ve laboratuvar imkânlarından faydalanmama izin veren A.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Ömer Bakır'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	II
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	VI
TABLolarIN LİSTESİ	X
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	XI
 BÖLÜM I	
I.1. Giriş	1
I.2. Bugüne Kadar Yapılmış Çalışmalar	3
 BÖLÜM II	
MATERYAL VE METOD	14
II.1. Materyal	14
II.2. Metod	15
II.2.1. Kolkisin Etkisi ile Melez Bitkilerden Amfidiploid Elde Edilmesi	15
II.2.1.a. Klonların Hazırlanması	15
II.2.1.b. Kolkisinin Klonlara Uygulanması	15
II.2.2. Mikroskop Muayeneleri için Materyalin Hazırlanması	18
II.2.2.a. Kök Ücu Örneklerinin Alınması	18
II.2.2.b. İlk İşlem	18
II.2.2.c. Tesbit	19
II.2.2.d. Materyalin Muhafazası	19
II.2.2.e. Boyama	20

II.2.3. Mikroskop Muayenesi İçin Preparatların Hazırlanması	22
II.2.4. Devamlı Preparatların Yapılması	24
II.2.5. Karyotip Analizleri ve Kromozomların Detaylı Olarak İncelenmesi	25
II.2.5.a. Kromozom Boylarının Ölçülmesi	25
II.2.5.b. Kromozomların Nisbi Boylarının Hesaplanması	26
II.2.5.c. Kromozom Kollarının İndeksleri	27
II.2.5.d. İdiogramların Çizilmesi	29
II.2.5.e. Karyogramların Yapılması	30
BÖLÜM III	
ARAŞTIRMALARDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR	31
III.1. Melez Bitkilerden Kolkisin Etkisi ile Amfidiploid Elde Edilmesi İmkânları	31
III.2. Kamışsı Yumakta Mitoz Kromozomlarının Özellikleri	32
III.3. Diploid Çok Yıllık Çimde Mitoz Kromozomlarının Özellikleri	37
III.4. Doğal Festuca x Lolium Melezinde Mitoz Kromozomlarının Özellikleri	42
III.5. Doğal Festuca x Lolium Melezinden Kolkisin Etkisi ile Elde Edilen Amfidiploid Bitkide Mitoz Kromozomlarının Özellikleri	47

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM IV	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	58
IV.1. Farklı Mevsimlerin Mitoz Bölünme ve Kromozom Morfolojileri Üzerine Etkileri	58
IV.2. Kamışsı Yumak ⁴ ın Metafaz Kromozomları Üzerinde Yapılan Araştırmalar	58
IV.3. Çok Yıllık Çimin Metafaz Kromozomları Üzerinde Yapılan Sitolojik Araştırmalar	59
IV.4. Doğal Festuca x Lolium Melezleri Üzerinde Yapılan Araştırmalardan Elde Edilen Veriler	60
IV.5. Kolkisin ve Dimetil Sulfoksidin Festuca x Lolium Doğal Melezinden Amfidiploid Elde Edilmesi Üzerine Etkileri	62
IV.6. Doğal Festuca x Lolium Melezinden Kolkisin Etkisi ile Elde Ettığımız Amfidiploid Bitkilerin Özellikleri	66
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLÖLARIN LİSTESİ

<u>TABLO</u>	<u>Sayfa</u>
1. Kamışsı yumakta kromozomların morfolojik özellikleri	33
2. Çok yıllık çimde kromozomların morfolojik özellikleri	38
3. Doğal <u>Festuca</u> x <u>Lolium</u> melezinde kromozomların morfolojik özellikleri	43
4. Amfidiploid bitkide kromozomların morfolojik özellikleri	48

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

ŞEKİL

Sayfa

- 1.a. Birkaç klon birarada olacak şekilde kök
tacından bölünen melez bitki
- 1.b. Tek tek klonlara ayrılan sürgünler 17
2. Klonların büyüme bölgelerinde açılan üçgen
şeklindeki yarık 17
3. Kolkisinin büyümenin ilk devrelerinde
durdurucu etkisi 32
4. Kamışsı yumakta somatik kromozomlar metafazda 41
5. Çok yıllık çimde somatik kromozomlar metafazda 41
6. Kamışsı yumak, çok yıllık çim ve melez
bitkilerin başakları 53
7. Doğal Festuca x Lolium melezinde mitoz
kromozomlar metafazda 54
8. Doğal Festuca x Lolium melezinden kolkisin
etkisi ile elde edilen amfidiploid bitkide
mitoz kromozomlar metafazda 54
- 9.a. Kamışsı yumak
- 9.b. Çok yıllık çimin idiogramları 55
- 10.a. Doğal Festuca x Lolium melezi
- 10.b. Doğal Festuca x Lolium melezinden kolkisin
etkisi ile elde edilen amfidiploid
bitkinin idiogramları 56
- 11.a. Kamışsı yumak
- 11.b. Çok yıllık çim
- 11.c. Doğal Festuca x Lolium melezi

11.d. Doğal Festuca x Lolium melezinden kolkisin
etkisi ile elde edilen amfidiploid
bitkilerin karyogramları

57



BÖLÜM I

I.1. GİRİŞ

Kamışsı yumak (Festuca arundinacea Schreb.) Avrupa ve Asyanın mutedil bölgelerinden Sibirya'ya kadar uzanan alanda, ayrıca Kuzey Afrika'da yetişen mer'a yabani otu olarak tanınır. Amerika Birleşik Devletleri'nde de yaygın olarak yetiştirilmekte ve devamlı otlatılan mer'alarda kuvvetli ve derin köklü bir yumak teşkil etmektedir. Kaba yapılı olmasına rağmen, oldukça iyi kalitede ot veren bir bitkidir. Sapı 130 cm'ye kadar boylanır. Yaprakları kuvvetli ve şerit şeklinde çıkıntılıdır. Salkım büyüklüğü 10-30 cm uzunluğunda olup, fazla sayıda başakcık bulundurur (1,2). Somatik kromozom sayısı $2n = 42$ dir (3).

Çok yıllık çim (Lolium perenne L.) Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'nın ılıman bölgelerinde yerli olarak bulunur. Kuzey ve Güney Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda'ya götürülmüş olup, buralarda çığnenen yerlerde, yol kenarlarında yabani olarak yetişir. Kuvvetli kardeşlenen yumak şeklinde bir yapıya sahiptir. Sürgünleri küçük olması nedeniyle elverişli bir çim kapağı teşkil eder. Sap uzunluğu 10-90 cm arasında olup, ortalama 40-70 cm'dir. Yaprakları çıplak, tüysüz, üst yüzü çizgi şeklinde çıkıntılı, alt yüzü ise düz ve parlaktır(1). Haploid kromozom sayısı $n = 7$ olup, çok senelik alçak boylu bir Gramineae türüdür(2).

Doğal olarak meydana gelebilen Festuca x Lolium melezleri, Diyarbakır dolaylarında ve Adana'da bulunmuştur. Çok yıllık olan melezler her iki anacın bazı karakterlerinin birleşmesinden meydana gelir. Sapları 70-100 cm veya daha uzundur. Yaprak kenarları düzdür. Başaklar basit veya salkım şeklinde olup, birçok başakcık taşır(4). Melez, anaçlardan daha fazla kardeşlenme özelliğine sahiptir. Yere daha yatık bir gelişme gösterir. Toprağı tutma ve erozyonu önleme yeteneği daha fazladır. Fakat, iki ayrı genomdan gelen ve aralarında yeterince homolog segmentleri olmayan kromozomlara sahip olduğundan, tohum meydana getirememektedir. Bu melez, sadece vejetatif olarak üreyebilmektedir.

Büyük ölçüde tarım ile geçinen ülkemizde, yem bitkileri kültürü, hem tarla tarımını hem de hayvansal üretimi yakından etkilemektedir. Ayrıca, artan toprak erozyonunu önleme bakımından da büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde tarımsal üretim yönünden yem bitkileri kültürü henüz gerekli düzeye ulaşamadığından, Festuca x Lolium melezleri üzerinde şimdiye kadar gerekli araştırmaların yapılmadığı gözlenmektedir.

Bitki sitogenetiği geliştikçe, birçok türlerin ploidi seviyeleri açıklığa kavuşmaktadır. Böylece, daha elverişli bitkiler elde etmek için, kromozom sayıları iki katına çıkarılarak ıslah yoluna başvurulmaktadır.

1937'de kolkisinin bitkilerde poliploidi meydana

getirme etkisinin anlaşılmasından sonra, bu konuda yapılan çalışmalar gittikçe artmıştır. Bunun sonucunda da poliploidi yolu ile ıslah büyük önem kazanmıştır(5).

Yapılan bu araştırmanın amacı, doğal Festuca x Lolium melezinden, poliploidi yolu ile tohum verebilen amfidiploid bir bitkinin elde edilmesi imkanlarını araştırmaktır. Bu amaca ulaşmak için en uygun poliploid bitki elde etme yönteminin bulunması da araştırmamızın önemli bir yönünü teşkil etmiştir. Buna ilave olarak bu bitkide karyotip analizi ve kromozom morfolojileri bakımından ortaya çıkan özellikleri belirlemek ve yapılacak ıslah araştırmaları için faydalanılacak materyalin temin edilmesine çalışılmıştır.

1.2. Bugüne Kadar Yapılmış Çalışmalar

Kromozom sayısının iki katına çıkarılmasında kolkisinin kullanılma yöntemleri:

Kolkisin ile bitkilerde kromozom sayısının iki katına çıkarılmasının mümkün olduğu, ilk olarak 1937 yılında Blakeslee ve bir kısım Amerikalı araştırmacılar tarafından keşfedilmiştir(5). Bundan sonra çeşitli kolkisin metodlarının kullanılmasıyla, bir çok bitki poliploid hale getirilmiştir. Böylece, poliploidi bitki ıslahında önemli bir yer kazanmıştır.

Kolkisin, süs bitkisi olan sonbahar çiğdeminden(Colchicum autumnale) elde edilen kuvvetli bir zehirdir. Saf halde $C_{22}H_{25}O_6N$ kimyasal formülünde, renksiz bir maddedir(5).

Kromozom sayısının katlanması(dublikasyonu), bir hücre içinde, metafazda boyuna bölünen fakat, iki kardeş hücreye ayrılmayıp aynı hücre içinde kalan kromozomların bir arada bulunmasıyla meydana gelmektedir. Kolkisinin etkisi devam ettiği sürece yeniden boyuna bölünen kromozomlar yine aynı hücre içerisinde kalarak, poliploidinin devam etmesine ve daha yüksek sayıda kromozomlu bireylerin meydana gelmesine sebep olur (6,7).

Kolkisin, bitki dokularına hızla girmekte ve her halde iletken doku sistemi ile bitkide bir taraftan diğer tarafa taşınmaktadır. Bitkilerde, uzun süre ve az yoğun kolkisin çözeltisi ile çalışmak yerine, kısa sürede fakat yüksek dozlardaki çözeltiler ile daha elverişli sonuçlar alınmaktadır (7).

Su, alkol ve kloroform içerisinde kolaylıkla çözülebilen kolkisin, dimetil-sulfoksid(DMSO)'de de erimektedir. Burada DMSO, kolkisinin bitki dokularına taşınmasını hızlandırmakta ve arttırmaktadır(8). Bu nedenle, bazı araştırmacılar tarafından özellikle kullanılmaktadır. Çoğu araştırmacılar ise, DMSO kullanmadan, kolkisini saf su ile hazırlamaktadırlar. Her iki durumda da başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir (8, 9, 10).

1961'de, Buckner, Hill ve Burrus çok yıllık çim(L.perenne)x kamışsı yumak(F.arundinacea) melezlerini, % 0.2 kolkisin çözeltisinde, 24 saat süre ile bekletmişlerdir (9).

1962 yılında Essad, Lolium perenne x Festuca pratensis-ten deneysel yollarla amfidiploid elde etmiştir. Melezlerdeki kromozom sayısının iki katına çıkması için F_1 klonlarını, % 0.9 kolkisinde, 15 saat bekletmiştir. Diğer yandan % 0.5'lik kolkisinde, 24 ve 40 saat tutmuştur (10).

1964'te Elçi, Agropyron junceum (L.) P.B. ssp. boreoatlanticum S.G. ile A.elongatum (Host) P.B.'den meydana gelen F_1 melezinin kolkisin ile muamele edilmesinden $2n=21$ olan somatik kromozom sayısının, $2n=42$ 'ye çıktığını gözlemiştir (11).

Malik ve Thomas, Lolium ve Festuca cinsinin 25 türü üzerinde sitolojik araştırmalar yapmışlardır. Bu araştırmacılar, bir bitkinin somatik kromozom takımının, temel bir taksonomik özellik olarak görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca, kromozomların nisbi boyu, sentromerin yeri, ikincil yapılar ve satelitlerin sayısının, karşılaştırmalı sitotaksonomik çalışmalarda önemli karakterler olduklarını gözlemişlerdir (12).

Lewis, Lolium multiflorum ve Festuca arundinacea melezine kolkisin enjekte ederek, steril F_1 melezlerinden fertil melezler elde etmiştir (13).

Elçi (1966), diploid çok yıllık çavdardan (Secale montanum Guss.), kolkisin etkisi ile tetraploid çavdar elde etmiştir. Tohumları, kolkisin muamelesinden bir gün önce petri kutusunda, oda sıcaklığında çimlendirmiş, 3-10 mm

boyunda kökçük veren fideleri seçmiştir. Bunları, içerisinde 3-4 mm'lik bir tabaka teşkil edecek şekilde % 0.1 kolkisin çözeltisi bulunan ayrı bir petri kutusuna koymuştur. Seçilen fideleri bu kutuda, 25-27°C'ta 3 saat bekletmiştir. Bu tohumlardan elde edilen kökçüklerden yapılan preparatlarda tetraploid çavdarlar elde etmiştir (14).

Bazı araştırmacılar, kolkisinin, dimetil-sulfoksit ile hücrelere daha kolay ve hızlı bir şekilde taşındığını düşünerek, kolkisini, su yerine dimetil-sulfoksit (DMSO) ile hazırlamışlardır (8, 15, 18).

Sanders ve Hull (1970), DMSO'in, bitkilerde birçok organik karışımın taşıyıcısı olduğu gerçeğinden hareket ederek, bitkilere, DMSO ile hazırlanmış kolkisin çözeltisi uygulamışlardır. Araştırmacılar, bir çeşit böğürtlen üzerinde yaptıkları çalışmada, bitkileri, gelişmenin üç değişik safhasında kolkisin ile muamele etmişlerdir. Bunlar:

- 1- Sürgünler (filizler) uzamış, fakat gözle görülür çiçek tomurcukları yok.
- 2- Sadece bitkinin ucundaki çiçek tomurcuğu ayırt edilebilir durumda.
- 3- Bitkideki bütün tomurcuklar belirgin halde.

Araştırmacılar, yukarıda sayılan safhalarda bitkilerin büyüme bölgelerini, DMSO ile hazırlanmış, farklı konsantrasyonlardaki kolkisin çözeltileri ile 3, 6 ve 12 saat muamele etmişlerdir (15).

Kaul ve Zutshi, DMSO'in, kolkisinin etkisini arttırıcı özelliğinden yararlanarak, poliploid üretiminde kullanmışlardır. Araştırmacılar, kara buğday, arpa ve çavdar tohumlarını, % 2 DMSO ile hazırlanmış % 0.2 ve % 0.4 kolkisin çözeltisinde, 24 saat bekletmişlerdir. Bu sürenin sonunda, tohumlar hızla akan musluk suyunda yıkanmış ve yayılan ışık altında, su ile ıslatılmış filtre kâğıdı üzerinde filizlenmeye bırakılmışlardır. Tohumlardan elde edilen kök uçlarında, 4x veya x'in daha fazla katları kadar kromozomu olan hücreler elde etmişlerdir (8).

Sulinowski (1964), Festuca pratensis (2x) x F.arundinacea (6x)'den tamamı ile steril olan melezler elde etmiştir. Bu melezlerin $2n=28$ kromozomlu olduğunu belirlemiştir. Ayrıca, melezlerin yaprak şekilleri ve bitki sapı morfolojisi ile çiçek durumlarının, anaç bitkilere oldukça fazla derecede benzer olduğunu gözlemiştir.

Araştırmacı, çiçek tozu ana hücrelerinde, mayoz bölünmenin anafaz-I ve tefofaz-I'inde, hemen her zaman 3-8 arasında geri kalmış kromozomlar ve bazan da kromatin köprüleri tesbit etmiştir.

Sulinowski, anafaz-II ve telofaz-II'de de 1-6 arasında geri kalmış kromozomlar mevcut olduğunu ve anafaz-II de ara sıra kromatin köprüleri bulunduğunu belirtmiştir. Anafaz ve telofazda geri kalmış kromozomlar, tetrad safhasında mikronuklei meydana getirmektedirler (16).

Elçi, doğal Festuca x Lolium melezi üzerinde yaptığı sitolojik çalışmalar sonunda, bu bitkide somatik kromozom sayısının $2n=28$ olduğunu bulmuştur. Melez bitkiyi kolkisin ile muamele ederek, $2n=56$ kromozomlu hücreleri bulunan amfidiploid klonlar elde etmiştir(7).

Elçi, amfidiploid bitkinin başaklarında yaptığı mayoz incelemesinde, anafaz-I ve anafaz-II safhalarında 4-10 arasında geri kalmış kromozom gözlemiştir. Tetratlarda ortaya çıkan birden fazla mikronukleinin de anafaz safhalarında geri kalmış olan kromozomlardan oluştuğunu bildirmiştir. Araştırmacı, melez bitkiyi açık araziye dikerek, dış şartlara maruz bırakmıştır. Kış mevsiminde, karların altında dahi canlılığını koruması üzerine, bu bitkinin soğuğa dayanıklı olduğu sonucuna varmıştır.

Sağsöz, diploid çok yıllık çimden, tetraploid çok yıllık çim elde etmek için tohumları önce nemlendirilmiş kurutma kâğıdı ile kaplanmış petri kutuları içerisinde, çimlendirme dolabında, 24°C 'ta çimlendirmiştir. Bu tohumları % 0.2'lik kolkisinde, 25°C 'ta 3saat bekletmiştir. Bu sürenin sonunda tohumları distile su ile yıkamış ve ancak örtecek kadar olan su içerisinde bir gece bırakmıştır. Kolkisin işleminden sonra tekrar petri kutusundaki süzgeç kağıtları üzerine konan tohumlar, çimlendirme dolabında gelişmeye bırakılmıştır. 3-4 gün sonra kâsalara şaşırtılarak, güneşli bir odada büyümeye terkedilmiştir. 3 ay sonunda bitkilerin bir kısmı ölmüş, canlı kalanlardan

tetraploid olma ihtimalindekiler, Sağsöz tarafından ayırt edilmiştir (17).

Morgan da (1976) % 2 DMSO'de hazırladığı % 0.2 kolkisin çözeltisini çimlerde poliploid üretimi için kullanmıştır. Araştırmacı, gövde ucunda üçgen şeklinde yarık açmış ve bu klonları, hazırladığı kolkisin çözeltisinde 7-8 saat bekletmiştir. Çözeltiden çıkardığı klonları akan musluk suyu altında, 4 saat yıkamış ve saksılara dikmiştir (18).

Thomas ve Pickering (1979), Morgan'ın tekniğini bir miktar değiştirerek, arpa ve çavdar melezini, 5 yapraklı safhada kolkisin ile muamele etmişlerdir. Araştırmacılar % 2 DMSO ile hazırlanmış % 0.1 kolkisindeki bitkileri, oda sıcaklığında, 5 saat bekletmişlerdir (19).

Preparatların yapılması ve mitoz kromozomlarının incelenmesi:

Bitkilerin özelliklerine göre az-çok farklı şekillerde preparatlar yapılmaktadır. Mitoz kromozomlarının incelenmesinde genellikle ezme tekniği ve Feulgen boyama metodu kullanılmaktadır.

Malik ve Thomas, kromozom morfolojisi çalışmasını kolaylaştırmak için kök uçlarını, fiksasyondan önce çeşitli şekillerde ön işleme tabi tutmuşlardır. Düşük oksikinin solusyonu (0.002 M, 2.5-3 saat, 15°C'ta), doymuş kumarin solusyonu (2.5 saat), α -bromonaftalin (25 dakika)

ve soğuk suda (0°C'ta 16 saat) son derece tatmin edici sonuçlar elde etmişlerdir. Ezme preparatları, asetik-orsein veya aseto-lakmoid ile yapmışlardır.

Araştırmacılar, orta derecede büzülmüş kromozomu olan 5-10 hücre ölçüsünü esas alarak, haploid yapının idiogramlarını göstermişlerdir. Kromozomların değerlendirilmesinde 1:1 oranındaki kollara sahip olanlar median, 1:1-1:3 arasındakiler sub-median ve 1:3'ten küçük olanları sub-terminal kromozom olarak kabul etmişlerdir. Farklı türler arasındaki karşılaştırmaları, nisbi boy (Belirli bir kromozomun boyu / En uzun kromozomun boyu), kol oranı (Kısa kol / Uzun kol) ve satelit tiplerini dikkate alarak yapmışlardır (12).

Sulinowski, kök uçlarında somatik kromozomların incelenmesinde ezme tekniğini kullanmıştır. Çiçek tozu ana hücrelerinde mayoz gözlemlerini de ezme metoduna göre yapmıştır (16).

Şağsöz, kök uçlarını ilk işlemde, α -mono-bromonaftalinde, 16-18 saat, 5°C'ta buzdolabında bekletmiştir. Tesbit işlemini, oda sıcaklığında, glasial asetik asitte, yarım saat uygulamıştır. 60°C'taki 1 N HCl'de 12 dakika bekleterek hidroliz ettiği kök uçlarını Feulgen ile boyamıştır. Preparatların yapılmasında ezme metodunu kullanmıştır. Devamlı preparatları, lam ile lameli ayırmadan hazırlamıştır (17).

Lange ve Jochemsen, kromozom sayısı ve morfolojisi ile ilgili yaptıkları araştırmada, kök uçlarına 8-hidroksikinolinde ilk işlem uygulamışlardır. Fiksasyonu 1:3 asetik alkolde yaptıktan sonra, boyama için Feulgen kullanmışlar ve preparatları ezme tekniğine göre hazırlamışlardır (20).

Thomas ve Pickering, arpa x çavdar melezi ve amfidiploidlerinin sitolojik çalışmalarında, kuvvetli büyüyen kök uçlarını keserek, distile suda, 1°C'ta, 24 saat ilk işlem ve 3:1 etanol:asetik asitte 2 saat fiksasyon yapmışlardır. Hidrolizi, 1 N HCl'de, 60°C'ta 10 dakika olarak gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra Feulgende boyayarak ezme preparatları % 1 aseto-karminde hazırlamışlardır (19).

Zwierzkyowski, kromozom sayımı için kök uçlarını buzlu suya koymuş ve buzdolabında $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ta bir gece bekletmiştir. Fiksasyonu, 3:1 etanol:asetik asitte, 16-20 saat uygulamıştır. Bir çok durumlarda, kromozomların daha iyi dağılmasını sağlamak için, materyali, fiksasyondan önce, doymuş alfa-bromonaftalin ile, 2-3 saat muamele etmiştir. Sonra, % 4-5 alkolokarminde bekletmiştir. Ezme preparatları yapmadan önce, kök uçlarını, 1-3 gün HCl'de bırakarak, dokuların yumuşaması sağlanmıştır (21).

Jan ve arkadaşları, kromozom sayımında kök uçlarına, soğuk su ile (3°C) ön işlem uygulamış ve boyamayı standart Feulgen ile yapmışlardır (22).

Elçi, kök uçlarında ilk işlem için çeşitli çözelti

ve yöntemlerin kullanıldığını belirtmiştir. Bunlar:

- Eriyen buz
- α -Monobromonaftalin
- Paradiklorbenzen
- 8-Hidroksikinolin
- Kolkisin
- Kumarin

Elçi, yaptığı araştırmaların çoğunda, doymuş α -monobromonaftalin kullanmış ve olumlu sonuçlar elde etmiştir. Kök uçlarını, bu çözeltide, 16-17 saat, 4°C'ta buz dolabında bekletmiş, sonra glasiyal asetik asitte, yarım saat tesbit etmiştir. Materyalin özelliğine göre, 60°C'ta 1 N HCl'de, 10-12 dakika hidroliz yapmıştır. Buradan aldığı kök uçlarını Feulgen ile yaklaşık 1 saat boyamıştır. Ezme preparatları % 45'lik asetik asit ile hazırlamıştır.

Araştırmacı, bazı baklagil ve buğdaygil yem bitkilerinin kök uçlarının boyanmasında aseto-karminden faydalanmıştır. Gerek Feulgen gerekse aseto-karmin ile yaptığı preparatları, devamlı hale getirmek için alkol buharı değiş-tokuşu yöntemini kullanmıştır. Bu alkol buharı, daha sonra euparal ile yer değiştirmektedir.

Elçi, karyotip analizleri için kromozomların kol indekslerini;

$$\text{Kol indeksi} = \frac{\text{kısa kol boyu}}{\text{uzun kol boyu}}$$

Kromozomların nisbi boylarını ise,

$$\text{Nisbi boy} = \frac{\text{kromozom boyu}}{\text{hücredeki bütün kromozomların toplam boyu}} \times 50$$

ile elde etmiştir. Kromozom nisbi boy hesaplamalarında her genom için 25 katsayısını kullanmıştır (23, 24, 25, 26).

BÖLÜM II

MATERYAL VE METOD

II.1. Materyal

Bu araştırmada kullanılan materyaller:

1- Kamışsı yumak (Festuca arundinacea Schreb. $2n= 42$) Ankara-Haymana yolu üzerinde bulunan, A.Ü. Ziraat Fakültesi Araştırma Çiftliğinden alınmıştır. Bu bitki, araştırmalarımızda kullandığımız doğal Festuca x Lolium melezinin anacı olarak kabul edilmektedir.

2- Çok yıllık çim (Lolium perenne L., $2n= 14$), Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir.

3- Çalışmamızda, araştırma materyali olarak kullanılan Festuca x Lolium melezi ($2n= 28$), Ş. Elçi tarafından Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi araştırma arazisinde yetiştirilen parsellerden elde edilmiştir. Bu melezin, kamışsı yumak ile çok yıllık çim arasında, doğal olarak tozlanma ve döllenme sonucunda meydana gelmiş bir bitki olduğu kendisi tarafından yapılan morfolojik ve sitogenetik araştırmalar ile belirlenmiştir.

4- Araştırmalarımız sırasında yukarıda belirtilen melez bitkinin kromozom sayısı, kolkisin etkisi ile iki katına çıkarılmıştır. Böylece elde edilen amfidiploid bitki üzerinde sitogenetik araştırmalar yapılmıştır.

Araştırmalarımızda kullanılan bütün bitkiler, A.Ü. Ziraat Fakóltesi serasında, saksılarda klonlar halinde yetiştirilmiştir. Melez bitkiden, amfidiploid bitki elde etmek ve böylece, kromozom sayısını iki katına çıkarmak için uygulanan kolkisin işlemleri, saksılarda yetiştirilen bitkilerden alınan klonlar üzerinde yapılmıştır. Kar-yotip araştırmalarında da bu bitkilerin kök uçlarından elde edilen kromozomlardan faydalanılmıştır.

II.2. Metod

II.2.1. Kolkisin Etkisi ile Melez Bitkilerden Amfidiploid Elde Edilmesi

II.2.1.a. Klonların Hazırlanması

Kolkisin uygulamasından 2-3 hafta önce, melez bitkilerin kökleri temizlenip, 4-8 klon birarada olacak şekilde bölünerek saksılara dikilmiştir. (şekil.1.a). Saksılarda geliştikten sonra, kolkisin ile muamele edilmek üzere her sürgün tek tek klonlara ayrılmıştır (şekil.1.b). Bunların da kökleri yeniden temizlenmiş, üst kısmından da yaprak ve sapları kesilerek 7-10 cm. boyunda klonlar elde edilmiştir.

II.2.1.b. Kolkisinin Klonlara Uygulanması

Daha önceden hazırlanmış klonlara, farklı yöntem ve sürelerde, çeşitli konsantrasyonlarda kolkisin tatbik edilmiştir. Bu işlemler aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1- Kökleri ve yaprakları kesilerek, temizlenmiş klonlar, damıtık suda çözülerek hazırlanmış % 0.1'lik kolkisin çözeltisinde, 18-20°C sıcaklıkta, 24 saat süre ile bekletildi.

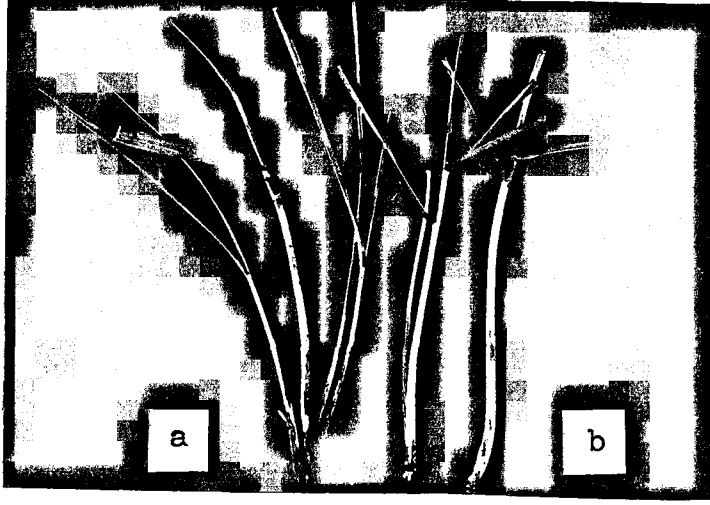
2- Klonlar, % 2 dimetil sulfoksit (DMSO) içinde çözülerek hazırlanan % 0.4, % 0.2 ve % 0.1 kolkisin çözelti-lerinde, 18-22°C sıcaklıkta, 3, 6, 12 ve 24 saat süre ile kolkisin etkisinde bırakıldı.

3- Klonların köklenen kısımlarında, kökten itibaren 4-8 mm kadar yukarıda, keskin bir jilet ucu ile, kenarlarının uzunlukları yaklaşık 2x5x5 mm olan üçgen şeklin- de yarıklar açıldı. (Şekil.2). Bu klonlar da % 2 DMSO ile hazırlanmış % 0.1, % 0.2 ve % 0.4 kolkisin çözeltile- rinde, 15-20°C sıcaklıkta, 8, 12 ve 24 saat süre ile bek- letildi.

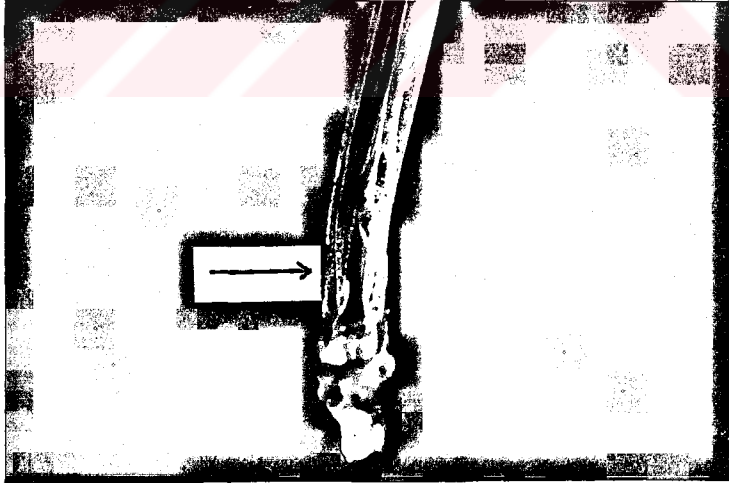
Yukarıdaki şekillerde yapılan bütün kolkisin uygula- malarından sonra, kullanılan 1375 klon, 7-8 defa su ile yıkan- mıştır. Bu klonlar, gelişmelerini sürdürmek için yeniden saksılara dikilmiş ve serada gelişmeye bırakılmıştır. Se- rada saksılara yeterince su verilerek, bitkilerin gelişme- leri sağlanmıştır. Seranın sıcaklığı, 18-20°C arasında tutulmaya çalışılmıştır.

Saksılara konulan toprak karışımı:

2 hacim yanmış elenmiş çiftlik gübresi,



Şekil.1.a. 4-8 klon birarada olacak şekilde
kök tacından bölünen melez bitki.
b. Tek tek klonlara ayrılan sürgünler.



Şekil.2. Klonların büyüme bölgelerinde açılan
üçgen şeklindeki yarık.

1 hacim yıkanmış elenmiş ince kum ve
1 hacim elenmiş tarla toprağının karıştırılması ile
hazırlanmıştır (7).

II.2.2. Mikroskop Muayeneleri İçin Materyalin Hazırlanması

Kök ucu hücrelerindeki somatik kromozomlar üzerinde
yaptığımız karyotip analizleri için gerekli materyal, a-
şağıda belirtilen metod ile hazırlanmıştır:

II.2.2.a. Kök Ucu Örneklerinin Alınması

Bitkilerin yetiştirildiği küçük saksılar ters çevri-
lerek, saksının kenarlarına yeni dokunmaya başlayan genç
kökler 1.0-1.5 cm boyunda kesildi. Örnekler, mevsim şart-
larına göre değişik saatlerde alındı.

İlkbahar, sonbahar ve sera sıcaklığının 20°C'in üze-
rinde olması halinde kış mevsiminde de 16⁰⁰-17⁰⁰ saatleri
arasında alınan kök uçlarında, % 20'nin üzerinde, mitoz
bölünmede olan hücreler elde edilmiştir. Yaz ve sera sı-
caklığının 20°C'in altında olduğu kış mevsiminde ise, sabah
07⁰⁰-09⁰⁰ veya akşam 16⁰⁰-18⁰⁰ saatleri arasında, ancak
% 5 dolayında, mitoz bölünme gösteren hücreler elde edilmiştir.

II.2.2.b. İlk İşlem

100 cm³ damıtık suya, birkaç damla α -monobromonaftha-
lin damlatılarak, oda sıcaklığında doymuş çözelti hazırlan-
mıştır. Bu çözeltiden, 2-2.5 cm çapında, 4-5 cm boyunda
cam deney tüplerine 2.5-3 cm yüksekliğe kadar (4-5 cm³)

doldurulmuştur. (Bundan sonra tüplere konulan diğer çözeltiler için aynı miktarlar kullanılmıştır). Kesilen kök uçları bu çözeltiye konulmuştur. Yaklaşık 1x5 cm boyutlarındaki kağıt etiketlere kurşun kalem ile bitki numaraları, kök ucunun alındığı tarih, saat v.b. yazılarak, tüpün içine konulmuştur. Kurşun kalem kullanılmasının nedeni, etiketlere yazılan yazıların çeşitli çözeltilerde silinmeden kalabilmesini sağlamaktır. Materyal buzdolabında 16-18 saat süre ile bekletilmiştir.

İlk işlemin amacı, iğ ipliklerinin teşekkülüne engel olmak ve mitozu metafazda bloke etmektir (6).

II.2.2.c. Tesbit

α -monobromo naftalinden çıkarılan kök uçları, asetik asit içerisinde, oda sıcaklığında, 30 dakika bekletilmiştir. Böylece, kök uçları tesbit edilmiştir. Tesbit işleminin amacı, kromozomların bitkinin hayattaki durumuna mümkün olduğu kadar yakın olarak kalmasını sağlamaktır (7).

II.2.2.d. Materyalin Muhafazası

Tesbit işleminden sonra, hemen kullanılmayacak kök-ler % 70'lik alkolde oda sıcaklığında 5'er dakika olmak üzere 2 defa yıkanmıştır. Böylece, kök uçları asetik asitten temizlenmiş, sonra yine % 70'lik alkol içinde buzdolabında + 4°C'da depolanmıştır. Bu şekilde kökleri bozulmadan uzun süre muhafaza etmek mümkün olmuştur. Elçi, bazı

araştırmacılar aynı yöntemle uzun süre depolanmış kök uçlarında, kromozomların gözleminde daha iyi sonuçlar elde ettiklerini bildirmektedir.

II.2.2.e. Boyama

Boyama iki safhada yapılmıştır:

1- Hidroliz:

Kök uçları, tesbit işleminden sonra hidroliz edilecek ise, bunların glasiyal asetik asitten temizlenmeleri gerekir. Materyal, depolanmış halde bekletildiği % 70'lik alkolde çıkarıldıktan sonra hidroliz edilecek ise, bu kök uçlarının alkolünün temizlenmesine ihtiyaç vardır. Bunun için oda sıcaklığında, her biri 5 dakika devam eden 3 yıkama yapılmıştır. Yıkamalarda, damıtık su kullanılmıştır. Yıkanan kökler 1 N HCl içinde, 60°C'da hidroliz edilmiştir. Hidrolizler, Lolium perenne'de 10 dakika, Festuca arundinacea, melez ve amfidiploidde 12 dakika olarak yapılmıştır.

Hidroliz ile dokunun hücreleri birbirinden ayrılıp, daha iyi gözlenmeleri sağlanmaktadır. Çünkü, yüksek sıcaklıkta HCl, hücreler arası bağlayıcı maddeyi eritmektedir. Aralarında birleştirici bağ kalmadığından, hücreler tek tek bulunacak şekilde ayrılır. Böylece, kök ucu hücreleri mikroskop altında tek bir tabaka halinde yayılarak, ayrı ayrı gözlenmeleri mümkün olabilmektedir. Hidroliz ile aynı zamanda sitoplazmanın renksiz hale gelmesi ve yalnızca

çekirdekdeki kromatinin boyanması sağlanmaktadır (7).

2- Boyama:

Boyama işleminde Feulgen kullanılmıştır.

Feulgenin Özellikleri: Feulgen boyası, Feulgen ve Rossenbeck tarafından 1924 yılında ortaya konulmuş bulunmaktadır. Feulgen, dokular HCl ile hidroliz edildikten sonra kullanılır. Feulgenin yapılışında kullanılan fuksin bazik çözeltisi, kromatini seçici olarak boyar. Özel olarak, kromozomların nükleik asitini boyayan aldehitler için Schiff'in reaksiyonuna dayanan bir yöntem bulunmuştur. Bu bakımdan Feulgen, kromozomların görünümü için etkili bir şekilde kullanılmaktadır (7).

Feulgenin Hazırlanışı: Kristal halde 1 gr bazik fuksin alınır. Küçük bir havanda iyice ezilir, toz haline getirilir ve 500 cm³'lük bir erlenmayere konulur. Bir başka erlenmayerde 200 cm³ damıtık su kaynatılır ve toz halindeki bazik fuksin üzerine yavaş yavaş dökülür. Bir yandan da sürekli olarak karıştırılır. Karıştırma işlemi, boyanın sıcaklığı 50°C'a düşünceye kadar devam eder. Sonuçta vişne çürüğü renginde bir çözelti elde edilir. Bu çözeltiye 20 cm³ 1 N HCl ilave edilir ve süzülür, içerisine 2 gr potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) konulur. Buzdolabında en az bir gece bekletilir. Boya, vişne çürüğü renginden, açık çay rengine dönünce kullanılır (7).

Boyama İşlemi: Hidroliz edilen kök uçları 1 N HCl'den

çıkarılarak, içerisinde Feulgen bulunan tüplere konulmuştur. Burada en az bir saat bekletilmiştir. Feulgenden çıkarılan kökler, 10-15 dakika damıtık su içinde bırakılmış ve bu materyalden preparatlar hazırlanmıştır.

II.2.3. Mikroskop İncelemeleri İçin Preparatların Hazırlanması

Boyama işleminden sonra, bütün köklerin kırmızı-viyole renginde boyandığı görülmüştür. Fakat, meristem hücrelerinin bulunduğu 2 mm kadar uzunluğundaki kök ucu, daha koyu kırmızı-viyole bir renk almıştır. Mikroskop incelemeleri için yapılan preparatlarda, kökün yalnız bu kısmı kullanılmıştır.

Preparatların yapılmasında aşağıdaki yöntem uygulanmıştır:

Boyanmış olan kök uçlarından biri, pens yardımı ile bir lam üzerine konulur. Keskin bir jilet ile, kökün 2-3 mm lik uç kısmı kesilerek, çok küçük parçalara bölünür. Bu parçalar ne kadar küçük olursa, preparatta hücrelerin dağılışı da o kadar iyi olur. Kökün parçalanması sırasında, parçalanan kısımların kuruması, kök ucunu daha küçük parçalara ayırmayı güçleştirebilir. Bu nedenle, kök parçalarının hacmi kadar % 45'lik asetik asit bir ok uçlu iğne vasıtasıyla parçalanan kısma ilave edilir. Büyük bir asit damlası alınırsa, damla içinde dağılan parçacıkların yeniden parçalanması güç olur. Bunun için az miktarda % 45'lik

asetik asit ilavesi uygun olur.

Bu şekilde tamamen parçalanmış kök ucunun üzerine bir damla % 45'lik asetik asit ilave edilir. Ok uçlu iğne ile parçacıkların damla içinde homojen olarak dağılması sağlanır. Bu parçacıkların üzerine lamel kapatılır. Bir elin baş parmağı ile lamel üzerinden oynatmadan tutarak, diğer ele alınan kurşun kalemin arkası ile lamele hafif hafif vurulur. Böylece, hem hücrelerin daha iyi dağılması hem de yassılaşıarak hücre içerisindeki tüm kromozomların aynı düzlem üzerine gelmesi sağlanır. Uygulanan vuruşun şiddeti her bitki materyali için farklıdır. Örneğin, Festuca ve Loliuma göre melez ve amfidiploid materyalin kök uçları oldukça sert olduğundan bu materyalde kromozomları aynı düzlem üzerine getirmek için daha kuvvetli kurşun kalem darbeleri gerekmektedir.

Yukarıdaki işlemlere ilave olarak, kromozomları aynı düzlemde bulundurmak için preparat bir masanın üzerine, iki kurutma kağıdı arasına konulur ve baş parmağın ucu ile lamelin her yanına aynı şiddette bastırılır. Bunun sonucunda parçacıkların tek bir hücre tabakası haline gelmesi sağlanır. Lamele fazla bastırıldığından preparatın içinde yer yer hava kabarcıkları kalır. Bunları gidermek için lamelin kenarlarına ok uçlu iğne ile % 45'lik asetik asit damlatılır. Fazla asit kurutma kağıdı ile alınır (6,7).

Mikroskopta incelenen ve hücrelerinde amaca elverişli kromozomları bulunduğu gözlenen preparatlar devamlı

duruma getirilir.

II.2.4. Devamlı Preparatların Yapılması

Hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenerek, kromozomları yeterli derecede boyanan ve bir düzlem üzerinde iyi bir dağılım gösteren hücrelere sahip olanlar devamlı duruma getirilmiştir.

Devamlı preparatları yapmak için alkol buharı değiş-tokuşu yöntemi kullanılmıştır(7). Bu yöntemle preparatın lamı ile lameli arasına alkol buharının girmesi sağlanmıştır. Çünkü alkol buharı daha sonra Euparal ile yer değiştirecektir. Bu nedenle, temizlenmiş ve üzerine gerekli bilgileri cam kalemi ile yazılmış preparat, bir lam yıkama kabına konulmuştur. Bu kabin ve kapağının iç tarafına kurutma kağıdı yerleştirilmiştir. Cam kaba, 4-5 mm yüksekliğe kadar absolü alkol konulmuştur. Aynı şekilde, kabin iç kısımlarına yerleştirilen kurutma kağıdı da bu alkol ile nemlendirilmiştir. Burada, kurutma kağıtlarının alkol ile fazla miktarda ıslanmamasına dikkat edilmiştir. Çünkü, fazla miktardaki alkol, buharlaşma oranını azaltmaktadır. Bu nedenle kurutma kağıtlarının her tarafının ıslanmasına ancak yetecek kadar alkol konulmalıdır. Ayrıca, cam kabin ağzına ve kapağının etrafına vazelin sürülerek, alkol buharlarının kapaktan uçması önlenmiştir.

Preparatlar cam kaptan, buz dolabında 0-4°C'da bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün, preparatlar bu cam kaptan

çıkarılıp petri kutusuna konulmuştur. Petri kutusu ve kapağının iç kısımları da önceden kurutma kağıdı ile kaplanmıştır. Kaplanan kurutma kağıtları, absolü alkol ile yeterince nemlendirilmiş ve düz bir masa üzerine konulmuştur. Preparatlar, bu petri kutusu içerisine dizilmiştir. Lamelin iki kenarına karşılıklı olarak birer damla Euparal damlatılmıştır. Bu damlalar ok uçlu iğne ile lamelin kenarı boyunca dağıtılmıştır. Böylece, Euparalin lam ile lamel arasına girmesi kolaylaştırılmıştır. Petri kutusunun kapağı kapatılarak 4-5 gün oda sıcaklığında bekletilip kurutulan preparatlar, devamlı duruma gelmişlerdir.

Devamlı hale getirilen preparatlar yıllarca bozulmadan kalabilirler.

II.2.5. Karyotip Analizleri ve Kromozomların Detaylı Olarak İncelenmesi

II.2.5.a. Kromozom Boylarının Ölçülmesi

Araştırmalarımızda kromozom ölçümlerini ve karyotip analizlerini yapmak için devamlı preparatlar kullanılmıştır. Bu preparatlarda, kromozomları metafaz safhasında bulunan iyi bir şekilde dağılma gösteren, fazla büzülmemiş, morfolojileri iyi görülebilen ve bir düzlem üzerinde bulunan en iyi kök ucu somatik hücreleri belirlenmiştir. Bu hücrelerin fotoğrafları, Jena marka mikroskopta, 24x36 mm, 15 DYN'lik mikro filmler üzerine çekilmiştir. Kromozomların negatif filmleri, mikrofilme alınan yazıları

okumada kullanılan agrandisöre konulmuştur. Buradan, masa üzerindeki kağıda akseden kromozomların görüntüleri, ince uçlu bir kurşun kalem ile çizilmiştir. Kromozomların mikroskopta fotoğrafları çekilirken, gerçek büyütmenin ne kadar olduğunu tesbit etmek için bir objektif mikrometrenin de fotoğrafı çekilmiştir. Bu mikrometrenin negatif filmi aynı agrandisöre konularak bir mikronun kağıt üzerinde ne kadar büyütüldüğü bulunmuştur. Böylece, kromozomların kaç kez büyütülerek kağıda çizildiği belirlenmiştir. Araştırmamızda kromozom boyları, gerçek büyüklüklerinin 4826 katı kadar büyütülmüştür. Çizilen kromozomların kısa ve uzun kol boyları kompas ile mm olarak ölçülmüştür. Ölçülen kromozomların 4826 defa büyütüldüğü dikkate alınarak gerçek boyları mikron olarak değerlendirilmiştir. Kromozom boylarının ölçümünde, sentromerler ve satelit ile kromozomu ayıran bölgeler dikkate alınmamıştır. Essad (10), ve Elçi (6,7 ve 14) de aynı yolu izlemişlerdir.

II.2.5.b. Kromozomların Nisbi Boylarının Hesaplanması

Aynı hücre içinde bulunan kromozomların boylarını birbiri ile veya anaçları ileriki dölleri ile karşılaştırmak için kromozomların nisbi boyları kullanılmıştır. Çünkü, ölçülen her hücrede kromozomlar diğer hücrelerin kromozomlarından az çok farklı bir şekilde büzülmüş olabilir. Oysa, bir hücrenin içindeki kromozomlar hemen hemen aynı

derecede b z lm   t r. Kök ucu örnekleri alınırken, preparatlar yapılırken ve diğer bütün işlemlerde her preparata mümkün olduğu oranda aynı yöntemler uygulanmıştır. Fakat Elçi'nin de belirttiği gibi kromozom ölçümlerinde deneylerin hatalarını tamamen ortadan kaldırmak mümkün değildir(7). Bu bakımdan, kromozomların boyu, hücre içindeki diğer kromozomların toplam boylarına oranlanırsa, bu oran hücreden hücreye oldukça az bir değişim gösterir. Böylece, bir hücrenin kromozomları diğer bir hücrenin kromozomları ile daha sağlıklı bir şekilde kar ıla tırılır.

Nisbi kromozom boyları bir katsayı ile çarpılarak ifade edilir. Bu şekilde, çeşitli sayıda kromozomları bulunan hücreleri, doğrudan doğruya kar ıla tırmak mümkün olur. Elçi, nisbi boyların hesaplanmasında her genom için 25 katsayısını kullanmıştır (7,14).

$$\text{Kromozomun nisbi boyu} = \frac{\text{Kromozom boyu}}{\text{Hücredeki kromozomların toplam boyu}} \times 50$$

(50 katsayısı diploidler için kullanılmıştır).

II.2.5.c. Kromozom Kollarının İndeksleri

Bazı araştırıcılar bu indeksi kromozomun uzun kolunun boyunu kısa kol boyuna bölerek elde etmişlerdir. Essad(10) ve Elçi(7,14) kol indekslerini, kromozomun kısa kol boyunu uzun kola bölerek bulmuşlardır. Bu sayede, kromozomların tanımında sentromerlerin yeri ve hangi kolun daha uzun olduğu belirlenir. Araştırmamızda, kromozomun kısa kol boyu

uzun kol boyuna bölünerek kol indeksleri hesaplanmıştır.

Kromozomların nisbi boyu ve kol indeksleri, bir karyotipteki homolog kromozomların belirlenmesinde kullanılmıştır. Karyotip araştırmalarında, bir tür içinde ve anaçlar ile ileriki dölleri arasında yapılan karşılaştırmalarda, kromozomlar nisbi boy sınıflarına göre gruplandırılmıştır. Türlerin her birinde beş somatik hücrede kromozom ölçümleri yapılmıştır. Böylece, bir hücre içerisinde iki homolog kromozom olduğuna göre, bu hücrenin bütün kromozomları ölçüldüğü zaman, bir kromozom ve bir de onun homoloğu olan, aynı değerdeki iki kromozom ölçülmüş olmaktadır. Beş hücrede ölçüm yapıldığına göre her bir kromozom ve bir de onun homoloğu yani on kromozom ölçüsü elde edilmiş olur. Hesaplamalar bu on kromozomun ölçüleri esas alınarak yapılmıştır.

Her kromozomun boyu, kısa kol ve uzun kol boyları, daha önce anlatılan yöntem ile kromozom şekillerinin çizildiği kağıtlar üzerinde mm olarak ve mm'nin 0.1'ine kadar ölçülmüştür. Bir kromozomun boyu, iki kol boyunun toplamıyla elde edilmiştir. Her kromozomun ayrı ayrı nisbi boyu ve kol indeksleri hesaplanmıştır. Kol indeksleri ve nisbi boyları birbirine yakın olanlar homolog kromozomlar olarak belirlenmiştir. Ayrı bir cetvel hazırlanarak, homolog kromozomlar birbirinin yanına getirilmiştir. Bu durumda, beş hücrenin her birinde en uzun olan ikişer kromozoma(homolog kromozomlar) I numarası verilmiştir. Sıra

ile diğerk homolog kromozomlar da numaralanmıştır. Aynı numarayı alan beş ayrı hücredeki 10 homolog kromozomun kısa kollarının boyu toplanıp, ortalaması alınarak, I numaralı kromozomun ortalama kısa kol boyu bulunmuştur. Aynı yöntem ile, kromozomun uzun kol boyu hesaplanmıştır. Kısa ve uzun kol boylarının toplamının ortalaması, bu kromozomun ortalama boyu olarak alınmıştır. Milimetre olarak ifade edilen bu değerler 4826 defa büyütölerek çizilmiş olan kromozomların boylarını vermektedir. Gerçek kromozom boyları, elde edilen ölçümlerin 4826'ya bölünmesi ile mikron (μ) olarak hesaplanmıştır.

I numaralı 10 homolog kromozomun nisbi boyları toplanıp ortalaması alınmış, bu ortalama, o türün I numaralı kromozomunun nisbi boyu olarak kabul edilmiştir. Diğerk II, III, IV... numaralı kromozomlar için de aynı işlemler yapılmıştır. Homolog kromozomların kol indeksleri toplanarak ortalaması alınmak suretiyle de ortalama kol indeksleri bulunmuştur.

Çalışmalarımızda, kol indeksi 1.000-0.750 arasında olan kromozomlar median, 0.750-0.500 arasındakiler submedian olarak değerlendirilmiştir. Elçi de aynı yöntemi kullanmıştır (11, 24).

II.2.5.d. İdiogramların Çizilmesi

Kromozomları, idiogram halinde göstermek için, en uzun en başta olmak üzere, bütün kromozomlar boylarına göre

sıralanmıştır. Bunun için, kâğıda çizilen yatay eksen üzerine belli bir oranda kromozomların ortalama kol boylarını belirleyen, 5 mm'lik kalın dik çizgiler halinde, kromozomların önce uzun kolu çizilmiştir. Sentromer yerini belirlemek üzere 2 mm aralık bırakıldıktan sonra, aynı kalınlıkta olmak üzere kromozomun kısa kolu belirtilmiştir. 2 mm aralık bırakılarak, sırasıyla diğer kromozomların önce uzun daha sonra kısa kolları çizilerek, idiogramlar hazırlanmıştır.

II.2.5.e. Karyogramların Yapılması

Karyogramları yapmak için önceden tesbit edilmiş homolog kromozomların fotoğrafları, eşler halinde yan yana getirilmiştir. Bunun için, bir hücrenin çok iyi çekilmiş fotoğrafı seçilmiştir. Satelit, sentromerin yeri ve diğer yapılar açık bir şekilde görülmelidir.

Karyogramlar, bir bireyin kendi genomu içindeki kromozomları birbirleri ile karşılaştırmada kullanılmıştır. Ayrıca, diğer bireylerden kromozom yapıları bakımından farklarının belirtilmesinde ve aralarındaki ilginin görülmesi bakımından da önem taşır.

BÖLÜM III

ARAŞTIRMALARDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

III.1. Melez Bitkilerden Kolkisin Etkisi İle Amfidiploid Elde Edilmesi

Araştırmalarımızda, doğal Festuca x Lolium melezinden ($2n = 28$), kolkisin etkisi ile amfidiploid ($2n = 56$) elde edilmesi için, metod kısmında belirtilen yöntem uygulanmıştır.

Kolkisin uygulamasından sonra, melez klonlarda büyümenin yüksek oranda yavaşladığı gözlenmiştir (Şekil.3). Hava şartlarına göre 1-3 ay arasında, bitkiler normal gelişmelerine başlayabilmektedirler. Kolkisin ile muamele edilen 1375 klondan, 1038 tanesinin (yaklaşık % 75) gelişemediği, canlılığını kaybettiği görülmüştür. Geriye kalan 337 canlı klonun (yaklaşık % 25) kök uçları, ortalama bir ay sonra, kromozom sayımı yapılabilecek büyüklüğe ulaşmıştır. Bu klonların kök ucu hücrelerinde kromozom sayımı yapıldığında, bir kısım klonlarda, $2n = 56$ kromozomlu hücreler ile birlikte $2n = 28$ kromozomlu hücrelerin de bulunduğu gözlenmiştir.



Şekil.3. Kolkisinin, büyümenin ilk devrelerinde durdurucu etkisi (soldaki kontrol bitkisi).

III.2. Kamaşsı Yumakta Mitoz Kromozomlarının Özellikleri

Kamaşsı yumak (Festuca arundinacea Schreb.) ta yapılan sitolojik çalışmalar sonucunda, somatik kromozom sayısı $2n = 42$ olarak bulunmuştur (Şekil.4). Karyogramı şekil.11; idiogramı şekil.9'da gösterilmiştir. Kromozom morfolojilerine ait ölçümler Tablo.1'de verilmiştir. Araştırma materyalimizde kromozom boyları $2.472-4.826 \mu$ arasındadır. Kromozomların özellikleri aşağıdaki şekilde izah edilebilir.

Tablo.1 Kamışsı yumakta (2n=42) Kromozomların Morfolojik Özellikleri

Kromozom No	Kromozom Boyu (µ)			Kol İndeksi			Nisbi Boy		
	Ort.	Min.	Mak.	Ort.	Min.	Mak.	Ort.	Min.	Mak.
I	4.826	3.752	6.874	0.871	0.631	0.985	4.863	3.796	6.924
II	4.459	3.575	6.750	0.927	0.650	1.000	4.540	3.700	6.800
III	4.301	3.269	6.573	0.746	0.650	0.930	4.375	3.434	6.374
IV	4.189	3.500	5.972	0.770	0.631	0.941	4.261	3.491	6.136
V	4.000	3.200	5.535	0.827	0.720	0.979	4.127	3.631	6.650
VI	3.916	2.937	4.979	0.749	0.657	0.863	3.985	3.663	6.279
VII	3.798	2.759	5.761	0.761	0.605	0.912	3.864	3.422	5.827
VIII	3.704	2.872	5.931	0.720	0.627	0.890	3.767	3.100	6.139
IX	3.642	3.125	5.672	0.851	0.657	0.971	3.702	3.100	5.687
X	3.518	2.824	5.368	0.725	0.687	0.928	3.575	2.975	5.951
XI	3.408	2.737	4.951	0.765	0.690	0.910	3.463	2.990	5.737
XII	3.342	2.179	4.864	0.716	0.641	0.866	3.396	2.841	5.690
XIII	3.259	2.831	4.511	0.641	0.579	0.811	3.313	2.625	5.858

.....

Tablo.1'in devamı

XIV	3.220	2.420	4.120	0.754	0.638	0.858	3.273	2.617	5.273
XV	3.128	2.530	4.372	0.706	0.638	0.858	3.185	2.704	5.716
XVI	3.000	2.122	4.721	0.704	0.617	0.779	3.097	2.581	5.567
XVII	2.967	2.020	4.374	0.677	0.581	0.873	3.019	2.541	5.176
XVIII	2.880	1.900	3.521	0.687	0.532	0.820	2.932	2.158	4.273
XIX	2.849	1.719	3.137	0.729	0.655	0.851	2.898	2.120	4.671
XX	2.770	1.932	3.324	0.751	0.650	0.928	2.820	2.428	3.650
XXI	2.472	1.700	3.400	0.660	0.506	0.864	2.556	2.000	3.900

Kromozom I: En uzun kromozomdur. Boyu 4.826 μ dur. Sentromeri median durumdadır. Ortalama kol indeksi 0.871 dir. Nisbi boyu 4.863'tür.

Kromozom II: İkinci derecede uzun kromozomdur. Boyu 4.459 μ 'dur. Median durumda sentromeri vardır. Kromozomun kol indeksi 0.927, nisbi boyu 4.540'tır.

Kromozom III: Kromozom boyu 4.301 μ 'dur. Sentromeri submedian durumdadır. Bu kromozom ikincil bir yapıya sahiptir. Kısa kol üzerinde bulunan heterokromatik bölge, küçük bir sateliti bu kromozomdan ayırır. Kol indeksi 0.746, nisbi boyu 4.375'dir.

Kromozom IV: Kromozomun boyu 4.189 μ olup, median sentromeri vardır. Kol indeksi 0.770, nisbi boyu ise 4.261'dir.

Kromozom V: Boyu 4.0 μ 'dur. Sentromeri median durumdadır. Kol indeksi 0.827'dir. Nisbi boyu 4.127 dir.

Kromozom VI: Kromozom boyu 3.916 μ olup, submedian sentromeri vardır. Kol indeksi 0.749, nisbi boyu 3.985'tir.

Kromozom VII: Kromozom boyu 3.798 μ 'dur. Median durumda sentromere sahiptir. Kol indeksi 0.761, nisbi boyu 3.864'dür.

Kromozom VIII: Boyu 3.704 μ 'dur. Sentromeri

submedian durumdadır. Kol indeksi 0.72, nisbi boyu 3.767'dir.

Kromozom IX: Bu kromozom median durumda sentromere sahiptir. Boyu 3.642 μ , kol indeksi 0.851 ve nisbi boyu 3.702'dir.

Kromozom X: Kromozom boyu 3.518 μ olup, sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.725 ve nisbi boyu 3.575'dir.

Kromozom XI: Median durumda sentromere sahiptir. Kromozom boyu 3.408 μ , kol indeksi 0.765 ve nisbi boyu 3.463'dür.

Kromozom XII: Kromozom boyu 3.342 μ 'dur. Sentromeri submedian durumda olup, kol indeksi 0.716, nisbi boyu ise 3.396'dır.

Kromozom XIII: Kromozomun boyu 3.259 μ 'dur. Submedian durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.641, nisbi boyu 3.313'dür.

Kromozom XIV: Bu kromozom median durumda sentromere sahiptir. Boyu 3.220 μ 'dur. Kol indeksi 0.754'dür. Nisbi boyu 3.273'dür.

Kromozom XV: Kromozomun boyu 3.128 μ 'dur. Sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.706, nisbi boyu 3.185'dir.

Kromozom XVI: Submedian durumda sentromere sahiptir. Kromozom boyu 3.0μ 'dur. Kol indeksi 0.704, nisbi boyu ise 3.097'dir.

Kromozom XVII: Bu kromozomun boyu 2.967μ olup sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.677, nisbi boyu 3.019'dur.

Kromozom XVIII: Boyu 2.880μ 'dur. Submedian durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.687, nisbi boyu 2.932'dir.

Kromozom XIX: Kromozom boyu 2.849μ 'dur. Sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.729'dur. Nisbi boyu 2.898'dir.

Kromozom XX: Bu kromozom median durumda sentromere sahiptir. Boyu 2.770μ olup, kol indeksi 0,751 ve nisbi boyu 2.820'dir.

Kromozom XXI: Kromozomların en küçüğüdür. Sentromeri submedian durumdadır. Kromozom boyu 2.472μ , kol indeksi 0.660, nisbi boyu 2.556'dır.

III.3. Diploid Çok Yıllık Çimde Mitoz Kromozomlarının Özellikleri

Diploid çok yıllık çimde (Lolium perenne L.) yapılan sitolojik araştırmalarda $2n = 14$ somatik kromozom bulunmuştur (Şekil.5). Karyogramı Şekil.9'da, idiogramı Şekil.11'de verilmiştir. Kromozom morfolojilerine ait ölçümler Tablo.2'de gösterilmiştir.

Tablo.2 Çokyallılık içinde ($2n=14$) Kromozomların Morfolojik Özellikleri

Kromozom No	Kromozom Boyu (μ)			Kol İndeksi			Nisbi Boy		
	Ort.	Min.	Mak.	Ort.	Min.	Mak.	Ort.	Min.	Mak.
I	4.761	3.937	5.532	0.880	0.647	0.971	4.334	4.010	5.521
II	4.202	3.522	5.014	0.868	0.724	1.000	4.018	3.742	4.348
III	3.910	3.481	4.558	0.605	0.526	0.962	3.736	3.556	3.946
IV	3.690	3.253	4.268	0.735	0.446	0.930	3.526	3.401	3.680
V	3.526	3.128	4.185	0.751	0.535	0.987	3.368	3.143	3.590
VI	3.253	2.693	4.040	0.633	0.401	0.897	3.097	2.882	3.328
VII	2.838	2.217	3.522	0.680	0.447	0.833	2.695	2.372	3.000

Bu bilgilerden yararlanarak kromozomların özellikleri aşağıdaki şekilde izah edilebilir.

Kromozom I: Çok yıllık çimin en uzun kromozomudur. Boyu 4.761μ 'dur. Median durumda bir sentromeri vardır. Kromozomun kol indeksi, 0.880, nisbi boyu 4.334'dür.

Kromozom II: Çok yıllık çimin ikinci uzun kromozomudur. Median durumda sentromeri vardır. Bu kromozom ikincil bir yapıya sahiptir. Kısa kol üzerinde bulunan heterokromatik bölge büyük bir sateliti bu kromozomdan ayırır. Satelit kısa koldan daha uzundur. Kromozomun toplam boyu 4.202μ 'dur. Nisbi boyu 4.018, kol indeksi 0.868'dir.

Kromozom III: Submedian durumda sentromeri vardır. Bu kromozomun uzun kolu üzerinde heterokromatik bölge büyük bir sateliti ayırır. Kromozomun boyu 3.910μ , nisbi boyu 3.736 ve kol indeksi 0.605'dir.

Kromozom IV: Çok yıllık çimin bu kromozomunun submedian durumda bir sentromeri vardır. Bu kromozomunda uzun kolu üzerinde heterokromatik bölge büyük bir sateliti ayırır. Kromozom boyu 3.690μ , nisbi boyu 3.526 ve kol indeksi 0.735'dir.

Kromozom V: Median durumda bir sentromere sahiptir. Kromozomun boyu 3.526μ 'dur. Nisbi boyu 3.368, kol indeksi 0.751'dir.

Kromozom VI: Çok yıllık çimin küçük kromozomlarından olup, submedian durumda bir sentromeri vardır. Kromozomun boyu 3.253μ , nisbi boyu 3.097 ve kol indeksi 0.633'dür.

Kromozom VII: Somatik kromozomların en küçüğüdür. Sentromeri submedian durumdadır. Kromozom boyu 2.838μ , nisbi boyu 2.695 ve kol indeksi 0.680'dir.



Şekil.4. Kamışsı yumakta somatik kromozomlar
metafazda ($2n = 42$) x 1250



Şekil.5. Çok yıllık çimde somatik kromozomlar
metafazda ($2n = 14$) x 1250

III.4. Doğal Festuca x Lolium Melezinde Mitoz Kromozomlarının Özellikleri

Araştırma materyallerimizden doğal Festuca x Lolium melezi üzerinde yapılan sitolojik çalışmalar sonucunda, somatik kromozom sayısının $2n = 28$ olduğu bulunmuştur (Şekil.7). Karyogramı Şekil.11, idiogramı Şekil.10'te gösterilmiştir. Kromozom morfolojilerine ait ölçümler Tablo.3 de verilmiştir. Kromozomların özellikleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

Kromozom I: Doğal melezin en uzun kromozomudur. Boyu 5.669μ 'dur. Median durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.775'dir. Nisbi boyu 5.261'dir.

Kromozom II: Melez bitkinin ikinci derecede uzun kromozomudur. Boyu 4.826μ olup, submedian durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.675 ve nisbi boyu 4.730'dur.

Kromozom III: Bu kromozomun boyu 4.844μ 'dur. Median durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.837, nisbi boyu 4.452'dir.

Kromozom IV: Boyu 4.666μ olup, median durumda sentromere sahiptir. Nisbi boyu 4.303, kol indeksi 0.847'dir.

Kromozom V: Kromozom boyu 4.587μ 'dur. Median durumda sentromere sahip olup, kol indeksi 0.893, nisbi boyu ise 4.237'dir.

Kromozom VI: Boyu 4.463μ 'dur. Sentromeri submedian

Tablo.3 Doğal Festuca x Lolium Melezinde (2n=28) Kromozomların Morfolojik Özellikleri

Kromozom No	Kromozom Boyu (μ)			Kol İndeksi			Nisbi Boy		
	Ort.	Min.	Mak.	Ort.	Min.	Mak.	Ort.	Min.	Mak.
I	5.669	3.978	6.962	0.775	0.554	0.939	5.261	4.450	6.692
II	4.826	3.874	6.692	0.675	0.575	0.800	4.730	4.334	5.165
III	4.844	3.729	6.133	0.837	0.573	0.979	4.452	4.055	4.795
IV	4.666	3.729	5.781	0.847	0.699	1.000	4.303	4.055	4.520
V	4.587	3.688	5.739	0.893	0.753	0.990	4.237	4.055	4.488
VI	4.463	3.564	5.656	0.747	0.358	1.000	4.118	3.875	4.423
VII	4.309	3.543	5.346	0.667	0.381	0.943	3.992	3.853	4.126
VIII	4.227	3.377	5.325	0.777	0.542	1.000	3.910	3.778	4.110
IX	4.115	3.356	5.076	0.812	0.662	0.968	3.811	3.717	3.911
X	4.069	3.315	5.055	0.759	0.468	1.000	3.767	3.627	3.902
XI	3.990	3.273	4.973	0.705	0.556	1.000	3.691	3.560	3.838
XII	3.845	3.253	4.703	0.578	0.420	0.679	3.572	3.451	3.662
XIII	3.808	3.211	4.641	0.838	0.659	0.962	3.536	3.451	3.639

.....

Tablo.3'ün devamı

XIV	3.796	3.211	4.641	0.883	0.615	1.000	3.477	3.434	3.699
XV	3.746	3.170	4.579	0.883	0.811	0.962	3.467	3.402	3.569
XVI	3.704	3.149	4.537	0.660	0.567	0.697	3.439	3.353	3.523
XVII	3.626	3.066	4.330	0.778	0.609	0.977	3.368	3.337	3.430
XVIII	3.601	3.025	4.289	0.735	0.553	0.886	3.344	3.310	3.384
XIX	3.580	3.025	4.268	0.766	0.558	0.897	3.324	3.290	3.384
XX	3.506	2.942	4.185	0.801	0.690	0.902	3.258	3.208	3.334
XXI	3.435	2.813	4.164	0.693	0.488	0.863	3.190	3.110	3.312
XXII	3.331	2.797	3.895	0.747	0.515	0.957	3.106	2.981	3.312
XXIII	3.298	2.797	3.874	0.798	0.678	0.927	3.073	2.965	3.222
XXIV	3.195	2.755	3.688	0.704	0.576	0.890	2.980	2.830	3.109
XXV	3.099	2.714	3.605	0.721	0.478	1.000	2.888	2.766	3.036
XXVI	3.037	2.507	3.584	0.831	0.544	1.000	2.824	2.726	2.967
XXVII	2.735	2.113	3.398	0.620	0.482	0.736	2.574	2.174	2.920
XXVIII	2.561	1.989	2.942	0.639	0.224	0.948	2.403	2.094	2.828

durumdadır. Kol indeksi 0.747 ve nisbi boyu 4.118'dir.

Kromozom VII: Boyu 4.309 μ 'dur. Submedian durumda sentromeri vardır. Nisbi boyu 3.992 ve kol indeksi 0.667 dir.

Kromozom VIII: Boyu 4.227 μ 'dur. Sentromeri median durumdadır. Kol indeksi 0.777, nisbi boyu 3.910'dur.

Kromozom IX: Boyu 4.115 μ 'dur. Sentromeri median durumdadır. Nisbi boyu 3.811, kol indeksi 0.812'dir.

Kromozom X: Boyu 4.069 μ 'dur. Sentromeri median durumda olup, kol indeksi 0.759, nisbi boyu 3.767'dir.

Kromozom XI: Boyu 3.990 μ 'dur. Submedian sentromere sahiptir. Nisbi boyu 3.691, kol indeksi 0.705'dir.

Kromozom XII: Boyu 3.845 μ 'dur. Submedian durumda sentromeri vardır. Nisbi boyu 3.572, kol indeksi 0.578'dir.

Kromozom XIII: Boyu 3.808 μ 'dur. Sentromeri median durumdadır. Nisbi boyu 3.536, kol indeksi 0.838'dir.

Kromozom XIV: Boyu 3.796 μ 'dur. Median sentromere sahiptir. Kol indeksi 0.883, nisbi boyu 3.477'dir.

Kromozom XV: Kromozom boyu 3.746 μ 'dur. Median sentromere sahiptir. Kol indeksi 0.883, nisbi boyu 3.467 dir.

Kromozom XVI: Boyu 3.704 μ 'dur. Sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.660, nisbi boyu 3.439'dur.

Kromozom XVII: Boyu 3.626μ dur. Sentromeri median durumdadır. Kol indeksi 0.778, nisbi boyu 3.368'dir.

Kromozom XVIII: Boyu 3.601μ dur. Sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.735, nisbi boyu 3.344'dür.

Kromozom XIX: Median durumda sentromeri olan bu kromozom 3.580μ boyundadır. Nisbi boyu 3.324, kol indeksi 0.766'dır.

Kromozom XX: Boyu 3.506μ dur. Median durumda sentromeri olup, kol indeksi 0.801, nisbi boyu 3.258'dir.

Kromozom XXI: Boyu 3.435μ dur. Sentromeri submedian durumdadır. Nisbi boyu 3.190, kol indeksi 0.693'dür.

Kromozom XXII: 3.331μ boyunda olup, submedian durumda sentromeri vardır. Nisbi boyu 3.106, kol indeksi 0.747'dir.

Kromozom XXIII: Boyu 3.298μ dur. Sentromeri median durumdadır. Kol indeksi 0.798, nisbi boyu 3.073'dür.

Kromozom XXIV: Boyu 3.195μ , sentromeri submedian durumdadır. Nisbi boyu 2.980, kol indeksi 0.704'dür.

Kromozom XXV: 3.099μ boyundadır. Submedian sentromeri olup, kol indeksi 0.721, nisbi boyu 2.888'dir.

Kromozom XXVI: Boyu 3.037μ dur. Median durumda sentromeri vardır. Nisbi boyu 2.824, kol indeksi 0.831'dir.

Kromozom XXVII: İkinci derecede küçük olan kromozomdur. Boyu 2.735 μ 'dur. Submedian sentromerlidir. Nisbi boyu 2.574, kol indeksi 0.620'dir.

Kromozom XXVIII: Doğal melezin en küçük boylu kromozomudur. Boyu 2.561 μ 'dur. Submedian durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.639, nisbi boyu 2.403'dür.

III.5. Doğal Festuca x Lolium Melezinden Kolkisin Etkisi İle Elde Edilen Amfidiploid Bitkide Mitoz Kromozomlarının Özellikleri

Doğal Festuca x Lolium melezinde $2n=28$ olan somatik kromozom sayısının, çeşitli kolkisin uygulamalarından sonra $2n=56$ 'ya çıktığı gözlenmiştir (Şekil.8). Bu materyalin kromozom morfolojilerini gösteren ölçümler Tablo.4'te verilmiştir. Karyogramı Şekil.11, idiogramı Şekil.10'da gösterilmiştir. Kromozomların özellikleri aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:

Kromozom I: Amfidiploidin en uzun kromozomudur. Boyu 5.196 μ 'dur. Median durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.901, nisbi boyu 4.642'dir.

Kromozom II: İkinci uzun kromozomdur. Boyu 4.919 μ 'dur. Median durumda sentromeri vardır. Nisbi boyu 4.423'tür. Kol indeksi 0.776'dır.

Kromozom III: Kromozom boyu 4.794 μ olup, median durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.770, nisbi boyu

Tablo.4 Amfidiploid Bitkide (2n=56) Kromozomların Morfolojik Özellikleri

Kromozom No	Kromozom Boyu (μ)			Kol İndeksi			Nisbi Boy		
	Ort.	Min.	Mak.	Ort.	Min.	Mak.	Ort.	Min.	Mak.
I	5.196	3.771	6.983	0.901	0.557	1.000	4.642	4.162	5.219
II	4.919	3.729	6.547	0.776	0.565	1.000	4.423	4.295	4.643
III	4.794	3.667	6.361	0.770	0.481	0.966	4.315	4.187	4.440
IV	4.656	3.564	6.237	0.749	0.512	1.000	4.083	3.065	4.304
V	4.569	3.393	6.216	0.751	0.504	0.888	4.095	3.950	4.231
VI	4.539	3.398	6.133	0.820	0.620	0.967	4.071	3.971	4.215
VII	4.446	3.377	5.998	0.797	0.547	1.000	3.993	3.907	4.067
VIII	4.378	3.273	5.884	0.715	0.561	0.924	3.932	3.842	4.034
IX	4.299	3.211	5.739	0.826	0.724	0.890	3.863	3.781	4.001
X	4.227	3.108	5.594	0.659	0.481	0.944	3.805	3.654	3.951
XI	4.164	3.025	5.573	0.895	0.784	1.000	3.739	3.581	3.787
XII	4.106	3.025	5.387	0.692	0.444	0.858	3.694	3.581	3.770
XIII	4.067	3.025	5.387	0.763	0.483	1.000	3.660	3.556	3.704

.....

Tablo.4'ün devamı

XIV	4.005	2.963	5.180	0.809	0.510	0.956	3.605	3.507	3.691
XV	3.949	2.921	5.180	0.778	0.486	0.945	3.557	3.434	3.654
XVI	3.903	2.900	5.159	0.856	0.531	1.000	3.511	3.434	3.626
XVII	3.862	2.880	5.076	0.736	0.666	0.866	3.474	3.409	3.561
XVIII	3.804	2.900	5.014	0.713	0.980	1.000	3.429	3.293	3.532
XIX	3.742	2.880	4.973	0.728	0.514	1.000	3.375	3.243	3.497
XX	3.636	2.776	4.890	0.788	0.608	0.942	3.279	3.178	3.389
XXI	3.561	2.735	4.807	0.701	0.500	0.911	3.203	3.046	3.302
XXII	3.464	2.714	4.641	0.660	0.523	0.875	3.168	2.980	3.528
XXIII	3.389	2.652	4.600	0.715	0.505	0.930	3.065	2.848	3.216
XXIV	3.290	2.631	4.413	0.685	3.356	1.000	2.978	2.700	3.164
XXV	3.193	2.548	4.309	0.559	0.493	0.811	2.885	2.651	3.017
XXVI	3.135	2.424	4.268	0.673	0.565	0.756	2.825	2.618	2.923
XXVII	3.043	2.300	4.247	0.778	0.505	0.950	2.734	2.552	2.881
XXVIII	2.772	1.782	3.812	0.702	0.373	1.000	2.499	2.190	2.720

4.315'tir.

Kromozom IV: Boyu 4.656 μ 'dur. Submedian durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.749 ve nisbi boyu 4.083'tür.

Kromozom V: Bu kromozomun boyu 4.569 μ 'dur. Median durumda sentromere sahiptir. Nisbi boyu 4.095, kol indeksi 0.751'dir.

Kromozom VI: Kromozom boyu 4.539 μ 'dur. Sentromeri median durumdadır. Kol indeksi 0.820 ve nisbi boyu 4.071 dir.

Kromozom VII: Boyu 4.446 μ 'dur. Median durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.797, nisbi boyu 3.993'tür.

Kromozom VIII: 4.378 μ boyundadır. Submedian durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.715'tir. Nisbi boyu 3.932'dir.

Kromozom IX: Boyu 4.299 μ 'dur. Median durumda sentromeri vardır. Nisbi boyu 3.863, kol indeksi 0.826'dır.

Kromozom X: Kromozom boyu 4.227 μ olup, sentromeri submedian durumdadır. Nisbi boyu 3.805, kol indeksi 0.659 dur.

Kromozom XI: Boyu 4.164 μ 'dur. Sentromeri median durumdadır. Kol indeksi 0.895, nisbi boyu 3.739'dur.

Kromozom XII: 4.106 μ boyundadır. Submedian

durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.692, nisbi boyu 3.694'tür.

Kromozom XIII: Boyu 4.067 μ 'dur. Sentromeri median durumdadır. Kol indeksi 0.763, nisbi boyu 3.660'tır.

Kromozom XIV: Kromozom boyu 4.005 μ 'dur. Median durumda sentromere sahip olup, kol indeksi 0.809, nisbi boyu 3.605'tir.

Kromozom XV: Boyu 3.949 μ 'dur. Median durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.778, nisbi boyu 3.557 dir.

Kromozom XVI: Kromozom boyu 3.903 μ 'dur. Sentromeri median durumdadır. Nisbi boyu 3.511, kol indeksi 0.856'dır.

Kromozom XVII: 3.862 μ boyundadır. Sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.736'dır. Nisbi boyu 3.474'tür.

Kromozom XVIII: Boyu 3.804 μ 'dur. Sentromeri submedian durumdadır. Nisbi boyu 3.429 ve kol indeksi 0.713 tür.

Kromozom XIX: Kromozomun boyu 3.742 μ olup, sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.728, nisbi boyu 3.375'tir.

Kromozom XX: Boyu 3.636 μ 'dur. Median durumda

sentromeri vardır. Kol indeksi 0.788, nisbi boyu ise 3.279'dur.

Kromozom XXI: Kromozom boyu 3.561 μ 'dur. Sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.701'dir. Nisbi boyu 3.203'tür.

Kromozom XXII: 3.464 μ boyundadır. Submedian durumda sentromeri vardır. Nisbi boyu 3.168'dir. Kol indeksi 0.660'tır.

Kromozom XXIII: Bu kromozomun boyu 3.389 μ 'dur. Submedian durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.715 tir. Nisbi boyu 3.065'tir.

Kromozom XXIV: Boyu 3.290 μ 'dur. Submedian sentromerlidir. Nisbi boyu 2.978, kol indeksi 0.685'tir.

Kromozom XXV: Bu kromozom 3.193 μ boyundadır. Submedian durumda sentromeri vardır. Kol indeksi 0.559, nisbi boyu 2.885'tir.

Kromozom XXVI: Boyu 3.135 μ olup, sentromeri submedian durumdadır. Kol indeksi 0.673, nisbi boyu 2.825'tir.

Kromozom XXVII: İkinci derecede küçük kromozomdur. Boyu 3.043 μ 'dur. Sentromeri median durumdadır. Kol indeksi 0.778, nisbi boyu 2.734'tür.

Kromozom XXVIII: Amfidiploidin en küçük kromozomudur. Boyu 2.772 μ olup, sentromeri submedian durumdadır.

Kol indeksi 0.702, nisbi boyu 2.499'dur.

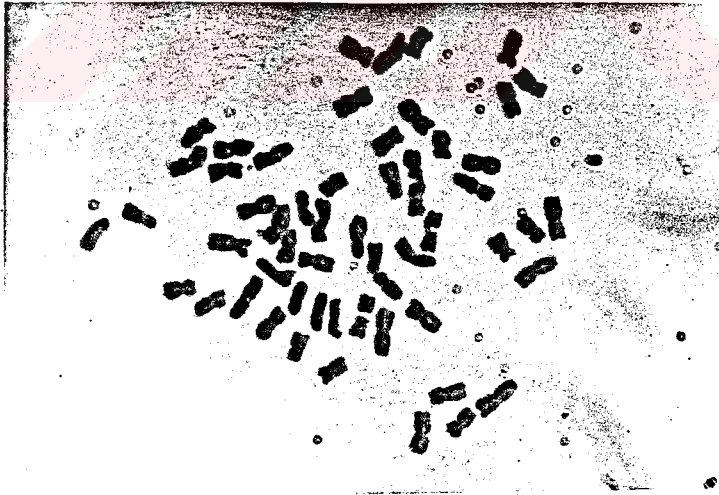
Kamışsı yumak, çok yıllık çim ve bunlardan doğal olarak meydana gelen melezin başak yapıları Şekil.6'da verilmiştir.



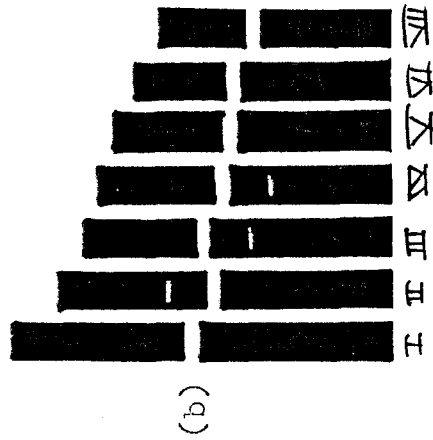
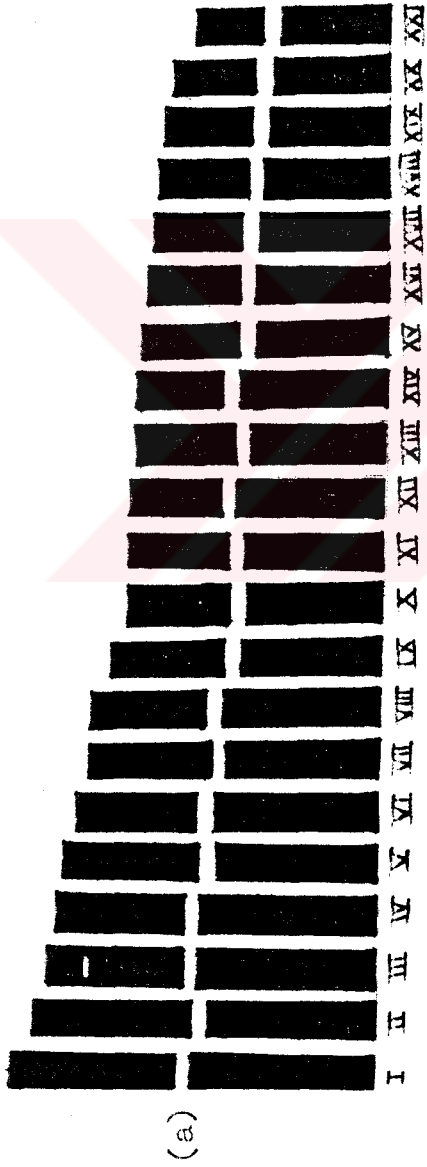
Şekil.6. Kamışsı yumak, çok yıllık çim ve melez bit bitkilerin başakları (soldan sağa doğru).



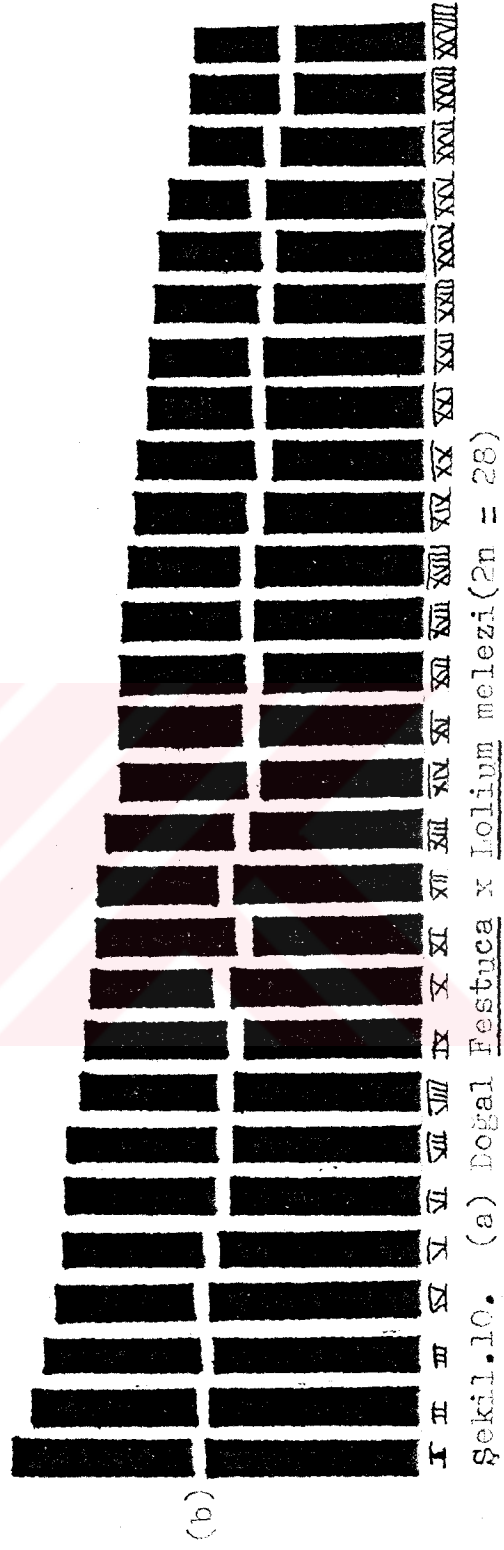
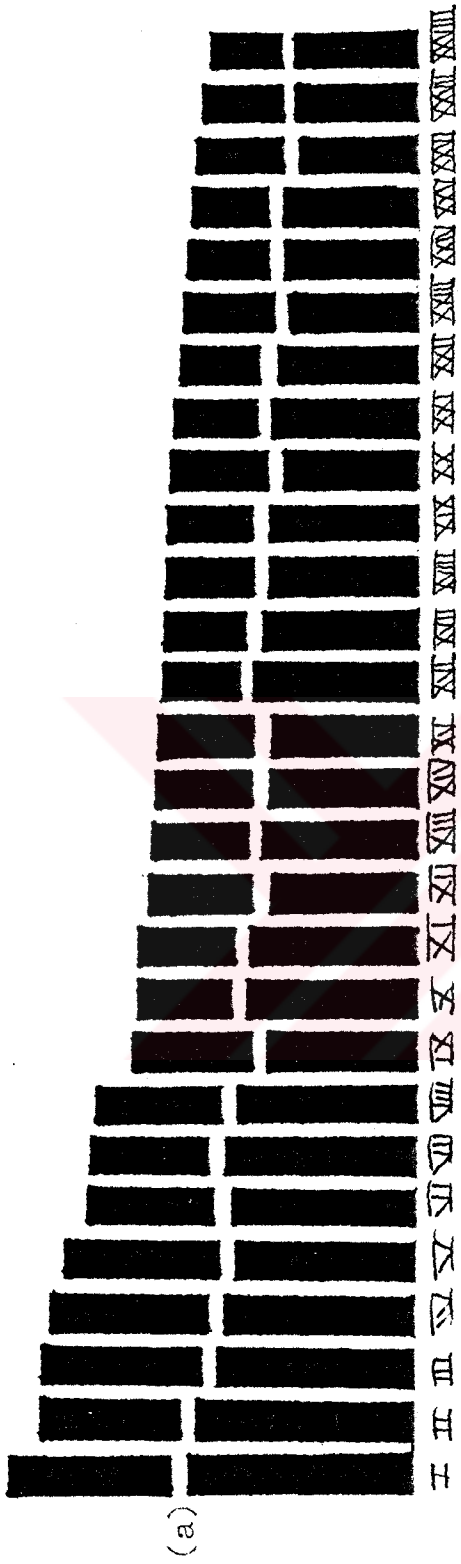
Sekil.7. Doğal Festuca x Lolium melezinde mitoz kromozomlar metafazda ($2n = 28$) x 1250



Sekil.8. Doğal Festuca x Lolium melezinden kolkisin etkisi ile elde edilen amfidiploid bitkide mitoz kromozomlar metafazda ($2n = 56$) x 1250



Şekil.9: (a) Kamışlı yumak (E. arundinacea $2n = 42$)
 (b) Çok yıllık çim (L. perenne $2n = 14$)'in idiogramları



Şekil.10. (a) Dogal Festuca x Lolium melez (2n = 28)

(b) Dogal Festuca x Lolium melezinden kolkisin etkisi ile elde edilen amfidiploid bitkinin (2n = 56) idiogramları

(a) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

(b) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

(c) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

d)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

Şekil.11. (a) Kamışsı yumak (F. arundinacea Schreb. $2n=42$),

(b) Çok yıllık çim (L. perenne L. $2n=14$),

(c) Festuca x Lolium melezi ($2n=28$) ve

(d) Amfidiploidin ($2n=56$) karyogramları.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

IV.1. Farklı Mevsimlerin Mitoz Bölünme ve Kromozom Morfolojileri Üzerine Etkileri

Araştırmalarımızda, farklı mevsimlerin ve sıcaklık derecelerinin, kullandığımız bitkilerin kök ucu hücrelerinde mitoz bölünmenin oluşumu ve özellikle metafazdaki kromozomların morfolojik yapıları üzerinde büyük önem taşıdığı belirlenmiştir. Kış mevsiminde, bitkilerde büyümenin yavaş olması nedeniyle, kök ucu hücrelerinde elde edilen mitoz bölünme oranı % 5'ten azdır. Metafazda bulunan kromozomlar da oldukça fazla büzülmüş olduğundan, karyotip analizlerinde kullanılamamıştır. Yaz mevsiminde de, çok sıcak hava şartlarından dolayı benzer durumlar gözlenmiştir. İlkbahar ve sonbaharda ise, kök uçlarında, % 20'den fazla mitoz ve uygun metafaz kromozomları elde edilmiştir. Bunlara dayanarak, kış ve yaz mevsimlerinde özellikle melez ve amfidiploid bitkiler olmak üzere, F. arundinacea ile L. perennede de yeterli gelişme olmadığı, kök ucu somatik hücrelerinde karyotip analizleri için uygun materyalin bulunamayacağı sonucuna varılmıştır.

Elçi de, sıcaklık derecelerinde meydana gelen değişmelerin, mitozun oluşumunda etkili olduğunu tesbit etmiştir. Mitoz bölünmedeki kromozomların gözlemine yaparken, kromozomları bir mevsimde daha iyi gözlerken, başka bir mevsimde bu imkânı bulamadığını belirtmiştir (7).

IV.2. Kamışlı Yumak'ın Metafaz Kromozomları Üzerinde Yapılan Araştırmalar

Ana bitkilerden, kamışsı yumak üzerinde yaptığımız çalışmalar sonucunda, materyalin $2n = 42$ kromozomlu olduğu tesbit edilmiştir. Kromozom boyları birbirine çok yakın olduğundan, homologların belirlenmesinde güçlük çekilmiştir. Boyları $4.826-2.472 \mu$ arasında değişen kromozomların 9 tanesi median, 12 tanesi ise submedian sentromerlidir.

Molik ve Thomas "Festuca arundinacea" (Schreb.) ye ait S 170, Bn 271, Bn 273 ve Bn 274 olmak üzere 4 farklı populusyonda yaptıkları sitolojik araştırmalarda, bütün populusyonların $2n = 42$ kromozomlu hexaploid bitkiler olduklarını, bununla beraber, populusyondaki bazı bitkilerin 40-44 arasında değişen, farklı sayıda kromozoma sahip olduğunu tesbit etmişlerdir. Karyotip incelemelerinde kromozomları, çok uzundan kısaya doğru kademeli olarak sıralamışlardır. Sentromerler median veya submedian durumda olup, kromozom boylarının birbirine çok yakın olduğunu gözlemişlerdir (12).

IV.3. Çok Yıllık imin Metafaz Kromozomları zerine Yapılan Sitolojik Araştırmalar

Çok yıllık çimde, sitolojik çalışmalar sonucunda $2n = 14$ somatik kromozom tesbit edilmiştir. Kromozom boyları $4.761-2.838 \mu$ arasında değişmektedir. Sentromerlerden 3' median, 4 tanesi ise submedian durumdadır. II, III ve IV nolu kromozomda ikincil yapılar gözlenmiştir. Kol indeksleri birinci kromozomda 0.880, ikincide 0.868,

üçüncüde 0.605, dördüncüde ise 0.735'tir. Beşinci kromozomda kol indeksi 0.751, altıncıda 0.633 ve yedincide de 0.680 olarak bulunmuştur.

Essad, Lolium perenne ve Festuca pratensis üzerinde yaptığı kromozom incelemelerinde, Lolium perennede kromozom boylarının 3.0-5.1 μ arasında olduğunu ve II, III ile IV. kromozomda ikincil yapılar bulunduğunu tesbit etmiştir. Kol indeksleri için verdiği değerler; birinci kromozomda 0.87, ikincide 0.90, üçüncü ve dördüncüde 0.59, beşincide 0.94, altıncıda 0.49 ve yedincide ise 0.54'tür (10). Araştırmacının sonuçları ile bizim araştırmalarımızdan elde ettiğimiz değerler birbirine yakındır

Sağsöz, çok yıllık çimde kromozom boylarının 3.934-5.762 μ arasında olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmacı da II, III ve IV nolu kromozomlarda ikincil yapılar tesbit etmiştir. Kol indekslerini sırası ile 0.878, 0.813, 0.599, 0.620, 0.862, 0.506 ve 0.587 olarak bildirmiştir(17).

IV.4. Doğal Festuca x Lolium Melezleri Üzerinde Yapılan Araştırmalardan Elde Edilen Veriler

Araştırmamızda, Festuca x Lolium melezinde kromozom sayısının $2n = 28$ olduğu tesbit edilmiştir. Kromozom boyları 5.669-2.561 μ arasındadır. Kromozomlardan 15 tanesinin median, kalan 13 tanesinin ise submedian durumda sentromeri vardır. Kromozom boylarının birbirine çok yakın olması nedeni ile homologların ayırımında güçlük çekilmiştir.

Kol indeksleri 0.755-0.639, nisbi boyları ise 5.261-2.403 arasında değişmektedir.

Sulinowski, Festuca pratensis(2x) x F. arundinacea (6x)'den tamamen steril olan melezler elde etmiştir(16).

Essad, Lolium perenne ($2n = 14$) x Festuca pratensis ($2n = 14$)'ten $2n = 14$ kromozomlu suni melezler elde etmiştir. Melez bitkiler üzerinde yaptığı sitolojik çalışmalarda, kromozom boylarının $3.25-5.72 \mu$ arasında bulunduğunu tesbit etmiştir (10).

Zwierzykowski, Lolium multiflorum Lam. ($2n = 14$) x Festuca arundinacea Schreb. ($2n = 42$)'den elde ettiği bütün melezlerin $2n = 28$ kromozomlu ve tamamen steril olduklarını belirtmiştir (21).

Kleijer, L. multiflorum ($2n = 14$) ile farklı F. arundinacea ($2n = 42$) varyetelerini çaprazlamıştır. Bunlardan meydana gelen bütün melezlerin $2n = 28$ kromozomlu olduğunu tesbit etmiştir. Melez bitkilerin mayotik analizlerinde univalentların, bivalentların, trivalent, quadrivalent ve pentavalantların hücrelerdeki ortalama oranlarını belirlemiştir. Tetraploid L. multiflorum ($2n = 28$) x F. arundinacea melezlerinin ise $2n = 35$ kromozomlu olduğunu tesbit etmiş ve bu melezlerde mayotik kromozomların özelliklerini incelemiştir (27).

IV.5. Kolkisin ve Dimetil Sulfoksidin, Festuca x Lolium Doğal Melezinden Amfidiploid Elde Edilmesi Üzerine Etkileri

Araştırmalarımızın başlangıcında, amfidiploid elde etmek için temizlenmiş 180 klon damıtık suda çözülerek hazırlanmış % 1 kolkisin çözeltisinde, 18-20°C'ta, 24 saat bekletilmiştir. Çözeltiden çıkarılan klonlar, musluk suyu ile 7-8 defa yıkanmış ve gelişmek üzere tekrar saksılara dikilmiştir. Kolkisin uygulamasından sonra, klonlardan 125'i canlılığını kaybetmiş, kalan 55'inde % 20-30 oranında $2n = 56$ kromozomlu hücreler gözlenmiştir.

Buckner, Hill ve Burrus, Çok yıllık çim (L.perenne)x Kamışsı yumak (F. arundinacea) melezinin klonlarını, % 0.2 kolkisin çözeltisinde, 24 saat bekletmişlerdir. Sonuçta, 1 tane $2n=42$, 3 tane $2n=70$ ve 30 tane de $2n=56$ kromozomlu olan bitkiler elde etmişlerdir. Bunlardan yalnız bir tek bitki verimli olmuş ve tohum meydana getirmiştir (9).

Sulinowski, F. pratensis ($2n=14$) x F. arundinacea ($2n=42$) melezinin klonlarını, oda sıcaklığında, kolkisinin % 0.25'lik çözeltisinde, 6 ve 24 saat bekletmiştir. Kolkisinden çıkardığı klonları, suda birkaç saat yıkamış ve saksılara dikmiştir. Bunların kök uçlarında yaptığı sitolojik analizlerde, 15 C_1 dölünde 12 tane $2n=42$ ve sadece 3 tane $2n=56$ kromozomlu bitkiler gözlemiştir. Yine bu dölün 5 ayrı bitkisinde yaptığı analizlerde, 3 tane $2n=42$ ile birer tane $2n=35$ ve $2n=77$ kromozomu olan bitkiler

tesbit etmiştir. Bundan başka, başaklarda meydana gelen mayoz bölünmedeki kromozom konfigürasyonlarını incelemiştir (16).

Lange ve Jochem, diploid Hordeum bulbosumdan poliploid bitki elde etmek için çimlenen tohumları % 0.05 ve % 0.1 kolkisin çözeltiğinde, 6 saat bekletmiştir. Meydana gelen köklerde yaptığı kromozom sayımı sonucunda yüksek oranda poliploid hücre elde etmiştir (20).

Essad, Lolium perenne x Festuca pratensisin F_1 klonlarını, % 0.9'luk kolkisinde 15 saat, % 0.5'likte ise 24 ve 40 saat bekletmiştir. Araştırmacı, diğer bir muamelede klonları % 0.1'lik kolkisinde 16 ve 24 saat bırakmıştır. Kolkisin ile muamele ettiği 258 klondan 78'i canlılığını kaybetmiştir. Geriye kalanlar arasında $2n$ ve $4n$ kromozomlu bitkiler ile miksoploidler tesbit etmiştir (10).

Sağsöz, diploid çok yıllık çimden, tetraploid çok yıllık çim elde etmek için 24°C 'ta çimlendirdiği tohumları % 0.2'lik kolkisinde, 25°C 'ta 3 saat bekletmiştir. Tohumları kolkisinden çıkarıp yıkadıktan sonra, çimlendirme dolabında 3-4 gün daha gelişmeye terketmiştir. İşleme tabi tuttuğu 1500 bitkiden canlı kalan 92 bitkiyi kasalara şaşırtmıştır. 3 ay sonra, 92 bitkiden sadece 24 tanesinin kök uçlarında kromozom sayılarının iki katına çıktığı ve $2n=28$ kromozomlu tetraploidlerin meydana geldiğini tesbit etmiştir. Elde ettiği tetraploid bitkilerin kromozomlarını incelerken, aynı bitkinin bazı köklerinden yaptığı

preparatlarda $2n=14$ olan hücrelere de rastlamıştır. Bu miksploidiiyi önlemek için bitkileri klonlara ayırmıştır(17).

Araştırmalarımızın daha ileri safhalarında, Festuca x Lolium melezleri, % 2 dimetil-sulfoksit (DMSO) içinde çözülerek hazırlanan % 0.4, % 0.2 ve % 0.1 kolkisinde, 18-20°C'ta, 3, 6, 12 ve 24 saat bekletilmiştir. Muamele edilen 660 klondan 165'i canlı kalmış, bu oranın % 25 olduğu tesbit edilmiştir. Sadece, damıtık su ile hazırlanmış olan kolkisine oranla, kök uçlarında elde edilen $2n=56$ kromozomlu amfidiploid hücre sayısının, DMSO'de % 40-50 kadar daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kolkisinin etkisini arttırmak için, klonların büyüme bölgesinde üçgen şeklinde yarıklar açılarak, bu klonlar da % 2 DMSO içinde çözülmüş % 0.4, % 0.2 ve % 0.1 kolkisin çözeltisinde, 15-20°C'da , 8, 12, 24 saat bekletilmiştir. Bu muameleden sonra 535 klondan 107'si canlı kalmıştır. Bunların oranı % 20'dir. Yapılan bütün kolkisin muamelelerinden sonra , klonlar 7-8 defa musluk suyundan geçirilmiş ve saksılara dikilmiştir. 1-3 ay sonra klonlarda meydana gelen kök uçlarından yapılan preparatlarda, $2n = 56$ kromozomlu amfidiploid hücreler elde edilmiştir. Ayrıca, $2n = 28$ kromozomlu hücreler de mevcuttur. Ancak, $2n = 56$ olan hücre sayısı % 80 dolayındadır. ,

Yukarıda sayılan bütün kolkisin işlemlerinden 5-10 gün sonra uygulama esnasındaki bütün yeşil kısımlar solmuş ve kurumuştur. İlkbahar ve sonbaharda ortalama 1-1.5 ay sonra,

yaz ve kış mevsiminde ise en az 3 ay sonra, klonların toprak üstü kısımları gelişmeye başlamakta, 10-15 gün sonra da kökleri gelişmektedir. Klonlarda meydana gelen ilk köklerde % 90-95 oranında $2n = 56$ kromozomlu hücreler elde edilmiştir. İlk köklerden sonra oluşan diğer köklerde ise bu hücrelerin sayısı gittikçe azalarak % 70-60'a kadar düşmektedir. Bu durum, kolkisinin bitki hücreleri üzerindeki etkisinin yeniden gelişen genç sürgünlerde yetersiz olmasından kaynaklanabilir.

Sanders ve Hull, rubusun tohum ve sürgün uçlarını DMSO + kolkisin çözeltisinin değişik konsantrasyonlarında, 3, 6, ve 12 saat bekletmiştir. Bu çözeltiler sırasıyla kolkisin + DMSO olmak üzere; % 0.0 + % 0.2, % 0.2 + % 0.0, % 0.5 + % 0.1, % 1 + % 5, % 1 + % 20 dir. Araştırmacılar bu yöntemi, DMSO'nun bitkilerde pek çok organik bileşiklerin etkili taşıyıcısı olarak bildirilmesi nedeniyle, rubus dokusuna, kolkisinin nüfuz etmesini kolaylaştırıp kolaylaştırmadığı ve kromozom sayısını iki katına çıkarıp çıkarmadığını belirlemek için kullanmışlardır. Çalışmalarında, % 0.2 kolkisin + % 2 DMSO'nun 6 ve 12 saat muamelesiyle, poliploid sürgünlerin % 400 oranında çoğaldığını tesbit etmişlerdir. Muamele ettikleri bitkilerin x, 2x veya 4x poliploidi seviyesinde gametler meydana getirdiğini gözlemişlerdir(15).

Kaul ve Zutshi, kolkisini su yerine % 2 DMSO ile hazırladıklarında, tetraploid üretimindeki etkisinin

öncekinden çok daha fazla arttığını görmüşlerdir. Böylece, kara buğdayda % 100'den, çavdar ve arpada % 50'den daha fazla poliploid meydana gelmiştir. Araştırmacılara göre, meristematik dokular arasından geçen bu çözeltinin etkisini çoğaltmak için kolkisinin DMSO ile taşınması gereklidir(8).

Morgan da gövde ucunda üçgen şeklinde yarıklar açtığı genç çim klonlarını, taze hazırlanmış % 0.2 kolkisin + % 2 DMSO'da 7-8 saat bekletmiştir. Kolkisinden çıkararak 3 saat akan musluk suyunda yıkamış, ve gelişmeleri için yüksek dozda ışık altında bırakmıştır. Yukarıdaki işlemlerin, bitki ıslahında daha elverişli bir şekilde kullanılabileceğini bildirmiştir(18).

IV.6. Doğal Festuca x Lolium Melezinden Kolkisin Etkisi ile Elde Ettiğimiz Amfidiploid Bitkilerin Özellikleri

Çalışmalarımızda % 2 DMSO + % 0.4 kolkisin uygulamasıyla elde ettiğimiz amfidiploid klonlardan alınan kök uçlarında, yaklaşık % 80 oranında $2n = 56$ kromozomlu hücre tesbit edilmiştir. Kromozom boyları $5.196-2.772 \mu$ arasındadır. Kol indeksleri 0.901-0.559; nisbi boyları ise 4.642-2.499 arasındadır. Kromozomlardan 14'ü median, 14 tanesi de submedian durumdadır. Kromozom boyları birbirine çok yakındır.

Sulínowski, F. pratensis x F. arundinacea melezlerinden

kolikisin ile elde ettiği amfidiploidlerin çiçek tozu hücrelerinde mayoz incelemesi yapmıştır. Anafaz-I, telofaz-I ve anafaz II'de geri kalmış kromozomlar ve kromatin köprüleri gözlemiştir. Geri kalan kromozomların, tetradlarda mikronuklei oluşturduğunu bildirmiştir(16).

Zwierzykowski, L. multiflorum x F. arundinacea'nin F_1 melezlerinin morfolojik karakteri ve somatik kromozom sayıllarını araştırmıştır. Daha sonra melezleri anaçlar ile çaprazlamıştır(21).

Kleijer ve Morel, L. multiflorum ($2n = 14$) x F. arundinacea ($2n = 42$) melezlerinden elde ettikleri amfidiploidlerin $2n = 56$ kromozomlu olduğunu bulmuşlardır. Mayoz incelemesinde, univalent, bivalent, trivalent, quadrivalent, pentavalent ve heksavalentlerin hücre başına ortalama dağılımlarını hesaplamışlardır. Anafaz safhasında geri kalmış kromozomlar ve tetradlarda mikronuklei gözlemişlerdir.(28).

Elde ettiğimiz verilere dayanarak, doğal Festuca x Lolium melezinden, amfidiploid elde etmek için en etkili yöntemin; klonların büyüme bölgelerinde üçgen şeklinde yarık açmak suretiyle, % 2 DMSO'de hazırlanmış % 0.4 kolikisin çözeltisinde 24 saat bekletmek olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Demir, İ., Yem Bitkileri, E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 62, 123-149 (1963).
- 2- Erač, A., Ekiz, H., Yem Bitkileri Yetiştirme, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, 56-63 (1985).
- 3- Vinall, H.N., Hein, M.A., Breeding Miscellaneous Grasses, Year Book of Agriculture, Washington, USDA, 1096 (1937).
- 4- Dawis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 9, Edinburg, 444-445 (1972).
- 5- Müntzing, A., Genetic Research, LTS Förlag, Stocholm, 231 (1961).
- 6- Elçi, Ş., "Memleketimizin önemli fiğ türlerinde kromozom sayılarının tesbiti ve kromozom morfolojisinin mukayesesi", A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 254 (1965).
- 7- Elçi, Ş., "Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri", F.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, Biyoloji: 3, Elazığ (1982).
- 8- Kaul, B.L., Zutshi, U., "Dimethyl sulphoxide as an adjuvant of colchicine in the production of polyploids in crop plants" Indian J. Exp. Biol., 9, 522-523 (1971).

- 9- Buckner, R.C., Hill, H.D., and Burrus, P.B., "Some characteristics of perennial and annual ryegrass x tall fescue hybrids and the amphidiploid progenies of annual ryegrass x tall fescue" Crop. Sci., 1, 75-80 (1961).
- 10- Essad, S., Etude Génétique et cytogénétique Des Espèces Lolium perenne L., Festuca pratensis Huds. et de Leurs Hybrids., I.N.R.A., Annales de L'Amélioration des plantes, Wersailles (1962).
- 11- Elçi, Ş., "Agropyron junceum (L.) P.B. ssp. boreo-atlanticum S.G.; Agropyron elongatum (Host) P.B. de ve bunların melezi (F₁) ile bu melezin amfidiploidinde karyotiplerin mukayeseli analizleri" A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları:251, (1964).
- 12- Malik, C.P., Thomas, P.T., "Karyotypic studies in some Lolium and Festuca species" Caryologia, 19(2), 167-196 (1966).
- 13- Lewis, E.J., "The production and manipulation of new breeding material in Lolium-Festuca", X. International Grassland Congress, Finland, 3, 21 (1966).
- 14- Elçi, Ş., "Çok yıllık çavdarın (Secale montanum Guss) bazı morfolojik ve diğer özellikleri, meioz analizi ve kromozom morfolojisi ile tetraploid çok yıllık çavdarın elde edilmesi üzerinde araştırmalar" A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 281 (1966).

- 15- Sanders, H., Hull, J.W., "Dimethyl sulphoxide as an adjuvant of colchicine in the treatment of rubus seeds and shoot apieces.", Hort. Sci. 5, 111-112 (1970).
- 16- Sulinowski, S., "Induced allopoloids in grasses of Festuca and Lolium genera, part.I. Festuca pratensis Huds. ($2n = 14$) x F. arundinacea Schreb. ($2n = 42$) hybrid derivatives." Genetica Polonica, 18(I), 91-105 (1972).
- 17- Sağsöz, S., "Diploid İngiliz çiminden (Lolium perenne L.) tetraploid İngiliz çiminin elde edilmesi imkanları, bu bitkilerde mitoz ve meosis kromozomları ile bazı morfolojik özelliklerin mukayesesi" Atatürk Üniversitesi Yayınları: 325, Erzurum (1974).
- 18- Morgan, W.G., "A technique for the production of polyploids in grasses." Euphytica, 25, 443-446 (1976).
- 19- Thomas, H.M., Pickering, R.A., "Barley x Rye crosses. the morphology and cytology of the hybrids and the amphidiploids." Z. Pflanzenzüchtg, 82, 193-200 (1979).
- 20- Lange, W., Jochemsen, G., "The production and behavior of hexaploid hybrids between Hordeum vulgare and H. bulbosum." Euphytica, 25, 621-631 (1976).

- 21- Zwierzykowski, Z., "Hybrid of Lolium multiflorum Lam. ($2n = 14$) x Festuca arundinacea Schreb. ($2n = 42$) and it's allopolyploid derivatives. I. Morphology, fertility and chromosome number of F_1 hybrids and C_0 and C_1 allopolyploid derivatives" Genetica Polonica, 21(3), 259-270 (1980).
- 22- Jan, C.C., De Pace, C., Mc. Guire, P.E et al., "Hybrids and amphidiploids of Triticum aestivum L. and T. turgidum L. with Dasypyrum villosum (L) candargy" Z. Pflanzenzüchtg, 96, 97-106 (1986).
- 23- Elçi, Ş., "Bazı kültür bitkilerinde hücre bölünmesi ve mitoz ile meosiste kromozom konfigürasyonları." Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 99 (1975).
- 24- Elçi, Ş., "Diploid çavdar (Secale cereale L.) ile tetraploid çavdarlarda karyotiplerin analiz ve mukayesesi." Ankara (1965).
- 25- Elçi, Ş., "Yem bezelyesinde (Pisum arvense L.) kromozom sayısının tesbiti ve karyotip analizi." A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 259 (1966).
- 26- Elçi, Ş., "Mitoz kromozomların tetkikinin zor olduğu bazı baklagil bitkilerinde kromozom sayımı ve karyotip analizi için elverişli bir metod." Ankara, (1966).

- 27- Kleijer, G., "Cytogenetic studies of crosses between Lolium multiflorum Lam. and Festuca arundinacea Schreb. I. The parents and the F₁ hybrids." Z. Pflanzenzüchtg. 93, 1-22 (1984).
- 28- Kleijer, G., Morel, P., "Cytogenetic studies of crosses between Lolium multiflorum Lam. and Festuca arundinacea Schreb. II. The amphidiploids." Z. Pflanzenzüchtg. 93, 23-42 (1984).

ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında, Çanakkale iline bağlı Biga ilçesinin Savaştepe köyünde doğdu. İlk öğrenimini kendi köyünde yaptı. Orta öğreniminin ilk kısmını Biga Lisesinde, ikinci kısmını Ankara Kurtuluş Lisesinde 1980 yılında tamamladı. 1981 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde öğrenime başladı. Haziran 1985'te Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu sınavı kazanarak, Ekim 1985'te Biyoloji Yüksek Lisans programına başladı. İngilizce bilmektedir.

Y. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi