

**FLORESAN *IN SITU* HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ  
ile *Dactylis* TAKSONLARININ RİBOZOMAL DNA  
BÖLGELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Hüseyin KELEŞ**

**Doktora Tezi**

**Tarla Bitkileri Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Metin TUNA**

**2019**

T.C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

FLORESAN *IN SITU* HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ ile *Dactylis*  
TAKSONLARININ RİBOZOMAL DNA BÖLGELERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI

Hüseyin KELEŞ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Metin TUNA

TEKİRDAĞ-2019

Her hakkı saklıdır

Bu alışma, bilimsel ve teknolojik araştırma projelerini destekleme programı kapsamında, **TÜBİTAK Tarım Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Gurubu (TOVAG/Proje No 1110654)** tarafından desteklenmiştir.

Prof. Dr. Metin TUNA danışmanlığında, Hüseyin KELEŞ tarafından hazırlanan “Floresan *In Situ* Hibridizasyon Yöntemi ile *Dactylis* Taksonlarının Ribozomal DNA Bölgelerinin Karşılaştırılması” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak, oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Metin TUNA (Danışman)

*İmza:*

Üye: Prof. Dr. Esra MARTİN

*İmza:*

Üye: Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

*İmza:*

Üye: Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN

*İmza:*

Üye: Doç. Dr. İlker NİZAM

*İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ

**Enstitü Müdürü**

# ÖZET

Doktora Tezi

Floresan *In Situ* Hibridizasyon Yöntemi ile *Dactylis* Taksonlarının Ribozomal DNA Bölgelerinin Karşılaştırılması

**Hüseyin KELEŞ**

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Metin TUNA

Çok yıllık buğdaygil yem bitkilerini oluşturan türlerin birçoğuna ait poliploidi ve genom yapıları ile ilgili temel bilgiler eksik veya mevcut değildir. Bu türler üzerinde yapılacak olan ıslah çalışmalarında doğru stratejilerin belirlenebilmesi ve uygulanabilmesi için bu temel bilgilerin bilinmesi şarttır. *Dactylis* L. gibi farklı poliploidi seviyelerine sahip çok sayıda ekotip içeren allogamik cinslerde, diğer bir sorunda kromozomların morfolojik olarak benzer ve küçük olmaları sebebiyle, tanımlanmalarının ve eşleştirmelerinin zor olmasıdır. Bu yüzden *Dactylis* üzerinde bu güne kadar klasik sitogenetik yöntemler ile yapılmış olan karyotip analizleri, *Dactylis* taksonlarına ait genomların analizi ve aralarındaki ilişkilerin saptanmasında beklenen faydayı tam anlamıyla sağlamamıştır.

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği, sitogenetiğin gelişmiş tekniklerinden birisi olup, kromozomlar üzerindeki spesifik DNA dizilerinin fiziksel lokasyonlarını belirlemek için oldukça kullanışlı ve yeni bir yöntemdir.

Bu tez çalışmasının amacı, prob olarak yaygın şekilde kullanılan 5S ve 25S rDNA dizilerini ilk defa *Dactylis* için kullanarak, *Dactylis* genom ve organizasyonu hakkında yeni bilgiler sağlamaktır. FISH tekniği kullanılarak taksonların sahip oldukları rDNA bölgelerinin sayı ve mitotik kromozomlar üzerindeki dağılımları belirlenmeye çalışılmış, bu bulgular ile *Dactylis* genomlarının analizi ve ilişkilerinin incelenmesinde yararlı olabilecek hassasiyette karyotiplerin elde-edilebilmesi, kromozomların teşhisi ve homologları ile eşleştirilebilmeleri amaçlanmıştır.

Çalışmada, IPK (Gaterslaben, Almanya), IBER (Aberystwyth, İngiltere), Western Regional Plant Introduction Station (Pulmann, Washington, ABD) gibi araştırma enstitülerinin gen bankalarından temin edilmiş olan, 2 yıl boyunca sitolojik incelemeler için uygun kalite ve miktarda kök ucu elde edilebilen 9 diploid ve 31 tetrapoliploid aksesyon kullanılmıştır.

FISH sonuçlarına göre diploid *Dactylis* aksesyonlarının toplamda, 8 ve 10 adet rDNA sinyaline sahip oldukları belirlenmiştir. Diploid aksesyonların 25S rDNA sinyallerinin sayısı 4 ve 6, 5S rDNA sinyallerinin sayısı ise 2 ve 4 olarak belirlenmiştir. Tetrapoliploid *Dactylis* aksesyonlarında, toplam rDNA sinyal sayısı, 12 ve 18 arasında değişmiştir. Tetrapoliploid aksesyonlarda 25S rDNA sinyal sayısı 8 ve 14, 5S rDNA sinyal sayısı ise 4 ve 6 arasında belirlenmiştir. Ek olarak çalışmada iki adet triploid taksonun ise sırasıyla toplamda 9 ve 11 adet rDNA sinyaline sahip oldukları saptanmıştır. 5S ve 25S rDNA sinyal özelliklerine göre *Dactylis* cinsinde intraspesifitenin yüksek olduğu, poliploidizasyon olayının gerçekleştiği, otopoliploidizasyon ve segmental otopoliploidizasyon olgularından bahs edilebileceği anlaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Dactylis*, FISH, rDNA, Genom analizi, Karyotip, Poliploidi

2019/ 232 sayfa

## ABSTRACT

Phd Thesis

Comparison of Ribosomal DNA Sequences of *Dactylis* Taxa by Fluorescent *In Situ* Hybridization Technique

**Hüseyin KELEŞ**

Tekirdağ Namık Kemal University  
Institute of Science and Technology  
Department of Field Crops

Advisor: Prof. Dr. Metin TUNA

The basic knowledge of polyploidy and genome structures belonging to many species of perennial forage grasses is incomplete or absent. In order to determine and apply appropriate strategies in these breeding activities, it is necessary to know these basic information. In allogamic genera which contain a large number of ecotypes with different levels of polyploidy, such as *Dactylis* L., another problem is that their chromosome are morphologically similar and small, making it difficult to identify and correctly matched to their homologues. Therefore, the karyotype analyzes performed on *Dactylis* by classical cytogenetic methods to date have not provided the expected benefits in analyzing the genomes of *Dactylis* taxa and determining the relationships between them.

Fluorescent in situ hybridization (FISH) technique is one of the advanced techniques of cytogenetics and is a very useful and novel method for determining the physical locations of specific DNA sequences on chromosomes.

The aim of this thesis is to provide new information about *Dactylis* genome and its organization by using 5S and 25S rDNA sequences commonly used as probes for *Dactylis* for the first time. By using FISH technique, the distribution of rDNA regions, number on mitotic chromosomes of taxa was tried to be determined and it was aimed to obtain the karyotypes of sensitivity which could be useful in the analysis and relations of *Dactylis* genomes, and to match the identification and homologs of chromosomes.

In the study, quality and quantity of cytological examinations for 2 years from approximately 9 diploids and 31 tetrapoliploids from gene banks of research institutes such as IPK (Gaterslaben, Germany), IBER (Aberystwyth, England), Western Regional Plant Introduction Station (Pulmann, Washington, USA) were used.

According to FISH results, diploids *Dactylis* was determined to have 8 and 10 rDNA signals in total. The number of 25S rDNA signals of diploids were observed 4 and 6, and the number of 5S rDNA signals were observed 2 and 4.

In tetrapoliploids *Dactylis*, the total number of rDNA signals varied between 12 and 18. In tetrapoliploids *Dactylis* were determined 25S rDNA signals between 8 and 14, 5S rDNA signals between 4 and 6. In addition two triploid taxa were found to have 9 and 11 rDNA signals, respectively.

According to the 5S and 25S rDNA signal characteristics, it is understood that intraspecificity is high in *Dactylis* genus, polyploidization occurs, autopolyploidization and segmental autopolyploidization cases could be mentioned.

**Key Words:** *Dactylis*, FISH, rDNA, Genome analysis, karyotype, Polyploidy

2019/ 232 pages

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>İ</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>İ</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>İİ</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>XV</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI</b> .....	<b>1</b>
2. 1. <i>Dactylis</i> 'in Bitkisel ve Tarımsal Özellikleri.....	1
2. 2. <i>Dactylis</i> 'in Coğrafik Dağılımı ve Ekolojik İstekleri .....	4
2. 3. <i>Dactylis</i> 'in Taksonomik Durumu .....	6
2. 3. 1. Diploid <i>Dactylis</i> taksonların kökeni ve yayılış alanları .....	8
2. 3. 2. Tetrapoliploid <i>Dactylis</i> taksonların kökeni ve yayılış alanları .....	16
2. 4. <i>Dactylis</i> 'in Genetik Durumu .....	21
2. 5. <i>Dactylis</i> Kaynak Taramaları.....	26
2. 5. 1. Sitogenetik çalışmalar .....	26
2. 5. 2. Ekolojik ve morfolojik çalışmalar .....	37
2. 5. 3. Moleküler çalışmalar .....	51
<b>2. 6. Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon (FISH)</b> .....	<b>76</b>
2. 6. 1. FISH tekniğinde kullanılan problemler .....	82
2. 6. 2. FISH kaynak taramaları.....	90
<b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....	<b>103</b>
3. 1. Bitki Materyali.....	103
3. 2. Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon .....	105

3. 2. 1. Kullanılan bitki materyalleri, sarf malzemeleri, laboratuvar alet ve donanımları..	105
3. 2. 2. Çözeltilerin hazırlanışı.....	107
3. 2. 3. Bitkilerden kök ucu dokularının elde edilmesi ve ilk işlem .....	109
3. 2. 4. Tespit (Fiksasyon) .....	110
3. 2. 5. Ezme Preparatların hazırlanması.....	110
3. 2. 6. Preparatların FISH için hazırlanması .....	111
3. 2. 6. 1. RNAaz muamelesi.....	111
3. 2. 6. 2. 2X SSC yıkaması.....	111
3. 2. 6. 3. PBS yıkaması.....	112
3. 2. 6. 4. 2 X SSC Yıkaması.....	112
3. 2. 6. 5. Slaytların kurutulması.....	112
3. 2. 7. Probların etiketlenmesi.....	112
3. 2. 7. 1. PCR metodu ile 5S rDNA probun etiketlenmesi.....	112
3. 2. 7. 2. Nick translasyonu ile 45S rDNA probun etiketlenmesi .....	113
3. 2. 7. 3. Probların etanol ile saflaştırılması ve yoğunlaştırılması.....	114
3. 2. 8. Denatürasyon ve Hibridizasyon .....	115
3. 2. 8. 1. Hibridizasyon solusyonunun hazırlanması.....	115
3. 2. 8. 2. Hibridizasyon sonrası yıkama .....	116
3. 2. 8. 3. Probların immünolojik işaretlenmesi .....	116
3. 2. 9. Karşı boyama (Kontrast) ve koruma .....	117
3. 2. 10. Fotoğrafların çekimi ve analizi.....	117
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>120</b>
4. 1. Diploid Taksonlara ait Bulgular .....	121
4. 1. 1. <i>Dactylis glomerata</i> L. subsp. <i>santai</i> (ABY-Bc 4454-1982U).....	121
4. 1. 2. <i>Dactylis glomerata</i> L. forma <i>galicia</i> (ABY-Bc 6977-1979U) .....	122
4. 1. 3. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>himaleyensis</i> (ABY-Bc 5194-1980U).....	124
4. 1. 4. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lusitanica</i> (ABY-Bc 5562-1973U) .....	125



4. 1. 5. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lusitanica</i> (PI 237603) .....	126
4. 1. 6. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lobata</i> (PI 283242).....	128
4. 1. 7. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>mairi</i> (ABY-Bc 6106-1975U).....	129
4. 1. 8. İsimsiz diploid aksesyonlar .....	131
4. 1. 9. Diploid taksonların karşılaştırılması.....	133
4. 2. Tetrapoliploid Taksonlara Ait Bulgular .....	139
4. 2. 1. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>hispanica</i> aksesyonlarına ait bulgular.....	140
4. 2. 1. 1. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>hispanica</i> (PI 265567) .....	140
4. 2. 1. 2. <i>Dactylis glomerata</i> L. subsp. <i>hispanica</i> (Roth) Nyman (ABY-Bc 5645-2004U-). 141	
4. 2. 1. 3. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>hispanica</i> (PI 265568) .....	143
4. 2. 1. 4. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>hispanica</i> (PI 306730 ) .....	144
4. 2. 1. 5. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>hispanica</i> aksesyonlarının değerlendirilmesi.....	145
4. 2. 2. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i> aksesyonlarına ait bulgular.....	147
4. 2. 2. 1. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i> (GR 669\96) .....	147
4. 2. 2. 2. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i> (14G1000192) .....	149
4. 2. 2. 3. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i> aksesyonlarının değerlendirilmesi.....	150
4. 2. 3. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lobata</i> aksesyonlarına ait bulgular .....	151
4. 2. 3. 1. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lobata</i> (ABY-Bc 7279-0000U).....	151
4. 2. 3. 2. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lobata</i> (PI 316209).....	152
4. 2. 3. 3. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lobata</i> (PI 372621).....	154
4. 2. 3. 4. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lobata</i> aksesyonlarının değerlendirilmesi.....	155
4. 2. 4. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>smithii</i> aksesyonlarına ait bulgular .....	156
4. 2. 4. 1. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>smithii</i> (PI 237607) .....	156
4. 2. 4. 2. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>smithii</i> (GR 8202\80) .....	157
4. 2. 4. 3. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>smithii</i> (GR 1238\83) .....	158
4. 2. 4. 4. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>smithii</i> (GR 7297\02) .....	159
4. 2. 4. 5. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>smithii</i> aksesyonlarının değerlendirilmesi .....	160

4. 2. 5. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>santai</i> aksesyonlarına ait bulgular .....	162
4. 2. 5. 1. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>santai</i> (PI 237606) .....	162
4. 2. 5. 2. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>santai</i> (PI 237605) .....	164
4. 2. 5. 3. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>santai</i> aksesyonlarının değerlendirilmesi .....	165
4. 2. 6. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>woronowii</i> aksesyonlarına ait bulgular .....	167
4. 2. 6. 1. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>woronowii</i> (PI 283243) .....	167
4. 2. 6. 2. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>woronowii</i> (GR 1241\94) .....	168
4. 2. 6. 3. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>woronowii</i> aksesyonlarının değerlendirilmesi .....	170
4. 2. 7. <i>Dactylis glomerata</i> L. subsp. <i>aschersoniana</i> G. (ABY-Bc 6223-1971U) aksesyonuna ait bulgular .....	171
4. 2. 8. <i>Dactylis marina</i> aksesyonlarına ait bulgular .....	173
4. 2. 8. 1. <i>Dactylis marina</i> Borrill (ABY-Bc 7213-0000U) .....	174
4. 2. 8. 2. <i>Dactylis marina</i> (PI 477989) .....	175
4. 2. 8. 3. <i>Dactylis marina</i> (PI 346970) .....	176
4. 2. 8. 4. <i>Dactylis marina</i> (PI 346969) .....	177
4. 2. 8. 5. <i>Dactylis marina</i> (PI 346968) .....	178
4. 2. 8. 6. <i>Dactylis marina</i> (PI 346967) .....	179
4. 2. 8. 7. <i>Dactylis marina</i> (PI 237604) .....	181
4. 2. 8. 8. <i>Dactylis marina</i> (PI 577066) .....	182
4. 2. 8. 9. <i>Dactylis marina</i> (PI 577065) .....	183
4. 2. 8. 10. <i>Dactylis marina</i> aksesyonlarının değerlendirilmesi .....	184
4. 2. 9. İsimli tetrapoliploid aksesyonlara ait bulgular .....	186
4. 2. 10. Tetrapoliploid taksonların karşılaştırılması .....	192
4. 3. Diploid ve Tetrapoliploid Taksonların Karşılaştırılması .....	199
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>208</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>214</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>231</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 3.1. Diploid <i>Dactylis</i> taksonlarının aksesyon adları, numaraları ve orijinleri.....	103
Çizelge 3.2. Tetrapoliploid <i>Dactylis</i> taksonlarının aksesyon adları, numaraları ve orijinleri	104
Çizelge 3.3. 5S rDNA probun etiketlenmesi için gerekli karışım maddeleri ve miktarları ...	113
Çizelge 3.4. 45 S rDNA probun etiketlenmesi için gerekli karışım maddeleri ve miktarları	114
Çizelge 3.5. Hibridizasyon karışımının hazırlanmasında kullanılan karışım ve miktarları ...	115
Çizelge 4.1. Diploid <i>Dactylis</i> aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları .....	137
Çizelge 4.2. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>hispanica</i> aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları .....	146
Çizelge 4.3. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i> aksesyonlarına ait, 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları .....	151
Çizelge 4.4. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lobata</i> aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları.....	155
Çizelge 4.5. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>smithii</i> aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları .....	161
Çizelge 4.6. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>santai</i> aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları .....	166
Çizelge 4.7. <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>woronowii</i> aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları .....	170
Çizelge 4.8. Diploid <i>lobata</i> (PI 283242) ile tetrapoliploid <i>lobata</i> (ABY-Bc 5645-2004U, PI 372621) ve <i>aschersoniana</i> (ABY-Bc 6223-1971U) aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları .....	173
Çizelge 4.9. <i>Dactylis marina</i> aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları .....	186
Çizelge 4.10. İsimli tetrapoliploid aksesyonlara ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları.....	191
Çizelge 4.11. Tetrapoliploid ve triploid <i>Dactylis</i> aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA FISH sinyal sayısı ve lokasyonları .....	197

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Basitleştirilmiş DNA-DNA FISH tekniğinin grafiksel gösterimi .....	79
Şekil 3.1. Yeşil (a), Kırmızı (b), ve mavi (c) filitre kanalları ile çekilmiş siyah beyaz <i>Dactylis</i> mitoz kromozomları .....	118
Şekil 3.2. Yeşil (d), Kırmızı (e) ve mavi (f) filtre ile siyah beyaz olarak çekilmiş resimlerin Wasabi programı kullanarak renklendirilmesinden sonraki görünüşleri.....	118
Şekil 3.3. Wasabi programı ile renklendirilmiş resimlerin, Picture Publisher programı ile üst üste getirilerek tek resim elde edilmesi .....	118
Şekil 4.1. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 4454-1982U nolu diploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>santai</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları .....	121
Şekil 4.2. ABY-Bc 4454-1982U nolu diploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>santai</i> aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü.....	122
Şekil 4.3. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 6977-1979U nolu diploid <i>D. glomerata</i> L. forma <i>galicia</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları .....	123
Şekil 4.4. ABY-Bc 6977-1979U nolu diploid <i>D. glomerata</i> L. forma <i>galicia</i> aksesyonuna ait haploit idiogramının görünüşü .....	123
Şekil 4.5. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 5194-1980U nolu diploid <i>D. glomerata</i> subsp. <i>himalayensis</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	124
Şekil 4.6. ABY-Bc 5194-1980U nolu diploid <i>D. glomerata</i> subsp. <i>himalayensis</i> aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü.....	125
Şekil 4.7. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 5562-1973U nolu diploid <i>D. glomerata</i> subsp. <i>lusitanica</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları .....	126
Şekil 4.8. ABY-Bc 5562-1973U nolu diploid <i>D. glomerata</i> subsp. <i>lusitanica</i> aksesyonuna ait haploit idiogramının görünüşü .....	126
Şekil 4.9. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 237603 nolu diploid <i>D. glomerata</i> subsp. <i>lusitanica</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları .....	127
Şekil 4.10. PI 237603 nolu <i>D. glomerata</i> subsp. <i>lusitanica</i> aksesyonuna ait haploit idiogramının görünüşü.....	127

Şekil 4.11. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 283242 nolu diploid <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lobata</i> taksonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	128
Şekil 4.12. PI 283242 nolu diploid <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>lobata</i> aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü.....	128
Şekil 4.13. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 6106-1975U nolu diploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>mairei</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	130
Şekil 4.14. ABY-Bc 6106-1975U nolu diploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>mairei</i> aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü.....	130
Şekil 4.15. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası GRA 712\8 nolu diploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları .....	131
Şekil 4.16. GRA 712\8 nolu diploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü.....	132
Şekil 4.17. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası 87 nolu diploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	132
Şekil 4.18. 87 nolu diploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	133
Şekil 4.19. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 265567 nolu tetrapoliploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>hispanica</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	141
Şekil 4.20. PI 265567 nolu tetrapoliploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>hispanica</i> aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü.....	141
Şekil 4.21. (a) Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 5645-2004U nolu tetrapoliploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>hispanica</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	142
Şekil 4.22. (a) ABY-Bc 5645-2004U nolu tetrapoliploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>hispanica</i> aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü .....	142
Şekil 4.23. (b) Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 5645-2004U nolu tetrapoliploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>hispanica</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	143
Şekil 4.24. (b) ABY-Bc 5645-2004U nolu tetraploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>hispanica</i> aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü .....	143
Şekil 4.25. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 265568 nolu tetrapoliploid <i>D. glomerata</i> L. subsp. <i>hispanica</i> aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	143

- Şekil 4.26. PI 265568 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü..... 144
- Şekil 4.27. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 306730 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..... 144
- Şekil 4.28. PI 306730 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü..... 145
- Şekil 4.29. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 669\96 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..148
- Şekil 4.30. GR 669\96 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü..... 148
- Şekil 4.31. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası 14G1000192 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..149
- Şekil 4.32. 14G1000192 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü..... 150
- Şekil 4.33. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 7279-0000U nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..... 152
- Şekil 4.34. ABY-Bc 7279-0000U nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü..... 152
- Şekil 4.35. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 316209 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..153
- Şekil 4.36. PI 316209 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü..... 153
- Şekil 4.37. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 372621 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları 1544
- Şekil 4.38. PI 372621 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* ssp. *lobata* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü..... 154
- Şekil 4.39. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 237607 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..157
- Şekil 4.40. PI 237607 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* ssp. *smithii* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü..... 157

- Şekil 4.41. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 8202\80 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..158
- Şekil 4.42. GR 8202\80 nolu tetraploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü..... 158
- Şekil 4.43. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 1238\83 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..159
- Şekil 4.44. GR 1238\83 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* ssp. *smithii* aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü..... 159
- Şekil 4.45. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 7297\02 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..160
- Şekil 4.46. GR 7297\02 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* ssp. *smithii* aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü..... 160
- Şekil 4.47. (a) Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 237606 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..163
- Şekil 4.48. (a) PI 237606 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyona ait idiogramın görünüşü..... 163
- Şekil 4.49. (b) Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 237606 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..164
- Şekil 4.50. (b) PI 237606 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü..... 164
- Şekil 4.51. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 237605 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..165
- Şekil 4.52. PI 237605 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü..... 165
- Şekil 4.53. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 283243 nolu tetraploid *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..... 168
- Şekil 4.54. PI 283243 nolu tetraploid *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü..... 168
- Şekil 4.55. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 1241\94 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları..169

Şekil 4.56. GR 1241\94 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>woronowii</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü.....	169
Şekil 4.57. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 6223-1971U nolu tetrapoliploid <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>aschersoniana</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	171
Şekil 4.58. ABY-Bc 6223-1971U tetraploid <i>Dactylis glomerata</i> subsp. <i>aschersoniana</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	172
Şekil 4.59. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 7213-0000U nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	174
Şekil 4.60. ABY-Bc 7213-0000U tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	175
Şekil 4.61. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 477989 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	175
Şekil 4.62. PI 477989 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	176
Şekil 4.63. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası 346970 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	177
Şekil 4.64. PI 346970 nolu tetraploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	177
Şekil 4.65. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 346969 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	17878
Şekil 4.66 PI 346969 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	178
Şekil 4.67. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 346968 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	179
Şekil 4.68 PI 346968 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	179
Şekil 4.69. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 346967 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	1800
Şekil 4.70. PI 346967 nolu tetraploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	180



Şekil 4.71. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 237604 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	181
Şekil 4.72. PI 237604 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	182
Şekil 4.73. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 577066 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	183
Şekil 4.74. PI 577066 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	183
Şekil 4.75. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 577065 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	184
Şekil 4.76. PI 577065 nolu tetrapoliploid <i>Dactylis marina</i> aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	184
Şekil 4.77. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası GRA 833\83 nolu tetrapoliploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	187
Şekil 4.78. GRA 833\83 nolu tetrapoliploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü.....	187
Şekil 4.79. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası 139 nolu tetrapoliploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları .....	188
Şekil 4.80. 139 nolu tetrapoliploid aksesyona ait haploit ideogramın görünüşü.....	188
Şekil 4.81. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası 22 nolu triploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları.....	189
Şekil 4.82. 22 nolu triploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	189
Şekil 4.83. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası 65 nolu triploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları .....	190
Şekil 4.84. 65 nolu triploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü .....	190

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	: Amplified fragment length polymorphism
AMOVA	: Analysis of Molecular Variance (Moleküler varyans analiz sonuçları)
BAC	: Bacterial artificial chromosome (Bakteriyal yapay kromozom)
Bç	: Baz Çifti (base pair; bp)
Prob	: Probe
cDNA	: Komplementer DNA
C-DNA	: N kromozoma sahip hücrenin çekirdek DNA miktarı
2C-DNA	: 2N kromozoma sahip hücrenin çekirdek DNA miktarı
CENH3	: Sentromere özgü histon 3 gen bölgesi (sentromer spesifik histon H3)
CMA	: Kromomicin A3
cM	: Santimorgan
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole (Floresan boya)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNA ITS	: DNA Internal transcribed spacer
EST-SSR	: Expressed sequence tag–simple sequence repeat
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat
FISH	: Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon
g	: Gram
GISH	: Genomik <i>In Situ</i> Hibridizasyon
GOT	: Glutamate Oxaloacetate Transaminase
HCL	: Hidroklorik asit
hk4S	: 4. kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan heterokromatik knob
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
ıgG	: Immünglobulin G (Bir antikor çeşidi)
IGS	: İntergeneric sequences
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat

Kb	: Kilobaz
kpDNA	: Kloroplast DNA'sı
m	: Metre
MgCl <sub>2</sub>	:Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
MTR1	:Microspore and Tapetum Regulator1
NaOAc.3H <sub>2</sub> O	:Sodyum asetat
NOR	: Nucleolar organizer regions
PBS	: Phosphate buffered saline
PCA	: Cluster and principal component analysis
PCoA	: Principal coordinate analyses (Temel koordinat analizi)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
Pg	: Pikogram
PGI	: Fosfoglukoizomeraz
PI	: Propodium iyodat
PX	: Peroxidase
QTL	: Kantitatif karakter lokus
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
Rabl	: Heterokromatik yapıda olan gen bölgesi
rDNA	: Ribozomal DNA
rDNA-ITS	: Ribosomal DNA Internal transcribed spacer
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal RNA
SDW	: Steril distile su (Sterile distilled water)
SSC	:Saline sodium citrate
TRITC	:Tetrametilrodamin (Tetramethylrhodamine)

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının hayata geçmesinde yardımcı olan danışmanım Prof. Dr. Metin TUNA'ya, sabır ve emeklerini esirgemeyen aileme teşekkür ediyorum. Tez izleme komitesinde olan ilgi ve alakalarını esirgemeyen Prof. Dr. İskender TIRYAKİ (COMÜ) ve Doc. Dr İlker NİZAM (NKÜ)'a saygı ve sevgilerimi sunuyorum. Tezin teknik kısımlarında yardımcı olan bilgisayar öğretmeni Cevdet ÇOŞKUN'a ve bilişim uzmanı Doğuş AYDIN'a minnetlerimi sunuyorum. Ayrıca FISH konusundaki sorularıma verdiği cevaplar ve makale temini konusunda yardımcı olan Polanya Katowice Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Robert Hasterok ve yine makale temininde yardımcı olan, PGG Wrightson Seeds (Yeni Zellanda) daire başkanı Stewart V. ALAN'ı tebessüm ile anıyorum.

Bu çalışmayı finanse eden TÜBİTAK Tarım Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Gurubu (TOVAG/Proje No 111O654) 'na da ayrıca teşekkür ederim.

Nisan 2019

Hüseyin KELEŞ

## 1. GİRİŞ

Çayır-meralar çoğunluğu otsu bitkiler olmak üzere, seyrek ağaç ve çalılardan oluşan, dünya yüzeyinin yaklaşık %40'nı kaplayan oldukça büyük ekosistemlerdir (Last ve ark. 2014). Çayır-mera ekosistemleri yaban ve evcil hayvanlar için yem kaynağı, yetiştikleri geniş alanlardaki toprağın fiziksel ve biyolojik yapısını koruyan sürekli bitki örtüsüdür (Hatipoğlu ve Kökten 2009, Altın ve ark. 2011, Last ve ark. 2014, Fernández-Núñez ve Castro 2016). Çayır-mera ekosistemleri bitki genetik kaynakları bakımından oldukça zengindir. Bu genetik kaynakların korunması, özellikle de değişmekte olan iklim koşulları sebebi ile ileri ıslah programları için çok önemlidir (Maxted ve ark. 2012, Last ve ark. 2014, Stolton 2015).

*Dactylis* (Cocksfoot) cinsi, tek bir türe (monospesifik) ait olduğu düşünülen 20'den fazla taksonomik birimden oluşmaktadır. Diploid, tetrapoliploid ve hekzapoliploid olan bu taksonlar farklı coğrafik bölgelerde, bazı durumlarda birarada yetişmekte ve çoğu durumda morfolojik olarak birbirinden ayırtedilememektedir (Borrill 1991, Zhong 2006). Doğada bu taksonlardan en fazla  $2n=4x=28$  kromozom sayısına sahip tetrapoliploid ekotipler yer alırken, diploid ( $2n=2x=14$ ) ekotiplere belirli coğrafik bölgelerde ve hekzapoliploid ekotiplere ise sadece birkaç lokalitede rastlanmıştır (Borrill 1978).

*Dactylis* cinsinin farklı poliploidi seviyelerine sahip olması tarımsal açıdan değerli bir varyasyon kaynağı oluşturmaktadır (Domin 1943, Borrill ve Lindner 1971). Fakat farklı poliploidi düzeylerine sahip bitkilerin melezlenmesi sonucu oluşan bitkiler tohum veya sağlıklı bir yeşil aksam oluşturamamakta, neticede elde edilen bitkiler kısır olabilmektedir. Bu yüzden herhangi bir ıslah çalışmasına başlamadan önce kullanılacak çayır-mera türlerinin poliploidi düzeylerinin bilinmesi zorunludur. Farklı poliploidi seviyelerine ve fenotipik çeşitliliğe sahip doğal bitki varlıkları ve bunlardan elde edilen çeşitler farklı habitat ve çevresel koşullara yüksek oranda adaptasyon sağlamaktadır. Geniş bir dağılıma çeşitli ve çok sayıda biyotik ve abiyotik koşullara dayanıklı *Dactylis* cinsi, fenotipik, genetik, sitogenetik ve tarımsal olarak araştırılmaya uygundur (Lindner ve ark. 2004, Xie ve ark. 2012, Huang ve ark. 2015).

Coğrafik, morfolojik, tarla, biyokimyasal, klasik sitoloji, moleküler belirteç (markır) gibi teknikler kullanılarak cinsin, coğrafik dağılımı, filogenetik ilişkileri, genom özellikleri anlaşılmasına çalışılmıştır. Tüm bu çalışmalarda varılan genel kanı, cinsin buzul dönemi oluşan

iklimsel ve coğrafik değişikliklere adaptasyon amaçlı poliploidi seviyesini yükselttiği, coğrafik engeller, yabancı dölllenme, doğal seleksiyon, mutasyon, popülasyonlar arası kısmi gen geçişi, tohumların başka yerlere taşınması, insan faaliyetleri gibi etkenlerden dolayı incelenen taksonlarda; fenotipik, genetik ve coğrafik çeşitliliğin arttığı şekindedir. Fakat halen cinsin filogenetik ilişkileri, poliploidizasyonu, türleşmesi ve genetiği hakkında yeterli bilimsel bilgi mevcut değildir (Mizianty 1991a,b, Stewart ve Ellison 2011, 2014, 2015).

Klasik sitogenetik teknikleri kullanılarak, örneğin kromatin yapının boyanması ile bitki türlerinin kromozomal özellikleri, sayısı, morfoloji, mitoz ve mayoz davranışları hakkında belirli bir dereceye kadar bilgi sahibi olunabilirken bazı bitki türleri için bu teknikler yetersiz kalmaktadır. Bu durumda farklı veya kombine sitogenetik tekniklerin kullanılması zorunludur (Jenkins ve Hasterok 2007).

Günümüzde, belirli gen veya DNA sekanslarına ait yapılar ve bu yapıların fonksiyonları bir dizi gelişmiş moleküler sitogenetik yöntem (floresan *in situ* hibrizasyon, karşılaştırmalı genomik hibrizasyon, çok renkli floresan *in situ* hibrizasyon..) ile çalışılmaktadır. Örneğin FISH (floresan *in situ* hibrizasyon) gibi ileri sitogenetik teknikler sayesinde kromozomların tek tek veya PCR klonlarının haritası çıkarılabilmektedir. Benzer şekilde GISH (genomik *in situ* hibrizasyon) tekniği ile tüm genoma ait problemler kullanılarak hibrid ve allopoliploid bitkilerin parentel kromozomları çalışılabilmektedir (Wolny ve Hasterok 2009, Catalán ve ark. 2012).

Floresan *in situ* hibrizasyon tekniklerinin türler arası melezlerde transfer edilen genetik materyalin takibi, poliploid bitkilerin atalarının belirlenmesi, filogenetik akrabalıkların ortaya çıkarılması, genetik haritalama yapmak, karyotip analizi ve kromozomlar boyunca rekombinasyon dağılımlarının belirlenmesi gibi konuların aydınlatılmasında sıkça kullanıldıkları görülmektedir. Yine bu teknikler sayesinde, hücre döngüsü ve gelişme süresince farklı hücrelerde kromatin katlanması, interfaz nükleer organizasyonu ve kromatin yapı dağılımı gibi konular hakkında da araştırmalar yapılmaktadır (Wolny ve Hasterok 2009, Catalán ve ark. 2012, Wang ve ark. 2015, Schwarzacher 2016).

Floresan *in situ* hibrizasyon (FISH) tekniği, genlerin veya özellikli DNA dizilerinin kromozomlar üzerindeki fiziki yerlerinin belirlenmesini sağlayan bir metottur. Kromozomlar üzerindeki bazı özel DNA dizileri floresan boyalar ile işaretlenip, cins veya türler arası taksonomik ilişkileri belirlemede kullanılabilmektedir. Telomerik veya sentromerik tekrar

dizileri, 5S veya 25S ribozomal DNA sekansları, bu sekansların internal ara bölgeleri (Internal Transcribed Spacer: ITS) veya intergenik ara bölgeleri (Intergenic Spacer: IGS), FISH tekniğinde kullanılacak özel markır dizilerine örnek olarak verilebilir. FISH metodu kullanılarak türlerin genom yapı ve ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla FISH karyotipleri 1990'lı yıllardan beri yaygın olarak kullanılmaktadır (Lavia ve ark. 2011, Badakshi 2014, Wang ve ark. 2015, Schwarzacher 2016, Kus ve ark. 2017).

Floresan *in situ* hibridizasyon yönteminde, tanımlanmak istenen nükleik asit bölgesine eşlenik olan ve floresan işaretli tek iplikli özgün nükleik asit parçaları (prob) kullanılır. 5S ve 25S gibi korunmuş olan ribozomal DNA bölgelerinin kromozomlar üzerindeki fiziki pozisyonlarının ve sayılarının belirlenmesi ile elde edilen bilgiler, incelediğimiz bitki varlıklarının evrimsel durumunu karşılaştırmamıza olanak sağlamaktadır. Böylece poliploidi gösteren genotipler arasındaki uyumsuzluklar önceden belirlenmiş ve yapılacak ıslah çalışmalarında bu bilgilerin kullanılması mümkün olabilecektir (Fulnecek ve ark. 2006, Wolny ve Hasterok 2009, Bustamante ve ark. 2014, Roa ve Guerra 2015).

Bu çalışmanın öncelikli amacı, floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) metodunu laboratuvarımızda çalışır duruma getirmek olmuştur. Sonrasında materyal olarak kullanılan *Dactylis* cinsine ait diploid ve tetrapoliploid aksesyonların kendileri ve birbirleri ile olan filogenetik ilişkilerini açığa kavuşturmak için çift renkli ribozomal DNA (5S ve 25S) FISH yöntemine dayalı karyotip analizleri yapılmıştır. Hazırlanan bu karyotipler kullanılarak cins içerisindeki genom yapı ve ilişkileri kromozomal düzeyde karşılaştırılmıştır. Bunun yanı sıra aksesyonlara ait FISH analiz sonuçları ve daha önce çeşitli projelerde belirlenen flow sitometri değerleri (2C çekirdek DNA içerikleri) arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

### 2. 1. *Dactylis*'in Bitkisel ve Tarımsal Özellikleri

Domuz ayrığı, çok yıllık, uzun ömürlü, yoğun yumak formunda, yılın serin dönemlerinde iyi gelişen, sıcak yaz aylarını ise dormant halde geçiren bir buğdaygil yem bitkisidir. Kaba dokulu vejetatif bir yapıya sahiptir. Sık biçilmeye ve basılmaya dayanıklı değildir. Biçimden veya otlatmadan sonra yeniden gelişimi hızlı olmaktadır. Gölge ortamlara uyum yeteneği yüksektir. Dik eğimler, yol kenarları (banketler) ve ağaç altı alanlarda yetiştirilmeye uygundur. Cinsine ait bireylerde yabancı dölllenme görülmekte, tozlaşma büyük oranda rüzgâr vasıtası ile gerçekleşmektedir. Bitki boyu, sapa kalkma evresinde iklim koşullarına göre 60-200 cm uzunluğa erişebilmektedir. Bitkinin sapları birkaç yaprağa sahip iken, tabanda bol yapraklıdır. Yaprak rengi koyu yeşilden mavi-yeşile kadar değişir. Yapraklar genç iken, kıvrık, geniş, dik ve uzundur. Yakacık oldukça geniş, düzensiz ve beyaz renklidir. Bitki saplarının erken gelişim döneminde basık bir morfoloji göstermesi cins için karakteristik bir özelliktir. Çiçekler bileşik salkım şeklinde, dik olup, küçük dallar birer başakçık ile son bulur. Çiçek salkımının alttaki dalları üsteki dallara göre daha uzundur ve sayıca daha fazladır. Bin tane ağırlığı yaklaşık 1 g'dır. Yoğun ve geniş bir kök sistemine sahip olduğundan, topraktaki besinleri iyi kullanabilmekte, aynı zamanda bu özelliği ile toprağı erozyona karşı korumaktadır. Köklerin toprak derinliği, çayır salkım otu ve kelp kuyruğu'ndan fazla, kılçıksız Brom'dan ise az bulunmuştur (Jung ve Baker 1985, Elçi 2005, Hatipoğlu ve Kökten 2009, Gür ve Şen 2016, Kallida ve ark. 2016). Yapılan bir araştırmada, *Dactylis* bitkilerinin köklerinden salgılanan bazı metabolitlerin muhtemel allelopatik etkisi sebebiyle, diğer bazı baklagil ve buğdaygil bitki tohumlarının çimlenmelerini engellediği belirlenmiştir (Li ve ark. 2016).

*Dactylis*, taban suyu düşük, geçirgenliği yüksek topraklarda iyi gelişmektedir. Besince zengin, özellikle azot oranı yüksek topraklarda en yüksek verimi vermeye beraber, fakir topraklarda, kısmen asit ve alkali topraklarda da yetişme yeteneğine sahiptir. *Dactylis* tarımı sonbahar donlarının ağır olmadığı alanlarda daha ekonomik olmaktadır. *Dactylis* bitkilerinin sıcaklığa kelp kuyruğu (*Phleum pratense*) ve çayır salkım otundan (*Poa pratensis*) daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Elçi 2005, Hatipoğlu ve Kökten 2009). *Dactylis*, ılıman ve nemi uygun koşullarda iyi gelişmekte, aşırı su baskınlarına karşı toleranslı değildir (Açıkgöz 2001, Elçi 2005, Hatipoğlu ve Kökten 2009).



Subtropikal ülkelerde geliştirilen bazı *Dactylis* çeşitleri, pas hastalığına karşı hassas ve yazın erken dormant hale gelmektedir. Pas mantarı *Dactylis*'in tüm vejetatif döneminde özellikle başaklanma ve çiçiklenme döneminde görülmekte ve bitkilerin besleme değerini düşürmektedir (Mizuno ve ark. 2000). *Scolecotrichum graminis* kahverengi çizgi hastalığına sebep olmaktadır. Ayrıca külleme hastalığının da *Dactylis* bitkilerinde önemli zararlara yol açmaktadır. Bunun yanı sıra *Dactylis* bitkisinin kökleri ile beslenen Japon karaböceği (*Popillia japonica*) ile yeşil haziran böceği (*Cotinis nitida*) ve bitkinin toprak üstü yapıları ile beslenen testere sinekleri (*Dolerus* subsp.) önemli zararlılar arasındadır (Hatipoğlu ve Kökten 2009). Özellikle subtropikal (rutubetin fazla olduğu) bölgelerde *Dactylis* bitkilerinde en fazla enfeksiyon gösteren 3 çeşit mantar tanımlanmıştır. Bunlar sarı pas hastalığına neden olan *Puccinia striiformis* Westend, yaprak yanıklığına neden olan *Rynchosporium orthosporum* Caldwell ve özellikle Amerikanın güney bölgelerinde antraknoz kaynağı *Colletotrichum graminicola* (Ces. G. W. Wils.) olarak kayıt edilmiş. Birçok *Dactylis* çeşidinin *Puccinia graminis* Pers., pas etkenine duyarlı oldukları bu hastalık etmeninin hem yem verimini hemde kalitesini azalttığı bildirilmiştir (Mizuno ve ark. 2000, Yan ve ark. 2013, Zeng ve ark. 2014). Yine *Dactylis* tarımının yapıldığı ılıman iklim alanlarında, endofitik gelişen *Epichloë typhina* adlı mantari hastalık etkenine raslanmıştır. Bu hastalık etkenin bitkinin çiçeklenmesini engellediği ve tohum verimini düşürdüğü belirlenmiştir (Leyronas ve Raynal 2008). Bu gibi sebeplerden ve tarımsal değerinden ötürü, son yıllarda, moleküler düzeyde, sıcaklığa ve hastalıklara dayanıklı *Dactylis* çeşit geliştirme çalışmalarının arttığı görülmektedir (Zeng ve ark. 2014, Huang ve ark. 2015, Yan ve ark. 2016).

Şu ana kadar 100'den fazla *Dactylis* kültür çeşidi geliştirilmiştir (Casler ve ark. 2000). Kültür çeşitlerinin çoğu tetrapoliploid olsada, diploid alt türlerden de geliştirilen az sayıda çeşit mevcuttur. Diploid subsp. *izcoi* ve subsp. *aschersoniana* ait kültür çeşitleri bulunmaktadır (Stewart ve Ellison 2011). Galiçya (İspanya) kaynaklı diploid subsp. *izcoi*'den, Grassland Wana (Yeni Zellanda), Cambria (İngiltere), Artibro (İspanya) çeşitleri geliştirilmiştir. Yine diploid subsp. *lusitanica*'dan Saborto ve Calder (İngiltere) Grassland Kara (Yeni Zelanda) çeşitleri geliştirilmiş, bunlardan Saborto kolşisin uygulanarak elde edilmiştir (Rumball 1982, Stewart ve Ellison 2011).

Avustralya, Yeni Zellanda, Çin, Japonya, Güney ve Kuzey Amerika ve bazı Avrupa ülkelerinde, uygun iklim koşullarının olduğu alanlarda, *Dactylis*'in; hem ot amaçlı hem de mera amaçlı kullanıldığı, çeşit geliştirme programlarının önemsendiği ve başarı sağlandığı

görülmektedir. *Dactylis*'in Japonya, ABD ve Yeni Zelanda gibi bazı ülkelerde en önemli buğdaygil yem bitkileri arasında olduğu görülmektedir. Kamışsı yumak'dan (*Festuca arundinacea*) sonra geniş bir adaptasyon yeteneğine sahip olduğu söylenen *Dactylis*, Kuzey Amerika'da oldukça yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir. Amerika'nın özellikle merkez-kuzey ve kuzeydoğu bölgelerinde 45 eyalette yetiştirildiği rapor edilmiştir (Lolicato ve Rumball 1994, van Santen ve Sleper 1996, Casler ve ark. 2000).

Çin'de 20 yıllık ıslah çalışmaları sonucu, doğal *Dactylis* kaynaklarından Gulin, Baoxing ve Chuandong adında 3 çeşit ve 5 adet çeşit adayı geliştirilmiş olup hem mera hemde ot amaçlı kullanıldıkları aktarılmıştır (Peng ve ark. 2008, Xie ve ark. 2012).

*Dactylis* bol yapraklı olduğundan, verimli bir şekilde, kuru ot, yaş ot, silaj amaçlı hayvan yemi olarak kullanılabilir. Otunun besleme değeri ve sindirilebilirliği birçok buğdaygil yem bitkisinden yüksektir. Bozulan çayır-mera alanlarının ıslahında, yapay mera uygulamalarında baklagiller ile karışık yetiştirilmektedir. Erken ilkbahar ve sonbahar aylarında hızlı gelişen *Dactylis*, özellikle otlatma amaçlı, kırsal bölgelerde hayvanlar için ekonomik ve sağlıklı bir yem kaynağı sunmaktadır (Hatipoğlu ve Kökten 2009, Sanada ve ark. 2010). Küçük ve büyük baş hayvan beslemeye uygun olan bitki, mera alanlarında dönüşümlü otlatmaya dayanıklıdır. Gölgeye dayanıklı olan domuz ayrığı, yonca, çeşitli üçgül türleri, gazal boynuzu gibi baklagil yem bitkileri ile beraber yetiştirilmeye uygundur (Ogle ve ark. 2011). Kuru ot verimi ve besin içeriği birlikte değerlendirildiğinde, bitkilerin salkım gösterme başlangıcı en uygun hasat zamanı olarak belirlenmiştir (Can ve Ayan 2017).

Dünyanın sıcak ve ılıman geniş bölgelerinde, *Dactylis* yetiştiriciliğinin yaygın olduğu; Dünya'da her yıl yaklaşık olarak 14.000 ton *Dactylis* tohumu üretildiği rapor edilmiştir (Stewart and Ellison 2011). Bu miktar, tohum üretiminde %3.3'lük bir pay ile *Lolium*, *Festuca* ve *Phleum* gibi ılıman-sıcak bölgelerde tarımı yapılan cinslerden sonra *Dactylis*'i 4. sıraya yerleştirmektedir. *Dactylis* cinsi içerisinde yeşil alan bitkisi olarak kullanıma uygun formlar bulunmakta ancak tohum üretimlerinin az, üretim maliyetlerinin ise yüksek olmasından dolayı tercih edilmemektedir (Jafari ve Naseri 2007, Bondesen 2007, Stewart and Ellison 2011).

Ülkemizde Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitü Müdürlüğü'nce geliştirilen, Taya, Doğu Yıldızı ve Ayfam adlı 3 çeşit adayı, Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü tarafından 2015 yılında tescillenmiştir. Çeşit adaylarının değerlendirme süreci

sonunda; ortalama, yeşil ot verimi 2400 kg/da, kuru ot verimi 739 kg/da, bitki boyu 98.33 cm, ham protein oranı %12.81, ham lif oranı %26.91 ve Erzurum koşullarında kışa dayanımının %90'dan fazla olduğu belirlenmiştir (Anonim 2015).

## 2. 2. *Dactylis*'in Coğrafik Dağılımı ve Ekolojik İstekleri

*Dactylis* cinsi monofiletik (tek atadan köken almış) olduğu düşünülen, diploid, tetrapoliploid ve heksapoliploid poliploidi seviyelerinde, 20'den fazla takson içermektedir. Doğada bu taksonlardan en fazla tetrapoliploid ( $2n=4x=28$ ) kromozom sayısına sahip formlar yer alırken, diploid ( $2n=14$ ) formlar belirli coğrafik bölgelerde ve heksapoliploid ( $2n=6x=42$ ) formlarına ise Mısır'ın batısında, Libya'nın bir kıyı bölgesi olan Sirenayka ve İspanya'da rastlanmıştır (Borrill 1961a, Borrill ve Jones 1961). Son buzul döneminden sonra havaların hızlı bir şekilde ısınması ile Kuzey bölgelerde kurakçıl koşullara dayanıklı diploid, tetrapoliploid ve heksapoliploid *Dactylis* formları kalmıştır. Heksapoliploid bitkiler hakkında az şey bilinmektedir. Muhtemelen inter-ekotipik kökenli oldukları, kurakçıl koşullara iyi adapte oldukları söylenmiş ve bu sebeple subsp. *hispanica* ile ilişkilendirilmişlerdir (Borrill ve Jones 1961, Borrill 1977).

*Dactylis* cinsi Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve bazı Atlantik adalarına dağılmış haldedir (Jones ve Borrill 1962, Jones 1962, Borrill 1977, Stewart ve Ellison 2011). Ülkemiz doğal mera alanlarının yaygın bir bitkisi olan domuz Ayırığı (*Dactylis* L.) ülkemizin de içinde yer aldığı, Avrupa, Yakın Doğu ve Akdeniz coğrafyası bitkilerindedir (Tuna ve ark. 2004).

Yapılan çalışmalar, Türkiye'de genellikle tetrapoliploid seviyeye sahip bitkilerin varlığından söz etmektedir. Henüz diploid bitkilerin varlığını kayıt eden bir çalışmaya rastlanmamıştır (Hatipoğlu ve ark. 1992, Tükel ve Hatipoğlu 1994, Tosun ve ark. 1999, Tuna ve ark. 2004, Ayan ve ark. 2006, Aygün ve ark. 2009, Can ve Ayan 2017).

Doğal florasında yer almamasına rağmen, ılıman iklime sahip olan Kuzey Amerika ülkeleri ve Avustralya'da, dışarıdan götürülen materyallerden çeşitler geliştirilmiştir. Cinsin üyeleri oldukça değişik iklim; ılıman, tropikal, sup-tropikal, Akdeniz, Alpin ve farklı toprak tekstürlerine; taşlı, çakıllı, kireçli, kumlu, killi, silisli, kalkerli, dolomitik gibi uyum sağlamıştır (Bretagnolle ve Thompson 2001, Stewart ve Ellison 2011).

Diploid *Dactylis* ekotiplerinin Avrasya ve Akdeniz eko-coğrafyalarında yaygın oldukları bildirilmiştir (Stebbins ve Zohary 1959, Lumaret ve ark. 1987). Morfolojik ve

coğrafi özelliklerine göre diploidler iki büyük guruba ayrılmıştır. Avrasya diploidleri geniş yapraklı, karasal iklime uyum sağlamış ve genellikle yaz ayları boyunca gelişme göstermektedir. Sadece *lusitanica* ve Galiçya diploidlerinin daha çok güney kesimlerde yer aldıkları ve kış ayları boyunca gelişme gösterdikleri aktarılmıştır (Stebbins ve Zohary 1959). Akdeniz diploidleri boyca kısa, daha dar yapraklara sahip olup, Akdeniz iklimine adapte olmuş ve yaz aylarını yüksek sıcaklıktan dolayı dormant halde geçirmektedir. Avrasya bölgesinde günümüzde *Dactylis polygama* Horvat., olarak adlandırılan diploid *aschersoniana* alt türünün tarımsal açıdan önemli olduğu, meşe, kayın ve gürgen ormanlarında yaygın bir dağılışa sahip olduğu belirlenmiştir (Stebbins ve Zohary 1959, Borrill 1977). Alt türün her ne kadar Akdeniz iklim bölgesinde yaygın olduğu belirtilse de, bitkinin Kafkasya'dan Avrupa'nın kuzey kesimlerine kadar başarılı bir şekilde yayıldığı kayıt edilmiştir. Subsp. *aschersoniana* Avrupa'nın ormanlık, yarı nemli bölgelerinde 3. dereceden yaygın bir flora elemanı olarak belirlenmiştir (Stebbins ve Zohary 1959, Borrill 1977). Akdeniz eko-coğrafyasında tarımsal açıdan ekonomik olmayan, fenotipik olarak farklılık gösteren, yazın dormant 10'dan fazla diploid *Dactylis* ekotipi bulunduğu, bunlardan yalnızca *lusitanica* alttürünün tarımsal açıdan önem arz ettiği vurgulanmıştır (Stebbins ve Zohary 1959, Borrill 1977, Falistocco ve Torricelli 2016).

Tetrapoliploid taksonlar daha çok *glomerata* ve *hispanica* alt türleri altında toplanmıştır. Bunlardan *Dactylis glomerata* alt türü Avrupa'nın sıcak ve ılıman bölgelerinde, Asya'nın batı ve orta bölgeleri ile Afrika'nın kuzeyinde yaygın bir dağılışa sahiptir. *Dactylis glomerata* en yaygın dağılışı gösteren alt tür olup, önemli tarımsal özelliklere sahiptir. *Dactylis hispanica* kısa boylu ve kış aylarında gelişme gösteren bir alt tür olarak tanımlanmıştır. Cins içerisinde kurakçıl karakter özellikleri gösteren tetrapoliploid ve heksapoliploid taksonlar, subsp. *hispanica* ile özdeşleştirilmiştir (Borrill 1977, Mizianty 1990, Stewart ve Ellison 2011).

*Dactylis* taksonlarının coğrafi dağılışı ve ekolojik isteklerinin poliploidi düzeylerine göre değişiklik gösterdiği görülmektedir. Tetrapoliploid taksonlar, çok değişken habitat ve yükseltilerde yetişirken, diploidler kendilerine has, dar ve sıra dışı habitatlarda, çoğu endemik, bazıları relict (buzul devrine ait) endemik formlar olarak belirlenmişlerdir (Jones 1961, Lumaret 1988, Lumaret ve Barrientos 1990). Bazı diploid ve tetrapoliploid *Dactylis* taksonları aynı habitatta birbirleri ile temas (simpatrik) halinde yaşamaktadır (Bretagnolle ve Thompson 2001). Çoğu durumda ise diploid formların tetraploid formlarca çevrelendiği (allopatrik, coğrafi türleşme) gözlemlenmiştir (Lumaret ve Barrientos 1990, Lindner ve ark. 2004).

Bunlardan simpatriye (türleşmeye) örnek olarak, subsp. *izcoi*'ye ait diploid ve tetrapoliploid formlar bazı araştırmacılarca İspanya'nın Galiçya bölgesinde ve Portekiz'de farklı lokalitelerde gözlemlenmiştir (Ortiz ve Rodríguez-Oubiña 1993, Lindner ve Garcia 1997, Lindner ve ark. 1999, 2004). Subsp. *castellata* alt türünün karışık poliploidilerine Cezayir'de, alüvyonlu-killi topraklarda, demir yolu dolguları üzerinde rastlanmıştır. Formlar arasında morfolojik farkın olmadığı bildirilmiştir (Jones ve ark. 1961). Subsp. *lusitanica* karışık poliploidilerine Portekiz'de, subsp. *judacia* alt türüne ait simpatrik lokalitelere ise İsrail ve Lübnan'da rastlanmıştır (Nur ve Zohary 1959, Borrill ve Corroll 1969).

Tetrapoliploid *Dactylis* bitkileri bazı anatomik (stomalar) ve morfolojik (yaprak boyu, yaprak eni, başak durumu vb.) farklılıklar ile diploidlerden ayrılmaktadır. Tetrapoliploidler bu yapılar bakımından daha iri özellikler sergilemektedir. Yine aynı sitotiplere ( aynı alt türe ait diploid ve tetrapoliploid bitkiler) ait tetrapoliploid bitkiler diploidler ile karşılaştırıldığında, çoğu zaman morfolojik olarak ayırt edilemeselerde, tetrapoliploid bitkilerin tohum çıkışlarının daha hızlı ve güçlü, tohumlarının daha ağır, sürgün çıkışlarının daha hızlı ve erken çiçeklendikleri gözlemlenmiştir. Bununla beraber her iki poliploidi seviyesi; çevresel koşullara uyum, hastalıklara dayanıklılık ve diğer bazı agronomik özellikler açısından ıslah çalışmaları için önemli genetik kaynak oluşturmaktadır (Borrill ve Lindner 1971, Ortiz ve Rodríguez-Oubiña 1993, Falistocco ve Torricelli 2016).

### **2. 3. *Dactylis*'in Taksonomik Durumu**

*Dactylis* cinsi; *Poaceae* (buğdaygil) familyası, *Pooideae* alt famiyası, *Festucea* (yumak) oymağına dâhil en az sayıda taksonomik birim içeren buğdaygillerden biridir. Cinsin *Dactylis glomerata* adlı tek bir türden oluştuğu, diğer taksonomik birimlerin bu türden çeşitlendiği düşünülmektedir. Cins içerisinde geniş ve süreklilik gösteren sistematik belirsizlikler, önerilen bir türün geçerlilik kazanmasını zorlaştırmaktadır. Bu sebeple cinse ait birçok takson alt tür olarak kabul edilegelmiştir (Steward ve Ellison 2014, 2015, Yan ve ark. 2016).

*Dactylis* cinsi yetiştiği farklı doğal alanlarda birçok farklı çalışmanın konusu olmuştur. Fakat hala tüm taksonları adlandıracak modern bir sınıflandırma yapılamamıştır. Bunun nedenleri arasında çok farklı coğrafik alanlarda görülmeleri, farklı taksonların bir birleriyle kolayca melezlenebilmeleri, çakışan veya ortak habitatlarda yaşamaları ve cinsin sahip olduğu genetik ve morfolojik çeşitlilik sayılabilir. Örneğin, çoğu durumda farklı poliploidi seviyeleri

arası veya simpatrik alanlarda toplanan sitotipler arası net fenotipik ayrımlar yapılamadığı, *Dactylis* taksonları üzerinde klasik sitogenetik yöntemler ile şu ana kadar yapılmış karyotip çalışmalarında ise sistematik açıdan farklılık sağlayacak kadar kromozomal değişimlerin gözlemlenemediği belirtilmiştir (Mizianty 1991a, Tuna ve ark. 2004, Büyükbaşar 2010). Bu yüzden taksonlar arası genetik ilişkiler tam anlamı ile tanımlanmamış, morfolojik karakterlere ait farklılıkların ise her zaman sitolojik farklılıklar ile özdeşleşmediği belirtilmiştir (Borrill 1961a, 1969, Mizianty 1991a, Vilhar ve ark. 2002).

Günümüzde yapılan moleküler analizler ise daha çok cinsin genetik çeşitliliği ve ıslahı ile ilgili konular üzerine yoğunlaşmıştır. Cinsine ait bu sistematik sorunun giderilmesi için, tüm genetik kaynakların yeniden toplanması ve tüm taksonları kapsayıcı ileri genetik ve sitogenetik çalışmaların yapılması gerekmektedir (Xie ve ark. 2010 a, b, Stewart ve Ellison 2011).

*Dactylis* cinsi en iyi çalışılmış poliploidi sistemlerinden biri olarak görülmektedir. Cinsin temel kromozom sayısı  $n=x=7$  olup, buğdaygil ailesinde yer alan buğday, arpa, çeltik ile aynıdır (Serin ve Tan 2009). Cinsinde doğal olarak 3 poliploidi seviyesi bulunmaktadır. Bunlar 15 veya 18 kadar diploid ( $2n=2x=14$ ), 3 veya 6 kadar tetrapoliploid ( $2n=4x=28$ ) ve bir hekzapoliploid ( $2n=6x=42$ ) seviye olarak belirlenmiştir. Bu poliploidi seviyelerine dâhil popülasyonlar, tür, alt tür, form, ekotip gibi muğlak bir sınıflandırma durumu göstermektedir (Nur ve Zohary 1959, Borrill 1977, Stewart ve Ellison 2011, Song ve ark. 2011). Ayrıca doğal floradan toplanmış materyaller üzerine yapılan sitolojik çalışmalarda triploid ( $2n=3x=21$ ) ve pentapoliploid ( $2n=5x=35$ ) bitkilere de rastlanılmıştır (Müntzing 1933, Zohary ve Nur 1959, Bretagnolle ve Lumaret 1995).

Cinsin sistematik durumunu ortaya koyacak çeşitli; sitolojik, genetik, biyokimyasal, fenotipik, çalışmalar yapılmış olsa da günümüzde cinsin adlandırılması hala büyük oranda coğrafik ve morfolojik farklılıklara dayanmaktadır (Stewart and Ellison 2011). Bu sebeple cinsin bilimsel sınıflandırılması halen tam anlamı ile açıklığa kavuşmuş değildir. Her ne kadar günümüzde cinsin tek bir atadan kökenlendiği ve cinsine ait 20'den fazla taksondan bahsedilsede, bunların çoğununun geçici veya alt tür olarak kabul edilen taksonlara ait sinonim isimler olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden literatür çalışmalarında bu belirsizliğe atfen genellikle takson teriminin kullanıldığı görülmektedir. Burada takson; bilimsel adlandırmadaki her bir basamağı temsil etmekten ziyade, daha çok *Dactylis*'in sistematik belirsizliğini genellemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu belirsizlikten dolayı alt tür, form,

ekotip veya takson sözcükleri benzer anlamlarda kullanılmaktadır (Stewart and Ellison 2011, 2014, 2015).

The Plant List ([www.theplantlist.org/1/](http://www.theplantlist.org/1/)) taksonomi veri tabanı sitesinde 18 farklı diploid, çoğu alt tür olarak, adlandırılmıştır. Bunlardan *Dactylis metlesicii* P. Schönfelder ve *Dactylis smithii* tür olarak yazılmış fakat şimdi *Dactylis glomerata* L.'nin sinonimi olarak kabul edildikleri görülmektedir. Kromozom sayısı veritabanı (Chromosome Counts Database: CCDB) kayıtlarında ise aşağıdaki diploid taksonlar kabul edilmiştir. Diğer taksonlar geçici veya bu birimlerin sinonimi olarak verilmiştir (<http://ccdb.tau.ac.il/search/Dactylis/>).

*Dactylis glomerata* subsp. *juncinella* (Bory) Stebbins & D. Zohary

*Dactylis glomerata* subsp. *lobata* (Drejer) H. Lindb.

*Dactylis glomerata* subsp. *lusitanica* Stebbins & D. Zohary

*Dactylis glomerata* subsp. *reichenbachii* (Hausm.) Stebbins & D. Zohary

*Dactylis glomerata* subsp. *smithii* (Link) Stebbins & Zohary

Kromozom sayısı veritabanı (Chromosome counts database: CCDB) sadece *Dactylis glomerata* ve *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* taksonlarını tetrapoliploid olarak tanımlamıştır (<http://ccdb.tau.ac.il/search/Dactylis/>). Taksonomi sitesi The Plant List'de ise aşağıdaki tetrapoliploid taksonlar verilmiştir ([www.theplantlist.org/1/](http://www.theplantlist.org/1/)). Diğer taksonlar geçici (resmi olmayan) veya bu taksonların sinonimi olarak görülmektedir.

*Dactylis glomerata* L.

*Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* (Roth) Nyman

*Dactylis glomerata* subsp. *glomerata*

*Dactylis glomerata* subsp. *marina* (Borrill) Greute

### **2. 3. 1. Diploid *Dactylis* taksonlarının kökeni ve yayılış alanları**

Coğrafik ve morfolojik farklılıklara dayanılarak 1988 yılına kadar 15 diploid takson tanımlanmıştır (Lumaret 1988). Bugün 18 diploid alt tür veya form bilinmekte, bu diploidler birçok çalışmaya rağmen hala büyük oranda coğrafik ve morfolojik özelliklerine göre adlandırılmaktadır. Fakat bu adlandırmaların çoğunun kesin olmadığı, zamanla değişebileceği belirtilmiştir (Steward ve Ellison 2011).

Diploid *Dactylis* taksonları iklim istekleri ve yayılış alanlarına göre, Avrasya, Akdeniz veya ılıman, Subtropikal ve Akdeniz gurupları şeklinde sınıflandırılmışlardır (Borrill 1961a, Lumaret 1988, 1997). Diploid taksonların sınıflandırılması ile ilgili en kapsamlı çalışmayı gerçekleştiren Stebbins ve Zohary (1959)' göre *Dactylis g. subsp. himalayensis*, *Dactylis g. subsp. juncinella*, *Dactylis g. subsp. ibizensis* ve *Dactylis g. subsp. smithii* taksonları morfolojik olarak farklıdır. Diğer tanımlanan diploid alt türlerin, bu 4 form arası geçiş özellikleri taşıdıkları belirtilmiştir. Coğrafik dağılımlarından yola çıkarak, *Dactylis g. subsp. aschersoniana*, *Dactylis g. subsp. himalayensis* ve *Dactylis g. subsp. smithii*'nin cinsin eski üyeleri olduğu ve muhtemelen kökenlerinin Miosen dönemine kadar gittikleri ifade edilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda *Dactylis g. subsp. ibizensis*'in de Miosen döneminde oluşmuş olabileceğini ve muhtemelen *Dactylis g. subsp. juncinella*'nın 3. zamanın sonlarında bu formdan farklılaşarak kökenlenmiş olabileceğini belirtmişlerdir (Stebbins ve Zohary 1959). Lumaret (1988)'e göre *Dactylis g. subsp. parthiana* ve *Dactylis g. subsp. sinensis*'de eski zamanlarda kökenlenmiştir. Bunların dışında kalan diploid taksonların genellikle, yaygın olan tetrapoliploid popülasyonlara yakın yetiştikleri aktarılmıştır (Borrill ve Carroll 1969).

*Dactylis subsp. aschersoniana* (Graebner) Thell, subsp. *himalayensis* Domin, subsp. *parthiana* Parker & Borrill, diploid formları ılıman iklim kuşaklarında, subsp. *smithii* (Link) Stebbins & Zohary subtropikal, subsp. *lusitanica* ve *reichenbachii* (Hausm.) ise Galiçya (İspanya), büyük oranda Atlas okyanusunun iklimsel özellikleri altında fakat kıyıya uzak kesimlerde, nispeten kışın biraz daha sert olduğu alanlarda gözlemlenmişlerdir. Subsp. *woronowii* (Ovcz.), *judaica* Stebbins & Zohary, *juncinella* (Bory) Stebbins & Zohary, *ibizensis* Stebbins & Zohary, *castellata* Parker & Borrill, *santai* Stebbins & Zohary, *mairei* Stebbins & Zohary Akdeniz diploidlerini oluşturmaktadır ve diploid formların çoğu Akdeniz iklim kuşağında belirlenmiştir (Stebbins ve Zohary 1959, Lumaret 1988).

Doğada çoğu diploid *Dactylis* alt türünün, coğrafik ve ekolojik bariyerlerden dolayı etkileşimde bulunamadığı, fakat diploidlerin birbirleri ile olan eşleşme durumlarının göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmıştır. Örneğin doğal ortamlarında diploid subsp. *parthiana* ve subsp. *woronowii* hibritlerine rastlandığı, diploidler ile yapılan çaprazlamalar sonucunda, eğer aralarında coğrafik ve morfolojik engeller yok ise fertil döller oluşturdukları gösterilmiştir (Borrill ve Carroll 1969). Fakat oluşan döllerde (F1 ve F2) nükleer ve sitoplazmik düzeyde, hibride bağlı olarak çeşitli oranlarda fertilitede azalmaları gözlemlenmiştir (Zohary 1956, Parker ve Borrill 1968). Bu kısmi fertilitite durumunun, kısmi bir türleşmeye ve geniş oranda



bir alt tür çeşitliliğinin oluşmasına katkı sağlayabileceği belirtilmiştir (Zohary 1956, Parker ve Borrill 1968).

Diploid formlar üzerindeki kromozomal çalışmalar örnekler arasında, kromozom özellikleri bakımından çok büyük farklılıklar olmadığını göstermiştir (Wetschnig 1991, Büyükbaşar 2010). Ancak en büyük ve en küçük diploid 2C-DNA içerikleri arasında 1.47 pg'lık fark bulunmuş, bu farkın populasyonlar arasında önemli bir genetik varyasyona işaret ettiği açıklanmıştır (Büyükbaşar 2010). Kromozomlar arasında belirgin farklılıkların olmayışı, 2C-DNA varyasyonlarının süreklilik göstermesi, cins içerisinde türleşme olayının tamamlanmadığını göstermektedir (Tuna ve ark. 2004, Büyükbaşar 2010). Bununla beraber uzun süre birbirlerinden izole diploidlerin, büyük genetik değişimler sebebiyle fertil döller oluşturamayacağı, örneğin subsp. *smithii*'nin bu özellikleri taşıdığı ve bu yüzden relikt endemik olduğu belirtilmiştir (Parker 1972).

Diploid *Dactylis* sistematik birimleri üzerinde şimdiye kadar filogenetik ilişkiler; morfolojik karakterizasyon (Stebbins ve Zohary 1959), izoenzim analizleri (Lumaret 1986), fenolik bileşikler (Fiasson ve ark. 1987), klasik yöntemler ile karyotip analizi (Wetschnig 1991, Büyükbaşar 2010) ve çekirdek DNA analizleri (Büyükbaşar 2010) ile ilgili çalışmalar yürütülmüştür. Yukarıdaki araştırmacıların ortak görüşü, diploid formların geçmişte daha çok yayılma alanlarına sahip oldukları, özellikle sıcak ve subtropikal bölgelerde vejetasyon gösterdikleri, fakat zamanla ekolojik koşulların değişmesi ile yaşam alanlarının daraldığı ve özelleştiği yönündedir. Yine bu çalışmaların çoğunda diploidler çalışılan özellikler bakımından genellikle çok büyük farklılıklar göstermeselerde, farklı alt gurup özellikleri göstermişlerdir.

Yakın zamanlı nükleer DNA ITS ( internal transcribed spacer region) ve kloroplast DNA trnL intron bölgelerinin karşılaştırılması esasına dayanan moleküler çalışmalar, diploid *Dactylis* birimlerinin evrimine ve kökenine ait en açıklayıcı çalışma olmuştur. Araştırmacılar muhtemelen ilk diploid *Dactylis*'lerin Asya'nın merkezinde yaklaşık 150.000 yıl önce köken aldığını, ara buzul dönemde batıda Portekiz'e, güneyde İsrail'e doğru yayıldıklarını öngörmüşlerdir. Son buzul dönemi ile birlikte kuzey bölgeleri soğuyunca, bu yayılmanın yönü değişmiştir. Birçok bakiye diploid form bu zamanda, nispeten yumuşak iklime sahip güney buzul barınaklarında, buzul sonrası döneme yok olmadan kalabilmişlerdir. Tabi bu arada yayılmanın yönü, İsrail'den Kuzey Afrika, Cezayir, Fas otlaklarından, Kanarya adaları, Cape Verde gibi Atlantik adalara doğru olmuştur. Buzul çağı sona erip, havalar tekrar ısınınca

Kuzey Afrika ve ada otlaklarında diploid formların yayılması azalmış, sınırlı sayıda ve dar alanlarda bazı diploidler günümüze kalmıştır. Fakat bunun tersi havalar ısınınca Avrupa'nın kuzey ormanları ve Kafkaslar'da diploid *aschersoniana* tekrar yaygınlaşmaya başlamıştır. *Dactylis* cinsi alt türleri, ılıman, kurak ve Alpin karakterli çeşitli ekotiplere yayılmışlardır. Bu durum cinsin adaptasyon anlamında oldukça esnek olduğunu göstermektedir (Stewart ve Ellison 2011,2013, 2015).

Stebbins ve Zohary (1959), Lumaret (1988) ve Stewart ve Ellison (2011)'in çalışmalarında adı geçen 17 diploid taksonun eko-coğrafik kökenlerine aşağıda kısaca değinilmiştir

### ***Himalayensis***

*Dactylis glomerata* subsp. *himalayensis* Domin., Himalaya sıra dağlarının batı taraflarında 1800-4000 m rakımlarda, serin ılıman orman zonlarında yaşam alanı bulmuştur. *Himaleyensis* ile *aschersoniana* arasında ilişki olabileceği aktarılmıştır. (Stebbins ve Zohary 1959, Borrill 1977).

### ***Aschersoniana***

*Dactylis glomerata* subsp. *lobata* (Drejer) Lindb. F. (Syn. subsp. *aschersoniana* (Graebn.) Thell. ≡ *Dactylis aschersoniana* Graebn. ≡ *Dactylis polygama* Horv. ≡ subsp. *polygama* (Horv.) Domin.). İliman iklim özelliklerine adapte olmuş bu alt tür, yaprak döken ağaçların oluşturduğu ormanlarda, Kafkas dağlarından Avrupa'nın merkezine, kuzeyde İsveç, doğuda Rusya'nın batısına, Yugoslavya'nın güneyi ve Makedonya'nın kuzeyine kadar geniş bir alana dağılmıştır. *Aschersoniana* ve *himaleyensis*, her ikisinde yüksek rakımlarda, karasal iklimin hâkim olduğu serin ılıman orman alanlarında görülmüştür (Stebbins ve Zohary 1959). Her iki alt türün izoenzim bantları (Lumaret 1986), fenolik kompozisyonları (Lumaret 1988), DNA içerikleri (Tuna ve ark. 2007, Büyükbaşar 2010), birbirine benzer bulunmuştur. *Aschersoniana*'nın tarımsal açıdan kültüre alınmaya uygun karakterler taşıdığı, Avrupa'nın merkez bölgelerinin iklimsel koşullarına iyi adapte olduğu bildirilmiştir. Çek Cumhuriyeti'nde Tosca adlı bir çeşidi bulunmaktadır (Mika ve ark. 2002).

## ***Lusitanica***

*Dactylis glomerata* subsp. *lusitanica* Stebbins & Zohary: Bu takson Portekiz'in Serra de Sintra bölgesinde bir kaç lokalitede tespit edilmiştir. *Lusitanica* habitatları Atlas Okyanus iklim koşullarının hâkim olduğu, orta derecede ılıman orman alanlarında bulunmaktadır. Ancak bu bölgelerde kış mevsiminin görece sert geçtiği belirtilmiştir (Stebbins ve Zohary 1959). Subsp. *lusitanica* genellikle meşe ve çam topluluklarının açık kesimlerinde görülmüştür. Serra de Sintra (Portekiz) bölgesi kurak alanlarında, *lusitanica* popülasyonları etrafında tetrapoliploid *hispanica* popülasyonlarına rastlanmıştır (Stebbins 1961). Diploid *lusitanica* popülasyonlarının yakınlarında triploid ve tetrapoliploid bitkiler belirlenmiş. Diploid bitkilerin indirgenmemiş gametler aracılığıyla çift yönlü eşleşmeleri sonucu diğer poliploidi seviyelerinin oluştuğu belirtilmiştir (Bretagnolle ve Lumaret 1995).

## ***İzcoi***

*Dactylis glomerata* subsp. *izcoi* Ortiz & Rodriguez-Oubina: İliman iklim koşullarına adapte olmuş bu takson, Galiçya (İspanya) ve Portekiz'de ormanlık habitatlarda 400-650 m arası rakımlarda yetişmektedir (Ortiz ve Rodriguez-Oubiña1993, Lindner ve Garcia 1997, Lindner ve ark. 2004). Subsp. *juncinella* ile genetik benzerlik gösterdiği, atalarının ortak buzul döneminden olma ihtimallerinin yüksek olabileceği söylenmiştir (Steward ve Ellison 2011). Zira İber yarımadası (İspanya ve Portekiz) *Dactylis* bitkilerinin kurtulabileceği çok sayıda buzul barınağına ev sahipliği yapmaktadır (Steward ve Ellison 2011). İngiltere'de dioploid subsp. *izcoi*'den Conrad kültür çeşidi ıslah edilmiştir (Borrill 1977).

## ***Woronowii***

*Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* (Ovcz.) Stebbins ve Zohary (Syn. *Dactylis woronowii* Ovcz.). Bu ekotip (morfortip) kurakçıl Akdeniz dağ steplerinde, İran ve Türkmenistan'ın ormanlık steplerinde habitat bulmuştur (Stebbins ve Zohary 1959). Bu alt tür, İran'ın Elburz dağlarında, kireççe zengin topraklarda yetişen dikenli çalı formlarının açık alanlarında tespit edilmiştir (Borrill ve Carroll 1969). Aynı zamanda Ermenistan'da da simpatrik formlarına rastlanmıştır (Doroszewska 1963).

### ***Sinensis***

*Dactylis glomerata* subsp. *sinensis* Camus'a, Çin'in merkezinde yer alan Sichuan, Hubei, Guizhou, Xinjiang ve Yunnan bölgelerinde, 100-3800 m arası yükseltilerde rastlanmıştır. Bu alanların serin-ılıman ormanlarla kaplı olduğu aktarılmıştır (Stewart ve Ellison 2015). Lumaret 1988'e göre alt tür subsp. *himaleyensis* ile ilişkili olabilir. Fakat Nükleer DNA ITS sekans karşılaştırmaları sonucuna göre diploid subsp. *sinensis*, kendisine komşu olan diploid subsp. *himaleyensis*'den daha çok Avrupa kökenli diploid *aschersoniana*'ya daha yakın bulunmuştur. Bu durum; taksonun kökenini muhtemelen Çin'e en yakın olan Kafkasya'dan, bir şekilde *aschersoniana*'dan almış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Stewart ve Ellison 2015).

### ***Altaica***

*Dactylis glomerata* subsp. *altaica* (Bess.) Domin (Syn. *Dactylis altaica* Bess.) Kazakistan'ın Alatu dağlarında tanımlanmıştır (Mizianty 1990). Kazakistan ve Azerbaycan bölgelerinde toplanan *Dactylis* materyalleri çeşit geliştirmek üzere Avustralya'ya götürülmüştür (Auricht ve ark. 2010).

### ***Parthiana***

*Dactylis glomerata* subsp. *parthiana* Parker ve Borrill. Bu alt türe ait en iyi bilinen yayılma alanı İran'ın Elburz dağlarının yaklaşık 1600 m rakımlı kuzey yamaçları olup, bölgenin nemli ve meşe ağaçları ile kaplı olduğu bildirilmiştir (Borrill ve Carroll 1969). Daha düşük rakımlarda, habitatlarının *woronowii* ile kesiştiği ve ikisinin oluşturduğu hibrit bitkiler gözlemlenmiştir (Borrill ve Carroll 1969). İki alt türe ait bitkiler eşleştirilmiş, oluşan hibritlerde fertilité azalması gözlemlenmemiştir (Parker ve Borrill 1968). Kesişen habitatlarda toplanan hibritlerin enzim bantları diğer örneklerden oldukça farklı çıkmıştır (Lumaret 1988). Her iki alt türün fenolik kimyaları uyuşmaktadır (Ardouin ve ark. 1985).

### ***Reichenbachii***

*Dactylis glomerata* subsp. *reichenbachii* (Hausm. Ex Dala Torre ve Sarnth.) Stebbins ve Zohary (Syn. *Dactylis glomerata* L. var. *reichenbachii* Hausm. Ex Dalla Torre and Sarnth.  $\equiv$  *Dactylis reichenbachii* (Hausm. Ex Dada Torre and Sarnth.) Meusel sod.). Bu alt tür Avrupa Alpin meralarının güney yüzlerinde ve yüksekliği 700-1000 m arasında değişen,

İsviçre, İtalya, Fransa Massif Central platolarında kayıt altına alınmıştır. Dolomitçe zengin topraklarda yetişmesi önemli bir adaptasyon olarak belirtilmiştir. Taksona ait diploid ve tetrapoliploid popülasyonlar belirlenmiştir (Speranza and Cristofolini 1987, Gauthier ve ark. 1999). Stebbins ve Zohary (1959)'e göre bu alt tür *woronowii* ve *aschersoniana* alt türlerine benzemektedir. Flavonoid içeriği *aschersoniana* ve *lusitanica* arası bir özellik (Fiasson ve ark. 1987), izoenzim elektroforetik bantları ise *aschersoniana* ve *himalayensis* arası bir durum sergilemiştir (Lumaret 1988). Fransa Alp'lerinde toplanan tetrapoliploid *reichenbachii* ve *glomerata* popülasyonları arasında, izoenzim bant özelliklerine göre, gen akışı olduğu belirlenmiştir (Gauthier ve ark. 1999).

### ***Hyrcana***

*Dactylis glomerata* subsp. *hyrcana* Tselev., Taliş (Azerbaycan, İran) ovasında yaprak dökken ağaç topluluklarının açık alanlarında endemik bir alt tür olarak tanımlanmıştır. Morfolojik yapı olarak belirgin bir tüylülüğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bulunduğu ekosistemin subsp. *woronowii*'nin devamı olduğu düşünülmektedir (Tsvelev 1983). *Dactylis Hyrcana*'nın diploid olduğu, kromozomlarının 1.5–3.5 µm arasında, büyük metasentrik ve submetasentrik ile küçük telosentrik kromozom gruplarından oluştuğu belirtilmiştir (Weiss-Schneeweiss ve Schneeweiss 2003).

### ***Mairei***

*Dactylis glomerata* subsp. *mairei* Stebbins ve Zohary. Bir Akdeniz ekotipi olan bu alt tür, Kerrata Gorge (Cezayir) dağların kıyıya bakmayan tarafında kireç taşı oluşumlu kayaların gölgelerinde yetişmektedir. Buralar yıllık yağışın 1100-2000 mm olduğu bol yağışlı yerlerdir (Stebbins ve Zohary 1959). Aynı zamanda Cezayir'de orman ekosistemlerinde mesofitik habitatlarda da rastlanmıştır (Amirouche ve Missset 2007). Kuzey Afrika meralarında, son buzul çağı sonrası havaların ısınması ile yaşam alanlarının daraldığı düşünülmektedir (Borrill ve Lindner 1971). İzoenzim analizi (Lumaret 1988), fenolik bileşik analizi (Ardouin ve ark. 1985), bu taksonun diploid *castellata*, *santai*, *smithii* ve *woronowii* ile akrabalığının olduğunu göstermektedir.

### ***Santai***

*Dactylis glomerata* subsp. *santai* (Stebbins ve Zohary). Fas ve Cezayir'i de kapsayan Akdenize paralel uzanan Tel Al sıradağlarında 150-1500 m arası yükseltilerde, rutubetli, yarı

rutubetli bir iklimde yetişmektedir. Aynı coğrafyada gözlemlenen *mairei* ve *santai* iki farklı morfolojik tip göstermişlerdir (Amirouche ve Misset 2007). Fas'ta toplanan örneklerin morfolojik olarak diploid subsp. *ibizensis*'e benzedikleri belirtilmiştir (Mousset 2000).

### ***Smithii***

*Dactylis glomerata* subsp. *smithii* (Syn. *Dactylis smithii* Link.). Atlas Okyanusu adaları, Kanarya Adaları ve Yeşil Burun Adaları (Cape Verde) bu alt türün endemik yetiştiği yerler olarak belirlenmiştir. Kanarya Adaları'nda 100 ila 700 m arası rakımlarda yamaçların rutubetli taraflarında, Yeşil Burun Adaları'nda ise 1200 m yükseltilerde toplanmıştır. Bu bitkilerin saplarının çok sayıda nod (düğüm) taşımaları ve kardeşleşme durumları ayırt edici bir özellik olarak saptanmıştır (Stebbins ve Zohary 1959, Ardouin ve ark. 1985). İzoenzim özellikleri karşılaştırıldığında, diploid *mairei*, *santai*, *castellata* alt türleri ile aynı grupta yer almaktadır (Lumaret 1988). Morfolojik ve fenolojik özellikler bakımından subsp. *smithii* diğer taksonlardan belirgin şekilde ayrılmaktadır (Ardouin ve ark. 1985). Subtropikal bir iklimde yetiştiğinden soğuklanma (vernalizasyon) ihtiyacının az olduğu bildirilmiştir (Parker ve Borrill 1968).

### ***Metlesicsii***

*Dactylis metlesicsii* Schoenfelder ve D. Ludwig. Kanarya Adalarında *smithii*'den daha yüksek lokalitelerde görülmüş, muhtemelen *smithii*'nin farklı bir formu olabileceği söylenmiştir Fenolik içerik karşılaştırmaları bu savı destekler nitelikte bulgular sunmuştur (Jay ve Lumaret 1995, Stewart ve Ellison 2011).

### ***Juncinella***

*Dactylis glomerata* subsp. *juncinella* (Bory) Boiss. İspanya'nın Sierra Nevada Alpin ve Subalpin otlaklarında, 2200-2900 m yükseltilerde, otlakların mikalı toprak kısımlarında kayıt altına alınmıştır. Daha düşük yükseltilerde etrafında tetrapoliploid *hispanica* popülasyonlarına rastlanmıştır (Stebbins ve Zohary 1959). Fenolik kimyası diploid *lusitanica* ve *ibizensis* ile benzerlik göstermektedir (Ardouin ve ark. 1985). Türler arası hibritleme sonrası yapılan sitolojik çalışmalar ise diploid *juncinella*, *smithii* ve *ibizensis* arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir (Hu ve Timothy 1971).

## ***İbizensis***

*Dactylis glomerata* subsp. *nestorii* Rossello ve L. Sáez (Syn. *Dactylis ibizensis* Gandoger  $\equiv$  subsp. *ibizensis* (Gandoger) Stebbins & Zohary). Castro ve ark. (2007) tarafından tekrar *nestorii* olarak adlandırılmasına rağmen bütün literatürlerde *ibizensis* olarak geçmektedir. Balear Adaları'na (İspanya) özgü bir alt tür olarak belirtilmiş, aynı bölgede tetrapoliploid formlarına da rastlanmıştır (Castro ve ark. (2007)

## ***Judaica***

*Dactylis glomerata* subsp. *judaica* Stebbins ve Zohary. İsrail'in kurak tepelik alanlarında görülen bu takson, yaz aylarını dormant geçirmektedir. Lübnan ve Suriye'de benzer koşullarda yetişen *libanotica* alt türü tanımlanmıştır. Muhtemelen bu iki ekotipin aynı taksonomik statüye sahip oldukları belirtilmiş, fakat coğrafik referans anlamında *judaica* adlandırması tercih edilmiştir (Stebbins ve Zohary 1959, Apirion ve Zohary 1961). Moleküler veriler, ılıman subsp. *himalayensis*'den köken aldığını göstermektedir (Steward ve Ellison 2015). Subsp. *judaica* karışık bir fenolik içeriğe sahiptir, incelenen popülasyonlara ait bazı bitkiler ılıman iklim koşullarına özgü fenolik bileşik özellikleri göstermiştir (Ardouin ve ark. 1985). Son buzul çağı sonrası havaların hızlı ısınması sonucu, ılıman iklim kuşağındaki bazı coğrafyalar kurak bir akdeniz iklimi hâkimiyetine girmişlerdir. Bu fenolik heterojenite ılıman iklim, morfolojik farklılıklar ise Akdeniz ikliminin bitki türleri üzerindeki etkilerine bağlanmıştır (Lumaret 1986, 1988, Borrill 1977).

### **2. 3. 2. Tetrapoliploid *Dactylis* taksonların kökeni ve yayılış alanları**

Tetrapoliploid olarak tanımlanan *Dactylis* cinsi üyeleri, çok sayıda farklı habitatlara yayılmıştır. Habitatları dikkate alındığında tetrapoliploid *Dactylis* formları temelde 3 farklı alt türe dâhil edilmiştir. Bu alt türlerden subsp. *glomerata* orta derecede ılıman, subsp. *hispanica* Akdeniz ve subsp. *marina* ise subtropikal iklim ile ilişkilendirilmiştir. Fakat coğrafik ve iklim farklılıklarının kesin sınırlarının olmadığı belirtilmiştir (Borrill 1977, 1978, 1991). Ekolojik çeşitlilik ve tetrapoliploid bitkiler arası doğal hibridizasyon durumları, *Dactylis* formları arasında görülen çeşitliliğin sebebi olarak vurgulanmıştır (Stebbins 1971). Tetrapoliploid bitkilerin kökenine ilişkin hipotezlerden biri; tetrapoliploidlerin farklı diploidler arası hibridizasyon sonrası poliploidizasyon süreçleri sonucu oluşmuş olabileceğidir (Stebbins 1971). Diğer hipotez; diploid ve tetrapoliploid bitkilerin çoğu zaman morfolojik olarak ayırt

edilememeleri, dolayısıyla tetrapoliploidlerin direk diploidlerden indirgenmemiş gametlerin katlanması sonucu kökenlenmiş olabilecekleridir (Lumaret ve Barrientos 1990, Lumaret ve ark.1992). Bazı sitolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda bu savı destekler niteliktedir (Müntzing 1937, Myers 1940, 1948, Borrill ve Lindner 1971, Borrill 1977).

*Dactylis* cinsinde ortak habitatlarda yaşayan diploid ve tetrapoliploidlerin çoğu zaman morfolojik olarak ayırt edilemedikleri ancak kromozom sayımları sonucu ayırt edilebildikleri rapor edilmiştir (Mizianty 1990). Bu morfolojik benzerlikler dikkate alınarak tetrapoliploidlerin otopoliploidizasyon ile diploidlerden oluştuğu varsayılmıştır. Ancak bu benzerlik otopoliploidiye kanıt mı yoksa her iki sitotip aynı habitatları mı paylaşmaktadır, sorusunu da beraberinde getirmiştir (Mizianty 1986, 1990). Çalışmalar, diploid ve tetrapoliploid popülasyonların habitat olarak ilişkide olduğu yerlerde, diploidlerden tetrapoliploidlere doğru gen geçişi olduğunu, fakat tersine bir geçişin olmadığını göstermektedir (Mizianty 1986, 1990). Aynı zamanda bu bölgelerde tespit edilen triploid bitkilerin de bu gen akışında rol aldıkları belirtilmiştir (Müntzing 1937, Zohary ve Nur 1959, Bretagnolle ve Lumaret 1995). Bununla birlikte tetrapoliploidler arası gen akışı yüksek seviyede iken bu oranın diploidler ve farklı poliploidi seviyeleri arasında daha az olduğu vurgulanmıştır (Müntzing 1937, Zohary ve Nur 1959). Ancak ortak habitatlarda 2x bitkileri indirgenmemiş gametler oluştursalar da 3x ve 4x poliploidi seviyelerinin oluşması için çift yönlü bir eşleşme olması gerektiğinden bahs edilmiştir (Bretagnolle ve Lumaret 1995).

Buzul çağı sonrası tetrapoliploidlerin iyi kolonize oldukları ve kuzeye doğru geniş bir yayılım gösterdikleri aktarılmıştır (Stewart ve Ellison 2011, 2014). Diploidler daha çok sınırlanmış ve buzul dönemlerde türlerin kurtulabileceği, buzul barınaklarının olduğu yerlerde görülmüşlerdir. Sadece diploid *aschersoniana* bireyleri Kafkas buzul alanlarından kuzeye doğru Avrupa'nın birçok yerine yayılmış ve tetrapoliploidler ile simpatrik yaşamaktadır. Bu durum tetrapoliploidlerin çok sayıda farklı diploidler arası indirgenmemiş (2n) gametlerin birleşmesi sonucu oluştuğu ihtimalini kuvvetlendirmektedir (Stebbins ve Zohary 1959, Lindner ve ark. 2004).

Poliploidizasyona bağlı olarak, sürme güçleri (hybrid vigor) yüksek olan tetrapoliploidler geniş bir yayılma alanı bulmuştur (Stebbins 1971). Tetrapoliploidlerin erken yaprak çıkışı, bitki gelişiminin başlangıcında fotosentez yaparak bitkiyi soğuğa karşı korurken, havaların ısınması sonucu aynı zamanda sıcaklığa ve kuraklığa karşı da korur. Bununla beraber diploidlerin çimlenmesi daha geç olmakta ve birçok yerde yaz sıcaklarından



korunmak için ağaç veya kaya gölgelerinde görülmektedir (Borrill ve Lindner 1971). Simpatrik *lusitanica* (2x, 4x) bitkilerinin anatomik, fenolojik ve genetik olarak bazı farklılıklar gösterdikleri, poliploidizasyon ve doğal seleksiyon sonucu farklı *Dactylis* poliploidi durumlarının olduğu gözlemlenmiştir (Bretagnolle ve Lumaret 1995).

Stewart ve Ellison (2011, 2014)'ın moleküler çalışmaları, cinsin evriminin buzul dönemine kadar gidebileceğini göstermiştir. Sonuçlara göre, değişen iklimsel ve çevresel koşullara uyum amacı ile cinsin yayılma yönü zamanla değişmiş ve hayatta kalabilme yeteneğini arttırmak için poliploidi seviyesini yükseltmiştir. Son buzul çağı sonrası havaların hızlı ısınması ile inter-hibrid tetrapoliploidler kuzeye doğru geniş alanlara yayılmışlardır. Geriye sınırlı alanda yayılış gösteren diploid ve yaygın ototetrapoliploidler kalmıştır. Kuraklaşmaya bağlı olarak Kuzey Afrika'da geriye kalan kurakçıl diploidler, tetrapoliploidler ve en az bir hekzapoliploid form günümüze ulaşmıştır. Bu çalışmalarda tetrapoliploidlerin farklı diploidlerin hibridizasyonu veya direk diploidlerin indirgenmemiş gametlerinin poliploidizasyonu sonucu oluşabilecekleri söylenmiştir.

Aşağıda tetrapoliploid olduğu varsayılan taksonların genel özellikleri, farklı kaynaklar değerlendirilerek kısaca değinilmiştir. Bu taksonlar en son Stewart ve Ellison (2011) derlemesinde geçen adlandırmalardır.

### ***Glomerata***

*Dactylis glomerata* subsp. *glomerata*. Ilıman iklim kuşağının hâkim olduğu orman bölgelerinde yaygın olan ve *Dactylis* cinsi içerisinde en çok rastlanılan taksondur. Bu formun diploid *aschersoniana* ve *woronowii* gibi farklı iki ekolojik alt türün hibridi olduğu düşünülmektedir. Bunu test etmek amacı ile *aschersoniana* ve *woronowii* arasında yapay melezleme çalışmaları yapılmıştır. Oluşan hibrid bitkilerin her iki atanın arası bir morfoloji gösterdiği ve subsp. *glomerata*'ya çok benzediği bildirilmiştir. Bu alt türün Avrupa'dan, Kafkasya coğrafyasına kadar yayılabilmesi için çok başarılı bir genetik yapıya sahip olması gerektiği, bu durumun ancak çok sayıda ve farklı ekotipin hibridizasyonu sonucu gerçekleşebileceği savunulmuştur. Alplerde görülen *glomerata* tipleri, birbirine benzeyen *aschersoniana* ve *woronowii*'nin doğal hibridizasyonları sonucu oluşmuş olabilir (Stebbins ve Zohary 1959, Stebbins 1971).

Domin (1943)'e göre *glomerata*'nın birincil yayılma alanı Avrupa'nın kuzeyi olsada, Fas ve Cezayir'in ılıman orman alanlarında da görülmektedir. Bu durumda büyük olasılıkla Kuzey Avrupa kökenli *glomerata*'nın diploid atalarının farklı olabileceği kanısına varılmıştır. Subsp. *glomerata* genellikle yazın aktif gelişme gösteren, *hispanica* ise dormant olarak bilinmektedir. Fakat Fransa'nın Akdeniz etkisindeki alanlarda *glomerata* formlarının dormant olduğu bildirilmiştir (Mizianty 1991 a, b, Stewart ve Ellison 2011).

### ***Slovenica***

*Dactylis glomerata* subsp. *slovenica* (Domin) Domin (Syn. *Dactylis slovenica* Domin.). Bu tetraploiploid form, Avrupanın merkez bölgelerinde, dağların 600-1300 m arası yükseltilerinde, genellikle kalkerli veya dolomitik topraklarda yetişmektedir (Mizianty 1997). Bu taksona atf edilen en belirgin özellik, bitki boyunun 1,5 m uzunluğa ulaşabilmesidir (Domin 1943). Bu durum *slovenica*'nın genetik geçmişinde diploid *aschersonina*'nın etkisinin olabileceğini göstermektedir. Zira iki taksonda uzun boylu, yaprak ayaları tüysüz veya az tüylü ve her ikisinde sıra dışı habitatlara uyum sağlamıştır (Mizianty ve Cenci 1995).

### ***Hispanica***

*Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* (Roth) Nyman (Syn. *Dactylis hispanica* Roth.). İber yarım adası (İspanya ve Portekiz), Akdeniz Flora bölgesine ait bir taksondur. Fakat Kafkasya coğrafyasında da tanımlanmıştır. Kısa boylu, sıkı ve az dallı salkım yapısı ve erken çiçeklenmesi, yazın dormant olması gibi tipik kurakçıl bitki karakterlerine sahiptir. Kurağa dayanıklı olmasının bitki ıslahı açısından önemli bir avantaj olduğu söylenmiştir (Speranza ve Cristofolini 1987). Domin (1943)'in belirttiğine göre *hispanica*'nın iç kavuzları loblu bir yapıya sahiptir. Bu özellik oldukça çeşitlilik göstermektedir. Kuzey bölgelerinde bu loblu yapının indirgendiği, *hispanica*'nın *glomerata*'nın bu kadar yağınlaşmasına ve verimli olmasına katkıda bulunabileceği söylenmiştir. Subsp. *hispanica*'nın en az iki formu tanımlanmıştır. Bunlardan İspanyanın güneyinde Korsika ve Sardinya formu, uç koşullara adapte olmuştur. Fransa'nın güneyinde bulunan form ise daha çok *glomerata*'ya benzemektedir (Lumaret 1986). Akdeniz tipi *hispanica*'ya ait çok sayıda çeşit ıslah edilmiştir. Bunlardan Uplands, Sundance, Berber, Kasba (Avustralya), Jana (İtalya), Medly (Fransa), Perouvia ve Chrysopigi (Yunanistan) örnek verilebilir. Akdeniz iklimi olan bölgelerde ıslah çalışmaları için potansiyel bir genetik kaynak olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Steward ve Ellison 2011).

İspanya Sierra Nevada bölgesinde toplanan *hispanica* popülasyonlarına ait bitkiler yaygın formdan farklı morfolojik özellikler göstermiştir. Özellikle kumca zengin topraklarda yetişen bitkiler, morfolojik olarak oldukça geniş ve farklı oranlarda bölünmüş çiçek yapısı, kısa çiçek sapı, kümelenmiş geniş başakçıklar, glumlar kısa, kılçıklı ve tabandaki internod uzunluğu ile dikkat çekmiştir (Borrill ve Lindner 1971).

### ***Marina***

*Dactylis glomerata* subsp. *hackelii* (Asch. and Graeb.) Cif. and Giacom. (Syn. *Dactylis marina* Borrill  $\equiv$  *Dactylis glomerata* L. subsp. *marina* (Borrill) Greuter  $\equiv$  *Dactylis smithii* Link subsp. *marina* (Borrill) Parker.). Genellikle dik kıyı kesimlerinde (falezlerde), lokalize olan bu bitki, bazı Atlantik adaları ile Akdeniz kıyılarında yer alan Galiçya (İspanya, Portekiz) bölgesinde kayıt edilmiştir (Borrill 1961b, Benson ve Borrill 1969, Lindner ve Garcia 1997). En belirgin özelliği, yaprak epidermisinin kabarcıklı (papillose) bir yapı göstermesidir. Bu morfolojik farklılığın kıyı coğrafik koşulları nedeniyle su kaybına karşılık bir uyum olduğu söylenmiştir. Fakat yaprak kenarları düz ve silisyum birikimi yoktur, bu yüzden lezzetli ve hazmolunabilirliğinin %2-6 arası olduğu belirlenmiştir. Bu özelliklerden dolayı ıslahçıların ilgisini çekmiş fakat herhangi bir çeşit kaydı yoktur (Van Dijk 1961, Tyler ve Borrill 1983). Bunun sebebi, muhtemelen geliştirilen çeşitlerin yeterince ot verimine sahip olmamaları olabilir (Steward ve Ellison 2011). Düz yaprak kenarları, papilalı epidermis ve kemiksi görünüşü nedeni ile diploid *smithii* ve *ibizensis* ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Borrill 1961b).

### ***Oceanica***

*Dactylis glomerata* subsp. *oceanica* G. Guignard. Bu taksona Fransa'nın kuzey batısında bulunan Atlantik kıyıları ve güney kıyılarında rastlanmıştır (Guignard 1985). Bu formun Avrupa'nın kuzey otlaklarında *marina*'nın devamı olabileceği söylenmiştir. Fakat Akdeniz kökenli *marina* formları daha çok *hispanica* alt türüne, *oceanica* ise daha çok *glomerata*'ya benzemektedir. *Oceanica*'ya benzer formlar İrlanda adasında da kayıt edilmiştir (Lumaret 1988).

### ***Hylodes***

*Dactylis glomerata* subsp. *hylodes* P.F. Parker. Bu alt tür Madeira adasında okyanusa bakmayan yamaçlarda, Kanarya Adaları ve Cape Verde adalarında ise kıyıya bakan

yamaçlarda görülmüştür. Morfolojik olarak (yayılcı, gövdeler odunsu, yapraklar kabarcıklı) diploid *smithii*'ye benzemektedir. Doğal melezlenme ve poliploidleşme durumlarının bu taksona geniş bir yayılma kabiliyeti kazandırdığı belirtilmektedir (Parker 1972). Steward ve Ellison (2011)'in çalışmasında, moleküler profili diploid *smithii* ve İspanya diploidleri ile benzerlik göstermiştir.

#### 2. 4. *Dactylis*'in Genetik Durumu

Morfolojik, biyokimyasal, sitolojik ve moleküler çalışmalar, *Dactylis* cinsinin net taksonomik ayrımlar gösterecek bir farklılaşma göstermediğini, bununla beraber popülasyonlar içi ve arası, incelenen parametreler açısından farklı düzeylerde varyasyonlar gösterdiğini teyit etmektedir (Mizianty 1990, 1991a,b, Tuna ve ark. 2004, Stewart ve Ellison 2011). Bu varyasyonların oluşmasında en önemli etkenlerin, poliploidi, çok büyük oranda yabancı tozlaşma ve taksonlar arası net genetik bariyerlerin olmaması gösterilmiştir. Bu sebeplerden dolayı cinsin adaptif bir yayılma yolu izlediği bu adaptif yayılma sürecinin büyük oranda iklimsel ve coğrafik değişimlerin etkisi altında olduğu belirtilmiştir (Mizianty 1990, 1991a, b, Stewart ve Ellison 2011).

Poliploidi, bitki hücrelerinin diploid kromozom sayısının katları kadar kromozom sayısına sahip olmaları şeklinde tanımlanmıştır. Domuz ayrığı cinsinin farklı poliploidi seviyelerinden oluştuğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, bu poliploidi seviyelerinin nasıl oluştuğu, genoma etkileri ve çevresel koşullarla ilişkisi anlaşılmaya çalışılmıştır. Poliploidi için en büyük itici gücün sıcaklığa bağlı olarak değişen iklimsel ve çevresel koşullar olduğu vurgulanmıştır (Stewart ve Ellison 2011). Çevresel değişimlere adaptasyon için bitkiler genom sayılarını yükseltme yoluna gitmişlerdir. Yapılan çalışmalar, tetrapoliploidlerin hayatta kalma güçlerinin yüksek olduğunu ve bu durumla ilişkili anatomik, fizyolojik ve genomik olarak diploidlerden farklı özellikler taşıdıklarını göstermiştir. Örneğin tetrapoliploid bitkilerin tohum çıkış gücü, vejetatif rekabet gücü diploidlerden daha yüksek bulunmuştur (Nur ve Zohary 1959, Maceira ve ark. 1992, 1993). Yine kolşisin ile diploidlerden elde edilen tetrapoliploidlerin fotosentez oranları ve düşük sıcaklıkta hayatta kalma oranları daha yüksek bulunmuştur (Eagles 1967, Borrill ve Lindner 1971, Eagles ve Othman 1978).

*Dactylis* cinsinin poliploidi geçmişi oldukça karmaşık bir durum sergilemektedir. Literatür taramalarında, taksonların oluşumunda, otopoliploidi, allopoliploidi ve segmental-

allopoliploidi gibi 3 farklı genetik kökenden bahsedilmektedir (Mizianty 1990). Kalıtımla ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, tetrapoliploid *Dactylis*'in kökeninin çoğunlukla otopoliploidi olduğu vurgulanmıştır (Mizianty 1986, 1990). Bununla beraber genomların tamamen farklılaşmadıkları ve aralarında gen alış verişi yaptıkları da belirtilmiştir (Stewart ve Ellison 2011). Bazı araştırmacılar başlarda, *Dactylis*'in, diploid subsp. *aschersoniana* genomunun katlanması sonucu oluşmuş bir otopoliploid olduğunu vurgulamışlardır. Fakat daha sonra, bu iki poliploidi seviyesi arası yakın bir genetik ilişki olsa da doğrudan bir otopoliploidizasyondan bahsedilemeyeceğini savunmuşlardır (Müntzing 1936, 1937, Myers 1947, Stebbins 1950).

Stebbins (1971)'e göre tetrapoliploid subsp. *glomerata*, diploid subsp. *aschersoniana* ve subsp. *woronowii*'den kökenlenmiş bir allopoliploiddir. Ancak, Hanson ve Carnahan (1956) 'a göre ise tetrapoliploid subsp. *glomerata*'nın kökeni, otopoliploidi ve allopoliploidi arası bir durum sergileyen bir segmental allopoliploidi olabilir.

Simpatrik diploid ve tetrapoliplid bitkiler üzerine yapılan sitolojik çalışmalar, bu iki sitotipin, kromozomal özelliklerinin birbirinden bazı farklılıklar sergilediğini göstermiştir. Bu durumda tam olarak bir otopoliploidizasyondan söz etmek mümkün değildir. Örneğin subsp. *izcoi* tetrapoliploid sitotipleri diploid sitotiplerinden oransal olarak daha fazla sayıda submetasentrik kromozoma sahip bulunmuştur. Yine aynı çalışmada diploid bitkinin bir çift homolog kromozomuna denk gelen tetrapoliploid homoloji gurubu kromozomları morfolojik farklılıklar göstermiştir. Bu durumda, tetrapoliploidler otopoliploidi sonucu oluşmuşlarsa bile kromozomal farklılıklar göstermektedir (Lindner ve Garcia 1999).

*Dactylis glomerata* örneklerinde mayozun diakinez evresinde kromozomların çoğunlukla bivalent eşleşmeler gerçekleştirdiği, fakat quadrivalent eşleşmelerin de yaygın olduğu gösterilmiştir (Myers ve Hill 1943, McCollum 1957, Jones 1962, Guignard 1987, Tosun ve ark. 1999, Amirouche ve Missset 2007). Diploid *Dactylis* örneklerinde ise yüksek oranda bivalent eşleşmeler gözlemlenmiştir (Müntzing 1937, Amrrouche ve Missset 2007). Diploid ve tetrapoliploid *Dactylis* kromozomları kendi aralarında büyük oranda benzerlikler ve kısmen farklılıklar göstermektedir (Guignard 1987, Wetschnig 1991, Büyükbaşar 2010, Falistico ve Torricelli 2016). Özellikle tetrapoliploid taksonlara ait popülasyonlarda aneupoliploid bitkilere rastlanmış, kromozom sayı farklılıklarının farklı eşleşme frekanslarını artıracığından bahsedilmiştir. Yine tetrapoliploid *Dactylis* örneklerinde mayoz bölünmenin, metafaz I, anafaz I ve telofaz I safhalarında, kromozomların kutuplara çekilmemesi, kutuplara

çekilmede gecikme, tetrat oluşumunda anormallikler belirlenmiştir (Müntzing 1933, Curran 1961, Lentz ve ark. 1983, Tosun ve ark. 1999). Bazı örneklerde anafaz I'de köprü ve fragmentli yapılar oluştuğu, kutuplara çekilmede geciken kromozom veya fragmentlerin kromatit tipte olduğu belirtilmiştir. Bu bulgulara dayanılarak tetrapoliploid *Dactylis*'lerin mayoz davranışları bakımından istikrarlı genom özellikleri taşımadıkları söylenmiştir. Domuz ayrığında çeşitli oranlarda quadrivalent eşleşmeler belirlenmiş, hücre başına düşen quadrivalent sayısının çalışılan materyallere göre değiştiği belirtilmiştir. Kültür çeşitleri, yabancı popülasyonlar hatta popülasyon içinde bile bu oranın değiştiği söylenmiştir. Tetrapoliploid örneklerde yapılan çalışmalarda bu oran hücre başına ortalama 2.54-4.36 aralığında sayılmıştır. Çalışmalar derlendiğinde en yüksek eşleşmelerin bivalent arkasından quadrivalent ve çok az sayıda multivalent eşleşmelerin olduğu görülmüştür. *Dactylis* örneklerinde mayoz I evresinde quadrivalent eşleşmelerin sıklıkla görüldüğü, bu yüzden de ototetrapoliploid olabilecekleri söylenmiştir (Müntzing 1933, Curran 1961, Lentz ve ark. 1983, Tosun ve ark. 1999).

Ototetrapoliploid bir örnekte 4 homolog kromozom normalde bir quadrivalent oluşturmalı, ancak 2 tane bivalent yapı oluşmaktadır. Bivalent eşleşmelerin fazla oluşu, bazı araştırmacılarca, homolog olan 4 kromozom seti quadrivalent eşleşme yaparlar ancak kısmen benzer olanlar bivalent eşleşmeler oluştururlar şeklinde yorumlanmıştır. Bu olgu bazı araştırmacılar tarafından segmental allopoliploidi olarak adlandırılmıştır (Stebbins 1950, Schulz-Schaeffer ve ark. 1963, Soltis ve ark. 2004).

Stebbins (1950)'e göre segmental allopoliploidi, aynı türe ait farklılaşmış genomların birleşmesi sonucu oluşmuş ve ototetrapoliploid (geniş anlamda bir otopoliploidi) kategori altında sınıflandırılmalıdır. Grant (1981) ise bu durumun allopoliploidi (gerçek allopoliploidi), genetik olarak farklı genomların hibridizasyonundan oluşmuş, kategorisi altında değerlendirilmesi gerektiğini savunmuştur. Segmental allopoliploidler hem homolog hem de homeolog kromozomal segmentler taşımaktadır. Bu yüzden mayoz sırasında bivalent ve multivalent kromozom eşleşmeleri göstermektedir. Dolayısı ile disomik ve polisomik kalıtım karışık olarak seyretmektedir. Genom durumu oturmuş bir segmental allopoliploid türün, genomuna ait bazı kromozomlar çok özel farklılıklar yani allopoliploid özellikler gösterirken, diğer yandan belirgin farklılıklar göstermeyen kromozomların ise otopoliploid özellikler gösterdikleri belirtilmiştir (Sybenga 1996, Wendel 2000, Soltis ve ark. 2004, 2007).

Basit olarak otopoliploidi: Bir bitkinin genomunun iki katına çıkması veya genetik olarak benzer iki diploidin indirgenmemiş gametin (diploid gamet) birleşmesi ile oluşmaktadır. Fakat segmental allopoliploidi, aynı türe ait genetik çeşitlilik (varyabilite) gösteren guruplara (birey veya popülasyonlara ait genomlar, allel genler veya kromozomal segmentler düzeyinde bir birinden önemli derecede farklılıklar gösteren) veya popülasyonlara ait bireylerin eşleşmeleri sonucu meydana gelmektedir. Segmental allopoliploidi durumunun stabil olmayıp, zamanla farklı otopoliploidi veya gerçek allopoliploidi düzeylerine geçebileceği belirtilmiştir (Stebbins 1950, 1985, Soltis ve Soltis 1993).

Sitogenetik bulgular, örneğin multivalent eşleşmeler, kiazma frekans farklılıkları (mayotik krosing over) ototetrapoliploidi durumunu göstermektedir. Fakat bazı ototetrapoliplerde bivalentler tetrasomik kalıtım göstermektedir. 4 homolog kromozom arasındaki eşleşmeler rastgele gerçekleşmekte ve ilk oluşumlar kalıtılabilir. Her ne kadar polisomik kalıtım otopoliploidlere özgü ve disomik kalıtım allotetrapoliploidlere özgü olsada, sadece genetik bilgilere dayanılarak bu genellemelerin yanıtıcı olabileceği bildirilmiştir (Soltis ve Soltis 2000, Soltis ve ark. 2004, 2015). Örneğin, segmental allopoliploid türlerin kalıtımında, bazı lokuslar polisomik bazıları ise disomik kalıtım gösterebilirler. Bu durumun otoallopoliploid türlerde daha karmaşık bir durum sergileyebileceği belirtilmiştir Bazı durumlarda ise multivalent kalıtımın bivalent kalıttan üstün olabileceği veya öncelikli gerçekleşebileceği rapor edilmiştir (Grant 1981, Soltis ve Soltis 2000, Soltis ve ark. 2015).

Lentz ve ark. (1983)'a göre bivalent eşleşmelerin yaygın olmasının nedenini farklı genomların tercihli eşleşme yapabilecekleri şeklinde yorumlamıştır. Sybenga (1984)'a göre ise tercihli eşleşmeden ziyade zigoten evresinde karşılıklı yakın kromozom kolları eşleşmekte ve bivalentler bu yüzden oluşmaktadır. Bununla birlikte quadrivalent yapıların kırılabilmesi ve bivalent eşleşmeler oluşturabilecekleri de söylenmiştir (Jenkins 1983).

Farklı araştırmalarda tetrapoliploid *Dactylis glomerata* 'nın çekirdek DNA içeriği 6.4 ile 12.4 arasında bulunmuştur (Creber ve ark. 1994, Reeves ve ark. 1998, Vilhar ve ark. 2002). Adaptif yayılmaya bağlı olarak, *D. glomerata* popülasyonlarında yükseklik ile çekirdek DNA hacmi arasında negatif bir ilişki bahsedilmiştir (Reeves ve ark. 1998). Başka bir çalışmada ise farklı yükseltilerde toplanan popülasyonların 2C-DNA içeriğinin % 2.1'lik bir varyasyon gösterdiği ve genom hacmi ile yükselti arasında bir ilişki olmadığı belirtilmiştir (Vilhar ve ark. 2002). İber yarımadasının güneyi, Kuzey Afrika ve Kanarya

adalarından elde edilen diploid *Dactylis* taksonlarına ait 2C-DNA miktarı ortalaması, İber yarımadası kuzeyi, Avrupa, Orta Doğu ve Asyanın merkezinden elde edilen diploid *Dactylis* 2C-DNA miktarı ortalamasından % 15 daha az bulunmuştur (Tuna ve ark. 2007). Geniş bir diploid *Dactylis* koleksiyonun çalışıldığı başka bir çalışmada, diploid taksonlar arasında 2C-DNA içeriği bakımından, en küçüğü ile en büyüğü arasında 1.47 pg'lık büyük bir fark olduğu ve bu farkın süreklilik gösterdiği belirtilmiştir (Büyükbaşar 2010). Flow sitometri sonuçlarına göre diploid ve tetrapoliploid taksonlar içi ve arasında belirli bir oranda 2C-DNA içeriği polimorfiziminden bahs edilmiş, fakat her iki poliploidi seviyesinde de türleşmenin tamamlanmadığı ve iki genotip arasında yakın bir akrabalık olduğu vurgulanmıştır (Tuna ve ark. 2004, 2007, Büyükbaşar 2010).

*Dactylis* üzerine yapılan moleküler belirteç çalışmaları, tetrapoliploidler arası üreme engellerinin olmaması nedeniyle, genotiplerin diploid genotiplerden daha yüksek polimorfik lokusa, lokus başına yüksek allelle ve heterozigositeye sahip olduklarını göstermektedir. Bu varyasyonlar tetrapoliploid *Dactylis* kültür çeşitlerinde de belirlenmiştir (Kölliker ve ark. 1999, Xie ve ark. 2010 a, b, 2012 ). Bu çalışmaların hepsinde, *Dactylis* örnekleri aksesyon bazında ve coğrafik bölge bazında moleküler genetik çeşitlilik göstermişlerdir. Çalışmalarda genellikle popülasyon içi genetik çeşitlilik popülasyonlar arasından fazla bulunmuştur (Bushman ve ark. 2011, Hirata ve ark. 2011, Xie ve ark. 2012, Yan ve ark. 2016). Bu çalışmalar daha çok poliploidizasyon ve cins içi gen akışına bağlı olarak moleküler genetik temelde cins içi genetik varyasyonun yüksek olduğunu göstermektedir. Moleküler belirteçlere dayanılarak az sayıda filogenetik çalışmalar yapılmıştır. Örneğin farklı ülkelerden toplanan 16 *Dactylis* aksesyonu (diploid ve tetrapoliploid), SSR moleküler belirteçleri ile taranmış, tetrapoliploidler aynı kümede, diploidler ise iki farklı kümede toplanmıştır. Diploid ve tetrapoliploid guruplar arası düşük bulunan genetik farklılık (% 2.62), bu iki poliploidi seviyesi arası akrabalığın oldukça yüksek olduğunu göstermiştir (Xie ve ark.2010a). Benzer çalışmalarda popülasyonların toplandığı coğrafya ve iklimlere göre gurup ve alt gurup özellikleri gösterdikleri bulunmuştur (Xie ve ark. 2012, Yan ve ark. 2016, Sun ve ark. 2017). Cins için bazı SSR markırları (Bushman ve ark. 2011, Hirata ve ark. 2011), genetik linakge (bağlılık) haritaları (Song ve ark. 2011, Xie ve ark. 2012), başaklanma zamanına özgü QTL analizi (Xie ve ark 2012), yaz dormansisine sahip olan ve olmayan çeşitlere ait QTL analizi (Kallida ve ark. 2016) ile ilgili yayınlar yapılmıştır.



Nükleer ITS sekans yapılarındaki karşılaştırmalara dayanılarak yapılan bir çalışmada 18 diploid *Dactylis* üyesi 3 farklı guruba ayrılmıştır. Sekanslardaki mutasyonlar dikkate alınarak, çalışılan tetrapoliploidlerden bazılarının farklı diploidlerin hibridleri olabilecekleri, bazılarının ise kendilerine yakın diploidlerin genomlarının katlanması ile oluşabilecekleri belirtilmiştir (Stewart ve Ellison 2015).

## 2. 5. *Dactylis* Kaynak Taramaları

### 2. 5. 1. Sitogenetik çalışmalar

Davies (1927) *Dactylis glomeata* subsp. *glomerata*'nın kromozom sayısını,  $2n=4x=28$  olarak saymıştır. Levan (1930), Kattermann (1930) ise *Dactylis aschersoniana* Graebn. ve *D. glomerata* subsp. *aschersoniana* (Graebn) Thell.'in kromozom sayılarını,  $2n=14$  olarak rapor etmişlerdir. Diploid ve tetrapoliploid bitkilerin bir arada buldukları ve aralarında gen akışı olduğu belirtilmiştir. Örneğin doğadan toplanan *D. aschersoniana* (diploid) ve *D. glomerata* (tetrapoliploid) hibritlerine ait bitkilerden bazılarının kromozom sayıları triploid ( $2n=3x=21$ ) bulunmuştur (Levan 1930).

Müntzing (1933)'e ait çalışmada, *Dactylis glomerata* ve bir kültür çeşidine ait bitkilerde mayoz bölünme incelenmiştir. Tetrapoliploid bitkilerde, mayoz bölünme sırasında quadrivalent eşleşmelere sıklıkla rastlandığı, kromozom sayılarında indirgemeler olduğu belirlenmiştir. Örneğin incelenen 19 polar durumlu mayoz metafaz plağında, hücre başına düşen quadrivalent eşleşme sayısı 3.5 bulunmuştur. 25 hücrede ise quadrivalent sayısı ortalaması hücre başına 3.0 bulunmuştur. Genel olarak kromozomlarda bivalent eşleşmelerin daha fazla olduğu, univalent ve trivalent eşleşmelerin ise çok az oranlarda olduğu rapor edilmiştir. Kromozomların polar durumlu olduğu hücrelerde zikzag şekilli quadrivalent sayısı, kromozomları kenar durumlu olanlara göre daha fazla bulunmuştur. İncelenen popülasyon içinde kromozom sayısı 27 ile 31 arası aneupoliploid bitkiler gözlemlenmiştir. Sonuç olarak *Dactylis glomerata* bitkisinin sitolojik olarak istikrarlı olmadığı sonucuna varılmıştır. 27 kromozomlu bitkide bir kromozomun eksikliği, univalent, trivalent ve quadrivalent frekansını artırmıştır. 29 kromozomlu *D. glomerata* bitkisinde, gametlerin yarısına yakını fazla sayıda kromozoma sahip çıkmıştır. 14 ve 15 kromozomlu gametlerin oranı yaklaşık olarak 65:35 oranında bulunmuştur. Başka bir bitkide fazla sayıdaki kromozomun büyük oranda elimine olduğu görülmüştür. Bu durumun oluşması, mayoz bölünme sırasında kromozomlarda

görülen multivalent (genellikle univalent olması, nadiren trivalent veya quadrivalent) eşleşmelere bağlanmıştır.

Diploid (*D. aschersoniana*) ve tetrapoliploid (*D. glomerata*) *Dactylis* popülasyonları, poliploidi durumları, birbirleri ile olan ilişkileri ve döllenme biyolojileri üzerine geniş çaplı bir araştırma yapılmıştır. 4x ve 2x formlarının bazı bölgelerde simpatrik olup, kromozomlarının etkileşimi sonucu doğal triploidlerin oluştuğu, kromozomal ve morfoljik benzerliklerden faydalanılarak, *glomerata* ve *aschersoniana* genomlarının homolog özellikler taşıdıkları sonucuna varılmıştır. Araştırmacı çalışmasında *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* ait popülasyonlarda 2n=27, 28, 30 kromozumlu bitkiler gözlemlemiş ve *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* popülasyonlarının genel olarak %10 oranında aneupoliploidi gösterdiklerini rapor etmiştir. Ayrıca bu bitkilerin fertilitelerinin az olduğunu da eklemiştir. Mayoz bölünmede, incelenen bazı bitkilerde, hücre başına ortalama 4.58 gibi yüksek bir oranda trivalent eşleşme durumu belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanılarak tetrapoliploid *Dactylis* formlarının, direk diploid formlardan, indirgenmemiş gametlerin katlanması sonucu oluştukları aktarılmıştır. Tetrapoliploid bitkilerdeki morfoljik farklılıkların sebebi ise poliploidiye (kromozomal farklılıklara) bağlanmıştır. Aynı çalışmada 3 adet diploid subsp. *aschersoniana* bitkisi üzerinde mayoz bölünmeye ilişkin aşağıdaki farklılıklar saptanmıştır. İncelenen bitkilerden birtanesi %88.7 oranında fertil polen oluşturmuştur. Aynı bitkinin mayoz metafaz aşamasında 7 kromozumlu bivalent eşleşmeler yaptığı ve anafazda I'de kromozomların kutuplara 7-7 şeklinde düzenli ayrıldığı görülmüştür. İncelenen hücrelerden 71 tanesi 7 bivalent, 2 tanesi 6 bivalent ve 2 tanesi univalent eşleşme göstermiştir. Aneupoliploidi gözlemlenen ikinci bitkide ise polen fertilitesi yüksek bulunmuş, mayoz bölünmenin düzenli olduğu söylenmiştir. Üçüncü bitkide polen fertilitesi ortalama %47 oranında bulunmuştur. Ek olarak homolog olmayan kromozomlar arası bir adet translokasyona rastlanmıştır (heterozigot translokasyon). Bu sonuca kiazma noktalarının frekans farklılıklarına bakılarak ulaşılmıştır. İlk iki bitkinin kiazma frekansları birbirine yakın, üçüncü bitkinin bir preparatında ilk iki bitkininki ile aynı fakat başka preparatında yüksek çıkmıştır. Bu bitkide 4 kromozom kısmen homolog bulunmamıştır. *Dactylis* örneklerinde genellikle terminal durumlu bir veya iki kiazma noktasının oluşumundan bahs edilmiştir. Araştırmacı kromozomlarda görülen bu farklılıkların çevresel koşullardan veya kısmi polen fertilitelerinden kaynaklanabileceğini aktarmıştır (Müntzing 1937).

Müntzing (1943)'e ait başka bir çalışmada, 198 *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* klonu (kardeş bitkiler) fenotipik ve sitolojik özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Klonlardan 2 tanesi haploit kromozomlu (mayoz) bulunmuş, bu bitkilerin anterlerinin dejenere olduğu ve morfolojilerinin farklı olduğu belirtilmiştir. Ancak bu iki bitkinin somatik kök hücrelerinde kromozom sayısı 14 olarak sayılmıştır. Bu bitkilerde incelediği morfolojik özellikler, tetrapoliploidlere oranla oldukça indirgenmiştir. Bu durumdan hareketle morfolojik farklılıklar ile kromozom sayıları arası ilişki kurulabileceği söylenmiştir. Aynı zamanda farklı morfotiplerin oluşumunun kromozomlardaki resesif mutasyonlara bağlı olabileceği de eklenmiştir.

*Dactylis glomerata* klonlarına ait açıkta tozlaşan hatlar mayoz bölünme davranışları bakımından incelenmiştir. Her bitkiye ait sporosit başına ortalama 21 diakinez evresi kiazma sayısı bakımından değerlendirilmiştir. 20 bitkilik (I<sub>1</sub>) 1. kuşak döllerde mayoz diakinez evresinde kromozom başına yarı kiazma görülme oranı ortalama 1.71, aynı parametre ebeveyn bitkilerde 1.78 olarak hesaplanmıştır. I<sub>1</sub> bitkilerinde bu oran 1.35 ve 1.90 arasında çeşitlilik göstermiştir. Bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. 6 bitkiden oluşan 2. gurupta, ebeveynler için kiazma sayısı 1.77, döller için ise 1.82 bulunmuştur. Bitki başına 28 sporosit hücre, diakinez evresinde quadrivalent oluşum sıklığı 2.62-4.91 aralığında bulunmuş ve bu durumun kalıtılabilir olduğu söylenmiştir. Kendileme sonucu oluşturulmuş 26 bitkide, ortalama kiazma frekans çeşitliliğinin quadrivalent frekansını %35 oranında etkilediği, quadrivalent oluşum sıklığında başka faktörlerin de etkili olabileceği belirtilmiştir. Bu faktörler 2 veya daha fazla genin ayrışması, kromozomal düzenlemeler veya her iki faktörün küçük eklemeli etkileri olabilir. Kendilenmiş hatlarda mayoz diakinezinde ünivalent yapıların görülme sıklığı ebeveynlerine göre 3 kat fazla bulunmuştur. 8 adet ebeveyn bitkide bu oran %3-24 rasında iken I<sub>1</sub> hattında bu oran %0,78-97 aralığında bulunmuştur. Aynı zamanda çekirdekçikli tetrat oranı bakımından çalışılan Domuz ayrığı bitkilerinde önemli farklılıklar (varyasyon) olduğu, 1 veya 2 çekirdekçiğe sahip tetratların daha yaygın oldukları bulunmuştur. Tetrapoliploid bitkilerdeki en önemli düzensizliklerden biri diakinezde multivalent şekillerin görülmesi olmuştur. Açıkta döllen bitkilerde kromozom etkileşimleri daha sık gerçekleşmekte, bunların kendilenmesi sonucu oluşan soylarda quadrivalent yapılar çoğalmaktadır (Myers ve Hill 1943).

Hekzapoliploid *Dactylis* bitkilerinin mayoz kromozom davranışlarını incelemek amacıyla 24 bitkiden oluşan 15'er tekrarlı bir polikros denemesi kurulmuştur. Farklı yıllara ait

tetrapoliploid ve heksapoliploid bitkilere ait sitolojik bulgular çalışılmış, tüm bitkiler tarlada bir arada yetiştirilmiştir. Ancak karşılıklı çaprazlamalar serada yapılmıştır. Hekzapoliploid bitkilerden 10 adet seçilmiş, asetokarmin ile polen ana hücrelerinden yapılan preparatlar mayoz davranışları incelemek için kullanılmıştır. Çalışmada mayoza ait kromozom davranışları diakinez, metafaz I, anafaz I ve tetrat safhaları incelenmiştir. Gözlemlenen bulgular, 13 tetrapoliploid bitkiye ait parametreler ile karşılaştırılmıştır. Bitki başına ortalama 29 sporosit hücresi diakinez evresinde incelenmiş, sporosit başına quadrivalent yapılar ortalama 2.57, multivalent oluşumlar ortalama 3.41 bulunmuştur. Eşleşmelerin çoğu heksavalent, fakat bazı bitkilerde sıklıkla oktavalentlerde görülmüştür. Trivalent ve univalent eşleşmelerin çok nadir oldukları söylenmiştir. Bazı hücrelerde ince kromatin ipliklerin 2 veya 3 kromozomu bir arada tuttıkları gözlemlenmiştir. Bu yapıların eşleşme durumlarının anlaşılmasının zor olduğu vurgulanmıştır. Kromozom başına ortalama yarı kiazma sayısı 1.66, buna karşılık diakineзде eşleşmemiş kromozom sayısı %0.90 oranında bulunmuştur. Metafaz I, anafaz I ve telofaz II safhalarında ayrılmama, kutuplara gitmede gecikme, tetrat safhasında fazla mikronükleus yapı oluşumu gibi atipik düzensizlikler bulunmuştur. Metafaz I univalent yapılar ile anafaz I gecikmeleri frekansı ve tetrat oluşum yüzdeleri arasında pozitif bir ilişki hesaplanmıştır. Tetrapoliploid örneklere ait yarı kiazma noktaları heksapoliploidlerden farkedilebilir şekilde fazla gözlemlenmiştir. Bütün heksapoliploid örneklerde süreklilik arz eden düşük oranlarda eşleşmemiş kromozomlar gözlemlenmiş. Nadirde olsa univalent yapılara, açıkta tozlanan bitkilerde, serada yapılan melezlerde ve soy içi hatlarda da rastlanmıştır. En düzensiz mayoz özellikleri %55.4 oranında 4'lü mikronükleus (tetrat) yapılar, birkaç univalent yapı (%0.70 kromozom eşleşmemiş) açıkta tozlanan bitkilerde bir istisna olarak kayıt edilmiştir. Fakat bütün durumlarda sinaps tamamlanmıştır. Karşılıklı çaprazlar heksavalent yapılar oluşturmuştur. Hekszavalent bitkilerde heksavalent eşleşmeler görece fazla ve karşılıklı kromozomal etkileşimler çok sık gözlemlenmemiştir. Gözlemlenen multivalent yapı tetrapoliploid quadrivalent ortalamasına yakın bulunmuştur. Karşılıklı çaprazlamalarda multivalent oranı düşmüştür. Genel olarak sera çaprazları ve açıkta yetiştirilen bitkilerin döllerinde mikronükleus yapıların azaldığı görülmüştür. Hem heksapoliploid hem de çaprazlarda yarı kiazma oluşma sıklığı ile 4'lü mikronükleus oluşum yüzdesi arası negatif bir ilişki belirlenmiştir. Kendilenmiş hatlar dışında mikronükleus oluşumu ve multivalent oluşum sıklığı arası ilişki önemsiz fakat kendilenmiş hatlarda negatif bir ilişki bulunmuştur. Tarlada yetiştirilen (açık tozlanan) heksapoliploid bitkilerde 2 bitkiye ait tohumlar çimlendirilmiş ve her birine ait 6 bitkide mitotik kromozomlar sayılmış ve bazı örneklerde, kromozom sayısı  $2n=35$  (aneupoliploid) bulunmuştur. Bu durumun; (1)  $n=21$

kromozomlu bir yumurtanın,  $n=14$  kromozomlu bir polen ile döllenmesi, (2) aneupoliploid dişi gametin eupoliploid polen ile ( $n=21$  veya 14), (3) iki aneupoliploid indirgenmemiş gametin birleşmesi ile oluşabilecekleri, söylenmiştir. Çalışmada heksapoliploid döllerin mayoz davranışları karşılıklı çaprazlama sonucu yetiştirilen tetrapoliploid dölleri ile karşılaştırılmıştır. Mayotik düzensizliklere ait korelasyon katsayıları hesaplanmış, heksapoliploidlerde belirlenen mayoz anormallikleri ile tetrapoliploid bitkilerdeki benzer bulunmuş, özellikle kendilenen hatlar yüksek oranlarda düzensizlikler göstermiştir. Erken safhada oluşan ayrılmama olayının, mayoz düzensizlikleri etkilediği söylenmiştir. Hekzapoliploid soylarda %0-33 oranında aneupoliploidi gözlemlenmişken, açıkta tozlanan tetrapoliploidlerde %11 oranında aneupoliploidi gözlemlenmiştir. Hekzapoliploidlerde kizma frekansı, multivalent frekansı, diakinez aşamasında univalent sayısı ve mikronükleus sayısı gibi parametreler birbirleriyle ilişkilendirilerek, mayoz davranışları hakkında karşılaştırmalı bilgi elde edilebileceği söylenmiştir. Yine telofaz II de mikronükleus yapısının bize mayotik bölünmenin düzgün gerçekleşip gerçekleşmediği hakkında sağlam bilgiler sunacağı aktarılmıştır. Hekzapoliploid bitkilerin mayoz davranışları ile ilgili bu çalışma bulgularının, bitkilerin otopoliplidizasyon sonucu oluştuklarını desteklediği ileri sürülmüştür. Hekzapoliploidler ile tetrapoliploidlerin mayoz anormallikleri benzer, fakat heksapoliploid ve bazı kendilenmiş tetrapoliploid hatlar diakinez evresinde de farkedilir şekilde univalent kromozom durumları göstermiştir. Diakinezde univalent yapı oluşması, kromozomal farklılıklar ve eşleşme için oluşan rekabet, en büyük sebepler olarak gösterilmiştir. Hekzapoliploid ve bazı kendilenmiş hatlarda düşük kizma sayısı, diakinezde oluşan univalent sayısı ile çok yakın ilişki göstermiştir. Bu durumun diğer tetrapoliploid koleksiyonlarda görülmediği belirtilmiştir. Doğal koşullarda heksapoliploid bitkiler ile tetrapoliploid bitkiler arasında gen alış verişi için kesin bir bariyer olmadığı belirtilmiştir. Tetrapoliplid *Dactylis* örnekleri üzerindeki genetik ve sitolojik çalışmalar, muhtemelen iki poliploidi seviyesinin otopoliplidizasyon sonucu oluştuğu yönünde kanıtlar sunmuştur. Bu durumda iki formun genotiplerinin birbirine çok yakın olması gerekmektedir. Bu çalışma sonuçlarına göre, heksapoliploid formların indirgenmiş veya indirgenmemiş gametlerin birleşmesi sonucu oluşmuş olabilecekleri öne sürülmüştür. Bu savı destekleyen kanıtlarından biri, çeşitli sayılarda kromozomal bağlantılar (bivalent, quadrivalent ve heksavalent) olmasıdır. Yine bütün popülasyonlarda düşük kizma frekansı, açık bivalent ve zincir multivalent yapılar ile beraber görülmüşlerdir. Tarla koşullarında açıkta tozlanan ve birinci kendilenmiş hatların olduğu çalışmada, kizma frekansı ile 4'lü mikronükleus oluşumu arasında negatif korelasyon istatistikî açıdan önemli, aynı zamanda kapalı quadrivalent yapılar

ile 4'lü mikronükleus oluşumu arasında da negatif ilişki önemli bulunmuştur. Metafaz I de görülen univalent kromozom sayısına kiazma sayısı dışında, bazı diğer faktörlerin de etkili olabileceği belirtilmiştir (Hanson ve Hill 1953).

İrlanda, Akdeniz ve Amerika menşeli 27 *Dactylis* populasyonu mayoz özellikleri bakımından çalışılmıştır. Mayoz I'de bitkilerde ünivalent oluşum aralığı, 1.3 ile 28 arası bulunmuştur. Anafaz I'de geciken kromozomlar ve fragment oluşumları gözlemlenmiştir. *Dactylis* bitkilerinde, anafaz safhasında geciken kromozomlar yabani formlarda kültür formlarına göre oldukça yüksek ve geciken kromozomların çoğu kromatit tipte bulunmuştur. Türkiye'den alınan materyalde çekirdekçikli tetrat oranı %5.5 olarak bulunmuştur. *Dactylis* örnekleri arası yapılan eşleşmeler sonrası incelenen mayotik özellikler, bivalent eşleşmelerin çoğunlukta olduğunu göstermiştir. Anafaz I sırasında görülen kromozomal köprülerin sebep olduğu kromozom gecikmelerinin, crossing-over, heterozigot inversiyonlar veya translokasyonlardan kaynaklanabileceği söylenmiştir (Curran 1961).

Avrupa'nın Akdeniz ve kuzey bölgelerinden toplanan tetrapoliploid *Dactylis* ve hibritleri ile diploid *aschersoniana*, *woronowii*, *lusitanica*, *judaica*, *santai* ve bunlardan oluşturulan *woronowii* x *aschersoniana*, *woronowii* x *lusitanica*, *aschersoniana* x *lusitanica* hibritleri üzerinde sitolojik çalışmalar yapılmıştır. Çalışılan *Dactylis* koleksiyonunda heksapoliploid popülasyonlar da bulunmaktadır. 460 tetrapoliploid bitkiden sadece %3.2 oranında aneupoliploid bitki belirlenmiştir. Özellikle diploid *Dactylis* örneklerinde ekstra (B) kromozomlar fazla bulunmuştur. Diploid ve onların hibritlerinde mayoz bölünmenin metafaz I safhasında bivalentler kutuplara eşit oranda dağılmıştır. Hücre başına kiazma oluşum ortalaması diploid taksonlarda, *aschersoniana*'da 10.60 - 12.40, *lusitanica*'da 10.95 - 13.68 ve *aschersoniana* x *lusitanica* hibridinde 11.68 - 12.44 aralıklarında bulunmuştur. Aynı zamanda, *glomerata* ve *hispanica* taksonları ve hibritlerinde de quadrivalent eşleşme formasyonu frekansları önemli farklılıklar göstermiştir. Tetrapoliploid ve hibritlerini karşılaştırmada kiazma noktalarının oluşum sıklığından faydalanılamamıştır. Bununla beraber taksonlarda kiazma frekansı ile quadrivalent eşleşme frekansı arasında yüksek ( $r = 0.712$ ), hibritlerinde ise düşük ( $r = 0.198$ ) korelasyon belirlenmiştir. Tetrapoliploid popülasyonlar arasında küçük kromozomal farklılıklar belirlenmiştir. Bu sonuca dayanılarak kiazma frekansı dışında, örneğin kromozom farklılaşması gibi bir etmenin hibritlerdeki quadrivalent yapı oluşum sıklığını azaltabileceği söylenmiştir. Doğal heksapoliploid popülasyonlarda kromozom eşleşmelerinin düzenli fakat çeşitlilik gösterdiği bulunmuştur. Aynı zamanda

eskimiş tohumlardan (çimlenme kapasitesi azalmış) elde edilen bitkilerin bazılarında kromozomal translokasyon oluşumuna dair kanıtlar (kırılmalar ve yeni birleşimler) olduğu, eskimiş tohumların kromozomal mutasyonlara sebep olabileceği de aktarılmıştır (Jones 1962).

Domuz ayrığı bitkilerinin mayoz davranışlarına açıklık getirmek amacı ile diploid ve tetrapoliploid subsp. *lusitanica* bitkileri karşılıklı çaprazlanmıştır. Ayrıca diploid bitkiler hem kendilenmiş hem de aralarında eşleştirilmiştir. Melezlemeler sonucunda oluşan döllere ait polen özellikleri incelenmiştir. Çalışmada serada yapay ışık altında yetiştirilen bitkilerden, Mart- Mayıs arası toplanan anter örnekleri, küçük parçalara ayrılmış, ezilen anterler bir gece 3:1 etil alkol-asetik asit içerisinde fikse edildikten sonra, %70'lik etil alkolde saklanmıştır. Daha sonra asetokarmin ile ezme preparatlar hazırlanmış ve F1 bitkilerine ait mayoz özellikleri incelenmiştir. Farklı çaprazlamalar sonucunda elde edilen 4 subsp. *lusitanica* bitkisinde bariz anormallikler gözlemlenmiştir. Bu bitkilere ait bazı anormallikler kendilenmenin giderilmesi ile normalleşirken, mayotik anormalliklerin çoğu kendilenme depresyonuna bağlı, indirgenmemiş gamet oluşumunun sonucuna bağlanmıştır (Shah 1964).

26 *Dactylis* genotipi sitolojik araştırmaya tabi tutulmuş, bu genotiplerde en yaygın eşleşmenin bivalent, eşleşmelerin halka (6.47) ve çubuk (1.67) şeklinde olduğu saptanmıştır. Sonra azalan bir şekilde quadrivalent, ünivalent ve trivalent yapılar gözlemlenmiştir. Hatta bir hücrede 14 halka bivalente rastlanmıştır. Anafaz I de köprü ve fragment oluşumları gözlemlenmiş fakat geciken kromozomlar daha çok kromatit yapıda görülmüştür. Mayoz bölünmenin profaz I evresinde kromozomlar düzenli eşleştiğinde, anafaz I de kutuplara dağılmaların çoğunlukla düzenli gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bivalent eşleşmelerin quadrivalent eşleşmelerden daha yaygın olması, farklı genomların tercihli eşleşme yapabilecekleri şeklinde yorumlanmıştır (Lentz ve ark. 1983).

Polonya doğal florasından 3 farklı lokaliteden toplanan *Dactylis gloromerata* subsp. *aschersoniana* (Graebner) Thell. ( $2n=14$ ) popülasyonlarına ait kromozomal yapılar Giemsa heterokromatin bant boyama yöntemi ile çalışılmıştır. Her örneğe ait 10 mitoz metafaz hücresine ait kromozomların aritmetik ortalaması, standart sapması, standart hata ve varyasyon katsayısı hesaplanmış, devamında 3 popülasyona ait haploit bant karyotipleri hazırlanmıştır. Her üç örnekte, I. kromozom median sentromer durumlu, kromozomun uzun kolunda görece büyük bir satelit yapı ve kısa kolunda terminal durumlu heterokromatin bant tespit edilmiştir. II. kromozom median sentromer durumlu, uzun kolunda sentromere yakın koyu boyanan heterokromatin bir banda sahip bulunmuştur. Yine uzun kolda görece büyük

bir satelit görülmüştür. III. kromozom median sentromerli, satelitsiz ve heterokromatin bant bulundurmamaktadır. IV. kromozom submedian sentromerli ve uzun kol telomerik bir bant bulundurmaktadır. Ancak 1. popülasyonda bu bant görece daha büyüktür. V. kromozom submedian sentromerli kısa kolda küçük terminal bir bant bulunmaktadır. Yine 1. popülasyonda bunun biraz daha büyük olduğu görülmektedir. VI. kromozom submedian, bantsız ve en küçük submedian sentromerli bulunmuştur. VII. kromozom haploit kromozom setinin en küçük median sentromerli kromozomu olarak hesaplanmıştır. Kromozomun uzun kolu geniş ve yoğun boyanmış bir heterokromatin bant ve kısa kolu terminal, zayıf ve küçük bir bant olmak üzere 2 banda sahip bulunmuştur. Genel olarak 3 popülasyona ait bant karyotipleri bir birine benzemekte, ancak popülasyon içi ve arası incelenen örneklerde bantların yeri, yoğunluğu ve uzunlukları az çok farklılıklar göstermektedir. Arştırmacı aynı takson ile yapılan bir başka çalışma ile kendisinininkini karşılaştırdığında, VII. kromozomun bant özellikleri ile ilgili bazı polimorfizimlerin olduğunu aktarmıştır (Mizanty 1985).

B kromozomları, birçok hayvan ve bitki türünde belirlenmiş olup, normal (A kromozomları) kromozomlarla birlikte bulunan ekstra (fazlalık) kromozomlar olarak tanımlanmışlardır. Özellikle yabancı tozlanan, poliploidi kompleksine sahip buğdaygil yem bitkilerinde daha çok rastlandıkları bilinmektedir. B kromozomlarının kalıtımı Mendel genetiğinden sapmalar göstermektedir. *Agrostis*, *Anthoxanthum*, *Bromus*, *Calamagrostis*, *Dactylis*, *Deschampsia*, *Festuca*, *Koeleria*, *Lolium*, *Phleum*, *Poa* gibi çim bitkisi cinslerinde çoğunlukla raslanmaktadır. Bunların dışında, *Zea mays*, *Aegilops*, *Avena*, *Secale*, *Pennisetum* ve *Sorghum* cinslerine ait bazı türlerde de tespit edilmiştir. B-kromozomları bu türlerin ilkel formlarında, kültüre alınan bitkilerin ise yabani ve atasal formlarında belirlenmiştir (Jones ve Rees 1982, Jones 1991, Palestis ve ark. 2004, Houben 2017). B kromozomları bir cins içerisindeki genetik çeşitliliği artırmakta etkili olmaktadır. Çeşitliliğin artması bitkilerin adaptasyon yeteneklerini artırması anlamına gelmektedir. B kromozomları diploid bitkilerde tetrapoliploid bitkilere göre daha etkindir. B kromozomlarının etkisi pozitif veya negatif yönde olabilmektedir. Eğer B kromozomları fazla ise bitkilerin canlılığını ve fertilesini azaltabilmektedir. Eğer sayıca az iseler herhangi bir etkide bulunmayacakları gibi olumlu yönde de etki edebilmektedirler. Bu kromozomların bir şekilde A kromozomlarından kökenlendikleri, mayoz bölünme öncesi, sonrası veya mayoz bölünme sırasında oluşabilecekleri aktarılmıştır (Jones ve Houben 2003, Palestis ve ark. 2004, Houben 2017).



*Dactylis* cinsinde, normal kromozomlara homolog olmayan, en küçük kromozomların yarı büyüklüğünde olan, submedian sentromerik durumlu, 1-12 sayı aralığında ekstra (B kromozom) kromozomların varlığı bildirilmiştir. B kromozomları, diploid *D. g.* subsp. *lusitanica*, subsp. *judaica*, subsp. *castellata* alt türlerinde saptanmıştır. Tetrapoliploid alt türlerden *D. g.* subsp. *glomerata* ve subsp. *hispanica*'da gözlemlenmiştir. Ayrıca B kromozomu sayılarının çevre koşullarına göre değiştikleri de aktarılmıştır (Mizianty 1990, 1991a).

*Dactylis* taksonları üzerinde yapılan, klasik kromozom boyama teknikleri sonucu oluşturulan karyotipler, cinsin kromozom uzunluklarının ortalama 3-9 µm arasında olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalarda ortak noktalar, cinse ait kromozomların genellikle median ve submedian sentromerli durumda oldukları yönündedir. Diploid genotiplerin kromozomları 1, 2 veya 3 adet satelit taşıırken, tetrapoliploidler 4 adet satelitli kromozom taşımaktadır. Cinse ait taksonların kromozomları hem küçük hem de morfolojik olarak birbirlerine çok benzediklerinden, araştırmacıların ortak görüşü, klasik yollar ile yapılan çalışmaların çok sağlıklı karyotipik bilgiler vermediği yönündedir. Bu yüzden klasik sitogenetik metotlar ile yapılan çalışma sayısı azdır (Mizianty 1985, Guignard 1987, Wetschnig 1991, Büyükbaşar 2010).

Guignard (1987), subsp. *glomerata*, *marina* ve *oceanica* üzerinde yaptığı kromozomal çalışmalar neticesinde, bu tetrapoliploidlerin kökeninin segmental allopoliploidi olduğu sonucuna varmıştır. Bu tetrapoliploid alt türlerin genomları, 7 veya 8 metasentrik, 4 veya 5 submetasentrik, 1 veya 2 subtelosentrik kromozoma sahip bulunmuştur.

Wetschnig (1991)'e ait çalışmada 11 diploid *Dactylis* taksonuna ait kromozom sayısı ve morfolojisi karşılaştırılmış, taksonlara ait kromozomal bulgular idiogramlar ile şematize edilmiştir. Bu çalışmanın *Dactylis* mitoz kromozomlarına ait en ayrıntılı çalışmalardan biri olduğu görülmektedir. Sonuçlar karşılaştırıldığında bu 11 diploid takson temelde 3 guruba ayrılmıştır. *D. g.* subsp. *smithii*, *D. g.* subsp. *ibizensis*, *D. g.* subsp. *aschersoniana*, *D. g.* subsp. *judaica*, *D. g.* subsp. *juncinella* 1. gurubu oluşturmuştur. Bu taksonların idiogramları benzer olup hepsi 2 adet satelitli kromozom taşımaktadır. Satelitli kromozomlardan biri her örnekte oldukça simetrik bir yapı sergilemektedir. Diğer kromozomlarda median sentromerli olup, simetrik yapı göstermişlerdir. Bu grup içinde *D. g.* subsp. *ibizensis* ve *D. g.* subsp. *smithii*'nin kromozomal özellikler bakımından birbirine oldukça benzer oldukları belirtilmiştir. *D. g.* subsp. *lusitanica* ve *D. g.* subsp. *santai* 2. gurubu oluşturmuştur. Bu iki

örneğe ait kromozom setleri sadece bir adet satelitli kromozom içermeleri ile karakterize edilmişlerdir. *D. g. subsp. parthiana* ve *D. g. subsp. himalayensis* ise 3. gurubu oluşturmuştur. Bu grup 3 adet satelitli kromozom ve satelit taşıyan kısa kol uzunluğu ile diğer gruplardan ayrılmıştır. Geriye kalan *D. g. subsp. mairei* ve *D. g. subsp. reichenbachii* oldukça farklı kromozomal özellikler göstermişlerdir. İkisine ait karyotip benzerlikleri az bulunmuştur. İkisinin de diğer örneklerden çok farklı birer satelitli kromozoma sahip oldukları belirlenmiştir. Sayısal verilere dayanılarak yapılan kümeleme analizi, 1. grupta *D. g. subsp. aschersoniana* ile 3. grupta *D. g. subsp. himalayensis* taksonlarının daha önceki çalışmalarda, morfoloji ve kimyasal olarak oldukça benzer özellikler sergiledikleri, ancak idiogramlarının kayda değer farklılıklar gösterdikleri aktarılmıştır. İncelenen 11 diploid *Dactylis* örneklerine ait bazı önemli veriler aşağıdaki şekilde özetlenebilir. Satelit taşıyan kromozom çifti sayısı, 1, 2 ve 3 olup, bütün aksesyonlarda bu kromozomlar median sentromer durumlu gözlemlenmiştir. İncelenen 11 diploid taksona ait haploit genomlardan, 5 taksonda 3 adet, 6 taksonda 2 adet kromozom submetasentrik sentromer durumlu bulunmuştur. Hemen hemen bütün taksonlarda birkaç adet küçük veya morfolojik olarak ayırt edilemeyen kromozom varlığından söz edilmiştir. Bazı taksonlarda satelit büyüklüklerinin ayırt edici olduğu vurgulanmıştır.

Galiçya (İspanya ve Portekiz) bölgesinde simpatrik alanlarda yaşayan subsp. *izcoi*'e ait diploid ve tetrapoliploid bitkilere ait mitoz kromozomları karşılaştırmak amacıyla, doğadan toplanan tohumlar kullanılmıştır. Çimlendirilen tohumlara ait fideler 3. veya 4. kök sapları verince kökleri hasat edilmiştir. Kökler soğuk distile su ile 6 saat ön muameleye tabi tutulmuş, alkol asetik asit (3:1) çözeltisinde en az 3 saat fikse edildikten sonra, 60 C° de 10 dk hidroliz edilmiştir. 15 dk Feulgen ile boyandıktan sonra asetokarmin ezme yöntemi ile hazırlanan preparatlar mikroskop altında gözlemlenmiştir. Diploid bitkilere ait kromozomlar tetrapoliploid kromozomlara göre daha fazla oranda metasentrik kromozom çiftine sahip bulunmuştur. Diploid karyotipe ait 7 haploit kromozomun 5'i metasentrik 2'si submetasentrik iken, tetrapoliploid karyotipe ait 14 haploit kromozomun 8'i metasentrik ve 6'sı submetasentrik durumlu belirlenmiştir. Tetrapoliploid örneklerde 2. kromozom çiftinin 2. homoloji grubunda birer satelit belirlenirken, diploidlerde bu yapının açıkça belirlenemediği söylenmiştir. Tetrapoliploid örnekte, 2. homoloji gurubunu oluşturan kromozom çiftlerinden biri metasentrik diğeri submetasentrik kromozomlara sahip bulunmuştur. Bu durum diploid atanın submetasentrik kromozomlar taşıması gerektiğini düşündürmüştür. Aynı şekilde 7. homoloji gurubunda (tetrapoliploid), çiftlerden biri metasentrik, diğeri submetasentrik ve

çiftlerin kromozom uzunluklarıda farklı bulunmuştur. Bu durumda diploid atanın metasentrik kromozomlu olması gerektiği söylenmiştir. Son olarak tetrapoliploid örneklerin 1. grup (homoloji) kromozomlarından 1a ve 1b morfolojik olarak diploid bitkilerin 1. çift kromozomlarına benzerken, 1c ve 1d farklılık göstermiştir. Araştırmacılar bant boyama teknikleri kullanılmadığı için bu sonuçların kesin olmadığını belirtmişlerdir. Eğer tetrapoliploid subsp. *izcoi* bitkileri diploid atadan otopoliploidizasyon sonucu oluşmuşlar ise kromozomlarının değişiklik göstermemesi gerektiği belirtilmiş, alternatif olarak tetrapoliploidlerde görülen bu karyotip farklılıklarının, kısmen otopoliploidi kısmen başka alt türlerle melezlenmeleri sonucu oluşabileceği söylenmiştir (Lindner ve ark. 1999).

Erzurum iline ait 8 farklı lokalitede Domuz ayrığı varlıkları toplanmış ve somatik kromozom sayımları yapılmıştır. Oltu ve Ulubağ lokasyonlarına ait bitkiler ise mayoz özellikleri bakımından incelenmiştir. Her iki lokasyona ait 15 bitki her bitkiye ait 20 hücre mayoz özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Kromozom sayımı yapılan tüm bitkiler  $2n=28$  kromozomlu bulunmuştur. Metefaz I aşamasında en yaygın eşleşme şeklinin bivalent olduğu (ortalama 8.37) bunu azalan sıra ile quadrivalent (2.81), ünivalent (0.04) ve trivalent eşleşmeler (0.015) izlemiştir. Halka yapılı eşleşmeler çubuk yapılı eşleşmelerden fazla bulunmuştur. Her iki ekotipte de incelenen bitkilerde ünivalent sayısı 2'yi geçmemiştir. Bivalent ve quadrivalent eşleşmelerde tüm şekiller gözlemlenmiştir. Ancak en fazla halka ve çubuk şekiller gözlemlenmiştir. Oltu örneklerinin %1.02'si 14 bivalente, %0.77'si 7 quadrivalente, Ulubağ örneklerinin %1.91'i 14 bivalente, %0.64'ü 7 quadrivalente sahip bulunmuşlardır. İncelenen anafaz I hücrelerinde, ortalama %96.34 oranında kromozomlar düzenli dağılım göstermiştir. Kutuplara çekilmede geçiken kromozom sayısı ve köprülü hücre sayısı ise az sayıda saptanmıştır. İncelenen tetradların %95.172'sinde çekirdekçik oluşumu görülmemiştir. Bu oran ünivalentli metafaz I hücreleri (%1.99) ile anafaz I de geciken ve köprü oluşturan hücrelerin (%3.66) düşük olması ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir. Çalışmada B kromozomlarına ve aneupoliploidiye rastlanmamıştır. Aneupoliploid bitkiler az tohum tuttuklarından ve vejetatif olarak gelişimleri zayıf olduğundan (otlatma yapılan yerlerde rekabet etme yetenekleri azalmış) zamanla vejetasyondan yok oldukları öne sürülmüştür. İncelenen hücrelerin %98.582'inde quadrivalent eşleşmelerin gözlemlenmesi ve bazılarında sadece 7 çift quadrivalent olması, tetrapoliploid Domuz ayrığının otopoliploidi sonucu oluştuğuna kanıt olarak gösterilmiştir. Son olarak tetrapoliploid bitkilerin tohum tutma oranının yüksek oluşunun mayoz bölünmenin düzenli oluşuna bağlanabileceği vurgulanmıştır. Doğal genetik kaynaklar direk seleksiyon yoluyla ıslah programlarına alınabilecekleri gibi,

melezleme yoluyla istenilen karakterler kültür çeşitlerine aktarılabilir. Kültür bitkilerinin değişen çevresel ve biotik koşullara uyumu için yabani gen kaynakları bu yüzden çok değerlidir. Herhangi bir karakterin melezleme ile ticari çeşide aktarılması veya yeni çeşitler geliştirilmesinde çalışılan ebeveynlere ait sitolojik karakterlerin öğrenilmesi önceliklidir. Oluşacak melez soyların fertiliteleri ve verimleri düzenli gamet oluşturmalarına bağlıdır. Aynı kromozom sayısına ve benzer morfolojiye sahip gametlerin oluşturdukları hibritlerin başarı şansı daha yüksektir (Tosun ve ark. 1999).

### 2. 5. 2. Ekolojik ve morfolojik çalışmalar

Yapay olarak diploid subsp. *aschersoniana* örneklerinden tetrapoliploid bitkiler elde edilmiş, bu bitkilerin morfolojik olarak tetrapoliploid subsp. *glomerata*'dan ziyade diploid örneklere daha çok benzedikleri açıklanmıştır. İran menşeli diploid subsp. *woronowii* ile diploid *aschersoniana* ile melezlenmiş, oluşan F1 döllerinin morfolojik olarak tetrapoliploid *Dactylis glomerata*'ya benzedikleri söylenmiştir. Bu şekilde Kuzey Avrupa tetrapoliploidlerinin farklı diploidlerden kökenlenmiş olabilecekleri söylenmiştir (Myers 1948).

İsrail'de diploid ve tetrapoliploid bitkilerin birbirine yakın olduğu bir bölgeden toplanan 2000 bitkiden 27'sinin anterlerinin açılmadığı görülmüştür. Bu 27 bitkiden 15 tanesine ait kromozom sayımları meristem kök hücrelerinde yapılmış, bitkilerden 8 tanesi diploid, 4'ü tetrapoliploid ve 3'ü triploid olarak belirlenmiştir. Triploid bitkilerin morfolojik olarak normal görümlü, diploid ve tetrapoliploidlere benzedikleri gözlemlenmiştir. Bu triploid bitkilerin subsp. *judaica* taksonuna ait diploid ve tetrapoliploid formların hibridi olabileceği sonucuna varılmıştır. Başka bir lokasyonda 9 adet anter açmayan bitki görülmüş, bunlardan 4 tanesinin triploid olduğu anlaşılmıştır. Triploid bitkilerin anterlerinin açılmaması sebebi ile büyük oranda erkek kısır oldukları anlaşılmıştır. Bu nedenle çalışılan ortamda triploid olduğu bilinen 2 bitki tohum durumu için işaretlenmiştir. Bitkilerin tohum tutma oranı yaklaşık %5 bulunmuştur. Komşu diploid ve tetrapoliploid bitkilerin tohum tutma oranı %25-30 bulunmuştur. İki bitkiye ait tohumlar ekilmiş, tohum çimlenmelerinin düzenli olmadığı, bazı fidelerin (ince gövdeli, ince ve kıvrık yaprak) gelişimin erken safhasında öldükleri gözlemlenmiştir. Kurtulan bitkiler ise morfolojik ve fenolojik olarak çeşitlilik göstermişlerdir. Bazıları normal gelişim göstermiş ve çiçeklenmiş, bazılarında ise çiçek sapı oluşmamıştır. Triploid bitkilerin bazı döllerinde tetrapoliploid ve pentapoliploid genoma sahip bitkiler görülmüştür. Bu olay, triploid bitkilerin çok sayıda indirgenmemiş yumurta hücresi

oluşturması ve bu gametlerin diploid veya tetrapoliploid gametlerce döllenmesi ile açıklanmıştır. Çalışmalarda iki triploid ataya rastlanmadığından, tetrapoliploidlerin diploid ve triploid melezi olabileceği vurgulanmıştır. Tüm bu verilere dayanılarak triploid bitkilerin diploid ve tetrapoliploid bitkiler arasında gen akışında önemli bir aracı görevi gördükleri belirtilmiştir (Zohary ve Nur 1959).

Stebbins ve Zohary (1959)' e göre cinsin evrimleşme süreci 3 farklı dönemi kapsamaktadır. Teritiary (Tersiyer), yoğun iklimsel ve coğrafik değişimlerin olduğu dönemde, diploid *Dactylis* formları değişime uğramış ve farklı ekolojik nişler oluşturmuştur. Pleistocene (Buzul çağı ve sonrası) zamanda, diploid formlar arasında döllenme veya otoploidizasyon sonucu tetrapoliploid formlar oluşmuş ve bu formlar kendilerine özgü ekocoğrafyalarda yaşamaya başlamıştır. 3. dönem, insan ve bazı diğer sebeplerden kaynaklı çevresel koşulların değişimi sonucu, bazı formların yok olduğu, bazı formların yeni habitatlar edindiği dönemi ifade etmektedir. Yine bu dönemde insanlar taksonlar arası hibritleme çalışmaları yaparak farklı çeşitler geliştirip bunlardan tarımsal açıdan faydalanmışlardır. Cinsin üyeleri farklı ülkelerin tarım sistemlerinde intriksiyon yöntemi ile kullanılmaya başlanmıştır. Böylece *Dactylis* cinsi farklı kıtalarda yaygınlaşmaya başlamıştır.

*Dactylis* üyelerini sınıflandırmada karşılaşılan bir başka zorlukta, farklı poliploidi seviyesine sahip olmalarına rağmen, morfolojik olarak birbirlerinden ayırt edilememeleridir. Çoğu bölgede diploid ve tetrapoliploidler ortak ekocoğrafyalarda yetişmektedir. Eğer bu taksonlar üzerine sitolojik veya başka çalışmalar yapılmaz ise sadece fenotipik karşılaştırmaların bu taksonları ayırt etmede işe yaramayacağı vurgusu yapılmıştır (Nur ve Zohary 1959, Borrill ve Lindner 1971).

Diploid subsp. *judaica*, İsrail ve Lübnan'da coğrafik özellikleri bakımından ayrıntılı çalışılmıştır. Nazareth ve Safad (İsrail) bölgelerindeki tepelerde subsp. *judaica*'nın hem diploid hemde tetrapoliploidleri kayıt edilmiştir. Nazareth (Nasıra) bölgesindeki yüksek tepelerde diploidler tetrapoliploidlerce çevrilmiş halde, düşük yükseltilerde ise tamamen tetrapoliploidlerin yerleştiği gözlemlenmiştir. Tetrapoliploid taksonların habitatları karışık yaşayan popülasyon alanlarından çok uzakta bulunmamıştır. Safad bölgesinde ise etkileşim halinde olan diploid ve tetrapoliploidlerin oldukça geniş bir alana yayıldıkları gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda şu kanıya varılmıştır: *Dactylis* bitkileri sürekli buldukları alanın dışına yayılma eğiliminde olup, bu yüzden dağılımlarında bir mozaik durumu hâkim görünmektedir. Saha çalışmasında tetrapoliploid ve diploidlerin her 100 m'de

bir yer değiştirdikleri kayıt edilmiştir. Çoğu durumda taksonlar arası morfolojik farklılıkların saptanamadığı belirtilmiştir. Fakat etkileşim halinde olan popülasyonların kromozom sayımları sonucu farklı sitotipler içerdikleri saptanmıştır. Araştışıcılara göre kurakil koşullar ile tetrapoliploidlerin hibrid kökeni arasında ilişki bulunmaktadır. Buna dayanarak diploid *judaica* ve *woronowii*'nin tetrapoliploidlerin genetik yapısına katkı sağlamış olabilecekleri söylenmiştir. Örneğin step koşullarında gözlenen subsp. *woronowii* popülasyonlarının İsrail'in kurak koşullarına uyum sağlamış tetrapoliploid popülasyonlara genetik katkıda bulunmuş olabilecekleri ileri sürülmüştür. Yukardaki diploid ve tetrapoliploid popülasyonların fenotipik olarak benzer özellikler sergiledikleri, çoğu durumda sitotipleri birbirinden ayırt etmenin imknsız olduğu söylenmiştir. Ancak *judaica* ve *woronowii*'nin bu katkıyı beraber yapıp yapmadıkları ile ilişkili daha fazla kanıt bulunması gerektiği vurgulanmıştır (Nur ve Zohary 1959).

*Dactylis* cinsine ait bir başka kapsamlı coğrafik alışma, Güney Asya'nın merkezi ve Akdeniz bölgesine ait 9 adet diploid *Dactylis*'in tanımlanması olmuştur. Bu diploidler, *himalayensis* (Güney Asya'nın merkezinde), *reichenbachii* (İtalya'nın kuzeyinde), *judaica* (İsrail'de), *ibizensis* (Belarus adalarında), *juncinella* (İspanya'nın kuzeyinde), *lusitanica* (Portekiz), *santai* (Cezayir'in batısında), *mairei* (Cezayir'in doğusunda), *smithi* (Kanarya adalarında) adları ile tanımlanmışlardır. Çalışmanın devamında, 11 diploid ve çeşitli hibritleri mayoz bölünme davranışları açısından incelenmiş, bütün örneklerde mayoz bölünmenin normal ve diakinez aşamasında 7 çift (bivalent) eşleşmenin olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber diploid atalar ve bazı F1 hibritlerinin polen fertilitesi yüksek iken diğer örneklerin polen fertilitesi %50-80 oranında düşük bulunmuştur. Uygun koşullarda yetiştirilen bazı F1 hibritlerinin tohum tutma oranı, elverişli olmayan koşullarda yetiştirilen klonlarından daha düşük bulunmuştur. Bu farklılığa aynı koşullarda yetiştirilen anne-baba bitkilerinde rastlanılmamıştır. Sonuç olarak diploid *Dactylis* alt türlerinin genel olarak interfertil oldukları ve aralarında gen geçişleri yapabildikleri vurgulanmıştır. Aynı çalışmada, tetrapoliploidlerin kolaylıkla hibritleştikleri ve açılan döllerinde kısırlık kusurlarının olmadığı söylenmiştir. Aynı durumun doğa koşullarında da gerçekleştiği zira doğada tetrapoliploid subsp. *glomerata* ve subsp. *hispanica* taksonlarının habitatlarının sıklıkla çakıştığı veya bitişik bir durum arz ettiği belirtilmiştir. Araştışıcı, *Dactylis*'in tek türden oluştuğunu fakat diploid ve tetrapoliploid olmak üzere iki paralel seri alt türden kkenlenebileceği varsayımında bulunmuştur (Stebbins ve Zohary 1959).

Doğal panmikrik (rastgele eşleşme) popülasyonlarda letal genlerin varlığının evrimleşme açısından önemli olduğu vurgulanmıştır. Bu olgunun varlığı, İsrail’de en yaygın diploid alt tür olan *Dactylis glomerata* subsp. *judaica* ait 13 lokaliteden toplam 14 diploid popülasyon üzerinde araştırılmıştır. Çalışma ıslah amaçlı toplanan subsp. *judaica* tohumlarının yetiştirildikten sonra çok sayıda beyaz yapraklı bitki görülmesi üzerine, bu olayın aydınlatılması için yapılmıştır. Araştırmada *Dactylis glomerata* subsp. *judaica* bitkilerinde klorofil yetmezliğine sebep olan ve bitkilerin fenotipik olarak albino görünmesine sebep olan letal genetik faktörler belirlenmeye çalışılmış ve polimorfizm dengelenmesi (balanced polymorphism) ile olan ilişkisi açıklanmaya çalışılmıştır. Bu olguyu araştırmak için, her popülasyona ait 100 bitkinin tohumları ayrı ayrı hasat edilmiştir. Bu tohumlar, her 3-4 deneme istasyonu arası 15-20 m aralıklı olacak şekilde bölünmüş deneme alanlarına ekilmişlerdir. Elde edilen bitki örnekleri, 2 parçaya bölünmüş, parçalar arası 5-10 m, parça içi ise 1-2 m’lik aralıklar ile belirlenmiş parsellerde yetiştirilmişlerdir. Farklı popülasyonlarda klorofil bozukluğuna sebep olan genlerin frekansı, döl kontrolü amacı ile yetiştirilen heterozigot bitkilerin doğal yollarla belirlenmesi ile hesaplanmıştır. Döl kontrolü ile heterozigot bitkileri belirlemek için, her bitkiye ait tohumlar kışın serada ekilmiştir. Çimlenmeden 3-4 hafta sonra fideler kontrol edilmiş, yaprak rengi normal (yeşil) ve albino (resesif letal gen taşıyan bitkiler) bitkiler belirlenmiş; döllere ait en az bir albino bitki gözlemlenmiş ise heterozigot klorofil bozukluğu faktörlerini taşıdığı kabul edilmiştir. Komşu parsel çiftlerine ait heterozigotluk veya homozigotluk değerleri binomal test ortalamalarına göre kontrol edilmiştir. Test sonuçları homozigot ve heterozigot bitkilerin rastgele dağıldığını, lokal bir toplanma olmadığını göstermiştir. Kendine kısırlığın hâkim olduğu *Dactylis* bitkilerinin bazı soyları, heterozigot bir bitki tarafından döllenir ise polenler aracılığı ile mutant bir gen taşınmış olur. Böylece albino bitkiler homozigot resesif letal bir lokus tarafından hâsıla getirilmiş olur. Araştırma bulgularına göre, büyük ihtimalle *Dactylis* popülasyonlarının habitatlarında heterozigot bitkiler, klorofil eksikliğine neden olan genler bakımından homozigotlara oranla daha fazla belirleyici olmaktadır. Bu durumla ilişkili adaptif polimorfizm koşullarına bağlı klorofil eksikliğine neden olan letal genler test edilen subsp. *judaica* bitkilerinde açıkça ortaya konulmuştur. Bu şekilde heterozigot bitkiler belirlenerek doğal şekilde albino gen taşıyan polen oranının bulunabileceği söylenmiştir. Letal gen taşıyan bir polen heterozigot bir bitki stıgması üzerinde çimlenirse homozigot albino dölleri oluşacaktır. Eğer selektif bir bariyer yok ise gametlerin yarısı letal gen ve bitkilerin %25’i albino olacaktır. Çalışılan *Dactylis* popülasyonlarına ait dölleri arasında %12-15 oranında, bazı lokalitelerdeki popülasyonlarda ise %30 varan albino bitkiler gözlemlenmiştir. Aynı

zamanda terra-rossa (kırmızı topraklar) topraklarında yetişen bitkiler, rendzina (koyu renkte killi ve kireçli topraklar) tipi toprakta yetişenlerden daha fazla albino bulunmuştur. (Apirion ve Zohary 1961).

Jones ve Borrill (1962), subsp. *lusitanica*, subsp. *aschersoniana*, subsp. *woronowi*, subsp. *santai* diploid genotipleri ile subsp. *glomerata*, subsp. *hispanica*, *D. marina* tetrapoliploid genotipleri arasında yapay melezleme çalışmaları sonrası tetrapoliploid bitkiler elde etmişlerdir. Bunun için, araştırmacılar önce diploid ve tetraploid bitkiler arasında çaprazlamalar yapmış, oluşan ara form triploid bitkiler ile diploidler arasında geri melezleme yaparak nihayetinde tetrapoliploid bitki elde etmeyi başarmışlardır.

İsveç'in güney bölgelerinde doğal *Dactylis aschersoniana* popülasyonları toplanmıştır. Kromozom sayısı  $2n=14$  olan 10 adet bitki tarlaya aktarılmış ve sonrasında kendileme çalışmaları yapılmıştır. 10 adet  $I_1$  soyu, pistil ve polen davranışları açısından incelenmiştir. İlk yıl  $I_1$  ailesine ait tohumlar çift katlı kâğıt torbalar içerisinde elde edilmiş, saksılara ekilen tohumlar, fide şeklinde tekrar tarlaya aktarılmıştır.  $I_2$  bitkileri elde edildikten sonra, tekrar kendileme gerçekleştirilmiştir. Tozlaşmadan sonra stigma üzerinde canlı polen sayısını bulmak için mavi pamuk boyama yöntemi kullanılmıştır (cotton-blue technique). 10 popülasyona ait bitkiler ile yapılan kendileme sonucunda, her başağa ait 25'den daha az tohum sayılmıştır. Yani bitkiler büyük oranda kendine kısır bulunmuştur. Diğer yıllara ait değerler de benzer bulunmuştur. Polenlerin pistil üzerindeki davranışları incelendiğinde, bütün kendilemelerde stigma üzerinde çimlenme özelliğini yitirmiş polenler gözlemlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde diğer çim bitkilerinde olduğu gibi, bağımsız kalıtılan ve karşılıklı etkileşim içinde olan, kendine kısırılığı belirleyen 2 lokus durumunun *Dactylis aschersoniana* içinde geçerli olduğu söylenmiştir. Uyuşmazlığın spesifitesi, pistil üzerinde allelerin bağımsız hareketi ile sporofitik, polenlerde ise her iki lokus etkilerini gametofitik olarak göstermektedir. Ayrıca incelenen 4 bitkiden, ikisine ait  $I_1$  döllerinde monohibrit uyumsuzluk kalıtımı gözlemlenmiştir. Çalışmada az oranda kendine döllen bitkilerde rastlanmıştır. Kendileme ile elde edilen 2 familyada homozigotluk veya heterozigotluk ile bağımsız kalıtılan S ve Z lokusları arası ilişki bulunmamıştır. Aynı zamanda daha önceki uyumsuzluğun tek taraflı olarak azalması, kendileme sonrası oluşan mutasyonlara bağlanmıştır (Lundqvist 1965).

İsveç'in güneyinde farklı bölgelerde 5 *Dactylis glomerata* bitkisi toplanmış ve somatik kromozom sayısı  $2n=4x=28$  olarak belirlenmiştir. Bitkiler korunaklı paketlerde kendilenmiş,



elde edilen I<sub>1</sub> döller ve ebevenler arası test melezleri yapılmıştır. 1961-1964 yılları arasında, I<sub>1</sub> bitkilerine ait fideler tarlaya aktarılmıştır. 1963 yılında test melezleri yapılmıştır. Polen canlılığı için, tozlaşmadan 24-36 saat sonra stigmalar cotton blue tekniği ile boyanmıştır. Çalışma sonunda, kendileme sonucu oluşan döllere ait polen canlılığı, bu döllerin melezlerinden daha az çıkmıştır. I<sub>1</sub>(tozlayıcı) ve ataları arası tozlaşmada, I<sub>1</sub> polenlerinin canlılığı daha az bulunmuştur. Sonuçlardan bazıları uyumsuzlukla ilgili genlerle ilişkili iken, tetrasomik kalıtımın karışıklığı nedeni ile diğer faktörlerin çalışılmadığı belirtilmiştir. Bazı I<sub>1</sub> soylarında uyumsuzluk diallel kalıtım göstermiştir. Polenlerin stigma üzerinde çimlenme durumları uyumsuzluk ile ilgili bilgiler vermiştir. Kendilemeden sonra yapılan test melezi bitkilerine ait polenler daha az çimlenmiştir. I<sub>1</sub> (tozlayıcı) ve atalar arası melezlemede I<sub>1</sub> polenleri daha az fertilitite göstermiştir. Diploidi için geçerli uyumsuzluk durumlarının tetrapoliploidi içinde geçerli olduğu söylenmiştir. Bazı diploid buğdaygillere göre *Dactylis* örneklerinde kendine uyumsuzluk oranının yüksek olduğu belirlenmiştir. Kendine uyumsuzluğa sebep olarak, sf allel sistemi, double (çifte) indirgenme, uyumsuzluk ile ilgili lokusların bağılılığı, uyumsuzluk genlerinin dominansı gibi durumların etkili olabileceği bildirilmiştir. Bu gibi nedenlerin, otopoliploid bitkilerde karşı döllenmeyi zorunlu kıldığı vurgulanmıştır (Lundqvist 1969).

Literatür çalışmaları, diploid (subsp. *himaleyensis* dışında) ve tetrapoliploid *Dactylis* habitatlarının bir birleri ile çakıştığını veya ortak alanda yaşadıklarını göstermektedir. Doğada diploidler ekolojik ve coğrafik bariyerler ile birbirlerinden ayrılmış görümlerde yine de birbirleri ile tozlaşma ihtimallerinin göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmıştır. Örneğin diploid subsp. *parthiana* ve subsp. *woronowii* hibritlerine doğada rastlanılmıştır (Borrill ve Carroll 1969).

Sierra Nevada (İspanya) ve Gorges de Kerrata (Cezayir) ait farklı lokasyonlarda *Dactylis* popülasyonları toplanmış, toplanan örnekler ekolojik özellikleri açısından ayrıntılı incelenmiştir. Diploid subsp. *juncinella*'nın morfolojik olarak ayırt edilebildiği ve Sierra Nevada'nın yüksek rakımlarında yetiştiği belirlenmiştir. Bu alanlarda tanımlanan tetrapoliploid subsp. *hispanica* örnekleri ise yaygın olarak bilinen *hispanica* formundan farklı bulunmuştur. Çalışmada lokasyonlar belirlenirken, yükselti arası geçişte bu iki belirgin taksonunun özellikleri referans alınmıştır. Örneğin Kerrata'da, diploid relik endemik subsp. *mairei* örnekleri toplanırken bu özellik dikkate alınmıştır. Çalışmada daha önce kayıt altına alınmış diploid ve tetrapoliploid *Dactylis* taksonların ilişkide olduğu alanlar tekrar çalışılmıştır. Toplanan tohumlar serada saksılarda çimlendirilmiş kromozom sayımları

yapılmıştır. Kerrata'dan kuzey yönünde vadinin derin alt kesimlerinde, kireçli topraklarda diploid örnekler hâkim iken, tetrapoliploidler Kerrata'ya yakın alanlarda, karışık popülasyonlar ise vadinin en dar 2 bölgesinden toplanmıştır. Kerrata bölgesi bitkileri az tohum vermiştir. Özellikle vadinin daralan alanlarında diploid ve tetrapoliploidlerin yan yana yaşadığı rapor edilmiştir. Bu bitkiler çoğunlukla aynı vejetatif görünümde olmalarına ve birbirinden birkaç santim uzakta olmalarına rağmen, kromozom sayımları sonucu iki farklı sitotip özelliği göstermiştir. Kerrata bölgesinin dağ platolarından oluştuğu, yazın kuru akdeniz ve kışın yağışlı iklim koşullarına sahip olduğu belirtilmiştir. Bu iklimsel koşulların türlerin farklılaşmasında etkili olabileceği söylenmiştir. Örneklerin toplandığı Kerrata vadisinin 350 m derinlikte olduğu, örneklerin çoğunlukla dar ve derin alanlardan toplandığı aktarılmıştır. Yazların sıcak ve kurak olduğu bölgede, günün güneşli ve gölgelik geçtiği zamanların da *Dactylis* dağılımını etkilediği söylenmiştir. *Dactylis* örnekleri, özellikle gölgelik ve korunaklı uçurum kenarlarında veya sel yataklarının oluşturduğu barınaklarda toplanmışlardır. Morfolojik olarak bazı ayırt edici özellikler, renk, tüylülük, yaprağın dişli olup olmaması, bitki saplarının tabanda dallanma yapması gibi saptanmış fakat sitotiplerin bu karakterler açısından büyük farklılıklar göstermedikleri aktarılmıştır. Farklı kromozomlara sahip sitotiplerin çiçek açma zamanlarında aynı bulunmuştur. Bu durumun hibridizasyon için elverişli olacağı söylenmiştir. Genel olarak tetrapoliploidler bekçi hücreleri, ligula uzunluğu, yaprak uzunluğu ve sap uzunluğu açısından küçük farklılıklar gösterebilir, bu karakterler sitotipleri ayırt etmede çok da kullanışlı bulunmamıştır. Ayrıca bu farklılıkların çoğu tek bitki düzeyinde yaygın bulunmuştur. Araştırmacılar, Kuzey Afrika ikliminin 10.000 yıl önce sürekli kötüye gitmesi nedeni ile subsp. *mairi*'nin toplandığı alanlarda azalmış olabileceğini, tetrapoliploidlerin ise bu alanlarda arttığını aktarmışlardır. Bu duruma dayanılarak, relik *mairi* habitatlarının otopoliploidi için iyi bir örnek teşkil ettiğini vurgulamışlardır. Örnek toplanan ikinci bölge, Sierra Nevada (İspanya) Granada yolu boyunca düşük rakımlarından zirveye kadar farklı lokasyonlarda toplanan subsp. *juncinella* popülasyonlarını içermektedir. Her lokasyona ait bitkiler aynı morfolojik özellikler göstermiştir. Temmuz başlarında diploid *juncinella* ve tetrapoliploid *hispanica* bitkileri tamamen başaklanmış, morfolojik farklılıklardan dolayı ikiside kolayca ayırt edilmişlerdir. Diploid subsp. *juncinella* 2500 m altı rakımlarda, şist tabanlı kayalar üzerine yayılmış iri kaya parçası veya çıkıntı halinde kayaların oluşturduğu bir arazide, kaya aralarında veya çatlaklarında veya ince mikalı toprak gibi özel habitatlarda gözlemlenmiştir. Örneklerin toplandığı bazı yerlerde yaz boyu kar kümeleri görmenin mümkün olduğu söylenmiştir. Bu tip alanlarda toplanan diploid subsp. *juncinella* bitkilerinin, tabanda yoğun fibril bir yapı, kaba ve odunsu gövdeler (stem), her biri

kısa ve yoğun bir başakla biten ince şeritsi çiçek sapları, başaklar çeşitli sayılarda küçük çiçeklerden oluşmuş ince başakçıklara sahip bulunmuştur. Glumeler görece uzun kılçıklara sahip, epidermal hücreler oldukça uzun ve dar olarak belirlenmiştir. Subsp. *hispanica* diploid *juncinella*'nın yetiştiği alanların dışında, 2500 m rakımın altında özellikle kumlu topraklarda toplanmıştır. Bitkinin adapte olduğu yerler, zeytin ağaçlarının bulunduğu alanlar, kurakçıl alanlar, kumca zengin ve benzeri farklı habitat özellikleri sergilemiştir. Morfolojik olarak oldukça geniş ve farklı oranlarda bölünmüş çiçek yapısı ile dikkat çeken *hispanica*'nın, çiçek sapı 10 cm çivarında ölçülmüştür. Bitki kümelenmiş geniş başakçıklar, gulumlar kısa kılçıklı ve tabandaki internod uzunluğu ile karakterize morfolojik karakter özellikleri sergilemiştir. Relikt diploid subsp. *mairi* özel habitatında kendine benzer tetrapoliploidler ile beraber gözlemlenmiştir. Özel korunmuş bir habitatta diploid ve tetrapoliploidlerin bir arada yaşaması otopoliploidiye kanıt olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, interpoliploid simpatrik alanların 2 şekilde oluşabileceği kanısına varılmıştır. Birincisi doğal habitatların değişmesi ve izole olması sonucu morfolojik olarak farklı ve kısmen ayrı yaşayan  $2n$  ve  $4n$  bitkileri karışık yaşamaya başlamak zorunda kalırlar. İkincisi diploid habitatlarda otopolizasyon sonucu tetrapoliploidlerin oluşması ve bir arada yaşamaya başlamaları şeklinde yorumlanmıştır. Arkasından farklı diploid ve tetrapoliploidler arası hibridizasyon ile cinse ait çeşitliliğin zamanla gelişmiş-olabileceği öngörülmüştür. Kerrata bölgesinden toplanan bitkilere ait çimlendirilen tohumlardan triploid veya tetrapoliploid bitkiye rastlanmamıştır. Araştırmacılar, bunun sebebinin az örnekle çalışmaya bağlamışlardır. Aynı zamanda diploid bitkilerden direk indirgenmemiş gametler ( $2n$ ) aracılığıyla tetrapoliploid bitkilerin oluşması durumunun, triploidler ile geri çaprazlanması sonucu oluşmasından daha etkili olduğunu savunmuşlardır. Birçok durumda çevresel faktörlerin kademeli değiştiği, bu yüzden popülasyonların dağılımı ile ilgili değişimlerin ani gelişebileceği üzerinde durulmuştur. Bu gerçeklikler göz önüne alındığında, her poliploidi seviyesinin kendi adaptasyonunu sağlayacak şekilde evrildiği söylenmiştir. Diploid ve tetrapoliploidlerin herhangi bir alanda bir arada bulunması, formlara ait kromozomlar arası denge, çevresel koşullar ile diploid ve tetrapoliploidlerin kendi özel durumlarına bağlanmıştır. Bu faktörlere küçük korunaklı alanlarda yaşayan diploidlerin hayatta kalması için poliploidi seviyelerini yükseltmeleri böylece tetrapoliploidler tarafından sarılmaları da (parapatik türleşme) eklenmiştir (Borrill ve Lindner 1971).

Fransa alplerinde, tetrapoliploid *Dactylis g.* subsp. *reichenbachii* Alpin meraların güney yüzünde, 2000 m rakımlarda ve dolomitik topraklarda, *D. g.* subsp. *glomerata* ise 1900 m rakımlarda daha çok şist toprak yapısında olan mera alanlarından toplanmıştır. Her iki

taksona ait 2'şer popülasyon toplayan araştırmacılar, her popülasyona ait 20 bitkinin poliploidi seviyesini flow sitometri ile belirlemişlerdir. Bu iki alt türe ait ara formlar çok az oranda ve sınırlı alanlarda görülmüştür. Bu duruma dayanarak, iki alt tür arası morfolojik ve fizyolojik farklılıkların adaptasyon açısından önemli olduğu söylenmiştir. Bu olguyu araştırmak için, iki örneğe ait sera ve tarla çalışmaları yapılmıştır. Kardeşlenme, çiçeklenme, tohum bağlama gibi özellikler araştırılmıştır. İki taksona ait fenotipik, fenolojik (çiçeklenme) ve coğrafik koşullara bağlı ekotipik çeşitlilik ile genetik farklılıklar arası ilişki karşılaştırılmıştır. Genetik ve çevre arası interaksiyon istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Farklı alanlardan toplanan tüm subsp. *glomerata* popülasyonları daha fazla kardeş sayısına, daha uzun yaprak ve boğum aralıklarına sahip bulunmuşlardır. Subsp. *reichenbachii* ise özellikle çiçekli sap ve yaprak uzunluğu bakımından tekdüze bulunmuştur. Fakat subsp. *reichenbachii* daha fazla tohum tutma oranına sahip bulunmuştur. Çalışma subsp. *glomerata*'nın dolomitik topraklarda yaygın olmadığını, subsp. *reichenbachii*'nin ise daha seçici topraklarda yaşadığını göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak; birbiri ile ilişkili aynı poliploidi seviyesine sahip, aralarında potansiyel üremenin olabileceği, yakın habitatlarda yaşayan, fakat farklı morfolojik ve fenolojik özelliklere sahip taksonların, çevresel koşullara bağlı olarak farklı adaptasyon ve türleşme durumları gösterebilecekleri söylenmiştir (Gauthier ve ark. 1998).

Avrupa'nın, Finlandiya, Polonya gibi bölgelerinde yapılan çalışmalar tetrapoliploid taksonların diploid subsp. *aschersoniana* alt türü ile morfolojik olarak çok benzer olduklarını göstermiştir. Aynı şekilde tetrapoliploid popülasyonlar, İsrail'de diploid subsp. *Judaica*, Rusya, Ermenistan, Kazakistan bölgelerinde ise subsp. *woronowii* diploid alt türüne benzer bulunmuştur. Coğrafik dağılış açısından cinse ait çalışmalar incelendiğinde, diploid ve tetrapoliploid ekotiplerin buldukları ekosistemler çeşitlilik arz etmekte, bu durum bitkilerin morfolojik özelliklerine de yansımaktadır. Diploid taksonlar dar, birbirinden uzak, çoğu endemik denilebilecek, çeşitli ekocoğrafyalarda vejetasyon göstermektedir. Diploid alt türlerden sadece subsp. *aschersoniana* alt türüne en fazla Avrupa merkezinde rastlanıldığı söylenmiştir. Fakat tetrapoliploid bitkilerin geniş alanlarda ve çoğu zaman belirli sınırların konulamayacağı çeşitli ekocoğrafyalarda yaşam sürdükleri belirtilmiştir. Polonya'da geniş bir alanda vejetasyon gösteren ve tek diploid *Dactylis* olarak belirlenen subsp. *aschersoniana*'nın aynı zamanda tetrapoliploid formlarının da bulunduğu belirtilmiştir. Bu diploid ve tetrapoliploid subsp. *aschersoniana* taksonlarının morfolojik olarak birbirlerine çok benzedikleri fakat dikkatlice incelendiğinde küçük farklılıklar bulmanın mümkün olduğu

söylenmiştir. Bahsi geçen sitotiplerin oluşması için diploid subsp. *aschersoniana* ile tetrapoliploid subsp. *glomerata* veya diploid subsp. *aschersoniana* ile tetrapoliploid subsp. *slovenica* arasında melezlenmenin olabileceği veya tamamen tetrapoliploid formların (subsp. *glomerata* ya da subsp. *slovenica*) değişime uğraması sonucu oluşabilecekleri tahmininde bulunulmuştur (Mizianty 1990, 1991a, b).

Diploid *Dactylis* bitkilerinin indirgenmemiş gamet oluşum oranını belirlemek amacıyla, 100 adet  $4n \times 2n$  çaprazına ait döller incelenmiştir. Çaprazlama sonucunda döllere ait poliploidi seviyeleri kromozom sayımı, DNA miktarları ise flow sitometri ile ölçülerek belirlenmiştir. Döllere ait polen çapları ölçülerek  $2n$  polen oluşum sıklığı belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca çalışmada farklı enzim lokuslarına ait atalar çaprazlanmış, elektroforez aracılığı ile döllere ait genotipler bu özellik açısından da incelenmiştir. Çalışma sonucunda alt türlere bağlı olarak test edilen bitkilerin %20-75'i  $4n$  döller vermiştir. Bütün çaprazlama sonuçları değerlendirildiğinde,  $2n$  polen frekansı %0.98 oranında bulunmuş fakat 6 genotipe ait  $2n$  polen frekansı farklı olarak, %8.04-14.35 oranları arasında çıkmıştır. Polen çapı alt türler arası farklılık göstermiştir. Popülasyon içi çeşitlilik, alt türler arası çeşitlilikten daha fazla bulunmuştur. Takson içi polen boyutlarının benzer olmaları ile tetrapoliploid nesiller verip vermemeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Rastgele belirlenen normal polen boyutu, her bir alt türe ait gruplarda benzer çıkmış, bitkilerin %70'inde  $2n$  polen oluşumu belirlenmiştir (Maceira ve ark. 1992).

İspanyanın Galiçya bölgesinde diploid ve tetrapoliploid *Dactylis* popülasyonları simpatrik halde yaşamaktadır. Morfolojik olarak ayırt edilemeyen bu sitotipler arası rekabet yetenekleri test edilmiş ve poliploidi oluşumunun doğası aydınlatılmaya çalışılmıştır. Galiçya'nın merkezinde 2 lokaliteden birinde 60 adet  $2x$  ve diğerinde 60 adet  $4x$  kök filiz (fide) deneme bahçesine dikilmiş, 5 yıl boyunca aynı koşullarda yetiştirilmiştir. Her genotipe ait bitkiler, en az 5 sıra olacak şekilde 3 kere klon şeklinde çoğaltılmıştır. En son klonlamadan sonra, aynı koşullarda yetiştirilmiş (üniform) fideler  $18 \times 18$  cm saksılara, dikilmiş, poliploidi seviyesi, bitki yoğunluğu (iki yoğunluk, saksılara 16 ve 36 bitki gelecek şekilde), genotip etkisi, bitkilerin kültür ortamı (tek sitotip veya karışık), sitotip içi ve arası rekabet gibi değerler ile hayatta kalma arası etkileşimler ölçülmüştür. Birinci yıl diploid ve tetrapoliploid örneklerin kardeşlenme dinamikleri birbirine benzer özellikler göstermiştir. Sezon sonunda bitki başına kardeşlenme sayısına, yoğunluk (bitki yoğunluğu) ve genotip etkisi istatistiksel olarak çok önemli bulunmuştur. Her iki genotipte kardeşlenme sayısı ilkbahar sonrası

azalmış veya durmuştur. İzole bitkilerde yazında kardeşlenme devam etmiştir. İki yılsonunda tetrapoliploidlerin biomas ağırlığı diploidlerinkinden oldukça yüksek bulunmuştur. Genotip, bitki başına kardeşlenme ve biomas üzerine çok önemli derecede, bitki başına başak sayısına ise önemli derecede etki etmiştir. Her iki sitotipte, seyrek ortamda sık bitki ortamına göre ve tek tip kültür ortamından karışık kültür ortamına göre daha yüksek oranda tohum vermiştir. Diploidler için, sitotipler arası yarış katsayısı sitotipler içi katsayıdan önemli derecede büyük çıkmıştır. Tetrapoliploidler için bu durum istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Tetrapoliploidlerin rekabet gücü yüksek bulunmuştur. Bu durum 2x ve 4x bitkilerin karışık yetiştiği ortamda 2x bitkilerin yıllara göre artacak şekilde ölmelerine veya çiçek gelişiminin durması ile sonuçlanmıştır. İzole ortam koşullarında, tetrapoliploidler yoğun bitki ortamına göre daha başarılı büyümüştür. Tetrapoliploidlerin erken ilkbaharda hızlı ilk yaprakçık çıkışı direk poliploidi seviyesi ile ilişkili bulunmuştur. Bu şekilde düşük sıcaklığa rağmen bitkiler etkili bir şekilde fotosentez yaparak gelişimlerini sürdürmektedir. Tetrapoliploidlerin üstün rekabet yeteneği poliploidleşme sonrası farklılaşan genotip ile ilişkilendirilmiştir. Tetrapoliploid bitkilerin üstün rekabet gücü, kardeşlerin ortalama ağırlıklarının yüksek oluşu ve özellikle karışık kültür ortamı ile ilişkili bulunmuştur. Tetrapoliploidler aynı zamanda, daha yüksek tohum ağırlığı, erken ilkbaharda hızlı yaprak çıkışı ve erken çiçeklenme özellikleri göstermiştir. Sitotipler arası bazı farklılıklar poliploidi seviyesi ile ilişkili bulunmuştur. Tetrapoliploidlerin rekabet güçlerinin fazla oluşu tetrapoliploidlerin daha yaygın ve geniş coğrafyalara yayılabilmelerini açıklamaktadır (Maceira ve ark. 1993).

*Dactylis glomerata* L.'ya ait 9 diploid (2x) ve 5 tetrapoliploid (4x) alt tür karşılıklı (reciprocal) çaprazlanmıştır. Elde edilen 3x ve 4x dölleri, erkek kısırlık ve bazı fenolojik (çiçeklenme süresi, tohum tutma oranı, tohumların çimlenme durumları) özellikler açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada triploid döllere ait ebeveynlerin genetik uzaklıkları ile fertil olmayan (kısır) çiçeklerin oluşum sıklığı arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur. Bu durumun yakın akraba alt türlerin oluşturduğu triploid soylarda fertiliteye karşı bir seçim olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. 4x soylara ait parantel alt türler arası genetik uzaklık ile fertil başak sayısı, polen yaymayan başak sayısı ve steril başak sayısı arasında ve 3x soylara ait fertil başak ve fertil olmayan polen oluşturan başak sayısı arasında önemli bir bağlantı bulunmamıştır. 4n döllere ait başak veren bitkilerin %60'ı tamamen üretken (fertil), %24 ise tamamen verimsiz bulunmuştur. Üreme yeteneğine sahip 3x bitkilerden %63'ü erkek kısır, %31 çeşitli oranlarda fertil başaklara ve %6'sı ise tamamen fertil başaklara sahip bulunmuştur. Meydana gelen hibrit bitkilerdeki erkek kısırlığı poliploidi seviyelerine veya

diploid ataların cinsiyetine bağlanmıştır. Hibritlerin fertil olması durumunda, erkek kısırlığı her iki faktörün de etkileşimine bağlı bulunmuştur. Dişi bitki tetrapoliploid olduğu zaman, vejetatif 4x bitki sayısı 3x bitki sayısından fazla bulunmuştur. Ancak dişi bitki diploid olduğunda 4x ve 3x bitki sayısı birbirine yaklaşık bulunmuştur. Fertil başaklardaki polen canlılığı (anter açan), polen yaymayan (anter açmayan) başaklardan, anter açmayan bitkilerin polen canlılığı ise fertil olmayan başaklardan çok daha yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda fertil başakların tohum tutma oranı diğer iki duruma göre daha yüksek çıkmıştır. Ancak fertil bitkilerin, polen yayan ve anterleri fertil olmayan bitkilere ait tohumların çimlenme oranlarında farklılık bulunmamıştır. Bu yüzden melezleme sonucu 2n (indirgenmemiş gamet) gamet aracılığı ile oluşmuş tetrapoliploidler, normal gamet ile oluşmuş triploidlerden daha üretken bulunmuştur. Körelmiş veya polen yaymayan anterlere sahip 3x bitkileri erkek kısır olup, anterleri düşük polen canlılığı ve açıkta tozlaşmanın olduğu koşullarda düşük tohum tutma kabiliyeti göstermişlerdir. Bu durumun muhtemelen erkek ve dişi organlarda mayoza bağlı anormalliklerden kaynaklandığı belirtilmiştir. Dahası triploid bitkilerin sayısının ve üretkenliğinin dişi bitkinin poliploidi seviyesine bağlı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar interpoliploid tetrapoliploidlerin 2n gametler (indirgenmemiş) aracılığıyla oluşması durumunda; farklı poliploidi seviyesine sahip alt tür veya popülasyonlar arasında coğrafik engel bulunmuyorsa, aralarında direk gen geçişi olabileceğini göstermiştir (Sato ve ark. 1993).

İspanya'nın Galiçya bölgesinde *D. glomerata*'ya ait 3 alt türden bahsedilmiştir. *Dactylis* popülasyonlarının Galiçya'nın kıyıya yakın bazı kesimleri dışında da yaygın oldukları belirtilmiştir. Yine bu popülasyonların bulunduğu bazı habitatların toprak tipi açısından sıra dışı (besince fakir, asitli, kayalık, çalılarla kaplı veya çok rutubetli topraklar) özellikler taşıdıkları not edilmiştir. Bunlardan tetrapoliploid subsp. *glomerata*'nın yayılış alanıyla ilişkili kesin sınırlar olmadığı ve daha çok diğer taksonlar ile beraber çalışıldığı bildirilmiştir. Subsp. *izcoi*'nin hem diploid hem de tetrapoliploid sitotipler içerdiği ve asidik topraklara adapte olduğu gözlemlenmiştir. Her iki poliploidi seviyesinin morfolojik ve coğrafik olarak benzer özellikler taşıdıkları eklenmiştir. Fakat tetrapoliploid bitkilerin erken çiçeklendiği, hücrelerinin, yaprak kını ve bitki boyunun diploidlerden daha büyük olduğu açıklanmıştır. Buna rağmen diploidler ortalama olarak daha kısa, açık renkli az sayıda yaprağa sahip bulunmuşlardır. Kardeşlenme sayısı fazla olduğundan, diploid subsp. *izcoi*'den iki çeşit geliştirilmiştir. 4x subsp. *izcoi* ve 4x subsp. *glomerata* alt türleri arasında hibritler görülmüştür. Kıyıya yakın bir bölgede subsp. *glomerata*'ya ait bir popülasyonun morfolojik

olarak 4x *izcoi*'ye benzediği aktarılmıştır. Subsp. *marina* doğal tetrapoliploid popülasyonları özellikle deniz kıyısında görülmüştür. Otunun hazmolabilirliği yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada *Dactylis* cinsinin sınıflandırılmasının farklı poliploidi seviyesi ve özellikle tetrapoliploidi seviyede serbest hibridizasyonun gerçekleşmesinden dolayı zor olduğu aktarılmıştır. Tetrapoliploid subsp. *izcoi* popülasyonlarının ekolojik dağılımları diploidlerinden daha fazla bulunmuştur. Diploid *izcoi* ve subsp. *marina* lokalasyonlarının önceden bildirilenlerden daha fazla olduğu açığa çıkartılmıştır. Subsp. *glomerata* ve *izcoi* arasında oldukça yakın morfolojik benzerlikler olduğu, alt türlerin farklı ekolojilere adaptasyon amaçlı hibridize oldukları bildirilmiştir. Bu alt türlerin asidik topraklar veya ağaçlık alanların otlandırılması amacı ile kullanılabilmesi belirtilmiştir (Lindner ve Garcia 1997).

*Dactylis glomerata* subsp. *izcoi*'nin İspanyanın kuzeyinde (Galiçya) endemik olduğu diploid ve tetrapoliploid sitotipler içerdiği bildirilmiştir. Diploid popülasyonlar dar alanlarda ve kendilerine has ekocoğrafyalarda toplanmıştır. Çoğu durumda kromozom sayımı yapılmadan sitotipleri birbirinden ayırmanın çok zor olduğu ancak dikkat edildiğinde diploidlerin geç çiçek açtıkları ve sindirimlerinin zaman aldığı bildirilmiştir. Yine diploidlerin soğuğa, *Mastigosporium albüm* ve nematotlara dayanıklı olduğu, tohumlarının daha küçük olduğu ve bitki gelişiminin daha yavaş olduğu bildirilmiştir. Diploid bitkilerin toplandıkları topraklar, fazla kış yağmurları nedeniyle yıkanmış ve asit karakter gösteren, granit, şist ve mikaşist kökenli bulunmuştur. Tetrapoliploidlerin bölge boyunca yaygın oldukları ve yayılıcı oldukları farklı habitatlara adapte oldukları gözlemlenmiştir. Yeni bulunan diploid lokaliteler daha çok "Macizo Galaico-Duriense" adlı dağ silsilerinde, meşe toplulukları etrafında belirlenmiştir. Galiçya içlerinde ise *Erico-Ulicietalia* (*Ericion australis* ve *Ulicion nanae*) bitkilerinin oluşturduğu fundalık alanlarda gözlemlenmiştir (Lindner ve ark. 2004).

Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Kurupelit kampüsünde 7 lokalitede *D. glomerata*'ya ait tohumlar toplanmış. Tohumlardan yetiştirilen bitkiler üzerinde 2 yıl süren bazı morfolojik ve sitolojik çalışmalar yapılmıştır. Tohumların alındığı bölgelerin toprak karakterleri belirlenmiş ve bitkilerin toprak açısından seçici olmadığı görülmüştür. Çalışılan tarımsal karakterlerin (tohum verimi, bin tane ağırlığı, tohum çimlenme gücü) çeşitlilik gösterdiği ve bu özelliğinden dolayı *Dactylis* bitkilerinin ıslah programlarında başarı ile kullanılacakları söylenmiştir. Tohumların çıkış güçleri ortalama % 51.7- 65.9 arası çıkmıştır. Çalışılan örneklerin hepsi tetrapoliploid bulunmuş, aneupoliploidiye veya B kromozomlarına rastlanmamıştır.



Aneupoliploid bitkilerin tohum tutma oranı çok düşük olduğundan, olatmaya bağlı, zamanla vejetasyondan yok oldukları düşünülmüştür (Ayan ve ark. 2006)

Cezayir’de farklı bioklimatik ve ekolojik (kıyı şeridi, tepeler gibi) lokalitelerde 30 *Dactylis* populasyonu morfolojik ve sitolojik açıdan değerlendirilmiştir. Araştırmada çeşitlilik gösteren sayısal verilerin daha kolay anlaşılması ve karşılaştırılması için (Principal Component Analysis) çoklu istatistik analiz yöntemi kullanılmıştır. Kromozom sayılarına göre, 30 örneğin 12’si diploid, 18 ise tetrapoliploid olarak belirlenmiştir. Diploidler mayoz diakinezinde bivalent eşleşmeler sergilerken, tetraploidler hem bivalent hem de tetravalent eşleşmeler sergilemiştir. Analiz sonuçları çalışılan bölgelerde tetrapoliploidlerin başlıca 2 grupta toplandığını göstermiştir. Birincisini, deniz falezlerinde (yalıyar, kayalık deniz kenarı) yayılım gösteren subsp. *marina* (Borrill) Greuter ve ikincisini, genel bir dağılımına sahip subsp. *hispanica* (Roth) Nyman alt türleri oluşturmuştur. Ancak subsp. *hispanica* (Roth) Nyman’a ait popülasyonlarda bazı bitkiler farklılıklar göstermiş, bu bitkiler subsp. *glomerata* Hayek. olarak belirlenmiştir. Bölgede daha önce 3 diploid alt tür tanımlanmıştır; subsp. *santai* Stebbins & Zohary, subsp. *castellata* Parker & Borrill, subsp. *mairei* Stebbins ve Zohary. Bu çalışmada dar bir alanda yayılma gösteren subsp. *mairei* ve çok sayıda morfolojik farklılık gösteren subsp. *santai* diploid form olarak bulunmuştur (Amirouche ve Misset 2007).

Farklı tohum bankalarından temin edilmiş 9 diploid ve bir adet yabancı tetrapoliploid *Dactylis*, bazı bitkisel ve tarımsal özellikleri ile karyomorfolojik özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Bitkisel ve tarımsal açıdan, bayrak yaprağı boyutları, sap uzunluğu, ana sap dal sayıları, habitusları, baş bağlama ve çiçeklenme zamanları, biçim sonrası büyüme gibi 19 karakter karşılaştırılmıştır. Farklı alt türler, bu karakterler bakımından farklı alt grup özellikleri göstermiştir. Pearson korelasyon katsayılarına göre bitki sap uzunluğu, bayrak yaprak boyutları, dal sayısı ve internod sayıları ile yüksek ve pozitif ilişki göstermiştir. Tetrapoliploid popülasyonlar diploidlerden daha erken baş vermiş yine biçimden sonra daha hızlı büyümüştür. Bitki yüksekliği, internod sayısı ve ilk 3 internod uzunlukları yüksek ve pozitif ilişki göstermiştir. Bitki sap özellikleri ve bayrak yaprağı boyutları dikkate alındığında, diploid taksonlar, *aschersoniana*, *himalayensis*, *parthiana*, *lusitanica*, Galiçya diploidleri bir gurubu, *castellata*, *judaica*, *santai*, *woronowii* ise ikinci gurubu oluşturmuştur. Bu sıralamada diploidler Avrasya ve Akdeniz coğrafya özelliklerine göre ayrılmıştır. Fakat diploid *lusitanica*’nın her iki coğrafya özellikleri gösterdiği vurgulanmıştır. Yine Avrasya ekotiplerinde baş çıkarma ve çiçeklenme sürelerinde farklılıklar belirlenmiştir. Örneğin

Galiçya diploidleri ve *parthiana* bitkileri aynı grupta yer alan *aschersoniana*, *himalayensis* ve *lusitanica* bitkilerinden 10 gün geç baş ve çiçek oluşturmışlardır. Özellikle Akdeniz ekotiplerinde biçim sonrası büyümenin çeşitlilik gösterdiği söylenmiştir. Bu özellik Avrasya ekotiplerinde özellikle *aschersoniana* ekotipinde belirlenmiştir. Bitki uzunluğunun çeşitlilik gösterdiği fakat bu farklılıkların morfo-coğrafik sınıflandırmada işe yaramadığı belirtilmiştir. Bütün diploid taksonların kromozom sayısı  $2n=14$  bulunmuştur. Sadece *judaica* alt türüne ait bir bitkide kromozom sayısı  $2n=21$  bulunmuştur. Taksonlara ait karyomorfolojik özellikler genellendiğinde, kromozom uzunlukları, sentromer konumları, sekonder yapıların sayısı ve lokasyonlarının hemen hemen aynı olduğu belirtilmiştir. Simetrik karyotipler göz önüne alınarak, çalışılan diploidlerin hepsini karşılayacak şekilde  $1m + 3m^{sat} + 3sm$  karyotip formülü yazılmıştır. Kromozom uzunluklarının  $2.83-4.47 \mu m$  aralığında ölçülmüştür. Diploid *aschersoniana* karyotipi standart alındığında, 1, 2 ve 4. kromozom çiftleri median sentromerli bulunmuştur. Bu kromozomlar uzun kollarında proksimal bölgede sekonder boğum varlığı göstermiştir. 1. ve 2. kromozom çiftleri boy ve morfolojik olarak çok benzer olduklarından, fotomikrograflarda ayırt edilememiştir. Bu yüzden bu kromozomların homologları ile eşleştirmeleri ve karyotipteki yerleri rastgele yapılmıştır. 3. kromozom çiftinde median sentromerli olduğu geriye kalan kromozomların hepsinin submedian sentromerli oldukları belirlenmiştir. 5. ve 6. kromozomların uzunluk olarak çok az farklılık gösterdikleri fakat 7. kromozom en kısa uzunluğa sahip olmasıyla geriye kalan bütün kromozomlardan kolayca ayırt edilebildiği bulunmuştur. Bir adet triploid *judaica* bitkisinin varlığı, triploid bitkilerin popülasyon içinde  $n$  ve  $2n$  (indirgenmemiş) gametlerin birleşmelerinden oluşmuş olabilecekleri şeklinde yorumlanmıştır (Falistocco ve Torricelli 2016).

### 2. 5. 3. Moleküler çalışmalar

Galler Bitki Islahı İstasyonundan (Aberystwyth, Wales) ve 24 farklı lokaliteye ait 14 diploid takson ile özellikle Kuzey Afrika ve Avrupa menşeli 41 tetrapoliploid (subsp. *glomerata*, *hispanica*, *marina*,) popülasyondan oluşan bir *Dactylis* koleksiyonu oluşturulmuştur. Bu alt türlerden subsp. *glomerata* sıcak-ılıman bölgelerden, subsp. *hispanica* Akdeniz ikliminin etkin olduğu bölgelerden, subsp. *marina* ise subtropikal iklimin etkin olduğu deniz kıyılarından toplanmıştır. Çalışmada *Dactylis* cinsine ait poliploidi kompleksi içerisinde filogenetik ilişkiler moleküler düzeyde araştırılmıştır. Bunun için öncelikle kontrollü serada bitkiler yetiştirilmiş, bazı diploid ve tetrapoliploidler arası melezleme ve

kendilemeler yapılmıştır. Örneklerden toplanan yapraklar ve polenler dimerik özellik gösteren Fosfoglikoz İzomeraz gen çeşitliliğini analiz etmek amacıyla kullanılmıştır. Fosfoglikoz İzomeraz enziminin 2 formu bulunmaktadır. Bu formlardan biri sitoplazmada diğeri kloroplastlarda bulunmaktadır. Form I ünitesi kloroplast, form II ünitesi ise sitoplazmik tip olarak adlandırılmaktadır. Polenlerden sadece form II enzim alt üniteleri elde edilmiştir. Yapraklardan ise her iki form elde edilmiştir. Dimerik enzimler, farklı alt ünitelerden oluşmuş ve farklı lokuslar tarafından sentezlenmektedir. Bu yüzden aynı lokusa ait enzim üniteleri benzer elektroforetik özellikler gösterir. 17 *Dactylis* örneğine ait Fosfoglikoz İzomeraz elektroforetik bantları değerlendirildiğinde, enzime ait 2 lokusun oldukça polimorfik olduğu, ilişkili diğer lokusların ise benzer oldukları görülmüştür. Buna dayanarak 2 lokustan birinin gen duplikasyonu ile diğerinden kökenlendiği söylenmiştir. Fosfoglikoz İzomeraz gen duplikasyonuna tüm tetrapoliploid *Dactylis* örneklerinde rastlanmıştır. Bu da *Dactylis* cinsinin monospesifik olduğunu göstermektedir. *Dactylis*'lerde Fosfoglikoz İzomeraz gen duplikasyonunun varlığı, tetrapoliploidlerin, diploid atalarından otopolipdizasyon sonucu oluştuklarına kanıt sayılmıştır. Bu enzim ile ilgili genetik yapının hem diploid hem de tetrapoliploidlerde korunmuş olmasının muhtemel sebepleri: Diploidlerde, gen rekombinasyonlarına bağlı gen sezgisizliği hızının azalması, düzensiz enzim sentezi veya enzim özelliklerindeki bazı farklılıklara dayandırılmıştır. Böylece farklı allelerin bir araya gelmesi hayatta kalmak için bir avantaj sağlayacaktır. Tetrapoliploidlerin otopoliploid genetik yapısı, bu enzimin duplike genlerce ekspresse olmasını açıklamaktadır. Ancak tamamen heterozigositeden bahs edilemeyeceği, muhtemelen homeoalleller arası negatif heterodimerik interaksiyonların oluşturduğu bir allopoliplidizasyondan da bahs edilebileceği vurgulanmıştır (Lumaret 1986).

Doğal floradan toplanan diploid *lusitanica*, tetrapoliploid *glomerata*, *marina* ve simpatrik (2x, 4x) Galiçya popülasyonları, kloroplast DNA (kpDNA) tipleri bakımından karşılaştırılmıştır. Bunun için örneklere ait kloroplast DNA'ları 11 adet farklı restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Enzimlerin oluşturduğu fragmentler MBMK, MBmK ve mBMK şeklinde 3 farklı kloroplast DNA tipi oluşturmuştur. Gözlemlenen bu kloroplast DNA çeşitliliğinin popülasyonlar içinde 3 farklı aşamada geliştiği söylenmiştir. MBMK kpDNA tipi çalışılan bütün poliploidi seviyelerinde ortak bulunmuştur. MBmK kpDNA tipi sadece bir tetrapoliploid bitkide belirlenmiş olup, muhtemelen son zamanlarda gelişmiş olan bir mutasyondan kaynaklandığı belirtilmiştir. mBMK kpDNA tipi özellikle diploid ve tetrapoliploid Galiçya örneklerinde gözlemlenmiş olup, bu durumun Galiçya

tetrapoliploidlerinin muhtemel kökeni hakkında kanıt sunduğu söylenmiştir. Bu kanıt Galiçya diploidlerinin tetrapoliploidlerin anne tarafından atası olduğunu göstermektedir. Bu sonuç daha önce yapılan morfolojik ve kimyasal çalışma sonuçları ile bütünleşmektedir. Yani bu bölgedeki tetrapoliploidlerin otopoliploidizasyon sonucu oluştuğu daha kuvvetli görünmektedir (Lumaret ve ark. 1989).

Montpellier (Fransanın güneyi) bölgesinde 290 m yükseklikte kireçli toprakların hâkim olduğu alanlardan 448 *D.g. subsp. hispanica* bitkisine ait tohumlar toplanmıştır. Bölge yarı nemli ve istikrarsız bir Akdeniz iklimine sahip olması ile karakterizedir. Bitkilere ait, bitki boyu ölçümleri doğal alanlarında, diğer bazı morfolojik özellikler kontrollü sera ve sonrasında tarla denemelerinde yetiştirilen bitkiler üzerinde yapılmıştır. Kalitatif kalıtılan morfolojik karakterler ile heterozigosite düzeyi ilişkilendirilmiş, karakterlerin çeşitliliği ile farklı enzimlere ait lokusların ilişkisi, kalitatif karakterler ve özel bir lokusa ait heterozigosite ile herhangi bir seviyedeki heterozigotluk ilişkisi, bitkilerin bütün verimi ile ilgili özel genetik kombinasyonların varlığı araştırılmıştır. Çalışmada 8 enzim lokusuna ait tek veya çoklu allel polimorfizmi arası ilişki ile bazı morfolojik karakterlerin (bitki genişliği, yaprak ağırlığı, başak sayısı) çoklu kalıtsal özellikleri karşılaştırılmıştır. 448 bitki, 7 enzim lokusu açısından araştırılmış bu bitkilerden 288 tanesi fazladan bir lokusa daha (8.) sahip bulunmuştur. Heterozigosite seviyesine göre 5 farklı genotip sınıflandırması (monogenik, simpleks, dubleks digenik, trigenik ve tetragenik) yapılmıştır. Multilokus heterozigosite durumu, çalışmada hesaplanan yaprak ağırlığı ve başak verimi ile önemli pozitif bir ilişki gösterirken, doğal şartlarda ölçülen bitki boyu ile böyle bir ilişki bulunmamıştır. Çeşitliliğin oluşmasında çevresel koşulların rolünün etkisinin büyük olduğu söylenmiştir. Multilokus enzim çeşitliliği, heterozigot lokus ve lokus başına farklı allellerin sayısına bağlanmıştır. Bu durumun kantitatif karakterlerin performansını etkilediği söylenmiştir. Çalışmada, GOT1 ve PX1 enzim lokuslarının oldukça polimorfik oldukları, GOT1 lokusunun heterozigosite seviyesinin artışı ile başak sayısının arttığı belirtilmiştir. Bununla beraber yaprak ağırlığı ve başak sayısındaki artış PX1 lokus heterozigositesine bağlı bulunmuştur. Bazı varyasyonların bu lokuslar veya ilişkili lokusların heterozigot dominantlık (overdominance) seviyesine bağlı olabileceği tahmin edilmiştir. Bu şekilde heterozigot genotiplerin oluşturdukları fenotipler sıra dışı çevresel koşullara, homozigotlardan daha iyi adapte olmaktadır. GOT1 lokusu homozigotlaştıkça yaprak verimliliğinin arttığı söylenmiştir. Geriye kalan 6 lokus ile 5 farklı genomun kantitatif karakter kalıtımı arasında önemli bir ilişki saptanmamıştır. Özetle GOT1

ve PX1 enzim lokuslarına ait heterozigosite, yaprak ağırlığı ve başak sayısı verimi üzerine etkili bulunmuştur (Tomekpe ve Lumaret 1991).

Subtropikal iklim koşullarının hâkim olduğu Atlantik bölgesinden 15 *Dactylis* popülasyonuna ait genetik ve coğrafik ilişkiler, 8 polimorfik Alloenzim lokus allel çeşitliliği üzerinden araştırılmıştır. 3 diploid popülasyon Tenerife adasından toplanmış ve subsp. *smithii* olduğu belirlenmiş, 3 diploid subsp. *hylodes* Madeira adasının iç kısımlarından toplanmıştır. Morfolojik olarak farklı fakat tanımlanmamış olan 2 tetrapoliploid popülasyon Grand Canary adasından, 4 tetrapoliploid subsp. *marina* Madeira adasının kıyı kesimlerinden, 3 tetrapoliploid subsp. *marina* popülasyonu Portekiz kıyılarından toplanmıştır. Enzim analizi, Madeira adasına ait popülasyonlardan *in situ* toplanan yaprak örnekleri üzerinde, geriye kalan popülasyonlarda ise tohumlardan yetiştirilen fidelerden elde edilen yapraklar üzerinde uygulanmıştır. Bitkilere ilişkin poliploidi seviyeleri, köklerden kromozom sayımı ve flow sitometri yöntemleri ile belirlenmiştir. Popülasyon başına ortalama 26 bitki, 8 enzim lokusu bakımından, hem aynı alt türlere sahip popülasyonlar içi hem de popülasyonlar arası ortalama allel sayısı ve ortalama heterozigozite açısından karşılaştırılmıştır. Diploid örneklere ait 16 allel, tetrapoliploid örneklere ait 24-25 allel olmak üzere toplamda 37 allel hesaplanmıştır. Diploidlerde gözlemlenen allellerin hepsi tetrapoliploidlerde de gözlemlenmiştir. Ancak tetrapoliploidlere özgü hesaplanmış 21 allelin, 6 tanesi Grand Canary, 3 tanesi Madeira adasına ait hem iç hem de kıyı kesimlere, 1 tanesi sadece Madeira kıyı bölgesine, 4 tanesi Portekiz ve 7 tanesi bazı örnekler için yaygın bulunmuştur. Genetik olarak 4 farklı grup belirlenmiştir. 1.'sini Tenerife adasında endemik olan diploid subsp. *smithii*'e ait popülasyonlar oluşturmuştur. 2.'sini Grand Canary adasında yetişen ve morfolojik olarak farklılık gösteren tetrapoliploid popülasyonlar oluşturmaktadır. 3. gurubu Madeira adasına ait iç ve kıyı bölgelere ait muhtemelen tetrapoliploid subsp. *hylodes*'in 2 farklı ekotipi olan örnekler oluşturmuştur. 4. gurubu Portekiz kıyılarından toplanan tetrapoliploid subsp. *marina* örnekleri oluşturmuştur. Araştırmacılar, subtropikal *Dactylis* örneklerine ait enzim allel çeşitliliğini, kısmen örneklerin toplandığı bölgeler arası coğrafik sürekliliğin olmamasına (özellikle GOT1 enzimine ait özel bir lokus) ve çoğunlukla Atlantik Okyanusu'nun iklimsel etkisinin oluşturduğu nemli koşullara adaptasyona bağlamışlardır (Sahuquillo ve Lumaret 1995).

Atlantik etkisi altındaki bölgelerden toplanan 15 *Dactylis* popülasyonu, içerdikleri fenolik bileşik kompozisyonlarına göre karşılaştırılmıştır. Subtropikal iklim özelliklerine

sahip lokasyonlardan, 3 diploid subsp. *smithii* popülasyonu Atlantik Tenerife adasından, iki isimsiz tetrapoliploid Atlantik Grand Canary adasından, 5 populasyon Atlantik Madeira adasından (bunların ikisi iç bölgelerde tetrapoliploid subsp. *hylodes*, 3 populasyon ise kıyı kesimlerinde toplanan tetrapoliploid subsp. *marina* örneklerine ait) toplanmıştır. Ayrıca 3 tetrapoliploid subsp. *marina* örneği Portekiz kıyılarından, bir tetrapoliploid subsp. *marina* popülasyonu ise Portekiz'in merkez batı sahillerini oluşturan Nazare'den toplanmıştır. Bir başka tetrapoliploid subsp. *marina* popülasyonu ise Canary adlarından La Palma'dan toplanmıştır. Geriye kalan 5 gurup *Dactylis* örneği Akdeniz ve orta ılıman iklime sahip lokasyonlardan toplanmıştır. Bunlardan 3'ü subsp. *mairei* Cezayir'den, 1 tetrapoliploid subsp. *hispanica* Fransanın Montpellier bölgesinden, orta derece ılıman iklim kuşağına ait 1 popülasyon subsp. *reichenbachii* ile 1 popülasyon subsp. *glomerata* ise Fransa'nın Vanoise Alplerinden toplanmıştır. Bir popülasyon ise ılıman iklim kuşağı ile Akdeniz iklim kuşağı arası geçit özelliğine sahip olan İspanya'nın kuzey batısında bulunan Santiago bölgesinden toplanmıştır. Tohumlardan yetiştirilen bitkilerden alınan yaprak örneklerine ait fenolik bileşikler özümlemiş, devamında fenolik bileşiklerin profillerinin belirlenmesi için örnekler HPLC cihazı ile okunmuştur. Elde edilen kromotografik değerler spektrofotometre ile değerlendirilmiştir; elde edilen sayısal değerler çoklu analize (Principal Component Analysis) tabi tutulmuştur. Grup analizi sonuçlarına göre incelenen 126 bitki, 6 farklı gurup ile karakterize edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, Madeira adasına ait kıyı tetrapoliploidi subsp. *marina* örnekleri ile Portekiz kıyılarına ait subsp. *marina* örnekleri daha önceki çalışmalarda morfolojik olarak aynı bulunmuşken, bu çalışmada fenolik özellikleri oldukça farklı çıkmıştır. Önceki enzim çalışmaları ile birlikte bu örneğin subsp. *hylodes*'in bir ekotipi olabileceği söylenmiştir. Şaşırtıcı şekilde bazı Portekiz kıyı örnekleri Madeira adası iç kesimlerde toplanan örneklere, Madeira kıyı kesimlerinde toplanan örneklerden daha yakın çıkmıştır. Grand Canary adası hariç diğer subtropikal *Dactylis* örnekleri fenolik kimyası bakımından bir homojenlik göstermiştir. Bu farklılığın sebebi, bitkilerin yüksek rakımlarda yaşamaları ve yüksek nemden uzak olmaları sonucu, zamanla kimyasal farklılıklar geliştirmiş olabilecekleri şeklinde yorumlanmıştır. Subtropikal bitkilerin orta ılıman bölgelerdeki akrabalarına göre oldukça düşük oranlarda mono-C-glycosyl luteolin bileşikleri içerdikleri gözlemlenmiş, buna rağmen subtropikal ve Akdeniz örnekleri benzer fenolik kompozisyon göstermiştir. Subsp. *reichenbachii* ait örnekler morfolojik ve habitat özellikleri bakımından Akdeniz tipi özellikler gösterirken, fenolik yapı bakımından orta ılıman iklim bölgesine ait gurub özellikleri gösterdikleri saptanmıştır. Bu durum orta ılıman bitkilerin subtropikal veya kurak koşullar yönünde bir yayılım göstermiş olabilecekleri şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmada 4 veya 5 subtropikal tetrapoliploid *Dactylis* popülasyonu benzer fenolik kompozisyon göstermiş ve orta ılıman subsp. *Dactylis* örneklerinden açıkça ayrılmıştır. Akdeniz tetrapoliploidleri bu iki grup arası özelliklere sahip bulunmuştur (Jay ve Lumaret 1995).

*Dactylis glomerata* bitkilerinin habitat özelliklerinin, morfolojik ve alloenzim özellikleri ile karşılaştırmak amacıyla, Fransa Alplerinde Vanoise dağ silsilesi ile çevrili birbiri ile bağlantılı 3 vadiye ait toplam 7 popülasyon toplanmıştır. Bitkiler vadi tabanından itibaren farklı yükseltiler, uçurum kenarları, kayalık alanlar, ıslak alpin mera alanları, şist, dolomitik, kalkerli gibi farklı toprak faktörlerinin etkili olduğu lokalitelerden toplanmıştır. Flow sitometri ile poliploidi seviyesi belirlenen popülasyonlardan 2 tanesi tetrapoliploid *D. g.* subsp. *reichenbachii* olarak kayıt edilmiştir. Bu alt tür diploid ve tetrapoliploid sitotiplere sahip olup, meraların güney yüzlerinde, dolomitli topraklarda habitat edinmiştir. Geriye kalan 5 popülasyon morfolojik olarak orta seviyeli karakterlere sahip olup *D. g.* subsp. *glomerata*'ya oldukça benzerlik gösterdikleri söylenmiştir. Bu bitkilerin çiçeklenme süreleri farklılıklar göstermektedir. Popülasyonlar 8 farklı polimorfik enzim lokusu olmak üzere toplamda 9 lokusa sahip bulunmuş, alloenzim özellikleri bakımından popülasyonların hepsi daha çok subsp. *reichenbachii*'ye benzer bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanılarak 2 tetrapoliploid alt tür arasında gen geçişi olduğu, morfolojik ve enzim çeşitliliği sebebinin seleksiyona bağlı olabileceği söylenmiştir (Gauthier ve ark.1999).

İspanya'nın Galiçya bölgesinde (İspanya'nın kuzey batısı) *Dactylis* tarımının yapılmadığı 3 farklı lokaliteden Domuz ayrığı popülasyonları toplanmıştır. Kıyı ve iç kesimlerde toplanan diploid ve tetrapoliploid taksonlar arası genetik ilişkiyi belirlemek amacı ile 2 farklı tarla denemesi kurulmuş, örneklerin morfolojik ve enzim özellikleri karşılaştırılmıştır. Galiçya bölgesine özgü 4 ekotipe ait toplamda 30 popülasyon, 23 tanesi iç bölge tetrapoliploidi, 3 popülasyon diploid subsp. *izcoi*, 3 popülasyon papilar yapı göstermeyen kıyı tetrapoliploidi ve bir popülasyon subsp. *marina* çalışmalarda kullanılmıştır. Her popülasyondan 40 adet tohum petri kaplarında çimlendirilmiş, çimlenen fideler daha sonra serada saksılara dikilmiş ve yeterince büyüyen fideler tarlaya şaşırtılmıştır. Her deneme, her popülasyona ait 30 bitki ve her blokta 10 bitki olacak şekilde tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü kurulmuştur. Birinci tarla denemesinde, baş bağlama zamanı, vejetatif büyüme evreleri (kış, erken ilkbahar, yaz büyümeleri ve verimleri) bayrak yaprağı uzunluğu ve eni, yaprak kımı uzunluğu, pasa direnç gibi agromorfolojik karakterler

ölçülmüştür. İkinci tarla denemesi, 10 adet tetrapoliploid popülasyon, 4 tanesi kıyı subsp. *marina* popülasyonu, 6 tanesi ise iç bölgelerden toplanmış bitkilerden kurulmuştur. Bu denemede agromorfolojik özellikler daha kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Alloenzim analizi için her popülasyondan 20 bitki seçilmiş ve 3 enzime ait gen bölgeleri elektroforetik yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Peroksidaz (PX1) ve fosfoglikoizomeraz (PGI1-2, duplike gen içermekte) nişasta jel elektroforezi, tetrazolium oksidaz (TO1) sekanslarına ait bantlar ise poliakrilamid jel elektroforezi ile çalışılmıştır. Birinci tarla denemesinde ekotiplerin sahip olduğu, baş bağlama zamanı, bayrak yaprağı ölçüleri, büyüme durumları ve güçleri arasında önemli farklılıklar ölçülmüştür. Kıyı *Dactylis* varlıklarının pasa en dayanıklı oldukları gözlenmiştir. 10 tetrapoliploid ve bir diploid subsp. *izcoi* popülasyonun kullanıldığı enzim çalışmasında, her popülasyon 3 enzime ait bant özellikleri göstermiştir. Bu sonuca dayanarak, kıyı popülasyonları ile iç bölge popülasyonları arasında gen akışı olduğu açıklanmıştır. Tetrazolium oksidaz'a ait allellerin tüm popülasyonlarda görülmesi, kıyı ve iç bölge ekotiplerinin hepsinin subsp. *izcoi* olabileceğini göstermiştir. Ancak, salkım sapı ve boyu, 10 tetrapoliploid için, 1. tarla denemesinde (1997) subsp. *izcoi* için ölçülen değerlerin arasında değerler gösterirken, ikinci denemede (1998) bütün popülasyonlarda bazı bitkiler için bu değerler artmıştır. Buna dayanarak subsp. *izcoi*'nin kıyılarda da yetişebileceği ve alt tür olarak adlandırabileceği sonucuna varılmıştır. Bazı popülasyonlara ait sezon büyümeleri birbirine çok yakın bulunmuştur. Bazı popülasyonlar arası melezleme sonucu elde edilecek nesillerin sıcağa dayanıklı olabileceği bildirilmiştir (Lindner ve ark. 1999).

Macaronesia (Madeira ve Kanarya adaları) adalarında bazıları endemik diploid ve tetrapoliploid *Dactylis* taksonları ile bu adalara yakın Kuzey Afrika'nın batı ve Avrupa'nın güney kesimleri ile ilişkili karasal alanlarda *Dactylis* örnekleri toplanmıştır. Toplamda 6 diploid ve 15 tetrapoliploid *Dactylis* varlığına ait kloroplast DNA fragmentleri, filogenetik ilişkileri belirlemek amacı ile RFLP (parça uzunluğu polimorfizim) belirteçleri ile taranmıştır. Her popülasyona ait tohumlar toplanmış ve en az 2 ay sera koşullarında yetiştirilmiştir. Yaprak dokusu kuru buza konmadan önce, bitki örnekleri 36 saat karanlıkta nişastalarının parçalanması için bekletilmiştir. Kuru buz örneklerinden 2 şer g toz halinde alınan yaprak örneklerinden izole edilen kloroplast DNA' ları analiz için kullanılmıştır. 121 bitki örneğine ait DNA örnekleri 8 endonükleaz enzimi ile kesilmiş, oluşan fragmentler jel elektroforezinde koşturulmuştur. Oluşan 191 farklı fragmente ait jel örnekleri UV ışık altında görüntülenmiştir. Elde edilen bant desenlerine göre adalara ve kıtalara ait farklı iki kloroplast tipi bulunmuş, ikisi arasındaki farkın, 290 bp uzunluğunda bir mutasyon olduğu söylenmiştir.



1. kloroplast tipi Avrupa ve Kuzey Afrika (Fas, İspanya ve Portekiz ) örneklerinde daha baskın olmasına rağmen bütün *Dactylis* taksonlarında bariz şekilde gözlemlenmiştir. Bu klorotip daha çok batı Makronezya adalarında, Tenerife adasında, düşük rakımlı çalılık alanlarda ve yüksek rakımlarda yetişen 2 diploid takson ile Madeira ile La Palma adalarında yetişen tetrapoliploidlerde baskın bulunmuştur. Bu adaların ortak özellikleri oldukça nemli ve rüzgârlara açık olmalarıdır. 2. kloroplast tipi 290 bç uzunluğunda bir delesyon içermektedir. Bu tip kloroplasta Afrika'ya yakın takımadalarda, kurak Akdeniz iklim özelliklerinin hâkim olduğu, yüksek bölgelerde ve sadece Fas Atlas Dağlarında yetişen çok az sayıdaki diploid ve tetrapoliploid bitkide rastlanmıştır. Çalışma sonuçları, kloroplast DNA geçişlerinin Akdeniz bitkilerinden subtropikal bitkilere birden fazla kez geçtiğini, bitki kolonileşmesinin karalardan adalara doğru veya adalar arasında gerçekleşmiş olabileceğini göstermiştir. Bu farklılıkların oluşmasında coğrafik öğelerin muhtemelen büyük rol aldığı eklenmiştir (Sahuquillo ve Lumaret 1999).

Yüksek rakımlı (1850m), soğuk ve kurak iklim koşullarına sahip Erzurum ili Oltu, Olur, Uzundere ve Ulubağ bölgelerinde yabancı *D. glomerata* bitkileri toplanmıştır. Her popülasyondan 24 bitki yetiştirilmiş ve her bitkiye ait 5 yaprak örneği -20 °C de muhafaza edilmiştir. Yaprak örneklerinden, Peroksidaz, Polifenol Oksidaz ve Malat Dedidrogenaz enzimleri izole edilmiş, enzim bantlarının elektroforetik özellikleri karşılaştırılmıştır. İzoenzim bantlarının benzerlik ve polimorfik özelliklerine dayanılarak yapılan karşılaştırma sonucu popülasyonlar içi ve arası genetik çeşitlilik olduğu gözlemlenmiştir. Bant özelliklerine dayanılarak yapılan dendrogram analizine göre, Oltu-Ulubağ ve Olur-Uzundere şeklinde 2 grup ortaya çıkarmıştır. Oltu-Ulubağ grubunun ilişki derecesi Olur-Uzundere grubu bitkilerinden daha yüksek bulunmuştur (Tosun ve ark. 2002).

Bitkilerin çekirdek DNA hacimlerinin (içerikleri), DNA replikasyonu, hücre döngüsü süresi, bitkinin coğrafik dağılımı ve yaşam döngüsü gibi faktörler ile ilişkili olduğu aktarılmıştır. Genellikle bu faktörlerde ki artış DNA hacminin artışına neden olmaktadır. Fakat belirli koşullarda bu durumun tersine de dönebileceği belirtilmiştir. Örneğin DNA hacmi ile mitotik hücre döngüsünün süresi veya diploid, tetrapoliploid gibi poliploidi seviyeleriyle arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Farklı cinslere ait türler arası DNA hacmi oranları çok uzak veya birbirlerine yakın olabilir. Aynı cinse dâhil, aynı kromozom sayısına ait türlerin DNA hacimleri çeşitlilik gösterebilir. Tür içi popülasyonlara ait DNA hacimleri, bitki gelişiminin çeşitli evreleri, coğrafik dağılımı gibi etkenlerden oldukça

etkilenebilir (Bennett 1987, Leitch ve Bennett 2004, Gregory 2005 ). Murray (2005)'e göre bir bitki türünün çekirdek DNA içeriği, morfolojik karakterlerden çok önce farklılaşmaktadır. Bu yüzden bir türe ait örneklerle çalışılırken, DNA içeriğinde farklılaşma var ise bu durumda taksonomik bir değişimden bahs edilebileceği belirtilmiştir.

Aşağıda son yıllarda bitki genotiplerine ait DNA hacmini ölçmede pratiklik sağlayan, poliploidi seviyesi ve türleşme arası ilişkileri belirleyen eski ve yeni teknikler *Dactylis* açısından derlenmiştir.

Avrupa'nın çeşitli bölgelerinden toplanan 18 *Dactylis* popülasyonuna ait C-DNA içerikleri bulunmuş, farklılıkların yükselti ve konum ile ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. 8 popülasyon İspanyanın kuzey kesimlerinde, 350-1120 m arası yükseltilerde diğer popülasyonlar ise daha aşağı yükseltilerden toplanmıştır. 18 doğal popülasyondan 17'si  $2n=4x=28$  kromozom sayısına sahipken, bir popülasyon  $2n=2x=14$  kromozumlu bulunmuştur. Feulgen asit hidroliz yöntemi ile (feulgen mikrodensiyometre) örnekler için C-DNA miktarları, *Hordeum vulgare* L. (Sultan çeşidi C-DNA = 5.6 pg) standart alınarak ölçülmüştür. Mikrodensiyometri ile örnekler için C-DNA miktarları, feulgen boyasının absorban değerleri ölçülerek bulunmuştur. Bu yöntemde C-DNA miktarı, kromozomların büzülmesi, kromozomların nükleusta dağılımının kestirilememesi gibi nedenlerden dolayı sıkıntılara neden olmaktadır. Feulgen reaksiyonunda hidroliz süresinin çok önemli olduğu vurgulanmış ve boyanma için optimum hidroliz süresinin bulunması gerektiği söylenmiştir. Çalışma sonunda 17 tetrapoliploid popülasyon 4.35-5.60 pg arası C-DNA hacmine sahip bulunmuş, bu değerlerin örnekler için C-DNA hacminde %28.7 oranında bir çeşitliliğe denk geldiği belirlenmiştir. Tek diploid popülasyonun C-DNA değeri 3.3 pg bulunmuştur. Bir diploid ve 9 tetrapoliploide ait C-DNA içerikleri ile yükselti arasında önemli bir ilişki olmadığı söylenmiştir. Fakat İspanyanın kuzey tarafında yer alan Galiçya dağlarına ait 8 popülasyona ait C-DNA içerikleri ile toplandıkları yükseltiler (350-1120 m) arasında negatif ilişki saptanmıştır. Bununla beraber C-DNA içeriği ile iklim veya yükselti arası ilişkinin tartışmalı olduğu ve daha çok araştırılması gerektiği not edilmiştir (Creber ve ark. 1994).

Yukarıdaki çalışmada 8 *Dactylis* popülasyonu ile yükseklik arasında negatif bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Bu durumu netleştirmek için daha kapsamlı örnek toplanmış, Fransa ve İtalya'ya ait *Dactylis* örneklerine ait C-DNA miktarları feulgen mikrodensiyometri ile çalışılmıştır. 17 doğal popülasyona ait C-DNA miktarları ile yükselti arasında negatif ilişki saptanmıştır. En düşük yükseltide ki örneğin DNA hacmi, en yüksek rakımda toplanan

örneğin DNA hacminden 1.3 kat büyük çıkmıştır. Aynı zamanda AFLP belirteçleri ile yapılan ön çalışmalar, İtalya ve Fransa’da farklı yükseltilerde toplanan popülasyonlar arası genetik farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bir türe ait popülasyonlar coğrafik ya da çevresel koşullara bağlı olarak dereceli bir şekilde bazı morfolojik ve fizyolojik değişiklikler gösterebilmektedir. Sert iklim koşulları, kısa yetiştirme sezonu gibi faktörlerin etkisi altında kalan bitkilerin hücre döngüsü daha hızlı gerçekleşmektedir. Bu ihtimal dâhilinde yüksek rakımlarda ki bitkilerin C-DNA içeriğinin düşük, alçak rakımlarda ki bitkilerinin ise yüksek çıkması muhtemeldir. Ancak farklı yükseltiler arası C-DNA hacmi farkı çok yüksek olmadığından, bu olgunun araştırılması için daha geniş çaplı çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir (Reeves ve ark. 1998).

Slovenya Alpleri’nin güney doğu yükseltilerinde toplanan 55 *D. glomerata* subsp. *glomerata* bitkisinin ortalama 2C-DNA içeriği 8.6 pg bulunmuştur. Farklı yükseltilerden toplanan popülasyonlara ait ortalama 2C-DNA içerikleri, %2.1 oranında varyasyon göstermiş, yükselti ile genom hacmi arasında bir korelasyon olmadığı belirtilmiştir. Benzer şekilde popülasyonlar içinde 2C-DNA değerleri %2.4 ile %6.4 arası bir varyasyon göstermiştir. Aynı çalışmada, poliploidi belirlemede, kromozom sayımına alternatif olarak, nükleolus sayısı, polen ve stoma boyutlarının kullanılabilmesi eklenmiştir. Ancak genom hacminin direk ölçülebileceği ve poliploidi seviyesini belirlemede daha etkin olduğu vurgulanmıştır (Vilhar ve ark. 2002).

Türkiyenin Avrupa ile bağlantılı Trakya bölgesinde 57 lokasyona ait *Dactylis* popülasyonları toplanmış, örnekler ait 2C-DNA miktarları, poliploidi seviyeleri ve RAPD belirteçleri kullanılarak popülasyonlar arası genetik çeşitlilik araştırılmıştır. Her popülasyona ait 6 bitkinin DNA miktarları ortalaması flow sitometri ile belirlenmiştir. Mitoz kromozom sayımları sonucu bütün örnekler  $2n=2x=28$  kromozomlu bulunmuştur. Örnekler ait ortalama DNA miktarı 9.5 pg olarak hesaplanmıştır. Bu bulgulara dayanılarak, Trakya bölgesinde diploid *Dactylis* popülasyonlarının olmadığı veya nadir oldukları için rastlanılmadığı bildirilmiştir. RAPD işaretleme tekniği sonucunda tetrapoliploid örneklerde 40’a aşkın polimorfik bant elde edilmiştir. Gurup analiz sonuçlarına dayanarak, bölgede doğal tetrapoliploid *Dactylis* popülasyonlarında genetik çeşitliliğin yüksek olduğu, ancak popülasyon içi varyasyonun popülasyonlar arası varyasyondan daha yüksek olduğu anlaşılmış ve sonuçlar popülasyonlar arası gen geçişinin olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu durum popülasyonlar arası gen dağılımının homojen olduğunu göstermektedir. Zira bölge düzlük

olduğu için, tozlaşmayı ve tohum taşınmasını engelleyecek coğrafik engeller bulunmamaktadır (Tuna ve ark. 2004).

Diploid *Dactylis* taksonlarının mitoz kromozomlarına ait özellikler ve 2C-DNA miktarlarının belirlendiği tez çalışmasında, 18 diploid takson ve her taksona ait en az 2 aksesyonun oluşturduğu bir bitki koleksiyonu kullanılmıştır. Örnekler için mitoz kromozomların gözlenmesi amacıyla hasat edilen kökler 8-hydroxyquinoline ile ön işleme tabi tutulmuş, farmer solüsyonu ile fikse edildikten sonra, asetokarmin ile boyanarak mikroskop preparatları hazırlanmıştır. Çekirdek DNA miktarı analizi için her aksesyona ait 10 bitki kullanılmıştır. Bitkilerden alınan yaprak örneklerine ait 2C-DNA içerikleri flow sitometri cihazı ile belirlenmiş ve ortalamaları alınmıştır. Çalışılan örnekler arasında *D. masai* 3.65 pg ile en düşük, *D. g. subsp. woronowii* 5.12 pg ile en büyük 2C-DNA hacmine sahip bulunmuşlardır. Diğer taksonlara ait değerler bu iki değer arasında bulunmuştur. Taksonlara ait kromozomların, sentromer pozisyonları bakımından median ve submedian durumlu, 1 ila 3 arasında satelit taşıdıkları gözlemlenmiştir. Ancak kromozomların büyüklük ve morfolojik olarak birbirlerine benzemelerinden dolayı, asetokarmin veya feulgen gibi boyalara dayalı kromozomları karakterize edecek karyotipler hazırlanmasının zor ve açıklayıcı olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca diploid bitkilerin çimlenme sıkıntıları olduğu, bazı taksonlardan sağlıklı kök almanın zor olduğu aktarılmıştır. Flow sitometri sonuçlarına göre, en büyük ve en küçük 2C-DNA içerikleri arasında 1.47 pg'lık fark, populasyonlar arasında önemli bir genetik varyasyon olduğunu göstermektedir. Kromozomlar arasında belirgin farklılıkların olmayışı, 2C-DNA varyasyonlarının süreklilik göstermesi, cins içerisinde türleşme olayının tamamlanmadığını düşündürmüştür. Diploid taksonlarda gözlemlenen 2C-DNA varyasyonunun, önceki çalışmalarda tetrapoliploid taksonlarda gözlemlenen 2C-DNA varyasyonu ile benzerlik gösterdiği, bu ilişkinin, tetrapoliploidlerin diploidlerden kökenlediğine dair kanıt olarak sunulabileceği ifade edilmiştir (Büyükbaşar 2010).

Çekirdek DNA içeriğine ilişkin çalışmalar incelendiğinde, ortak materyal *Dactylis glomerata*'nın 2C-DNA içeriğine ilişkin 2 kata varan sayısal farklılıklar saptanmıştır. Bu farklılıkların kullanılan metotlardan veya türün kendi genom özelliklerinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Vilhar ve ark. 2002, Tuna ve ark. 2004, Tuna 2015).

Bitki populasyonlar içi ve arası genetik ilişkileri belirlemenin bir yoluda, son yıllarda oldukça yaygın kullanılan moleküler DNA belirteçlerine dayalı tekniklerdir. Bitki gen kaynaklarının belirlenmesi, korunma altına alınması, ıslah çalışmalarında başarı ile

kullanılması için sitolojik ve moleküler karakterizasyonları yapılmalı, poliploidi seviyelerinin ve genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi şarttır. Morfolojik özelliklere dayanılarak bitki gen kaynaklarının teşhisi ve ıslahı uzun yıllar alan çalışmalar ve tarla denemeleri gerektirmektedir. Ayrıca morfolojik farklılıkların her zaman genetik yapıyı yansıtmadığıda bilinmektedir. Filogenetik ilişkiler veya genetik çeşitlilik, belirli proteinlere dayalı, örneğin enzim analizi gibi biyokimyasal yöntemlerle de belirlenebilmektedir. Ancak biyokimyasal belirteçler, post-transkripsiyonel sonrası değişimler ve çok sayıda olmamaları gibi nedenlerle sınırlı kullanıma sahip bulunmuşlardır (Staub ve ark. 1996, Agarwal ve ark. 2008, Kumar ve ark. 2009, Grover ve Sharma 2016).

Evrimsel ekolojide, merkeze yakın bir türün poplasyonları genelde yoğun fenotipik ve genetik çeşitlilik gösterir. Fakat merkezden uzak (periferal-kenar) poplasyonlar seyrek görünüşlü, korumasız ve izole habitat koşullarına maruz kalmaktadır. Bu farklı konum poplasyonlarının kromozomal yapıları birbirine benzemektedir. Fakat merkez poplasyonları coğrafik koşullara daha dayanıklı ve korunaklı iken, kenar poplasyonları daha korumasız ve daha uç iklim özelliklerine adapte olmuştur. Merkez ve uç poplasyonların genetik çeşitliliğini, çevresel koşulların değişimi ve poplasyonlar arası gen akışı etkilemektedir. Küçük bir gen akışı büyük farklılıklara neden olabilmektedir. Daha sert coğrafik koşullara maruz kalan ve korumasız olan kenar poplasyonları strese karşı yüksek bir fenotipik çeşitlilik göstermektedir. Bitkiler bu stres koşullarında uygun gen kombinasyonlarına veya değişimlerine uğramaktadır. Bu yüzden periferal poplasyonların merkez poplasyonlara göre daha dirençli (toleranslı) ve çoklu genlerce kalıtılan fenotipik özelliklere sahip olmaları beklenir (Aronson ve ark. 1990, Parson 1992). Örneğin *Hordeum spontaneoum*'a ait periferal poplasyonların merkezdekilere oranla genetik çeşitliliği daha yüksek bulunmuştur. Arpada gen çeşitliliği, çevre koşullarının değişimine ve heterozigosite oranı ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca gen çeşitliliği ile yağışlar (su varlığı) arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Merkezi poplasyonlar, dış poplasyonlara göre sudan daha fazla yararlanmaktadır (Boyer 1982).

Ototetrapoliploid *Dactylis* bitkilerinde gözlemlenen polimorfizm yüksekliği, ilişkili diploidler ile karşılaştırıldığında, poliploidi seviyesi yüksek sitotiplerin daha stabil fenotip özellikleri gösterdikleri ve marginal alanlara daha iyi adapte oldukları görülmüştür. Bu şekilde *Dactylis* varlıkları farklı ve geniş ekocoğrafyalara yayılmışlardır (Bretagnolle ve Thompson 2001).

İsrail'in kurakçıl iklim koşullarının hâkim olduğu güney ve Akdeniz ikliminin hâkim olduğu kuzey bölgelerinden toplanan 6 *Dactylis glomerata* popülasyonu, RFLP genetik işaret tekniği kullanarak, kurağa dayanıklı popülasyonlarda, dayanıklılık genlerinin çeşitliliği ve çevre ile olan ilişkileri araştırılmıştır. Örneklerin yaprakları kullanılarak kuraklığa dayanıklılık genlerine ait cDNA'lar sentezlenmiştir. Bu cDNA'lar prob olarak kullanılmış, popülasyonlar ve coğrafik özelliklerle ilişkilendirilerek, *Dactylis glomerata* örneklerine ait kuraklığa dayanıklılık gen polimorfizmi belirlenmiştir. Kuraklık ile alakalı, dayanıklı, bastırılmış ve nötr olmak üzere 3 gen gurubu belirlenmiştir. Southern blot analizi sonrası yapılan gözlemler, İsrailin kurakçıl güney bölgesine ait örnekler, kuzey bölgesine (İsrailin Akdeniz kuşağı) ait örneklerden daha yüksek kuraklılığa dayanıklılık gen polimorfizmi göstermiştir. Kuraklılığa dayanıklılık ile ilişkili 6 genden 4'ü güney popülasyonlarına ait bulunmuştur. Kuraklık ile ilişkili en yüksek gen polimorfizmi Süper Oksit Dismütaz gen ailesinde hesaplanmıştır. Kuzeye ait örnekler yüksek genetik çeşitlilik göstermelerine rağmen bu genlerin kuraklık ile ilişkili olmadıkları belirtilmiştir. Aynı zamanda kuraklık genleri takip edilerek popülasyonlar arası yüksek oranda gen akışı olduğu görülmüştür. RFLP bant analizi sonuçları, kuraklık genleri üzerinden, genetik çeşitliliğin %80'inin popülasyon içi, %20'sinin ise popülasyonlar arası olduğunu göstermiştir. Yine kuraklık ile ilgili baskılanmış gen polimorfizmi, popülasyon içinde daha yüksek bulunmuştur. Kuzey ve güney popülasyonları arasında spesifik kuraklık gen çeşitliliği istatistiki açıdan önemli değildir. Güney popülasyonlarında kuraklık genlerinin varyasyon göstermesi, kuraklık ile ilgili allellerin pozitif seleksiyon sonrası marginal alanlara uyumu ve yüksek oranda yabancı döllenmeye bağlı heterozigosite durumlarına bağlanmıştır. Özel genler bakımından farklılığın az olması, kuzey ve güney bitkileri arası yüksek gen akışından kaynaklanabilir. Marjinal alanlarda kolonize olan popülasyonlar, bazı genlerin frekansını artırmaktadır. Zira merkezi popülasyonlarda kuraklık ile ilişkili genlerin nötr bulunması, çevresel koşulların uygun olması ile açıklanmıştır (Trejo-Calzada ve O'Connell 2005).

Çin'in güney ve kuzey batı bölgeleri *Dactylis* için birincil yetişme alanları olarak belirlenmiştir. Buralardaki *Dactylis* habitatları, ormanlık alanların kenarları, çalılık alanlar ve subalpin karakterli, 1000-3600 rakımlı meralarda bildirilmiştir. Ayrıca diploid ve tetrapoliploid bitkilerin bu alanlarda simpatrik yaşadıkları da rapor edilmiştir. Doğal alanlardan elde edilen *Dactylis* örnekleri arası genetik çeşitliliği belirlemek için, Çin kaynaklı 32 aksesyon ve karşılaştırma için Amerika kökenli 2 aksesyon, AFLP DNA belirteçleri ile çalışılmıştır. Çalışmada 9 primer kombinasyonu kullanılmış, toplamda 400 DNA fragmenti

analiz edilmiştir. Bu bantlardan 322 tanesi polimorfik özellik göstermiştir. 34 aksesyonuna ait genetik polimorfizm % 80.50 oranında, genetik benzerlik katsayıları ise ortalama 0.81 olarak hesaplanmıştır. Genetik çeşitliliğe ait bantlar moleküler varyans analizine tabi tutulmuştur. Analiz sonuçlarına göre popülasyon içi genetik varyans oldukça yüksek (%87.98) çıkmıştır. Coğrafik farklılıklara bağlı genetik varyans da % 85.65 oranında oldukça yüksek bulunmuştur. AFLP polimorfizmine göre, üç coğrafik bölge arası polimorfik bant yüzdeleri büyükten küçüğe, %79 (Güneybatı Çin), %49 (Kuzeybatı Çin) ve %26.25 (Amerika) şeklinde sıralanmıştır. Küme analizine (UPGMA) göre çalışılan örnekler 6 guruba ayrılmıştır. Temel koordinat analizine (PCoA) göre ise genetik özelliklerine göre çalışılan örnekler 3 temel guruba ayrılmıştır. Farklı coğrafyalara ait tetrapoliploidlerin hepsi bir grupta, diploidler ise coğrafik (kuzey, güney) kökenine göre 2 grupta toplanmışlardır. AFLP analiz sonuçları, daha önce Çin kaynaklı örnekler ile yapılan morfolojik, agronomik ve karyotip çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur (Peng ve ark 2008).

Çin, Rusya, Kazakistan, Hindistan, Japonya ülkelerine ait 16 *Dactylis* aksesyonu barındırdıkları genetik çeşitlilik ve filogenetik ilişkiler açısından SSR moleküler belirteçleri ile taranmıştır. 21 SSR primer çifti toplamda 143 polimorfik allel bant vermiştir. Lokus başına allel sayısı 3-13 arası olup, primer çifti başına ortalama 6.8 değeri hesaplanmıştır. 16 aksesyon için ortalama genetik polimorfizm oranı %90.7 bulunmuştur. Bu oran aksesyonların oldukça yüksek bir genetik çeşitliliğe sahip olduklarını göstermektedir. Moleküler varyans analiz sonuçları (AMOVA), popülasyon içi genetik çeşitliliği ortalama %65.75 ve coğrafik bölgeler arası çeşitliliği ortalama %75.58 olarak göstermiştir. Tetrapoliploid ve diploid poliploidi seviyeleri arası genetik varyans sadece %2.62 bulunmuştur. Tetrapoliploid gruplar içi genetik çeşitlilik (%94.23) ve diploid gruplar içi (%91.25) genetik çeşitlilik arası farkın çok büyük olmaması, iki poliploidi seviyesi arasında ki filogenetik ilişkinin çok yakın olduğunu göstermektedir. Grup analizi sonucu oluşan dendrograma göre aksesyonlar 2 büyük guruba ayrılmıştır. Farklı bölgelere ait tetrapoliploidler bir gruba, diploidler ise aralarında 2 guruba ayrılmıştır. *Dactylis* örnekleri arası moleküler genetik farklılıklar hem aksesyon hemde coğrafik temelde yüksek bulunmuştur. Her aksesyona ait 10 bitkinin SSR belirteçleri ile taranması genetik çeşitliliği belirlemede yeterli bulunmuştur. Diğer yabancı buğdaygil bitkilerindeki genetik çeşitliliği belirleyen, mutasyon, gen akışı, seleksiyon gibi faktörlerin *Dactylis* içinde geçerli olabileceği bildirilmiştir. SSR belirteçlerinin her iki poliploidi seviyesi için, enzim belirteçlerine göre genetik farklılıkları belirlemede daha etkin oldukları söylenmiştir (Xie ve ark 2010a).

Aralarında kültür çeşitlerinin, alt türlerin, doğal materyallerin ve ileri ıslah hatlarının bulunduğu, 27 ülke ve 9 farklı coğrafik bölgeye ait 74 *Dactylis* aksesyona ait genomlar, buğdaygil kaynaklı EST-SSR ve *Dactylis*'e özgü SSR belirteçleri ile taranmıştır. Amaç, bu belirteçleri kullanarak, farklı coğrafyalara ait aksesyonlar içi ve arası genetik çeşitliliği belirlemek, genetik kaynakların kullanımı ve korunması için strateji geliştirmek olarak açıklanmıştır. 15 buğdaygil kaynaklı EST-SSR ve 15 *Dactylis*'e özgü SSR olmak üzere 30 primer çifti kullanılmıştır. Toplamda 217 bant oluşmuş, bu bantlardan 190 âdeti polimorfizm göstermiştir. Polimorfik bant başına ortalama 6.3 allel düşmüştür. Bu yüksek orandaki polimorfizm *Dactylis* cinsinin yabancı döllenenmesine bağlanmıştır. 15 buğdaygil kaynaklı EST-SSR belirteçi toplamda 90 bant oluşturmuş bunlardan 68 tanesi polimorfik bulunmuştur. Primer çifti başına ortalama 4.5 polimorfik bant düşmüştür. 15 *Dactylis* SSR markırı 122 polimorfik bant oluşturmuş, primer çifti başına ortalama 8.1 polimorfik bant hesaplanmıştır. 9 coğrafik bölge arası polimorfizm oranı, %30.16 (Doğu Avrupa) ve %88.89 (Kuzey Afrika) aralığında çıkmıştır. Aksesyonlar için ortalama polimorfizm oranı %84.63 olarak bulunmuştur. Moleküler varyans analiz değerleri coğrafik guruplar içi %74.87 ve guruplar arası %25.13 çeşitlilik belirlemiştir. Amerika örnekleri ile Okyanusya örnekleri arasında, coğrafik duruma bağlı belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. 9 coğrafik bölge arasında en yüksek genetik farklılık sırasıyla, Asya (P: % 94.44), Kuzey Afrika (P: % 88,89) ve Avrupa (P: % 87.30), en düşük genetik farklılık sırasıyla, Batı Avrupa (P: % 30.16), Okyanusya (P: % 40.48) ve Kuzey Avrupa (P:% 48.40) şeklinde belirlenmiştir. Bu oranlar aynı zamanda, Avrupa, ılıman Asya ve Kuzey Afrika'nın *Dactylis* için farklılaşma merkezi olabileceğini göstermiştir (Xie ve ark. 2010b).

Mendel açılımından sapmalar (segregation distortion), kendileme depresyonu veya genom içinde çeşitli derecelerdeki uyumsuzluklar sonucu gerçekleşen bir olgu olarak tanımlanmıştır. Çeltik, buğday, mısır, yumak, çim gibi buğdaygillerde bu olguya sıkça rastlanmıştır. Genlerin kalıtımında beklenen oranlarda sapmalara, kromozom kayıpları, genetik izolasyon mekanizmaları, çaprazlama, aktif genlerin varlığı ve kalıtım derecesi, çevresel faktörler, zamanla bazı popülasyonların kaybı gibi birçok biyotik ve abiyotik faktör etki etmektedir. Bu durum, evrimsel süreçte türlerin farklılaşması ve çevreye adaptasyon adına önemli olgudur. Genomdaki bu değişimlerin oranı, derecesi, yönü ve genetik etkisi; türler, hibritler, genetik haritası yapılacak popülasyonlar ve belirteç tipine göre çok önemli farklılıklar göstermektedir. Türler arası eşleşme ile ilgili kısırılık genleri de yüksek derecede gen sapmalarına neden olmaktadır. Bu durum çeltikte gözlemlenmiştir. Teoriye göre, mayoz



bölünmeyi kontrol eden olaylar, gen/lerin sapmalarına neden olabilir, örneğin gametofitik yarıştta tercihli bir üreme durumu söz konusu olabilir. Böylece erkek veya dişi gametler üreme sırasında farklı davranışlar sergileyebilir (Xu ve ark. 1995, Yaneshita ve ark. 1999).

*Dactylis*, birçok buğdaygil yem bitkisinde olduğu gibi yabancı dölllenmekte, yani çok büyük oranda kendine kısırır. Kendine kısır bitkilerde, kısırlık ile ilgili genler ve kendileme depresyonu sonucunda, genotiplerin kaltımında Mendel açılımlarından sapmalar görülür ve bunlar geleneksel genetik metotlar ile analiz edilemezler. Ancak iki heterozigot ebeveyn çaprazlandığında, F1 dölllerine yaptıkları genetik katkı belirteç sistemleri ile haritalanabilir. Bu amaçla, İsveç (01996) kaynaklı diploid bir hat ile Çin (YA02-103), kaynaklı bir diploid hat melezlenmiştir. Her iki diploid atanın, genetik ve morfolojik olarak birbirinden farklı özellikler gösterdikleri belirlenmiştir. Yoklama melezi çalışmaları sonucunda elde edilen 111 F1 bitkisine ait genetik linkage 164 SSR ve 108 SRAP belirteci kullanılarak araştırılmıştır. Melezlemede erkek olarak kullanılan aksesyon (01996) erken çiçeklenmekte (Mayıs başı), yaprakları geniş ve uzundur. Dişi olarak kullanılan aksesyon ise (YA02-103) Mayıs sonu çiçeklenmekte, yaprakları dar ve kısadır. Babaya ait genetik linkage haritası 57 SSR ve 33 SRAP olmak üzere toplamda 90 belirteç ile ilişkili bulunmuştur. Bu ilişkiler 9'u aşkın linkage gurubu oluşturmuştur. Dişi bitkiye ait genetik linkage haritası 87 belirteç (54 SSR ve 33 SRAP) ile ilişkili bulunmuş, 10'u aşkın linkage bağlantısı oluşturmuştur. Erkek bitkide toplam genetik harita uzaklığı 866.7 santimorgans (cM) ile genomun %81'ni kapsarken, dişi bitkide 866.7 cM ile genomun %75'ni temsil etmiştir. Moleküler belirteçler arası ortalama harita uzunluğu, erkek bitkide 9.6 cM ve dişi bitkide 8.9 cM bulunmuştur. Haritalamada kullanılan 272 lokustan, %86'sı bir atadan kaltılırken (Aa X aa veya aa X Aa), geriye kalan % 14'ü ise her iki (Aa X Aa) atadan aktarılmıştır. X<sup>2</sup> testine göre ise markırların %85'i Mendel oranlarına göre kalıtılmıştır. Geriye kalan %15 ise genetik sapma göstermiştir. İki harita arasında erkek bitkide 5 ve dişi bitkide 5 linkage gurubu olmak üzere toplamda 10 bağlantı gurubu homoloji göstermiştir. Homoloji gösteren bu 10 linkage gurubunun, 8 tanesi Domuz ayrığına özgü SSR, biri mısır EST-SSR ve biri sorgum genomik SSR belirteçleri ile homoloji kurmuştur. Bu sonuçlara rağmen, belirlenen linkage grupları ile kromozomlar arası etkileşim yeterince açıklayıcı bulunmamıştır. Bu ilişkinin *Dactylis*'e özgü genomik proplar kullanılarak İn situ hibridizasyon tekniği ile çalışılmasının açıklayıcı olacağı not edilmiştir (Xie ve ark. 2010).

SSR gibi moleküler belirteçler ile bitki türlerine ait coğrafik dağılım, morfolojik karşılaştırma, sitogenetik yapı, interpoliploidi gibi durumların çalışılabileceği vurgulanmıştır. SSR belirteç sistemlerinin otopoliploid türlerin genetik yapılarının araştırılmasında oldukça kullanışlı oldukları açıklanmıştır. Bu çalışmaların spesifik olması için türe özgü DNA belirteçlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. *Dactylis glomerata* için SSR belirteçlerinin izole edilmesi amacı ile Japon 'Akimidori II' *Dactylis* çeşidinden 3 bitki, İsveç 'Loke' *Dactylis* çeşidinden 2 ve yine Japonya doğal florasından 3 bitki olmak üzere toplamda 8 bitki üzerinde çalışmalar yapılmıştır. SSR belirteçlerinin geliştirilmesi için, 4 genomik kütüphaneden farklı kaynaklara ait SSR belirteçleri kullanılmıştır. Bu kaynaklardan elde edilen belirteçler çoğaltılmıştır. Toplamda 969 eşsiz SSR klonu tanımlanmış ve primer dizaynı için kullanılmıştır. Bu 969 primer SSR sekansları bilinen türler ile karşılaştırılmıştır. Tarama sonuçlarına göre 63 sekansın diğer bitki türlerinin sekansları ile önemli derecede homoloji gösterdikleri belirlenmiştir. Bu sekanslardan 34 tanesi çeltik ve diğer bazı türler ile görevi bilinmeyen genomik veya cDNA sekansları ile yüksek homoloji göstermiştir. Fakat 18 SSR sekansı görevi bilinen genler ile daha yüksek seviyede homoloji göstermiştir. 5 sekans hareketli genetik elemanlar (transposeble elemanlar) ile 5 tanesi iki türe ait mikrosatelit ve 1 sekans *Agrostis stolonifera*'nın Penn A-4 çeşidi kloroplast geni ile yüksek homoloji göstermiştir. 969 SSR sekansı kullanılarak, 8 örneğe ait 606 polimorfik SSR belirteci geliştirilmiştir. Bunlardan 70'i monomorfik (tek düze) bantlar gösterirken, diğerleri çoklu bantlar veya herhangi bir çoğaltma ürünü (PCR) vermemişlerdir. Bu 606 polimorfik SSR belirtecinin büyük kısmınının 1-13 arası allele sahip olduğu ve primer başına ortalama 4.5 allel düştüğü görülmüştür. Bitki başına polimorfik allel sayısı 1-4 arasında bulunmuştur. Bu çalışmada geliştirilen SSR belirteçlerinin *Dactylis*'in orjini, farklılaşması ve genetik durumu gibi konuların çalışılmasında kullanılabileceği bildirilmiştir (Hirata ve ark. 2011).

Buğdaygil yem bitkilerinin iyi bir yeşil aksam oluşturmaları istenir. Bu yüzden de başaklanma süreleri ot verimi için önemlidir. Bu durumla ilgili yapılan çalışmada tetrapoliploid *Dactylis* örneklerine ait başaklanma süreleri ile ilişkili kantitatif gen gruplarının linkage haritası oluşturulmuştur. Bu amaç için *Dactylis*'de başaklanma ile alakalı genetik karakterler, EST belirteç kütüphanelerinden elde edilen SSR belirteç kombinasyonları ve AFLP moleküler belirteçleri araştırma için kullanılmıştır. Moleküler belirteç analizleri, geç başaklanan *Dactylis g. subsp. himalayensis* ile erkenci veya ortancı başaklanan *Dactylis g. subsp. aschersoniana* diploid ataların melezlenmesinden elde edilen 284 F1 bitkisi popülasyonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. 1806 AFLP ve SSR belirteci test edilmiş,

bunlardan 376 tanesi (%21) uygun dağılım oranına sahip bulunmuş ve linkage gruplarının haritalanmasında kullanılmıştır. Kullanılan SSR belirteçler 32 tanesi her iki ata için bantlar oluşturmuş ve döllerde 3:1 oranında düzgün bir dağılım göstermişlerdir. Bu yüzden iki ebeveyn arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılmışlardır. Bu ortak işaretlere dayanılarak kromozom düzenlenmeleri hakkında bilgi toplanmış, linkage gruplarından 2 veya 6 tanesinde segmental inversiyon olabileceği bildirilmiştir. Aynı zamanda bu guruplar bitkilerin baş bağlaması ile ilişkili kantitatif kalıtım gösteren guruplar olarak belirlenmişlerdir. 63 adet SSR markırı çeltik genomu ile benzerlik göstermiştir. Linkage guruplar içi belirteç dağılımı genellikle düzenli bulunmamıştır. Kullanılan AFLP belirteçleri daha çok özel alanlarda toplanmışlardır. 600 AFLP bantı analiz edilmiş, bu bantların 1:1, 3:1 veya 5:1 oranında dağılım gösterenler analiz için seçilmiştir. F1 bitkilerine ait iki atanın genetik linkage haritası; 28 linkage gurubunun beraber kalıtıldıklarını ve 7'sinin aralarında homoloji gösterdiklerini göstermiştir. Bu 7 homoloji gurubu 38 belirteç ile birbirine bağlanmıştır. Linkage gurupları 98-187 cM arası uzaklığa ve belirteç başına ortalama 5.5 cM sahip bulunmuşlardır. Haritası yapılan 2 SSR belirteci, çeltik fiziksel haritası ile homoloji göstermişlerdir. Burada 7 homoloji gurubundan 6'sı çeltik ile aralarında varolduğu sayılan benzerlikten faydalanarak belirlenmiştir. Başaklanma süresi ile ilgili kantitatif özellikli lokuslar her iki ebeveyne ait haritada 2, 5 ve 6 numaralı linkage gurupları olarak belirlenmiştir (Xie ve ark. 2012).

SRAP ve ISSR yem bitkilerine ait genetik çeşitliliği belirlemede, iki ileri moleküler işaret tekniği olarak bilinmektedir. Bu iki işaret tekniği kullanılarak, 7 farklı ülke ve coğrafyaya ait 44 aksesyon, 25 ekotip ve 19 çeşitten oluşan *Dactylis* koleksiyonuna ait genetik ilişkiler çalışılmıştır. Kullanılan 21 SRAP primer kombinsyonu 476 bant oluşturmuş bunların 401'i (%84.24) polimorfik çıkmıştır. 12 SSR primeri ise toplamda 115 bant vermiş bunlardan 100 tanesi (%86.96) polimorfizm göstermiştir. SRAP belirteçleri için 44 aksesyona ait genetik benzerlik katsayısı ortalama 0.8013 olarak belirlenmiştir. Çin'in Sichuan eyaletine ait iki aksesyon en yüksek genetik benzerlik oranına (yani aralarındaki genetik uzaklık en düşük) sahip bulunmuştur. Bunun tersine Çin Guizhou eyaletine ait bir aksesyon ile Danimarka'ya ait bir aksesyon arası genetik benzerlik çok düşük, genetik çeşitlilik yüksek bulunmuştur. SSR primerleri için benzerlik katsayısı ortalaması 0.8044 çıkmıştır. Aksesyonlar arası genetik ilişkiler SRAP sonuçları ile benzerlik göstermektedir. UPGMA ve PCA analiz sonuçlarına göre, SRAP sonuçları için bütün örnekler 3 guruba ve ISSR için 4 guruba ayrılmıştır. Eş bölgelerden toplanan örnekler aynı kümede yer almıştır. Bu durum coğrafik farklılıklar ile genetik çeşitlilik arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır. Çinde yetiştirilen 3 çeşit dışında kalan

örneklere ait genetik çeşitlilik diğer bölgelere oranla oldukça farklılık göstermiştir. SRAP ve ISSR belirteçleri *Dactylis* genotipleri arası ilişkiyi belirlemede benzer sonuçlar vermiştir. Ancak SRAP belirteçleri daha polimorfik olup grup oluşturmada daha spesifik bulunmuştur (Zeng ve ark. 2012).

Çayır-mera yem bitkilerine ait yerel ekotipler genetik çeşitlilik ve uyum açısından çeşit geliştirmede önemli kaynaklardır. Çin yerel *Dactylis* genetik kaynaklarından 8 çeşit geliştirilmiştir. Yabancı döllenene türlerine ait çeşitlerin yüksek genetik çeşitliliğe sahip olmaları tarımsal açıdan aranan bir özelliktir. Çin kökenli Baoxing, Anba, Bote ve Kaimo adlı 4 çeşit, bir alt tür (*Dactylis glomerata* subsp *woronowii*) ve geliştirilmiş bir hat (YA02-116) olmak üzere toplamda 6 aksiyona ait moleküler çeşitlilik, toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve polimorfizm oranları SSR belirteçleri ile araştırılmıştır. Her bir aksiyona ait 20 bitki 15 SSR primeri ile taranmıştır. Toplamda 114 bant sayılmış, lokus başına ortalama 7.6 allel düştüğü hesaplanmıştır. 120 bitki arasında SSR genetik polimorfizm oranı %100 gözlemlenmiştir. Moleküler varyans analizine göre aksiyonlar, kendi içlerinde %65 ve aralarında %35 oranlarında çeşitlilik göstermiştir. Bulgular, Çin *Dactylis* çeşitlerinin genetik farklılıklarının yüksek olduğunu ve ileri ıslah çalışmaları için kullanılabilirliğini göstermiştir. Kültür çeşitleri arasındaki bu yüksek varyasyonun kaynağı yabancı döllenmeye bağlanmıştır. Çeşitler yüksek genetik çeşitliliğe sahipken, ileri ıslah hattında genetik çeşitlilik en az bulunmuştur. Kullanılan ıslah metodunun bu çeşitliliği oluşturmada çok önemli olduğu vurgulanmıştır. Yabancı materyallerden ıslah edilen çeşitler, klonlardan ıslah edilen çeşitlerden daha yüksek bir genetik çeşitlilik göstermiştir. Yerel çeşitler ile yabancı popülasyonlar arası yabancı döllenme, genetik çeşitliliğin başka bir sebebi olarak belirlenmiştir. Ayrıca Çin *Dactylis* kültür çeşitlerinin yem üretimi amacı ile yüksek bir seleksiyon baskısına maruz kaldıkları belirtilmiştir. Bu durumun zamanla kültür çeşitlerinde genetik çeşitliliği sınırlayabileceği üzerinde durulmuştur. Bu yüzden doğal ve tarımsal genetik kaynakların etkin bir şekilde kullanılması gerektiği önerilmiştir (Xie ve ark. 2012).

Avrupa'nın doğal ve yarı doğal meralarından, İsveç'e ait 20, Bulgaristan'a ait 20 ve 19'u Norveç kaynaklı olmak üzere toplamda 59 *Dactylis* popülasyonu, popülasyon bazında ve bölge bazında, buldukları genetik çeşitlilik ve aralarındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla, 29 SSR belirteci ile araştırılmıştır. Üç bölge arası ortalama heterozigosite oranı 0.44-0.59 arasında olup, en yüksek heterozigosite oranını Norveç bölgesi göstermiştir. Gözlemlenen allellerin %59.9'u nadir bulunmuştur. İncelenen 1861 bitkinin %80.82'si kendi coğrafik

alanlarına özgü allel frekansı göstermiştir. Materyallerin toplandığı coğrafyaların birbirinden uzak olmalarına rağmen, ortalama genetik uzaklık küçük bulunmuştur. Her üç coğrafik bölge elemanı tetrapoliploid *D. glomerata*'da, popülasyonlar içi genetik çeşitlilik yüksek bulunmuş ve her coğrafyaya özgü çeşitli sayılarda nadir ve spesifik alleller tespit edilmiştir. Geniş ve süreklilik arz eden Bulgaristan otlaklarına ait örnekler en fazla genetik çeşitliliği göstermiştir. Buna rağmen kesikli coğrafik özellik gösteren ve yarı doğal Norveç meralarına ait örnekler en yüksek nadir ve spesifik allel çeşitliliği göstermiştir. Avrupa'da 3 bölge meralarından toplanan genetik materyallerin *Dactylis* ıslahı için değerli olduğu sonucuna varılmıştır (Last ve ark. 2013).

İtalya'nın Sicilya bölgesine ait farklı iklimsel özelliklere sahip 9 lokaliteden *D. glomerata* popülasyonları ve karşılaştırma için 3 (Kasbah, Porto ve Medly) kültür çeşidi kullanılarak 2 yıllık deneme yürütülmüştür. Kültür çeşitlerinden Kasbah yazın dormant, diğer iki çeşit ise yazın aktif büyümektedir. Çiçeklenme zamanının belirlenmesi için de kontrol olarak subsp. *hispanica* bitkileri kullanılmıştır. Çalışmanın amacı, yarı kurak Akdeniz iklim özelliklerinin görüldüğü bölgeye uyum sağlayacak uygun morfolojik ve tarımsal karakterlere sahip genotipler seçmektir. Bu karakterlere ait genetik çeşitlilik aynı zamanda floresan AFLP tekniği ile desteklenmiştir. Bitki boyu, yaprak eni ve genişliği gibi karakterlerde önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. Örneklere ait başaklanma süreleri 83-125 gün arası bulunmuş, yazın aktif büyümelerine göre, tamamen dormant, yarı dormant ve dormant olmayan şekilde farklı guruplar ortaya çıkmıştır. Bazı popülasyonlarda hayatta kalma oranı, yazın aktif olan 2 standart çeşide yakın bulunmuştur. Popülasyonlardan biri yüksek oranda dormant olmasına rağmen, dormant standart çeşitten daha fazla ot verimine sahip bulunmuştur. 2. yılın sonunda genotiplerin hayatta kalma oranı ortalama %85.5 bulunmuştur. 7 AFLP primeri kullanılmış, 9 popülasyon ve 3 çeşide ait 1788 AFLP piki belirlenmiştir. 1788 pikten 1648'i polimorfik bulunmuş ve polimorfizm oranı %92.1 olarak belirlenmiştir. 12 örneğe ait genetik benzerlik ortalaması 0.52 bulunmuş, genetik benzerliğin en az (0.33) bulunduğu iki genotip oldukça farklı coğrafik bölgelerden toplanmıştır (Copani ve ark.2013).

Kanarya adalarında iki diploid *Dactylis* formu tanımlanmıştır. Bu formlardan *Dactylis smithii* düşük rakımlarda, *Dactylis metlesicsii* ise yüksek rakımlarda tespit edilmiştir. Bu iki forma ait çekirdek ITS sekansları ile İspanya, Portekiz ve Kuzey Afrika kökenli diploidler arası çekirdek ITS sekansları karşılaştırılmıştır. Her taksona ait en az 3 genotip kullanılmış, poliploidi seviyeleri flow sitometri ile belirlenmiştir. Örnekler arası filogenetik ağaç,

*Dactylis*'e yakın tür *Lamarckia aurea* temel alınarak hazırlanmıştır. Çalışma sonuçlarına İspanya, Portekiz (İber Yarımadası) diploidleri ile Kuzey Afrika diploidleri belirgin farklılıklar göstermiştir. Subsp. *smithii* Kuzey Afrika kökenli *castellata*, *mairei*, *santai* alt türleri ile benzerlik göstermiş, ancak 601 numaralı sekans bakımından farklılık göstermiştir. 4 *smithii* aksesyonundan 3 tanesi bu sekans bakımından duplikasyona sahip bulunmuştur. Bu durum İber formları ile Kanarya adaları menşeli subsp. *smithii* arasında filogenetik bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bunun tersine *metlesicsii* aksesyonlarından birtanesi 3 sekans bakımından, İber kaynaklı *izcoi* ve *lusitanica* ile büyük benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte incelenen 4 ITS sekansından 3 tanesinde duplikasyon belirlenmiştir. Kuzey Afrika örneklerinden *castellata*, *mairei* ve *santai*'e ait bazı aksesyonlar ise aynı sekans özellikleri göstermiştir. Sonuç olarak yüksek rakımlarda yetişen *metlesicsii* formunun İber Yarımada'sından kökenlenebileceği ve düşük rakımlarda yetişen *smithii* formunun ise Kuzey Afrika'nın toplandığı bölgeye yakın kısımlarından köken almış olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Aynı zamanda kesişen alanlarda hibrit formlarada rastlanabileceği eklenmiştir (Stewart ve ark. 2013).

Son 50 yılda 100'ü aşkın, çoğu tetrapoliploid *Dactylis glomerata*'ya ait çeşit geliştirilmiştir. Büyük çoğunluğu Kuzey Amerika olmak üzere, Japonya, Avrupa ve Yeni Zelanda menşeli 52 *Dactylis*, çeşit, aksesyon ve ıslah hattından oluşan materyal, genetik ilişkileri açısından SSR belirteçleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Amaç çoğu 5 veya 10 klondan geliştirilen çeşitler içi ve arası genetik çeşitliliğin durumunu belirlemektir. Böylece bitki ıslahı açısından çeşitlerin yeteri kadar genetik farklılık taşıyıp taşımadıkları araştırılmıştır. Ayrıca *Dactylis glomerata* alt türlerine ait bazı aksesyonlar, çeşit geliştirme sırasında eski atalar olduklarından, çeşitlere yapmış oldukları genetik katkı veya çeşitlerdeki değişim durumu açısından incelenmiştir. Çeşit içi genetik benzerlik %52-71 arasında bulunmuştur. Genetik farklılık seleksiyona uğramış popülasyonlarda, birkaç çeşit ve hatta görülmüştür. Bu gruplar genetik olarak Asya'nın doğu taksonları ile benzerlik göstermiş ve geç çiçeklenme özelliği göstermiştir. Sonuç olarak, çeşitler içi genetik farklılık yüksek iken, çeşitler arası genetik farklılık yetersiz bulunmuştur (Xie ve ark. 2014).

*Dactylis glomerata* L. türünün Akdeniz ve ona benzer iklimlerde yetiştirilebilecek önemli bir yem bitkisi olduğu belirtilmiştir. Yunanistan coğrafyasında *Dactylis glomerata* L. bitkilerinin kurakçıl, düşük yükselteli veya yüksek rakımlı Alpin benzeri otlaklarda oldukça yaygın olduğu aktarılmıştır. Yunanistan'a ait farklı coğrafyalarda yetişen doğal *Dactylis*

*glomerata* popülasyon çeşitliliği, morfolojik ve moleküler belirteçler kullanılarak çalışılmıştır. Bu sebeple Yunanistan'ın merkez, kuzey ve güney olmak üzere 3 farklı lokalitesinden, her lokalitede 2 km ara ile 2 farklı popülasyon, toplamda 72 bitki toplanmıştır. Çalışılan popülasyonlara ait moleküler genetik ilişkiler SSR ve ISSR belirteçleri ile taranmış elde edilen sonuçlar, coğrafik ve morfolojik özellikler bakımından karşılaştırılmıştır. Başaklanan sap sayısı dışında, coğrafik bölgelere bağlı olarak diğer tüm morfolojik karakterler farklı bulunmuştur. Dahası güney bölgesine ait aksesyonlara ait fenotipik çeşitlilik, kuzey bölgesine ait olanlardan daha fazla bulunmuş. Moleküler belirteç sonuçları karşılaştırıldığında, tür seviyesinde oldukça yüksek bir genetik çeşitlilik hesaplanmıştır. Moleküler belirteç analizlerine göre, popülasyonlar içi genetik farklılık ISSR belirteçleri için %62 ve SSR belirteçleri için %83 oranında hesaplanmıştır. Popülasyonlar arasında ise ISSR için %38 ve SSR için %17 oranında hesaplanmıştır. Bu durumda popülasyonlar içi genetik farklılık popülasyonlar arasından daha yüksek bulunmuştur. Küme analizine göre bu veriler değerlendirildiğinde 3 bölgeye ait popülasyonlar iki grupta toplanmıştır. 1. grup Crete (güney) adasına ait popülasyonlar, 2. grup ise kuzey popülasyonları (Taxiarchis) ile merkez (Pertouli) popülasyonlarından oluşmuştur. Bu çalışmada, SSR belirteçleri popülasyon içi, ISSR belirteçleri popülasyonlar arası genetik çeşitliliği belirlemede daha elverişli bulunmuştur. Çalışılan lokasyonlar bazında genotipik ve fenotipik özelliklerin her ikisi de çeşitliliği belirlemede kullanışlı bulunmuştur. Hem tür hem de lokasyon bazında yüksek genetik çeşitlilik gözlemlenmiştir. Kuzeye ait bitkiler (Taxiarchis) boyca uzun, yaprak ve dallar geniş, başaklar diğer iki bölgedekinden daha uzun bulunmuştur. Güney (Crete Adası) bölgesinden toplanan bitkiler ise morfolojik olarak, en kısa boylu, yaprak ve dallar dar, başaklar daha kısa belirlenmiştir. Vejetatif ve generatif fenotipik karakterler oldukça farklılık göstermelerine rağmen, başak uzunluğu, ilk internod uzunluğu ve bitki yüksekliği *D. glomerata* bitkileri için kullanılabilecek belirgin farklılıklar gösteren temel morfolojik karakterler olarak belirlenmiştir. Bu morfolojik karakterler çevre ile ilişkilendirildiğinde, en yüksek fenotipik farklılıkları Crete adasına (güney) ait aksesyonlar göstermiştir. Bu duruma örneklerin toplandığı alanlarda, türe ait popülasyonların sayıca fazla olmasının sebep olabileceği söylenmiştir. Buna rağmen en az morfolojik farklılıklara sahip aksesyonlar Taxiarchis (kuzey) bölgesine ait bulunmuştur. Pertouli (merkez) bitkilerinde yüksek fenotipik farklılıklar gösterdikleri belirtilmiştir. Bunun sebebi olarak bölgenin farklı mikro klimalara sahip olması neden gösterilmiştir. Mikrosatellit belirteç (SSR ve ISSR) analiz sonuçlarına göre, 3 bölgeye ait örneklerin hepsi bu belirteçler açısından yüksek polimorfik bantlar göstermiştir. Kuzey bölgesi (Taxiarchis), fenotipik ve genetik olarak diğer iki bölgeye

göre en az çeşitlilik gösteren yer olmuştur. Güney lokasyonları SSR ve merkez lokasyonları ISSR belirteçleri bakımından daha yüksek polimorfizm göstermiştir. Güney bölgesindeki fenotipik ve genetik çeşitlilik, büyük oranda iklimsel koşulların yarattığı stres (sıcaklık, kuraklık) faktörlerine bağlanmıştır. Benzer durumun merkezde görülmesinin habitat çeşitliliğinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Kuzey (Crete) bölgesi bitki genomları, diğer iki lokasyona göre daha yüksek sayıda spesifik allel polimorfizmi göstermiştir. Bu duruma coğrafik engellerin oluşturduğu üreme engellerinin neden olabileceği belirtilmiştir (Madesis ve ark. 2014).

Domuz ayrığına ait genetik kaynakların çalışılması, etkili bir ıslah programı, türe ait yem kalitesi ve verimliliğinin artırılması için önemlidir. *Dactylis* genetik kaynaklarının araştırıldığı başka bir çalışmada, 21 ülke ve 7 farklı coğrafyadan 95 aksesyona ait genetik çeşitlilik ve aralarındaki ilişkileri belirlemek için protein sentezini başlatan kodon (ATG) dizisi belirteç olarak kullanılmıştır (SCoT: start codon-targeted). Bu amaçla 24 adet yeni, kolay, polimorfik ve güvenilir SCoT belirteç, analiz için kullanılmıştır. Primer başına ortalama 11.4 olmak üzere toplamda 324 bantın 273'ü polimorfik çıkmıştır. Cins için ortalama polimorfizm oranı %83.4 bulunmuştur. Moleküler varyans analizine göre grup içi polimorfizm oranı %69.13 ve gruplar arası polimorfizm oranı %30.8 olarak belirlenmiştir. 6 primer için polimorfizm oranı %100 çıkmıştır. 7 coğrafik bölge için *Dactylis* örneklerine ait genetik varyasyon oranları, büyükten küçüğe doğru Batı Avrupa (P: % 65.74), Güney Çin (P = % 59.26), Kuzey Çin (P = % 54.32), Kuzey Avrupa (P = % 46.60), Merkez Avrupa (P = % 41.67), Kuzey Amerika (P = % 36.11), Okyanusya (P = % 35.80) şeklinde sıralanmıştır. Bu değerlere göre, örnek sayısı veya coğrafik koşullara bağlı olarak Avrupa ve Çin aksesyonları önemli düzeyde genetik çeşitlilik göstermiştir. Sonuçlar gruplar arası genetik çeşitliliğin, coğrafik bölgelere ve dağılışa oranla daha yüksek olduğunu göstermektedir. UPGMA dendrogram sonuçları, coğrafik bölgelere göre 95 aksesyon için 7 grup (küme) oluşturmuştur. Aynı bölgeye ait aksesyonlar aynı kümede toplanmıştır. Orjinlerine göre her küme aynı zamanda alt grup özellikleri göstermiştir. Özellikle Güney ve Kuzey Çin aksesyonları genetik olarak birbirlerine çok yakın çıkmıştır. Bu genetik çeşitliliğe, ekocoğrafik koşullar, iklim tipleri, ıslah çalışmaları, kültür çeşitleri arası gen geçişi, kuşların tohumları taşımaları, tohumluk seçimi gibi etkenlerin neden olabileceği söylenmiştir. Bu çalışma ile SCoT genetik belirteçlerinin, *Dactylis* için genetik ve coğrafik farklılıkları belirlemede, *Dactylis* gen kaynaklarının değerlendirilmesi ve korunmasında başarılı bir şekilde kullanılabilecekleri gösterilmiştir (Jiang ve ark. 2014).



*Dactylis*'in taksonomik statüsünü aydınlatmaya yönelik moleküler çalışmalardan biride, *Dactylis*'e ait 5S rDNA ara bölgelerine (intergeneric sequences/ IGS) ait PCR ürünlerinin, diğer bazı *Poaceaea* türleri ile karşılaştırılması olmuştur. Ukrayna kaynaklı çalışmada belli bir bölgeye ait *Dactylis* örnekleri toplanmış, 5S rDNA (rRNA) IGS bölgeleri PCR ile çoğaltılmış, *Dactylis*'e ait 5S rDNA PCR ürünlerinin büyüklükleri jel elektroforezi ile saptanmış ve sekans dizilimleri belirlenmiştir. Çalışmada *Dactylis*'in 258 bp uzunluğunda 5S rDNA-IGS sekanslarına sahip olduğu, bu özelliği ile *Poaeaea* ırkında en kısa sekanslara sahip olduğu belirtilmiştir. 5S rDNA tekrarlarının RNA 3 polimeraz aktivitesi gösterdikleri ve promotöre sahip oldukları belirtilmiştir. *Dactylis glomerata* örneklerine ait 5S rDNA-IGS sekansları %96.8-98.8 arası genetik benzerlik göstermiştir. Bu oran tür içi (İntragenomik) genetik homolojinin yüksek olduğunu göstermiştir. Yapılan 5S rDNA IGS sekans karşılaştırması, *D. glomerata* ile kendisine uzak akrabası *Avena clauda* arasında yüksek bir homoloji olduğunu, muhtemelen subtribe *Dactylidinae* ile subtribe *Aveninae* arasında yatay bir sekans geçişi ihtimali olduğu ve bu olgunun ileri çalışmalar ile aydınlatılması gerektiği aktarılmıştır (Volkov ve Panchuk 2014).

*Dactylis* serin mevsim yem bitkilerinden olup, yazın havalar ısındıkça ot verimi azalmaktadır. Bu sebeple *Dactylis* ve sıcaklık stresi ile ilgili çalışmalar yapılması önemli görülmüştür. Sıcak mevsimlerde de *Dactylis*'ten yüksek ot verimi almak için, sıcaklık toleransı ile ilişkili genetik faktörlerin belirlenmesi ve ileri ıslah çalışmaları için moleküler belirteçlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Sıcağa dayanıklı 'Baoxing' ve sıcaklığa duyarlı '01998' genotipleri kullanılarak *Dactylis* genotiplerinin sıcaklığa adaptasyon ile ilişkili genetik özellikleri moleküler belirteçler ile araştırılmıştır. Illumina RNA sekans okuma teknolojisi kullanılarak SSR ve SNP moleküler belirteçlerine dayalı polimorfizm ve yanı sıra sıcaklık stresi altında farklı eksprese olan dayanıklılık genleri belirlenmeye çalışılmıştır. İki genotipe ait bitkiler yetiştirildikten sonra gündüz 38 C° ve gece 30 C° olmak üzere 26 gün süre ile sıcaklık stresi uygulanmıştır. Belirli aralıklar ile alınan yaprak örneklerine ait mRNA'lar izole edilmiş ve cDNA'ları sentezlenmiştir. SSR ve SNP belirteçlerine özgü polimorfizimler belirlenmiştir. Daha sonra Illumina HiSeq 2000 platform sayesinde bu polimorfizimleri belirleyen transkriptom okumaları yapılmıştır. 207 milyon işlenmemiş (ham) okumadan, yüksek kaliteli 163 milyon işlenmiş sekans okuması gerçekleştirilmiştir. Gerekli düzenlemelerden sonra toplamda 126846 unigen tanımlanmış ve bunlardan 40078 tanesinin kodlama sekansları taşıdığı belirlenmiştir. Yine birleştirilmiş unigenlere göre 669300 adet yüksek kaliteli SNP okumasının, 416099 tanesinde transisyon, 257736 tanesinde

transversiyon (nokta mutasyonları) ve 75875 tanede unigen saptanmıştır. Ayrıca toplam 8475 mikrosatelitin 7764 unigen barındırdığı belirlenmiştir. Sıcaklık stresi altında, sıcaklığa farklı cevap veren unigen sayısı, sıcaklığa toleranslı ‘Baoxing’ (3527)’de sıcaklığa duyarlı ‘01998’ (2649)’den fazla bulunmuştur. Sıcaklık stresi sonrası cevap oluşturan sekansların yüksek teknoloji sayesinde yapılan transkriptom analizi SNP ve SSR belirteci geliştirmede ve sıcaklık stresi ile ilişkili özel genlerin belirlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Huang ve ark. 2015).

Diploid *Dactylis glomerata* subspecies *sinensis*, Çin’in bazı eyaletlerinde 1000-3800 m arası yükseltilerde, soğuk iklim zonunda belirlenmiştir. Bu özelliği nedeni ile diğer diploid ve tetrapoliploid *Dactylis* taksonlarının yaygın olarak bulunduğu alanlardan kopuk bir durum sergilemektedir. Bu duruma açıklık getirmek amacı ile Çin kaynaklı 10 tetrapoliploid aksesyon ile diploid iki subsp. *sinensis* genotipi, Asya, Avrupa, Kuzey Afrika ve Kanarya Adaları’na ait 17 diploid takson, nükleer ITS sekansları bakımından karşılaştırılmıştır. ITS sekans yapılarına göre diploidler, Avrupa ve Kuzey Afrika gurubu (*aschersoniana*, *woronowii*, *smithii*, *santai*, *castellata* ve *mairei*), İber gurubu (*ibizensis*, *lusitanica*, *juncinella* ve *izcoi*) ve 3. gurubu ise Orta Doğu kökenli *Judaica*, İran’ın yüksek kesimlerinde yetişen *parthiana* ve Himalaya diploidi *himalayensis* oluşturmuştur. Çin diploid örneklerinin Avrupa diploidlerine benzedikleri fakat ITS sekanslarında 4 adet mutasyon gösterdikleri belirlenmiştir. 10 Çin kaynaklı tetrapoliploidin 5 tanesi sekanslarında nükleotit pozisyonunda farklılıklar göstermiştir. Farklılıklara dayanılarak bu tetrapoliploidlerin Avrupa kökenli *aschersoniana* ile Çin kökenli diploid *sinensis* hibridi olabileceği bildirilmiştir. 4 tetrapoliploid takson sekanslarındaki farklılıklara bakılarak, bunların Himalaya kökenli diploid *himalayensis* ve Avrupa kökenli diploid *aschersoniana* hibridi olabilecekleri aktarılmıştır. Geriye kalan tetrapoliploid aksesyonların tipik diploid *aschersoniana* sekans özellikleri gösterdikleri, dolayısı ile bu tetrapoliploidlerin iki *aschersoniana* genotipinin indirgenmemiş gametlerinin birleşmesi sonucu oluşmuş olabilecekleri sonucuna varılmıştır. Çin kaynaklı diploid *sinensis* örneklerinin genetik köken olarak Avrupa diploid *aschersoniana* formlarına yakın, coğrafik olarak daha yakın olan diploid *himalayensis* formlarına ise genetik olarak daha uzak olduğu görülmüştür. Diploid *aschersoniana* Çin’e en yakın Kafkasya buzul barınaklarında gözlemlenmiştir. Diploid *sinensis* ile ilişkisinin buzul devri öncesi veya daha yakın zamanda “İpek Yolu” aracılığı ile olabileceği yorumunda bulunulmuştur (Steward ve Ellison 2015).

## 2. 6. Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH)

Sitogenetik, genetik biliminin tamamlayıcı dallarından biri olup, çekirdek veya organel genomlarının, özellikle kromozomal seviyede yapı ve organizasyonlarının analiz edilmesinde, 1900'lü yıllardan beri kullanılmaktadır. Kullanılmaya başlandığı günden bu yana birçok büyük ökaryotik canlı gurubuna ait kromozomların tanımlanması ve karyotiplerinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Genlerin fiziksel paketlenmiş halleri olan kromozomlar, büyüklük ve morfoloji olarak tür içi ve türler arasında farklılıklar sergilemektedir. Kromozomlar bazı fiziksel özelliklerine göre; kol uzunlukları, sentromer pozisyonu, sekonder yapı gibi karşılaştırılıp, tanımlanabilir (Maluszynska 2002, Figueroa ve Bass 2010).

Çeşitli sitogenetik metotlar ile haklarında bilgi toplanan, kromozom, kromozom parçaları veya belli gen bölgelerine ait ayırt edici özellikler, insan sağlığı, bitki veya hayvan genetiği, taksonomisi ve ıslahı amacı ile kullanılmaktadır. Sitogenetik bilgiler ışığı altında, kromozomal anormaliler ve bunlara bağlı genetik hastalıklar, evrimsel biyoloji, karşılaştırmalı taksonomi, filogenetik araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar, genomları oluşturan yapısal öğelerin, poliploidi seviyesi, intra veya inter-spesifik genetik materyal geçişlerin belirlenmesi, belirli gen bölgelerinin haritalanması sonuçlarına dayanmaktadır (Hasterok ve ark. 2006a, Figueroa ve ark. 2012, Pita ve ark. 2013).

Sitogenetiğin temel materyali olan kromozomlar, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında fakat özellikle kromozomların yoğunlaştığı ve kısaldığı mitoz metafaz aşamasında daha kolay çalışılmaktadır. Işık mikroskopu altında kromozomlar gözlenemez, ancak floresan olmayan (asetokarmin, asetoorsein, feulgen) ve floresan (DAPI, kromomisin A3, probodium iyodat, Hoechst) boyalar ile boyanarak görünür hale gelirler (Walling ve ark. 2005, Siljak-Yakovlev ve ark. 2014). Klasik sitogenetikte, metafaz kromozomları, yukardaki boyalarla homojen boyanmakta, uygun mikroskoplarla incelendikten sonra, bu şekilde kromozomların sayısı, kol uzunlukları ve oranları ölçülmekte, sentromer, satelit, NOR bölgesi gibi morfolojik yapılar belirlenebilmektedir. Fakat bazı bitki türlerinde, kromozomların küçük olması, çok sayıda olması veya morfolojik olarak ayırt edilememesi (simetrik karyotip); yanı sıra inversiyon, translokasyon, delesyon gibi kromozomal değişikliklerin belirlenmesi; sekans düzeyinde genom organizasyonunun aydınlatılması gibi durumlarda yukardaki homojen boyamalar yetersiz veya sınırlı düzeyde bilgi sağlamaktadır. Bu durumda spesifik bölgeleri belirleyen boyama teknikleri (C, Q, N, NOR, G bantları) kullanılmaktadır. Farklı boyalar kullanılarak kromozomlar, boyandıkları yerlere ve boyanma yoğunluklarına göre

sınıflandırılıp, karşılaştırılabilir. Fakat çoğu durumda bu teknikler de yetersiz kalabilmektedir. Bu durumda daha ileri tekniklerin tek veya yukarıdaki tekniklerle birlikte kullanılmaları gerekmektedir (Sharma ve Sharma 2014, Singh 2016).

Son yıllarda gelişen bilimsel ve teknolojik gelişmelere paralel olarak sitogenetik biliminin kullanım alanı ve etkinliği artmış, yukarıdaki sitogenetik yöntemlere ilave yeni teknikler geliştirilmiştir. *In situ* hibridizasyon teknikleri bu gelişmelerden olup, sitogenetik çalışmaların moleküler düzeyde yapılmalarına olanak sağlamaktadır. Genom yapısındaki tekrarlı diziler ve tek kopya DNA bölgeleri; küçük farklılıklar gösteren genomları, bir genomda bulunan kromozomların homoloji derecesini, farklı türlerin genomlarını, poliploidi durumlarını, yapay oluşturulan melezlerin genom yapısını açıklığa kavuşturmada çok önemli işaretlerdir. Bu işaret niteliğindeki gen dizilerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması için en etkili moleküler sitogenetik yöntemlerin başında *in situ* hibridizasyon teknikleri gelmektedir (Jiang ve Gill 2006, Chester ve ark. 2010, Figueroa ve ark. 2012, Karafiátová ve ark. 2016).

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH), genomik *in situ* hibridizasyon (GISH), Fiber-FISH, çok renkli FISH, Try-FISH, üç boyutlu FISH gibi farklı *in situ* hibridizasyon varyasyonları kullanılarak, spesifik kromozomlar, kromozom setleri, kromozom bölgeleri, kromozomal anormaliler, belirli gen bölgeleri gelişmiş floresan boyama ve görüntüleme ekipmanlarıyla analiz edilmektedir (Pita ve ark. 2014, Xu ve ark. 2016).

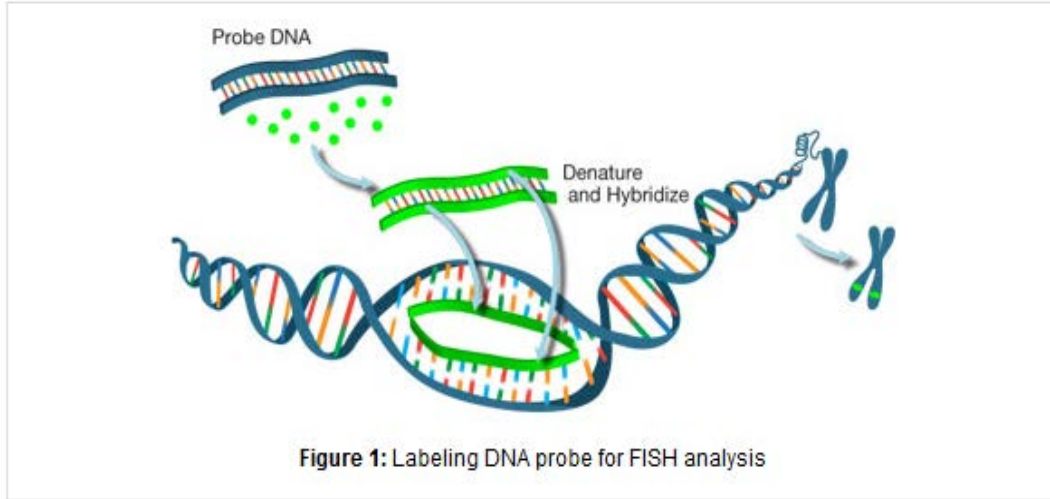
Aşağıda bu tez çalışmasında kullanılan floresan *in situ* hibridizasyon tekniğinin (FISH/ Fluorescence *In Situ* Hybridisation) gelişimi, çeşitleri ve kullanım alanları hakkında bilgiler verilmiştir.

FISH biyolojik materyallerden elde edilen nükleik asitlerin yapı ve fonksiyonlarının, mikroskop slaytları üzerinde incelenmesine olanak sağlayan *in situ* hibridizasyon tekniklerden birtanesidir. DNA–DNA hibridizasyonuna dayalı FISH, gen sekanslarının hücrenin çeşitli kromozomal aşamalarında, kromozomlar üzerindeki lokasyonlarını belirlemede kullanılmaktadır. RNA-RNA FISH ise hücre veya dokularda genlerin ekspresyon özelliklerini, aktif genlerin sentezlediği RNA'ları veya immünolojik boyama metotları ile birleştirilerek kromozomların yapı ve fonksiyonları ile ilişkili proteinleri belirlemede kullanılmaktadır. FISH göreceli uygulama kolaylığı, farklı floresan boyaların çeşitliliği, görüntüleme ve analiz edilebilirliğinin hızlı olması nedeni ile oldukça yaygın kullanılan ve gelişmekte olan bir tekniktir. Bu sebeple çeşitli canlılara ait genom projeleri ve fonksiyonel

genomik çalışmalarda, sitogenetik harita oluşturmak ve genoma etrafıca bakmak amacı ile sıklıkla kullanıldığı görülmektedir (Jiang ve Gill 2006, Pita ve ark. 2014, Xu ve ark. 2016).

DNA-DNA FISH tekniğinde sitolojik veya histolojik kaynaklı hedef DNA ve bu hedef DNA üzerindeki ilgili bölgeye bağlanan floresan boya işaretli spesifik prob veya problemlerin oluşturduğu yapı (hibridizasyon) mikroskop slaytları üzerine fikse edilmektedir (Şekil 2. 1). Arkasından bu mikroskopik preparatlar floresan, konfokal veya elektron mikroskopları ile incelenmektedir. Preparatlara ait kullanışlı görüntüler çekildikten sonra çeşitli analiz programları ile belirli genom sekanslarına ait bazı nicel (sinyallerin sayısı) ve nitel (yapısal özellikleri, ökratik, heterokratik, erken ya da geç replike olması) bilgiler değerlendirilmektedir. Teknik, çeşitli aşamalarda kinetik kontrol (denatürasyon, renatürasyon) mekanizmaları ve kimyasal çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. FISH ve varyantları mitoz metafaz kromozomlarına, mayoz pakiten, diakinez ve metafaz I kromozomlarına uygulanabilmektedir. Ayrıca, konfokal taramalı laser mikroskop yardımı ile hücrenin interfaz evresi kromatin yapısına ait sinyaller gözlenebilmektedir. Yine hedef olarak, kimyasal işlemler sonucunda, uzatılmış DNA iplikçikleri ve kromatin fiberleri kullanılarak hedef sekanslara ait yüksek çözünürlüklü haritalar hazırlanmaktadır (Walling ve ark. 2005, Chester ve ark. 2010, Badaeva ve ark 2017).

FISH çalışmalarında nükleik asit üzerindeki hedef bölgeler prob veya problemler aracılığıyla işaretlenmektedir. Prob olarak genom sekanslarına ait kodlayan veya kodlama yapmayan genellikle tekrar dizilerinden oluşan bölgeler sıklıkla kullanılmaktadır. Yine rekombinant DNA kütüphaneleri taranarak BAC (bacterial artificial chromosome), YAC (yeast artificial chromosome), plasmid gibi klonlar, PCR ürünleri veya bir bitkinin genomik DNA'sının tamamı da prob olarak kullanılmaktadır. Kullanılan problemler amaca bağlı olarak, bazıları spesifik kromozomları diğer bütün kromozomlardan ayıran morfolojik farklılıkları gösterirken, bazıları doğal veya sentetik allopoliploid organizmalarda kromozomların kökeni hakkında bilgi vermektedir (Hasterok ve ark. 2006b, IBGSC 2012, Lysak ve Mandáková 2013, Badaeva ve ark. 2017).



**Şekil 2. 1.** Basitleştirilmiş DNA-DNA FISH tekniğinin grafiksel gösterimi. İlk önce prob DNA'sı floresan moleküllerle (yeşil) işaretlenip (labeling) yeniden sentezlenir. Prob ve kromozomal DNA denatüre edildikten sonra birleştirilerek hibridizasyona tabi tutulur. Prob ile kromozomal DNA'nın homologlarının oluşturduğu "hibrit moleküller" floresan mikroskop altında gözlemlenerek, probun kromozom üzerindeki yeri tespit edilmiş olur (<http://www.enzolifesciences.com>)

Gall ve Pardue (1969), John ve ark. (1969)' ilk defa DNA-DNA *in situ* hibridizasyon tekniğini geliştirerek modern sitogenetiğe önemli bir katkıda bulunmuşlardır. Başlarda prob olarak kullanılacak nükleik asitler, radyoaktif elementler ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ) ile işaretlenip arkasından oluşan sinyaller otoradyografik yollarla görüntülenmiştir. Bu protokol oldukça zahmetli ve zaman alıcı olmaktadır (Pinkel ve ark. 1986). Daha sonraları izotopik olmayan, DNA problemleri kimyasal olarak modifiye edilmiş ve hedef bölgeler sitokimyasal veya floresan işaretler ile belirlenmiştir. Bitki kromozomları biotin veya dioksijenin bağlanmış prob ile hibridize edildikten sonra, hedef bölgeler enzim (horseradish peroxidase, alkaline phosphatase gibi) bağlı antikolar ya da floresan boyalar (fluorescein, rhodamine, Cy3) boyalar ile tespit edilirler (Jiang ve Gill 1994, Levsky ve Singer 2003). Günümüzde floresan işaretli problemler direk kullanıldığından, yukarıdaki karışık belirleme yöntemleri kullanılmamaktadır. Zamanla spesifik nükleotit ve antijenler ile bağlanabilen floresan moleküllerin çeşitliliği, mikroskop ve bilgisayar teknolojisindeki gelişmelerin kombinasyonu, FISH tekniğinin çeşitlenmesini, giderek daha pratik, hızlı, duyarlı ve aynı anda çok sayıda prob ile çalışmayı mümkün hale getirmiştir (Jiang ve Gill 2006, Pita ve ark. 2014, Sharma ve ark. 2016).

Tyramide-FISH (Try-FISH) tekniği kullanılarak, 1 kb'dan küçük prob sinyalleri kuvvetli bir şekilde belirlenebilmektedir. Sinyal duyarlılığını ve kalitesini artırmada Try-FISH normal tekniğe göre 10-100 kat daha duyarlıdır (Romanov ve ark. 2015, Khrustaleva ve ark. 2016).

Bitki mitotik metafaz kromozomları tek tek flow sitometri sayesinde ayrılıp üzerlerinde FISH alışmaları yapılabilir. Bu şekilde elde edilen bir kromozom proteinaz-K ile muamele edilirse orijinal halinden 100 kat daha fazla uzatılmış duruma getirilir. Uzatılmış kromozomlar üzerinde uygulanan FISH desenlerinin özünürlüğu daha yüksektir. Bu durumdaki kromozomlara problemler daha kolay bağlanabilmektedir. Süper uzatılmış metafaz kromozomları üzerinde yapılan FISH (Super Stretched FISH) bize yaklaşık 70 kb çözünürlüğünde bir harita oluşturma imkânı sağlamaktadır (Romanov ve ark. 2015, Khrustaleva ve ark. 2016, Fominaya ve ark. 2016). Uzatılmış DNA fiberleri üzerine uygulanan FISH (Fiber FISH) yüksek çözünürlükte sitogenetik haritalar oluşturmamıza olanak sağlamaktadır. Bu şekilde DNA fiberleri mikroskop slaytları üzerinde yaklaşık 2.5–3.5 kb/μm olacak şekilde görüntülenmektedir. Fiber FISH sayesinde, büyük tekrarlı gen bölgelerinin analiz edilmesinin, PCR, southern blot ve modern sekans tekniklerine göre daha avantajlı olduğu söylenmiştir. Fiber-FISH, bitki ve hayvan genom çalışmalarında, tekrarlı sekansların yapı ve organizasyonun belirlenmesinde, BAC klonlarının ve kloroplast DNA'sının haritalanmasında, transgenik DNA analizinde, fiziksel haritalardaki uzaklıkların belirlenmesinde geniş bir şekilde kullanılmıştır (Jiang ve Gill 2006, Chester ve ark.2010, Dechyeva ve Schmidt 2016).

İki renkli FISH (genellikle kırmızı ve yeşil) sayesinde, iki farklı prob kullanılarak, genom üzerinde belirlenen iki farklı fiziki sinyal filogenetik olarak karşılaştırılabilir. Bitki sitogenetiğinde uzun süre iki renkli FISH tekniğinin kullanıldığı görülmektedir. Fakat günümüzde ikiden fazla probun kullanıldığı, çok renkli FISH tekniğinin, bitkilerde de giderek kullanımının artığı görülmektedir (Chester ve ark.2010, Dechyeva ve Schmidt 2016, Xu ve ark. 2016).

Yıllar geçtikçe FISH tekniğinin uygulama alanları, etkinliği, uygulanabilirliği ve spesifitesinin hızlı bir şekilde artığı gözlenmektedir. İmmünolojik yöntemler FISH ile beraber kullanılarak, ekspresyonu kontrol eden ve düzenleyen genler kromatin düzeyinde belirlenmektedir. Konfokal mikroskop ve BAC problemleri kullanılarak, bitki interfaz genomlarına

ait kromozomların, sentromerlerin, telomerlerin, transgenlerin ve diğer DNA sekanslarının 3 boyutlu organizasyonları çalışılmaktadır (Santos ve ark. 2006, Sharma ve ark. 2016).

Daha spesifik bölgelerin belirlenmesi amacı ile kısa, tek kopya veya tekrar sayısı az olan dizilerin görünürlüğü için protokoller geliştirilmiştir (Karafiátová ve ark. 2016). Yine model bitkilerin çeşitli kromozomal aşamalarına özgü FISH teknikleri geliştirilmiştir (Li ve Cheng 2016, Wang ve Yu 2016). Artık RNA-FISH sayesinde tekrar dizileri kullanılarak, gen transkriptlerinin yeri ve ifade seviyeleri belirlenmektedir (Francoz ve ark. 2016, Koo ve ark. 2016). Böcek ve bitki dokularında yaşayan, virüs, bakteri veya başka mikroorganizmaların yerlerini belirlemek amacıyla, pratik ve hızlı sonuçlar almak için FISH metodu çeşitli şekillerde kullanılmaktadır (Kliot ve Ghanim 2016). Hücrelere uygulanan çeşitli mutajenler sonucu kromozomal yapılarda meydana gelen değişimler FISH çalışmaları ile takip edilmiştir (Juchimiuk-Kwasniewska ve ark. 2011, Kwasniewska ve Kwasniewski 2013, Kus ve ark. 2017).

Günümüzde FISH ve varyantları sayesinde tek kromozom veya PCR klonlarının haritası yapılmaktadır. Yine GISH tekniği ile tüm genoma ait problemler kullanılarak hibrid ve allopolloid bitkilerin parentel kromatinleri hakkında bilgi elde edebilmekteyiz. FISH ve GISH teknikleri, türler arası melezleme, poliploidi, filogenetik akrabalıklar, genetik haritalama ve bitki ıslahı alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yine bu teknikler sayesinde hücre döngüsü ve gelişme süresince farklı hücrelerde kromatin katlanması, interfaz nükleer organizasyon ve kromatin dağılımı gibi konularda bilgi sahibi olabilmekteyiz (Santos ve ark. 2015, Li ve Cheng 2016, Dechyeva ve Schmidt 2016, Badaeva ve ark. 2017).

FISH tekniği *Nicotiana*, *Lepidium*, *Primula* ve *Oryza* bitkilerine ait genomlar arası translokasyon gibi genetik değişimler ve allopoliploid orijinleri konusunda ileri bilgiler elde edilmesini sağlamıştır. *Paeonia*, *Aloe*, *Clivia*, *Nicotiana* ve *Pinus* gibi allopolloid cinslerde sekans ve karyotip değişiklikleri FISH tekniğiyle çalışılmış ve filogenetik durumları açığa kavuşturulmuştur. BAC klonları kullanılarak *Brassicaceae* familyasında translokasyonlar ve rekombinasyonlar net bir şekilde ortaya çıkartılmış, böylece atasal karyotiplerin hazırlanması kolaylaşmıştır. Poliploidizasyonu son 150 yıllık süreci kapsayan *Tragopogon* ve *Spartina* cinslerine ait türlerin poliploidi durumları, atasal genomları, FISH ve GISH teknikleri ile açığa çıkartılmıştır (Chester ve ark. 2010, Pita ve ark. 2014).



## 2. 6. 1. FISH tekniğinde kullanılan problemler

Bitki ve hayvan genomları kompleks olup kromozom adı verilen yüksek organizasyonlu genetik materyaller halinde organize olmuşlardır. Kromozomlar DNA molekülleri, histon ve histon olmayan proteinlerden oluşmuş yapısal moleküllerdir. Optik ve elektron mikroskopu gibi cihazlar ile bitki ve diğer ökaryot kromozomları incelendiğinde, primer ve sekonder yapılar dışında, tek düze yapılar olarak görünürler. Ancak klasik veya moleküler bazı sitogenetik teknikler kullanıldığında, her bir kromozom koluna ait, telomer, subtelomerik bölge, ara bölge (interstitial), yakın bölge (proksimal=sentromere yakın), uzak bölge (distal=sentromere uzak) ve sentromer olmak üzere en az 6 farklı bölge ayırt edilebilmektedir. Bu bölgelerde bulunan genler, retrotransposomlar, satelit DNA ve diğer sekanslar rekombinasyon frekanslarına ve fonksiyonel özelliklerine göre özelleşmiştir (Fengler ve ark. 2007, Margueron ve ark. 2010, Zhang ve Dawe 2012, Roa ve Guerra 2012).

*In situ* hibridizasyon teknikleri sayesinde, tekrarlı DNA dizilerinin olduğu bölgelere özgü problemler geliştirilerek, bu gen bölgelerinin fiziki lokasyon, yoğunluk ve transkripsiyon düzeyleri belirlenmektedir (Maluszynska 2002, Jiang ve Gill 2006, Li ve Cheng 2016). Floresan *in situ* hibridizasyon tekniğinde çoğunlukla kodlama yapan veya yapmayan tekrar DNA veya tek kopya DNA sekansları prob olarak kullanılmaktadır. Bu problemler rekombinant DNA kütüphanelerinden izole edilen plasmid, kosmid, BAC (bacterial artificial chromosome), YAC (yeast artificial chromosome) gibi klonlar; PCR sekansları veya belirli bir bitkiye ait genomik DNA'nın tamamından elde edilebilir. Bitki genom çalışmalarında kullanılan problemlerden bazıları kromozomların spesifik morfolojik özelliklerini teşhis ederek diğer kromozomlardan ayrılmasını, bazılarıda kromozom setlerinin kökenleri hakkında bilgi elde etmemizi sağlamaktadır (Maluszynska 2002, Hasterok ve ark. 2006a, b, Figueroa ve Bass 2010, Badaeva ve ark. 2017).

FISH ile çalışılabilecek prob büyüklüğü dolayısı ile işaretlenebilecek hedef DNA bölgesinin büyüklüğü, hedef DNA özellikleri, kullanılan kimyasallar veya geliştirilen FISH tekniğine göre değişmektedir. Örneğin tek kopya halinde 10 kilobaz çifti (kb) büyüklüğündeki prob, DNA genomu üzerinde işaretlenebilir. Bununla birlikte Tyramide-FISH tekniğinde, tyramide kimyasalı "horse radish peroxidase" enzimi ile etkileşime konulduktan sonra, 700 bp (baz çifti) uzunluğunda prob, metafaz kromozomları üzerine hibridize edilmektedir. Fakat kopya sayısı fazla DNA elementlerinde prob büyüklüğü 100 bp'ne kadar inebilmekte ve

başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Figuroa ve Bass 2010, Khrustaleva ve ark. 2016, Badaeva ve ark. 2017).

FISH tekniğinin gelişmesi ve etkili bir şekilde kullanılmasını sağlayan gelişmelerden biri zamanla spesifitesi artan farklı problemlerin geliştirilmesi olmuştur. Bunlardan ikisine, yaklaşık 100 kb büyüklüğünde bakteri yapay kromozomları (Bacterial Artificial Chromosomes/BACs) ve yaklaşık 0.5 Mb büyüklüğündeki maya yapay kromozomları (yeast artificial chromosome/YAC) örnek verilebilir. Bu problemler, nükleer DNA kaynaklı büyük sekansların klonlandığı problemlerdir. Bu problemlerden BAC klonları, kromozom veya kollarına ait spesifik bölgelere bağlanan, özellikle küçük genomlu ve düşük miktarda tekrar yapılarına sahip bitki türlerinde sıklıkla kullanılmıştır. *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* ve *Brachypodium distachyon* gibi küçük genomlu model bitkilerde, iki renkli BAC-FISH kullanılarak kromozom kollarına ait spesifik bölgeler çalışılmıştır. Yeterli sayıda BAC klonuna dayalı prob kullanıldığında, bitkilerin tüm kromozom kollarının özel bölgeleri işaretlenerek detaylı ve yüksek çözünürlükte sitogenetik haritalar yapılmıştır. Bu problemler düşük yoğunluklarından dolayı, daha çok mayoz pakiten kromatin preparatlarına uygulanmaktadır. Böylelikle daha ayrıntılı haritalar yapılabilinmektedir (Hasterok ve ark. 2006b, Figuroa ve ark. 2012, Khrustaleva ve ark. 2016, Badaeva ve ark. 2017).

Kromozomların sentromer ve telomer bölgeleri önemli kromozomal işaretlerdir. Bazı problemler kromozomların temel yapı taşları, örneğin sentromer veya telomer gibi özel bölgeleri tanımlamada kullanılmaktadır. Örneğin birçok bitki ve hayvan türünde, sentromer bölgelerinin mega baz seviyesinde tekrarlara sahip oldukları bilinmektedir. Fakat bu bölgelere ait tekrar dizilerinin değişimleri hızlı olduğundan, yakın ilişkili türlerde bile farklılıklar göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı ökaryot canlılarda, sentromerik ve telomerik bölgeleri kapsamlı karşılaştırmak tam anlamı ile mümkün değildir. Ancak bu bölgelerde, heterokromatin adı verilen, genellikle tekrar DNA elementlerinden oluşan, aktif olmayan, yoğun yapıda, rekombinasyon frekansının az olduğu, hücre döngüsünde geç sentezlenen yapılar bulunmaktadır. Sentromerik ve telomerik bölgelere özgü problemler kullanılarak, heterokromatik yapıların dağılımı, genom stabilitesi veya kromozomal aksaklıklar saptanmaktadır (Sharma ve Preting 2008, Birchler ve ark. 2009, Ravi ve ark. 2010).

*Arabidopsis thaliana*'nın 4. kromozomunun kısa kolu üzerinde, *hk4S* adı verilen heterokromatik knob bölgesi tanımlanmış, FISH ve diğer moleküler çalışmalar ile bu bölgenin yapısı açığa çıkartılmıştır (Fransz ve ark. 2000, Grob ve ark. 2013). *Brachypodium* türlerinde

heterokromatik yapıda olan *Rabl* dağılımı, sentromerik ve telomerik problemler ile açığa çıkartılmıştır (Idziak ve ark. 2015).

*B. distachyon* ve diğer birçok sıcak iklim tahılları ve buğdaygil yem bitkilerinde kromozomların sentromer organizasyonunda, diğer önemli bir eleman retrotranspozon elementlerdir. Bu retrotranspozonlar Ty3-gypsy ailesini oluşturmaktadır, bu elementlerden problemler geliştirilerek kromozomların sentromer bölgelerinin organizasyonları çalışılmıştır (Santos ve ark. 2015, Divashuk ve ark. 2016). Benzer şekilde tekrar yapılarından oluşan sentromere özgü histon 3 (*CENH3*) yapısı bulunduğundan sonra, FISH çalışmalarında prob olarak kullanılmıştır (Zhong ve ark. 2002, Ravi ve ark. 2011, Schubert ve ark. 2016).

FISH çalışmalarında kullanılan bir başka prob ise bir türe ait tüm genomik DNA'nın kullanılmasıdır. Genomik *in situ* hibridizasyon (GISH) olarak adlandırılan bu yöntem sayesinde, cins içerisindeki türlerin veya farklı genomlardan oluşmuş türlerin kromozom dağılımları ve tekrar eden DNA miktarları karşılaştırılmaktadır. Örneğin bir bitki türüne ait genomik DNA izole edilip prob olarak aynı türün genomuna hibridize edilirse, tekrarların çok olduğu bölgeler daha yoğun sinyal gösterir. GISH metodunun en çok özelleştiği alan, doğal veya yapay oluşturulan allopoliploid genomların kökenini araştırmakta kullanılmasıdır. Bu şekilde türler veya cinsler arası hibridizasyon sonucu oluşan türlerin atasal genomları hakkında bilgi toplanmaktadır. Örneğin iki renkli GISH kullanılarak, aralarında ilişki olduğu düşünülen iki diploid türün oluşturduğu poliploid bitkinin ataları araştırılabilir. Bunun için 2 türe ait genomik DNA'lar ayrı ayrı izole edilir, farklı floresan boyalar ile etiketlenir, bu türlerin oluşturduğu düşünülen doğal veya yapay poliploid bitkinin mitotik kromozomları ile hibridize edilir. Yeterli sekans homolojisi olması durumunda, farklı renkler ile etiketlenmiş prob DNA'lar poliploid genomun bazı kromozomlarına bağlanacak ve bu kromozomlar kendilerine bağlanan prob DNA'nın etiketlenmiş olduğu renge boyanacaktır. Böylece poliploid türün ataları belirlenmiş olur (Hasterok ve ark. 2004, Catalan ve ark. 2012, Dos Reis ve ark. 2014 ).

FISH çalışmalarında ribosomal DNA (rDNA) sekanslarına ait kodlama yapan veya yapmayan sekanslar sıklıkla kullanılan problemlerdir. rDNA sekansları protein sentezinden sorumlu ribozom organeli için yapısal ribozomal RNA üretiminden sorumlu olup, bu olay tüm canlılar için ortak bir süreçtir. Bitkilerde iki rDNA sınıfı bulunmaktadır. Bunlardan birini 18S, 5.8S ve 25S (veya 26S) rRNA kodlama bölgelerinden oluşan 45S rDNA (veya 35S), diğerini ise 5S rRNA kodlama bölgesinden oluşmuş 5S rDNA tekrarları oluşturmaktadır. Özel

proteinler ile birlikte bütün ribozomal RNA'lar, tüm ökaryotik canlılar için protein sentezinden sorumlu ribozom organelinin hayati parçalarını oluşturur. Neredeyse bütün canlı hücrelerde ribozomal DNA sekansları aktif şekilde sürekli transkripsiyona uğramakta, bu şekilde ribozom üniteleri için yeterli sayıda RNA sentezlenmiş olmaktadır. 45S ile 5S rDNA sekansları, ardışık dizi tekrarlarından oluşmuş, bu tekrarlar transkripsiyon yapmayan ara veya bağlayıcı bölgeler ile birbirinden ayrılmış, kromozomların bir veya daha fazla bölgesinde lokalize genetik elemanlardır. 45S rDNA sekansları RNA polimeraz I tarafından, 5S rDNA sekansları ise RNA polimeraz III tarafından transkripsiyona uğramaktadır. Ribozomal DNA bölgeleri (rDNA), bitki genomlarının yaklaşık %10'nuna tekabül etmekte, uzun zamandır filogenetik, taksonomik ve evrimsel çalışmalarda sitolojik markır olarak kullanılmaktadır. Ribozomal DNA bölgeleri oldukça korunmuş tekrar dizilerinden oluşmuş olup, ribozomal problemlerin kullanıldığı FISH yöntemi sayesinde kromozomlar üzerindeki yerleri kolaylıkla tespit edilmektedir. Bu problemler metafaz veya pakiten kromozomal yapılarına uygulanmaktadır. Burdan elde edilen bilgiler kullanılarak, özellikle birbiri ile ilişkili poliploidi serilerinin kromozomal durumları, poliploidi seviyeleri, filogenetik ilişkileri çalışılmaktadır (Maluszynska 2002, Weider ve ark. 2005, Volkov ve ark. 2007, Roa ve Guerra 2012, Bustamante ve ark. 2014, Volkov ve ark. 2017).

Yüksek ökaryotlarda 45S ile 5S rDNA lokasyonları kromozomların farklı bölgelerinde veya bazı durumlarda yakın konumlu olabilmektedir. Fakat bazı maya ve kara yosunlarında bu sekanslar fiziksel olarak aynı lokus içinde dağılmışlardır (Sone ve ark. 1999). rDNA ünitelerinden değişimi görece yavaş ve kodlama yapan sekanslar, uzak akraba canlıları; kodlama yapmayan ara eleman tekrarları ise daha hızlı evrildiklerinden tür ve populasyon düzeyinde canlıları filogenetik olarak karşılaştırmada daha etkin olarak kullanılmaktadır (Roa ve Guerra 2012, Bustamante ve ark. 2014). 45S ve 5S rRNA ünitelerini kodlayan bölgeler evrimsel süreçte korunmuş yapılar olmalarına rağmen, sekansları bağlayan ve kodlama yapmayan ara veya bağlayıcı elemanlar uzunluk ve sekans olarak çeşitlilik göstermektedir. Kodlama yapmayan bu tekrarların çeşitliliği, filogenetik ve taksonomik çalışmalarda oldukça yaygın kullanılmaktadır. Kodlama yapan rDNA sekansları da önemli kromozomal işaretler olup, kromozomal seviyede genom değişimi hakkında bilgi sağlamaktadır (Catalan ve ark. 2012).

Transkripsiyonel olarak aktif 45S rDNA sekansları genom üzerinde çekirdekçik oluşumundan sorumlu lokuslarda (nucleolar organizer regions/NORs) yer almaktadır. Bu

bölgedeki aktif genler, hücre interfaz evresinde iken, genellikle gümüş nitrat boyaması (Ag-NOR) sonucu bant oluşturmaktadır. Aynı zaman da bu bölgeler, metafaz evresi satelit taşıyan kromozomlarda, sekonder yapı (büzüşme) olarak görülebilmektedir. Sekonder yapıların metafaz kromozom bölgeleri üzerindeki yeri, çok sayıda örneğe ait klasik sitogenetik karyotipler derlenerek, kromozom kol uzunlukları referans alınarak genelleme yapılmıştır (Garcia ve ark. 2012, Guerra 2012).

Bitki türlerinin çoğunda ve hayvanlarda 45S rDNA (18S-5.8S-25S) sekansları interfaz başında transkribe olmakta, genellikle, mitotik kromozomların kısa kollarında ve subterminal konumlu olarak bulunmaktadır. Bu lokusların kromozomlar üzerindeki konumları ve sayıları, türler arası karyotip benzerlikleri ve akrabalıkları belirlemede kullanılmaktadır. Ancak 45S rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki konumlarının ve sayılarının çeşitlilik göstermesi, bazı bitki guruplarında kullanımlarını kısıtlamaktadır (Garcia ve ark. 2012, Guerra 2012, Volkov ve ark. 2017).

Floresan *in situ* tekniği, sekonder bölgelerin sadece aktif sentezlenen rRNA oluşumundan sorumlu gen bölgeleri (rDNA) içerdiğini, interfazın son evresinde aktif olduklarını ve özellikle telomere yakın bölgelerde lokalize olduklarını göstermiştir. Bununla beraber diğer aktif bölgelerin, muhtemelen sekonder bölgeler ile alakalı olmadıkları söylenmiştir (Vanzela ve ark. 2003). Örneğin, *Phaseolus coccineus*, *Vigna unguiculata* bitkilerinde 45S rDNA prob olarak kullanılmıştır. FISH sonuçlarına göre rDNA bölgelerinin sayısı, lokasyonları ve yoğunlukları (rDNA kopya sayısı) türlere göre değişiklik göstermiştir. Aynı zamanda rDNA sayıları farklı dokularda farklı sayıda veya farklı yoğunluklarda gözlemlenmiştir. *Phaseolus coccineus*'ta daha önce aktif rDNA bölgesi (NOR) Ag-NOR boyama yöntemi ile iki tane bulunmuşken, FISH yöntemi kullanıldığında bu bölgelerin 4 tane olduğu görülmüştür (Guerra ve ark. 1996).

Angiosperm ve gymnospermlerden oluşan 846 türe ait karyotipler incelenmiş, 45S rDNA özellikleri derlenmiştir. Burada, 45S rDNA bölgelerinin kromozomlar üzerindeki dağılımı, bu dağılımın rastgele mi yoksa belirli kromozomal bölgelerde mi olduğu, yine bu dağılımı belirleyen karyotip özellikleri araştırılmıştır. Angiosperm diploid türlerinde 45S rDNA sayıları çoğunlukla 2 veya 4 lokasyon göstermişlerdir. 45S rDNA bölgeleri geniş bir yayılma alanına sahip olmalarına rağmen, sayı olarak az bulunmuştur. Bu bölgelerin öncelikli olarak kromozomların kısa kollarında ve genellikle terminal konumlu oldukları aktarılmıştır. Aynı zaman da bu DNA tekrarlarının sıklıkla akrosentrik kromozomların kısa kollarında ve

tüm kolu kapsadıklarında belirtilmiştir. Özellikle holokinetik kromozomlarda bu tekrarların terminal bölgelerde yoğunlaştıkları aktarılmıştır. Poliploid bitkilerde genom başına bu tekrar bölgelerinde bir azalma olduğu gözlenmiştir. Gymnospermlerde (açık tohumlular) ise rDNA özellikleri, incelenen bitki ailesine (karyotipe) önemli derecede bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Sonuç olarak, angiospermlerde 45S rDNA genlerinin lokasyonlarının dağılımının rastgele olmadığı, tercihen, kromozomların kısa kollarında ve terminal konumlu yerleştikleri belirtilmiştir (Roa ve Guerra 2012).

5S RNA tekrarlarında ribozom organelinin bir parçası olup, bu yapıları kodlayan geniş bir gen ailesi tüm ökaryotlarda bulunmaktadır. 5S rDNA (rRNA) sekansları tekrar dizilerinden oluşmuş olup, bu yapılar, FISH tekniği kullanılarak domates, çeltik ve şeker pancarı genomunda bir, arpa genomunda 4 ve heksaploid buğday genomunda 6 lokasyonda gözlemlenmiştir (Murata ve ark. 1997).

Bitkilerde genellikle S tipi adı verilen, genomda tek başına lokalize 5S rDNA ve küçük oranda L tipi adı verilen, genomda 35S rDNA (45S) ile bağlantılı iki tip 5S rDNA tanımlanmıştır. Örneğin bazı *Asteraceae* türlerinde L tipi 5S rDNA genlerinin ekspresse olduğu fakat S tipi 5S rDNA genlerinin aktif olmadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda bağlı sekansların (5S+35S) nükleolar bölge etrafında yoğunlaştığı FISH sayesinde belirlenmiştir (Garcia ve ark. 2012).

5S rDNA yapılarının lokalizasyonu, sayıları ve 45S rDNA ile ilişkileri 784 bitki türüne ait bilgiler derlenerek aktarılmıştır. Poliploid bitkilerde dâhil incelenen karyotiplerin %54.5'i 2 adet 5S rDNA lokasyonu göstermiş, bu bölgelerin %58.7'si kromozomların kısa kollarında ve başlıca proksimal bölgelerde belirlenmiştir. Daha fazla lokasyona sahip karyotiplerde bu lokasyon çeşitliliği ile ortalama kromozom boyu arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Kromozom boyu 3 µm küçük karyotiplerde, lokasyonlar daha çok proksimal alanlarda, ortalama boya (3 - 6 µm arası) ve büyük (>6 µm) boya sahip kromozomlarda ise daha çok terminal veya ara bölgelerde (interstitial) konumlanmıştır. Holokinetik kromozomlara sahip türlerde de ortalama 2 adet 5S rDNA alanı olduğu ve bu alanların terminal konumlu oldukları aktarılmıştır. Birbirine bitişik 5S ve 45S rDNA bölgeleri, cinsler içinde az da olsa, sıklıkla kromozomların kısa kollarında gözlemlenmiştir (Roa ve Guerra 2015).

*Arabidopsis thaliana* bitkisinde, haploit genom başına 1000 5S rDNA kopyası olduğu ve uzun tekrarlı dizilerden oluştuğu belirtilmiştir (Campell ve ark. 1992). Daha önceki bir çalışmada sadece 4. kromozomun uzun kolu üzerinde ve sentromerik bir 5S rDNA bölgesi haritalanmıştır (Schmidt ve ark. 1995). FISH çalışmasına göre ise 4 adet 5S rDNA bölgesi olduğu ve hepsinin sentromerik olduğu gözlemlenmiştir. 3. ve 5. kromozomlar metasentrik durumlu olup, uzun kollarında 5S rDNA sinyali vermiştir. Yalnız 5. kromozomun uzun kolunda görülen sinyal diğer 5S rDNA sinyal verenlerden daha büyük gözlemlenmiştir. Aynı zamanda 5. kromozomun küçük kolunda küçük bir 5S rDNA daha belirlenmiştir. 2. kromozomun akrosentrik olduğu ve kısa kolunda 45S rDNA tekrarları taşıdığı belirtilmiştir. 4. kromozomunda akrosentrik olduğu ve kısa kolunun hem 5S rDNA hem de 45S rDNA sinyalleri verdiği söylenmiştir. 5S rDNA bölgelerinin farklı büyüklüklerde olması, sekansları oluşturan kopya sayılarının farklı olabileceğine bağlanmıştır (Murata ve ark 1997). Fakat FISH tekniğinin, sinyal yoğunluğu ile hedef bölgenin gen kopya sayısı veya prob ile hedef arasındaki homoloji belirlemek için tam anlamı ile yeterli olmayacağı vurgulanmıştır (Leitch ve Harrison 1992). Yine, 6 *Arabidopsis thaliana* ekotipi, bu sefer mayoz pakiten kromozomları farklı proplar kullanılarak FISH tekniği ile araştırılmıştır. Ekotipler arasında, 5S rDNA sayı ve bölgeleri bakımından bir polimorfizm gözlemlenmiştir. Bütün ekotiplerde 5S rDNA, 4. ve 5. kromozomların kısa kollarında belirlenmiştir. 3 kromozom submedyan ve 5S rDNA varlığı lokasyonu bu kromozom için çeşitlilik göstermiştir. 2. ve 4 kromozomların akrosentrik olduğu, kısa kollara ait telomerik bölgelerde NOR yapıları taşıdıkları belirlenmiştir (Fransz ve ark. 1998). Büyük ve küçük aktif kodlama yapan 5S rDNA bölgeleri sadece 4. kromozom ve 5. kromozomun uzun kolunda belirlenmiştir (Tutois ve ark. 2002). İnterfaz çekirdeğine ait FISH desenleri, 5S rDNA bölgelerinin hem heterokromatik hem de eukromatik bölgelerde olduklarını göstermiştir. Heterokromatik rDNA tekrarları sentromerlerin özel bir kısmını (kromosenter, daha kuvvetli sinyaller) oluşturmakta, eukromatik aktif 5S rDNA'lar heterokromatik bölgeden köken almıştır (Mathieu ve ark. 2003). Aynı zamanda büyük (majör) ve küçük (minör) 5S rDNA bölgelerinin *Arabidopsis thaliana*'nın farklı dokularında, farklı gelişim zamanlarında ve epigenetik değişikliklere bağlı olarak aktivitelerinin değiştiği belirtilmiştir. Bu durumda 5S rDNA bölgelerinin kromatin organizasyonları değişmektedir (Vaillant ve ark. 2007).

*Brachypodium* türlerinde 5S ve 35S rDNA lokus sayısı 2 ila 6 arasında bulunmuş, kromozomal lokasyonlarının oldukça sabit olduğu belirtilmiştir. 5S rDNA kümeleri her zaman kromozomların perisentromerik, 35S rDNA kümeleri ise kromozom uçlarında lokalize

olmuştur (Wolny ve Hasterok 2009). Başka bir çalışmada *B. sylvaticum* ve *B. Pinnatum*'a ait genotipler arası (intraspecific) rDNA polimorfizmi, 5S ve 25S rDNA problemleri kullanılarak FISH ile belirlenmiştir. AgNOR boyaması ile aktif ve inaktif rDNA bölgeleri, ikili (CMA +DAPI) boyama ile de rDNA bölgeleri ve CMA+ bantları arası ilişki çalışılmıştır. Her iki türe ait bütün diploid aksesyonlarda iki adet 5S rDNA bölgesi, *B. pinnatum* ise 4 adet 5S rDNA bölgesi göstermiştir. Bunun aksine 35S rDNA sayısı olarak çeşitlilik göstermiştir. Diploid *B. pinnatum* aksesyonları 2 veya 3, tetrapoliploid aksesyonlar ise 4 adet 35S rDNA lokasyonu göstermiştir. *B. sylvaticum* aksesyonları ise 2 ila 6 arası 35S rDNA lokasyonu göstermiştir. 35S rDNA bölgeleri sayıca fazla olmasına rağmen her iki türe ait aksesyonlarda sadece 2 bölge, bununla beraber tetrapoliploid *B. pinnatum* aksesyonlarında 2 veya 4 aktif 35S rDNA (NOR) bölgesi belirlenmiştir. 35S rDNA lokusları ile CMA<sup>+</sup> (GC nükleotitlerince zengin) bantların olduğu kromozomal bölgeler arasında sıkı ilişki olduğu gözlemlenmiştir (Breda ve ark. 2012).

FISH tekniği kullanılarak, *Arabidopsis thaliana* (Fransz ve ark. 1998), *Hordeum vulgare* (Taketa ve ark. 1999) türlerinde 5S ve 25S rDNA problemleri aracılığı ile türlere ait kromozomlar etkili bir şekilde ayırt edilmişlerdir. *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis* (Hasterok ve ark. 2001, Hasterok ve ark. 2006a) , *Pinus* (Liu ve ark. 2003), *Aloe* (Adams ve ark 2000), *Hypochoeris* (Weiss-Schneeweiss ve ark. 2003), süs zambakları (Marasek ve ark. 2004), cinslerinde, intraspecific rDNA lokuslarının sayısı ve kromozomal dağılımları belirlenmiş ve filogenetik karşılaştırmalar yapılmıştır.

Sitogenetik çalışmalarda rDNA sekansları kromozomal belirteç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak 45S ve 5S rDNA sekanslarının sayısı ve lokasyonlarının, çalışılan birçok bitki genomunda çeşitlilik göstermesi, bu belirteçlerin güvenilir bir şekilde kullanılmasını kısıtlamaktadır. *Oryza*, *Allium*, *Triticeae*, *Aegilops* cinsleri üzerinde yapılan çalışmalar, 45S rDNA bölgelerinin kromozomal homolojiyi belirlemede, sayısı ve lokasyon çeşitliliğinden dolayı, bazı sıkıntılar gösterdiği belirtilmiştir (Guerra 2012, Bustamante ve ark 2014). Bu durumun, kromozom segment değişimleri gibi bazı düzensizliklerin, 45S rDNA segmentlerinin artışına sebep olmasından ötürü gerçekleştiği belirtilmiştir (Huang ve ark. 2009). Örneğin *Lolium* kromozomlarında farklı araştırmacılar tarafından kırılmış veya buldukları bölgede boşluklu yapı gösteren 45S rDNA kromozomal bölgeleri saptanmıştır (Huang ve ark. 2009, Bustamante ve ark. 2014). Kırılan kromozom parçaları, yeni kromozomal düzenlemelere, kromozomal karasızlıklara ve muhtemelen 45S rDNA



lokasyonlarının artışına sebep olabilmektedir. Bu kromozomal fragment kırılması veya çözülmesi sonucu 45S rDNA bölgelerinin gen aktivitelerinde değiştiği bildirilmiştir (Huang ve ark. 2009, Brown ve O'Neill 2010, Huang ve ark. 2012). Bu oluşumlar, bu bölgelerde transkripsiyon gerçekleşmesinden dolayı, epigenetik değişikliklere bağlanmıştır (Huang ve ark. 2012).

Ribozomal DNA elemanları birçok bitkide filogenetik, taksonomik veya genom organizasyonunu anlamak amacı ile farklı yöntemler ile çalışılmıştır. Bu çalışmalara kolay erişim için, internet ortamında bitki rDNA (5S ve 45S) ilgili çalışmalar toplanmıştır (Garcia ve ark. 2012, 2014, [www.plantrdnadatabase.com](http://www.plantrdnadatabase.com)).

Bu tez çalışmasında 5S ve 25S rDNA (45S rDNA'nın alt ünitesi) prob olarak kullanılmış, diploid ve tetrapoliploid *Dactylis* aksesyonlarındaki sayıları, lokasyonları ve yoğunlukları (kopya sayıları) FISH desenleri ile belirlenmiştir. Böylece görece küçük ve morfolojik olarak benzer *Dactylis* kromozomları tanımlanmaya çalışılmış, diploid ve tetrapoliploid taksonlar içi ve arası filogenetik ilişkiler araştırılmıştır. Bu sebeple yukarıda 5S ve 25S rDNA problemleri ile ilgili önemli noktalara özellikle değinilmiştir.

## 2. 6. 2. FISH kaynak taramaları

*Arabidopsis thaliana*'nın 4. kromozomunun sentromerik bölgesinde yer alan heterokromatik yapılar (*hk4S*), diğer moleküler ve FISH teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada ökromatik ve heterokromatik alanların sınırları belirlenmiş, kromozomun orta bölgesinde (sentromer) yaklaşık 2 kb büyüklüğünde tekrar yapılarının (*hk4S*) varlığı gösterilmiştir. Belirlenen bu bölgedeki genlerin çok az eksprese oldukları aktarılmıştır. Ayrıca bu kromozomun tekrar bölgelerini çevrelemiş retrotranspozonların heterokromatik yapının oluşumunu teşvik ettiği açıklanmıştır (CSHL/WUGSC/PEB Arabidopsis Sequencing Consortium 2000, Fransz ve ark. 2000). BAC klonlarının kullanıldığı FISH tekniğinin sağladığı bilgiler, 4. kromozom üzerinde belirlenen heterokromatik yapının yakın bir geçmişi olduğunu ve köken olarak sentromer çevresinden kopup tekrar kromozom üzerine lokalize olduğunu (inversiyon) göstermiştir. Aynı zamanda sitozin moleküllerinin metillasyonunun heterokromatik yapı oluşumunda rol alabileceği belirtilmiştir (Fransz ve ark. 2000). Yine FISH yardımı ile *Arabidopsis* genomunun 4. kromozoma ait sentromerik ve telomerik problemler kullanılarak heterokromatik bölgeler ile bu bölgeleri çevreleyen ökromatik bölgelerin interfaz kromozomları üzerindeki yeri tespit edilmiştir. Bu bölgelerin kromozom üzerinde birlikte

organize oldukları açığa çıkartılmıştır. Bu yapıyı belirlemek için rDNA ve BAC klonları birlikte kullanılmıştır. Heterokromatik yapıların yüksek oranda metillenmiş ve çoğunlukla kondense tekrarlardan oluştuğu, buna rağmen ökromatik bölgelerin yüksek oranda asetilenmiş histonlardan oluştuğu belirlenmiştir. FISH yöntemi, interfaz kromozomlarındaki düzenlemeleri, kromatin organizasyonu, homolog ve homeolog kromozom ilişkilerini ve epigenetik düzenlemeleri belirlemede oldukça kullanışlı bulunmuştur (Lysak ve ark. 2001, Fransz ve ark. 2002).

*Medicago truncatula* ( $2n = 2x = 16$ )'ya ait mitotik metafaz kromozomlarından 20 kat daha uzun olan pakiten kromozomları üzerinde, bazı BAC klonları aracılığı ile moleküler sitogenetik bir harita oluşturulmuştur. Pakiten evresindeki heterokromatin bölgeler daha net floresan sinyaller oluşturmuştur. Pakiten kromozomlarına ait karyogram, kromozom uzunlukları, sentromer pozisyonları, heterokromatin özellikler, 5S- 45S rDNA ve *MtRI* FISH desenleri kullanılarak oluşturulmuştur. FISH tekniğinde kullanılan BAC klonlarının oluşturdukları sinyaller ile linkage grupları ilişkilendirilmek sureti ile bir sitogenetik harita oluşturulmuştur. Bu şekilde pakiten kromozomları üzerinde 20 BAC klonu ve 3 tekrar dizisinin bağlandığı yerler belirlenmiş bu yerlere bağlanan problemlere ait genetik ve sitolojik uzaklıklar hesaplanmıştır (Kulikova ve ark. 2001).

Çeltik bitkisi mitoz prometafaz kromozomları, mayoz pakiten kromozomları ve uzatılmış DNA fiberleri üzerine BAC-FISH tekniği uygulanmıştır. Böylece FISH tekniğinin ve kullanılan problemlerin, farklı kromozom durumları üzerindeki etkinlikleri test edilmiştir. BAC klonlarına dayalı FISH sinyallerinin büyük çoğunluğu 1Mb büyüklüğünde kromozomal DNA bölgelerini göstermiştir. Fakat bu büyüklükteki bölgeler mitotik prometafazda gözlemlenmemiştir. Bununla beraber 10. kromozomun erken pakiten evresinde görece fiziki lokasyonları yakın olan veya kısmen çakışan BAC sinyalleri eukromatik bölgeleri görünür hale getirmiştir. Buradan pakiten kromozomlarında FISH metodunun etkinliği, pakiten evresinin erken veya geç safhada olması ile DNA problemlerinin eukromatik veya heterokromatik bölgelere bağlanmasına göre değişebileceği sonucuna varılmıştır. Fiber-FISH tekniği 7 BAC klonu kullanılarak çeltik kromozomları için kalibre edilmiştir. Bu 7 BAC klon ilmekleri yaklaşık 1 Mb büyüklüğünde bir DNA bölgesi sekansı ile eşleşmiştir (Cheng ve ark. 2002).

*Pinus densiflora*, *P. thunbergii*, *P. sylvestris* ve *P.nigra* türlerine ait karyotiplerin benzerlik ve farklılıkları FISH ile çalışılmıştır. Çalışmada hapten veya florokrom bağlı, telomerik tekrarlara, sentromerik tekrarlara ve rDNA tekrarlarına özgü problemler kullanılmıştır.

FISH sinyalleri çoğunlukla kromozomların ara bölgeleri (interstitial) ve proksimal (sentromere yakın) bölgelerinde gözlemlenmiştir. Türler arası FISH karyogramları değerlendirildiğinde ara bölge, telomerik ve rDNA problemlerinin oluşturduğu sinyaller tüm türler için homolog kromozomları belirlemede oldukça kullanışlı bulunmuştur. Sonuçlar 4 türe ait kromozomal farklılıkların az olduğu ve proksimal bölgelerin çeşitlilik gösterdiği yönünde özetlenmiştir (Hizume ve ark. 2002).

Bir çim bitkisi olan *Zingeria trichopoda* ( $2n = 8$ ,  $2C-DNA = 5.3$  pg)'nın genom yapısının oldukça dinamik evrimsel bir geçmişe sahip olduğu bazı sitolojik çalışmalar ile ortaya konulmuştur. GISH çalışması ile *Z. trichopoda* çekirdeğinin farklı genomik organizasyon belirtileri gösterdiği, 2 genoma ait farklı yapısal özellikler taşıdığı ortaya çıkartılmıştır. Bu bulgulara dayanılarak, *Z. trichopoda*'nın, günümüz *Zingeria biebersteiniana* ( $2n = 4$ ) türü ile benzer şekilde kromozom sayısı az olan başka bir türün hibridi olabileceği ortaya koyulmuştur. Aynı çalışmaya dayanılarak, *Z. biebersteiniana* genomuna ait sentromerik "Zbcen1" gen tekrarlarının, *Z. trichopoda*'da belirgin bir şekilde azaldıkları açığa çıkartılmıştır. GISH ve rDNA problemlerinin kullanıldığı FISH kombinasyonu, iki ataya ait genomların ayırt edilmesi, 5S ile 45S rDNA bölgelerinin aynı anda belirlenmesine imkân sağlamıştır. *Z. trichopoda*'da ayırt edilebilen iki alt genom, benzer 5S rDNA lokasyon dağılımları göstermiştir. Fakat 45S rDNA sinyal dağılım ve sayıları değişkenlik göstermiştir. *Z. trichopoda* genomunda daha çok *Z. biebersteiniana* genomuna benzer 45S rDNA özellikleri gözlemlenmiştir. Allopoliploidizasyon sonrası, diğer diploid atanın 45S rDNA lokuslarının muhtemelen kayıp oldukları belirtilmiştir. Bunun sonucunda, *Z. trichopoda* genomuna, *Z. biebersteiniana* genomundan kalıtılan 45S rDNA lokasyon sayısının azalabileceği veya bu lokasyonların *Z. trichopoda* genomuna dağılabileceği varsayımlarında bulunulmuştur (Kotseruba ve ark. 2003).

FISH tekniği kullanılarak birçok bitkide transpozon (zıplayan genler /jumping gene) genetik elemanların konum olarak ve bitki türüne bağlı olarak kromozomlar üzerindeki yerlerinin sürekli değiştiği belirtilmiştir (Schwarzacher 2003). Örneğin, mısır genomunun %60'ının retrotranspozonlardan oluştuğu vurgulanmıştır. FISH metodu ile sentromere özgü bir protein olan "sentromer spesifik histon H3" ile sentromer bölgesinde yoğunlaşmış retrotranspozonlar arasında etkileşim olduğu belirlenmiştir. Sentromerik 2 BAC klonu kullanılarak, bu bölgede bulunan mısıra özgü sentromerik retrotranspozonların göstermiş olduğu yapısal çeşitlilik ve organizasyon genel hatları ile belirlenmiştir (Nagaki ve ark. 2003).

Çeşitli retroelementlere ait proplar kullanıldığında mısır kromozomlarının tüm kollarının retroelementler taşıdıkları belirlenmiştir. Yani sentromer dışındaki bölgelerde de retroelementlerin lokalize oldukları gösterilmiştir (Mroczek ve Dawe 2003).

Ototetrapoliploid 3 adet *Arrhenatherum* sp. (yüksek çayır yulafı) türüne ait aksesyonlar, sitogenetik metotlar olan C-bantlama ve floresan *in situ* hibridizasyon teknikleri kullanılarak kromozomal seviyede karşılaştırılmıştır. *Arrhenatherum* ve *Avena* cinsleri arasında intergenerik gen akışı olduğu bildirilmiştir. Bu durum açıklığa kavuştuğunda, *Arrhenatherum*'dan sıcaklık ve soğuk toleransı ile ilgili genlerin *Avena sativa*'ya aktarılabilceği açıklanmıştır. Bunun için kromozomlar üzerindeki benzerliklerin çalışılmasının başlangıç için önemli bilgiler sağlayacağı düşünülmüştür. C-bant sonuçları, kullanılan 6 aksesyon kromozomlarının oldukça ökromatik yapıda olduklarını, metasentrik, submetasentrik ve az sayıda subtelosentrik sentromer durumlu olduklarını göstermiştir. *A. parlatorei* türüne ait aksesyon diğer örnekler içinde baskın bir telomerik C-bant ile farklılaşmıştır. FISH çalışmasında prob olarak buğday 45S rDNA bölgesine ait pTa71 klonu kullanılmıştır. Bu klon çekirdekçik oluşumundan sorumlu bölgeye ait tekrar dizileri taşımaktadır. *Arrhenatherum album*, *A. elatius* ve *A. thorei* türlerine ait aksesyonların her biri, mitoz metafaz kromozomlarında 4 adet 45S rDNA FISH sinyali vermiştir. Örnekler ototetrapoliploid olduklarından, 4 sinyalin varlığı, her türün bir adet NOR bölgesi taşıdığı anlamına gelmektedir. Elde edilen bilgilerin, *Arrhenatherum* ve *Avena* cinsleri arası genom aktarım çalışmalarında kullanılabilceği söylenmiştir (Mitchell ve ark. 2003).

Sitogenetik veya kromozom haritaları kromozomlar üzerinde bir veya daha fazla prob DNA'ların bağlandığı yerlerin fiziksel olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Sentromer veya telomer bölgeleri referans alınarak, propların bulunduğu yer ve uzaklıklar  $\mu$ m cinsinden hesaplanmaktadır. Crossing over sonucu oluşturulan genetik haritalarda kullanılan belirteçlerin yeri, sitogenetik harita ile entegre edilerek daha da görünür hale getirilmektedir. Örneğin heterokromatik bölgeler az oranda ekspres olurlar yani crossing over olayı nadirdir. Bu durumda genetik harita belirteçleri gerçek fiziksel uzaklığı vermemektedir. Eğer sitogenetik haritalar kullanılırsa sonuçlar daha görünür olacaktır (Budiman ve ark. 2004). Sitogenetik haritalar, genetik haritalarda kullanılan belirteçlerin, özellikle sitolojik çalışmaların yoğun yapıldığı, kromozomların sentromer, telomer, heterokromatin, çekirdekçik oluşumundan sorumlu (NOR) kromozomal bölgelerdeki fiziki lokasyonlarını belirlemekte kullanılmaktadır. Genom araştırmalarındaki gelişmelere bağlı olarak sitogenetik haritalar

kromozomal düzeyde genom düzenlemesi hakkında araştırmacılara önemli bilgiler sağlamaktadır (Wang ve ark. 2006).

Kromozomlar üzerinde tek kopya gen bölgelerini belirlemenin zor olduğu belirtilmiştir. Mısır bitkisinin 9. kromozomu üzerinde bulunan tek gen kopyaların yerinin belirlenmesi için yüksek çözünürlüklü FISH tekniği adapte edilmeye çalışılmıştır. Bunun için pakiten kromozomları üzerine daha önce belirlenmiş genetik belirteçlerin çoğaltılmış kolonları prob olarak kullanılmıştır. Yöntemde en kısa prob sayesinde 3.1 kb ve 2 sekansta ise 100 kb büyüklüğünde alanlar görüntülenmiştir. FISH yöntemi ile mısır bitkisinin 9. kromozomu üzerinde 9 adet genetik yeri bilinen tek kopya gen bölgesi belirlenmiştir. Moleküler markırlara dayalı genetik harita, BAC klonlarına (BAC contig map) bağlı fiziksel harita ve FISH yöntemine dayanan sitogenetik harita bilgileri, mısır bitkisine ait 9. kromozomun sentromerik heterokromatin bölgelerinde önemli rekombinasyon indirgenmeleri olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar aynı zamanda, 10 pakiten kromozomu kullanarak, mısır genomu için etkili bir sitogenetik harita oluşturmak amacı ile bir prob karışımı (kokteyl) geliştirmiştir (Wang ve ark. 2006).

İğne yapraklı ağaçlar büyük genom ve tek düze karyotip yapılarından dolayı, sitogenetik çalışmaların zor yapıldığı materyaller olarak bilinmektedir. Fakat FISH sayesinde bu zorlukların büyük derecede üstesinden gelindiği söylenmiştir. *Strobilus* alt cinsine ait 5 tür kromozomal seviyede, 5S ve 25S rDNA problemleri kullanılarak, genom yapıları daha önce FISH çalışması yapılmış *Pinus* alt cinsi sonuçları ile karşılaştırılmıştır. rDNA FISH desenleri *Strobilus*'a ait 5 tür içinde oldukça çeşitlilik göstermiştir. Daha önce yapılan *Pinus* FISH sonuçları ile karşılaştırılınca bazı farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir. *Strobilus* türleri rDNA bölgeleri bakımından, *Pinus* türlerine göre daha fazla sayıda lokasyon göstermiş, bu durumun *Strobilus* genomunun büyüklüğü ile ilişkilendirilebileceği söylenmiştir. İki cins için 5S ve 18S rDNA özellikleri açıkça ayırt edilmiştir. Cinsle bağlı türler arası filogenetik ilişkiler belirlenmiştir. *P. bungeana* diğer türlere göre daha az sayıda 18S rDNA bölgesine sahip, fakat yoğun sinyaller vermiştir. Bu durumun cins içi 18S rDNA lokus dağılımını yansıtabileceği söylenmiştir (Cai ve ark. 2006).

*Gossypium hirsutum* ( $2n = 4x = 52$ ) bitkisinde BAC klonları prob olarak kullanılmış, oluşan FISH desenleri daha önce bilinen 6 linkage gurubunun fiziksel lokasyonlarını ve üzerinde buldukları kromozomları göstermiştir. Böylelikle 13 homeolog (kısmen homolog) kromozom çifti belirlenmiş, pamuk kromozomları için yeni bir sınıflandırma önerilmiştir

(Wang ve ark. 2006). Yine tetrapoliploid pamukta kromozom çifti linkage guruplarını hızlı belirlemek için mikrosatelit belirteçler kullanılarak BAC problemleri sentezlenmiştir. Örneğin BAC problemlerden biri, pamukta etilen hormonu cevap oluşumunu sağlayan faktör dizileri ile yüksek sekans benzerliği gösteren EST mikrosatelit belirteçlerinden geliştirilmiştir. Bu şekilde oluşturulan BAC probu, etilen cevap oluşum faktörünün A7 kromozomunun uzun kolunda lokalize olduğunu göstermiştir. BAC-FISH desenlerinin oluşturduğu fiziksel noktalar ve genetik linkage harita bilgileri, 26 BAC klonunun çoğunun birbirine yakın veya buldukları kromozomun sonunda konumlandıklarını göstermiştir. Buradan rekombinasyon aktif kromozomal bölgelerin distal konumlu oldukları ortaya çıkmıştır (Wang ve ark. 2007).

Temel sitogenetik analizler sonucunda, Robertson (1981) kromozom sayıları  $2n=10$ , 20 ve 30 olan 3 diploid *Brachypodium distachyon* sitotipi tanımlamıştır. Bu sonuçlara dayanarak *Brachypodium distachyon*'un temel kromozom sayısı  $x=5$  olan otopoliploidi serilerinden oluştuğunu vurgulamıştır. Fakat daha sonra genomik DNA ve BAC temelli problemlerin kullanıldığı FISH analizleri sonucunda bu sitotiplerin farklı türleri karşılayabilecekleri söylenmiştir (Hasterok ve ark. 2004, 2006b). Fenotipik, sitogenetik ve moleküler tekniklerin birlikte çalışılması sonucunda, cinste tek yıllık olan bu sitotiplerin iki farklı, *B. distachyon* ( $2n=10$ , Bd genomu) ve *B. stacei* ( $2n=20$ , Bs genomu), diploidi ve bu diploidlerin de doğal allopoliploid *B. hybridum* ( $2n=30$  BdBs genomu)'u oluşturdukları öne sürülmüştür (Catalán ve ark. 2012).

Floresan *in situ* hibridizasyona dayalı BAC problemleri kullanılarak *Brachypodium distachyon* genomuna ait büyük elemanların fiziksel haritalanması için FISH protokolü tüm aşamaları ile özelleştirilmiştir (Jenkins ve Hasterok 2007). *Brachypodium* cinsi içerisinde yer alan 6 tür ve 2 alt tür (20 aksesyon) FISH tekniği ile analiz edilmiş aksesyonların 25S (45S) ve 5S rDNA floresan sinyalleri incelenmiştir. Bütün örneklerde, 25S rDNA sinyalleri kromozomların kısa kollarında, telomerik uca yakın ve bazen kromozomların sekonder bölgelerinde tespit edilmiştir. 5S rDNA bölgeleri ise buldukları kromozomların uzun kollarında sentromerik (proksimal veya distal) alanlarda gözlemlenmiştir. 25S rDNA sayılarında bir çeşitlilik olduğu, bu durumun kromozomların yeniden düzenlemeleri, eşit olmayan crossing over ve gen değişimleri ile ilgili olabileceği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, *B. pinnatum* için  $2n=18$  veya 28 kromozumlu aksesyonlar tanımlanmıştır. GISH metodu ile 28 kromozumlu aksesyonların büyük ihtimalle *B. distachyon* ( $2n=10$ ) ve *B. pinnatum* ( $2n=18$ ) doğal hibritleri olabilecekleri öne sürülmüştür (Wolny ve Hasterok 2009). H4K5ac,

H3K4me2 ve H3K4me1 gibi epigenetik markırlar (histon yapıları) kullanılarak *Brachypodium distachyon* tohumlarının farklı gelişme evrelerindeki epigenetik değişimlerin durumu *in situ* olarak çalışılmıştır. Farklı doku ve organlarda farklı epigenetik değişimler kayıt edilmiştir (Wolny ve ark. 2015).

Tropikal bir buğdaygil yem bitkisi olan *Panicum maximum* Jacq.'un yüksek verime ve kaliteli bir ota sahip olduğu söylenmiştir. *Panicum maximum*'a ait bir diploid örnek ve 3 adet kültürü yapılan tetrapoliploid çeşide ait DNA içeriği ile 5S ve 45S rDNA sekanslarının özellikleri karşılaştırılmıştır. Örneklere ait DNA içeriği Flow-sitometri, rDNA desenleri ise çift renkli FISH tekniği kullanılarak çalışılmıştır. Diploid örneğe ait DNA içeriği yaklaşık 500 Mbp, tetrapoliploid örneklere ait DNA içeriği ise yaklaşık 1000 Mbp olarak hesaplanmıştır. 5S rDNA sinyali diploid örnekte 2, tetrapoliploid örneklerde ise 4 olarak bulunmuştur. 45S rDNA sinyal sayısı tetrapoliploid örneklerde 4 ile 8 arası sayılmıştır. Diploid türe ait idiogram 45S rDNA lokasyon sayısının, bu lokusun 2. kromozom üzerinde olup olmamasına göre değiştiğini göstermiştir (Akiyama ve ark. 2008).

Diploid 15 yabani kahve türü (*Coffea*) ile kültürü yapılan tetrapoliploid *Coffea arabica* genom organizasyonları iki florokrom boya (CMA, DAPI) ve 5S ve 18S rDNA sekanslarının prob olarak kullanıldığı FISH tekniği ile analiz edilmiştir. Florokrom bantları ve rDNA işaretleri *C. arabica* türünün açıkça allopoliploid olduğunu ve 18S rDNA bölgelerinin satelit taşıyan kromozomlar ile sıkı bağlantılı olduğunu göstermiştir. Yine 5S ve 18S rDNA sinyalleri, çalışılan örneklerin poliploidi ve coğrafik dağılımları arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. Ribozomal DNA lokus sayısının poliploidizasyon süreci boyunca arttığı, poliploidi seviyesinin ise kuraklığa bağlı olarak arttığı vurgulanmıştır (Hamon ve ark. 2009).

*Oryza sativa* (çeltik) bitkisine aktarılan tek kopya transgenin lokasyonunu belirlemek için çeltik metafaz kromozomlarına pratik, rutin ve etkili bir FISH prosedürü uygulanmıştır. Hazırlanan kök meristem hücreleri metafaz kromozom preparatlarına, dioksigenin bağlanmış tekli ve çoklu T-DNA prob olarak hibridize edilmiştir. Hibridize olan prob dizilerine kromomisin 3 bağlı fare IgG antikorları bağlandıktan sonra oluşan FISH desenleri floresan mikroskopu ile belirlenmiştir. FISH tekniği T-DNA'nın kromozomlar üzerindeki bölgelerini ve sayısını belirlemede etkili bir şekilde kullanılmıştır (Kharb ve ark. 2001). Benzer şekilde T-DNA problemleri kullanılarak, çeltik bitkisinde 3 farklı transgen bölgesi başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Sonuçlara dayanarak transgenlerin homolog lokuslara yerleştikleri ve generasyonlar boyunca yerlerinin sabit olduğu belirtilmiştir (Park ve ark. 2010).

Kore’de toplanan yabancı *Lilium* türleri FISH tekniği kullanılarak, örneklerin sahip olduğu rRNA bölgelerinin fiziki lokasyonları haritalanmış, GISH metodu ile de türler arası (İnterspecific) genom ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır. FISH sonuçları, farklı türlerin farklı kromozomlarında 4 ila 8 arası 45S rDNA bölgesi olduğunu göstermiştir. Buna rağmen 5S rDNA bölgesi sadece 3. kromozomun uzun kolunda, nadiren birkaç türde aynı kromozom kolu üzerinde bitişik iki bölgede rastlanmıştır. Sadece 3 türde 5S ve 45S rDNA sekansları bitişik pozisyonda gözlemlenmiştir. Genomik DNA’nın prob olarak kullanıldığı GISH analizi sonucunda ise diploid ve triploid *Lilium lancifolium* genomları arasında hibridizasyon ilişkisi belirlenmiştir. Bu bilgi triploid genomların diploid kökeninin *L. lancifolium* olduğunu ve *Lilium maximowiczii* olmadığını göstermiştir (Sultana ve ark 1010).

*Brachiaria* bir buğdaygil cinsi olup tropik ve subtropik bölgelere yayılmış yaklaşık 100 tür içermektedir. 6 *Brachiara* aksasyonu poliploidi özellikleri açısından, 5S ve 25S rDNA lokus özelliklerine göre FISH tekniği kullanılarak karşılaştırılmıştır. Çalışılan türlerde 25S rDNA lokus sayısının poliploidi ile ilgili olduğu, 5S rDNA lokus sayısının ise olmadığı belirtilmiştir. rDNA lokusuna sahip kromozomların morfolojik olarak hem tür içi hem de türler arasında farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. *B. brizantha*’nın rDNA taşıyan kromozomlarının farklılıklar göstermesi, allopoliploidi olayına bağlanmıştır. *B. brizantha* asporik olup döllenme gerçekleşmeden sadece dişi çiçek ile çoğalabilmektedir. Bu sebeple görülen kromozomal farklılıkların (düzenlemelerin) diğer türler ile melezlenmesinden kaynaklanabileceği fikri öne sürülmüştür (Akiyama ve ark. 2010).

*Brachypodium*, buğday ve çeltik genomları arası genetik ilişki, sentromere özgü çeşitli proplar kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmada, buğday sentromerik EST tekrarları, çeltik sentromerik tekrarları, kütüphane kaynaklı ve daha önce lokasyonu bilinen belirteçler BAC klonu olarak kullanılmışlardır. Ayrıca buğday 45S rDNA tekrarları da prob olarak kullanılmıştır. Tümleşik sekans dizileri ve BAC klonları kullanılarak *B. distachyon*’a ait temel 5 kromozomun yaklaşık sentromer pozisyonları ile kromozomlara ait aktif ve inaktif sentromerler bulunmaya çalışılmıştır. Çalışma sonucunda *Brachypodium* ile çeltik ve buğday sentromerik bölgeleri arasında belirli bir homoloji bulunmuştur. Kullanılan 6 çeltik sentromeri ile 5 buğday sentromeri *Brachypodium distachyon* sentromerlerine bağlanmamıştır. Çalışılan üç tür içinde ortak geçmişe sahip sentromer bölgelerinin aktif genlerinin 40 milyon yıllık bir evrimsel paylaşım sürecine dikkat çektiği aktarılmıştır. *Brachypodium* aktif olmayan 3. kromozom sentromeri ile çeltik 8. ve buğday 7. kromozom



sentromerleri benzer gen dizilimlerine sahip bulunmuştur. BAC-FISH sonuçlarına dayanılarak, aktif sentromerlerin zamanla retrotransposon yapılarını kayıp ettikleri için inaktif hale geldikleri ve kendilerine özgü satelit tekrarlar taşıdıkları sonucuna varılmıştır (Qi ve ark. 2010).

*Chenopodium* cinsine dâhil 34 türün genomu 5S ve 35S rDNA sekanlarının prob olarak kullanıldığı FISH metodu ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre cins içerisinde rDNA bölgelerinin temelde kromozom sonlarında (terminal/telomerik) konumlu oldukları sadece birkaç türde 5S rDNA lokasyonları ara durumlu (interstitial) bulunmuştur. rDNA lokasyon sayısı bakımından incelenen örneklerde bir polimorfizm olduğu belirlenmiştir. Poliploid aksesyonlarda rDNA lokasyon sayısı diploidlere oranla daha fazla bulunmuştur. Tetrapoliploid ve hekzapoliploidlerde 35S rDNA lokasyon sayısı 1 veya 2 olarak kayıt edilmiştir. Yine tetrapoliploidlerde 5S rDNA lokasyon sayısı 2, 4, 6, hekzapoliploidlerde ise 6 veya 8 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanılarak, bazı poliploid türlerin evrimsel süreç içerisinde rDNA bölgelerinde bir azalma eğilimi gösterdikleri sonucuna varılmıştır (Kolano ve ark. 2012).

*Cenchrus ciliaris* (Syn: Pennicetum ciliare) önemli bir mera bitkisi olup özellikle kurak koşullara dayanıklıdır. Temel kromozom sayısı  $n=x=9$  olup, Tunus popülasyonları 3 poliploidi düzeyi (4x, 5x, 6x) göstermektedir. Çift renkli (double) FISH kullanılarak 5S ve 18S-5.8S-26S rDNA (rRNA) bölgelerinin 3 poliploidi genomu üzerindeki lokasyon ve sayıları karşılaştırılmıştır. Her iki proba ait sinyaller bu 3 poliploidi seviyesi için intraspesifik özellikler göstermişlerdir. Yine farklı poliploidi düzeyine sahip formlarda her iki prob için farklı (tetrapoliploidlerde 2 lokus, pentapoliploidlerde 5 ve hekzapoliploidlerde 6 ) sinyal sayıları gözlenmiştir. Her 3 sitotip için 5S rDNA bölgeleri kromozomların subsentromerik bölgelerinde, 18S rDNA bölgeleri ise kromozomların kısa kollarında telomerik bölgelerde gözlemlenmiştir. Bu bulgular *Cenchrus ciliaris*'in poliploidizasyon gelişiminde rDNA lokus sayılarının, poliploidi seviyesine bağlı olarak arttığını göstermektedir (Kharrat-Souissi ve ark. 2012).

İtalyan çimi (*Lolium multiflorum* Lam.) genotiplerine ait rDNA bölgelerinin, kromozomlar üzerindeki sayıları, dağılımları ve transkripsiyon aktiviteleri çalışılmıştır. Çekirdekçik oluşumundan sorumlu bölgeler (nucleolar organizer regions/NOR) gümüş nitrat boyama (Ag-NOR) ve 5S ve 45S rDNA dizilerinin prob olarak kullanıldığı FISH, yöntemleriyle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 5S rDNA bölgeleri hayli korunmuş

iken 45S rDNA bölgelerinin çeşitlilik gösterdiği dahası aynı kromozomun farklı yerlerinde lokalize oldukları görülmüştür. Genomlardan birinin beklenenden daha fazla sayıda 45S rDNA bölgelerine sahip olduğu görülmüştür. Metafaz hücrelerinin yaklaşık %95'inde 45S rDNA bölgeleri kırılmış en az bir kromozom belirlenmiştir. Bu sonuca dayanılarak 45S rDNA yapılarının, *Lolium multiflorum* genomu için kırılğan dizilere sahip oldukları ve genomda kromozom fragmentleri oluşturdukları söylenmiştir. Bu durumun diğer bazı faktörlerle beraber kromozomların yeniden düzenlenmesine sebep olacağı ve genom organizasyonunu değiştireceği vurgulanmıştır. Aynı zamanda 45S rDNA bölgelerinin tamamının transkripsiyon düzeyinde aktif olmadıkları belirtilmiştir (Bustamante ve ark. 2014).

*Phleum echinatum* Host. ( $2n = 2x = 10$ ) tek yıllık, Akdeniz iklim özelliklerine adapte bir buğdaygil bitkisi olarak tanımlanmıştır. *Phleum* cinsine ait diğer üyelerden kromozom sayısı, asimetrik karyotip özelliği ve yüksek genom hacmi ile ayrılmaktadır. Bu türe ait kromozomlar klasik aseto-orsein boyama ve FISH tekniği ile çalışılmıştır. Sekonder yapı bölgesi ile satelit bölgesinin aynı olduğu, 3. kromozomun aynı bölgesinde FISH sayesinde büyük 35S rDNA bölgesi belirlenmiştir. Küçük 35S rDNA bölgesi ise 5. kromozom üzerinde 5S rDNA bölgesine yakın bulunmuştur. Bütün kromozomların uçlarında, 3. kromozomun sekonder bölgesinde (satelit bölgesinde) ve 1. ile 2. kromozomun sentromerik alanında telomerik tekrarlar belirlenmiştir. Genom içi telomerik dizi çeşitliliğinin muhtemelen kromozomal düzenlemeler sonucu gerçekleştiği ve *Phleum echinatum* için karakteristik olduğu vurgulanmıştır. Kırılmalar sonucu oluşan bu fragmentler kromozomal çeşitliliğe sebep olmaktadır. 3. kromozomda belirlenen ve NOR bölgesinde bulunan ara telomerik tekrarların çok farklı ve büyük oldukları not edilmiştir. Bu lokasyonda çift renkli FISH sinyallerine dayanılarak belirlenen telomerik tekrarların ve 35S rDNA tekrarların varlığı kromozom kırılması için kanıt olarak nitelendirilmiştir (Grabowska-Joachimciak ve ark. 2015).

*Carica papaya* L. (Papaya) çok evcikli (erkek bitki, dişi bitki ve erselik bitki) bir bitkidir. Cinsiyet ancak çiçeklenmeden sonra ve çiçekler elle yoklanarak belirlenebilmektedir. Bu durumun tarımsal açıdan iş gücü, zaman kaybı olduğu ve ekonomik olmadığı bildirilmiştir. Çalışmada FISH tekniği kullanılarak iki Brezilya menşeli papaya çeşidine ait dişi ve hermafrodit (erselik=çift cinsiyetli) cinsiyetli bitkilerin çiçek olgunluğa ulaşmadan önce belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha önce moleküler yöntemler ile belirlenen 7 dizili bir markır FISH için prob olarak geliştirilmiştir. Seçilen markır polimorfik özellikler göstermektedir. Her iki çeşide ait yaprak örneklerine ait çekirdeklere uygulanan FISH tekniği,

erselik bitkileri önceden belirleme imkânı sağlarken, dişi bitkileri belirlemek için yeterli yoğunlukta sinyal vermemiştir. Bu çalışmanın geliştirilerek ilerde cinsiyet belirlemek için otomasyon sistemleri ile entegre edilmesi gerekliliği vurgulanmıştır (Abreu ve ark. 2015).

Try-FISH metodu kullanılarak soğan genomunda 5. kromozom üzerinde, tarımsal açıdan çok önemli olan gen veya gen bölgelerine ait genetik ve fiziksel haritalar oluşturacak in situ proplar geliştirilmeye çalışılmıştır. Amaç daha önce 5. kromozom ile ilgili moleküler markır ve klonları kullanarak, eksprese olan genom bölgelerinden daha spesifik ve zamanla tüm genomla ilgili ekzon ve intron bölgelerini belirleyen proplar geliştirmektir. Bu şekilde genetik ve kromozomal haritalar birlikte kullanılarak 5. kromozom üzerindeki rekombinasyon bölgeleri belirlenmeye çalışılmıştır (Romanov ve ark. 2015).

Yine soğan bitkisinde Try-FISH kullanılarak mitotik metafaz, pakiten ve süper uzatılmış pakiten kromozomları üzerinde genetik erkek kısırlığı belirleyen lokusun fiziki yeri moleküler proplar ile belirlenmiştir. 846–2251 bp uzunluğundaki DNA parçaları ve 666 bp uzunluğundaki cDNA klonu prob olarak kullanılmıştır. Kullanılan proplar 2. kromozomun sentromer bölgesine yakın bölgede sinyal vermişlerdir. Bu bölge düşük rekombinasyona uğrayan ve kullanılan propların sıkı bağlandığı bir bölge olarak tespit edilmiştir. Markıra dayalı seleksiyon için kullanışlı bulunan proplar, erkek kısırlık lokusunu haritalamak için yetersiz bulunmuştur (Khrustaleva ve ark. 2016).

*Pennisetum squamulatum* ve *Pennisetum ciliare* aspori apomitik çoğalma gösteren 2 buğdaygıl türüdür. Bu türlerde apomiksi kontrol eden genomik bölgenin oldukça korunmuş olduğu belirtilmiştir. FISH tekniği kullanılarak hangi kromozomların bu bölgeleri taşıdıkları fiziki olarak belirlenmiştir. Bilgisayar ortamında bazı transkriptlerin oluşturduğu harita ve FISH ile lokasyonları belirlenen bazı transkriptlere ait veriler birlikte kullanılmış, *P. squamulatum* türüne ait apospori-spesifik gen bölgesi taşıyan kromozom ile Cin darı (*Setaria italica*) ve Sorgum'a ait 2. kromozomun üzerinde aynı doğrultuda fakat farklı bölgede olduğu belirlenmiştir. *P. squamulatum*'a ait apospori gen bölgesini belirlemek için kullanılan markırlar, gama ışınları uygulanan polenlerden elde edilen bitkiler ve çaprazları, apospori gen bölgesinde meydana gelen yapısal değişiklikleri belirlemek için kullanılmıştır (Sapkota ve ark. 2016).

Sürekli tekrar eden DNA dizileri (satelit tekrarlar), büyük DNA parçaları olup, sıklıkla sentromerik ve telomerik heterokromatik bölgelerde lokalize yapılar olarak tanımlanmışlardır.

Son zamanlarda bu yapılarla ilgili elde edilen bilgiler, bazı satelit tekrarlarından ekspres edilen transkriptlerin biyolojik fonksiyonlarda önemli roller üstlendiklerini göstermektedir. RNA-FISH kullanılarak, mısır bitkisinde iyi tanımlanmış 4 farklı satelit bölgeye ait transkriptler belirlenmeye çalışılmıştır. Hedef bölge olarak birer knob, telomerik, subtelomerik ve sentromerik tekrar bölgelerine ait transkriptler kullanılmıştır. RNA-FISH ile 4 bölgeden üçüne ait transkriptler interfaz çekirdeğinde sinyal vermişlerdir. Bu durum sinyal veren 3 satelit bölgenin gen ürünlerinin kromatin yapıda aktif olduklarını göstermektedir. Knob ve telomerik tekrarlara ait transkriptler ilgili DNA lokusları ile ilişkilendirilerek haritalanmıştır. Buna rağmen sentromerik tekrarlara ait transkriptler yüksek oranda nükleolusta (çekirdekçikte) belirlenmiştir. Yani RNA-FISH kullanılarak satelit tekrarlarından ifade edilen ürünlerin ifade seviyeleri ve çekirdekdeki konumları belirlenip haritalanabilir (Koo ve ark. 2016).

*Bacillus subtilis* ve suşları bitki büyümesini teşvik edici özellikte bakteriler olup, birçok bitkiye inoküle (aşılama) edilerek kullanılmaktadır. Bu bakterilerin sağlıklı çoğalması bitki gelişimi için önemlidir. *Bacillus subtilis*'e ait 16S rRNA bölgesine özgü prob geliştirilerek, *Bacillus subtilis* ile yakın akrabası olan *Bacillus amyloliquefaciens* türlerinin FISH tekniği ile ayırt edilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen probun *Bacillus subtilis* ve bazı suşları için ayırt edici olduğu fakat diğer *Bacillus* türleri için ayırt edici olmadığı görülmüştür (Posada ve ark. 2016).

*Aegilops*, *Brachypodium*, *Festuca*, *Hordeum*, *Lolium*, *Secale* ve *Triticum* cinslerine ait türler, GISH metodu kullanılarak kromozomal seviyede, genomlar arası anahtar işaretleri belirlemek sureti ile filogenetik olarak karşılaştırılmıştır. Bir bütün olarak kromozomlar veya kromozom parçaları, genomlar arası bağlantılar kuracak sinyaller vermiştir. Tritikale (AABBRR) genomu prob olarak kullanıldığında, çavdar (RR) kromozomlarının sekonder bölgelerinde sinyal görülmemesi, araştırmacılar tarafından beklenmeyen bir durum olarak görülmüştür. Aynı zamanda prob bağlanmayan kromozom bölgeleri türler için ayırt edici olarak kullanılmıştır. Yukarıdaki cinslere ait çalışılan türlerin hepsi 35S rDNA kodlama yapan sekans dizileri bakımından korunmuş gen bölgeleri göstermiştir. Filogenetik olarak uzak olduğu söylenen türler genomik DNA sekansları bakımından büyük benzerlikler göstermiştir (Majka ve ark. 2016).

*Hordeum vulgare* (arpa) tohumlarına mutasyona sebep olan Maleic hidrazide kimyasalı uygulandıktan sonra, mikronükleusla etkileşimli aktif 35S rDNA bölgeleri ve

mikronükleus sayı değişimleri, iki farklı sitolojik teknikle karşılaştırılmıştır. 25S rDNA probunun kullanıldığı FISH ile toplam 35S rDNA bölgeleri ve gümüş nitrat boyama yöntemi ile de aktif 35S rDNA bölgeleri belirlenmiştir. Maleic hidrazide mutajeni mikronükleus yapının çekirdek ile etkileşimine engel olmaktadır. Klastojenik olan kimyasal, kromozom kırılmalarına ve aynı zamanda iğ ipliği deformasyonuna sebep olmaktadır. Kimyasal uygulandıktan sonra arpa bitkisinin hücre bölünmesi evresinde çekirdekçik yapılar kayıp olmaktadır. Çekirdekçik oluşumu, Maleic hidrazide veya başka steres (ağır metal, sıcaklık değişimleri) faktörlerinden çabuk etkilenmektedir. AgNOR ve FISH sonuçları normal hücrelerde tespit edilen sayıdan daha fazla 35S rDNA sinyali vermiştir. Bu da Maleic hidrazide'in mikronükleus yapılarının interfaz evresinde nükleusa bağlanmalarını engellediğini bunun sonucunda normal hücrelerde görülen aktif mikronükleus sayısından daha fazla mikronükleus oluştuğunu göstermektedir (Kwasniewska ve Jaskowiak 2016).

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3. 1. Bitki Materyali

Çalışmada, IPK (Gaterslaben, Almanya), IBER (Aberystwyth, İngiltere), Western Regional Plant Introduction Station (Pulmann, Washington, ABD) gibi araştırma enstitülerinin gen (tohum) bankalarından temin edilmiş olan *Dactylis* taksonlarından 2 yıl boyunca sitolojik incelemeler için uygun kalite ve miktarda kök ucu elde edilebilen 9 diploid ve 31 tetrapoliploid aksesyon kullanıldı. Diploid ve tetrapoliploid taksonların aksesyon numaraları, adları ve orijinleri sırasıyla Çizelge 3. 1 ve Çizelge 3. 2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3. 1.** Diploid *Dactylis* taksonlarının aksesyon adları, numaraları ve orijinleri

Örnek No	Aksesyon No	Aksesyon Adı	Orjin
1	ABY-Bc 6106-1975U	<i>Dactylis g. L. subsp. mairei</i>	-
2	ABY-Bc 5194-1980U	<i>Dactylis g. L. subsp. himalayensis</i> Domin	
3	ABY-Bc 6977-1979U	<i>Dactylis g. L. forma galicia</i>	-
4	ABY-Bc 4454-1982U	<i>Dactylis g. L. subsp. santai</i> Stebbins & Zohary	-
5	ABY-Bc 5562-1973U	<i>Dactylis g. L. subsp. lusitanica</i> Stebbins & Zohary	-
6	PI 237603	<i>Dactylis g. subsp. lusitanica</i>	Portekiz
7	PI 283242	<i>Dactylis g. subsp. lobata</i>	Almanya
8	GRA 712\81	<i>Dactylis g. subsp.</i>	-
9	87	<i>Dactylis g. subsp.</i>	-

Çalışmada incelenen diploid *Dactylis* aksesyonlarından 2 tanesi taksonomik olarak tanımlanmamış (gen bankasından alındığı gibi), 2 tanesi *Dactylis glomerata* L. subsp. *lusitanica* taksonuna ait olup, subsp. *mairei*, forma *galicia*, subsp. *himalayensis*, subsp. *santai* ve subsp. *lobata* taksonları sadece birer adet aksesyon ile temsil edilmektedir.

**Çizelge 3. 2.** Tetrapoliploid *Dactylis* taksonlarının aksesyon adları, numaraları ve orijinleri

Örnek No	Aksesyon No	Aksesyon Adı	Orjin
1	ABY-Bc 6223-1971U	<i>Dactylis g. L. subsp. aschersoniana</i> (Graebner)	-
2	22	- (Triploid)	-
3	65	- (Triploid)	
4	ABY-Bc7213 0000U	<i>Dactylis marina</i> Borrill	-
5	PI 477989	<i>Dactylis marina</i>	Fransa
6	PI 346970	<i>Dactylis marina</i>	Portekiz
7	PI 346969	<i>Dactylis marina</i>	Portekiz
8	PI 346968	<i>Dactylis marina</i>	Portekiz
9	PI 237604	<i>Dactylis marna</i>	Portekiz
10	PI 346967	<i>Dactylis marina</i>	Portekiz
11	PI 577066	<i>Dactylis marina</i>	Portekiz
12	PI 577065	<i>Dactylis marina</i>	Portekiz
13	ABY-Bc5645- 2004U	<i>Dactylis g. L. subsp. hispanica</i> (Roth) Nyman	
14	PI 306730	<i>Dactylis g. subsp. hispanica</i>	Yunanistan
15	PI 265568	<i>Dactylis g. subsp. hispanica</i>	İspanya
16	PI 265567	<i>Dactylis g. subsp. hispanica</i>	Fransa
17	PI 283243	<i>Dactylis g. subsp. woronowii</i>	Rusya
18	GR 1241\94	<i>Dactylis woronowii</i>	-
19	PI 237606	<i>Dactylis g. subsp. santai</i>	Fas
20	PI 237605	<i>Dactylis g. subsp. santai</i>	Cezayir
21	ABY-Bc 7279-0000U	<i>Dactylis g. L. subsp. lobata</i> (Drejer) H. Lindb	
22	PI 316209	<i>Dactylis g. subsp. lobata</i>	Bulgaristan
23	PI 372621	<i>Dactylis g. subsp. lobata</i>	Almanya
24	PI 237607	<i>Dactylis g. subsp. smithii</i>	İspanya
25	GR 8202\80	<i>Dactylis g. subsp. smithii</i>	-
26	GR 1238\83	<i>Dactylis smithii</i>	-
27	GR 7297\02	<i>Dactylis smithii</i>	-
28	4G10001921	<i>Dactylis glomerata</i> L. CZE	-
29	GR 669\96	<i>Dactylis glomerata</i>	-
30	GRA 833\83	<i>Dactylis</i> subsp.	-
31	139	<i>Dactylis</i> subsp.	-

Tetrapoliploid *Dactylis* taksonları, 4 adet taksonomik olarak tanımlanmamış (gen bankalarından alındığı gibi, 2'si triploid ve 2'si tetrapoliploid) olmak üzere, 9 adet *D. marina*, 4 adet *D. g. subsp. hispanica*, 4 adet *D. g. subsp. smithii*, 2 adet *D. glomerata*, 2 adet *D. g. subsp. woronowii*, 3 adet *D. g. subsp. lobata*, 2 adet *D. g. subsp. santai* ve 1 adet *D. g. L. subsp. aschersoniana* (Graebner) aksesyonlarından oluşmaktadır.

### **3. 2. Floresan *In Situ* Hibridizasyon**

#### **3. 2. 1. Kullanılan bitki materyalleri, sarf malzemeleri, laboratuvar alet ve donanımları**

**Bitki materyalleri:** Yüksek miktarda bölünen hücreye sahip kök ucu dokuları

#### **Sarf malzemeleri:**

Asetik asit

Glasiyal asetik asit

Buffer EB (Tris-HCl)

Selülaz enzimi

Selülaz Onozuka R-10 enzim

Sitrat buffer

DAPI boya

Dekstran sülfat

Digoxigenin-11-dUTP

Saf etanol: -20 °C'de buzdolabında tutulmalı, kullanılacağı zaman çıkartılmalıdır

Saf etanol ve %70'lik etanol

Metanol veya etanol-asetik asit tespit çözeltisi

Etanol serileri (%70, 90, 100)

FITC-conjugated anti-digoxigenin

Fluorescence-free immersion oil

Formaldehit

Formamide



İzole edilmiş, çoğaltılmış veya saflaştırılmış DNA kalıpları

Metanol

Monobed mixed resin “Amberlite” IRN-150L

Nick translation kit

RNA polimeraz

dNTPs

DNA izole kiti

Yağsız süt tozu

Fosfat bufer saline (PBS)

Pektinaz

RNase A, DNase free

Saline sodium citrate (SSC buffer)

Salmon sperm blocking DNA

Sodyum asetat (NaOAc);

Sodyum dodecyl (lauryl) sülfat

Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP

Tween 20

Vectashield mounting medium

Sıvı nitrojen

Filtre kağıdı

### **Laboratuvar alet ve ekipmanları:**

Makas, jilet, iğne, forsep, cam beher, ölçü kapları, yıkama kapları, buzdolabı, derin dondurucu (-86 °C), Epifloresan mikroskop, CCD dijital kamera sistemi, çeşitli filitreler, resim analiz ve işleme sistemleri (Corel Picture Publisher, Adobe Photoshop, Wasabi vb.), *in situ* thermal cycler, Faz kontrast mikroskopu, Stereo mikroskop, Mikrosantrüfuj, su banyosu, vorteks, manyetik karıştırıcı.

### 3. 2. 2. Çözeltilerin hazırlanışı

**Buffer EB (elüsyon buffer, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5):** Hazır alınabileceği gibi, tris bazı ve HCl asit ile hazırlanabilir. Örneğin 100 ml 1M çözelti için; 12,114 g Tris bazı, 80 ml ddH<sub>2</sub>O'de çözdürülür, üzerine 3-4 ml % 37'lik HCl eklenerek pH 8,5'e ayarlanır. Asit reaksiyonu sonrası kabın sıcaklığının düşmesi beklenmelidir. Son çözelti hacmi ddH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu stok çözelti 1:100 oranında seyreltilerek 10 mM Tris bufer elde edilmiş olur. Her defasında hassas bir pH metre ile pH=8,5 olacak şekilde kontrol edilmelidir. Çözelti hazırlandıktan sonra otoklavda sterilize edilmeli, oda sıcaklığında muhafaza edilmeli ve kontamine olması engellenmelidir.

**Sitrat buffer:** Saf su ile 0.1 M sitrik asit monohidrit ve trisodyum sitrat dihidrat stok solüsyonları hazırlanır. İki solüsyon sırası ile 4:6 oranında karıştırılır ve pH 4.8 olacak şekilde ayarlanır. Kullanılacağı zaman stok solüsyon 1:10 oranında saf su ile seyreltildikten sonra kullanılır. Her iki çözelti de buzdolabında saklanmalıdır.

**Enzim solusyonu:** Pektinaz %20 (v/v), selülaz %1 (w/v) ve %1 (w/v) selülaz Onozuka R-10 oranlarındaki enzimler 10 mM sitrat buffer ile karıştırılır. Çözelti +4 C° de magnetik karıştırıcıda çözdürülür. Enzim karışımı küçük tüplere 1'er ml paylaşılır ve kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanır.

**Sodyum asetat (3M):** 40.8 g sodyum asetat (NaOAc.3H<sub>2</sub>O) 80 ml steril saf suda çözdürülür. Glasial asetik asit ile pH 5.2'ye ayarlanır ve steril saf su ile 100 ml tamamlanır. Filtreden geçirildikten sonra buzdolabı veya oda sıcaklığında saklanabilir.

**DAPI (100 µg/ml):** 1 mg DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boyası 10 ml steril distile suda çözdürülür. Bu stok çözelti 1 ml plastik tüplere paylaşılır ve kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanır. Boyama solüsyonu kullanılacağı zaman, 2.5 µl DAPI solüsyonu 97.5 µl Vectashield adlı solüsyon ile karıştırılmalıdır. Boya buzdolabında saklanmalı ve kontamine olması engellenmelidir.

**Dekstran sülfat (50% w/v):** 5 g dekstran sülfat 10 ml steril saf suda 65 °C'de çözdürüldükten sonra 0.22 µm filtreden geçirilir ve daha sonra -20 °C'de saklanır. Solüsyon oldukça viskoz yapıda olduğu için filtreden geçmesi zordur. Bunun için 65 °C'de hızlı bir şekilde ısıtıldıktan sonra geniş uçlu bir pipet yardımı ile sıvı filtreye aktarılmalıdır.

**FITC (Anti-Digoxigenin antibody):** Bu küçük molekül floresan özelliğe sahip olup, dioksijenin ile kovalent bağ oluşturan bir antikordur. Kolay bozulma özelliğine sahip bu kimyasal, liyofilize haldeyken 1 ml steril saf su içerisinde tamamen çözündürülür. Bu çözelti 30 µl parçalar halinde 0.5 ml mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılır ve kullanılmaya kadar -20 °C sıcaklıkta koruma altına alınır. Kullanılacağı zaman, bu molekülü bloke edecek yağsız süt tozu (1:10 veya 1:15 seyreltik) kullanılır.

**Yağsız süt tozu:** Süt tozundan 5 g alınır 80 ml steril saf su ve 20 ml 20xSSC (salin sodyum sitrat) içerisinde çözündürülür. Karıştırıldıktan sonra, 2 ml plastik tüplere (ependorf) paylaştırılır ve -20 °C'de saklanır.

**Formaldehit (%1.1 fosfat bufer (PBS) içerisinde; asit yok):** 174 ml steril distile su, 20 ml 10xPBS ve 6 ml asit içermeyen %37'lik formaldehit karıştırılarak hazırlanır. Bu çözelti stabil olmadığından, kullanılacağı zaman taze hazırlanmalıdır. Formaldehit tahriş edici ve toksik özelliklere sahiptir. Çözelti çeker ocakta hazırlanmalıdır.

**Formamide:** 200 ml %100 formamid ile 10 gr resin karıştırılır. 1-2 saat iyice karıştırıldıktan sonra filtre edilir ve -20 °C'de saklanır. Bu kimyasal tahriş edici ve teratojen etkiye sahip olduğundan dikkatli çalışılmalıdır.

**Fosfat buffer solüsyonu (PBS, 0.1 M sodium phosphate, pH= 7.0, 1.4 M NaCl):** 8.10 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 36.82 g NaCl, 450 ml distile suda çözündürülerek birinci solüsyon hazırlanır. 1.56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 8.18 g NaCl, 100 ml distile suda çözündürülerek ikinci solüsyon hazırlanır. pH 7.0 olacak şekilde birinci solüsyon üzerine ikinci solüsyon, toplam hacim 500 ml olacak şekilde karıştırılır. Daha sonra otoklavda sterilize edilerek oda sıcaklığında muhafaza edilir.

**RNAaz A (100 µg/ml, w/v):** 10 mg RNAaz A, 1 ml 10 mM Tris-HCl + 15 mM NaCl içerisinde çözündürülür. 15 dk kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakılır. 2 ml miksantrifüj tüplerine 20 µl olacak şekilde paylaştırılır ve -20 °C'de depolanır. Kullanılacağı zaman 1980 µl 2xSSC buffer eklenir (1:99 seyreltme yapılmış olunur).

**Saline sodyum sitrat (20xSSC buffer) :** 175.3 g NaCl ve 88.3 g trisodyum sitrat dihidrat, 800 ml distile suda çözündürülür. pH 7.0 olacak şekilde 6M HCl eklenir. Distile su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra sterilize edilir ve oda sıcaklığında saklanır. Kullanılacağı zaman gerektiği kadar seyreltilir.

**Sodyum dodesil sülfat (SDS; Sodium dodecyl (lauryl) sulphate, 10% w/v) :** 10 g SDS 100 ml steril distile suda çözülür, filtreden geçirilir ve oda sıcaklığında saklanır.

**Tween 20:** 2 ml Tween 20, 798 ml steril distile suda çözdürülür ve 200 ml 20xSSC eklenir ve oda sıcaklığında bekletilir.

### **3. 2. 3. Bitkilerden kök ucu dokularının elde edilmesi ve ilk işlem**

Kök uçları, petri kaplarında çimlendirilen tohumlardan ve saksılarda yetiştirilen ergin bitkilerden elde edilmiştir. Çimlendirme işlemi için, örneklere ait tohumlar, 9 cm çapında petri kapları içerisine yerleştirilmiş çift katlı çimlendirme kâğıtları arasına 5-6 adet olacak şekilde serpiştirilmiştir. Çimlenmenin başlaması için, kâğıtlar uygun miktarda distile su ile ıslatılmıştır. Kâğıtlar kullanılmadan önce, sterilizasyon amaçlı, kaptan fungusiti ile muamele edilmiştir. Petri kapları 24 saat laboratuvarında oda sıcaklığında muhafaza edildikten sonra, 24 saat soğuk (4 °C) bir ortamda bırakılmıştır. Soğuk ortamdaki çıkartılan petri kapları çimlenene kadar (3-4 gün) karanlık ve 18 °C’de muhafaza edilmiştir. Bu aşamada petri kapları her gün kontrol edilmiş ve 1-1.5 cm uzunluğa erişmiş olan kök uçları keskin bir jilet ile kesilerek ya da pens ile kopartılarak hasat edilmiştir.

Ergin bitkilerden kök hasatı için; 4-5 adet tohum, çimlendirme viyollerine ekilmiştir. Viyollerden elde edilen genç fidelerin her biri 2:1:1 oranında bahçe toprağı, torf ve perlit karışımı içeren küçük saksılara ayrı ayrı transfer edilmiştir. Transfer işleminden 4-5 hafta sonra başlamak üzere iki yıl süre ile yılın uygun zamanlarında (bahar ve sonbahar) belirli aralıklarla bitkiler saksılardan çıkartılarak kök ucu hasatları yapılmıştır. Ergin bitkilerden kök ucu hasadı sabah erken saatlerde (8.30-10.30) yapılmıştır. İlk kök ucu hasadından sonra, bitkiler daha büyük saksılara şaşırtılmıştır. Bazen saksı içerisindeki toprağın değiştirilmesi yoluna gidilmiştir. Bitkiler, kış aylarında, bölümümüze ait kontrolsüz şartlara sahip plastik sera içerisinde, yılın geri kalan zamanlarında ise seranın dışarısına çıkartılmak suretiyle yetiştirilmiştir.

İlk işlem için, hasat edilen (rengi canlı, genç, hasar görmemiş) kök uçları hemen buz dolu polisistren (köpük) kaplar içerisinde yerleştirilmiş olan ve içerisinde soğuk su ya da kolşisin (colchicin) bulunan küçük cam şişelere (6 ml) aktarılmıştır. Çeşitli sürelerde (6, 12, 24 saat) ve +4 °C’de bu solüsyonlarda bekletilen kök uçları daha sonra fiksatif solüsyonuna aktarılmıştır. Burada +4 °C’de 24 saat soğuk su uygulaması ilk işlem için daha uygun

bulunmuştur. İlk işlem yapılmasının amacı mitoz bölünmeyi durdurmaktır. Bu şekilde mitoz metefaz kromozomları bir düzlemde yakalanmış olur.

### **3. 2. 4. Tespit (Fiksasyon)**

İlk işlemden sonra küçük cam şişelerin içerisinde bulunan su veya kolşisin uzaklaştırılarak yerine yeni hazırlanmış olan farmer çözeltisi (3 kısım %99'luk etil alkol + 1 kısım glacial asetik asit) doldurulmuştur. Fiksasyon işleminden emin olmak için kısa bir süre sonra fiksatif tekrar değiştirilmiştir. Tespit (fikse) edilmiş olan kök uçları 24 saat oda şartlarında bekletildikten sonra kullanılacakları zamana kadar +4 °C veya -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3. 2. 5. Ezme Preparatların hazırlanması**

Preparat yapımında kullanılacak olan kök uçları, Farmer solusyonundan çıkartıldıktan sonra, 5'er dakika süre ile 3 defa, içerisinde 10 ml 0.01 M sitrat bufer bulunan cam (saat) kaplarda yıkanmıştır. Üçüncü yıkama işleminden sonra, kök uçları üzerindeki fazla sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldıktan sonra içerisinde 1 ml enzim solusyonu (20% (v/v) pectinase, 1% (w/v) cellulase (Calbiochem) ve 1% (w/v) cellulase Onozuka R-10) bulunan cam kap içerisine aktarılmış ve 30-90 dakika süre ile 37 °C'de inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesini durdurmak için, örneklerin bulunduğu cam kap (saat camı) buz dolu kap üzerine konmuş, köklere zarar vermeden enzim pipetlenerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Akabinde köklerin üzerine sitrat buffer eklenerek 15 dk bekletilmiştir. Kök uçlarındaki meristem bölgeleri kök uçlarının geri kalan kısımlarından uzaklaştırılmıştır. Daha sonra meristem bölgesi içerisinde %45'lik asetik asit bulunan bir başka cam kaba aktarılmış ve stereo mikroskop yardımı ile meristem bölgesindeki epidermis dokusu ve kaliptra adı verilen sert tabaka iki adet böcek iğnesi kullanarak uzaklaştırılmıştır. Kalan epidermis dokusu (beyaz ve opak) bir pastör pipet ile dikkatli bir şekilde alınarak lam üzerine transfer edilmiş ve üzerine bir damla (5-6 µl) %45'lik asetik asit ilave edilerek klasik ezme yöntemiyle preparat hazırlanmıştır. Kullanılan lam ve lameller etanol ya da asit içerisinde bekletilerek temizlenmiş olmalıdır. Temizlenmemiş lam ve lamellerin kullanılması durumunda lam üzerindeki hücreler kısmen veya tamamen kaybolabilir ya da zayıf bir hibridizasyon elde edilmesine sebep olabilir. Preparatlar faz kontrast mikroskop ile hızlı bir şekilde kontrol edildikten sonra, çok sayıda morfolojisi düzgün ve iyi dağılmış mitoz kromozomlu hücreye sahip olanlar FISH deneylerinde kullanmak amacıyla buzdolabında (-86 °C) saklanmaya alınmıştır. Yaklaşık 2-3 saat sonra preparatlar buzdolabından çıkartılmış ve donmuş preparatın çözünmesine müsaade etmeden

hızlıca fakat dikkatli bir şekilde lamel bir jilet yardımıyla lam üzerinden uzaklaştırılmıştır. Sonra pastör pipeti yardımı ile -20 °C'de soğutulmuş etanol-asetik asit fiksatif ile lam yıkanmıştır. Dikkatli ve kısa dokunuşlar ile lam kenarından, kağıt havlu yardımı ile fiksatif emdirilmiş, arkasından hızlıca slayt saf etanolde 15-30 dk bekletilmiştir. Daha sonra preparatlar dik olarak bir gün süreyle oda şartlarında kurumaya bırakılmıştır. Bu şekilde kurutulmuş olan preparatlar FISH için hazırdır. Hemen kullanılmayacak preparatlar kapalı slayt kutularında oda sıcaklığında birkaç gün, +4 °C birkaç hafta veya -20 °C'de daha uzun süre saklanabilir. Faz-kontrast mikroskopu ile (X20, X40) taranan preparatlardan, FISH analizi için uygun olanlar (kromozomları sayılabilen ve tek tabaka halinde yayılmış) saklanmalıdır.

### **3. 2. 6. Preparatların FISH için hazırlanması**

FISH prosedürüne başlamadan önce, lameli uzaklaştırılmış ve kurutulmuş preparatlar faz kontrast mikroskopu ile tekrar incelenir ve hücrelerin hala lam üzerinde bulunduğundan emin olunmalıdır.

Aşağıdaki solüsyonlar hazırlandıktan sonra, örnekler RNAaz ve yıkama işlemlerine tabi tutulmuş, arkasından hibridizasyon ve denatürasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

50 ml %1 Formaldehit, 50 ml 1xPBS, 50 ml %70 etanol, 50 ml %90 etanol, 50 ml %100 etanol, 300 ml 2xSSC, 50 ml 0.01 M HCL, 1 ml denatürasyon solüsyonu, 1 ml RNAaz enzimi

#### **3. 2. 6. 1. RNAaz muamelesi**

Daha önce hazırlanan stok çözelti, her slayt üzerine 250 µl/slide olacak şekilde uygulanmıştır. RNAaz ilavesinden sonra slaytın üzerine 24x24 mm plastik lamel (otaklavlanabilir plastik poşet) yerleştirilmiş ve 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edilmiştir.

#### **3. 2. 6. 2. 2X SSC yıkaması**

Bir saatlik RNAaz uygulamasından sonra slaytlar inkübatörden çıkarılmış, plastik lameller forsepe ile kaldırıldıktan sonra, 3 defa 5'er dakika 2xSSC bulunan kap içerisinde oda sıcaklığında bekletilmek suretiyle yıkanmıştır.

### **3. 2. 6. 3. PBS yıkaması**

Slaytlar taze hazırlanmış %1 Formaldehit solüsyonunda 10 dakika kadar bekletilmiştir. Arkasından slaytlar 1xPBS solüsyonu bulunan kaba transfer edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika kadar bekletilmiştir.

### **3. 2. 6. 4. 2 X SSC Yıkaması**

PBS muamelesinden sonra slaytlar oda sıcaklığında tekrar 3 defa 5'er dakika 2xSSC solusyonu ile yıkanmıştır.

### **3. 2. 6. 5. Slaytların kurutulması**

Slaytlar oda sıcaklığında 3'er dakika önce %70 daha sonra %90 ve %100 etanol serileri içerisinde bekletilerek dehidre edilmiştir. Etanol muamelesinden sonra slaytlar oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat kadar kurutulmaya bırakılmıştır.

### **3. 2. 7. Probların etiketlenmesi**

Bu çalışmada 2 adet ribozomal DNA probu kullanılmıştır. Bunlardan 5S rDNA probu buğday ribozomal DNA yapısından elde edilmiş pTa794 kolonu olup, PCR ile çoğaltılmış ve dioksigenin-11-dUTP floresan bazı ile işaretlenmiştir (Hasterok ve ark. 2004).

Nik translasyon metoduyla çoğaltılmış 25S rDNA probu, *Aradopsis thaliana* bitkisine ait 25S rDNA kodlama bölgesinin bir alt ünitesi olup, 2.3 kb büyüklüğünde *ClaI* sekanslarından oluşmaktadır. Bu prob tetrametil rodamin-5-dUTP floresan bazı ile işaretlenmiştir. Bu probun sinyal verdiği kromozomal bölgeler, 18S, 5.8S ve 25S rDNA alt ünitelerini içeren 45S rDNA lokuslarını göstermektedir (Jenkins ve Hasterok 2007).

#### **3. 2. 7. 1. PCR metodu ile 5S rDNA probun etiketlenmesi**

Bu metod, dairesel veya düz çift veya tek iplikli, 0.2 kb (kısa PCR ürünleri) ile 1-2 kb (plasmid klonları) arasında büyüklüğe sahip kalıp DNA'ların etiketlenmesinde kullanılmaktadır. Metot kolay ve güvenilir olup, etiketleme sürecinde yeterli DNA çoğalmasına imkân vermektedir. 10–50 ng/50 µl gibi küçük DNA miktarları bu işlem için yeterlidir. PCR (5S rDNA /pTa794) etiketlemesi için buz üzerine yerleştirilen 0.2 ml PCR tüpleri için aşağıdaki karışım hazırlanmıştır (Çizelge 3. 3).

**Çizelge 3. 3.** 5S rDNA probun etiketlenmesi için gerekli karışım maddeleri ve miktarları

Karışım	Hacim (ul)
Steril distile su (SDW)	24.5
10x reaksiyon buffer (taq DNA polimeraz için)	5.00
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3.00
dATP (2.5mM)	2.00
dCTP (2.5mM)	2.00
dGTP (2.5mM)	2.00
dTTP (2.5mM)	3.25
Kalıp DNA (10 ng/ul i SDW veya EB/TE buffer içinde)	2.00
M13 universal sequencing primer 'forward' (5pmol/ml)	2.00
M13 universal sequencing primer 'reverse' (5pmol/ml)	2.00
Digoxigenin-11-dUTP (1 mM) veya tetramethyl-rhodamine – 5-dUTP (1 mM)	1.75
Taq DNA polimeraz (5U/ul)	0.50
Toplam hacim	50.00

Hazırlanmış olan karışım (labeling mix) PCR cihazı 94 °C 1 dk + [94 °C 40 saniye + 55 °C 40 saniye + 72 °C 1 dk] x 35 + 72 °C 5 dk + 4 °C ∞ olacak şekilde programlanarak inkübe edilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım tüpü buz üzerine alınmış ve akabinde etiketlenmiş prob DNA, etanol çöktürme ile saflaştırılmış ve yoğunlaştırılmıştır (aşağıda açıklanmıştır). Bu yöntemle hazırlanan 50 µl karışım 10 slayt için yeterli olmuştur.

### 3. 2. 7. 2. Nick translasyonu ile 45S rDNA probun etiketlenmesi

Nick translasyon metodu, 1 kb (plazmid ürünleri, bazı PCR ürünleri) ile 20-30 kb (tipik fragmanite edilmiş nükleer DNA) arasında veya 100 kb (BAC klonları) boyuta sahip olan dairesel veya düz çift iplikli kalıp DNA'ların etiketlenmesinde kullanılmaktadır. Bu metot kolay ve güvenilir olmakla beraber etiketleme sırasında DNA kopya sayısı artırılmadığından, kullanılacak DNA miktarının yüksek olması gerekmektedir (yaklaşık 0.5-2.0 µg/20 µl). Nick translasyonu ile prob 45S rDNA'in etiketlenmesi için, buz üzerine bırakılan 0.2 ml PCR tüpleri içerisine aşağıdaki prob karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3. 4).



**Çizelge 3. 4.** 45 S rDNA probun etiketlenmesi için gerekli karışım maddeleri ve miktarları

Karışım	Hacim (µl)
dATP (0.4 mM; labeling kit tube 2)	2.50
dCTP (0.4 mM; labeling kit tube 3)	2.50
dGTP (0.4 mM; labeling kit tube 4)	2.50
dTTP (0.4 mM; labeling kit tube 5)	1.67
10x reaction buffer (labeling kit tube 6)	2.00
Kalıp DNA (0.5-2.0 µg +SDW veya EB/TE buffer)	Max. 6.00
Digoxigenin -11-dUTP (1 mM) veya tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (1 mM).	0.83
Enzyme karışımı (labeling kit tube 7)	2.00
Gerektiği durumda SDW ilave ederek solusyonun miktarı 20 µl ye tamamlanır	20.00

Hazırlanan karışım pipet ile yavaşça karıştırıldıktan sonra 15 °C’de 60 dakika PCR cihazında inkübe edilmiştir. Bu işlem için PCR cihazının önceden 15 °C’ye kadar ısıtılması gerekmektedir. Prob karışımı 65 °C’de 10 dk bekletildikten sonra reaksiyon durdurulmuş, karışım içeren tüpler hemen buz üzerine alınmıştır. Eğer kullanılan floresan boyalar nükleotitlere direk bağlanan tipte iseler tüm işlemler esnasında, boyaların ışıktan korunması gerekmektedir. Daha sonra aşağıda açıklandığı şekilde karışım etanol çöktürme ile saflaştırılmış ve yoğunlaştırılmıştır.

### 3. 2. 7. 3. Probların ethanol ile saflaştırılması ve yoğunlaştırılması

Bu işlemde amaç, prob DNA’nın etiketlenmesi sırasında ortamda serbest olarak bulunan bağlanmamış nükleotidleri uzaklaştırmak ve probların yoğunluklarını arttırmaktır. Bunun için etiketlenmiş DNA’nın bulunduğu tüp içerisindeki karışıma, karışım hacminin 1/10’u kadar 3M NaOAc (sodyum asetat) ve 2.5 katı kadar önceden soğutulmuş (-20 °C) olan %100 ethanol ilave edilmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra en az 60 dakika -80 °C’de inkübe edilmiştir. Arkasından karışım 4 °C ve 14 000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edilmiştir. Tüp içerisindeki sıvı alkol alevinde ucu inceltilmiş pastör pipeti ile uzaklaştırılmıştır. Akabinde tüpün dip kısmında bulunan pellet soğutulmuş, 50-100 µl %70’lik ethanol ile yıkanmıştır. Daha sonra yine 4 °C ve 14000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilmiş ve tüp içerisindeki sıvı Pastör pipeti ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 2 defa daha tekrarlanmıştır. Yıkama işleminden sonra tüpün dibine çöktürülmüş olan pellet 37 °C’de 15 dakika

kurutulmuştur. Kurutma süresi fazla uzun tutulmamalıdır yoksa pelet çok fazla kurur ve tekrar çözünmesi zorlaşır. Kurutma işleminde sonra tüp içerisine 10 µl steril distile su veya daha uzun süreli saklama için 1 x EB (elüsyon buffer) buffer ilave edilerek pelet -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3. 2. 8. Denatürasyon ve Hibridizasyon

#### 3. 2. 8. 1. Hibridizasyon solusyonunun hazırlanması

Çizelge 3.5'de yer alan solusyonlar yine aynı çizelgede belirtilen miktarlarda karıştırılarak hazırlanmıştır. Karışım buz üzerinde, 1.5 ml mikrosantrüfuj tüplerine aktarılmış, alt üst edilerek yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra karışım, 0.5 µl mikrosantrüfuj tüplerine pay edilmiştir. Solusyonlar ışıktan korunmalıdır.

**Çizelge 3. 5.** Hibridizasyon karışımının hazırlanmasında kullanılan karışım ve miktarları

Karışım	Miktar/slayt (ul)	Son konsatrasyon
100% deionized formamide	20	%50
50% (w/v) dextran sulfate	8	%10
20 x SSC	4	X2
10% SDS	2	%0.5
Sonicated Salmon Sperm DNA	1	25-100X probe
Probe 1- 25 S rDNA (Tetrametil rodamin bağlı)	X1	75-200ng/slayt
Probe 2 -5 S rDNA (Dioksigenin bağlı)	X2	75-200ng/slayt
SDW (steril distile su)	Y	-
Toplam	40	-

Not: X ve Y için uygun değerler hesaplanır ve toplam hacim 40 ml'ye tamamlanır

Hibridizasyon solusyonu heat blok ile 85 °C'de 10 dakika inkübe edilmiş ve buz üzerinde ışıktan korunarak beklemeye alınmıştır (ön denaturasyon). Daha sonra hibridizasyon solusyonu (35 ul/slide) slayt üzerine uygulanarak üzeri plastik lamel (24 mm × 24 mm ) ile kapatılmıştır. Slaytlar nemlendirme sağlayan *in situ* termal cyclere (nem makinası) yerleştirilmiş ve 70 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Böylece substrat (hedef) DNA ve prob DNA

denatüre edilmiştir. Slaytlar bir kaç parça ıslak havlu kâğıdı ile nemlendirilmiş kapaklı bir kutuya yerleştirilmiş ve hibridizasyon için 37 °C’de 20-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda prob ve substrat DNA’ları hibridize olmuştur. Denatürasyon koşulları deneysel olarak belirlenmiştir. Bunun için daha önce kromozom materyaline uygulanan enzim süresi önemlidir. Düşük sıcaklık uygulaması yeterli denatürasyonu sağlamayabilir. Bu durumda hibridizasyon sırasında prob ve substrat DNA’sının hibridizasyonu olumsuz olarak etkilenecektir (hibridizasyon gerçekleşmeyebilir ya da kısmen gerçekleşebilir). Yüksek sıcaklık ise kromozom bütünlüğünü bozabilir.

### **3. 2. 8. 2. Hibridizasyon sonrası yıkama**

Hibridizasyon sonrası yıkamaların amacı, hibridizasyon işlemi sonunda yeterli homolojinin olmadığı bölgelerde yeterince güçlü bir şekilde bağlanmamış ya da hibridize olmamış prob DNA'nın sökülerek uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Bu aşama başarılı şekilde gerçekleştirildiğinde, spesifik sekans belirleme oranının %82 veya üzeri olduğu belirtilmiştir (Hasterok 2015). İnkübasyondan sonra slaytlar aşağıdaki sırayla yıkanmıştır.

42 °C’de 2xSSC bufer solusyonu ile plastik lamellerin kaldırılması sağlanmıştır.

42 °C’de iki defa 5’er dakika %15’lik formamide içeren 0.1xSSC solüsyonu ile

3 defa 42 °C’de 2xSSC solusyonu ile 3’er dakika

3 defa oda sıcaklığında, tekrar 2xSSC solusyonu ile 3’er dakika

Tüm yıkamalar esnasında slaytlar ışıktan korunmalıdır. Her tekrarda yeni solüsyon kullanılmalıdır.

### **3. 2. 8. 3. Probların immünolojik işaretlenmesi**

Slaytlar oda sıcaklığında 5 dakika, Tween + 4xSSC solusyonu ile yıkanmış ve üzerlerindeki fazla prob DNA’lar uzaklaştırılmıştır. Her bir slayt üzerine 500 µl DNA bloke edici solüsyon (BSA) uygulandıktan sonra plastik lamel ile üzeri kapatılmış ve oda sıcaklığında (karanlıkta) 30 dakika inkübe edilmiştir. BSA antikorun daha spesifik olarak bağlanmasını sağlamaktadır. Slaytlar üzerindeki plastik lameler pens ile alındıktan sonra fazla sıvı uzaklaştırılmış ve her bir slayt üzerine 100 µl FITC (anti dioksijenin bağlı) uygulanmıştır. Slaytlar üzerine plastik lamel yerleştirmek sureti ile rutubetli ortamda 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Antikor uygulamasından sonra slaytlar 37 °C'de 3 defa 10'ar dakika Tween + 4xSSC solusyonu ile yıkanmıştır.

### **3. 2. 9. Karşı boyama (Kontrast) ve koruma**

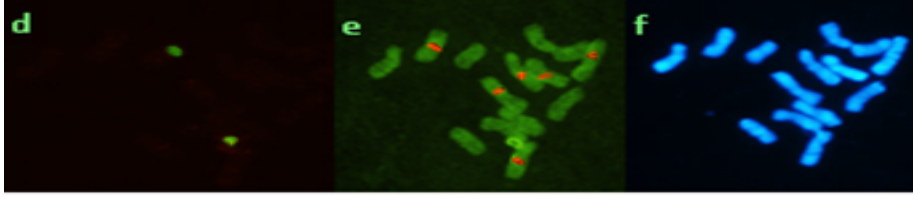
İnkübasyondan sonra, slaytlar %70, 90 ve 100 ethanol serileri ile 1 er dakika yıkanmış ve oda sıcaklığında 15-20 dk kurumaya bırakılmıştır. Her bir slayta 10 µl Vectashield-DAPI (Vectashield-DAPI mounting-staining medium) solüsyonu uygulanmış ve üzeri 24 x 24 mm cam lamel ile kapatılmıştır. Masa üzerinde iki filtre kâğıdı arasında lamel üzerine dikkatli bir şekilde hafif bir basınç uygulayarak, Vectashield-DAPI solüsyonunun, lamelin altına iyice yayılması ve fazla solüsyonun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Slaytlar mikroskop ile incelenmeden önce en az 2-3 saat kadar karanlıkta ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir. DAPI genel bir DNA boyası olup, kromozomların UV ışık altında görünmesine imkân sağlamaktadır. Vectashield ise floresan özellikteki boyaları floresan ışığa bozulmasından korumakta ve kararlılıklarını sağlamaktadır.

### **3. 2. 10. Fotoğrafların çekimi ve analizi**

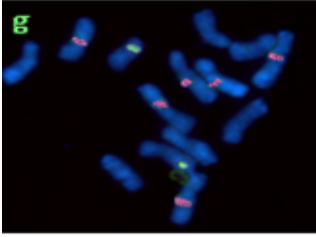
FISH prosedürünün tamamlanmasından sonra; her aksesyona ait kromozomların iyi dağıldığı, kromozom morfolojisinin düzgün olduğu ve FISH bantlarının açık bir şekilde gözlenebildiği hücrelerin fotoğrafları Olympus BX51 marka epi-floresan mikroskopa bağlı spot CCD dijital kamera ile çekilmiştir. Başarılı bir FISH çalışmasından sonra, yukarıda belirtilen özelliklere sahip fotoğraflar farklı filtreler aracılığı ile siyah beyaz çekilmiş (Şekil 4. 1), renklendirilmiş (Şekil 4. 2) ve üst üste getirilerek (Şekil 4. 3) FISH sinyallerinin renkli görüldüğü tek fotoğraflar elde edilmiştir. Bunun için Epi-floresan mikroskopta sırası ile tetrametil rodamin (TRITC) ve Floresan İzotiyosiyanat (FITC) filtreleri kullanılarak sırasıyla kırmızı ve yeşil mikroskop kanalları ile resimler çekilmiş, son olarak DAPI filitresi ile kontrast oluşturacak mavi resim çekilmiştir. Siyah beyaz çekilmiş bu resimler Wasabi programı ile renklendirilmiştir. Daha sonra Picture Publisher programı kullanılarak 3 resim üst üste getirilerek tek resim elde edilmiştir. Üzerinde kolay çalışılabilmesi için, bu resimler TIF (Tagged Image File) veya BMP (Bitmap) formatlarında kayıt edilmelidir.



**Şekil 3. 1.** Yeşil (a), Kırmızı (b) ve mavi (c) filtre kanalları ile çekilmiş siyah beyaz *Dactylis* mitoz kromozomları



**Şekil 3. 2.** Yeşil (d), Kırmızı (e) ve mavi (f) filtre ile siyah beyaz olarak çekilmiş resimlerin Wasabi programı kullanarak renklendirilmesinden sonraki görünüşleri



**Şekil 3. 3.** Wasabi programı ile renklendirilmiş resimlerin, Picture Publisher programı ile üst üste getirilerek tek resim elde edilmesi (Diploid *Dactylis* mitoz kromozomları üzerinde görülen yeşil sinyaller 5S rDNA genlerinin bulunduğu lokasyonları, kırmızı sinyaller ise 25S rDNA lokasyonlarını göstermektedir (g))

Bu aşamadan sonra her aksesyona ait en iyi fotoğraflar, ZEN (blue edition, 2012 sürümü) programı kullanılarak, aksesyonlara ait kromozomlar, boylarına ve FISH desenlerine göre teşhis edilmiş ve homologları ile eşleştirilmiştir. Eşleşme sonrası, desenlerin büyüklük, sayı ve yerlerini belirleyen haploit idiogramlar, Corel Draw Cs6 programı ile çizilmiştir.

Kromozom üzerindeki yeşil (Y) sinyaller 5S rDNA genlerinin bulunduğu lokasyonları, kırmızı sinyaller (K) ise 25S rDNA genlerinin bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Burada sinyal lokasyonları, sentromerik (S: sentromer ve çevresi), telomerik (T: telomer ve çevresi) ve interkalar (İK: telomer ve sentromer arası) şeklinde belirlenmiş, sinyal büyüklükleri (yoğunlukları) ise 1'den 5'ya kadar sayısal değerler verilerek küçük, orta ve

büyük şekilde belirlenmiştir. Bazı aksesyonlarda aynı kromozom üzerinde her iki rDNA sinyali yakın lokasyonlarda gözlemlenmiştir. Bu gösterim (5S+25S) veya (K+Y) şeklinde simgeleştirilmiştir. Kolaylık olması açısından yukarıdaki harflendirmeler kullanılarak, aksesyonların karyotip formülleri oluşturulmuştur. Örneğin PI 265568 numaralı *hispanica* aksesyonunun sinyal dağılımı, 12 sentromerik (10 kırmızı ve 2 yeşil), 2 interkalar kırmızı ve 6 telomerik ( 2 kırmızı ve 4 yeşil) şeklinde olup, aynı zamanda 2 yeşil sinyal aynı kromozom gurubu üzerinde sentromerik alanda 2 kırmızı sinyal ile komşudur. Bu sinyal dağılımı,  $12S(10K,2Y) + 2İK(K) + 6T(2K,4Y)$  şeklinde formüle edilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Yürütülen bu çalışmada hasad edilen kök uçları başlangıçta soğuk su ve kolşisin ile muamele (pretreatment) edilmiştir. Soğuk su ile muamele edilen örneklerde kolşisin ile muamele edilenlere göre mitotik indeksin daha yüksek olduğunun gözlenmesi üzerine kolşisin uygulamasından vazgeçilmiş ve tüm örnekler soğuk su ile muamele edilmiştir.

Bazı aksesyonlarda elde edilen kök uçlarının yeterince bölünen hücreye sahip olmaması nedeniyle yapılan preparatlarda kromozom morfolojisi düzgün ve dağılımı iyi olan hücre elde etme konusunda sorunlar yaşanmış ve analizler takson için elde edilen en iyi hücreler üzerinde yapılmıştır. Bu nedenle analiz edilen hücrelerde kromozomların yeterince kısalmamış, iyi dağılmamış olmaları ve sitoplazmik kirlilik gibi nedenler lokusların tam lokasyonlarını belirlemeyi zorlaştırmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan FISH protokolü ile 5S ve 25S rDNA problemleri *Dactylis* mitotik kromozomları üzerine başarılı bir şekilde hibridize olmuş ve genellikle kolayca gözlenebilecek büyüklük ve yoğunlukta sinyaller elde edilmiştir. Ancak elde edilen resimler üst üste getirilip birleştirildikten sonra hücrelerin büyük çoğunluğunda mitotik kromozomlar üzerinde sentromer bölgesinin net bir şekilde belirgin olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle yapılan karyotip analizlerinde kromozomları teşhis edip homologları ile eşleştirmede sentromer lokasyonunu (kromozomların kollarını ayırt etmek) kullanmak mümkün olmamış ve sadece kromozom boyu, sinyal sayısı ve yoğunlukları kullanılmıştır. İdiogramlarda sentromer lokasyonları gösterilmemiş olup, kromozomlar uzunluklarına göre (büyükten küçüğe doğru) sıralanarak numaralandırılmış ve FISH sinyalleri, kromozomların orta noktaları dikkate alınarak, hepsi kromozomların üst kısımlarında gösterilmiştir.

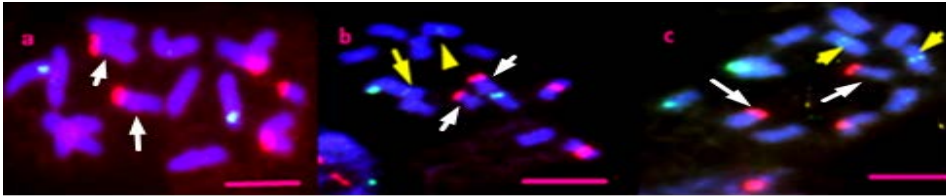
Sinyal sayısı, büyüklük ve görece lokasyonları, diploid ve tetraploid *Dactylis* aksesyonları için, örnek resim ve haploit idiogramlar kullanılarak aşağıda ayrı başlıklar altında detaylıca gösterilmiştir.

## 4. 1. Diploid Taksonlara ait Bulgular

### 4. 1. 1. *Dactylis glomerata* L. subsp. *santai* (ABY-Bc 4454-1982U)

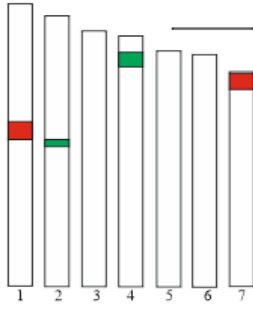
ABY-Bc 4454-1982U numaralı *Dactylis glomerata* L. subsp. *santai* (2n=14) aksesyonu ortalama 3.79 pg/2C çekirdek DNA içeriği ile bu çalışmada kullanılan *Dactylis* aksesyonları arasında en küçük genomlular arasında yer almaktadır (Büyükbaşar 2010).

FISH analizi sonrası aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 1 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 2'de gösterilmiştir. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 8 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 4'ü 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 4'ü 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 25S rDNA genleri taksonun en uzun kromozomunun (1 nolu) sentromer bölgesi ve en kısa kromozomun (7 nolu) telomer bölgelerinde yer almaktadır. Sentromerik kırmızı sinyal kromozomun ortasına yakın olduğu için konumu bu şekilde kabul edilmiştir. Şekiller incelendiğinde taksonun mitotik kromozomları üzerindeki 25S rDNA (kırmızı) sinyallerinin 5S rDNA (yeşil) sinyallerine göre daha büyük ve güçlü oldukları görülmektedir. Her iki kromozom çifti üzerindeki 25S rDNA sinyalleri kolayca görülebilecek kadar büyük ve güçlü olmakla birlikte 1 nolu kromozom üzerindeki sentromerik sinyalin 7 nolu kromozom üzerindeki telomerik sinyalden biraz daha büyük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte 4 nolu kromozom üzerindeki telomerik 5S rDNA sinyali kolayca görülebilecek kadar büyük ve güçlü iken 2 nolu kromozom üzerindeki sentromerik 5S rDNA sinyali oldukça küçük ve zayıf görülmektedir.



Şekil 4. 1. Floresan in situ hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 4454-1982U nolu diploid *D. glomerata* L. subsp. *santai* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı oklar (b, c) çok küçük sentromerik yeşil sinyal çiftlerini taşıyan kromozomları göstermektedir. Beyaz oklar (a, b, c) telomer konumlu kırmızı sinyal taşıyan kromozom çiftlerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10 µm'dir).





**Şekil 4. 2.** ABY-Bc 4454-1982U nolu diploid *D. glomerata* L. subsp. *santai* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

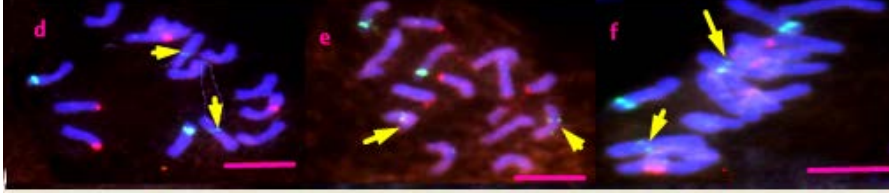
Wetschnig (1991) klasik (asetokarmin) yöntem ile taksonun karyotip analizini yapmıştır. Yapılmış olan bu çalışmada taksonun 5 çift metasentrik, 2 çift submetasentrik kromozoma sahip olduğu ve en büyük metasentrik kromozomun büyük bir satellite sahip olduğu bildirilmiştir. Wetschnig (1991) tarafından belirlenmiş olan satellitli kromozomun, çalışmamızda sentromere yakın (proximal) bir bölgede 25S rDNA lokusunu taşıdığını belirlediğimiz 1 nolu kromozom ile aynı kromozom olma durumu yüksektir. Wetschnig (1991)'in çalışmasında telomerik satelitten bahs edilmemiştir. Ancak çalışmamızda 7 nolu telomerik kırmızı sinyalin satelit üzerinde bulunma olasılığı yüksektir. Bu şekilde inaktif satelit varlıkları FISH ile belirlenebilmektedir.

#### **4. 1. 2. *Dactylis glomerata* L. forma *galicia* (ABY-Bc 6977-1979U)**

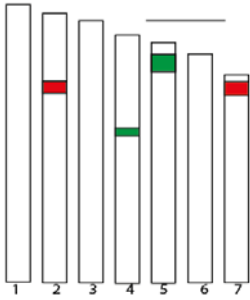
ABY-Bc 6977-1979U aksesyon numaralı diploid *Dactylis glomerata* L. forma *galicia* (2n=14) aksesyonu ortalama 4.27 pg/2C çekirdek DNA içeriği ile bu çalışmada kullanılan *Dactylis* aksesyonları arasında orta düzeyde genom büyüklüğüne sahip bir aksesyondur (Büyükbaşar 2010).

Floresan *in situ* hibridizasyon sonrası taksonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 3 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 4'te sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere taksonun 8 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 4'ü 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 4'ü 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 25S rDNA genleri taksonun en uzun 2. kromozomunun (2 nolu) sentromer bölgesinde (distal) ve en kısa kromozomunun (7 nolu) telomer bölgesinde bulunmaktadır. 5S rDNA genleri ise taksonun 4 (sentromerik bölge/prosimal) ve 5 (telomer bölge) nolu kromozomları üzerinde yer almaktadır. Şekiller incelendiğinde 4 nolu kromozom üzerindeki

sentromerik 5S lokusuna ait sinyal hariç diğer rDNA sinyallerinin büyüklüğünün bir birine yakın olduğu görülmektedir. Dört nolu kromozom üzerindeki sentromerik 5S sinyali ise diğerlerine göre daha küçük olmakla birlikte görülebilecek yoğunluktadır.



**Şekil 4. 3.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 6977-1979U nolu diploid *D. glomerata* L. forma *galicia* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı oklar küçük sentromerik yeşil sinyalleri taşıyan kromozom çiftlerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu$ m'dir).



**Şekil 4. 4.** ABY-Bc 6977-1979U nolu diploid *D. glomerata* L. forma *galicia* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1  $\mu$ m'dir).

Büyükbaşar (2010) klasik (asetokarmin) yöntem ile taksonun karyotip analizini yapmıştır. Yapılmış olan bu çalışmada taksonun kromozomlarının diğer diploid *Dactylis* taksonlarından farklı olarak genelde submetasentriğe benzediklerini ve büyük kromozomlardan bir çiftinin satellit taşıdığını gözlemlemiştir. Satellit kromozomun bu çalışmadaki sentromerik bölgeye yakın bir bölgede 25S rDNA sinyali taşıyan 2 nolu kromozom olması ihtimali yüksektir.

*Dactylis glomerata* L. subsp. *santai* (ABY-Bc 4454-1982U) ve *Dactylis glomerata* L. forma *galicia* (ABY-Bc 6977-1979U) taksonları rDNA lokus sayısı ve dağılım desenleri bakımından bir birine çok benzemektedir. Lokusların farklı kromozomlar üzerinde

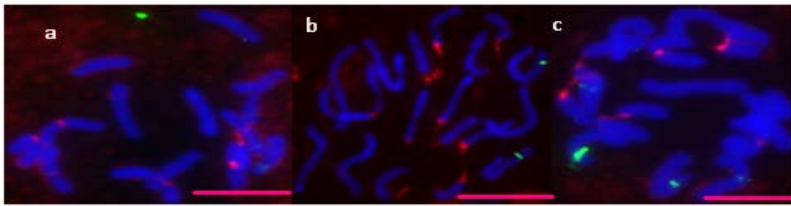
görünmesi; kromozomların preparat yapma esnasında farklı miktarda basınca maruz kalmaları, dolayısıyla kontraksiyonlarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Bu durum, aynı zamanda sinyallerin lokasyonları arasında görece farklılıklar oluşmasına da sebep olabilir. Bununla birlikte, bu kısmi farklılıklar taksonlar arasında ki gerçek genetik farklılıkları da yansıtıyor olabilir.

#### 4. 1. 3. *Dactylis glomerata* subsp. *himalayensis* (ABY-Bc 5194-1980U)

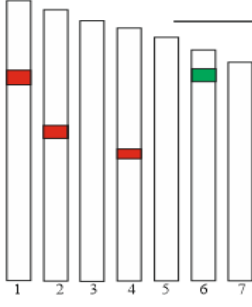
ABY-Bc 5194-1980U aksesyon numaralı *D. glomerata* L. subsp. *himalayensis* ( $2n=14$ ) taksonu ortalama 4.41 pg/2C çekirdek DNA içeriği ile çalışmada kullanılan *Dactylis* taksonları arasında ortalama büyüklükte bir genomu sahiptir (Büyükbaşar, 2010).

FISH analizi sonrası taksonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 5 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 6'da sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere taksonun kromozomları üzerinde 8 adet rDNA sinyali belirlenmiştir. Ancak analiz edilen önceki 2 taksondan farklı olarak, bu takson 6 adet 25S rDNA (kırmızı) ve 2 adet 5S rDNA (yeşil) sinyaline sahiptir.

İdiograma bakıldığında 25S rDNA lokusları taksonun nispeten uzun kromozomlarının (1, 2 ve 4 nolu) sentromer bölgelerine yakın bir konumda bulunurken, 5S rDNA lokusu ise en küçük 2. kromozomun (6 nolu) telomerik bölgesine yakın bir bölgede bulunmaktadır.



**Şekil 4. 5.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 5194-1980U nolu diploid *D. glomerata* subsp. *himalayensis* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu\text{m}$ 'dir).



Şekil 4. 6. ABY-Bc 5194-1980U nolu diploid *D. glomerata* subsp. *himalayensis* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

Wetschnig (1991), Büyükbaşar (2010), Falistocco ve Torricelli (2016) klasik (asetokarmin ve feulgen) yöntem ile taksonun karyotip analizini yapmışlardır. Yapılmış olan bu çalışmaların her üçünde de taksona ait kromozomların sentromerik konumlarının median ile submedian arasında değiştiği gözlenmiştir. Satellit kromozom sayısı bakımından ise yapılmış olan bu çalışmalar arasında farklılıklar bulunmuştur. Wetschnig (1991) taksonun satellit kromozom sayısını 3 olarak saptamış iken, Büyükbaşar (2010) taksonun satellit kromozom sayısını 2 olarak saptamıştır. Falistocco ve Torricelli (2016) ise bu takson için satellit kromozom sayısı belirtmemiştir. Taksonun satellit kromozom sayısının belirlendiği bu iki çalışma arasındaki farklılıkların, hasad edilen kök uçlarının muamele ve preparat hazırlamadaki yöntem farklılıkları ile kullanılan genotiplerin farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada sentromerik bölgelere yakın bölgelerde gözlenen 25S rDNA sinyallerini taşıyan kromozomların önceki çalışmalarda belirlenmiş satellit kromozomlar olma ihtimali yüksektir.

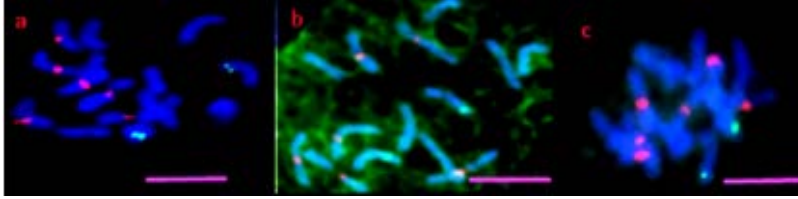
#### 4. 1. 4. *Dactylis glomerata* subsp. *lusitanica* (ABY-Bc 5562-1973U)

Bu çalışmada, farklı gen bankalarından temin edilmiş, *Dactylis glomerata* subsp. *lusitanica* taksonuna ait iki (ABY-Bc 5562-1973U, PI 237603) aksesyon bulunmaktadır.

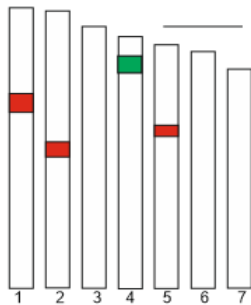
ABY-Bc 5562-1973U numaralı *D. glomerata* L. subsp. *lusitanica* ( $2n=14$ ) aksesyonu ortalama  $4.35\pm 0.11$  pg/2C çekirdek DNA içeriği ile çalışmada kullanılan *Dactylis* taksonları arasında ortalama büyüklükte bir genoma sahiptir (Büyükbaşar 2010).

FISH analizi sonrası taksonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 7 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 8'de sunulmuştur. Şekillerde görüldüğü üzere aksesyonun 8

mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. Bu sinyallerin 6 tanesi 25S (kırmızı) ve 2 tanesi 5S (yeşil) rDNA lokuslarına aittir. İdiogram üzerinde 25S rDNA lokusları 1, 2 ve 5 nolu kromozomların sentromer bölgelerine yakın bir konumda bulunurken, 5S rDNA lokusu 4. kromozomun telomer bölgesine yakın bir konumda bulunmaktadır. 25S rDNA sinyallerinin yoğunluklarının birbirine yakın oldukları gözlenmiştir.



**Şekil 4. 7.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 5562-1973U nolu diploid *D. glomerata* subsp. *lusitanica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu\text{m}$ 'dir).

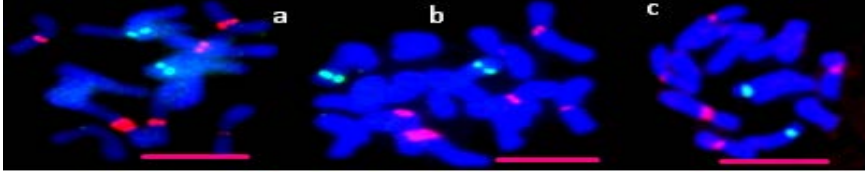


**Şekil 4. 8.** ABY-Bc 5562-1973U nolu diploid *D. glomerata* subsp. *lusitanica* aksesyonuna ait haploit idiogramının görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1  $\mu\text{m}$ 'dir).

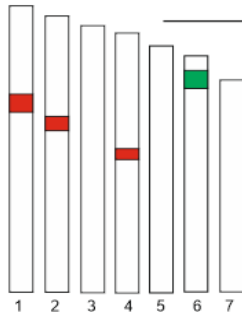
#### **4. 1. 5. *Dactylis glomerata* subsp. *lusitanica* (PI 237603)**

ABY-Bc 5562-1973U nolu *Dactylis glomerata* subsp. *lusitanica* aksesyonunda olduğu gibi PI 237603 nolu *Dactylis glomerata* subsp. *lusitanica* aksesyonunda da 8 adet FISH sinyali sayılmıştır (Şekil 4. 9 ve 4. 10). Diğer *lusitanica* aksesyonunda olduğu gibi sinyallerin 6 tanesi 25S (kırmızı) ve 2 tanesi 5S (yeşil) rDNA lokuslarına aittir. Benzer şekilde PI 237603 numaralı aksesyon 1. kromozomu üzerinde interkalar lokasyonlu ve 2. kromozomunun üzerinde sentromerik lokasyonlu (ortaya çok yakın) kırmızı sinyal taşımaktadır. 3. kırmızı

sinyal farklı olarak 4. kromozom üzerinde sentromer lokasyonlu (tam orta) görülmüştür. Yeşil sinyal 6. kromozom üzerinde, ABY-Bc 5562-1973U numaralı aksesyonunda olduğu gibi telomerik fakat daha yoğun gözükmektedir.



**Şekil 4. 9.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 237603 nolu diploid *D. glomerata* subsp. *lusitanica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu\text{m}$ 'dir).



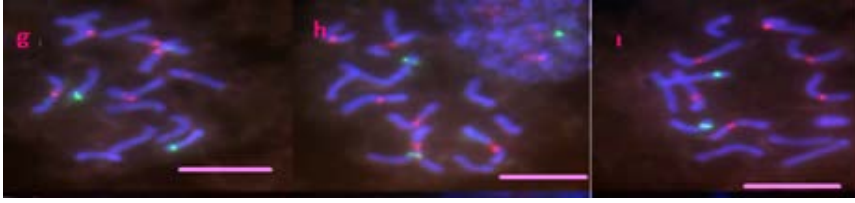
**Şekil 4. 10.** PI 237603 nolu *D. glomerata* subsp. *lusitanica* aksesyonuna ait haploit ideogramının görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1  $\mu\text{m}$ 'dir).

Yapılan FISH analizi sonucunda her iki *lusitanica* aksesyonunda gözlenen rDNA lokus sayısı ve dağılımı çok benzer bulunmuştur. Her iki aksesyonda da 25S lokuslarının sentromere yakın, 5S lokusunun ise telomere yakın bir konumda olduğu gözlenmiştir. İki aksesyonun rDNA lokasyonları ve görece yoğunlukları arasında gözlenen küçük farklılıkların ise preparat hazırlama esnasında kromozomların farklı basınç ve muamelelere maruz kalmasından ya da bu bölgeler bakımından aksesyonlar arasındaki gerçek kromozomal farklılıktan kaynaklanabilir.

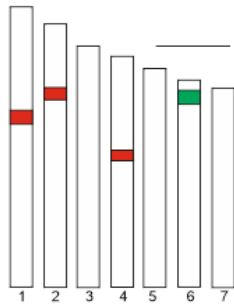
#### 4. 1. 6. *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* (PI 283242)

PI 283242 numaralı *Dactylis glomerata* L. subsp. *lobata* ( $2n=14$ ) aksasyonu ortalama 4.94 pg/2C çekirdek DNA içeriği ile çalışmada kullanılan diploid *Dactylis* aksasyonları arasında en büyük genoma sahip olanlar arasında yer almaktadır (Büyükbaşar 2010).

FISH analizi sonrası taksonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 11 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 12'de gösterilmiştir. Şekillerden de görüleceği üzere *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* kromozomları 8 adet rDNA FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 2 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Diğer taksonlarda olduğu gibi bu taksonda da 25S lokusları sentromere yakın, 5S lokusu ise telemore daha yakın bir konumda gözlenmiştir.



**Şekil 4. 11.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 283242 nolu diploid *D. glomerata* subsp. *lobata* taksonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu\text{m}$ 'dir).



**Şekil 4. 12.** PI 283242 nolu diploid *D. glomerata* subsp. *lobata* aksesonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1  $\mu\text{m}$ 'dir).

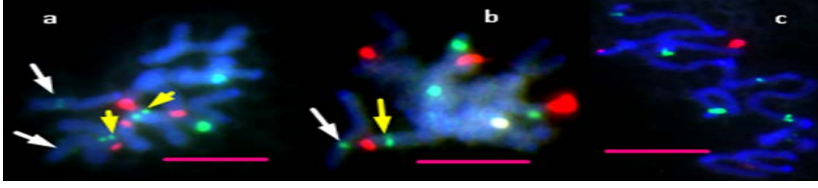
*Dactylis glomerata* L.subsp. *lobata* mitotik kromozomları üzerinde bulunan rDNA sinyallerinin sayı ve dağılışı, *Dactylis glomerata* L. subsp. *lusitanica* ve *Dactylis glomerata* L. subsp. *himaleysis* taksonları ile oldukça benzer görünmektedir. Bu bulgular *himaleysis*, *lusitanica*, ve *lobata* taksonlarının filogenetik olarak diğer taksonlara (*Dactylis glomerata* L. subsp. *santai* ve *Dactylis glomerata* L. subsp. forma *galicia*) nazaran daha yakın olduklarını, dolayısıyla genom yapılarının birbirine benzer olduklarını göstermektedir. Tabi bu durumun net bir şekilde açıklığa kavuşturulması için daha çok sayıda örnekle tekrar edilmesi gerekmektedir.

#### 4. 1. 7. *Dactylis glomerata* subsp. *mairei* (ABY-Bc 6106-1975U)

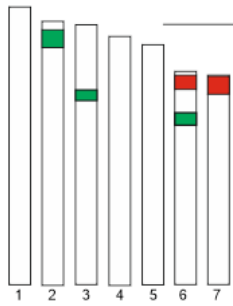
ABY-Bc 6106-1975U numaralı diploid *Dactylis glomerata* L. subsp. *mairei* (2n=14) aksasyonu ortalama 3.74 pg/2C çekirdek DNA içeriği ile çalışmada kullanılan diploid *Dactylis* aksasyonları arasında en küçük genomlular içerisinde yer almaktadır (Büyükbaşar 2010). Bununla beraber çalışılan diploidler içinde en fazla sinyal bulunduran aksesyonudur. Bu aksesyon analiz edilirken proplar ters işaretlenmiştir. 25S rDNA probu yeşil ve 5S rDNA probu ise kırmızı işaretlenmiştir. Bu şekilde propların lokasyon ve boya durumları ile olan ilişkileri karşılaştırılmaktadır.

FISH analizi sonrası taksonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 13 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 14'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 10 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6'sı 25S rDNA (yeşil) ve 4'ü 5S rDNA (kırmızı) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Bununla birlikte FISH analizinde kullanılan preparatlarda yer alan hücrelerde kromozomların morfolojisi ve dağılımı çok iyi olmadığı için lokusların kromozomlar üzerindeki lokasyonlarını net olarak gözlemek mümkün olmamıştır. Ancak çoğunun telomerik konumlu olduğu söylenebilir. Bu aksesyonun bir çift kromozomu kırmızı ve yeşil (K+Y) sinyalleri aynı kromozom kolu üzerinde birlikte taşımaktadır. Bu durum bu kromozom ile diğer bir kromozom arasında parça değişimi (translokasyon) ihtimalinin yüksek olduğunu gösteren bir işaret olarak kabul edilebilir. Bu değişim genom içinde veya başka genomlar arasında (farklı diploid) gerçekleşmiş olabilir.





**Şekil 4. 13.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 6106-1975U nolu diploid *D. glomerata* L. subsp. *mairei* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 5S ve yeşil sinyaller 25S rDNA bölgelerini göstermektedir). Sarı okların belirttiği kromozomlar her iki rDNA sinyalini (5S+25S) aynı kolda taşımaktadır. Beyaz oklar interkalar zayıf yeşil (25S rDNA) sinyalleri göstermektedir. Büyütme çizgileri 10 µm'dir).



**Şekil 4. 14.** ABY-Bc 6106-1975U nolu diploid *D. glomerata* L. subsp. *mairei* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 5S rDNA, yeşil sinyaller 25S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 6 nolu kromozom her iki (5S+25S) sinyalide taşımaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

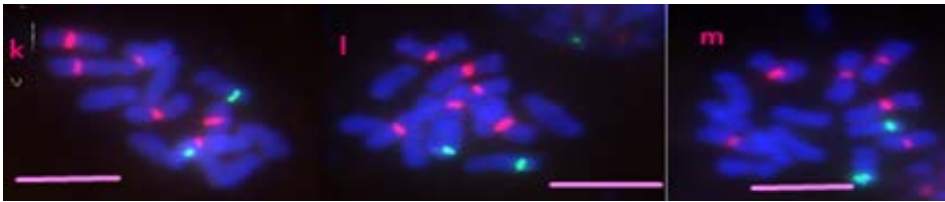
Borrill ve Lindner (1971), Amirouche ve Missot (2007) *mairei* taksonunun dar coğrafik alanlarda yayılış gösterdiğini ve endemik olduğunu belirtmişlerdir. Müntzing (1991)'in asetokarmin ile yaptığı karyotip çalışmasında da diploid *mairei* çalışılan diğer bütün diploidlerden farklı kromozomal özellikler sergilemiştir. İzoenzim analizi (Lumaret 1988), fenolik bileşik analizi (Ardouin ve ark. 1985), bu taksonun diploid *santai*, *smithii* ve *woronowii* ile akrabalığının olduğunu göstermektedir. Coğrafik çalışmalara göre de diploid *santai* ve *mairei* Akdeniz iklim gurubunda yer almaktadır (Stebbins ve Zohary 1959, Lumaret 1988). FISH analizi sonuçları da bu taksonun genetik olarak diğer diploidlerden farklılaştığını doğrular niteliktedir. Aynı zamanda FISH sonuçlarına göre diploid *santai* ve *mairei* genomlarının taşıdığı rDNA sayı, dağılım ve lokusları farklı çıkmıştır. Bu bulguya dayanarak iki takson arası bir genetik farklılaşma olup olmadığı araştırılmalıdır.

#### 4. 1. 8. İsimsiz diploid aksesyonlar

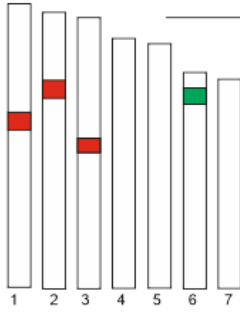
Çalışmada FISH analizi yapılan, ancak tohumların alındığı merkezlerin sistematik adlandırmasını yapmamış olduğu, GRA 712\8 (84) ve 87 nolu 2 diploid aksesyon kullanılmıştır.

GRA 712\8 (84) numaralı diploid ( $2n=14$ ) aksesyon ortalama 4.91 pg/2C çekirdek DNA içeriği ile çalışmada kullanılan diploid *Dactylis* aksesyonları arasında en büyük genoma sahip olanlardan birtanesidir (Büyükbaşar 2010).

FISH analizi sonrası aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 15 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 16'da sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 8 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 2 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 25S rDNA bölgeleri aksesyonun büyük kromozomlarının sentromere yakın bölgelerinde, 5S rDNA bölgesi ise aksesyonun en küçük ikinci kromozomunun telomere yakın bir bölgesinde bulunmaktadır. Şekiller incelendiğinde aksesyonun mitotik kromozomları üzerindeki 25S ve 5S rDNA sinyallerinin hemen hemen eşit ve kolayca görülebilecek büyüklükte oldukları dikkati çekmektedir. Bu sinyal özellikleri ile aksesyon, *lobata*, *lusitanica* ve *himaleyensis* aksesyonlarına benzer genom özellikleri göstermiştir. Diğer aksesyonlara nazaran bu aksesyonda sinyal yoğunlukları daha net ve kısmen daha yoğun gözükmektedir.

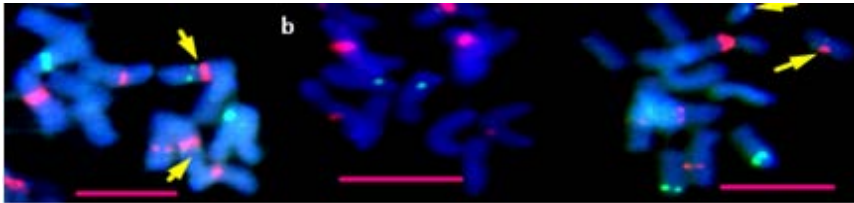


Şekil 4. 15. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GRA 712\8 nolu diploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu$ m'dir).

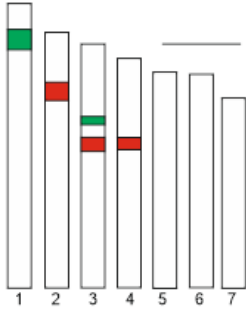


**Şekil 4. 16.** GRA 712\8 nolu diploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 10 µm'dir).

FISH analizi sonrası 87 nolu aksesyona ait mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 17 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 18'de gösterilmiştir. Şekillerden görüleceği üzere aksesyona ait 10 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Aksesyona ait bir çift kromozomu (3. kromozom), kırmızı ve yeşil sinyalleri birlikte sentromer bölgesine yakın bir bölgede taşımaktadır. Diğer yeşil sinyal ise bulunduğu kromozomun (1 nolu) telomerik bölgesinde yer almaktadır. Bu kromozom üzerindeki yeşil sinyal diğer kromozom üzerindeki yeşil sinyale göre daha büyüktür. Kırmızı sinyallerden 4'ü sentromere çok yakın (proksimal), 2 tanesi ise nispeten sentromerden daha uzakta (interkalar lokasyonlu) bulunmaktadır. Kırmızı sinyaller yeşil sinyallerden daha yoğun görünmektedir.



**Şekil 4. 17.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası 87 nolu diploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA lokasyonlarını göstermektedir. Sarı oklar (a, c) ile gösterilen kromozomlar her iki rDNA sinyalini yakın lokasyonlarda taşımaktadır. Büyütme çizgileri 10 µm'dir).



**Şekil 4. 18.** 87 nolu diploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA ve yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 3 nolu kromozom her iki sinyalide yakın konumlu taşımaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

Sinyal sayıları eşit olan *mairi* (ABY-Bc 6106-1975U) ve 87 numaralı aksesyona ait, bu sinyallerin lokasyon dağılımları bakımından farklılıklar göstermektedir. *Mairi* genomunda sinyaller çoğunlukla kromozom uçlarına yakın (telomerik) iken, 87 numaralı aksesyona ait genomunda sinyaller daha çok ortaya (sentromerik) yakın konumlu bulunmuştur. Bu durum genom içinde kromozomal (translokasyon) veya genetik değişiklikler ile ilişkilendirilebilir. Yanı sıra bu iki aksesyona ait diğer diploidlere benzer bazı sinyal özellikleri göstermeleri, bu iki aksesyona ait diğer diploidler ile genetik bir ilişkilerinin olabileceğini de göstermektedir. Ayrıca bu iki aksesyona ait sinyal dağılımlarının farklı olması, farklı lokus özellikleri göstermeleri diploid genomların değişim içerisinde olduğuna kanıt olarak gösterilebilir.

#### 4. 1. 9. Diploid taksonların karşılaştırılması

Çalışılan tüm diploid taksonların kromozom sayısı  $2n=14$  olarak belirlenmiştir. Aneuploidliğe veya B kromozomlarına rastlanmamıştır. Aksesyona ait kromozom morfolojileri çok belirgin olmamakla beraber, bazı resimlerde kromozom yapıları hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Kromozomların genellikle metasentrik veya submetasentrik (çoğunlukla) görüntü verdikleri gözlenmiştir. Bazı kromozomlarda büyük satellit, bazılarında ise küçük satellit varlıkları görülmüştür. Genel olarak tüm aksesyona ait kromozomlar benzer yapılar göstermiştir. Sentromer lokasyonlarının net olarak belli olmaması nedeniyle, FISH sinyallerinin kromozomun hangi kolunda (uzun/kısa) bulunduğunu söylemek mümkün olmamıştır. Buna ek olarak bazı takson ve aksesyona ait kök uçları kullanılarak yapılan preparatlarda hücre içerisinde bulunan kromozomların morfolojilerinin ve dağılımlarının yeterince iyi olmaması nedeniyle bazı durumlarda sinyallerin lokasyonlarını net olarak belirlemek mümkün olmamıştır.

Çözünürlüğü yüksek resimler dikkatli bir şekilde analiz edildiğinde, diploid *Dactylis* aksesyonlarının genel olarak 3 tip kromozom yapısı gösterdiklerini söylemek mümkündür. Bu ayırım kromozomların bir boğum noktası veya iki boğum noktası taşımalarına ve boğumlardan sonra gelen kol uzunluklarına göre değişmektedir. Tek boğum noktasına bağlı metasentrik veya submetasentrik kromozomlar çoğu durumda ayırt edilmektedir. Ancak sekonder boğum bulunduran üçüncü kromozom tipi çoğu durumda ayırt edilememektedir. Sinyal taşıyan kromozomlarda aynı yapıları sergilemişlerdir. Bu gibi sebeplerden dolayı aksesyonlara ait daha kapsamlı karyotipler yapmak sıkıntılı olmuştur. Özellikle iki boğumlu yapılarda sinyaller bazen orta noktaya çok yakın bazı durumlarda ise biraz uzak çıkmıştır. Bu gibi belirsizlikler göz önünde bulundurularak ve karışıklığı engellemek için, sinyaller kromozomların orta noktalarına göre konumlandırılmıştır. Ölçü olarak orta noktaya yakın olanlar sentromerik, biraz uzak olanlar interkalar alınmıştır. Kromozom uçlarında olan veya uçlara yakın olanlar ise telomerik lokasyonlu kabul edilmiştir.

Diploid *Dactylis* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları, Çizelge 4. 1'de verilmiştir. Ribozomal DNA (5S ve 25S) FISH sonuçlarına göre 9 diploid aksesyon toplam sinyal sayılarına göre iki guruba ayrılmıştır. *Dactylis glomerata* L. forma *galicia*, *D. g.* subsp. *santai* Stebbins & Zohary, *D. g.* subsp. *lusitanica* Stebbins & Zohary (ABY-Bc 5562-1973U), *D. g.* subsp. *lusitanica* (PI 237603), *D. g.* subsp. *lobata*, *D.g.* subsp. *himaleyensis* ve 84 (isimsiz) aksesyonların diploid genomlarında toplamda 8 adet 5S ve 25S rDNA FISH sinyali sayılmıştır. *D. g. mairei* ve 87 numaralı aksesyonlar ise diploid genomlarında toplamda 10 adet FISH sinyali göstererek ikinci bir gurubu oluşturmuştur (Çizelge 4. 1).

Birinci gurubu oluşturan aksesyonlar ise, kırmızı (25S rDNA) ve yeşil (5S rDNA) sinyal dağılımlarına göre 2 alt guruba ayrılmıştır. Bunlardan subsp. *galicia* ve *santai* aksesyonları diploid genomlarında, 4 adet kırmızı ve 4 adet yeşil sinyal taşımaktadır. Bu iki aksesyonda gözlemlenen bir çift kırmızı sinyal lokasyon farklılığı göz önünde bulundurularak, iki farklı sinyal karyotipi yazılabilir. Bu sinyaller lokasyonlara, 2S(Y)+2İK(K)+4T(2K,2Y) veya 4S(2Y,2K)+4T(2Y,2K), şeklinde dağıtılabilir. Bu sonuçlara göre *santai* ve *galicia* taksonları çok benzer sinyal yapıları sergilemiştir.

İkinci alt grubu *lusitanica*, *lobata*, *himaleyensis* ve isimsiz (84) aksesyonları oluşturmuştur. Bu aksesyonların sinyal dağılımı 6 kırmızı, 2 yeşil şeklindedir. Bu aksesyonlarda görülen sinyaller lokasyonlara, 4S(K)+2İK(K)+2T(Y), şeklinde dağıtılabilir.

5S ve 25S rDNA FISH sinyal bulgularına göre diploid *lusitanica*, *lobata*, *himaleyensis* ve 84 nolu aksesyonların ortak kökene sahip olma olasılıkları çok yüksektir. Sayısal olarak 9 diploid aksesyondan 5'inin bu sinyal sayısı ve dağılımını göstermesi, bu gruba diploidlerin daha yaygın oldukları anlamına gelmektedir.

Sinyal sayısı ve dağılımına göre *mairei* ve 87 numaralı aksesyon 3. bir grubu oluşturmuştur. Her iki aksesyon 4 adet 5S rDNA ve 6 adet 25S rDNA olmak üzere toplamda 10 sinyal varlığı göstermiştir. Ancak bu sinyallerin lokasyonlara dağılımları önemli farklılıklar göstermektedir. Örneğin *mairei* telomerik konumda çift sinyal (K+Y) bulundururken, 87 numaralı aksesyon sentromerik konumda çift sinyal (K+Y) bulundurmaktadır. Lokasyon farklılıkları dikkate alındığında, *Dactylis* genomlarında, genom içi değişikliklerin olduğu, bu değişikliklerin sentromerik ve telomerik alanlar arasında olduğu söylenebilir. Yanısıra bu iki genomda sinyal taşıyan kromozomların, 8 adet sinyal taşıyan genomlardaki kromozomlara benzemeleri, yine bazı sinyal lokasyon dağılım benzerlikleri, bu iki grup arasında genetik bir bağ olduğunu göstermektedir. Serbest hibridizasyon sonrası, değişen coğrafik koşullara bağlı olarak bu şekilde kısmen farklı genotipler oluşmuş olabilir.

Diploid taksonlar için Çizelge 4. 1 incelendiğinde toplam sinyal sayısının 8 ve 10 olduğu, 25S rDNA sinyal sayısının 4 ve 6, 5S rDNA sinyal sayısının ise 2 ve 4 olduğu görülmektedir. Burada 25S rDNA lokasyon sayısının 5S rDNA lokasyon sayısından daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum poliploidizasyon sonrası tetrapoliploidlerde, 25S rDNA bölgelerinin sayıca daha fazla olmasının nedenlerinden biri olarak görünmektedir. Diploid örneklerin neredeyse tamamında (*mairei* hariç) ortak nokta, telomerik yeşil sinyalin varlığı ve benzer yoğunluklar göstermesi olmuştur. Bu diploid örnekler için ortak bir genetik işaret olarak kullanılabilir. 5S ve 25S rDNA sayılarında gözlemlenen çeşitlilik, hibridizasyon, kromozomların yeniden düzenlemeleri, eşit olmayan crossing over veya gen değişimleri gibi olaylar sonucunda oluşmuş olabilir (Wolny ve Hasterok 2009).

Lokasyon olarak her iki sinyal çeşidi, sentromerik (sentromer ve çevresi), telomerik (telomer ve çevresi) ve interkalar (sentromer ve telomer arası) şeklinde bir çeşitlilik göstermiştir. Bu lokasyonlardan sentromerik ve telomerik lokasyonlar çoğunluktadır. Bununla beraber yeşil sinyaller çoğunlukla telomerik, kırmızı sinyaller ise çoğunlukla sentromerik pozisyonlu gözlemlenmiştir. Resimlerin bazılarında bu lokasyonların sekonder yapılarla yakın oldukları gözlemlenmiştir. Bu bilgilerden hareketle, lokasyonlar arası sinyal değişimleri olduğu veya diploid genomlar arasında kromozomal geçişler olduğunu söyleyebiliriz. Yanı

sıra bütün aksesyonların sinyalleri 4 adet kromozom üzerinde gözlemlenmiştir. Bu durum sinyal değişimlerinin veya kromozomal geçişlerin belirli kromozomlar ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Sinyal yoğunlukları yaklaşık olarak küçük, orta ve büyük olarak bir çeşitlilik göstermiştir. Genellikle kırmızı sinyallerin yeşillerden daha yoğun oldukları, terminal durumlu yeşil sinyallerin de diğer yeşil sinyallerden daha kuvvetli oldukları görülmüştür. Fakat bazı durumlarda resimlerdeki arka fon kirliliği, kromozomların üst üste gelmesi, kromozomların aynı netlikte görüntüye sahip olmaması gibi nedenler; bazı durumlarda yoğunluk farklılıklarını belirlemeyi veya sinyal sayımını zorlaştırmıştır. Bu yüzden sinyal yoğunlukları arasındaki küçük farklılıkların dikkate alınmamasına dikkat edilmiş ve analizlerde sadece net yoğunluk farklılığı gösteren sinyallere göre değerlendirme yapılmıştır. Bazı resimlerde yoğunluğu çok küçük yeşil veya kırmızı sinyalleri belirlemek zor olmuştur. Bu sonuçtan hareketle rDNA gen yapılarında değişimler olabileceği, böylece yeni sinyallerin oluşabileceği söylenebilir. Bunun yanısıra bazı tekrar sayısı az olan, çok küçük rDNA sekans bölgelerinin belirlenmesi için, FISH analizinin daha hassas bir şekilde yapılması gerekebilir.

Diploid taksonlar sinyal sayılarına göre 2 ve dağılımlarına göre ise 3 grup özelliği göstermiştir. Bu gruplar kendi içlerinde ve aralarında önemli benzerlikler ve farklılıklar sergilemiştir. Coğrafik engellerin olmadığı, diploid taksonların aralarında serbestçe tozlaştıkları hesaba katılırsa (Stebnis ve Zohary 1959), diploidlerin ortak bir ataya sahip olma durumları yüksek görünmektedir. Özellikle bütün diploidlerde benzer telomerik yeşil sinyal bulunması, kromozomların benzer yapılar göstermeleri, farklı sayıda sinyal taşıyan aksesyonlarda; sinyal bulunduran lokasyonların benzer olmaları bu düşüncüyü güçlendirmektedir. Yine subsp. *mairei* taksonunda 2 çift telomerik yeşil sinyal bulunması, bu taksonun geçmişinde otopoliploidizasyon veya çeşitli hibridizasyon olayları olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte bu yeşil sinyaller arası yoğunluk farkı bulunması genom içi değişimlerin de olabileceğini göstermektedir. Buna rağmen 87 numaralı aksesyonda sadece bir çift telomerik yeşil sinyalin olması, cinsin dinamik veya kademeli bir genetik değişim süreci geçirdiğini göstermektedir. Ancak sinyal sayısı ve dağılımlarının farklı gruplar oluşturması, grup içi bile önemli sinyal karyotip farklılıkları, cinsin evriminde genetik köken olarak bir çatallaşma olduğunu veya cinsin üreme ilişkilerinin değiştiğini göstermektedir. Özellikle *mairei* genomunda görülen farklılıklar yeni bir türün işaretleri olabilir. Bu farklı diploid genotipler farklı şekillerde tetrapoliploid genotiplerin yapısına katılmış olabilir.

**Çizelge 4. 1.** Diploid *Dactylis* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları

Aksesyon Adı	Aksesyon No	Sinyal Özellikleri						
		Toplam	5S rDNA	25S rDNA	5S+25S rDNA	Lokasyon		
						S	İK	T
<i>D. g. L. subsp. santai</i>	ABY-Bc 4454-1982U	8	4	4	-	4(2K,2Y)	-	4(2K, 2Y)
<i>D. g. L. subsp. galicia</i>	ABY-Bc 6977-1979U	8	4	4	-	2Y	2K	4(2K, 2Y)
<i>D. g. L. subsp. himaleyensis</i>	ABY-Bc 5194-1980U	8	2	6		4K	2K	2Y
<i>D. g. L. subsp. lusitanica</i>	ABY-Bc 5562-1973U	8	2	6	-	4K	2K	2Y
<i>D. g. subsp. lusitanica</i>	PI 237603	8	2	6	-	4K	2K	2Y
<i>D. g. subsp. Lobata</i>	PI 283242	8	2	6		4K	2K	2Y
İsimsiz	GRA 712\84	8	2	6		4 K	2K	2Y
<i>D. g. L. subsp. mairei</i>	ABY-Bc 6106-1975U	10	4	6	2*	-	2Y	8(4K, 4Y)
İsimsiz	87	10	4	6	2*	6(4K,2Y)	2K	2Y

S:Sentromerik, T:Telomerik, İK: İnterkalar, K:kırmızı, Y:yeşil \*= Homolog kromozomların üzerinde her iki rDNA bölgesi (5S+25S) mevcuttur.

Morfolojik ve coğrafik farklılıklara dayanılarak, genellikle diploid *Dactylis* varlıklarının iki alt guruba ayrıldıkları görünmektedir. Bazı araştırmacılar iki grup üyelerinden bazılarının geçiş özellikleri gösterdiklerini belirtmişlerdir (Borill 1977, Lumaret 1988, Falistocco ve Torricelli 2016). Lumaret (1988), Falistocco ve Torricelli (2016)'nın çalışmalarına göre, bu tez çalışmasında kullanılan, *lobata (aschersoniana)*, *himaleyensis*, *lusitanica* ve *galicia* (Galician type) Avrasya gurubunda, *santai* ise Akdeniz gurubunda yer almaktadır. İklim tiplerine göre yapılan guruplandırmalar net olmamakla beraber; *galicia*, *santai*, *mairei* Akdeniz, *lobata*, *himaleyensis* ve *lusitanica* ise ılıman iklim tipleri ile ilişkilendirilmiştir (Stebbins ve Zohary1959). İklim tipi gurubları ile FISH gurubları büyük benzerlikler göstermektedir. Ancak *mairei* Akdeniz iklim gurubunda olmasına rağmen rDNA FISH özellikleri, *galicia* ve *santai* gurubundan önemli derecede farklılıklar göstermiştir. Fakat *santai*, *galicia* ve *mairei*'nin 4 adet 5S rDNA (yeşil) sinyali taşımaları, bu üç diploid arası bir



filogenetik ilişki olabileceği anlamına gelebilir. Ilıman iklim gurubunda olan *himaleyensis*, *lobata* ve *lusitanica* rDNA FISH özellikleri bakımından aynı guruba girmişlerdir.

Wetshching (1991)'e göre 11 diploit takson somatik kromozom özelliklerine göre 3 farklı guruba ayrılmıştır. Bu guruplamada, *himaleyensis* farklı, *lusitanica* ve *santai* ise farklı bir gurupta yer almışlardır. Aynı çalışmada *mairei* taksonunun hiçbir guruba girmeyecek kromozomal farklılıklar gösterdiği eklenmiştir. Ancak araştırmacı çalışmasında, *lobata* taksonunu kullanmamıştır. Eğer *lobata* ve *aschersoniana* aynı takson ise, bu taksonuda başka gurupta göstermiştir. Çalışmamızda *lobata* ve *lusitanica* aynı gurupta yer almışlardır. *Lusitanica* ve *santai* ise aynı sayıda sinyal ve benzer lokasyon özellikleri göstermiştir. Fakat sinyal dağılımları farklılık göstermiştir. Yukarıdaki çalışmada olduğu gibi *mairei* taksonu diğer diploidlerden farklı FISH sinyalleri göstermiştir.

Falisticco ve Torricelli (2016)'ya göre ise 9 diploid takson kromozom özelliklerine göre aynı karyotip formülüne sahip bulunmuş, hepsi tek gurupta değerlendirilmiştir. 5S ve 25S rDNA FISH çalışmasında diploidler farklı guruplar oluşturmuştur.

Büyükbaşar (2010)'a ait çalışmada, diploid *Dactylis* örnekleri 2C-DNA içerikleri bakımından taksonlar içi ve arası varyasyon göstermiş, fakat bu varyasyonun süreklilik gösterdiği yani çok büyük dalgalanmalar göstermediği söylenmiştir. Bu veriye dayanarak diploidler arasında yüksek derecede eşleşme olduğu, türleşme olacak kadar diploidlerin genetik olarak değişmediği söylenmiştir. Aynı çalışmada çok sayıda diploid aksesyonun kromozomal yapıları, asetokarmin boyama yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmada satelit yapıların sayı ve morfoloji olarak farklılıklar sergiledikleri, bu durumun kromozom morfolojilerini belirlemeyi ve karşılaştırmalarında sıkıntılar oluşturduğu söylenmiştir. Aynı zamanda aynı taksona ait farklı aksesyonlarda karyotiplerin değişebildiğini söylemiştir. Bu nedenle herhangi bir sınıflandırma yapmayı uygun bulmamıştır.

Stewart ve Ellison (2015)'e ait çalışmada, 18 diploid takson çekirdek ITS (Internal transcribed spacer) sekans mutasyon durumlarına göre filogenetik olarak araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda diploidler 3 büyük guruba ayrılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre cins çok eski zamanlarda *altaica* gibi bir türden köken almış olup, sonra çatalaşmalar göstermiştir. Yine Kanarya adaları diploid örneklerinin iki koldan kökenlendiği sonucuna varılmıştır. FISH çalışmaları sonucu elde ettiğimiz 3 gurup, bu çalışma sonuçlarındaki guruplar ile benzerlik göstermemiştir. FISH guruplarında çalışılan taksonlar, çekirdek ITS guruplarındakilerden

farklı dağılımlar göstermişlerdir. Örneğin FISH çalışmasında farklı guruplarda gözlemlenen, *lobata*, *santai* ve *mairei*, çekirdek ITS çalışmasında aynı gurupta yer almışlardır. Bununla beraber çekirdek ITS sekanslarında gurup içi ve arası nükleotit farklılıkları olduğu bildirilmiştir. FISH çalışmasında da benzer şekilde, diploid *Dactylis* varlıklarının bir atadan köken almış olabilecekleri ile ilgili izler bulunmaktadır. Yanısıra farklı sinyal özelliklerine sahip taksonların görülmesi, cinste çatallaşmalar olduğunu göstermektedir. Yine çok yakın sinyal özelliği gösteren aksesyonlarda bazı küçük farklılıklar belirlenmiştir.

Moleküler markır çalışmaları, AFLP (Peng ve ark 2008), SSR (Xie ve ark. 2010a), diploid *Dactylis* taksonlarının toplandıkları yerlere göre 2 gurup oluşturduğunu, gurup içi ve arası genetik varyasyon gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Yukarıda görüldüğü gibi farklı çalışmalarda diploid *Dactylis* taksonları çoğunlukla farklı guruplar oluşturmuştur. Bu genel durum çerçevesinde, 5S ve 25S rDNA özelliklerini çalıştığımız diploid taksonların en az 2 farklı koldan evrimleştiklerine işaret etmektedir.

#### **4. 2. Tetrapoliploid Taksonlara Ait Bulgular**

Çalışmada kullanılan tetrapoliploid aksesyonlarının kromozom sayısı  $2n=4x=28$  olarak belirlenmiştir. 65 ve 22 aksesyon nolu bitkilerin kromozom sayısı,  $2n=3x=21$ , olarak belirlenmiş ve bu bitkilerin triploid oldukları anlaşılmıştır. Tetrapoliploid taksonlarda, gözlenebildiği kadarıyla, kromozomlar morfolojik olarak metasentrik ve submetasentrik sentromer durumu göstermiştir. Sentromer konumu bakımından, tetrapoliploid taksonların kromozomları ile diploid taksonların kromozomları büyük bir benzerlik göstermiştir. Ancak tetrapoliploidlerin kromozom sayılarının daha fazla olması ve morfolojik olarak benzer olmaları, sekonder boğumlu ve submetasentrik kromozomların fazla oluşu, tetrapoliploidlerde sinyal özelliklerini belirlemeyi daha da zorlaştırmıştır. Diploid taksonlarda olduğu gibi tetrapoliploid taksonların da büyük çoğunluğunda kromozomlar üzerinde sentromerlerin yerlerini net olarak görmek mümkün olmamıştır.

Çalışma sırasında; her ne kadar kök ucu hasadından preparat hazırlanmasına kadar aynı prosedür takip edilmiş ve aynı işlemler uygulanmış olsada bazı aksesyonlarda bol miktarda bölünen hücreye sahip kök ucu elde edebilmek mümkün olmamıştır. Genellikle bu aksesyonlarda uygun morfolojiye ve iyi dağılmış kromozomlara sahip yeterli sayıda hücre elde edilememiştir. Bunun muhtemel nedenleri, kök uçlarının alındığı bitki gelişim evreleri

veya bu bitkilerin yetiştirme şartlarından kaynaklanan; kök uçlarındaki büyümenin durmasından kaynaklı olduğu, tahmin edilmektedir. Buna ek olarak bazı preparatlarda sitoplazma kalıntıları yeterince uzaklaştırılamamıştır. Diğer taraftan preparat yaparken maruz kaldıkları farklı basınç uygulamalarından dolayı aynı preparatta dahi hücrelerin kromozom boyutları hatta aynı hücre içerisinde bile kromozomların boyları arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Bu sebeplerden dolayı tetrapoliploid taksonlarda kromozomları analiz etmek diploidlere nazaran daha güç olmuştur. Bu nedenle analizlerde sinyal sayısı ve dağılımları ön planda tutulmuştur. Ancak aynı sinyal grubuna giren aksesyonların çoğunda benzer lokasyon durumları gözlemlendiğinden bu karışıklıklar sıkıntı yaratmamış, aksine farklı durumların belirlenmesi daha kolay olmuştur.

Bu tez çalışmasında kullanılan tetrapoliploid taksonlara ait aksesyonlar üzerinde yapılan 5S ve 25S rDNA FISH analiz sonuçları aşağıda ayrıntılarıyla sunulmuştur.

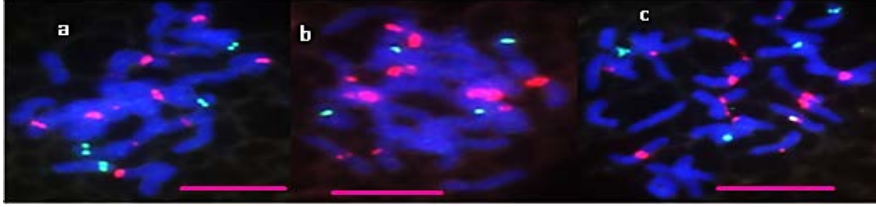
#### **4. 2. 1. *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* aksesyonlarına ait bulgular**

Çalışmamızda IBER (ABY-Bc 5645-2004U) ve Western Regional Plant Introduction Station (PI 306730, PI 265568, PI 265567)'dan temin edilmiş olan toplam 4 *Dactylis glomerata* L. subsp. *hispanica* (Roth) Nyman aksesyonu kullanılmış ve analiz sonuçları aşağıda ayrı ayrı sunulmuştur. Aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri 8.25 ile 8.54 pg arasında değişim göstermiştir (Tuna 2015).

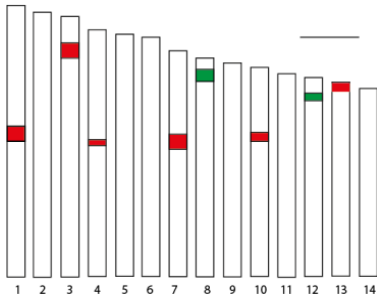
##### **4. 2. 1. 1. *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* (PI 265567)**

FISH analizi sonrası PI 265567 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 19 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 20'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 16 mitotik kromozomu (8 çift) FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 4'ü 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. İki çift kromozom dışında tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine yakın bir konumda taşımaktadır. Farklı olan bir çift kromozomda kırmızı sinyal nispeten sentromer bölgesinden biraz daha uzakta iken, diğer kromozom çifti kırmızı sinyal telomer bölgesinde taşımaktadır. Yeşil sinyaller ise kırmızı sinyallere nazaran sentromerden daha uzak olup, telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Bununla birlikte yeşil sinyallerin yoğunlukları ve telomere olan uzaklıkları bir

birinden farklıdır. Aksesyon kromozomları üzerindeki kırmızı sinyallerin yeşil sinyallere nazaran daha güçlü olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 19. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 265567 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu$ m'dir).



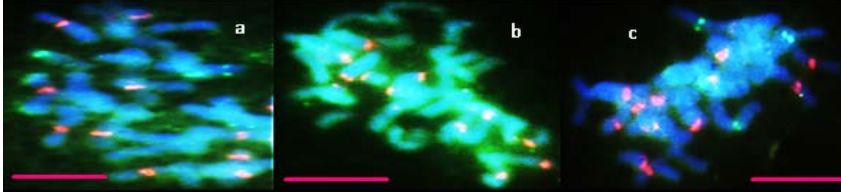
Şekil 4. 20. PI 265567 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1  $\mu$ m'dir).

#### 4. 2. 1. 2. *Dactylis glomerata* L. subsp. *hispanica* (Roth) Nyman (ABY-Bc 5645-2004U-)

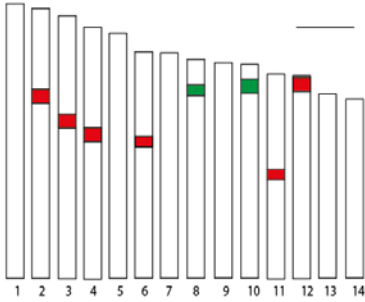
Bu aksesyona ait bitkiler üzerinde yapılan FISH analizlerinde sinyallerin sayı ve dağılımlarının değiştiği gözlenmiştir. Yapılan inceleme sonucu sinyal sayısı ve dağılımı bakımından bitkilerin 2 ye ayrıldığı görülmüştür. Farklılıkları gösterebilmek adına bu aksesyon için iki ayrı idiogram çizilmiştir.

Şekil 4. 21 ve 4. 22'den de görüleceği üzere bu aksesyona ait bazı bitkiler (a) önceki subsp. *hispanica* aksesyonunda olduğu gibi 16 mitotik kromozom FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin yine 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve geri kalan 4'ü 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Kromozomlar üzerindeki

sinyallerin fiziki lokasyonları önceki aksesyon ile büyük bir benzerlik göstermektedir. İki aksesyonun FISH sinyali desenleri arasındaki küçük farklılıklar preparatlar üzerindeki hücreler içerisinde bulunan kromozomların iyi dağılmaması veya morfolojilerinin yeterince iyi olmamasına bağlanabilir.

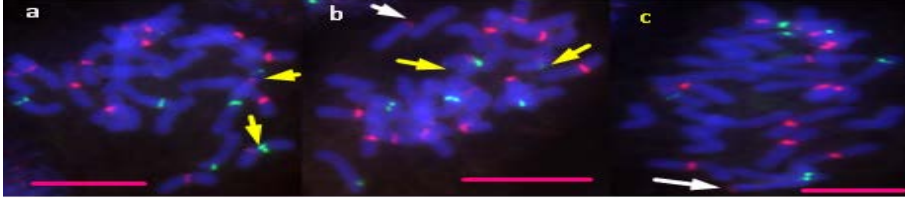


**Şekil 4. 21.** (a) Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 5645-2004U nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu$ m'dir).

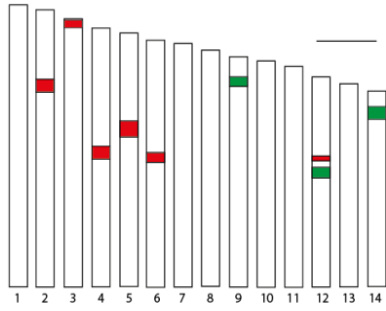


**Şekil 4. 22.** (a) ABY-Bc 5645-2004U nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1  $\mu$ m'dir).

ABY-Bc 5645-2004U nolu aksesyona ait diğer bazı bitkilerin (b) mitotik kromozomlarının görünüşü, Şekil 4. 23 ve onlara ait haploit idiogram, Şekil 4. 24'de gösterilmiştir. Şekillerden de görüleceği üzere kromozomlar üzerindeki sinyallerin fiziki lokasyonları önceki subsp. *hispanica* aksesyonu (PI 265567) ve bu aksesyonun diğer bireyleri (a) ile büyük bir benzerlik göstermektedir. Ancak ABY-Bc 5645-2004U nolu aksesyon (b) diğer iki aksesyondan farklı olarak, 2 adet ekstra sinyal, kırmızı sinyal taşıyan (25S rDNA) bir kromozom çiftinin ilave olarak aynı kromozomun sentromer bölgesine yakın bir konumda yeşil (5S rDNA) sinyal taşıması ile ayrılmaktadır.



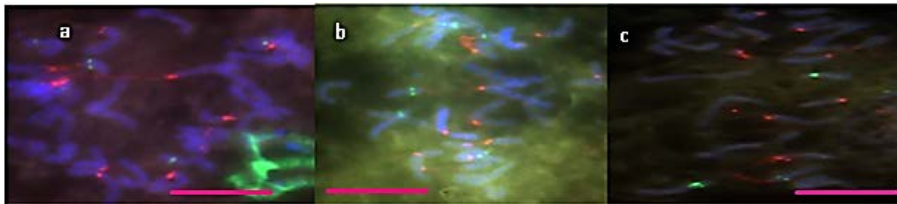
**Şekil 4. 23.** (b) Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 5645-2004U nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu$ m'dir.)



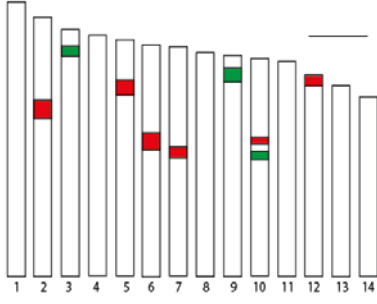
**Şekil 4. 24.** (b) ABY-Bc 5645-2004U nolu tetraploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1  $\mu$ m'dir.)

#### 4. 2. 1. 3. *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* (PI 265568)

FISH analizi sonrası PI 265568 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 25 ve onlara ait haploit ideogram Şekil 4. 26'de sunulmuştur. Şekillerden görüleceği üzere kromozomlar üzerindeki sinyallerin desenleri ABY-Bc 5645-2004U nolu aksesyonuna ait bazı bireylerde (b) gözlenen sinyal desenleri ile büyük bir benzerlik göstermektedir.



**Şekil 4. 25.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 265568 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu$ m'dir.)

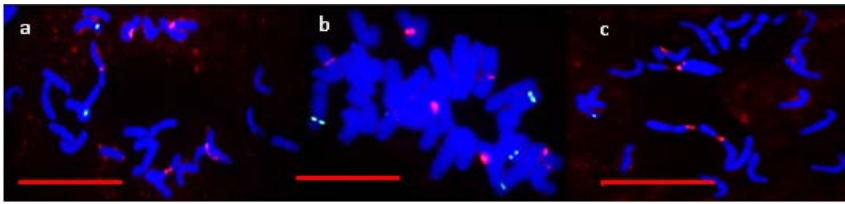


**Şekil 4. 26.** PI 265568 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 10. Kromozom her iki siyali de taşımaktadır. Büyütme çizgisi 1  $\mu\text{m}$ 'dir).

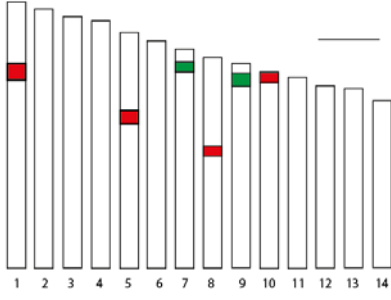
#### 4. 2. 1. 4. *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* (PI 306730)

FISH analizi sonrası PI 306730 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 27 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 28'de gösterilmiştir.

Şekillerden de görüleceği üzere kromozomlar üzerindeki sinyallerin sayısı, nispi yoğunlukları ve fiziki lokasyonları genel olarak önceki subsp. *hispanica* aksesyonları ile büyük bir benzerlik göstermektedir. PI 306730 nolu aksesyonda önceki subsp. *hispanica* aksesyonlarından farklı olarak sentromere yakın bölgede bulunan bir çift kırmızı sinyal bulunmamaktadır.



**Şekil 4. 27.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 306730 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu\text{m}$ 'dir).



**Şekil 4. 28.** PI 306730 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* L. subsp. *hispanica* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 1. 5. *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* aksesyonlarının değerlendirilmesi

FISH analizi sonrası 4 adet *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* aksesyonuna ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 2'de görüldüğü gibi 5S ve 25S rDNA FISH desenleri incelenen 4 adet subsp. *hispanica* aksesyonu, bu sinyallerin sayısı, lokasyon ve dağılım özelliklerine göre farklı sinyal desenleri oluşturmuştur. Toplam sinyal sayısı, 12, 16, 18, kırmızı sinyal sayısı 8 ve 12, yeşil sinyal sayısı 4 ve 6 şeklinde bir sayısal dağılım göstermiştir. Genel olarak aksesyonlara ait FISH resimleri kaliteli çıkmıştır. Bu durumdan faydalanıp sinyal taşıyan kromozomları karşılaştırmak kolay olmuştur. Farklı sinyal sayıları görülmesine rağmen, takson genomlarını karşılaştıracak ortak özellikler gözlemlenmiştir. Çizelge 4. 2 incelendiği zaman, 4 aksesyonun interkalar ve telomerik, 2İK(K)+6T(4Y,2K), sinyal dağılımları aynı bulunmuştur. Bu benzerlikler resimlerde de gözlemlenmektedir. Örneğin neredeyse bütün aksesyonlarda kırmızı sinyalleri ortaya çok yakın taşıyan kromozomların veya telomerik sinyal taşıyan kromozomların birbirlerine benzemesi, bu 4 aksesyon arasında genetik bir ilişki olduğunu göstermektedir. Buradan yola çıkarak, farklı *D. g.* subsp. *hispanica* aksesyonları arasında genetik bir ilişki olduğu söylenebilir.

Aksesyonlar arasında farklılıklar oluşmasında, sentromerik alanlardaki, kırmızı ve yeşil sinyal sayısı değişimlerinin sebep olduğu görülmektedir. En küçük (12) ve en büyük (18) sinyal sayısı arası farkın büyük olması, yine 6 adet yeşil sinyal bulunması bazı tetrapoliploid *hispanica* üyelerine birden fazla diploidin etki ettiğini göstermektedir. Bazı *hispanica* üyelerinde, ABY-Bc-56452004U (b), PI 265568, bir kromozom üzerinde komşu çift (K+Y)



lokasyonlu sinyal bulunması kromozomlar arası bazı etkileşimler olduğuna işaret etmektedir. Bu etkileşim poliploidi içi veya arası serbest tozlaşma ve dölllenme sonrası oluşmuş-olabilir.

*Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* (Roth) Nyman (ABY-Bc-56452004U) ait bitkilerden bazıları 16 (12K+4Y), bazıları ise 18 (12K+6Y) rDNA FISH sinyali vermişlerdir. Bu bitkilerin toplanma yerleri tam olarak bilinmediği için sonuçlar, bu bitkilerin karışık popülasyonlardan oluşmuş olabileceğini veya tohumlarının karıştırılmış olabileceği olasılığını da akla getirmektedir.

Tetrapoliploid *Dactylis* taksonları karışık ekotiplerden oluşabilmektedir. Farklı ekotipler benzer morfolojik özellikler gösterebilmektedir. Ancak farklı ekotip (aksesyon) genotiplerindeki bazı farklılıklar fenotipik karakterlere yansımayaabilir veya gözle farkedilmeyebilir. Bu durumda aynı adlandırmaya sahip olan aksesyonların farklı sinyal sayıları göstermeleri normal olabilir. *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* aksesyonlarında belirlenen sinyal sayılarının, diploidlerdeki katları şeklinde artmış olmaları, *hispanica* ekotiplerinde, genel anlamda, poliploidizasyon olayının gerçekleştiğini göstermektedir.

Çalışılan 4 aksesyon da *hispanica* olarak adlandırılmıştır. Bu 4 aksesyon 3 grup özelliği gösterebilir, aksesyonlar arası büyük benzerlikler de belirlenmiştir. Bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda taksonun poliploidizasyonunda bir veya daha fazla diploidin etki etmiş olabileceği söylenebilir.

**Çizelge 4. 2.** *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları

Takson Adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı				Lokasyon		
		Toplam	5S	25S	5S+25S	S	İK	T
<i>hispanica</i>	PI 265567	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)
	ABY-Bc-56452004U (a)	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)
	ABY-Bc-56452004U (b) *	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	PI 265568*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	PI 306730	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)

S: Sentromerik alan, T: Telomerik alan, İK: İnterkalar alan, K: 25S rDNA, Y: 5SrDNA temsil etmektedir. (a) ve (b) aynı taksona ait farklı bitkileri göstermektedir. \*Aynı kromozom üzerinde her iki rDNA bölgesi (5S+25S) mevcuttur.

*D. glomerata* subsp. *hispanica* taksonu daha çok Akdeniz iklim özelliği gösteren kurakçıl alanlarda tanımlanmıştır. Bu taksona ait toplanan bitkilerin morfolojik farklılıklar sergilediği ve en az iki farklı morfotipinin tanımlandığı belirtilmiştir (Domin 1943, Borrill ve Lindner 1971, Amirouche ve Missot 2007). Fransa'nın güneyinde (Akdeniz iklimi hâkim) toplanan çok sayıda *hispanica* popülasyonu kendi içinde enzim polimorfizmi göstermiştir (Tomekpe ve Lumaret 1991). Fenotipik, fenolojik ve alloenzim (SOD1) karakterleri bakımından İspanya (Galiçya) ve Portekiz *hispanica* örnekleri incelenmiş, popülasyonlar bu karakterler bakımından çeşitlilik göstermiştir. Galiçya'ya yakın Akdeniz iklim özellikleri altında olan yerler *hispanica* için sınır oluşturmuş; bu alanlardaki *hispanica* örneklerinin tetrapoliploid *hispanica* ve *izcoi* hibritleri oldukları belirtilmiştir. Yanısıra ılıman ve Akdeniz iklim geçiş alanlarında, tetrapoliploid *hispanica* ve *glomerata* popülasyonları belirlenmiş, var olan diğer popülasyonlar ile *hispanica* arasında gen akışı olabileceği belirtilmiştir (Lumaret 1986, Lindner ve ark. 2011). Diploid taksonlar üzerine yapılan moleküler çalışmalar, *hispanica* bitkilerinin yayılma alanlarında, farklı diploidler olduğunu göstermiş ve *hispanica*'nın genetik yapısına birden fazla diploidin genetik katkı yapmış olabileceğini göstermiştir (Steward ve Ellison 2011). Bu çalışmalarda görülen polimorfik özellikler, 5S ve 25S rDNA yapıları içinde geçerli görünmektedir.

#### **4. 2. 2. *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonlarına ait bulgular**

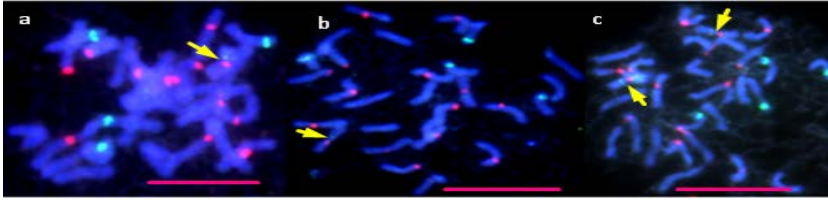
Çalışmamızda IPK (GR 669\96) ve Çek Cumhuriyeti ulusal gen bankasının (14G1000192)'dan temin edilmiş olan, 2 *Dactylis glomerata* L. subsp. *glomerata* aksesyonu kullanılmış ve analiz sonuçları aşağıda ayrı ayrı sunulmuştur. Aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri 8.4 pg olarak rapor edilmiştir (Tuna 2015).

##### **4. 2. 2. 1. *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* (GR 669\96)**

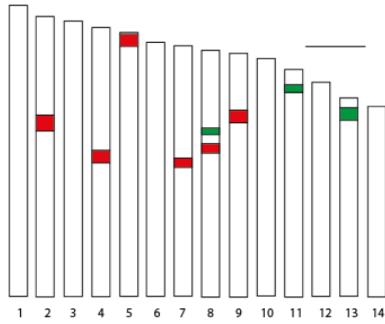
FISH analizi sonrası GR 669\96 nolu aksesyonun mitotik kromozomlara ait resimler, Şekil 4. 29 ve onlara ait haploit idiogram, Şekil 4. 30'da gösterilmiştir.

GR 669\96 aksesyonuna ait şekillere bakıldığında, 16 mitotik kromozomunun FISH sinyali taşıdığı görülmektedir. Orta boya sahip bir çift kromozom (8 nolu) aynı kolu üzerinde her iki sinyali bir birine oldukça yakın bir konumda taşımaktadır. Bu sinyallerden kırmızı olan daha belirgin iken yeşil olan oldukça küçüktür. Bu yeşil sinyal küçük olduğundan ve kromozomların üst üste gelmesinden dolayı bazı resimlerde görülmemektedir. FISH

sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 6 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. İki çift kromozom dışında tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine yakın bir konumda taşımaktadır. Farklı olan bir çift kromozomda ise kırmızı sinyal nispeten sentromer bölgesinden biraz daha uzakta iken, diğer kromozom çifti kırmızı sinyali telomer bölgesinde taşımaktadır. Yeşil sinyaller (4 adet) ise kırmızı sinyallere nazaran sentromerden daha uzakta olup, telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Bununla birlikte yeşil sinyallerin yoğunlukları ve telomere olan uzaklıkları bir birinden farklıdır. Aksesyonun kromozomları üzerindeki kırmızı ve yeşil sinyallerin yoğunlukları görece birbirine yakın görünmektedir.



**Şekil 4. 29.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 669\96 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı oklar çift sinyal taşıyan kromozomları göstermektedir. Büyütme çizgileri 10  $\mu\text{m}$ 'dir.)

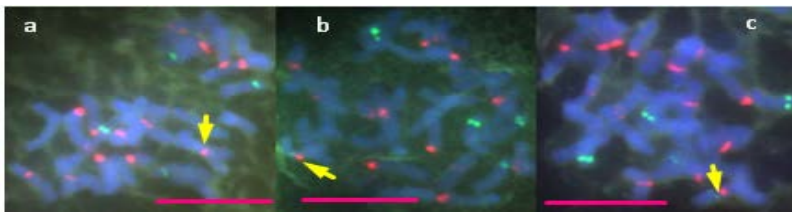


**Şekil 4. 30.** GR 669\96 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 8. Kromozom her iki sinyali de taşımaktadır. Büyütme çizgisi 1  $\mu\text{m}$ 'dir.)

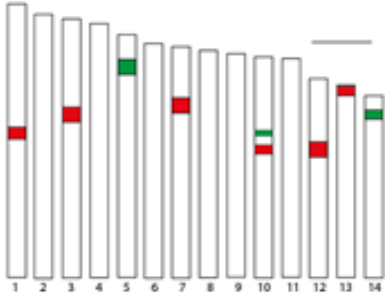
#### 4. 2. 2. 2. *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* (14G1000192)

FISH analizi sonrası 14G1000192 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 31 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 32’de sunulmuştur.

Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. Diğer aksesyonda olduğu üzere bu aksesyonda da orta boylu (8 nolu) bir çift kromozom aynı kromozom kolu üzerinde her iki sinyali bir birine oldukça yakın bir konumda taşımaktadır. Sentromerik alana yakın olan bu iki sinyalden, kırmızı olan yeşile göre daha güçlü ışımaya yapmıştır. Diğer aksesyonda olduğu gibi bu aksesyonda da yeşil sinyal bazı resimlerde gözükmemektedir. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 6 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. İki çift kromozom dışında tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine yakın bir konumda taşımaktadır. Farklı olan bir çift kromozomda ise önceki aksesyonda olduğu gibi kırmızı sinyal nispeten sentromer bölgesinden biraz daha uzakta iken, diğer kromozom çifti kırmızı sinyali telomer bölgesinde taşımaktadır. Yeşil sinyaller (4 adet) ise kırmızı sinyallere nazaran sentromerden daha uzak olup, telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Bununla birlikte yeşil sinyallerin yoğunlukları ve telomere olan uzaklıkları bir birinden farklıdır. Aksesyonun kromozomları üzerindeki kırmızı sinyallerin yeşil sinyallere nazaran daha güçlü olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 31. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası 14G1000192 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı oklar her iki sinyali de taşıyan kromozomları göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm’dir)



**Şekil 4. 32.** 14G1000192 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 10. kromozom her iki sinyali de taşımaktadır. Büyütme çizgisi 1 $\mu$ m'dir).

#### 4. 2. 2. 3. *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonlarının değerlendirilmesi

*Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* taksonuna ait 5S ve 25S rDNA FISH analizi, taksonun kromozomal yapısı hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Her iki aksesyonda benzer sinyal özellikleri göstermiştir. Kromozomların üst üste gelmesi veya kırılmalarına bağlı olarak, bazı çok küçük sinyallerin belirlenmesi zor olmuştur. Bu gibi preparatlar hazırlanırken çok dikkatli çalışılmalıdır.

Çizelge 4. 3 incelendiği zaman, 2 aksesyon hemen hemen aynı, sinyal sayı ve dağılım özellikleri göstermiştir. Her iki aksesyon toplamda 18 (12K+6Y) sinyal varlığı göstermiştir. Sentromerik yeşil sinyaller ve bazı kırmızı sinyallerin çok küçük olmaları, takson içinde zamanla gerçekleşen, genomik veya epigenetik değişikliklere bağlanabilir. Her iki aksesyon da diploid sinyal sayısının yaklaşık iki katı kadar sinyal varlığı göstermiştir. Bu durum *Dactylis* genomunda poliploidizasyon olayının gerçekleştiğini göstermektedir. Fakat yeterli aksesyon ile çalışılmadığından, bu poliploidizasyonun geçmişini ortaya çıkaracak kadar kanıt bulunmamaktadır. Ancak gerek sinyal sayısının fazlalığı ve gerek 6 adet yeşil sinyal görülmesi, bu iki aksesyona farklı poliploidi seviyelerinin katkı sağlamış olduğunu kuvvetlendirmektedir. Farklı poliploidi seviyeleri, örneğin iki diploid veya diploid-triploid bitkiler arası hibridizasyon sonrası poliploidizasyon sonucu bu aksesyonlar meydana gelmiş olabilir.

**Çizelge 4. 3.** *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* aksesyonlarına ait, 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları

Takson Adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı			Lokasyon			
		Toplam	5S	25S	5S+25S	S	İK	T
<i>glomerata</i>	GR 669/96*	18	12	6	2	10(8K, 2Y)	2K	6(2K,4Y)
	14G1000192*	18	12	6	2	10(8K, 2Y)	2K	6(2K,4Y)

S= Sentromerik alan, T= Telomerik alan, İK= İnterkalar alan, K=25S rDNA, Y=5SrDNA temsil etmektedir. \*= İki adet komşu rDNA bölgesi (5S+25S) bulunmakta.

Literatür çalışmalarında, *D. glomerata*, en yaygın ve cinsi en iyi tanımlayan tür olarak geçmektedir. Bazı çalışmalarda tek diploidten kökenlendiği bazılarında ise farklı diploidlerden kökenlenmiş olabileceği vurgulanmıştır (Steward ve Ellison 2011). Diploid aksesyonlarda gözlemlenen bazı genom izlerinin, *D. glomerata* aksesyonlarında da gözlemlenmesi, türün farklı diploidlerden köken almış-olabileceğini kuvvetlendirmektedir. Daha çok geçiş bölgelerinde diğer tetrapoliploidlerle, örneğin *hispanica* ile aynı alanlarda yetiştikleri ve aralarında gen geçişi olabileceği vurgulanmıştır (Lindner ve ark. 2011). Bazı sinyal özelliklerinin, kırmızı sinyal artışı veya sinyal yoğunluk farklarının, bu yolla oluşması mümkündür. Yeterince aksesyon ile çalışılmadığı için; *D. glomerata* subsp. *glomerata*'nın sinyal özellikleri, hem taksonu tanımlayacak hem de diğer taksonlar ile karşılaştıracak kadar yeterli bulunmamıştır. Yine de *glomerata* sinyal özellikleri, 18 sinyal taşıyan *hispanica* aksesyonları ile büyük benzerlik göstermektedir.

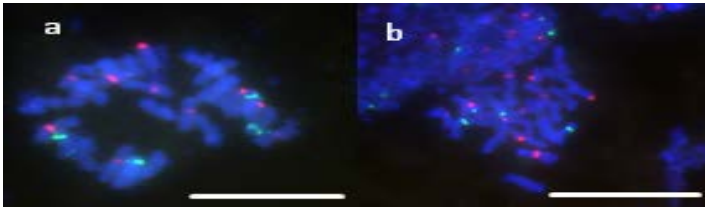
#### **4. 2. 3. *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonlarına ait bulgular**

Çalışmada, IBER (ABY-Bc 5645-2004U) ve Western Regional Plant Introduction Station (PI 316209, PI 372621)' dan temin edilmiş olan, 3 *Dactylis glomerata* L. subsp. *lobata* aksesyonu kullanılmış ve analiz sonuçları aşağıda ayrı ayrı sunulmuştur. Aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri 8.16 ile 8.66 pg arasında değişim göstermiştir (Tuna 2015).

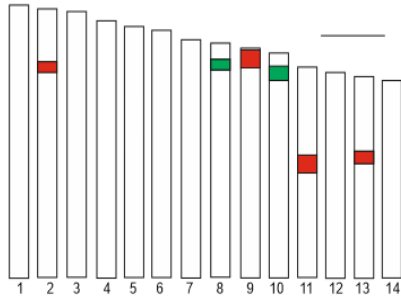
##### **4. 2. 3. 1. *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* (ABY-Bc 7279-0000U)**

FISH analizi sonrası ABY-Bc 7279-0000U nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 33 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 34'de sunulmuştur.

Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 12 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 4'ü 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Bir çift kromozom dışında tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın bir konumda taşımaktadır. Bazı kırmızı sinyaller yoğun bazıları ise zayıf ışımaya yapmıştır. Yeşil sinyal sayısı 4 olup, hepsi telomerik lokasyonlara daha yakın yerleşmiştir. Yeşil sinyal çiftleri arasında yarıya yakın yoğunluk farkı bulunmaktadır.



**Şekil 4. 33.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 7279-0000U nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10 µm'dir).

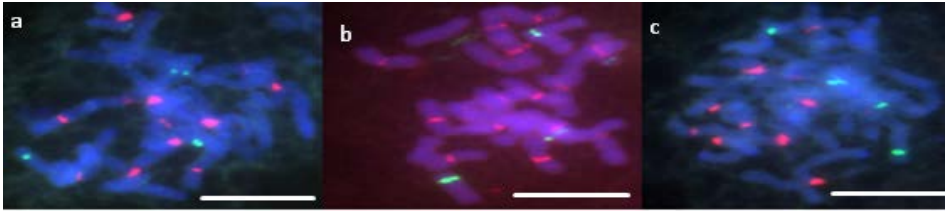


**Şekil 4. 34.** ABY-Bc 7279-0000U nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

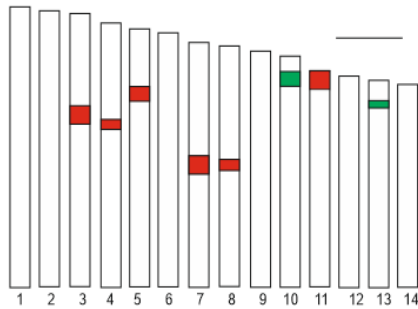
#### 4. 2. 3. 2. *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* (PI 316209)

FISH analizi sonrası PI 316209 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 35 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 36'de görülmektedir.

Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 4'ü 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Dört çift kırmızı sinyal sentromerik bölgeye daha yakın iken bir çifti sentromerden uzak (interkalar) ve bir çifti telomerik alanda konumlanmıştır. Sekiz kırmızı sinyal yoğun ve birbirine yakın ışımalar yaparken genellikle 4'nün zayıf ışımalar yaptığı görülmektedir. Bu aksesyonda da 4 adet telomerik yeşil sinyal net sayılmıştır. Yeşil sinyaller ise kırmızı sinyallere nazaran sentromerden daha uzak olup, telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Yeşil sinyal çiftleri arasında küçük yoğunluk farkı bulunmaktadır. 2 adet çok zayıf (sentromerik) kırmızı sinyal bazı resimlerde gözlenmemektedir. Sinyallerin lokasyonları ve yoğunlukları kromozomlar arasında değişkenlik göstermektedir.



**Şekil 4. 35.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 316209 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları. (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



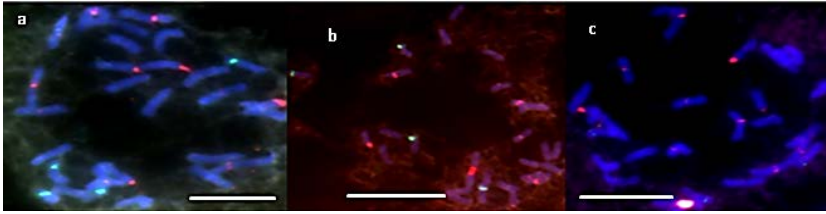
**Şekil 4 36.** PI 316209 nolu tetrapoliploid *D. glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1µm'dir).



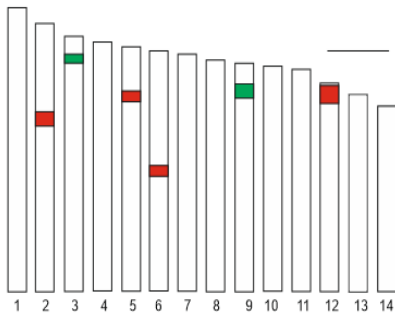
#### 4. 2. 3. 3. *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* (PI 372621)

FISH analizi sonrası PI 372621 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 37 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 38’de sunulmuştur.

Şekillerden de görüleceği üzere aksesyon 8 kırmızı ve 4 yeşil olmak üzere toplamda 12 sinyal varlığı göstermiştir. Bu aksesyon ABY-Bc 7279-0000U nolu aksesyon benzeri sinyal özellikleri göstermiştir. Bu aksesyonda da telomerik ve sentromerik 4 adet sinyal yoğunluk olarak ayırt edicidir. Bu aksesyona ait resimlerde de prob kirliliği gözlemlenmiştir. Ayrıca bazı resimlerde kromozomların görece uzun olması kırılmalarını kolaylaştırmıştır. Aksesyona ait 4 adet yeşil sinyal telomerik konumlu bulunmuştur. Diğer aksesyonlarda olduğu gibi çiftler arasında yoğunluk farkı görülmektedir. Sinyallerin lokasyonları ve yoğunlukları kromozomlar arasında değişkenlik göstermektedir.



Şekil 4. 37. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 372621 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm’dir).



Şekil 4 38. PI 372621 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* ssp. *lobata* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm’dir).

#### 4. 2. 3. 4. *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonlarının değerlendirilmesi

*Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA FISH sinyallerine ait sayı ve dağılımları, Çizelge 4. 4'de gösterilmiştir. Çizelgede, ABY-Bc 7279-0000U ve PI 372621 aksesyonların, 12 FISH sinyalini 8K+4Y şeklinde, PI 316209 aksesyonun ise 16 FISH sinyalini, 12K+4Y şeklinde taşıdığı görülmektedir. Bütün aksesyonların interkalar ve telomerik sinyal dağılımları, 2İK(K)+6T(4Y,2K), aynı bulunmuştur. Sinyal sayıları farklı olmasına rağmen bu dağılımın görelmesi, aksesyonların ortak veya benzer bir genetik gelişme sürecine sahip oldukları anlamına gelebilir. Sadece sentromerik kırmızı sinyaller arasında fark bulunmaktadır. Bu durumda sentromerik alanlar arasında kırmızı sinyal hareketi olabileceği söylenebilir. Aksesyonlara ait sinyaller az çok farklı yoğunluklarda ve farklı kromozomlar üzerinde bulunmaktadır. Bazı sinyallerin yoğunlukları ayırt edici bir ortak özellik olarak kullanılabilir. Bazı resimlerde fazla veya eksik sinyal olma ihtimali vardır. Kromozomların üst üste binmeleri, arka fon kirliliği ve kromozom morfolojilerinin ayırt edilememesi, sinyal sayı, yoğunluk ve lokasyonlarını belirlemeyi zorlaştırmıştır. Bu aksesyonlar için prob miktarları kalibre edilmeli ve kök örneklerinin, soğuk suda ve enzim karışımında tutulma süreleri artırılmalıdır. Bununla beraber takson içi genetik özelliklere bağlı, bazı sinyal farklılıkları olabileceği de hesaba katılmalıdır.

**Çizelge 4. 4.** *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayı, dağılım ve lokasyonları

Takson Adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı			Lokasyon			
		Toplam	5S	25S	5S+25S	S	İK	T
<i>lobata</i>	ABY-Bc 5645-2004U	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
	PI 316209	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)
	PI 372621	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)

S: Sentromerik alan, T: Telomerik alan, İK: İnterkalar alan, K: 25S rDNA, Y: 5SrDNA temsil etmektedir

Stewart ve Ellison 2011'in *Dactylis* derlemesinde, *Dactylis glomerata* subsp. *lobata* (Drejer) Lindb. F., diploid ve tetrapoliploid subsp. *aschersoniana*'nın sinonimi olarak tanımlanmıştır. Sinyal sayısı 12 olan *lobata* aksesyonlarının sinyal özellikleri, diğer 12 adet sinyal taşıyan tetrapoliploidlere (*hispanica*, *santai*, *aschersoniana*) benzemektedir. Sinyal sayısı 16 olan *lobata* aksesyonu direk diploidizasyon ile diploid *lobata*'dan kökenlenmiş

olabilir. Genomik in situ hibridizasyon ile diploid ve tetrapoliploid *lobata* arası ilişki olup olmadığı belirlenebilir.

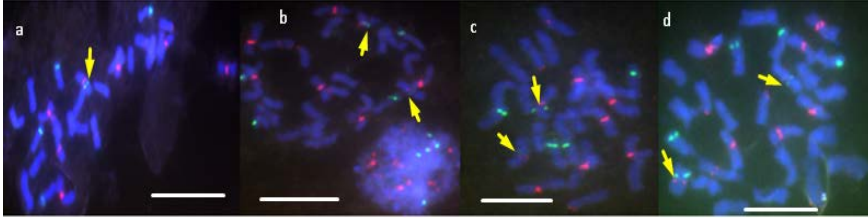
#### **4. 2. 4. *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonlarına ait bulgular**

Çalışmamızda Western Regional Plant Introduction Station (PI 237607) ve IPK (GR 8202\80, GR 1238\83, GR 7297\02) den temin edilmiş olan toplam 4 *Dactylis glomerata* L. subsp. *smithii* aksesyonu kullanılmış ve analiz sonuçları aşağıda ayrı ayrı sunulmuştur. Aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri 8.21 ile 8.46 pg arasında değişim göstermiştir (Tuna 2015).

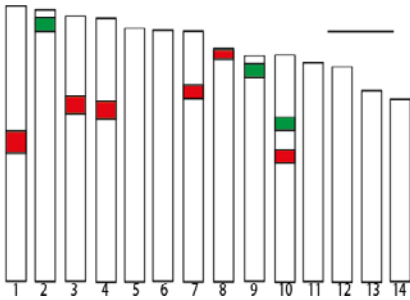
##### **4. 2. 4. 1. *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* (PI 237607)**

FISH analizi sonrası PI 237607 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 39 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 40'de gösterilmiştir.

*Dactylis glomerata* subsp. *smithii* (PI 237607) aksesyonuna ait resimler çok kalitelidir. Kromozomların dağılımı çok iyi ve kirlilik oldukça azdır. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. Bir çift kromozom her iki renkteki (K+Y) sinyalleri birlikte taşımaktadır. Aynı kromozom üzerinde sentromerik lokasyonda bitişik bulunan K+Y sinyalin eşi bazı resimlerde silik görünmektedir. Bazı resimlerde ise hiç görünmemektedir. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 6'sı 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Diğer taksonlarda olduğu gibi bu taksonda da bir çift kromozom dışında tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın bir konumda taşımaktadır. Farklı olan bir çift kromozom ise kırmızı sinyali telomer bölgesinde taşımaktadır. Bir çift kromozom üzerindeki yeşil sinyaller sentromer bölgesine nispeten daha yakın iken diğer iki çift kromozom üzerindeki yeşil sinyaller telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Sinyallerin yoğunlukları nispeten benzerlik göstermektedir.



**Şekil 4. 39.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 237607 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı renkli oklar K+Y olan kromozomları göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir.)

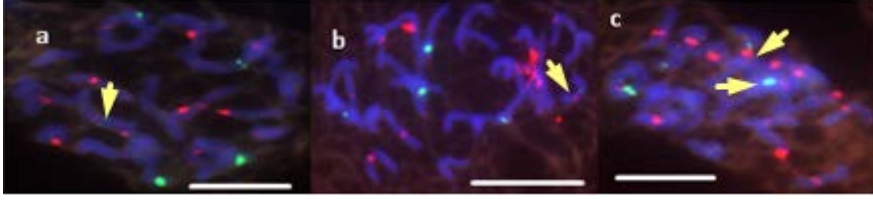


**Şekil 4. 40.** PI 237607 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* ssp. *smithii* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 10. kromozom her iki sinyali de taşımaktadır. Büyütme çizgisi 1µm'dir).

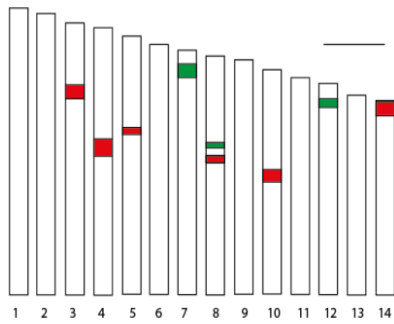
#### 4. 2. 4. 2. *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* (GR 8202\80)

FISH analizi sonrası GR 8202\80 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 41 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 42'de sunulmuştur.

Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. Bir çift kromozom her iki renkteki (K+Y) sinyalleri birlikte taşımaktadır. Sentromerik alanda gözlemlenen bu sinyal çifti bazı resimlerde görünmemektedir. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 6'sı 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Sinyal sayısı ve deseni bakımından önceki aksesyon ile benzerlik göstermektedir.



**Şekil 4. 41.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 8202\80 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı oklar çift sinyal (K+Y) sinyal taşıyan kromozomları göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).

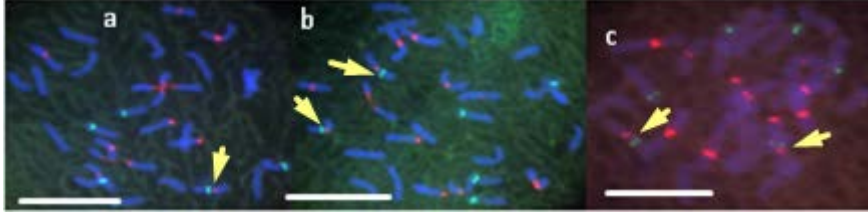


**Şekil 4. 42.** GR 8202\80 nolu tetraploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 8 nolu kromozom her iki sinyali de taşımaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

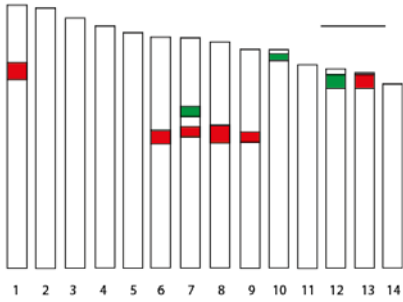
#### 4. 2. 4. 3. *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* (GR 1238\83)

FISH analizi sonrası GR 1238\83 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 43 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 44'de sunulmuştur.

Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. Bir çift kromozom her iki renkteki sinyalleri birlikte taşımaktadır. Burada yeşil sinyal komşu kırmızı sinyalden biraz daha yoğundur. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 6'sı 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Kırmızı sinyal sayısı bazı resimlerde, 2 fazla veya eksik sayılmıştır. Fakat resimlerin çoğunda 12 olarak sayılmıştır. Sinyal sayısı ve deseni bakımından önceki *smithii* aksesyonları ile benzerlik göstermektedir.



**Şekil 4. 43.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 1238\83 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı oklar çift sinyal taşıyan kromozomları göstermektedir. Bütün resimlerde büyütme çizgileri 10µm'dir).

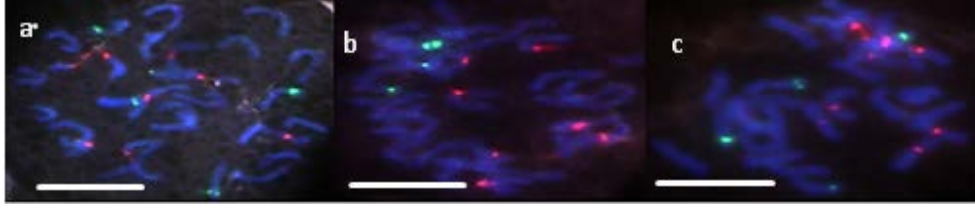


**Şekil 4. 44.** GR 1238\83 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* ssp. *smithii* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir.7. kromozom her iki sinyalide taşımaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

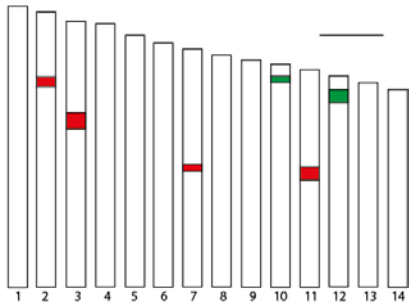
#### 4. 2. 4. 4. *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* (GR 7297\02)

FISH analizi sonrası GR 7297\02 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 45 ve onlara ait haploit ideogram Şekil 4. 46'de sunulmuştur.

*Dactylis glomerata* subsp. *smithii* GR 7297\02 aksesyonu, önceki 3 *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonundan daha az sayıda sinyal taşımaktadır. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 12 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 4'ü 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Bu aksesyonda tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın bir konumda taşımaktadır. Diğer aksesyonlarda gözlenen telomerik kırmızı sinyal bu aksesyonda gözlenmemiştir. Yeşil sinyaller diğer aksesyonlarda olduğu gibi telomere yakın konumda bulunmaktadır. Yeşil sinyallerin yoğunlukları farklılık göstermektedir.



**Şekil 4. 45.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 7297\02 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Bütün resimlerde büyütme çizgileri 10µm'dir).



**Şekil 4. 46.** GR 7297\02 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* ssp. *smithii* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 4. 5. *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonlarının değerlendirilmesi

*Dactylis glomerata* subsp. *smithii* taksonuna ait aksesyonlarda çok sayıda kromozom morfolojisi düzgün, kromozomları iyi dağılmış ve sitoplazma kalıntısı olmayan ya da çok az olan kaliteli preparat hazırlamak mümkün olmuştur. Bu nedenle preparatlar üzerinde FISH sinyalleri ve dağılımları daha hassas bir şekilde analiz edilebilmiştir. Bununla beraber bütün aksesyonlarda bazı sinyalleri belirlemek zor olmuştur.

Sinyal sayılarındaki değişiklikler genotip ile ilgili olabileceği gibi kullanılan prob miktarının az olmasından veya hibridizasyon şartlarının uygun olmamasından kaynaklanabilir. Bir grup preparata aynı işlemler uygulandığı zaman, bir resimde görülen durum diğer resimlerin hepsinde görünmektedir.

Çizelge 4. 5’de *D. g. smithii* (PI 237607, GR 8202/80, GR 1238/83) aksesyonlarında toplamda 18 FISH sinyalinin, (12K+6Y), şeklinde bir dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu 3 aksesyon benzer şekilde 18 sinyal taşıyan *Dactylis* ve bazı *hispanica* aksesyonları ile benzer sinyal özellikleri göstermektedir. GR 7297/02 aksesyonunda ise toplamda 12 sinyal, (8K+4Y), şeklinde dağılım göstermiştir. Bu sinyal dağılımı ile aksesyon daha çok, 12 sinyal taşıyan *marina* genomlarına benzer sinyal özellikleri göstermiştir.

FISH bulgularına göre, 5S ve 25S rDNA bölgelerinin kromozomların sentromerik alanlarında değişim içinde oldukları, sinyal kopya sayılarının değişiminde, bu bölgelerin daha aktif oldukları görülmüştür. Toplam sinyal ve yeşil sinyal sayı fazlalığı, bu taksonun kökeninde birden fazla diploidin olabileceğini göstermektedir. Sinyal özellikleri dikkate alındığında, *smithii* aksesyonlarının genom gelişiminde, poliploidizasyon, hibridizasyon ve genom içi değişimlerin hepsinin birden etkisinden bahsedilebilir.

**Çizelge 4. 5.** *Dactylis glomerata* subsp. *smithii* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayı, dağılım ve lokasyonları

Takson Adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı				Lokasyon		
		Toplam	5S	25S	5S+25S	S	İK	T
<i>smithii</i>	PI 237607*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	GR 8202/80*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	GR 1238/83*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	GR 7297\02	12	8	4	-	6K	2K	4 Y

S: Sentromerik, T: Telomerik, İK: İnterkalar, K: 25S rDNA, Y: 5SrDNA temsil etmektedir. \*Aynı kromozom üzerinde 5S ve 25S rDNA bölgesi

*D. glomerata* subsp. *smithii* Atlas Okyanusu adaları (Kanarya Adaları gibi) kıyılarında yetişen, endemik diploid ve tetrapoliploid sitotipler içermektedir. Morfolojik özellikler bakımından *marina* benzeri özellikler (Papılalı yaprak, çoklu nod) göstermektedir (Stebbins ve Zohary 1959, Benson ve Borrill 1969). Yine morfolojik ve flavonoid içeriği bakımından diğer diploidlerden farklı bulunmuştur (Ardouin ve ark. 1985). İzoenzim özelliklerine göre diploid *smithii*, diploid *mairei*, *santai*, *castellata* alt türleri ile aynı grupta yer almaktadır (Lumaret 1988). Kanarya Adaları’ndan toplanan diploid *smithii* çekirdek ITS sekans çalışmaları, bu taksonun Kuzey Afrika kökenli *castellata*, *mairei*, *santai* alt türleri ile aynı



grupta olduğunu göstermiştir. Ancak bu sekans bakımından bazı mutasyonlar gösteren subsp *smithii*'nin aynı zamanda İber Yarım Adası kaynaklı *izcoi*, *lusitanica* ve *metlesicsii*'de küçük benzerlikler gösterdiği bildirilmiştir (Stewart ve ark. 2013). Bu farklılıklar dikkate alındığında, subsp. *smithii* genomunun rDNA FISH sinyal özellikleri bakımından farklılıklar göstermesi anlamlı görünmektedir. Ancak çalışmamızda *smithii* aksesyonlarının daha çok tetrapoliploid *glomerata* ve *hispanica* özellikleri taşıdığı söylenebilir.

#### **4. 2. 5. *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyonlarına ait bulgular**

Çalışmamızda, Western Regional Plant Introduction Station'dan temin edilmiş olan 2 *Dactylis glomerata* L. subsp. *santai* aksesyonu (PI 237606 ve PI 237605) kullanılmış ve analiz sonuçları aşağıda ayrı ayrı sunulmuştur. Aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri sırasıyla 8.36 ile 8.46 pg olarak ölçülmüştür (Tuna 2015).

PI 237606 numaralı aksesyonu temsilen analiz edilen farklı bitkilere ait sonuçlar incelendiğinde, iki farklı sinyal deseni gözlenmiştir. Bu nedenle bu aksesyona ait sonuçlar (a) ve (b) şeklinde iki kısımda sunulmuştur.

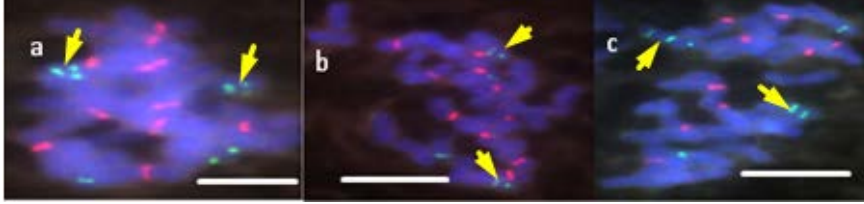
##### **4. 2. 5. 1. *Dactylis glomerata* subsp. *santai* (PI 237606)**

FISH analizi sonrası PI 237606 nolu aksesyona ait bazı bitkilerin (a) mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 47 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 48'de gösterilmiştir.

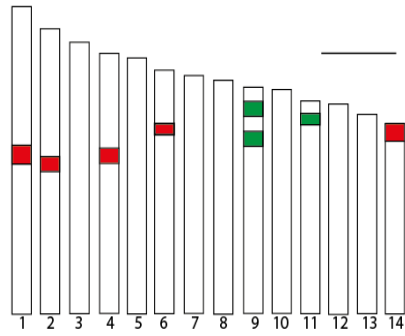
Şekillerden de görüleceği üzere bu grup içerisinde yer alan bitkilerin 12 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 4'ü 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Diğer taksonlarda olduğu gibi bu taksonda da bir çift kromozom dışında tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın bir konumda taşımaktadır. Farklı olan bir çift kromozom ise kırmızı sinyali telomer bölgesinde taşımaktadır. Sinyallerin yoğunlukları bir birine benzerdir. İki çift kromozom üzerindeki yeşil sinyaller telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Yeşil sinyallerin yoğunlukları farklılık göstermektedir.



sentromere daha yakın konumda ikinci bir yeşil sinyal daha taşımaktadır. Yeşil sinyallerin yoğunlukları farklılık göstermektedir. Böyle bir durumun oluşması için farklı poliploidiler arası eşleşme ve poliploidizasyon olmalıdır.



**Şekil 4. 49.** (b) Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 237606 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı oklar aynı kromozom üzerinde bitişik lokasyonlu yeşil sinyalleri göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



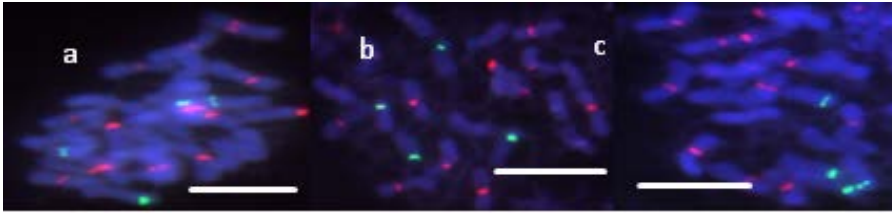
**Şekil 4. 50.** (b) PI 237606 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 9. kromozom üzerinde bitişik lokasyonlu yeşil sinyal çifti bulunmaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 5. 2. *Dactylis glomerata* subsp. *santai* (PI 237605)

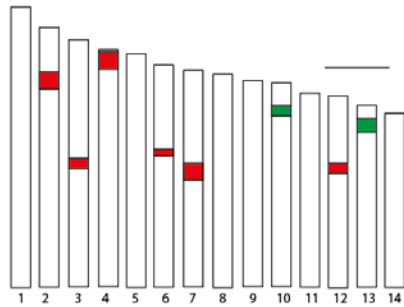
FISH analizi sonrası PI 237605 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 51 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 52'de sunulmuştur.

Şekillerden görüleceği üzere aksesyonun 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve diğer 4'ü 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Diğer taksonlarda olduğu gibi bu taksonda da bir çift kromozom dışında tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer

bölgelerine daha yakın bir konumda taşımaktadır. Bir çift kromozom üzerindeki kırmızı sinyal diğerlerine nazaran sentromere daha uzak bir konumda bulunmaktadır. Farklı olan bir çift kromozom ise kırmızı sinyali telomer bölgesinde taşımaktadır. Yeşil sinyal taşıyan her iki kromozom üzerindeki sinyaller telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Bu aksesyonun kromozomları üzerindeki sinyaller (her iki renk) yoğunluk bakımından bariz farklılık göstermektedir.



**Şekil 4. 51.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 237605 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Bütün resimlerde büyütme çizgileri 10µm'dir).



**Şekil 4. 52.** PI 237605 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 5. 3. *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyonlarının değerlendirilmesi

FISH analizi yapılan iki *santai* aksesyonu, *Dactylis* cinsinin rDNA değişimi ve filogenetik ilişkilerinin anlaşılması açısından farklı bilgiler sağlamıştır. *Santai* PI 237605 numaralı aksesyon toplamda 16 sinyal taşımakta olup, kırmızı ve yeşil sinyallerin sayıları ve lokasyonlara dağılımları, PI 237606 numaralı aksesyondan farklılıklar göstermiştir. *Santai* PI 237606 numaralı aksesyona ait bitkiler farklı sinyal sayıları göstermiştir. Resimlerin bir

kısmında (a) 8 kırmızı ve 4 yeşil sinyal, bir kısmında (b) ise 10 kırmızı ve 6 yeşil sinyal sayılmıştır (Çizelge 4. 6). Burda önemli olan interkalar yeşillerin (sentromerden uzak) telomerik yeşiller ile aynı kromozomlar üzerine yerleşmiş olmalarıdır.

Çoğunlukla toplam sinyal sayısı 17 veya 18 olan aksesyonlarda, sentromerik alanda yeşil sinyaller (1 veya 2 çift) ile kırmızı sinyaller aynı kromozom üzerinde belirlenmişlerdir. Bütün tetrapoliploid *Dactylis* aksesyonlarında 4 adet telomerik konumlu yeşil sinyal benzer özellikler sergilemektedir. Yeşil sinyallerde görülen bu 2 farklı durum, tetrapoliploidlerin en az iki farklı diploid atadan kökenlendiğine veya kendi triploidleri ile eşleştiğine delil olarak sunulabilir. Diploid aksesyonlarda da farklı lokasyonlu yeşil sinyaller belirlenmiştir. Bu yeşil sinyaller farklı diploidlerin hibridizasyonu ve takiben poliploidizasyonu sonucu tetrapoliploid bitkilere geçmiştir. Bu geçiş diploidlerden tetrapoliploidlere aynı lokasyonlar aracılığıyla gerçekleşmiş-olabilir.

Benzer bir yaklaşım kırmızı sinyal sayı artışı ve lokasyon değişimi içinde söylenebilir. *Santai* PI 237606 (b) aksesyonunun toplam sinyal sayısının 18 olması gerektiğini düşünürsek kırmızı sinyal sayısının artması gerekmektedir. Bu sinyaller muhtemelen genom içi kromozomal değişimler veya bilmediğimiz farklı hibridizasyon mekanizmaları ile çoğalabilir. Yine yeşil sinyallerin kırmızı sinyaller ile yakın lokasyonlara yerleşmesi gerektiği göz önünde bulundurulursa, her iki sinyal türünün aktarımı veya genom içinde yer değiştirmelerinin, en azından bazı aksesyonlar için, her zaman aynı kromozomlar ile ilişkili olabileceği düşünülebilir.

**Çizelge 4. 6.** *Dactylis glomerata* subsp. *santai* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayı, dağılım ve lokasyonları

Takson Adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı				Lokasyon		
		Toplam	5S	25S	5S+25S	S	İK	T
<i>santai</i>	PI 237606 (a)	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
	PI 237606 (b) <sup>ψ</sup>	16	10	6	-	6K	4(2K,2Y)	6(2K,4Y)
	PI 237605	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)

S: Sentromerik, T: Telomerik, İK: İnterkalar, K: 25S rDNA, Y:5SrDNA temsil etmektedir. <sup>ψ</sup>Aynı kromozom üzerinde çift 5S rDNA bölgesi

İki adet tetrapoliploid *santai* aksesyonuna ait rDNA sayı ve dağılımları büyük farklılıklar göstermiştir. Bu durum taksonlara ait aksesyonların karışık popülasyonlardan oluştuklarına veya *Dactylis* cinsine ait aksesyonlar içinde de rDNA sayı, konum ve yoğunluk farklılıkları olabileceğine işaret etmektedir.

*Dactylis* cinsi ile ilgili farklı çalışmalarda, popülasyonların karışık olduğu veya çalışılan konu bakımından popülasyon içi varyasyon gösterdikleri belirtilmiştir (Ardouin ve ark. 1985, Lumaret 1988, Büyükbaşaran 2010). *Santai* aksesyonları daha çok Akdeniz iklim özellikleri gösteren alanlarda (Fas, Cezayir) yetişmektedir. Benzer iklim gösteren alanlarda diploit *mairei*, *lusitanica* ve tetrapoliploid *hispanica* ve *marina* varlıklarından da bahs edilmiştir. Aynı şekilde diploid ve tetrapoliploid sitotiplerin aynı alanlarda etkileşim içinde oldukları belirlenmiştir (Stebbins ve Zohary, 1959, Borrill ve Lindner 1971, Amirouche ve Misset 2007).

*Santai* PI 237605 aksesyonu diploit *santai* bitkilerinden otopoliploidizasyon sonucunda meydana gelmiş-olabilir. *Santai* PI 237606 numaralı aksesyon ise farklı diploitlerin hibridizasyonu, farklılığa uğramış diploit *mairei* benzeri bir genomun katlanması veya kendi triploidi ile tetrapoliploidinin eşleşmesi sonucu meydana gelmiş-olabilir

#### **4. 2. 6. *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* aksesyonlarına ait bulgular**

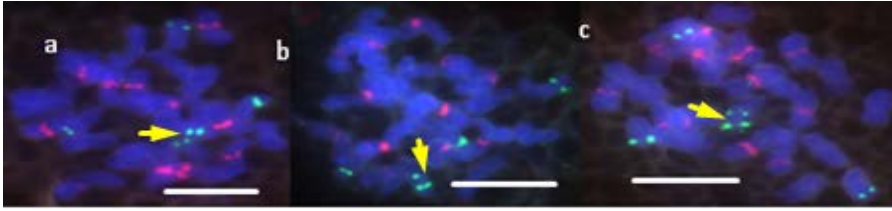
Çalışmamızda, Western Regional Plant Introduction Station (PI 283243 ) ve IPK (GR 1241\94) den temin edilmiş olan toplam 2 *Dactylis glomerata* L. subsp. *woronowii* aksesyonu kullanılmış ve analiz sonuçları aşağıda ayrı ayrı sunulmuştur. PI 283243 nolu aksesyon Rusya orijinli iken GR 1241\94 nolu aksesyonun orijini belirsizdir. Aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri sırasıyla 8.20 ile 8. 98 pg olarak ölçülmüştür (Tuna 2015).

##### **4. 2. 6. 1. *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* (PI 283243)**

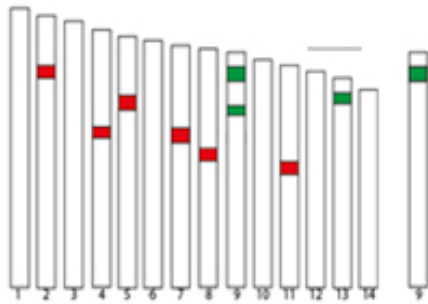
FISH analizi sonrası PI 283243 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 53 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 54'de sunulmuştur.

Aksesyon diğer tetrapoliploid örneklerden farklı sinyal özellikleri göstermiştir. Şekillerden görüleceği üzere, aksesyonun kromozomları üzerinde 12 adet kırmızı ve 5 adet yeşil sinyal sayılmıştır. Diğer taksonlardan farklı olarak bu taksonda tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda

taşımaktadır (bazıları interkalar bölgelerde bulunabilir). Diğer tüm taksonlarda bulunan telomerik kırmızı sinyal taşıyan kromozom çifti *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* taksonuna ait bu aksesyonda görülmemektedir. Yeşil sinyal taşıyan kromozomlar üzerindeki sinyaller telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir. Aynı kromozomun (9. kromozom) interkalar ve telomerik bölgelerinde komşu yeşil sinyal çifti bulunmaktadır. Resimlerde yakın lokasyonlarda gözlemlenen bu sinyallerden, telomerik olan sinyalin yoğunluğu, diğerinden fazladır.



**Şekil 4. 53.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 283243 nolu tetraploid *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı oklar aynı kromozom üzerinde çift yeşil sinyalleri göstermektedir. Bütün resimlerde büyütme çizgileri 10µm'dir).

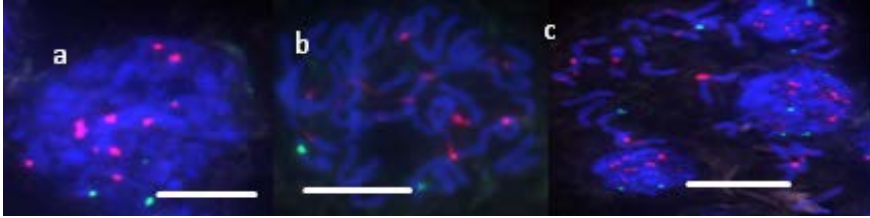


**Şekil 4. 54.** PI 283243 nolu tetraploid *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 9. kromozomun homoloğunda sentromere daha yakın olan ikinci yeşil sinyal bulunmamaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

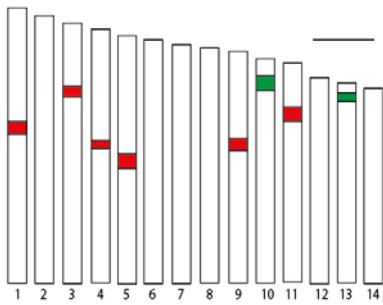
#### 4. 2. 6. 2. *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* (GR 1241\94)

FISH analizi sonrası GR 1241\94 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 55 ve onlara ait haploit ideogram Şekil 4. 56'de sunulmuştur.

Bu aksesyonun kromozomları üzerinde, şekillerden de görüleceği üzere, 16 mitotik kromozom FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Diğer *Dactylis glomerata subsp. woronowii* aksesyonunda olduğu gibi bu aksesyonda da tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Diğer tüm taksonlarda bulunan telomerik kırmızı sinyal taşıyan kromozom çifti *Dactylis glomerata subsp. woronowii* taksonunun bu aksesyonunda da görülmemektedir. Yeşil sinyal taşıyan kromozomlar üzerindeki sinyaller telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir.



**Şekil 4. 55.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GR 1241\94 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata subsp. woronowii* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



**Şekil 4. 56.** GR 1241\94 nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata subsp. woronowii* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).



#### 4. 2. 6. 3. *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* aksesyonlarının değerlendirilmesi

Çizelge 4. 7 incelendiği zaman, 2 aksesyona ait sinyal sayısı ve dağılımlarında benzer özelliklerin yanı sıra karakteristik farklılıklar da görülmektedir. Aksesyonlarda toplam sinyal sayıları farklı olsada, genel olarak sinyallerin lokasyon görüntüleri benzerlik göstermektedir. Ancak PI 283243 numaralı aksesyonda yeşil sinyal (5S rDNA) sayısının 5 olması farklılık oluşturmaktadır. Bu şekilde bir sinyal sayısı, bu tetrapoliploid bitkilerin triploidlerinin farklı diploidler ile eşleşmesi sonucu gerçekleşmiş olabilir. Bu durumda bu taksonun oluşmasında otopoliploidizasyon sonrası hibridizasyon gerçekleşmiş gibi görünmektedir.

**Çizelge 4. 7.** *Dactylis glomerata* subsp. *woronowii* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları

Takson Adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı				Lokasyon		
		Toplam	5S	25S	5S+25S	S	İK	T
<i>woronowii</i>	PI 283243*	17	12	5	-	8K	5(4K,1Y)	4Y
	GR 1241/94	16	12	4	-	8K	4K	4Y

S: Sentromerik, T: Telomerik, İK: İnterkalar, K: 5S rDNA, Y: 25SrDNA temsil etmektedir. \* Aynı kromozom üzerinde çift 25S rDNA bölgesi bulunmaktadır

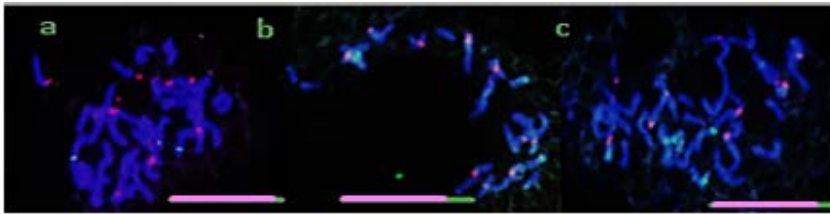
*Dactylis glomerata* subsp. *woronowii*'ye ait diploid ve tetrapoliploid sitotipler yakın habitatlarda belirlenmiştir (Stebbins ve Zohary 1959, Doroszewska 1963). Diploid *woronowii* taksonu, en eski *Dactylis* üyelerinden kabul edilmektedir (Mizianty 1990). Diploid ve tetrapoliploid *woronowii* DNA hacimleri arasında iki kat kadar fark bulunmuştur (Büyükbaşar 2010, Tuna 20015). Yine tetrapoliploid aksesyonların DNA hacimleri arasında 1 pg'a yakın fark bulunmuştur (Tuna 2015). Flowsitometri sonuçlarında *woronowii* genomunun istikrarlı olmadığını göstermektedir. Bu durum cinsin geniş anlamda bir intraspesifik üreme durumu sergilediğini ve en azından bazı tetrapoliploidler için segmental otopoliploidizasyonun daha geçerli olduğunu göstermektedir.

#### 4. 2. 7. *Dactylis glomerata* L. subsp. *aschersoniana* (ABY-Bc 6223-1971U) aksesyonuna ait bulgular

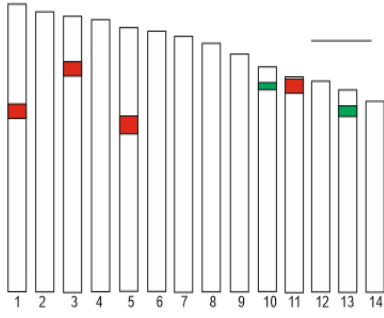
Çalışmamızda, IBER'den temin edilmiş olan tek bir *Dactylis glomerata* L. subsp. *aschersoniana* aksesyonu (ABY-Bc 6223-1971U) kullanılmış ve analiz sonuçları aşağıda sunulmuştur. Aksesyonun ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 8.18 pg ölçülmüştür (Tuna 2015).

FISH analizi sonrası ABY-Bc 6223-1971U nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 57 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 58'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 12 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

*Dactylis* taksonlarının çoğunda olduğu gibi bu aksesyonda da bir çift kromozom hariç kalan tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Bir çift kromozom ise *Dactylis* taksonlarının çoğunda olduğu gibi telomerik kırmızı sinyale sahiptir. Yeşil sinyal taşıyan kromozomlar üzerindeki sinyaller diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir.



Şekil 4. 57. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 6223-1971U nolu tetrapoliploid *Dactylis glomerata* subsp. *aschersoniana* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



**Şekil 4. 58.** ABY-Bc 6223-1971U tetraploid *Dactylis glomerata* subsp. *aschersoniana* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

Taksonomi sitesi The Plant List'te *Dactylis glomerata* subsp. *aschersoniana* (Graebn.) Thell, subsp. *lobata* (Drejer) Lindb. F. ve *Dactylis polygama* Horv., adlandırmaları sinonim olarak kullanılmıştır ([www.theplantlist.org/1/](http://www.theplantlist.org/1/)). Bu durumda çalışmada yer alan, diploid subsp. *lobata* (PI 283242), tetrapoliploid *lobata* (ABY-Bc 5645-2004U, PI 372621) ve tetrapoliploid *aschersoniana* (ABY-Bc 6223-1971U) aksesyonları arasında bir karşılaştırma yapabiliriz (Çizelge 4. 8). *Aschersoniana* (ABY-Bc 6223-1971U) aksesyonu ile tetrapoliploid *lobata* (ABY-Bc 5645-2004U, PI 372621) aksesyonlarının sinyal sayısı ve dağılımları oldukça benzer bulunmuştur. Sinyallerin yoğunlukları da benzer görüntüler vermiştir. Yalnız, Çizelge 4. 8 'de görüldüğü gibi tetrapoliploid *lobata* ve tetrapoliploid *aschersoniana* aksesyonlarının direkt diploid *lobata* aksesyonundan oluşmadıkları görülmektedir. Ancak bu durum için daha çok örnek ile karşılaştırma yapmak gerekmektedir.

**Çizelge 4. 8.** Diploid *lobata* (PI 283242) ile tetrapoliploid *lobata* (ABY-Bc 5645-2004U, PI 372621) ve *aschersoniana* (ABY-Bc 6223-1971U) aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları

Takson adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı			Lokasyon			
		Toplam	25S	5S	5S+25S	S	İK	T
<i>lobata</i> (2n)	PI 283242	8	6	2	-	4K	2K	2Y
<i>lobata</i> (4n)	ABY-Bc 5645-2004U	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
	PI 372621	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
<i>aschersoniana</i> (4n)	ABY-Bc 6223-1971U	12	8	4		4K	2K	6(2K,4Y)

S: Sentromerik, T: Telomerik, İK: İnterkalar, K: 5S rDNA, Y: 25SrDNA temsil etmektedir.

Flow sitometri sonuçlarına göre tetrapoliploid *lobata* (8,41 pg) ve *aschersoniana* (8.18 pg) genom hacimleri birbirlerine çok yakındır (Tuna 2015). Benzer şekilde sinyal özellikleri de birbirine çok benzemektedir. Yanısıra tetrapoliploid *lobata*'ların DNA hacim ortalamaları diploid *lobata*'nın (4,94 pg) yaklaşık 1,7 katı kadar çıkmaktadır (Tuna 2015). Yani tam 2 katı kadar çıkmamaktadır. Bu durumda tetrapoliploid *lobata* diploid *lobata*'nın poliploidisi olmayabilir. Bununla beraber otopoliloidizasyon benzeri bir olay var ise tetrapoliploid genomlarda bazı indirgenmeler olduğu söylenebilir. Bu indirgenmelerin başka genom yapıları ile beraber rDNA kopya sayılarında da meydana gelmesi muhtemeldir. Aynı zamanda 12 sinyal taşıyan tetrapoliploid *Dactylis*'ler, sinyal sayısı 6 olan bir diploidten kökenlenmiş olabilirler. Ya da diploid *lobata*'dan indirgenmemiş bir gamet ile normal bir *santai* genomunun birleşmesi sonucu da oluşabilirler.

#### 4. 2. 8. *Dactylis marina* aksesyonlarına ait bulgular

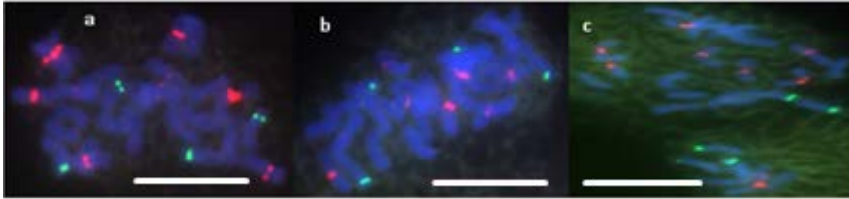
Çalışmamızda *Dactylis marina* taksonuna ait toplam 9 aksesyon incelenmiştir. Bu aksesyonlardan ABY-Bc 7213-0000U numaralı olanı IBER gen bankasından temin edilmiştir. Aksesyonun menşei belirsizdir. Diğer 8 aksesyon (PI 477989, PI 346970, PI 346969, PI 346968, PI 346967, PI 237604, PI 577066 ve PI 577065) ise Western Regional Plant Introduction Station gen bankasından temin edilmiştir. Bu aksesyonlardan PI 477989 numaralı olanı Fransa kökenli, diğer tüm aksesyonlar ise Portekiz kökenlidir. Aksesyonların

ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri 8.27 ile 8.69 pg arasında değişim göstermektedir (Tuna 2015). Aksesyonlara ait FISH analiz sonuçları aşağıda ayrı ayrı sunulmuştur.

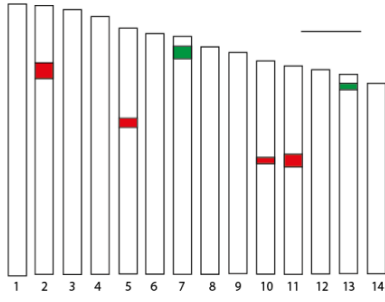
#### 4.2.8.1. *Dactylis marina* Borrill (ABY-Bc 7213-0000U)

FISH analizi sonrası ABY-Bc 7213-0000U nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4.59 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4.60'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 12 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Aksesyona ait bitkilerin mitotik kromozomları, kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın bulundurmakta, ancak kırmızı sinyallerin sentromere uzaklıkları çeşitlilik göstermektedir. Diğer taksonların çoğunda gözlenen telomerik kırmızı sinyal bu aksesyona ait bitkilerde bulunmamaktadır. Yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir.



**Şekil 4. 59.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası ABY-Bc 7213-0000U nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).

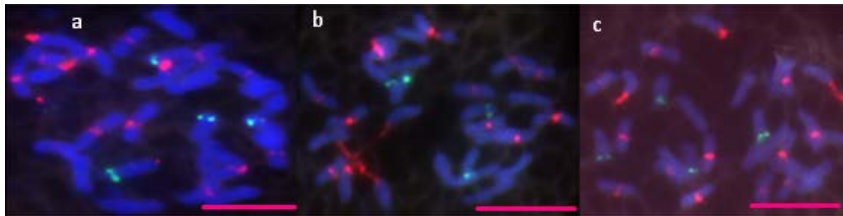


**Şekil 4. 60.** ABY-Bc 7213-0000U tetraploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

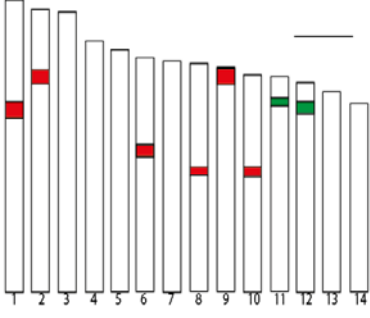
#### 4. 2. 8. 2. *Dactylis marina* (PI 477989)

FISH analizi sonrası PI 477989 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 61 ve onlara ait haploit ideogram Şekil 4. 62'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

*Dactylis* taksonlarının çoğunda olduğu gibi bu aksesyonda da bir çift kromozom hariç tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Bir çift kromozom ise *Dactylis* taksonlarının çoğunda olduğu gibi telomerik kırmızı sinyale sahiptir. Yeşil sinyal taşıyan kromozomlar üzerindeki sinyaller diğer *Dactylis* taksonların çoğunda olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir.



**Şekil 4. 61.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 477989 nolu tetraploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



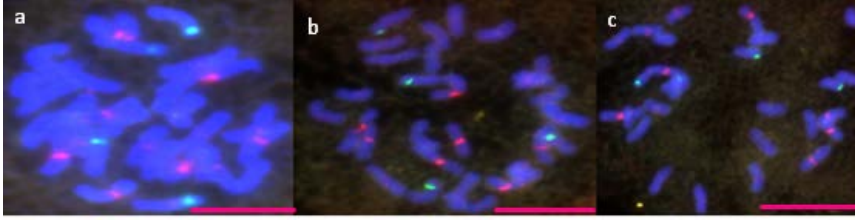
**Şekil 4. 62.** PI 477989 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1  $\mu$ m'dir).

#### 4. 2. 8. 3. *Dactylis marina* (PI 346970)

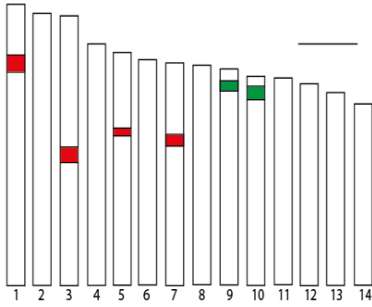
FISH analizi sonrası PI 346970 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 63 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 64'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 12 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Aksesyona ait bitkilerin mitotik kromozomları kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Diğer taksonların çoğunda gözlenen telomerik kırmızı sinyal bu aksesyona ait bitkilerde bulunmamaktadır. Yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir.

PI 346970 nolu aksesyon sinyallerin sayısı ve deseni bakımından ABY-Bc 7213-0000U nolu aksesyon ile büyük bir benzerlik göstermektedir. Zayıf sinyallerden dolayı bazı resimlerde kırmızı sinyalleri belirlemek zor olmuştur. Bu durum, kırmızı prob miktarı ile ilgili olabileceği gibi, genoma özgü bir durumda olabilir. Bazı rDNA yapılarının, kopya sayıları daha az olduğundan ışımaları daha küçük olabilmektedir. Yeşil sinyal çiftleri arasında yarıya yakın bir yoğunluk farkı bu aksesyonda da görülmektedir.



**Şekil 4. 63.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası 346970 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir.



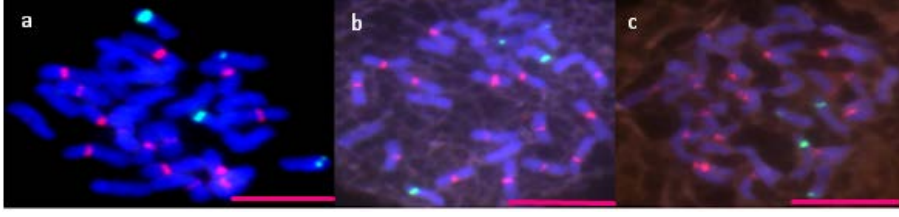
**Şekil 4. 64.** PI 346970 nolu tetraploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 8. 4. *Dactylis marina* (PI 346969)

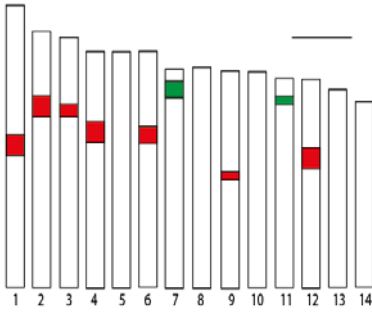
FISH analizi sonrası PI 346969 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 65 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 66'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 18 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 14 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Aksesyon, çalışmamızda incelenen tüm aksesyonlar arasında en yüksek kırmızı sinyal sayısına sahiptir.

Aksesyona ait bitkilerin mitotik kromozomları, kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Diğer taksonların çoğunda gözlenen telomerik kırmızı sinyal bu aksesyona ait bitkilerde bulunmamaktadır. Kırmızı sinyallerden 4 tanesi zayıf ışımaya yapmıştır. Yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* aksesyonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir.





**Şekil 4. 65.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 346969 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



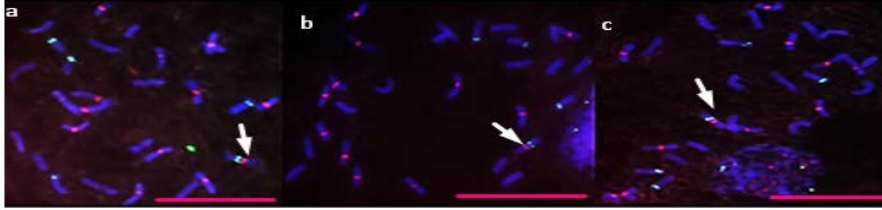
**Şekil 4. 66.** PI 346969 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 8. 5. *Dactylis marina* (PI 346968)

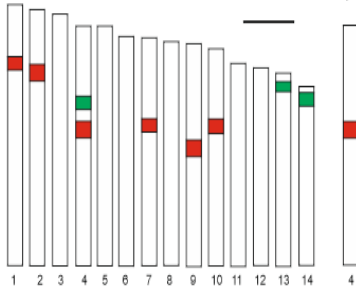
FISH sonrası PI 346968 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 67 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 68'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere bu aksesyona ait bitkilerin kromozom morfolojileri düzgün ve metafaz plağına iyi dağılmışlardır. Preparatlarda sitoplazmik kalıntı ve kirlilikte bulunmadığından aksesyona ait sinyal sayısı ve desenleri çok rahat belirlenmiştir. Aksesyonun 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. Büyük boya sahip kromozomlardan biri aynı kolu üzerinde hem kırmızı hemde yeşil sinyali birlikte taşımaktadır. Ancak bu kromozomun homologunda yeşil sinyal bulunmamaktadır. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 5 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Aksesyona ait bitkilerin mitotik kromozomları kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Diğer taksonların çoğunda gözlenen telomerik kırmızı sinyal bu aksesyona ait bitkilerde de bulunmamaktadır. Bir tanesi

hariç yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Farklı lokasyonda bulunan bu yeşil sinyal ise sentromere daha yakın bir bölgede bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir.



**Şekil 4. 67.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 346968 nolu tetraploid *Dactylis marina* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Beyaz oklar, sentromerik lokasyonlu 5S+25S rDNA taşıyan kromozomları göstermektedir. Bütün resimlerde büyütme çizgileri 10µm'dir).



**Şekil 4. 68.** PI 346968 nolu tetraploid *Dactylis marina* aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 4. kromozom üzerinde sentromerik 5S+25S rDNA bölgesi mevcuttur, homologunda 5S rDNA sinyali yoktur. Büyütme çizgisi 1 µm'dir)

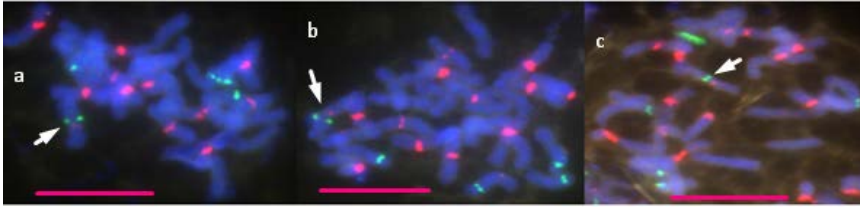
#### 4. 2. 8. 6. *Dactylis marina* (PI 346967)

FISH anlyzi sonrası PI 346967 nolu aksesyona ait mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 69 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 70'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyona ait 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. Büyük boya sahip kromozomlardan biri aynı kolu üzerinde hem kırmızı hemde yeşil sinyali birlikte taşımaktadır. Ancak bu kromozomun homologunda yeşil sinyal bulunmamaktadır. Yeşil sinyal kırmızı sinyalden biraz daha yoğun ışımaya yapmıştır. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S

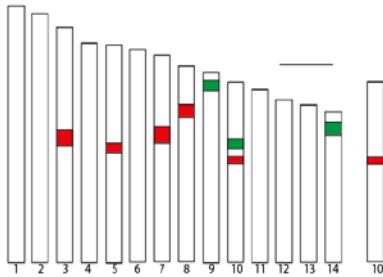
rDNA (kırmızı) ve 5 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Aksesyona ait bitkilerin mitotik kromozomları kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Diğer taksonların çoğunda gözlenen telomerik kırmızı sinyal bu aksesyona ait bitkilerde de bulunmamaktadır. Bir tanesi hariç yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Farklı lokasyonda bulunan bu yeşil sinyal ise sentromere daha yakın bir bölgede bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir.

Bu sinyal özellikleri ile aksesyon yukarıdaki PI 346968 aksesyonuna genetik olarak çok benzemektedir.



**Şekil 4. 69.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 346967 nolu tetraploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Beyaz oklar, aynı lokasyonlu 5S+25S rDNA taşıyan kromozomları göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



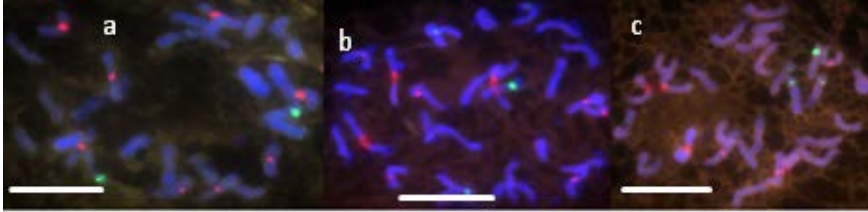
**Şekil 4. 70.** PI 346967 nolu tetraploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait haploit ideogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 10. kromozom üzerinde sentromerik 5S+25S rDNA bölgesi mevcuttur, homologunda 5S rDNA sinyali bulunmamaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 8. 7. *Dactylis marina* (PI 237604)

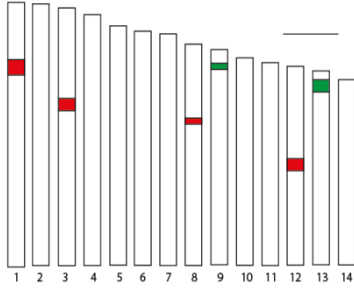
FISH analizi sonrası PI 237604 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 71 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 72’de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 12 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Aksesyona ait bitkilerin mitotik kromozomları kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Diğer taksonların çoğunda gözlenen telomerik kırmızı sinyal bu *marina* aksesyona ait bitkilerde de bulunmamaktadır. Kırmızı sinyallerin 4’ü görece kuvvetli, 4’ü zayıf ışımaya yapmıştır. Yeşil sinyallerden ikisi diğer ikisine oranla oldukça kuvvetli ışımaya yapmıştır Yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır (Şekil 4. 71 ve 4. 72).

PI 237604 nolu aksesyon sinyallerin sayı ve deseni bakımından ABY-Bc 7213-0000U ve PI 346970 nolu aksesyon sinyal özellikleri ile büyük bir benzerlik göstermektedir.



**Şekil 4 71.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 237604 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm’dir).



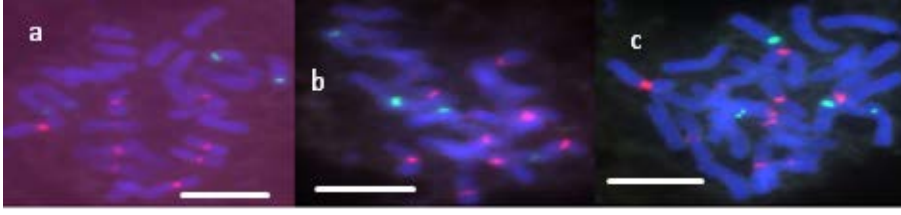
**Şekil 4. 72.** PI 237604 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 8. 8. *Dactylis marina* (PI 577066)

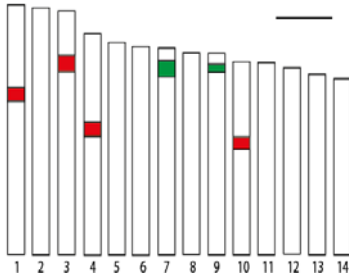
FISH analizi sonrası PI 577066 nolu aksesyona ait mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 73 ve onlara ait haploit ideogram Şekil 4. 74'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyona ait 12 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Aksesyona ait bitkilerin mitotik kromozomları kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Diğer taksonların çoğunda gözlenen telomerik kırmızı sinyal birçok *marina* aksesyonda olduğu gibi bu aksesyona ait bitkilerde de bulunmamaktadır. Yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir. Kırmızı sinyallerin 4'ü yoğunluk olarak, diğer kırmızı sinyallerden biraz fazladır. Genellikle 2 kırmızı sinyal diğerlerine göre daha küçük yoğunluktadır. Yeşil sinyallerin 4'ü de telomerik olup, 2'si yoğunluk olarak, diğer ikisinden ayrılmaktadır (Şekil 4. 73 ve 4. 74).

PI 577066 nolu aksesyona ait sinyallerin sayısı ve deseni bakımından ABY-Bc 7213-0000U, PI 346970 ve PI 237604 nolu aksesyona ait sinyaller ile büyük bir benzerlik göstermektedir.



**Şekil 4. 73.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 577066 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



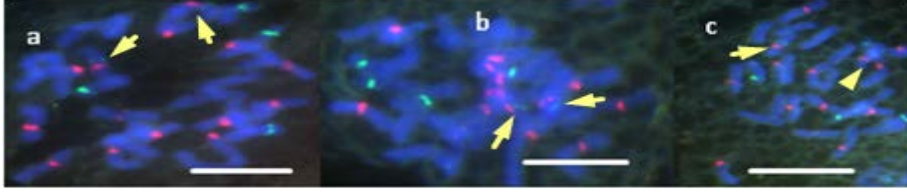
**Şekil 4. 74.** PI 577066 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 8. 9. *Dactylis marina* (PI 577065)

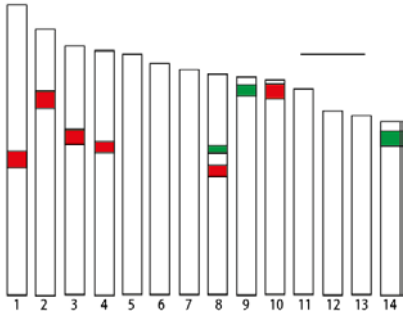
FISH analizi sonrası PI 577065 nolu aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 75 ve onlara ait haploit ideogram Şekil 4. 76'de sunulmuştur. Şekillerden aksesyonun 16 mitotik kromozomunun FISH sinyali taşıdığı görülmektedir. Orta boya sahip kromozomlardan bir çifti aynı kolu üzerinde hem kırmızı hemde yeşil sinyali birlikte taşımaktadır. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 6 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Diğer taksonların çoğunluğunda olduğu gibi bu taksonda da bir çift kromozom dışında tüm kromozomlar kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın bir konumda taşımaktadır. Bir çift kromozom üzerindeki kırmızı sinyal diğerlerine nazaran sentromere daha uzak bir konumda (interkalar) bulunmaktadır. Farklı olan bir çift kromozom ise kırmızı sinyali telomer bölgesinde taşımaktadır. Yeşil sinyaller iki kromozom çiftinin telomere yakın bölgelerinde bulunurken, bir çift kromozom yeşil sinyali aynı kol üzerindeki kırmızı sinyal ile birlikte telomerden nispeten daha uzak bir lokasyonda taşımaktadır. Bu aksesyonun

kromozomları üzerindeki sinyaller (her iki renk) yoğunluk bakımından farklılık göstermektedir. Aksesyona ait bitkilerin kök ucu dokuları kullanılarak yapılan preparatlarda kromozom morfolojilerinin ve hücre içerisindeki dağılımlarının yeterince iyi olmaması nedeniyle, sinyal sayı ve lokasyonlarını hasas bir şekilde belirlemede bazı sorunlar ile karşılaşmıştır.



**Şekil 4. 75.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 577065 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Sarı oklar K+Y sinyal çiftlerini taşıyan kromozomları göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



**Şekil 4. 76.** PI 577065 nolu tetrapoliploid *Dactylis marina* aksesyonuna ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 8. kromozom üzerinde kırmızı ve yeşil sinyaller birlikte aynı kromozom kolu üzerinde bulunmaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

#### 4. 2. 8. 10. *Dactylis marina* aksesyonlarının değerlendirilmesi

Ribozomal DNA (5S ve 25S) FISH sinyalleri incelen 9 *marina* aksesyonun toplam sinyal sayısı 12, 16, 17, 18, kırmızı sinyal sayısı (25S) 8, 12, 14 ve yeşil sinyal sayısı (5S), 4, 5, 6 şeklinde sayısal bir çeşitlilik göstermiştir.

Çizelge 4. 9 incelendiğinde ABY-Bc 7213-0000U, PI 346970, PI 237604, PI 577066, nolu aksesyonların FISH sinyal sayı 12 ve dağılımlarının (8K+4Y) aynı olduğu

görülmektedir. PI 346968 ve PI 3469 aksesyionları 17 FISH sinyaline sahip olup, bu sinyallerin lokasyonlara dağılımı (12K+5Y) şeklindedir. PI 346969 ve PI 577065 aksesyionları toplamda 18 FISH sinyali göstermektedir. Ancak bu sinyallerin dağılımı farklılık göstermektedir. PI 346969 aksesyionunda 18 sinyalin dağılımı (14K+4Y) şeklinde, PI 577065 aksesyionunda ise 18 sinyalin dağılımı (12K+6Y) şeklinde gözlenmiştir. Son olarak PI 477989 aksesyionun 16 sinyale sahip olduğu ve bu sinyallerin (12K+4Y) şeklinde bir dağılım gösterdikleri saptanmıştır.

Lokasyon bakımından, kırmızı sinyaller, interkalar pozisyonda (sentromerden görece daha uzak) aksesyionlara bağlı olarak 2 veya 4 adet sinyal lokasyonu gösterirken, geriye kalan kırmızı sinyallerin hepsi (PI 477989 ve PI 577065 hariç) sentromerik lokasyonlarda gözlemlenmişlerdir. PI 477989 ve PI 577065 aksesyionları farklı olarak diğer marina aksesyionlarında gözlemlenmeyen birer çift telomerik kırmızı sinyale sahiptir. Bütün aksesyionlar telomerik konumda 4 adet yeşil FISH sinyaline sahip iken, PI 346968 ve PI 3469 numaralı aksesyionlar ayrıca sentromerik konumda 1 (homoloğunda yok) ve PI 577065 numaralı aksesyion 2 adet yeşil sinyale sahip bulunmuştur (Çizelge 4. 9).

*Marina* taksonuna ait 9 aksesyiondan 7'sinde telomerik kırmızı sinyal gözlemlenmemiştir. Bununla beraber, aynı ülkeden tolanan PI 346970, PI 346969, PI 3469568, PI 346967, PI 237604, PI 577066, PI 577065 numaralı aksesyionlardan 3'ü 12, 2'si 17 ve 2'side 18 adet sinyal taşımaktadır. Aynı guruba giren aksesyionların sinyal özellikleri (PI 577065 hariç) büyük oranda benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte farklı guruplar arasında da kısmen benzerlikler bulunmaktadır (Çizelge 4. 9).

FISH sonuçlarına dayanarak, aksesyion sayısı fazla olan *marina* taksonun *Dactylis* cinsinin evrimsel süreci hakkında genelleme yapabileceğimiz bilgiler sunduğu söylenebilir. Bu sonuçlar taksonun bir veya birden fazla diploitten köken aldığına ve toplandıkları bölgelerde triploid bitkilerin bulunduğunu göstermektedir. Yabancı tozlanan cinsin üreme durumu da göz önünde bulundurulduğunda, takson genomunun tamamen dengelenmediği ve evrimleşme sürecinin devam ettiği söylenebilir. *Dactylis glomerata*, *hispanica*, *woronowii* taksonlarında bazı aksesyionların sinyal özellikleri, *marina* aksesyionlarında da bulunmaktadır. Bu durumda taksonların benzer gelişim süreçleri gösterdiklerini söyleyebiliriz. Ancak *marina* aksesyionlarında bazı sinyal sayı farklılıkları (PI 346969'da 1 kırmızı sinyalin fazlalığı), lokasyonlara farklı dağılım (çoğunda telomerik kırmızı olmaması) *marina* taksonunun diğer taksonlardan ayırmaktadır.



**Çizelge 4. 9.** *Dactylis marina* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları

Takson Adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı				Lokasyon		
		Toplam	5S	25S	5S+25S	S	İK	T
<i>marina</i>	ABY-Bc-7213-0000U	12	8	4	-	6K	2K	4Y
	PI 477989	16	12	4	-	8K	2K	6(4Y,2K)
	PI 346970	12	8	4	-	6K	2K	4Y
	PI 346969	18	14	4	-	10K	4K	4Y
	PI 349668**	17	12	5	1	9(8K,1Y)	4K	4Y
	PI 346967**	17	12	5	1	9K(8K,1Y)	4K	4Y
	PI 237604	12	8	4	-	6K	2K	4Y
	PI 577066	12	8	4	-	6K	2K	4Y
	PI 577065*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(4Y,2K)

S: Sentromerik, T: Telomerik, İK: İnterkalar, K: 25S rDNA, Y: 5SrDNA temsil etmektedir.\*Aynı kromozom üzerinde K+Y bölgesi bulunmakta, ancak homolog kromozomda Y sinyali yoktur. \*\*homolog kromozomların aynı lokasyonunda K+Y sinyali bulunmaktadır.

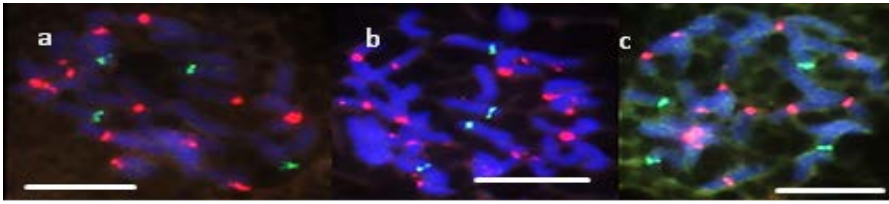
Literatür çalışmalarında *marina* bitkilerinin diğer tetrapoliploidlerden farklı coğrafik koşullarda (sarp kıyı yamaçlarında) yetiştikleri ve morfolojik olarak karakteristik (papilalı yaprak) yapılar taşıdıkları belirtilmiştir. Yakın bölgelerde benzer morfolojiye sahip farklı diploid alt türlerden ve yine yakın habitatlarda yaşayan farklı tetrapoliploidlerden bahs edilmiştir. Örneğin benzer morfolojik karakterler gösteren, diploid *smithii* ve *ibizensis* taksonları ile ilişkisi olabileceği aktarılmıştır (Borrill ve Lindner 1971, Lindner ve Garcia 1997). Aynı zamanda populasyonlar içinde morfolojik karakterlerin kademeli bir değişiklik gösterdikleri belirtilmiş, bu durum resesif genlerin pozitif seleksiyon etkisine bağlanmıştır (Benson ve Borrill 1969). Cins içi serbest üreme, poliploidizasyon, farklı diploidlerden köken alma (hibridizasyon) gibi durumlar dikkate alındığında, *marina* alt türünün farklı rDNA özellikleri sergilemesi normal bir durum olabilir. Yine tetrapoliploidler arası sinyal benzerlikleri, cinsin intraspesifik üreme durumu ile alakalı olabilir. Yanı sıra bazı sıkıntılar, cinse ait materyallerin toplama, adlandırma veya saklama koşulları nedeniyle ortaya çıkmış olabilir.

#### 4. 2. 9. İsimli tetrapoliploid aksesyonlara ait bulgular

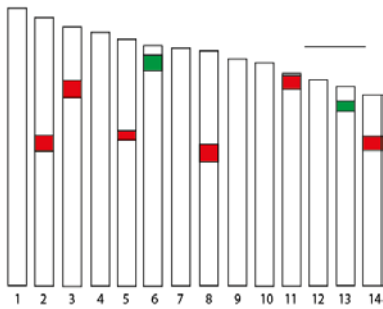
Çalışmamızda toplam 4 isimli aksesyon incelenmiştir. Bu aksesyonlardan iki tanesi  $2n=2x=28$  (tetrapoliploid) kromozom sayısına sahip iken, diğer ikisi  $2n=3x=21$  (triploid) kromozom sayısına sahiptir.

FISH analizi sonrası 1. tetrapoliploid (GRA 833\83 aksesyon numaralı) aksesyona ait mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 77 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 78'de sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyona ait 16 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 12 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Aksesyona ait bitkilerin mitotik kromozomları, bir çift hariç, kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Bunlardan 4'ü interkalar diyebileceğimiz bir uzaklıktadır. Farklı olan kromozom çifti telomerik kırmızı sinyal taşımaktadır. Yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılıklar göstermektedir.



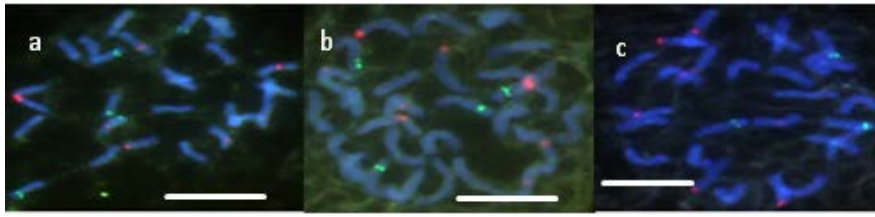
**Şekil 4. 77.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası GRA 833\83 nolu tetrapoliploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



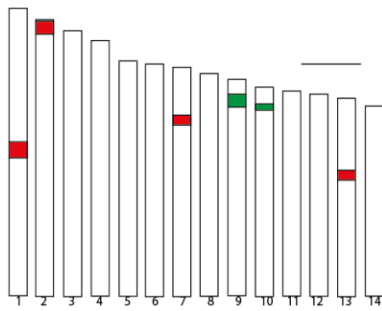
**Şekil 4. 78.** GRA 833\83 nolu tetrapoliploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

FISH analizi sonrası 2. tetrapoliploid 139 numaralı aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 79 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 80'de gösterilmiştir. Şekillerden de görüleceği üzere aksesyonun 12 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 4 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Aksesyona ait bitkilerin mitotik kromozomları, bir çift hariç, kırmızı sinyalleri sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Farklı olan kromozom çifti ise telomerik kırmızı sinyal taşımaktadır. Yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılıklar göstermektedir.



**Şekil 4. 79.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası 139 nolu tetrapoliploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).

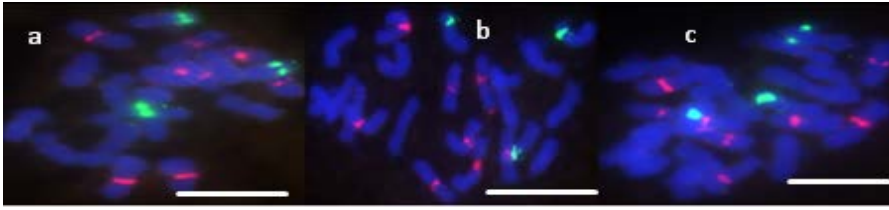


**Şekil 4. 80.** 139 nolu tetrapoliploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

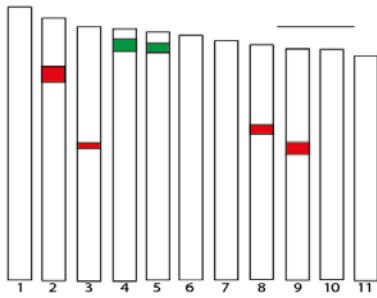
FISH analizi sonrası 1. triploid, 22 numaralı aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 81 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 82'de sunulmuştur. Şekillerden de

görülebileceği üzere aksesyonun 11 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 3 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir.

Bu aksesyon kromozomları, kırmızı sinyalleri diğer bazı tetrapoliploid aksesyonlarda olduğu gibi sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılıklar göstermektedir. Tam belirli olmamakla birlikte yoğunluğu nispeten daha fazla olan yeşil sinyali taşıyan 4. kromozomun homoloğu bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu yeşil sinyalin eşi de bulunmamaktadır.



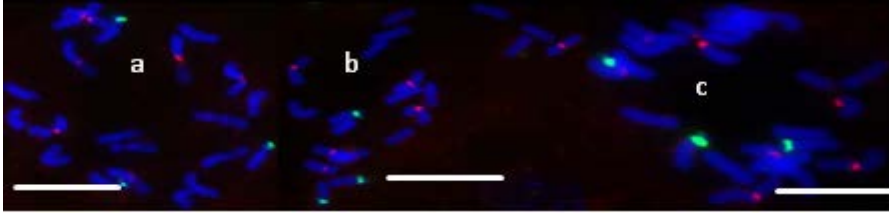
Şekil 4. 81. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası 22 nolu triploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Büyütme çizgileri 10µm'dir).



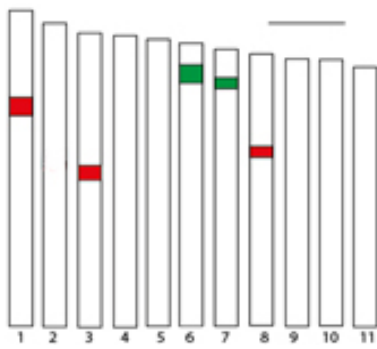
Şekil 4. 82. 22 nolu triploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 4. Kromozomun homoloğu bulunmamaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

FISH analizi sonrası 2. triploid (65 aksesyon numaralı) aksesyonun mitotik kromozomlarının görünüşü Şekil 4. 83 ve onlara ait haploit idiogram Şekil 4. 84'de sunulmuştur.

Şekillerden de görüleceği üzere bu aksesyonunun 9 mitotik kromozomu FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6 tanesi 25S rDNA (kırmızı) ve 3 tanesi 5S rDNA (yeşil) gen bölgelerinin (lokus) bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Yeşil sinyal taşıyan kromozomlardan birinin (muhtemelen daha yoğun sinyali taşıyan) homoloğu bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu yeşil sinyalin eşide bulunmamaktadır. Kromozomlar kırmızı sinyalleri diğer bazı tetrapoliploid aksesyonlarda olduğu gibi sentromer bölgelerine daha yakın ancak sentromere farklı uzaklıklarda taşımaktadır. Yeşil sinyaller ise diğer *Dactylis* taksonlarında olduğu gibi telomere daha yakın bölgelerde bulunmaktadır. Kromozomlar üzerindeki sinyaller yoğunluk bakımından farklılıklar göstermektedir. Sinyal sayıları farklı olsada, her iki triploid örnek çok yakın sinyal özellikleri göstermiştir.



**Şekil 4. 83.** Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası 65 nolu triploid aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 25S ve yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir. Bütün resimlerde büyütme çizgileri 10µm'dir).



**Şekil 4. 84.** 65 nolu triploid aksesyona ait haploit idiogramın görünüşü (Kırmızı sinyaller 25S rDNA, yeşil sinyaller 5S rDNA sinyallerinin nispi yoğunluk ve lokasyonlarını göstermektedir. 6. kromozomun homoloğu bulunmamaktadır. Büyütme çizgisi 1 µm'dir).

Çizelge 4. 10'de isimli tetrapoliploid ve triploid aksesyonlara ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı ve dağılımları karşılaştırılmıştır. Çizelgede GRA 833\83 isimli aksesyonuna ait

5S ve 25S rDNA sinyal sayısı ve dağılımlarına bakıldığında daha çok *woronowii* GR 1241/94 aksesyona benzer sinyal özellikleri görülmektedir. Çizelgede sinyal özellikleri verilen 139 numaralı isimli aksesyon bu sinyal özellikleri ile sinyal sayısı ve desenleri 12 adet sinyal taşıyan, *hispanica*, *lobata*, *santai*, *aschersoniana*, aksesyona ile benzerlik göstermektedir.

**Çizelge 4. 10.** İsimli tetrapoliploid aksesyona ait 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, dağılım ve lokasyonları

Takson Adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı			Lokasyon			
		Toplam	5S	25S	5S+25S	S	İK	T
isimsiz	GRA 833\83	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)
	139	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
	22 <sup>Ω</sup>	11	8	3	-	6K	2K	3Y
	65 <sup>Ω</sup>	9	6	3	-	4K	2K	3Y

S: Sentromerik, T: Telomerik, İK: İnterkalar, K: 25S rDNA, Y: 5SrDNA temsil etmektedir. <sup>Ω</sup>Triploid

İki adet triploid aksesyon arasında sentromerik bölgede iki kırmızı sinyal olup olmaması fark yaratmıştır. Triploid *Dactylis* örnekleri doğada habitatları kesişen veya yakın konumlu 2nX4n alanlarında veya sadece tetrapoliploid populasyonların bulunduğu alanlarda gözlemlenmiştir. Tetrapoliploid seviye için triploid bitkilerin genom aktarılmasında köprü görevi yaptıkları belirtilmiştir (Borill ve Lindner 1971, Sato ve ark. 1993).

Triploid örneklerin 5S ve 25S rDNA sinyallerini taşıyan kromozom yapıları diploid ve tetrapoliploid sinyal taşıyan kromozomlara benzemektedir. Bu iki örnek diploid ve tetrapoliploid melezleri olabilir, ancak hangi atanın genetik katkısının daha fazla olduğu belirsizdir. Triploid genomlar prob olarak kullanılıp GISH tekniği ile bu soru cevaplanabilir.

Basit bir şekilde triploid örneklerin indirgenmemiş bir gamet ( $3n=3x=21$ ) oluşturduğunu ve bu gametin var olan diploid normal gametlerle ( $n=x=7$ ) eşleştiğini farz edelim. Sinyal sayısı 11 olan (8K,3Y) triploid genom tetrapoliploid seviyeye ulaştığında, en az 15 ve en fazla 16 sinyal taşıyacaktır (diploid genomlar 4 veya 5 sinyal taşımaktadır). Diploid gametlerin kırmızı sinyal sayıları 2 veya 3 iken, yeşil sinyal sayıları 1 ve 2 olarak bulunmuştur. Bu hali ile eşleştirme yapacak olursak, kırmızı sinyaller, 10 veya 11, yeşil sinyaller 4 veya 5 olacaktır. Bu durum göz önüne alındığında, yeşil sinyallerin

poliploidizasyon sonrası sabit kaldığı, fakat kırmızı sinyallerin sayılarında artma veya azalmalar olabileceği görülmektedir. Bu durumları, sinyal sayısı 9 olan triploid örneğe uyguladığımızda da benzer bir durumla karşılaşmaktayız. Kırmızı sinyal sayısı 8 veya 9 olurken yeşil sinyal sayısı 4 veya 5 olmaktadır. Bu durumda örneklerde gördüğümüz fazladan kırmızı sinyaller farklı mekanizmalar ile oluşmaktadır. Var olan diploidler veya bunların melezlerinin poliploidizasyona uğradığını varsayarsak, bazı durumlarda tetrapoliploidlerde sayılan yeşil sinyal sayılarının beklenenden az olduğu görülmektedir

Bu bulgulara dayanarak, kırmızı sinyallerin beklenen sayılardan fazla olmalarında, poliploidizasyonun yanı sıra başka genetik faktörlerinde etki ettiği söylenebilir. Yeşil sinyallerin ise poliploidizasyon sonrası sabit kalmasında, triploid genomların aracılık etmesinin etkisi olduğu görülmektedir. Buradan triploid, diploid ve tetrapoliploid genotiplerin oluşturacağı genom yapılarının rDNA sinyallerindeki farklılıkların oluşmasında etkili oldukları çıkarılabilir.

#### 4. 2. 10. Tetrapoliploid taksonların karşılaştırılması

Farklı gen banklarından temin edilmiş, farklı sayıda aksesyonla temsil edilen, 9 tetrapoliploid (triploidler dahil) *Dactylis* taksonuna ait 5S ve 25S rDNA FISH sinyal sayı, lokasyon ve dağılımları Çizelge 4. 11’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 4. 11 incelendiği zaman, çalışılan aksesyonların sahip olduğu toplam 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı, 12, 16, 17 ve 18 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte 2 adet triploid örnek sırasıyla, toplamda 9 ve 11 adet rDNA FISH sinyali göstermiştir. 25S rDNA sinyal sayısı 6 (triploid), 8, 10, 12 ve 14 şeklinde, 5S rDNA sinyal sayısı ise 3 (triploid), 4, 5, ve 6 şeklinde bir sayısal çeşitlilik göstermiştir. Ayrıca çalışılan 31 aksesyondan, *hispanica* ABY-Bc5645-2004U aksesyonu ile *santai* PI 237606 aksesyonuna ait bitkiler ikişer farklı sinyal deseni gösterdiklerinden toplamda 33 sinyal karyotipi oluşmuştur.

Tetrapoliploid *hispanica* (PI 306730), *lobata* (ABY-Bc 5645-2004U, PI 372621), *santai* (PI 237606 (a)), *aschersoniana* (ABY-Bc 6223-1971U), isimsiz (139), *marina* (ABY-Bc-7213-0000U, PI 346970, PI 237604, PI 577066), *smithii* (GR 7297\02) aksesyonları 12 adet 5S ve 25S rDNA sinyali göstermiştir. Bu taksonlardan *hispanica*, *lobata*, *santai*, *aschersonina* ve isimsiz taksonlara ait aksesyonlarda, 12 adet sinyal lokasyonlara 4S(K)+2İK(K)+6T(2K,4Y) şeklinde, *marina* ve *smithii* aksesyonlarında ise

6S(K)+2İK(K)+4T(Y) şeklinde dağılım göstermiştir. Bu iki sinyal dağılımı arasındaki tek farkı, 2 adet 25S sinyalinin sentromerik veya telomerik alanda bulunması oluşturmaktadır. Bu sinyal gurubu tetrapoliploid aksesyolar, sinyal sayısı 6 olan, fakat diploid koleksiyonumuzda olmayan bir diploitten kökenlenmiş olabilirler. 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı 6 olan diploid *Dactylis* olup olmadığının öğrenilmesi için çalışılmayan diğer diploid taksonlar araştırılmalıdır.

Tetrapoliploid *hispanica* (PI 265567, ABY-Bc-56452004U (a)), *lobata* (PI 316209), *marina* (PI 477989), *woronowii* (GR 1241/94), *santai* (PI 237606 (b), PI 237605) ve isimsiz (GRA 833\83) aksesyoları toplamda 16 adet rDNA FISH sinyali göstermiştir. *Hispanica*, *lobata*, *marina*, *santai* (PI 237605), GRA 833\83 (isimsiz) aksesyolarında, 16 sinyal lokasyonlara 8S(K)+2İK(K)+6T(2K,4Y) şeklinde dağılım göstermiştir. *Woronowii* aksesyosunda bu sinyal dağılımı 8S(K)+4İK(K)+4T(Y) şeklinde gözlemlenmiştir. İki dağılım arasında, telomerik kırmızı sinyal olup olmaması fark yaratmıştır. *Santai* (PI237606 (b)) bitkilerinde ise 16 sinyal dağılımı 6S(K)+4İK(2K,2Y)+6T(2K,4Y) şeklinde belirlenmiştir. Bu sinyal dağılımını diğer iki dağılımdan ayıran özellik, 2 kırmızı sinyal eksikliği, bunun yerine 2 adet yeşil (25S rDNA) sinyalin interkalar bölgeye yerleşmiş olmasıdır. Ayrıca bu 2 adet yeşil sinyal homolog kromozomlar üzerinde yeşil sinyaller ile komşudur. Bu grup tetrapoliploidler (*santai* PI237606 (b) hariç) direkt *lobata*, *lusitanica* veya *himaleysensis* gibi bir diploitten direkt otopoliploidizasyon ile oluşabilirler. Sinyal dağılımı farklı olan tetrapoliploid *santai* (PI237606 (b)) aksesyosu, diploid *lobata* ile *santai* poliploidisi olabilir.

Tetrapoliploid *marina* (PI 349668, PI 346967) ve *woronowii* (PI 283243) aksesyoları 17 rDNA FISH sinyali göstermiştir. Bütün aksesyolarda bu sinyallerin 12'si kırmızı (5S) ve 5'i yeşil (25S) görünmektedir. Fakat *marina* aksesyolarında bu sinyallerin lokasyonlara dağılımı 9S(8K,1Y)+4İK(K)+4T(Y) şeklinde, *woronowii* aksesyosunda ise 8S(K)+5İK(4K,1Y)+4T(Y) şeklinde bulunmuştur. Bu iki dağılım arasındaki fark *marina* aksesyolarında homolog olmayan yeşil sinyalin sentromerik alanda, *woronowii* aksesyosunda ise interkalar alanda olmasıdır. Ayrıca bu sinyal *marina* aksesyolarında kırmızı sinyal ile birlikte aynı kromozomun üzerinde, *woronowii* aksesyosunda ise yeşil sinyal ile birlikte aynı kromozom üzerindedir. Bu grup tetrapoliploid aksesyolar, triploid *lobata* genomu ile diploid *mairei* genomu hibritleri olabilirler. Her iki tetrapoliploid aksesyonda yeşil sinyal lokasyon farklılıkları genetik veya kromozomal değişikliklerden kaynaklanabilir.



Tetrapoliploid *hispanica* (ABY-Bc-56452004U (b), PI 265568), *glomerata* (GR 669/96, 14G1000192), *marina* (PI 346969, PI 577065) ve *smithii* (PI 237607, GR 8202/80, GR 1238/83) aksesyonlarında toplamda 18 adet rDNA FISH sinyali sayılmıştır. Bu 9 aksesyondan sadece *marina* (PI 346969) aksesyonu farklı sinyal dağılımı göstermiştir. Bu aksesyonda 18 sinyalin dağılımı 10S(K)+4İK(K)+4T(Y) şeklinde diğer 8 aksesyonda ise 10S(8K,2Y)+2İK(K)+6T(2K,4Y) şeklinde belirlenmiştir. İkinci formülü gösteren aksesyonların farkı 6 adet yeşil sinyal taşımaları olmuştur. Bu sinyallerden 4'ü telomerik lokasyonlu olup, klasik bütün aksesyonlarda gözlemlenmiştir. Diğer 2'si sentromerik lokasyonlarda kırmızı sinyaller ile yakın lokuslarda gözlemlenmiştir. Bu grup tetrapoliploidler, *lobata*, *lusitanica*, *himaleyensis* gurubu diploidlerinden biri ile diploid *mairei* arası poliploidizasyon sonucu oluşabilirler.

Toplam sinyal sayıları göz önüne alındığında, aksesyonlar 4 gurub özelliği ve sinyal dağılımlarına göre ise, bu guruplar genelde 2'şer alt gurup özelliği göstermiştir. Alt gurupların oluşmasına küçük lokasyon farklılıkları sebep olmuştur. Bununla beraber bütün aksesyonlar telomerik lokasyonlu, hemen hemen benzer yoğunluk ve görünümde 4 adet 25S rDNA (yeşil) sinyaline sahip bulunmuştur. Bunun dışında en büyük ortak özellik, 31 tetrapoliploid popülasyondan 20'sinin interkalar ve telomerik lokasyonlarında görülen 5S ve 25S rDNA sinyal dağılım motiflerinin aynı olmasıdır. Bu sinyal motifi 2İK(K)+6T(2K,4Y) şeklinde olup, popülasyonların yaklaşık %65'ine tekabül etmektedir. Bu durum *marina* taksonuna ait 7 aksesyonda (tamamı 9 aksesyon), *woronowii*'ye ait her iki aksesyonda, *smithii*'ye ait 1 aksesyonda (tamamı 3 aksesyon) farklılık göstermiştir. Bununla birlikte *santai* PI 237606 aksesyonuna ait bazı bitkilerde bu durum bilinen bütün dağılımlardan farklı çıkmıştır. Bu bilgiler ışığında tetrapoliploid taksonların benzer genetik değişimler (örneğin poliploidizasyon) geçirdikleri söylenebilir. Aksesyon sayısında dikkate alındığında *marina* taksonunun diğer tetrapoliploidlerden genetik olarak kısmen farklı olduğu görülmektedir.

Tetrapoliploid *santai* PI 237606 aksesyonuna ait bazı bitkilerde ve *woronowii* (PI 283243) aksesyonlarına ait sinyal dağılım motifi, genel sinyal dağılımlarından farklı bulunmuştur. *Santai* PI 237606 aksesyonuna ait resimlerin bir kısmında 16 sinyal sayılmıştır. Bu sinyallerin lokasyonlara dağılımı, 10 kırmızı ve 6 yeşil şeklindedir. 18 sinyal taşıyan aksesyonlarda da 6 adet yeşil sinyal bulunmaktadır. Ancak 18 sinyal taşıyan aksesyonlarda 2 adet yeşil sinyal 2 adet kırmızı sinyal ile yakın lokuslarda iken *santai* PI 237606'de iki adet yeşil sinyal 2 adet telomerik yeşil sinyal ile yakın lokuslarda gözlemlenmiştir. Benzer şekilde

17 adet (12K+5Y) sinyal taşıyan *woronowii* (PI 283243) aksesyonunda 1 adet yeşil sinyal telomerik yeşil sinyal ile yakın lokuslarda iken diğer 17 sinyal taşıyan aksesyonlarda yeşil sinyallerden 1'i kırmızı sinyal ile yakın lokuslarda gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak bazı tetrapoliploidlerin poliploidizasyon mekanizmalarının farklılık gösterdiğini veya rDNA yapılarının lokasyonlar arasında yer değiştirdiklerini söyleyebiliriz.

Dikkat çeken durumlardan biri de *smithii*'ye ait 4 aksesyondan 3'ünde 18 sinyal, sayılmış olmasıdır. Benzer şekilde iki adet tetrapoliploid *Dactylis glomerata*'nın da sinyal sayısı 18 çıkmıştır. Bu bilgiye dayanarak *smithii* ve *Dactylis* taksonlarının poliploidizasyonunda daha çok iki farklı diploidin rol aldığını söyleyebiliriz. Fakat bu çıkarımda bulunmak için daha çok örnek karşılaştırılmalıdır.

Ribozomal DNA (5S ve 25S) FISH özellikleri çalışılan 31 aksesyondan ikisi triploid ( $3n=3x=21$ ) poliploidi seviyesine sahiptir. Bu aksesyonların sinyal dağılımları benzer olup sadece sentromerik lokasyonda 2 adet kırmızı sinyalin olup olmaması fark yaratmıştır. Her iki aksesyonun interkalar ve telomerik sinyal dağılımları 2İK(K)+3T(Y) aynı olup, tetrapoliploid aksesyonların büyük bir kısmı ile benzerlik göstermiştir. Triploidlerin bu sinyal özellikleri, diploid ve tetrapoliploid seviyeler arasında sinyal taşınmasında rol aldıklarını, sinyal dağılım farklılığı oluşmasında rol alabileceklerini göstermektedir.

Yukarıdaki 5S ve 25S rDNA FISH özellikleri dikkate alındığında, tetrapoliploid genomların, sinyal sayısı, lokasyon ve yoğunluk bakımından çeşitlilik gösterdikleri görülmektedir. Bu çeşitliliğin oluşmasında hem 5S hem de 25S rDNA tekrar yapılarının etkin olduğu, ancak 25S rDNA yapılarının sayısal olarak daha fazla çeşitlilik oluşmasına sebep oldukları görülmüştür. Yine kromozomal lokasyonlar göz önüne alındığında her iki sinyalin, sentromerik, interkalar ve telomerik alanlara dağıldıkları görülmüştür. Fakat 25S rDNA yapılarının daha çok sentromerik, 5S rDNA yapılarının ise daha çok telomerik alanlarda konumlandıkları görülmektedir. Ancak aksesyonlara ait sinyal karyotiplerinde çeşitlilik oluşmasında, daha çok her iki sinyalin sentromerik konum değişiklikleri sebep olmuştur. Bu durumda 5S ve 25S rDNA genetik yapı değişimlerinde, kromozomların sentromerik alanlarının daha aktif oldukları söylenebilir. *Dactylis* genomlarında lokasyonlar arası bu sinyal değişimleri, poliploidizasyon, hibridizasyon veya genom içi değişimlerin hepsi ile ilgili görünmektedir.

*Dactylis* taksonları arasındaki akrabalık ilişkilerini belirlemede 5S rDNA yapılarının daha önemli olduğu görülmektedir. Çünkü 25S rDNA sinyal sayıları hem takson içinde hem de taksonlar arasında çeşitlilik gösterirken, 5S rDNA sinyal sayısı değişimleri her iki durumda da daha sabit genom özellikleri göstermektedir. Tüm aksesyonların telomerik lokasyonlarında 4 adet 5S rDNA yapısına sahip olmaları, tetrapoliploid taksonların ortak bir ataya sahip oldukları anlamına gelebilir. Farklı sayıda (5, 6) 25S rDNA taşıyan genotiplerin farklı atalardan köken almış olabileceği söylenebilir. Örneğin teorik olarak, triploid genotipler (3 adet 5S rDNA) farklı diploit genotipler ile eşleştirildiğinde, tetrapoliploidlerde 4 ve 5 adet 5S rDNA sinyali oluşmaktadır. Bu durumda bazı tetrapoliploid taksonların oluşumunda, farklı diploitlerden ziyade daha çok kendi triploitlerinin katkı sağladığı görülmektedir. Benzer şekilde farklı diploid hibridlerine poliploidizasyon uygulandığında, tetrapoliploidlerde görülen bazı yeşil sinyallerin takip edilebildiği görülmektedir.

Tetrapoliploid taksonlar, özellikle çok aksesyonlu olanlar göz önünde bulundurulduğunda, kendi içlerinde farklı sinyal polimorfizmleri göstermişlerdir. Örneğin *marina* ve *hispanica* aksesyonları kendi içlerinde en az 3 farklı sinyal sayısı dağılımı göstermiştir. Bu dağılımlar arasında belirli ortak özellikler bulunmaktadır. Tüm taksonlar arasında da bu özellik görülmüş, çalışılan 31 aksesyon karışık bir popülasyon özelliği göstermiştir. Bu durum hem taksonların kökenleri, hem de kendi aralarında belli bir ilişkinin var olduğuna işaret etmektedir. Ancak bu arada *Dactylis* genetik kaynaklarının adlandırma, korunma, çoğaltma gibi muğlak durumları göz önünde bulundurulmalı, *Dactylis* bitkileri yeniden doğadan toplanıp, daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

5S ve 25S rDNA özelliklerine göre, tetrapoliploid taksonların oluşmasında, diploid seviyede direk veya hibridizasyon sonrası poliploidizasyon, tetrapoliploid seviyede gen akışı, bu gen akışına triploid genomların eşlik edip etmemesi gibi çok sayıda faktörün etki ettiği geniş bir intraspesifik evrimleşme sürecinden bahsedilebilir.

**Çizelge 4. 11.** Tetrapoliploid ve triploid *Dactylis* aksesyonlarına ait 5S ve 25S rDNA FISH sinyal sayısı ve lokasyonları

Takson Adı	Aksesyon No	Sinyal sayısı				Lokasyon		
		Toplam	5S	25S	5S+25S	S	İK	T
<i>hispanica</i>	PI 265567	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)
	ABY-Bc-56452004U (a)	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)
	ABY-Bc-56452004U (b) *	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	PI 265568*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	PI 306730	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
<i>glomerata</i>	GR 669/96*	18	12	6	2	10(8K, 2Y)	2K	6(2K,4Y)
	14G1000192*	18	12	6	2	10(8K, 2Y)	2K	6(2K,4Y)
<i>lobata</i>	ABY-Bc 5645-2004U	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
	PI 316209	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)
	PI 372621	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
<i>marina</i>	ABY-Bc-7213-0000U	12	8	4	-	6K	2K	4Y
	PI 477989	16	12	4	-	8K	2K	6(4Y,2K)
	PI 346970	12	8	4	-	6K	2K	4Y
	PI 346969	18	14	4	-	10K	4K	4Y
	PI 349668**	17	12	5	1	9(8K,1Y)	4K	4Y
	PI 346967**	17	12	5	1	9K(8K,1Y)	4K	4Y
	PI 237604	12	8	4	-	6K	2K	4Y
	PI 577066	12	8	4	-	6K	2K	4Y
	PI 577065*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(4Y,2K)
<i>woronowii</i>	PI 283243***	17	12	5	-	8K	5(4K,1Y)	4Y
	GR 1241/94	16	12	4	-	8K	4K	4Y
<i>smithii</i>	PI 237607*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	GR 8202/80*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	GR 1238/83*	18	12	6	2	10(8K,2Y)	2K	6(2K,4Y)
	GR 7297/02	12	8	4	-	6K	2K	4Y
<i>santai</i>	PI 237606 (a)	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
	PI 237606 (b) <sup>ψ</sup>	16	10	6	-	6K	4(2K,2Y)	6(2K,4Y)
	PI 237605	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)
<i>aschersoniana</i>	ABY-Bc 6223-1971U	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
<i>isimsiz</i>	GRA 833\83	16	12	4	-	8K	2K	6(2K,4Y)
	139	12	8	4	-	4K	2K	6(2K,4Y)
	22 <sup>Ω</sup>	11	8	3	-	6K	2K	3Y
	65 <sup>Ω</sup>	9	6	3	-	4K	2K	3Y

\* Homolog kromozomlar üzerinde her iki rDNA bölgesi (5S+25S) mevcuttur \*\* Homolog kromozomlardan biri üzerinde her iki rDNA bölgesi (5S+25S) mevcut, ancak diğer homolog kromozom yeşil sinyal taşımamakta \*\*\* Homolog kromozomlardan biri üzerinde iki adet 5S var homoloğunda 5S'lerden biri yok <sup>ψ</sup> homolog kromozomlardan biri üzerinde çift 5S rDNA sinyali var <sup>Ω</sup> triploid aksesyon S: Sentromerik T: Telomerik, İK: İnterkalar

Tetrapoliploid *Dactylis* örnekleri; morfolojik karakterler (Borill 1961), mitoz karyotip çalışmaları (Guignard 1987), mayoz karyotip çalışmaları (Jenkins 1983, Lentz ve ark. 1983, Tosun ve ark. 1999), kloroplast DNA yapıları (Lumaret ve ark 1989, Sahuquillo ve Lumaret 1999), izoenzim (Lumaret 1986, Sahuquillo ve Lumarett 1995) fenolik içerikleri (Jay ve Lumaret 1995), ekolojik (Amirouche ve Missset 2007), flow sitometri (Tuna 2015), nükleer ITS (Stewart ve Ellison 2015) gibi farklı çalışmaların konusu olmuştur. Bütün bu çalışmalarda, çalışılan tetrapoliploid taksonlar, kendi içlerinde ve aralarında çalışılan konular bakımından, belirli bir polimorfizm göstermiş, grub ve alt grub özellikleri sergilemişlerdir. Bu polimorfizimler paralel denebilecek özellikler göstermiştir. Bu durumun oluşmasında en büyük sebebin genotiplerin ortak veya benzer genotip gösteren diploitlerden köken alması, yanısıra cins içerisinde farklı ekotipler arası serbest eşleşme durumları gösterilmiştir.

Amirouche ve Missset (2007), ekolojik ve sitolojik farklılıklara dayanarak, *marina* ve *hispanica* alt türlerini ayırmış, bazı *hispanica* popülasyonlarında subsp. *glomerata* özelliği gösteren bitkiler gözlemlediğini belirtmiştir. Flow sitometri ile belirlenmiş 2C-DNA içeriklerine göre tetrapoliploidler bu özellik bakımından önemli bir varyasyon aralığı göstermiştir. Fakat 2C-DNA değerleri çok büyük dalgalanmalar göstermemiştir (Tuna ve ark. 2004, 2015).

*Dactylis* cinsi ile ilgili moleküler markır çalışmalarının sayısının gittikçe arttığı görülmektedir. Bu çalışmalarda daha çok cinsin genetik çeşitliliğinin tarımsal özellikler ile olan ilişkileri araştırılmıştır. Moleküler belirteçlere dayalı filogenetik çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Var olan çalışmaların hepsinde, *Dactylis* örneklerine ait takson veya popülasyon içi genetik çeşitliliğin yüksek olduğu, bu çeşitliliğin çalışılan örneklerde paralel değerler aldıkları görülmektedir (Last ve ark. 2013, Madesis ve ark. 2014, Mao ve ark. 2016, Sun ve ark. 2017). Buda cins içerisinde genetik değişimlerin olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda da tetrapoliploid taksonlar çoğunlukla kendi içlerinde ve aralarında 5S ve 25S rDNA FISH sinyal sayı, lokasyon ve yoğunlukları bakımından belirli bir varyasyon göstermiştir. Bununla beraber tetrapoliploidler arası 5S ve 25S rDNA FISH sinyalleri çalışılan taksonlar arası güçlü bir akrabaçlık olduğunu, çalışmamızdan elde edilen bulgular ile yukarıdaki çalışmalardan elde edilen bulguların uyumlu olduğunu göstermektedir.

### 4. 3. Diploid ve Tetrapoliploid Taksonların Karşılaştırılması

Diploid ve tetrapoliploid aksesyonlar kromozomal ve FISH özellikleri bakımından paralel denilebilecek özellikler sergilemişlerdir. Her iki poliploidi seviyesine ait *Dactylis* kromozomları, satelitli, sekonder boğumlu, metasentrik ve submetasentrik sentromer durumlu morfolojik yapılar göstermiştir. Sinyal taşıyan kromozomlarında morfolojik olarak, az çok benzer özellikler gösterdikleri belirlenmiştir. Ancak her iki poliploidi seviyesine ait kromozomlar simetrik özellikler gösterdiklerinden, görsel olarak, kromozom yapıları hakkında daha ayrıntılı bilgiler vermek zordur. Örneğin çok sayıda kromozom sayısına sahip şeker kamışı çeşitlerinde, doku olarak genç anterlere sahip tapetal polen ana hücreleri kullanıldığında, kromozom sayımı, bazı diğer karyotipik özelliklerin veya FISH sinyallerini belirlemenin ve karşılaştırmanın daha kolay olduğu söylenmiştir. Çünkü bu dokudaki kromozomların, kök meristem hücrelerindekiyle oranla daha iyi dağıldıkları ve daha iyi yoğun oldukları belirtilmiştir (Thumjamra ve ark. 2016). Farklı FISH yöntemleri kullanılarak, zor tanımlanan kromozomlara ait açıklayıcı karyotiplerin yapılabileceği bildirilmiştir. Nitekim çok sayıda küçük kromozoma sahip patates türlerine ait kromozomlar, patatese özgü BAC-FISH ve 5S ve 45S rDNA FISH teknikleri kullanılarak tanımlanmıştır (Dong ve ark. 2000).

Diploid *Dactylis* aksesyonları toplamda 8 veya 10 adet rDNA FISH deseni sergilemiş, bu FISH desenlerini oluşturan kırmızı (25S rDNA) sinyaller 4 ve 6, yeşil (5S rDNA) sinyaller ise 2 ve 4 şeklinde sayısal bir çeşitlilik göstermiştir. Toplam 8 sinyale sahip aksesyonlar, iki farklı sinyal dağılımı göstermiştir. Aksesyonlardan *lusitanica*, *lobata*, *himaleyensis*, 84 gurubunun sinyal dağılımı, 6K+2Y ve *galicia*, *santai* gurubunun sinyal dağılımı ise 4K+4Y şeklinde bulunmuştur. Toplam sinyal sayısı 10 olan *mairei* ve 87 numaralı isimli aksesyonda bu sinyallerin dağılımı, 6K+4Y şeklinde bulunmuştur. Bu hali ile 2 farklı sinyal sayısı 3 farklı sinyal dağılımı görülmektedir. Aynı sinyal sayısına sahip diploidlerde farklı alt grup (dağılım) özellikleri oluşmasında, 5S ve 25S sinyal sayı çeşitliliği ve bu sinyallerin özellikle sentromerik ve telomerik lokasyonlardaki dağılım farklılıkları sebep olmuştur. İlginç olan durum ise, bu farklılıklara rağmen, farklı sinyal gurubundaki bazı aksesyonların sinyal dağılım desenlerinin birbirine oldukça benzer bulunması olmuştur. Bu durum aksesyonlar arası genetik geçişlerin olduğuna veya farklı sinyallere sahip diploidler arası farklı eşleşme mekanizmalarının var olduğuna işaret etmektedir.

Elimizde diploid örneklerden *lusitanica* taksonuna ait iki adet aksesyona ait sinyal yoğunlukları ve kromozomlara dağılımları küçük farklılıklar göstermiştir. Diğer diploid

taksonlar ise birer adet aksesyon ile temsil edildiği için, bu taksonları kendi içlerinde rDNA özellikleri bakımından karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Var olan diploid taksonlar yukarıda belirtildiği gibi aralarında rDNA özellikleri bakımından belirli bir polimorfizm göstermiştir. Analiz edilen diploid taksonlar dikkate alındığında, *Dactylis* cinsinin 2 veya daha fazla diploid atadan kökenlendiği ya da bir diploid atadan kökenlendiği söylenebilir. Ancak zamanla, çevresel değişimler, mutasyonlar, üreme bariyerleri gibi etkenler sonucu, bu diploid atadan, farklı genetik özellikler gösteren diploidler oluşmuş olabilir. Diğer taraftan sinyal özellikleri dikkate alındığında, diploid aksesyonlar arası hibridizasyon veya genom içi değişikliklerin, zamanında, gerçekleştiği söylenebilir.

Tetrapoliploid *Dactylis* aksesyonlarında toplam sinyal sayısı, 12, 16, 17, 18 kırmızı (25S rDNA) sinyal sayısı 8, 10, 12, 14 ve yeşil (5S rDNA) sinyal sayısı 4, 5 ve 6 olarak belirlenmiştir. Ayrıca iki adet triploid örneğe ait sırasıyla toplamda, 9 (6K,3Y) ve 11(8K,3Y) adet sinyal yansıması belirlenmiştir. Tetrapoliploid taksonlar kendi içlerinde ve aralarında aynı sinyal sayıları üretmiştir. Ancak oluşan 5S ve 25S rDNA sinyal yapıları, sayı ve özellikle de dağılımları dikkate alındığında bu taksonların farklı alt guruplar oluşturdukları görülmektedir. Ayrıca incelenen guruplar arasında bazı benzer sinyal motiflerinin de var olduğu belirlenmiştir. Sinyal sayı ve dağılım özellikleri dikkate alındığında, taksonların evrimsel gelişiminde, değişik poliploidizasyon ve hibridizasyon mekanizmalarının etkili olduğu görülmektedir. Nitekim moleküler belirteçlere dayanan çalışmalarda hem diploid hem de tetrapoliploidler için benzer olgulardan bahs edilmiştir (Steward ve ark. 2013, Stewart ve Ellison 2015).

Elimizdeki diploid örneklerin toplam sinyal sayıları sırasıyla 8 ve 10 adet bulunmuştur. Tetrapoliploid taksonlarda 16 sinyal taşıyan aksesyonların, 8 sinyal taşıyan diploidlerden direk otopoliploidizasyon ile kökenlenmiş olabilecekleri düşünülebilir. Bu durumda, 16 adet sinyal taşıyan *hispanica*, *lobata*, *marina* ve *santai* aksesyonlarının (bu aksesyonların sinyal dağılımlarının da aynı olduğu belirlenmiştir), direk otopoliploidizasyon ile tek diploitten kökenlenmiş olabilecekleri söylenebilir. Aynı sinyal sayısına sahip *woronowii* GR 1241/94 aksesyonu farklı sinyal dağılımı göstermiştir. Bu aksesyon 8 sinyale sahip fakat kısmi bir farklılaşma gösteren bir diploitten poliploidize olmuş veya zamanla kendine has bir genom yapısı kazanmış olabilir. Örneğin coğrafik değişimler sonrası farklılaşmış bir diploidin genomunun katlanması sonucu oluşmuş olabilir. Tetrapoliploid aksesyonlardan, 16 sinyal taşıyan *santai* PI 237606 (b) ait bazı bitkiler diğer gurup

üyelerinden çok farklı bir sinyal dağılımı göstermiştir. Diğer guruba giren tetrapoliploidler 12 kırmızı ve 4 adet yeşil sinyal taşırken, *santai* PI 237606 (b) örneği 10 kırmızı ve 6 yeşil sinyal durumu göstermiştir. Bu şekilde bir sinyal dağılımının oluşması için farklı sinyal dağılımına sahip diploidlerin hibridizasyon sonrası poliploidizasyona uğramaları gerektiği teorik olarak gösterilebilir. Örneğin diploid *santai* (2K+2Y) ve *lobata* (3K+1Y) genomlarının hibridizasyonu sonrası otopoliploidizasyona uğramasıyla 10K+6Y sinyal sayısına sahip *santai* PI 237606 (b) diploid genomu (tetrapoliploid) oluşabilir.

Benzer şekilde 10 sinyale sahip diploidlerin yaklaşık iki katı kadar (17 ve 18) sinyal taşıyan tetrapoliploid aksesyollar bulunmaktadır. 18 sinyale sahip olan, *hispanica*, *glomerata*, *marina*, *smithii* aksesyolları bu diploidlerden gelişmiş olabilir. Bu aksesyollardan sadece *marina* (36) aksesyonu 14K+4Y sinyal dağılımına sahip olup, diğer aksesyollar 12K+6Y sinyal dağılımına sahiptir. 17 sinyal taşıyan *marina* (PI 349668, PI 346967) ve *woronowii* (PI 283243) aksesyollarının hepsi 12K+5Y sinyal dağılımı göstermiştir. Ancak kırmızı ve yeşil sinyallerin lokasyonlara dağılımı, her iki sinyal durumu için 2 farklı alt gurub oluşmasına sebep olmuştur. Bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda, yukarıdaki tetrapoliploidlerin oluşmasında, birden fazla poliploidi seviyesinin rol aldığı, direk otopoliploidizasyon veya hibridizasyon sonrası otopoliploidizasyon, genom içi veya genomlar arası lokasyon değişimi gibi olgulardan bahsedilebilir. Bunun yanı sıra tetrapoliploidlerde sinyal sayısının 20 olmamasında, 2 sinyalin eksik olmasında, diploidler arası hibridizasyon ve poliploidizasyon sonrası genetik değişiklikler sebep olmuş olabilir. Zaten yeşil sinyal sayısı dikkate alındığında, 4 veya üstü sinyal taşıyan diploidlerin direk poliploidizasyona katılmayacakları görülmektedir.

Bu çalışmadaki gibi iki renkli rDNA FISH tekniği kullanılan bazı çalışmalarda, poliploidizasyon sonrası oluşan yüksek poliploidi seviyelerinde genom içi değişiklikler gözlemlenmiştir. *Artemisia dracunculus*'a ait farklı ekotipler belirgin iki farklı 5S ve 25S lokasyon sayısı göstermiştir. Örneğin birçok diploid *Artemisia dracunculus* 4 (2 lokus) rDNA sinyali verirken, Avrasya kökenli olanlar 6 veya 10 sinyal (3 veya 5 lokus) göstermiştir. Aynı zamanda diploid, tetrapoliploid ve heksapoliploid seviyeler arasında 5S ve 25S rDNA sinyal sayısı ve lokasyonları arasında orantısal bir artış belirlenmiş ve bu durumun poliploidizasyonu kanıtladığı belirtilmiştir. Fakat heksapoliploid seviyede bazı küçük sinyal sayısı değişimleri poliploidizasyon sonrası genetik değişimlere bağlanmıştır (Pellicer ve ark. 2013).



Diploid *lobata*, *lusitanica*, *himaleysensis* ve 84 numaralı aksesyonlar aynı sinyal dağılımına, (6K+2Y), sahiptir. Bu gurubu *lobata* gurubu olarak adlandıralım, bu gurubun vereceği gamet 3K+1Y sinyal dağılımına sahip olacaktır. Diploid *santai* ve *galicia* aksesyonları aynı sinyal, 4K+4Y, dağılımına sahip olup, bu gurubu *santai* gurubu olarak adlandıralım. Bu gurubun vereceği gamet 2K+2Y sinyal dağılımına sahip olacaktır. Ayrıca 10 sinyal taşıyan aksesyonların (*mairei*) oluşturacağı gamet 3K+2Y sinyal dağılımına sahip olacaktır. Bu farklı gametleri oluşturan diploidlere teorik olarak hibridizasyon ve poliploidizasyon durumlarını uygulayalım:

Diploid *lobata* aksesyonunun direk otopoliploidizasyonu sonucu sinyal sayısı 16 (12K+4Y) olan tetrapoliploid bitkilerin meydana gelmiş olması mümkündür. *Lobata x mairei* çaprazına ait genomun katlanması sonucu 18 (12K+6Y) sinyal taşıyan tetrapoliploidlerin oluşması da olasıdır. Benzer şekilde *lobata x santai* çaprazının oluşturduğu genomun katlandığı düşünülürse, sinyal sayısı 16 (10K+6Y) olan tetrapoliploid *santai* (PI 237606) yapısı meydana gelmiş olabilir. Yine triploid genom ( $3n=8K+3Y$ ) ile farklı diploid genomların eşleşmesi sonucu 4 ve 5 adet yeşil sinyal taşıyan tetrapoliploid genomlar oluşabilir. Triploidler aracılığı ile poliploidizasyonda, bazı tetrapoliploid genomlarda 1 veya 2 adet kırmızı sinyal eksikliği görülmektedir. Bu eksik sinyaller tetrapoliploidler arası gen geçişi veya genom içi kromozomal değişimler sonucu meydana gelmiş olabilir. Örneğin triploid genom ( $3n=8K+3Y$ ) ile *mairei* (3K+2Y) genomunun hibridizasyonunda, bir kırmızı sinyal artışı ile 17 (12K+5Y) sinyale sahip tetrapoliploid genomlar oluşabilir. Elimizdeki her iki triploid örneğin yeşil sinyal sayısı 3 bulunmuştur. Tetrapoliploidlerde yeşil sinyal sayısının bu şekilde küçük kalması için triploidlerin yapısına daha çok *lobata* gurubu diploidlerin katılması gerektiği söylenebilir.

Yukarıdaki diploid genotiplerin kullanılması sonucu yapılan teorik eşleşmelerin hiçbirinde 12 (8K+4Y) adet sinyal taşıyan yapı oluşmamaktadır. Bu durumda sinyal sayısı 6 olan (4K+2Y) bir diploid genomun katlanması sonucu 12 adet sinyal taşıyan tetrapoliploidler meydana gelebilir. Benzer şekilde bu diploid ile *lobata* gurubundan bir diploidin eşleşmesi ve katlanması sonucu 14 sinyale ve *mairei* genomu ile eşleşmesi ve katlanması sonucunda 16 sinyale sahip tetrapoliploidler oluşabilir. Bu şekilde sinyal sayıları aynı fakat sinyal dağılımları farklı tetrapoliploidler oluşabilir.

Çalışma sonuçlarında dikkat çeken başka bir durum ise yeşil sinyalleri takip ettiğimiz zaman, bazı diploid genotiplerin direk birbirleriyle hibridize olamama durumlarının tespit

edilmiş olmasıdır. Örneğin *santai x mairei* çaprazının katlandığını varsayarsak, oluşacak tetrapoliploidin 8 adet yeşil sinyal taşıması gerekmektedir. Benzer şekilde *mairei x mairei* veya *santai x santai* çaprazları katlandığında da oluşacak tetrapoliploidlerin 8 adet yeşil sinyal taşıması gerekecektir. Bu eşleştirmeler, yeşil sinyal sayıları 4 olan diploidlerin direk veya hibridizasyon sonrası diploidize olamayacaklarını, yeşil sinyal sayısı 2 olan diploidler ile tetrapoliploidlerin yapısına katılabileceklerini göstermektedir. Bunun dışında 5S rDNA sayılarının katlanmasını engelleyen başka genetik mekanizmalar da olabilir.

Yukarıdaki bulgular sayesinde, *lobata* gurubu diploidlerinin yaygın olabileceği, genetik veya çevresel değişimler sonucu farklı genotipler oluşturabilecekleri, farklı diploidler ile hibridize olabilecekleri anlaşılmaktadır. Ayrıca bütün diploidler arası eşleşme durumlarının olmayacağı, bazı sınırlamaların olabileceği anlaşılmaktadır. Bununla beraber direk poliploidizasyon sonrası, kırmızı sinyaller katlar halinde artarken, yeşil sinyaller için böyle bir durumun sadece 2 adet yeşil sinyal taşıyan diploidler için geçerli olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla diploidlerde sayısı 4 olan yeşil sinyallerin tetrapoliploidlerde katlar halinde karşılıkları bulunmamaktadır. Yeşil sinyal sayılarının sabit kalmasında, 4 adet yeşil sinyal taşıyan diploidlerin direk poliploidizasyona katılmamaları; *lobata* gibi bir diploid ile eşleşmeleri sonucu, yeşil sinyal sayılarının indirgenmesi gerektiği görünmektedir. *Lobata* gibi bir diploidin, birçok tetrapoliploidin yapısına direk veya hibridizasyon yolu ile katılma durumu genomik insitu hibridizasyon (GISH) tekniği ile araştırılmalıdır. Eğer bu diploid direk bir tetrapoliploidin yapısına katılmış ise iki genom arasında yüksek homoloji olması beklenir. Hibridizasyon sonucu bir tetrapoliploidin yapısına katılmış ise, iki genom arasında kısmi bir homoloji olması beklenir. Benzer şekilde sadece yeşil sinyallere özgü problemler kullanılarak, bu sinyallerin poliploidi seviyeleri arasındaki ilişkileri farklı FISH teknikleri ile takip etmek mümkün olabilir.

Tetrapoliploid aksesyonların sinyal dağılımları göz önüne alındığında, 4 sinyal gurubunun kendi içinde 2 veya 3 alt gurub oluşturdukları görülmektedir. Bu alt gurupların oluşmasında, daha çok kırmızı sinyaller olmak üzere, her iki sinyal gurubunun sayı ve lokasyon değişimleri sebep olmaktadır. Her iki sinyal gurubunun, sentromerik, telomerik ve interkalar alanlar arasında yer değiştirebilecekleri gözlemlenmiştir. Fakat her iki sinyal gurubu için bu değişimlerin daha çok sentromerik ve telomerik alanlar arasında olduğu belirlenmiştir. Tetrapoliploid aksesyonların (triploidler dahil değil) yaklaşık %65'inde interkalar ve telomerik lokasyonlu rDNA sinyal dağılımları aynı bulunmuştur. Bu guruba

*hispanica*, *glomerata*, *lobata*, *smithii*, *santai*, *aschersoniana* taksonları ve *marina*'ya ait 2 aksesyon girmektedir. Bu taksonlar ortak bir kökene sahip olabilir. Yine bu orana dayanarak, *Dactylis* cinsinin geçmişinde diploid bir atanın yaygın olduğu düşünülebilir. Bununla beraber aksesyonların yaklaşık %35'inde interkalar ve telomerik lokasyonlu rDNA sinyal dağılımlarının farklı olduğu görülmüştür. Bu %35'lik farkı *marina*'ya ait 7 aksesyon (tamamı 9 aksesyon), *smithii*'ye ait bir aksesyon (tamamı 4 aksesyon) ve *woronowii*'ye ait 2 aksesyon (tamamı) oluşturmuştur. Özellikle aksesyon sayısı fazla olan *marina* taksonun sinyal dağılım özellikleri de göz önüne alındığında diğer bütün tetrapoliploidlerden ayrıldığı görülmektedir. Bu taksonun aynı zamanda *woronowii* ve *smithii* ile akrabalığının olabileceği söylenebilir. Ancak *smithii* taksonuna ait 3 aksesyonun diğer tetrapoliploidlere benzer sinyal dağılımı göstermesinden hareketle, *marina*, *woronowii* genomlarının değişime uğradığı sonucu çıkarılabilir. Bu değişimlere çevresel ve genetik faktörlerin etki etme olasılığı bulunmaktadır. Lokasyonlar arası kromozomal değişimlerin bir kısmı poliploidizasyona bir kısmı da diğer genetik faktörlere bağlanabilir. Tetrapoliploidler arası gen akışı veya mayoz bölünme sırasındaki değişimlere bağlı olarak sinyal lokasyonları yer değiştirebilir. Daha önce yapılan kromozomal çalışmalarda, *Dactylis* cinsinde heterozigot translokasyon ve inversyonlardan bahsedilmiştir (Müntzing 1933, Curran 1961, Xie ve ark. 2012).

Diploid *lobata*, *lusitanica*, *himaleyensis*, isimsiz (84) aksesyonlarının sinyal dağılımları aynı olup, 4S(K)+2İK(K)+2T(Y), bu düzen bakımından birçok tetrapoliploid sinyal dağılımı ile paralellik göstermektedir. Diğer diploidlerde sinyal dağılımları daha değişkendir. Diploid *lobata* bitkilerinin tetrapoliploid *lobata* bitkilerinin ataları olduğu kabul edilirse (simpatrik sitotip), birçok *Dactylis* taksonunun diploid *lobata* (*aschersoniana*)'dan kökenlendiğini veya atalarından birinin *lobata* olması gerektiği söylenebilir. Tetrapoliploidlerdeki rDNA sinyal dağılımlarına bakıldığında *marina* ve *woronowii* dışında kalan tetrapoliploid taksonlar bu sinyaller bakımından izdüşümsel bir görünüme sahiptir. Bu durum poliploidizasyon olasılığına dair iyi bir kanıt sunmaktadır. Bununla beraber bazı tetrapoliploidlerin atalarından biri *lobata* gibi bir diploid iken diğeri aynı sayıda sinyal taşıyan *santai* veya farklı sinyal taşıyan *mairi* gibi bir aksesyon da olabilir. Yani kısmen genom farklılığı taşıyan diploidlerin eşleşmeleri, iklimsel ve diğer coğrafik farklılıklar, mayoz bölünme davranışları, tetrapoliploidlerin üreme ve mayoz davranışları, coğrafik dağılımları, iklimsel farklılıklar gibi etkenler, direk otopoliploidizasyon veya hibridizasyon sonrası otopoliploidizasyon, tetrapoliploid genom yapılarının beklenenden farklı olmasına neden olmuş olabilir. Poliploidizasyon öncesi ve sonrası etkenler tetrapoliploidlerde sinyal sayısı ve

dağılımlarının daha fazla çeşitlilik göstermesine sebep olabilir. Bu gibi sebeplerden dolayı bazı *Dactylis* cinsi üyeleri için geniş bir otopoliploidizasyondan bahsedilebilir. Nitekim kloroplast DNA çalışmalarına göre, bazı diploidlerin direk otopoliploidizasyon, bazılarının ise hibridizasyon sonrası otopoliploidizasyon sonucu tetrapoliploid genomların yapısına katılabilecekleri rapor edilmiştir (Lumaret ve ark. 1989, Steward ve Ellison 2015).

Diploid *mairei* ve 87 numaralı aksesyonlar toplamda 10 (6K+4Y) adet sinyale sahip olup, bu sinyaller 4 adet kromozom üzerindeki lokuslara yerleşmişlerdir. Normalde 5 lokasyon dağılımı göstermeleri gerekirken, her iki aksesyonda, bir çift sinyal aynı lokasyonlu bulunmuştur. Yani aynı kromozom üzerinde komşu, 5S ve 25S rDNA (K+Y) sinyalleri bulunmaktadır. Bu bitişik lokasyon *mairei* genomunda telomerik konumlu iken, 87 numaralı genomda sentromerik konumlu yerleşmiştir. Tetrapoliploid aksesyonların bazılarında, çoğunlukla sentromerik konumda çift sinyal özelliği görülmektedir. Bazı tetrapoliploidlerde (17 sinyal taşıyan) bu sinyal çiftini taşıyan kromozomun homologunda yeşil sinyal bulunmamaktadır. Bazılarında ise (18 sinyal taşıyanlar) her iki homolog kromozom her iki çift sinyali de bulundurmaktadır. Tetrapoliploidlerden sadece iki örnekte (biri 16, diğeri 17 sinyal taşımakta) bitişik konumlu sinyallerin her ikisinde yeşil (Y+Y) sinyallerden oluşmaktadır. Diğer tetrapoliploidlerin hepsinde bitişik konumlu sinyaller, her iki sinyalden, (K+Y), oluşmaktadır. Diploid ve tetrapoliploid seviyeler arasında toplam sinyal sayısı bakımından orantısal bir artışın olması yine bitişik konumlu sinyallerin varlığı, bu iki poliploidi seviyesi arasında genetik bir akrabalık olabileceğini göstermektedir. Bununla beraber diğer sinyal özellikleri de dikkate alındığında, bazı *glomerata*, *marina*, *hispanica*, *woronowii* ve *smithii* aksesyonlarının ortak atalarından birinin diploid *mairei* veya 87 numaralı aksesyonlarından birisi olması gerektiği söylenebilir. Her iki poliploidi seviyesi lokasyon farklılıklarına bakarak bazı genetik değişikliklerin olduğu, bu değişikliklerin özellikle yeşil sinyallerde gözlemlendiği söyleyenebilir. Örneğin diploid ve tetrapoliploid *Paspalum* türlerinde 5S ve 25S rDNA sinyal özellikleri FISH ile çalışılmış, diploidlerde 2 adet, tetrapoliploidlerde ise 4 adet 5S rDNA sinyali belirlenmiştir. Fakat diploid örneklerde görülen 4 adet 45S rDNA sinyali bazı tetrapoliploidlerde 6 bazılarında ise 7 adet olarak sayılmıştır. Ayrıca 45S rDNA lokasyon farklılıkları da belirlenmiştir. Bu duruma crossing-overden ziyade yeni kromozomal düzenlemelerinin (translokasyon, delasyon, insersiyon, inversiyon vb...) sebep olabileceği, ayrıca poliploidizasyon sonrası bazı genom indirgenmeleri olabileceği rapor edilmiştir (Vaio ve ark. 2005).

Dikkat çeken bir başka nokta ise diploid *galicia*, *santai* ve 87 (isimsiz) aksesyonların sentromerik lokasyonlarında zayıf yeşil sinyal bulundurması olmuştur. Tetrapoliploid *glomerata*, *marina*, *smithii* ve *hispanica* taksonlarına ait bazı aksesyonların sentromerik lokasyonlarında da 1 veya 2 adet yeşil sinyal bulunmaktadır. Tetrapoliploidlerdeki sentromerik yeşil sinyallerin yoğunlukları diploid sentromerik yeşil sinyal yoğunluklarına oranla daha büyük görünmektedir. Görece bu sinyallerin kopya sayılarının arttığı söylenebilir. Eğer bu diploid örnekler tetrapoliploid örneklerin ataları ise, sinyal yoğunluklarındaki artış yine poliploidizasyona örnek olarak verilebilir. Fakat bunun tersine diploid telomerik yeşil sinyal yoğunlukları tetrapoliploidlerinkinden kısmen daha yoğun görünmektedir. Tetrapoliploidlerdeki bu yoğunluk azalışı, poliploidizasyon sonrası genetik veya epigenetik değişikliklerin olduğuna işaret edebilir. *Artemisia dracunculus* tetrapoliploid örnekleri, diploid atalarına göre sinyal yoğunlukları bakımından değişken bulunmuştur. Tetrapoliploid seviyede sinyal yoğunluklarının artabileceği ama yüksek poliploidi seviyelerinde sinyal yoğunluk küçülmelerinin poliploidi kanıtı olarak sayılabileceği belirtilmiştir (Pellicer ve ark. 2013). Ancak tetrapoliploid seviyede kromozom sayılarının fazlalığı, bu kromozomların simetrik özellikler göstermeleri, FISH tekniğinin uygulanmasına bağlı sıkıntılar sinyal yoğunluk karşılaştırmalarının *Dactylis* poliploidi seviyeleri arası ilişki kurmada çok belirleyici olmadıklarını göstermiştir.

Genel olarak diploid ve tetrapoliploidlerin sinyal dağılımları paralel özellikler göstermiştir. Her iki poliploidi seviyesi sinyal özelliklerine bakarak, hibridizasyon ve genom içi değişimlerinden bahsedebiliriz. Toplam sinyal sayılarındaki orantısal artış diploidlerden poliploidizasyon sonucu tetrapoliploidlerin oluştuğunu göstermektedir. 25S rDNA sayılarındaki orantısal artış da bu durumu desteklemektedir. Fakat 5S rDNA sinyal sayılarına bakıldığında, ilk bakışta poliploidizasyon olayının gerçekleştiği görülmemektedir. Ancak farklı hibridizasyon denemeleri sonucu yeşil sinyallerinde poliploidizasyona uğradığı belirlenmiştir. Bu durumun gerçekleşmesi için belirli sinyal dağılımına sahip diploidlerin eşleşmesi gerekmektedir. Bu durum diploidler arasında belirli eşleşme tercihleri olabileceğinin de kanıtı olarak gösterilebilir.

Bu çalışmada kullanılan diploid aksesyonların ortalama 2C-DNA değeri 4.34 pg (Büyükbaşaran 2010), tetrapoliploid aksesyonlarının ortalama 2C-DNA değeri ise 8.41 pg olarak belirlenmiştir (Tuna 2015). Her iki poliploidi seviyesi arası yaklaşık 1.94 pg kat fark bulunmaktadır. Yine her iki poliploidi seviyesi 2C-DNA içerikleri benzer varyasyonlar

göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak *Dactylis* cinsinde diploidizasyon olayının gerçekleştiğini ve iki poliploidi seviyesi arasında akrabalığın çok yakın olduğu söylenebilir. Benzer poliploidi ve akrabalık durumuna, rDNA sinyali özelliklerini takip edilerek de ulaşmak mümkündür. Çalışmada cinsin genel poliploidizasyon ve akrabalık derecesini belirlemede her iki analiz yöntemi de kullanışlı bulunmuştur. Ancak 2C-DNA içerikleri ile 5S ve 25S rDNA yapıları arasında direkt bir bağlantı görülmemiştir.

Çalışılan tetrapoliploid taksonlar kendi içlerinde ve aralarında rDNA FISH özellikleri açısından büyük bir çeşitlilik göstermiştir. rDNA FISH sinyallerinin sayısı, lokasyon ve dağılım bakımından çeşitlilik göstermesi, taksonların özellikle sistematik karşılaştırması ve poliploidizasyon doğalarının tam olarak anlaşılması açısından yeterli bilgi sunmamış, daha çok genellemeler yapmamıza olanak sağlamıştır. Bu genellemeler, farklı tekniklerin uygulandığı *Dactylis* çalışmaları ile benzerlik göstermektedir (Guignard 1987, Lentz ve ark. 1983, Lumaret ve ark 1989, Amirouche ve Missot 2007, Stewart ve Ellison 2013, 2015). Daha kesin bilgilere ulaşmak için farklı tekniklerin kullanıldığı yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bitki örneklerine ait sitolojik karyotipler, bitkilerin kromozomal yapıları, kromozomal değişimleri, taksonomik ilişkileri ve evrimsel kökenleri hakkında bilgiler sağlar. Asimetrik karyotiplere sahip bitkilerde bu özellikleri belirlemek daha kolaydır. Fakat küçük ve oldukça benzer kromozomlara sahip, poliploidi serilerinden oluşmuş bitkilere ait karyotiplerde bu özellikleri klasik yollarla belirlemek oldukça güç ve hatta bazı bitki türleri için imkânsızdır. Bu gibi durumlarda farklı sitogenetik tekniklerin birlikte kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmada iki poliploidi seviyesine sahip *Dactylis* bitkilerinin, genel kromozom yapıları ve sinyal taşıyan kromozomları çok büyük benzerlikler göstermiştir. Fakat kromozomlara ait sentromer yapıları belirgin olmadığı için, kromozomlar kol oranlarına göre sınıflandırılmamıştır. Bu nedenle hangi kromozom kollarının FISH sinyalleri taşıdıkları net olarak anlaşılamamıştır. Böyle bir durumda sentromer bölgesini belirleyici bant teknikleri ile FISH tekniği kombine kullanılabilir. Bu bilgi farklı *Dactylis* taksonları ve poliploidi seviyeleri arasındaki genetik ilişkiyi belirlemeye katkı sunacaktır. Yaptığımız ön çalışmalarda telomerik ve sentromerik FISH problemleri kullanılmış, telomerik prob belirgin sinyaller vermiş fakat sentromerik prob çalışmamıştır. Bunun muhtemelen nedeni sentromerik prob ile *Dactylis* sentromerik gen yapılarının homoloji göstermemiş olmasıdır. *Dactylis* cinsine özgü sentromerik problemler geliştirildikten sonra farklı FISH teknikleri bu amaç için kullanılabilir.

FISH uygulanacak bitki kromozomlarına ait preparatlar oldukça kaliteli olmalıdır. *Dactylis* popülasyonlarında, çok sayıda ve sağlıklı kök veren bitkiler, mitotik indeksi yüksek hücrelere sahip bulunmuştur. İdeal uzunluk ve yoğunlukta (kısalık) olan, metafaz plağına iyi dağılmış kromozomlara ait FISH desenleri çok kaliteli çıkmış, sinyal özelliklerini belirlemek kolay olmuştur. Ancak özellikle prometafaz aşamalarında gözlemlenen, uzun kromozomlar kolayca kırıldıkları için (preparat sırasında fazla basınç uygulandığı için), sinyal sayılarını belirlemeyi zorlaştırmıştır. Fakat bu yapıdaki kromozomlarda sinyal bölgelerini belirlemek daha kolay olmuştur. Benzer şekilde FISH preparatları hazırlanırken, enzim karışımının kalitesi ve uygulama süresi, denatürasyon, hibridizasyon koşulları, yıkama koşulları gibi adımların hepsinin tek tek çok önemli olduğu, türe özgü optimize edilmesi gerektiği ortaya konmuştur. Bu uygulamaların standartize edilmemesi, FISH resimlerinin arka fonlarında (sitoplazmik, kromozom üstleri) kirliliğe, prob kirliliğine, sinyal yoğunluk ve kalitelerinde

sapmalara neden olmaktadır. Bu gibi durumlar doğru sonuçlar almayı zorlaştırmakta ve bazı aksesyonlara ait FISH sonuçlarının kullanılamamasına neden olmuştur.

Bir lokusta bulunan yüksek kopya sayılı DNA tekrarlarının, diğer kromozomlardaki lokuslarda da benzer özellikler, yüksek sekans homolojisi göstermeleri gerektiği bildirilmiştir (Hanson ve ark. 1996, Thomas ve ark. 2001). *Dactylis* örneklerinde rDNA FISH desenlerinden faydalanarak homolog kromozomları belirlemek daha kolay olmuştur. Özellikle yoğunluk farkları ve sinyal yerleri, benzer morfolojiye sahip homologları belirlemede etkin olmuştur.

Bu çalışmada kullanılan diploid ve tetrapoliploid *Dactylis* taksonları genel olarak benzer sinyal özellikleri yansıtmıştır. Her iki poliploidi seviyesi de 5S ve 25S rDNA FISH sayı lokasyon ve dağılım açısından belirli bir polimorfizim göstermiştir. Bu polimorfizim poliploidi seviyeleri içinde, hatta aynı takson içerisinde de görülmüştür. Diploid taksonlardan; *D. glomerata* forma *galicia*, subsp. *himaleyensis*, subsp. *santai*, subsp. *lusitanica*, subsp. *lobata* ve 84 adlı taksonlara ait genomlar 4 adet (8 lokasyon) 5S ve 25S rDNA sinyali vermiştir. Buna rağmen subsp. *mairei* ve 87 numaralı taksonlara ait genomlar 5 adet (10 lokasyon) 5S ve 25S rDNA sinyali vermiştir. 25S rDNA sinyal sayısı genom başına 2 veya 3 (4 veya 6 lokasyon), 5S rDNA sinyal sayısı ise 1 veya 2 (2 veya 4 lokasyon) şeklinde bulunmuştur. Sinyal sayılarının ardışık olması ve benzer lokasyon özellikleri göstermeleri, diploidlerin genetik köken olarak birbirlerine yakın olduklarını göstermektedir. Fakat en az ve en çok sinyal sayısı arasındaki fark yanı sıra sinyal dağılım farklılıkları dikkate alındığında, diploidler için bazı genetik farklılaşmalardan söz etmek mümkündür. Ayrıca 5S rDNA sayılarındaki çeşitlilik diploid *Dactylis* genotiplerinde de poliploidizasyon olabileceğini göstermektedir. Bu durumun açıklığa kavuşturulması için çok sayıda örnekle çalışılması gerekmektedir. Yukarıdaki örneklerin hepsi hem tek aksesyonla çalışılmış hem de tüm diploid taksonları karşılamamaktadır. Tüm diploidler çalışıldığında farklı sayıda sinyal sayısı taşıyan örneklere rastlamak mümkün olabilir.

Tetrapoliploid *Dactylis* taksonları, *D. glomerata* subsp. *glomerata*, subsp. *marina*, subsp. *hispanica*, subsp. *lobata*, subsp. *aschersoniana*, subsp. *smithii*, subsp. *woronowii*, subsp. *santai* adları altında çalışılmıştır. Takson içi ve arası, 5S ve 25S rDNA sinyal özellikleri bakımından belirli bir polimorfizim saptanmıştır. Fakat bu polimorfizim benzer dalgalanmalar göstermiştir. Taksonların sinyal polimorfizimleri intraspesifik özellikler göstermiştir. Tetrapoliploid *glomerata*, *hispanica*, *lobata*, *aschersoniana*, *smithii* ve *santai*'ye ait



aksesyonlar, sinyal sayıları bakımından çeşitlilik gösterebilir, bu sinyallerin lokasyonlara dağılımı hepsinde önemli bir benzerlik göstermiştir. Aynı şekilde *marina* ve *woronowii* taksonlarına ait aksesyonlar sinyal dağılımları açısından kısmen benzer özellikler sergilemiştir. Bu aksesyonların toplanma yerlerinin bilinmemesi ve elimizde simpatrik aksesyonların olmaması, taksonlar arasında net karşılaştırmaların yapılmasına engel olmuştur. Tetrapoliploid aksesyonlara ait genomlar toplamda 6, 8, 9 (12, 16, 18 lokasyon) sayı düzeninde rDNA FISH sinyal çeşitliliği göstermiştir. Genomlar arasında ve içinde, yukardaki sinyal çeşitliliğinin görülmesinin en büyük sebebi, 25S (kırmızı) rDNA sayılarında görülen farklılıklar olmuştur. Tetrapoliploid genomlarda kırmızı sinyaller, 4, 5, 6, 7, (8, 10, 12, 14, lokasyon) sayı düzeninde bir çeşitlilik göstermiştir. Bu sinyallerin neredeyse tamamı perisentromerik lokasyonlara dağılmıştır. Telomerik lokasyonlarda (telomer ve subtelomer); subsp. *marina* ve subsp. *woronowii* dışında, bütün taksonlarda bir adet 25S (kırmızı) rDNA sinyali belirlenmiştir. Tetrapoliploid aksesyonların genomlarında 5S rDNA sinyal sayısı, 2 (4 lokasyon) veya 3 (6 lokasyon) bulunmuştur. Aksesyonların hepsi telomerik konumlarında 2 (4 lokasyon) adet 5S rDNA sinyali göstermiş, sadece 31 aksesyondan 12 tanesi bu iki sinyale ek bir adet daha 5S rDNA sinyali göstermiştir. Bu ekstra yeşil sinyal 9 aksesyonda da sentromerik lokasyonda kırmızı sinyal ile bitişik görülmüştür. Sadece 3 aksesyonda bu yeşil sinyalin homoloğu görülmemiştir. İki aksesyonun interkalar bölgesinde ise yeşil sinyale rastlanmıştır.

Diploid aksesyonlardan, subsp. *galicia*, *santai* ve *mairei*'nin sinyal dağılımları düzensiz iken, subsp. *lusitanica*, *himalayensis*, *lobata*'nın sinyal dağılımları daha düzenli ve tetrapoliploidlerinkine benzer bulunmuştur. Özellikle subsp. *lusitanica*, *lobata*, *himalayensis* gurubunun, yakın sinyal özellikleri göstermeleri, diğer diploidlerden coğrafik olarak daha yaygın olan *lobata* (*aschersoniana*) genomunun, tetrapoliploid genomlara daha fazla etki yapmış olduğuna işaret etmektedir. Stebbins ve Zohary (1959) coğrafik dağılımlarından yola çıkarak, *D. g. ssp. aschersoniana*, *D. g. ssp. himalayensis* ve *D. g. ssp. smithii*'nin cinsin eski üyeleri olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda diploid subsp. *aschersoniana* ve subsp. *himalayensis*'in benzer iklim koşullarında yetiştiklerini söylemişlerdir. 5S ve 25S rDNA FISH sonuçlarına göre, subsp. *lobata* (*aschersoniana*), *himalayensis*'e ek olarak subsp. *lusitanica*'nında cinsin eski üyesi olabileceği söylenebilir.

Tetrapoliploidlerde toplam sinyal sayı artışları ki, bu artışlar 25S (kırmızı) sinyallerin artışından kaynaklanmakta, diploidlerinkinden 1.5 veya 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Benzer şekilde sinyal yoğunluklarındaki kısmi değişimler dikkate alındığında, tetrapoliploid *Dactylis* taksonlarının poliploidizasyon sonucu diploidlerden kökenlendiklerini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda diploidlerde 5S ve 25S rDNA sayıları aynı sayısal çeşitliliğe sahip iken tetrapoliploidlerde 25S (45S) lokusları daha fazla sayısal çeşitlilik göstermiştir. Ayrıca her iki poliploidi seviyesinin poliploidizasyon ile ilişkili olduğu, fakat 5S (yeşil) sinyalinde ilk bakışta bunun görülemeyeceği bulunmuştur.

Diploid genomlarda 1 ve 2 olan 5S rDNA sinyal sayıları, tetrapoliploid genomlarda 2 veya 3 olarak sayılmıştır. Tetrapoliploid aksesyonlarda 1 adet 5S rDNA sinyali taşıyan aksesyon gözlemlenmemiştir. Bu durum poliploidizasyona işaret etmektedir. Bazı tetrapoliploid genomlarda, diploid genomlarda olduğu gibi 2 adet yeşil sinyal gözlemlenmesi, direk otopoliploidizasyona işaret etmektedir. Bazı tetrapoliploid genomlarda 3 adet yeşil sinyal görünmesi, kısmen veya tamamen farklı diploidler arası hibridizasyon sonrası poliploidizasyon olayının gerçekleştiğini göstermektedir. Elimizdeki diploid ve tetrapoliploid taksonlar yukarıdaki kombinasyonlar ölçeğinde eşleştirildiğinde, bazı eşleştirme sonuçlarında ortaya çıkan döllerde 5S rDNA FISH sinyal sayıları fazla çıkmaktadır. Bu durumda; (1) sadece bazı diploidlerin gametlerinin katlanması gerektiği, (2) triploidleri oluşturan ataların ve dölleyen diploidlerin veya tetrapoliploidlerin önemli olduğu, (3) indirgenmemiş gamet oluşturan diploidlerin ve normal gamet oluşturan tetrapoliploidlerin önemli olduğu, (4) indirgenmemiş gamet oluşturan iki diploidin önemli olduğu, sonuçlarına varılabilir. Tüm bu sonuçlar, *Dactylis* cinsinin evriminde, kısmen otopoliploidi ve kısmen ise allopoliploidinin etkili olduğunu göstermektedir. Fakat yukarıdaki gibi bir sinyal sayı durumunun ortaya çıkması için her iki durumda da 5S rDNA (yeşil) sinyal sayıları az olan diploidlerin eşleşmelere katılmaları gerekmektedir. Bu durumda *lobata*, *himaleensis* ve *lusitanica* gibi diploidlere ait indirgenmemiş gametlerin katlanması veya diğer diploidler ile eşleşmeleri gerekmektedir. Yanı sıra bu diploidlerin triploidleri ile diğer diploidlerin (genetiği farklılaşmış), örneğin *mairei* ürettikleri normal gametler eşleşebilir. Bu durum bazı tetrapoliploidlerde yeşil sinyal sayısının 5 veya 6 olmasını ve aynı zamanda az sayıda aksesyonda görülmelerini de açıklamaktadır.

Eşleştirmeler kırmızı sinyal sayıları için yapıldığında, bütün eşleştirmelerde kırmızı sinyal sayılarında katlanmalar olmakta, fakat bazı eşleştirme sonuçlarında sinyal eksiklikleri, örneğin tek sinyal sayıları, görülmektedir. Bu sinyal eksikleri genom içi farklılaşmalar veya diğer genomların hibridizasyonu ile tamamlanabilir. Bu durum *Dactylis* genomunda 25S

rDNA sinyallerinin daha dinamik, 5S rDNA sinyallerinin ise daha korunaklı bir genetik yapıya sahip olduklarını göstermektedir. Poliploidizasyon sonrası genetik veya epigenetik değişimlere bağlı olarak belirli genetik elemanların yapısının değiştiği aktarılmıştır (Soltis ve ark. 2015). Çalışmamızda elde ettiğimiz bu çıkarımlara benzer şekilde, İtalyan çiminde de (*Lolium multiflorum* Lam.) 5S rDNA bölgelerinin oldukça korunduğu, 45S rDNA bölgelerinin ise çeşitlilik gösterdiği belirtilmiştir (Bustamante ve ark. 2014)

Sonuçlar, poliploidizasyon ile beraber tetrapoliploid *Dactylis* taksonlarında hem 5S hem de 25S rDNA yapılarının iki katına çıktığını göstermektedir. Ancak başlarda diploid veya tetrapoliploid bitkilerin poliploidizasyonunda, *lobata* gibi (3 adet 25S ve 1 adet 5S) bir diploid genomun yaygın olması nedeniyle 25S rDNA sayısı tetrapoliploidlerde hayli fazla olmaktadır. Daha sonra genetik yapısı farklılaşan diploidlerin oluşması ve hibridizasyon olaylarına katılmaları ile *Dactylis* cinsinin bugün ki karmaşık filogenisi ortaya çıkmış gibi görünmektedir. Benzer şekilde, *A. dracuncululus* diploidlerinin çoğunda iki adet 35S ve 5S rDNA lokusu belirlenmiş, bu iki lokusun cins için atasal bir işaret olduğu sonucuna varılmıştır. Farklı coğrafik kökenli diploid bitkilerde bu lokasyonların 3 veya 5 olması, cinsin başka bir koldanda evrimleştiği sonucuna götürmüştür (Pellicer ve ark. 2013). Diploid *Dactylis*'lerde toplam 8 veya 10 sinyal olması cinsin farklı kollardan evrimleştiği anlamına gelmektedir.

Telomerik ve subtelomerik lokasyonlu rDNA lokusları, kromozomlar arası gen etkileşimine imkân sağlamaktadır. Bu şekilde oluşabilecek eşit olmayan değişimler, sekans kopya sayılarının artma veya azalmasına neden olabilir. Bu yüzden Bazı türlerde görülen sinyal büyüklük farklılıkları bazı durumlardan dolayı olasıdır (Pellicer ve ark. 2013, Bustamante ve ark. 2014). Poliploidizasyon ve rDNA FISH ilişkili çalışmalarda ki bunların çoğunu allopoliploid türler oluşturmaktadır. Özellikle 45S rDNA fragmentlerinin kırıldığı, poliploidizasyonun mayoz, genetik ve epigenetik değişimler üzerine etkilerine bağlı olarak, sayılarının poliploidi seviyeleri arasında ve içinde değiştiği aktarılmıştır (Huang ve ark. 2009, Huang ve ark. 2012, Bustamante ve ark. 2014). Çalışmamızda 25S (45S) rDNA lokasyonları çoğunlukla sentromerik alanda ve 5S rDNA lokasyonları ise çoğunlukla telomerik alanlarda gözlemlenmiştir. Takson içi kırmızı (25S) sinyal değişimlerinin çoğu sentromerik alanda tespit edilmiş olsada, bazı aksesyonlarda sinyal artışına bağlı olarak, kırmızı sinyallerin interkalar veya telomerik alanlara yerleştikleri görülmektedir. Yeşil sinyallerde ise 4 (telomerik) üzeri olan sinyallerin neredeyse hepsi sentromerik (bazılara interkalar) alanlarda

görülmüştür. Bunun gibi kısmi lokasyon farklılıkları, lokasyon çoğalmaları, yukarıda belirtildiği gibi kromozomal farklılaşmalara, cins içi üreme durumlarına ve poliploidizasyon olaylarına bağlanabilir.

*Dactylis* evriminde, 5S rDNA ve 25S rDNA genetik elemanlarının her ikisinin de önemli olduğu, her iki yapısında poliploidizasyon ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Cinsin poliploidizasyonunda diploid ve triploid bitkilerin her ikisinin de etkili olduğu, fakat indirgenmemiş gamet oluşturan veya hibridize olan diploidlerin tetrapoliploid oluşumunda daha etkili olduğu belirlenmiştir. Farklı sinyal özelliği gösteren diploidlerin olması, cinsin farklı kollardan geliştiğini göstermektedir. Fakat başlarda cinsin kökeninde ortak bir diploidin etkili olabileceği sonraları diploid taksonların artmış olabileceği de söylenebilir. Cinsin poliploidizasyonunda otopoliploid yanı sıra bazı tetrapoliploidlerde geniş bir otopoliploidizasyon (segmental otopoliploidizasyon) olgusundan bahs edilebilir. Bazı tetrapoliploidler için segmental allopoliploidizasyondan bahs etmek için, tetrapoliploidleri oluşturan diploidlerin yeterli genetik farklılık gösterip göstermedikleri belirlenmelidir. Özellikle 25S rDNA sayılarında çeşitlilik görülmesi, bu yapıların cinsin filogenetik ilişkilerini belirlemede etkin kullanılmayacaklarını göstermiştir. Daha az sayısal çeşitlilik gösteren ve genetik takibi kolay olan 5S DNA yapıları, cinsin filogenetik ilişkilerini belirlemede daha etkin kullanılabilir. Yukarıdaki bulgulara dayanarak 5S ve 25S rDNA yapılarının, *Dactylis* cinsinin genetik değişimi için önemli bilgiler sağladığı, fakat daha fazla kromozomal bilgi elde etmede, genomlar arasında kesin ayrımlar yapmak için tek başına yeterli bilgi sunmadıkları görülmüştür. Bu bulgulara dayanarak intraspesifik üreme durumu gösteren, taksonomik sınıflandırması sıkıntılı cinslerin genetik kökenleri ve değişimlerini anlamak için farklı karşılaştırma teknikleri bir arada kullanılmalı veya geliştirilmelidir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abreu IS, Carvalho CR, Soares FA (2015). Early sex discrimination in *Carica papaya* by nuclei FISH. *Euphytica*, 206(3), 667-676.
- Açıköz E (2001). Yem Bitkileri. III. Baskı, U.Ü. Güçlendirme Vakfı Yayın No: 182, Bursa, 167-172.
- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR (2000). Ribosomal evolution and phylogeny in *Aloe* (*Asphodelaceae*). *American Journal of Botany*, 87(11), 1578-1583.
- Agarwal M, Shrivastava N, Padh H (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4), 617-631.
- Akiyama Y, Yamada-Akiyama H, Yamanouchi H, Takahara M, Ebina M, Takamizo T, Nakagawa H (2008). Estimation of genome size and physical mapping of ribosomal DNA in diploid and tetraploid guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland science*, 54(2), 89-97.
- Akiyama Y, Yamada-Akiyama H, Ebina M (2010). Morphological diversity of chromosomes bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species. *Grassland science*, 56(4), 217-223.
- Altın M, Gökkuş A, Koç A (2011). Çayır ve Mera Yönetimi (2. Cilt). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü. Ankara
- Amirouche N, Misset MT (2007). Morphological variation and distribution of cytotypes in the diploid-tetraploid complex of the genus *Dactylis* L.(Poaceae) from Algeria. *Plant Systematics and Evolution*, 264(3-4), 157-174.
- Ananiev EV, Phillips RL, Rines HW (1998). Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:13073-13078.
- Annicchiarico P, Pecetti L, Bouzerzour H, Kallida R, Khedim A, Porqueddu C, Lelièvre F (2011). Adaptation of contrasting cocksfoot plant types to agricultural environments across the Mediterranean basin. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 82-89.
- Anonim (2015). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (Tohum Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü 2015). Domuz Ayrığı Tescil Raporu, <http://www.tarim.gov.tr/Bugem/TTsm>. Erişim Tarihi 24.03.2015
- Anonim (2015). Publications on plant rDNA loci. [www.plantrdnadatabase.com](http://www.plantrdnadatabase.com). Erişim Tarihi 04.05.2015.
- Anonim (2015). *Dactylis glomerata* ([www.theplantlist.org/1/](http://www.theplantlist.org/1/)). Erişim Tarihi 24.04.2015.
- Anonim(2015).ChromosomeCountDatabase.Dactylis glomereta (<http://ccdb.tau.ac.il/search/Dactylis/>). Erişim Tarihi 12.04.2015.
- Anonim (2019). *In situ* hybridization. <http://www.enzolifesciences.com>. Erişim Tarihi 2.06.2019
- Apirion D, Zohary D (1961). Chlorophyll lethal in natural populations of the orchard grass (*Dactylis glomerata* L.). A case of balanced polymorphism in plants. *Genetics*, 46(4), 393.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant molecular biology reporter*, 9(3), 229-241.
- Ardouin P, Fiasson JL, Jay M, Lumaret R, Hubac JM (1985). Chemical diversification within the *Dactylis glomerata* L. polyploid complex (Gramineae). NATOASI (Advanced Study Institute) series. Series G. Ecological sciences.
- Aronson JA, Kigel J, Shmida A (1990). Comparative plant sizes and reproductive strategies in desert and Mediterranean populations of ephemeral plants. *Israel journal of botany*, 39(4-6), 413-430.
- Auricht G, Hughes S, Humphries A, Hall E. (2010). Plant collection in Kazakhstan and Azerbaijan for forage improvement in Australia. In Sustainable use of genetic diversity in forage and turf breeding (pp. 47-59). Springer, Dordrecht.

- Ayan I, Mut H, Acar Z, Tongel MO (2006). Determination of some agricultural and cytological characters of natural cocksfoot plants (*Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(12), 2298-2302.
- Aygün C, Çakal Ş, Kara A, ATA E Müdürlüğü (2009). Characterization of some cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) lines from the natural rangelands of Eastern Anatolia. *Biological Diversity and Conservation*, 2(2), 57-64.
- Badaeva ED, Ruban AS, Aliyeva-Schnorr L, Municio C, Hesse S, Houben A (2017). *In situ* Hybridization to Plant Chromosomes. *Fluorescence In situ Hybridization (FISH) Application Guide*, 477-494.
- Badakshi F (2014). Genomes in the evolution of polyploid crop species and hybrids (Doctoral dissertation, Department of Biology).
- Bennett MD (1987). Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New phytologist*, 106(s1), 177-200.
- Benson M, Borrill M (1969). The significance of clinal variation in *Dactylis marina* Borrill. *New Phytologist*, 68(4), 1159-1173.
- Bennetzen JL (2000). Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol. Biol.* 42:251-269.
- Bickmore WA (2001). Karyotype analysis and chromosome banding. eLS.
- Birchler J, Gao Z, Han F (2009). A tale of two centromeres diversity of structure but conservation of function in plants and animals. *Funct Integr Genomics* 9:7–13.
- Bondesen OB, (2007). Seed production and seed trade in a globalised world. Seed production in the northern light. *Proc. 6th Int. Herbage Seed Conf. Norway*, 9-12
- Borrill M (1961a). The pattern of morphological variation in diploid and tetraploid *Dactylis*. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 56(368), 441-452.
- Borrill M (1961b). *Dactylis marina* Borrill, sp. nov., a natural group of related tetraploid forms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 56(368), 431-439.
- Borrill M ve Jones K (1961). Hexaploid *Dactylis*. *Nature*, 190(4774), 469.
- Borrill M, Carroll CP (1969). A chromosome atlas of the genus *Dactylis* (Part two). *Cytologia*, 34(1), 6-17.
- Borrill M, Lindner R (1971). Diploid-tetraploid sympatry in *Dactylis* (Gramineae). *New Phytologist*, 70(6), 1111-1124.
- Borrill M (1977). Evolution and genetic resources in cocksfoot. *Ann. Rep. Welsh Pl. Breed. Stat*, 1977, 190-209.
- Borrill M (1978) Evolution and genetic resources in cocksfoot. *Rep. Welsh Plant Breeding St. for 1977*, pp 190–209, Aberystwyth, UK.
- Borrill M (1991). Evolution and genetic resources in cocksfoot. In *Developments in Plant Genetics and Breeding* (Vol. 2, pp. 379-397). Elsevier.
- Boyer JS (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218(4571), 443-448.
- Breda E, Wolny E, Hasterok R (2012). Intraspecific polymorphism of ribosomal DNA loci number and morphology in *Brachypodium pinnatum* and *Brachypodium sylvaticum*. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 17(4), 526-541.
- Bretagnolle F, Lumaret R (1995). Bilateral polyploidization in *Dactylis glomerata* L. subsp. *lusitanica*: occurrence, morphological and genetic characteristics of first polyploids. *Euphytica*, 84(3), 197-207.
- Bretagnolle F, Thompson JD (2001). Phenotypic plasticity in sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata*. *International Journal of Plant Sciences*, 162(2), 309-316.

- Brown JD, R.J O'Neill (2010). Chromosomes, conflict, and epigenetics: Chromosomal speciation revisited. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11:291–316. doi:10.1146/annurevgenom-082509-141554.
- Budiman MA, Chang SB, Lee S, Yang TJ, Zhang HB, de Jong H, Wing RA (2004) Localization of jointless-2 gene in the centromeric region of tomato chromosome 12 based on high resolution genetic and physical mapping. *Theor. Appl. Genet.* 108:190-196.
- Bushman BS, Larson SR, Tuna M, West MS, Hernandez AG, Vullaganti D, Thimmapuram J (2011). Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) EST and SSR marker development, annotation, and transferability. *Theoretical and applied genetics*, 123(1), 119-129.
- Bustamante FO, Rocha LC, Torres GA, Davide LC, Mittelmann A, Techio VH (2014). Distribution of rDNA in Diploid and Polyploid Lam. and Fragile Sites in 45S rDNA Regions. *Crop Science*, 54(2), 617-625.
- Büyükbaşar A (2010). Bazı Diploid *Dactylis* Taksonlarının Sitolojik Olarak Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Türkiye ).
- Cai Q, Zhang D, Liu ZL, Wang XR (2006). Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annals of Botany*, 97(5), 715-722.
- Campbell BR, Song Y, Posch TE, Cullis CA, Town CD (1992). Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 112: 225–228.
- Can M, Ayan İ (2017). Domuz Ayırığı (*Dactylis glomerata* L.) Popülasyonlarında Gelişme Dönemlerine Göre Verim ve Bazı Özelliklerin Değişimi. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(2), 160-166.
- Catalán P, Müller J, Hasterok R, Jenkins G, Mur LA, Langdon T, López-Alvarez D. (2012). Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Annals of Botany*, 109(2), 385-405.
- Casler MD, Fales SL, McElroy AR, Hall MH, Hoffman LD & Leath KT. (2000). Genetic progress from 40 years of orchardgrass breeding in North America measured under hay management. *Crop Science*, 40(4), 1019-1025.
- Castro M, Fraga P, Torres N, Rosselló JA. (2007). Cytotaxonomical observations on flowering plants from the Balearic Islands. In *Annales Botanici Fennici* (pp. 409-415). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Cheng Z, Buell CR, Wing RA, Jiang J (2002). Resolution of fluorescence in-situ hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. *Chromosome Research*, 10(5), 379-387.
- Chen ZJ, Pikaard CS (1997). Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3442-3447.
- Chester M, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE (2010). Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). *Genes*, 1(2), 166-192.
- Clausen J, Keck DD, and Hiesey WM (1945). Experimental studies on the nature of species. II. Plant evolution through amphidiploidy and autopolyploidy, with examples from the Madiinae. *Carnegie Inst. Wash. Publ.* no. 564.
- Copani V, Testa G, Lombardo A, Cosentino SL (2013). Evaluation of populations of *Dactylis glomerata* L. native to Mediterranean environments. *Crop and Pasture Science*, 63(12), 1124-1134.
- Curran PL (1961). Microsporogenesis in native and introduced forms of *Dactylis glomerata* L. *Sci. Proceeding Royal Dublin Society, Series A, I*, 215-231,.

- Creber HMC, Davies MS, Francis D, Walker HD (1994). Variation in DNA C value in natural populations of *Dactylis glomerata*. *New Phytologist* 128: 555-561.
- CSHL/WUGSC/PEB Arabidopsis Sequencing Consortium (2000) The complete sequence of a heterochromatic island from a higher eukaryote. *Cell*, 100:377-386.
- Davies JG (1927). The chromosome number in *Dactylis glomerata* (Cocksfoot). *Nature*, 119, 236-237.
- De Haan A, Maceira NO, Lumaret R, Delay J (1992). Production of 2n gametes in diploid subspecies of *Dactylis glomerata* L. 2. Occurrence and frequency of 2n eggs. *Annals of Botany*, 69(4), 345-350.
- Dechyeva D, Schmidt T (2016). Fluorescent *In situ* Hybridization on Extended Chromatin Fibers for High-Resolution Analysis of Plant Chromosomes. *Plant Cytogenetics: Methods and Protocols*, 23-33.
- Divashuk MG, Khuat TML, Kroupin PY, Kirov IV, Romanov DV, Kiseleva AV, Razumova OV (2016). Variation in Copy Number of Ty3/Gypsy Centromeric Retrotransposons in the Genomes of *Thinopyrum intermedium* and Its Diploid Progenitors. *PloS one*, 11(4), e0154241.
- Domin K (1943) Monograficka studie o rodu *Dactylis* L. *Acta both bohém* 14:3–147.
- Dong, F, Song J, Naess SK, Helgeson JP, Gebhardt C, Jiang J (2000). Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(7), 1001-1007.
- Doroszewska A (1963). An investigation on the diploid and tetraploid forms of *Dactylis glomerata* L. subsp. *woronowii* (Ovczinn.) Stebbins et Zahary. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 32(1), 113-130.
- Dos Reis GB, Mesquita AT, Torres GA, Andrade-Vieira LF, Vander Pereira A, Davide LC. (2014). Genomic homeology between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* (*Poaceae*). *Comparative cytogenetics*, 8(3), 199.
- Eagles CF (1967). The effect of temperature on vegetative growth in climatic races of *Dactylis glomerata* in controlled environments. *Annals of Botany*, 31(1), 31-39.
- Eagles CF, Othman O. M. A. R (1978). Physiological studies of a hybrid between populations of *Dactylis glomerata* from contrasting climatic regions. II. Intra population variation. *Annals of Applied Biology*, 89(1), 81-88.
- Elçi Ş (2005), Buğdaygil ve Baklagil Yem Bitkileri. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı
- Falisticco E, Torricelli R (2016). Phenotypic variation and performance of diploid subspecies of *Dactylis glomerata* L. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 150(4), 692-701
- Fejer SO (1966). Growth and reproduction of New Zealand, Mediterranean, and hybrid *Dactylis glomerata* after short day and temperature treatments. *Canadian Journal of Plant Science*, 46(3), 233-241.
- Fengler K, Allen SM, Li B, Rafalski A (2007). Distribution of Genes, Recombination, and Repetitive Elements in the Maize Genome. *Crop Sci.* 47(Suppl2):S-83-S-95.
- Fernández-Núñez E, Castro M (2016). Management of agroforestry systems: ecological, social and economic approaches
- Fiasson JL, Ardouin P, Jay M (1987). A phylogenetic ground plan of the specific complex *Dactylis glomerata*. *Biochemical systematics and ecology*, 15(2), 225-229.
- Figueroa DM, Bass HW (2010). A historical and modern perspective on plant cytogenetics. *Briefings in functional genomics*, 9(2), 95-102.
- Figueroa DM, Amarillo IE, Bass HW (2012). Cytogenetic Mapping in Plants. In *Plant Cytogenetics* (pp. 79-119). Springer New York.



- Fominaya A, Loarce, Y, González JM, Ferrer E. (2016). Tyramide Signal Amplification: Fluorescence *In situ* Hybridization for Identifying Homoeologous Chromosomes. *Plant Cytogenetics: Methods and Protocols*, 35-48.
- Francoz E, Ranocha P., Pernot C, Le Ru A, Pacquit V, Dunand C, Burlat V (2016). Complementarity of medium-throughput *In situ* RNA hybridization and tissue-specific transcriptomics: case study of Arabidopsis seed development kinetics. *Scientific reports*, 6.
- Fransz P, Armstrong S, Alonso-blanco C, Fischer TC, Torres-ruiz RA, Jones, G (1998). Cytogenetics for the model system Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 13(6), 867-876.
- Fransz PF, Armstrong S, de Jong JH, Parnell LD, van Drunen G, Dean C, Zabel P (2000) Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell*, 100:367-376.
- Fransz P, de Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I (2002) Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99:14584-14589.
- Fulnecek J, Matyasek R, Kovarik A (2006). Plant 5S rDNA has multiple alternative nucleosome positions. *Genome*, 49(7), 840-850.
- Garcia S, Garnatje T, Kovařík A (2012). Plant rDNA database: ribosomal DNA loci information goes online. *Chromosoma*, 121(4), 389-394.
- Garcia S, Gálvez F, Gras A, Kovařík A, Garnatje T (2014). Plant rDNA database: update and new features. *Database*, 2014.
- Gall JG, Pardue ML (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 63:378-383.
- Gauthier P, Lumaret R, Bedecarrats A (1998). Ecotype differentiation and coexistence of two parapatric tetraploid subspecies of cocksfoot (*Dactylis glomerata*) in the Alps. *The New Phytologist*, 139(4), 741-750.
- Gauthier P, Lumaret R., Bedecarrats A (1999). Genetic introgression between tetraploid *Dactylis glomerata* subsp. *reichenbachii* and *glomerata* in the French Alps. Insight from morphological and allozyme variation. *Plant Systematics and Evolution*, 214(1), 219-234.
- Grabowska-Joachimiak A, Kula A, Gernand-Kliefoth D, Joachimiak AJ (2015). Karyotype structure and chromosome fragility in the grass *Phleum echinatum* Host. *Protoplasma*, 252(1), 301-306.
- Grant V (1981). *Plant speciation*. New York, USA: Columbia University Press.
- Gregory TR. (2005). The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. *Annals of botany*, 95(1), 133-146.
- Grob S, Schmid MW, Luedtke NW, Wicker T, Grossniklaus U. (2013). Characterization of chromosomal architecture in Arabidopsis by chromosome conformation capture. *Genome biology*, 14(11), R129.
- Grover A, Sharma PC (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 290-302.
- Guerra M, Kenton A, Bennett MD (1996). rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by in situ hybridization. *Annals of Botany*, 78(2), 157-161.
- Guerra M (2012). Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(3), 703-710.
- Guignard G (1985) *Dactylis glomerata* subsp. *oceanica*, a new takson of the Atlantic coast. *Bull Soc Bot France Let Bot* 132:341–346.
- Guignard G. (1987). Caryologie chez trois taxa tétraploïdes du genre *Dactylis* (Poaceae). *Takson*, 29-33.

- Gür M, Şen C (2016). Trakya Bölgesinde Doğal Bir Merada Tespit Edilen Baklagiller ve Buğdaygiller Familyalarına Ait Bitkilerin Bazı Özellikleri. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 13(1).
- Hamon P, Siljiak-Yakovlev S, Srisuwan S, Robin O, Poncet V, Hamon S, De Kochko A (2009). Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. *Chromosome Research* 17: 291-304.
- Hanson AA, Hill HD (1953). The Meiotic Behavior of Hexaploid Orchard Grass (*Dactylis glomerata* L.). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 113-122.
- Hanson, AA, Carnahan, HL (1956). Breeding perennial forage grasses. *Tech. Bull*, 1145.
- Hanson, RE, Islam-Faridi, MN., Percival, EA., Crane CF, Ji Y, McKnight TD, Price HJ (1996). Distribution of 5S and 18S–28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma*, 105(1), 55-61.
- Hasterok R, Jenkins G, Langdon T, Jones RN, Maluszynska J (2001). Ribosomal DNA is an effective marker of Brassica chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(4), 486-490.
- Hasterok R, Draper J, Jenkins G (2004). Laying the cytotaxonomic foundations of a new model grass. *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. *Chromosome Research*, 12(4), 397-403.
- Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kowalczyk M, Kulak-Ksiazczyk S, Ksiazczyk T, Maluszynska J (2006a). Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of *Brassicaceae*. *Annals of Botany*, 97(2), 205-216.
- Hasterok R, Marasek A, Donnison IS, Armstead I, Thomas A, King IP, Jenkins G. (2006b). Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence *In situ* hybridization. *Genetics*, 173(1), 349-362.
- Hasterok (2015). Yazılı görüşme. Department of Plant Anatomy and Cytology Faculty of Biology and Environment Protection University of Silesia in Katowice, Poland
- Hatipoğlu R, Hesemann CU, Gland A. (1992). Cytological researches on *Dactylis* subsp. populations collected from natural pastures in Cukurova University Campus. *Cukurova University. J. Agric. Fac*, 7, 141-156.
- Hatipoğlu R, Kökten K (2009). Domuz ayrığı (*Dactylis* sp. L.). TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü.
- Houben A (2017). B Chromosomes—A Matter of Chromosome Drive. *Frontiers in plant science*, 8.
- Heslop-Harrison JS (2000). Comparative genome organization in plants: From sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell* 12:617–635.
- Hirata M, Yuyama N, Cai H (2011). Isolation and characterization of simple sequence repeat markers for the tetraploid forage grass *Dactylis glomerata*. *Plant breeding*, 130(4), 503-506.
- Hizume M, Shibata F, Matsusaki Y, Garajova Z (2002). Chromosome identification and comparative karyotypic analyses of four *Pinus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(4), 491-497.
- Hu WWL, Timothy DH (1971). Cytological studies of four diploid *Dactylis* subspecies, their hybrids and induced tetraploids. *Crop Sci* 11: 203–207.
- Huang J, Ma L, Sundararajan S, Fei SZ, Li L (2009). Visualization by atomic force microscopy and FISH of the 45S rDNA gaps in mitotic chromosomes of *Lolium perenne*. *Protoplasma* 236:59–65. doi:10.1007/s00709-009-0051-x
- Huang M, Li H, Zhang L, Gao F, Wang P, Hu Y, Liu X (2012). Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. *PloS one*, 7(4), e35139.
- Huang LK, Yan HD, Zhao XX, Zhang XQ, Wang J, Frazier T, Ma X (2015). Identifying differentially expressed genes under heat stress and developing molecular markers in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) through transcriptome analysis. *Molecular ecology resources*, 15(6), 1497-1509.

- Hubbel HR. (1985). Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol.* 60:284-294.
- Idziak D, Robaszkiewicz E, Hasterok R (2015). Spatial distribution of centromeres and telomeres at interphase varies among *Brachypodium* species. *Journal of experimental botany*, 66(21), 6623-6634.
- International Barley Genome Sequencing Consortium (IBGSC). (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491(7426), 711-716.
- Jafari A, Naseri H (2007). Genetic variation and correlation among yield and quality traits in cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). *The Journal of Agricultural Science*, 145(6), 599-610.
- Jay M, Lumaret R (1995). Variation in the subtropical group of *Dactylis glomerata* L.—2. Evidence from phenolic compound patterns. *Biochemical systematics and ecology*, 23(5), 523-531.
- Jenkins G (1983). Chromosome pairing in *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring. *Carlsberg Research Communications*, 48(3), 255-283.
- Jenkins G, Hasterok R (2007). BAC'landing'on chromosomes of *Brachypodium distachyon* for comparative genome alignment. *Nature Protocols*, 2(1), 88-98.
- Jiang J, Gill BS (1994). Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome*, 37(5), 717-725.
- Jiang J, Gill BS (2006). Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49: 1057–1068. doi: 10.1139/g06-076.
- Jiang LF, Qi X, Zhang XQ, Huang LK, Ma X, Xie WG (2014). Analysis of diversity and relationships among orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) accessions using start codon-targeted markers. *Genet. Mol. Res.* 13, 4406-4418.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582–7
- Jones K, Carroll CP, Borrill M (1961). A chromosome atlas of the genus *Dactylis* L. *Cytologia*, 26(3-4), 333-343.
- Jones K, Borrill M (1962). Chromosomal status, gene exchange and evolution in *Dactylis*. *Genetica*, 32(1), 296-322.
- Jones K (1962) Chromosomal status, gene exchange and evolution in *Dactylis*. II. The chromosomal analysis of diploid, tetraploid and hexaploid species and hybrids. *Genetica* 33:272–295.
- Jones RN, Rees H (1982). B chromosomes. Academic Press.
- Jones RN (1991). B-chromosome drive. *The American Naturalist*, 137(3), 430-442.
- Jones N, Houben A (2003). B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome. *Trends in plant science*, 8(9), 417-423.
- Juchimiuk-Kwasniewska J, Brodziak L, Maluszynska J (2011). FISH in analysis of gamma ray-induced micronuclei formation in barley. *Journal of applied genetics*, 52(1), 23-29.
- Jung GA, Baker BS (1985). Orchardgrass.
- Kallida R, Zhou L, Volaire F, Guerin A, Julier B, Shaimi N, Barre P (2016). Combining Drought Survival via Summer Dormancy and Annual Biomass Productivity in *Dactylis glomerata* L. *Frontiers in plant science*, 7.
- Karafiátová M, Bartoš J, Doležel J (2016). Localization of Low-Copy DNA Sequences on Mitotic Chromosomes by FISH. *Plant Cytogenetics: Methods and Protocols*, 49-64.
- Kattermann G (1930). Chromosomenuntersuchungen bei Gramineen. *Planta*, 12(1), 19-37.
- Kharb P, Dong J, Islam-Faridi MN, Stelly DM. & Hall TC (2001). Fluorescence *In situ* hybridization of single copy transgenes in rice chromosomes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(1), 1-5.

- Kharrat-Souissi A, Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Chaieb M (2012). Physical mapping of 5S and 18S-5.8 S-26S RNA gene families in polyploid series of *Cenchrus ciliaris* Linnaeus, 1771 (Poaceae). *Comparative cytogenetics*, 6(3), 273.
- Khrustaleva L, Jiang J, Havey MJ (2016). High-resolution tyramide-FISH mapping of markers tightly linked to the male-fertility restoration (Ms) locus of onion. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(3), 535-545.
- Kliot A, Ghanim M (2016). Fluorescent *In situ* hybridization for the localization of viruses, bacteria and other microorganisms in insect and plant tissues. *Methods*, 98, 74-81.
- Koo DH, Zhao H, Jiang J (2016). Chromatin-associated transcripts of tandemly repetitive DNA sequences revealed by RNA-FISH. *Chromosome Research*, 1-14.
- Kolano B, Tomczak H, Molewska R, Jellen EN, Maluszynska J (2012). Distribution of 5S and 35S rRNA gene sites in 34 *Chenopodium* species (Amaranthaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 170(2), 220-231.
- Kotseruba V, Gernand D, Meister A, Houben A (2003). Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingeria trichopoda* (2n = 8). *Genome*, 46(1), 156-163.
- Kölliker R, Stadelmann FJ, Reidy B, Nösberger J (1999). Genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds, *Lolium perenne* L, and *Dactylis glomerata* L. *Euphytica*, 106(3), 261-270.
- Kulikova O, Gualtieri G, Geurts R, Kim DJ, Cook D, Huguet T, Bisseling T (2001). Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 27(1), 49-58.
- Kus A, Kwasniewska J, Hasterok R (2017). *Brachypodium distachyon*. A Useful Model in the Qualification of Mutagen-Induced Micronuclei Using Multicolor FISH. *PloS one*, 12(1), e0170618.
- Kumar P, Gupta VK, Misra AK, Modi DR, Pandey BK (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2(4), 141.
- Kwasniewska J, Kwasniewski M (2013). Comet-FISH for the evaluation of plant DNA damage after mutagenic treatments. *Journal of applied genetics*, 54(4), 407-415.
- Kwasniewska J, Jaskowiak J (2016). Transcriptional Activity of rRNA Genes in Barley Cells after Mutagenic Treatment. *PloS one*, 11(6), e0156865.
- Last L, Widmer F, Fjellstad W, Stoyanova S, Kölliker R (2013). Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe. *BMC genetics*, 14(1), 102.
- Last L, Lüscher G, Widmer F, Boller B, Kölliker R (2014). Indicators for genetic and phenotypic diversity of *Dactylis glomerata* in Swiss permanent grassland. *Ecological Indicators*, 38, 181-191.
- Lavia GI, Ortiz AM, Robledo G, Fernández A, Seijo G (2011). Origin of triploid *Arachis pintoi* (Leguminosae) by autopolyploidy evidenced by FISH and meiotic behaviour. *Annals of Botany*, 108: 103–111.
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS (1992). Physical mapping of the 18S-5.8 S-26S rRNA genes in barley by *In situ* hybridization. *Genome*, 35(6), 1013-1018.
- Leitch IJ, Bennett MD (2004). Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 651-663.
- Lentz EM, Crane CF, Slepser DA, Loegering WQ (1983). An assessment of preferential chromosome pairing at meiosis in *Dactylis glomerata*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 25(3), 222-232.
- Levsky JM, Singer RH (2003). Fluorescence *In situ* hybridization: past, present and future. *Journal of cell science*, 116(14), 2833-2838.

- Levan AV (1930). Beitrag zur Kenntnis der Chromosomen in der Gattung *Dactylis* L. Bot. Not, 1930, 95-104.
- Leyronas C, Raynal G (2008). Role of fungal ascospores in the infection of orchardgrass (*Dactylis glomerata*) by *Epichloë typhina* agent of choke disease. Journal of Plant Pathology, 15-21.
- Li S, Nie Z, Zhang D (2016). Competition between cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) and companion species: Evidence for allelopathy. Field Crops Research, 196, 452-462.
- Li Y, Cheng Z (2016). Fluorescence *in situ* Hybridization on Rice Chromosomes. Plant Cell Division: Methods and Protocols, 105-112.
- Lindner R, Garcia A (1997). Geographic distribution and genetic resources of *Dactylis* in Galicia (northwest Spain). Genetic Resources and Crop Evolution, 44(6), 499-507.
- Lindner R, Lema M, Garcia A (1999). Ecotypic differences and performance of the genetic resources of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) in north-west Spain. Grass and Forage Science, 54(4), 336-346.
- Lindner R, Lema M, Garcia A (2004). Extended genetic resources of *Dactylis glomerata* subsp. *izcoi* in Galicia (northwest Spain). Genetic Resources and Crop Evolution, 51(4), 437-442.
- Lindner R, Lema M, Lindner G, García A (2011). Natural hybridization among cocksfoot (*Dactylis glomerata*) subspecies in Galicia (Northwest Spain). Pastos, 30(1), 103-114.
- Liu ZL, Zhang D, Hong DY, Wang XR (2003). Chromosomal localization of 5S and 18S–5.8 S–25S ribosomal DNA sites in five Asian pines using fluorescence *In situ* hybridization. Theoretical and Applied Genetics, 106(2), 198-204.
- Lolicato S, Rumball W (1994). Past and present improvement of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) in Australia and New Zealand. New Zealand Journal of Agricultural Research, 37(3), 379-390.
- Lumaret R (1986). Doubled duplication of the structural gene for cytosolic phosphoglucose isomerase in the *Dactylis glomerata* L. polyploid complex. Mol. Biol. Evol, 3(6), 499-521.
- Lumaret R (1988). Cytology, genetics and evolution in the genus *Dactylis*. Crit Rev Plant Sci 7:55–91.
- Lumaret R, Bowman CM, Dyer TA (1989). Autopolyploidy in *Dactylis glomerata* L.: further evidence from studies of chloroplast DNA variation. TAG Theoretical and Applied Genetics, 78(3), 393-399.
- Lumaret R, Barrientos E (1990). Phylogenetic relationships and gene flow between sympatric diploid and tetraploid plants of *Dactylis glomerata* (Gramineae). Plant Systematics and Evolution 169, 81–96.
- Lumaret R, Bretagnolle F, Maceira NO (1992). 2n gamete frequency and bilateral polyploidization in *Dactylis glomerata*. In 'Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives'. (Eds A Mariana, S Tavoletti) pp. 15–21. (Forage Plant Breeding Institute: Perugia, Italy)
- Lumaret R (1997). Polyploidy and the critical size of natural populations: the case of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.), a grass used as a fodder plant. 32(1), 296-322.
- Lundqvist A (1965). Self-incompatibility in *Dactylis aschersoniana* Graebn. Hereditas, 54(1), 70-87.
- Lundqvist A (1969). Self-incompatibility in *Dactylis glomerata* L. Hereditas, 61(3), 353-360.
- Lysak MA, Fransz PF, Ali HB. M, Schubert I (2001). Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 28(6), 689-697.
- Lysak MA, Mandáková T (2013). Analysis of plant meiotic chromosomes by chromosome painting. Plant Meiosis: Methods and Protocols, 13-24.
- Maceira NO, Haan AD, Lumaret R, Billon M, Delay J (1992). Production of 2 n gametes in diploid subspecies of *Dactylis glomerata* L. 1. Occurrence and frequency of 2 n pollen. Annals of Botany, 69(4), 335-343.

- Maceira NO, Jacquard P, Lumaret R (1993). Competition between diploid and derivative autotetraploid *Dactylis glomerata* L. from Galicia. Implications for the establishment of novel polyploid populations. *New Phytologist*, 124(2), 321-328.
- Madesis P, Abraham EM, Kalivas A, Ganopoulos I, Tsiftaris (2014). Genetic diversity and structure of natural *Dactylis glomerata* L. populations revealed by morphological and microsatellite-based (SSR/ISSR) markers. *Genet. Mol. Res*, 13(2), 4226-4240.
- Majka J, Majka M, Kwiatek M, Wiśniewska H (2016). Similarities and differences in the nuclear genome organization within Pooideae species revealed by comparative genomic *In situ* hybridization (GISH). *Journal of Applied Genetics*, 1-11.
- Maluszynska J (2002). *In situ* Hybridization in Plants—Methods and Application. In *Molecular techniques in crop improvement* (pp. 299-326). Springer Netherlands.
- Mao JX, Luo D, Wang GW, Zhang J, Yang YM, Zhang XQ, Zeng B (2016). Genetic diversity of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars revealed by simple sequence repeats (SSR) markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66, 337-343.
- Marasek A, Hasterok R, Wiejacha K, Orlikowska T (2004). Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium*. *Hereditas*, 140(1), 1-7.
- Mathieu O, Jasencakova Z, Vaillant I, Gendrel AV, Colot V, Schubert I. and Tourmente S (2003) Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2929–2939.
- Maxted N, Kell S, Ford-Lloyd B, Dulloo E, Toledo Á (2012). Toward the systematic conservation of global crop wild relative diversity. *Crop Science*, 52(2), 774-785. McCollum G. D. (1958). A cytological study of natural and induced tetraploids in *Dactylis*. University of California, Davis.
- McCollum GD (1957). Comparative studies of chromosome pairing in natural and induced tetraploid *Dactylis*. *Chromosoma*, 9(1), 571-605.
- Mitchell CC, Parkinson SE, Baker TJ, Jellen EN (2003). C-banding and localization of 18S-5.8 S-26S rDNA in tall oatgrass species. *Crop science*, 43(1), 32-36.
- Mika V, Kohoutek A, Odstrcilova V (2002). Characteristics of important diploid and tetraploid subspecies of *Dactylis* from point of view of the forage crop production. *Rostlinna Vyroba*, 48(6), 243-248.
- Mikhailova EI, Sosnikhina SP, Kirillova GA, Tikholiz OA, Smirnov VG (2001). Nuclear dispositions of subtelomeric and pericentromeric chromosomal domains during meiosis in asynaptic mutants of rye (*Secale cereale* L.). *J Cell Sci* 114: 1875-1882.
- Mizianty M (1985). Banding patterns in plant chromosomes.: 3. *Dactylis glomerata* subsp. *aschersoniana* (Graebner) Thell. from Poland. *Acta Soc. Bot. Pol*, 54(2), 169-178
- Mizianty M (1986) Biosystematic studies on *Dactylis* L. 1. Review of previous studies. 1.1. Systematics, variability, ecology, biology and cultivation problems. *Acta Soc. Bot. Pol*. 59: 467–479.
- Mizianty M (1990) Biosystematic studies on *Dactylis* L. 1. Review of the previous studies. 1.2. Cytology, genetics, experimental studies and evolution. *Acta Soc. Bot. Pol*. 59: 105–118.
- Mizianty M (1991a) Biosystematic studies on *Dactylis* (Poaceae). 2. Original research. 2.2. Cytological differentiation of the genus in Poland. *Fragm. Flor. Geobot*. 36: 301–320.
- Mizianty M (1991b) Biosystematic studies on *Dactylis* (Poaceae). 3. Conclusions. *Fragm. Flor. Geobot*. 36: 321–338.
- Mizianty M, Cenci CA (1995). *Dactylis glomerata* L. subsp. *slovenica* (Dom.) Dom.(Gramineae), a new takson to Italy. *Webbia*, 50(1), 45-50.

- Mizianty M (1997). Distribution of *Dactylis glomerata* subsp. *slovenica* [Poaceae] in Europe. *Fragmenta Floristica et Geobotanica*, 42(2).
- Mizuno K, Shioya S, Fujimoto F, Sugita SI (2000). Varietal differences in palatability of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) and breeding for palatability and quality. *JARQ, Japan Agricultural Research Quarterly*, 34(1), 55-62.
- Mousset C (2000). Collecting, utilizing and managing the genetic resources of cocksfoot at the INRA Station of Lusignan. *Fourrages*, (162), 121-139.
- Mroczek RJ, Dawe RK (2003) Distribution of retroelements in centromeres and neocentromeres of maize. *Genetics*, 165:809-819.
- Müntzing A (1933). Quadrivalent formation and aneuploidy in *Dactylis glomerata*. *Bot. Notiser*, 84, 198-205.
- Müntzing A (1936). The evolutionary significance of autopolyploidy. *Hereditas*, 21(2-3), 363-378.
- Müntzing A (1937). The effects of chromosomal variation in *Dactylis*. *Hereditas*, 23(1-2), 113-235.
- Müntzing A (1943) Characteristics of two haploid twins in *Dactylis glomerata*. *Hereditas* 29: 134-140.
- Murata M, Heslop-Harrison JS, Motoyoshi F (1997) Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *In situ* hybridization with cosmid clones. *Plant J.* 12: 31–37.
- Murray BG, De Lange PJ, Ferguson AR (2005). Nuclear DNA variation, chromosome numbers and polyploidy in the endemic and indigenous grass flora of New Zealand. *Annals of Botany*, 96(7), 1293-1305.
- Muller S, Neusser M, Wienberg J (2002) Towards unlimited colors for fluorescence *In situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.*, 10:223-232.
- Myers WM (1940). Tetrasomic inheritance in *Dactylis glomerata*. *Genetics*, 25.
- Myers WM, Hill HD (1943). Increased meiotic irregularity accompanying inbreeding in *Dactylis glomerata* L. *Genetics*, 28(5), 383.
- Myers WM. (1947). Cytology and genetics of forage grasses. *The Botanical Review*, 13(7), 369-421.
- Myers WM (1948). Studies on the origin of *Dactylis glomerata* L. *Genetics*, 33(1), 117-117.
- Nagaki K, Song J, Stupar RM, Parokonny AS, Yuan Q, Ouyang S, Buell CR (2003). Molecular and cytological analyses of large tracks of centromeric DNA reveal the structure and evolutionary dynamics of maize centromeres. *Genetics*, 163(2), 759-770.
- Nur U, Zohary D (1959). Distribution patterns of diploid and tetraploid forms *Dactylis glomerata* L. in Israel. *BuU. Res. Coun., Israel, Sect. D. Botany*, 13.
- Palestis BG, Trivers R, Burt A, Jones RN (2004). The distribution of B chromosomes across species. *Cytogenetic and genome research*, 106(2-4), 151.
- Park HM, Jeon EJ, Waminal NE, Shin KS, Kweon SJ, Park BS, Kim HH. (2010). Detection of transgenes in three genetically modified rice lines by fluorescence *In situ* hybridization. *Genes & Genomics*, 32(6), 527-531.
- Parker PF, Borrill M (1968). Studies in *Dactylis*. *New Phytologist*, 67(3), 649-662.
- Parker PF (1972) Studies in *Dactylis* II Natural variation, distribution, and systematics of the *Dactylis smithii* Link. Complex in Madeira and other Atlantic Islands. *New Phytol* 72:371–378.
- Parson PA (1992). Evolutionary adaptation and stress. In *Evolutionary biology* (pp. 191-223). Springer, Boston, MA.
- Parvatham G, Rangasamy SRS (2004). Karyomorphological and phylogenetic studies in different species of *Sorghum* L. Moench. *Cytologia*, 69 (3): 301-305.
- Peng YAN, Zhang X, Deng Y, Ma X (2008). Evaluation of genetic diversity in wild orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) based on AFLP markers. *Hereditas*, 145(4), 174-181.

- Posada LF, Alvarez JC, Hu CH, de-Bashan LE, Bashan Y (2016). Construction of probe of the plant growth-promoting bacteria *Bacillus subtilis* useful for fluorescence *In situ* hybridization. *Journal of Microbiological Methods*.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83:2934-2938.
- Pita S, Panzera F, Ferrandis I, Galvão C, Gómez-Palacio A, Panzera Y (2013). Chromosomal divergence and evolutionary inferences in *Rhodiola* based on the chromosomal location of ribosomal genes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(3), 376-382.
- Pita M, Orellana J, Martínez-Rodríguez P, Martínez-Ramírez Á, Fernández-Calvín B, Bella JL (2014). FISH methods in cytogenetic studies. *Functional analysis of DNA and chromatin*, 109-135.
- Qi L, Friebe B, Wu J, Gu Y, Qian C, Gill BS (2010). The compact *Brachypodium* genome conserves centromeric regions of a common ancestor with wheat and rice. *Functional & integrative genomics*, 10(4), 477-492.
- Ravi M, Kwong PN, Menorca RM, Valencia JT, Ramahi JS, Stewart JL, Chan SWL (2010). The rapidly evolving centromere-specific histone has stringent functional requirements in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 186(2), 461-471.
- Ravi M, Shibata F, Ramahi JS, Nagaki K, Chen C, Murata M, Chan SW (2011). Meiosis-specific loading of the centromere-specific histone CENH3 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 7(6), e1002121.
- Reeves G, Francis D, Davies MS, Rogers HJ, Hodgkinson TR (1998). Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. *Annals of Botany*, 82(suppl\_1), 99-105.
- Richards EJ, Elgin SCR (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108:489-500
- Roa F, Guerra M. (2012). Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. *BMC evolutionary biology*, 12(1), 225.
- Roa F, Guerra M. (2015). Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. *Cytogenetic and genome research*, 146(3), 243-249.
- Robertson IH (1981). Chromosome numbers in *Brachypodium* Beauv.(Gramineae). *Genetica*, 56(1), 55-60.
- Romanov D, Divashuk M, Havey MJ, Khrustaleva L (2015). Tyramide-FISH mapping of single genes for development of an integrated recombination and cytogenetic map of chromosome 5 of *Allium cepa*. *Genome*, 58(3), 111-119.
- Rumball W (1982). 'Grasslands Wana' cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). *New Zealand journal of experimental agriculture*, 10(1), 51-52.
- Sahuquillo E, Lumaret R (1995). Variation in the subtropical group of *Dactylis glomerata* L. Evidence from allozyme polymorphism. *Biochemical systematics and ecology*, 23(4), 407-418.
- Sahuquillo E, Lumaret R (1999). Chloroplast DNA variation in *Dactylis glomerata* L. taxa endemic to the Macaronesian islands. *Molecular Ecology*, 8(11), 1797-1803.
- Sanada Y, Gras MC, Van Santen E (2010) Cocksfoot. In: Boiler B, Veronesi F, Posselt U (eds) *Fodder crops and amenity grasses. Handbook of plant breeding*, vol 5. Springer, New York, pp 317–327.
- Santos AP, Wegel E, Allen GC, Thompson WF, Stoger E, Shaw P, Abranches R (2006). *In situ* methods to localize transgenes and transcripts in interphase nuclei: a tool for transgenic plant research. *Plant Methods*, 2(1), 1.
- Santos AP, Abranches R, Oliveira M, Shaw P (2015). Plasticity of Chromatin Organization in the Plant Interphase Nucleus. In *Nuclear Functions in Plant Transcription, Signaling and Development* (pp. 57-79). Springer New York.



- Santos FC, Guyot R, Do Valle CB, Chiari L, Techio VH, Heslop-Harrison P, Vanzela A. L. L (2015). Chromosomal distribution and evolution of abundant retrotransposons in plants: gypsy elements in diploid and polyploid *Brachiaria* forage grasses. *Chromosome Research*, 23(3), 571-582.
- Sapkota S, Conner JA, Hanna WW, Simon B, Fengler K, Deschamps S. ve Ozias-Akins P (2016). In silico and fluorescence in situ hybridization mapping reveals collinearity between the *Pennisetum squamulatum* apomixis carrier-chromosome and chromosome 2 of sorghum and foxtail millet. *PLoS one*, 11(3), e0152411.
- Sato T, Maceira N, Lumaret R, Jacquard P (1993). Flowering characteristics and fertility of interploidy progeny from normal and 2n gametes in *Dactylis glomerata* L. *New phytologist*, 124(2), 309-319.
- Serin Y, Tan M (2009). Buğdaygil Yembitkilerinin Tarımsal Özellikleri, Ekonomik Önemleri, Taksonomileri ve Genel Yapısal Özellikleri. *Yembitkileri*, 3, 546-549.
- Schubert V, Ruban A, Houben A (2016). Chromatin ring formation at plant centromeres. *Frontiers in plant science*, 7.
- Schulz-Schaeffer J, Allderdice PW, Creel GC (1963). Segmental allopolyploidy in tetraploid and hexaploid *Agropyron* species of the crested wheatgrass complex (Section *Agropyron*). *Crop Science*, 3(6), 525-530.
- Schmidt R, West J, Love K, Lenehan Z (1995). Physical map and organization of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4. *Science*, 270(5235), 480.
- Schmidt T (1999). LINEs, SINEs and repetitive DNA: non-LTR retrotransposons in plant genomes. *Plant Mol. Biol.*, 40:903-910
- Schwarzacher T (2003). DNA, chromosomes, and In situ hybridization. *Genome*, 46(6), 953-962.
- Schwarzacher T (2016) Preparation and Fluorescent Analysis of Plant Metaphase Chromosomes. *Plant Cell Division: Methods and Protocols*, 87-103.
- Shah SS (1964). A Study of Plants with Meiotic Abnormalities in *Dactylis glomerata* subsp. *lusitanica*. *Cytologia*, 29(4), 387-395.
- Sharma A, Presting GG (2008). Centromeric retrotransposon lineages predate the maize/rice divergence and differ in abundance and activity. *Mol Genet Genomics* 279:133–147.
- Sharma AK, Sharma A (2014). *Chromosome techniques: theory and practice*. Butterworth-Heinemann.
- Sharma SK, Yamamoto M, Mukai Y (2016). Molecular cytogenetic approaches in exploration of important chromosomal landmarks in plants. In *Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement* (pp. 127-148). Springer International Publishing.
- Singh RJ (Ed.). (2016). *Plant cytogenetics*. CRC press.
- Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Vicic V, Robin O (2014). Molecular cytogenetics (FISH and fluorochrome banding): resolving species relationships and genome organization. *Molecular Plant Taksonomy: Methods and Protocols*, 309-323.
- Soltis DE, Soltis PS, Rieseberg LH (1993). Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical reviews in plant sciences*, 12(3), 243-273.
- Soltis PS, Soltis DE. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 7051–7057.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA (2004). Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New phytologist*, 161(1), 173-191.
- Soltis DE, Soltis PS, Schemske DW, Hancock JF, Thompson JN, Husband BC, Judd WS (2007). Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species. *Takson*, 56(1), 13-30.

- Soltis PS, Marchant DB, Van de Peer Y, Soltis DE (2015). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in genetics & development*, 35, 119-125.
- Song Y, Liu F, Zhu Z, Tan L, Fu Y, Sun C, Cai H (2011). Construction of a simple sequence repeat marker-based genetic linkage map in the autotetraploid forage grass *Dactylis glomerata* L. *Grassland science*, 57(3), 158-167.
- Sone T, Fujisawa M, Takenaka M, Nakagawa S, Yamaoka S, Sakaida M, Fukuzawa H (1999). Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant molecular biology*, 41(5), 679-685.
- Speranza M, Cristofolini G. (1987). The genus *Dactylis* L. in Italy. 2. The diploid entities. *Webbia*, 41(2), 213-224.
- Staub JE, Serquen FC, Gupta M (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, 31(5), 729-741.
- Stebbins GL (1950). *Variation and evolution in plants*. New York, USA: Columbia University Press.
- Stebbins GL, Zohary D (1959). Cytogenetic and evolutionary studies in the genus *Dactylis*. I. Morphology, distribution and inter-relationships of the diploid subspecies. *Univ Calif publ bot*, 31, 1-40.
- Stebbins GL (1961). A diploid subspecies of the *Dactylis glomerata* complex from Portugal. *Agron. Lusitanica* 1: 9-15. et D. Zohary. 1959. Cytogenetic and evolutionary studies in the genus *Dactylis*. I. Morphology, distribution, and interrelationship of the diploid subspecies. *Univ. California Publ. Bot*, 31(1), 1-39.
- Stebbins GL (1971). Chromosomal evolution in higher plants. *Chromosomal evolution in higher plants*.
- Stewart AV, Ellison NW (2011). *Dactylis*. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 73-87). Springer Berlin Heidelberg.
- Stewart AV, Ellison NW, Osorio VM (2013). Origins of diploid *Dactylis* from the Canary Islands as determined by DNA sequencing. In *Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement* (pp. 225-229). Springer, Dordrecht.
- Stewart AV, Ellison, NW (2014). A molecular phylogenetic framework for cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) improvement. *Crop and Pasture Science*, 65(8), 780-786.
- Stewart AV, Ellison NW (2015). Origins of Diploid *Dactylis* from China as Determined by ITS Sequences. In *Molecular Breeding of Forage and Turf* (pp. 165-171).
- Stolton S, Dudley N, Avcioglu Cokcaliskan B, Hunter D, Ivanic KZ, Kanga E, Wong M (2015). Values and benefits of protected areas. ANU Press.
- Sultana S, Lee S. H, Bang J. W, & Choi H. W. (2010). Physical mapping of rRNA gene loci and inter-specific relationships in wild *Lilium* distributed in Korea. *Journal of Plant Biology*, 53(6), 433-443.
- Sun M, Zhang C, Zhang X, Fan Y, Fu K, Wu W, Yan Y (2017). AFLP assessment of genetic variability and relationships in an Asian wild germplasm collection of *Dactylis glomerata* L. *Comptes Rendus Biologies*, 340(3), 145-155.
- Sybenga J (1984). Preferential pairing in *Dactylis glomerata*. *Canadian journal of genetics and cytology*, 26(5), 640-640.
- Sybenga J (1996). Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist. *Genome*, 39(6), 1176-1184.
- Ogle D, L. St. John, M. Stannard, L. Holzworth. 2011. Conservation Plant Materials for the Intermountain West. Technical Note 24. USDA-Natural Resources Conservation Service. Boise, ID. 57 p.

- Ortiz, S, Rodriguez-OUBIÑA J. U. A. N (1993, January). *Dactylis glomerata* subsp. *izcoi*, a new subspecies from Galicia NW Iberian Peninsula. In *Annales Botanici Fennici* (pp. 305-311). The Finnish Botanical Publishing Board.
- Taketa S, Harrison GE, Heslop-Harrison JS (1999). Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(1), 1-9.
- Thomas, HM, Harper, JA, Morgan, WG (2001). Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum*. *Chromosome Research*, 9(7), 585-590.
- Thumjamras S, Iamtham S, Prammanee S, de Jong H (2016). Meiotic analysis and FISH with rDNA and rice BAC probes of the Thai KPS 01-01-25 sugarcane cultivar. *Plant systematics and evolution*, 302(3), 305-317.
- Tosun M, Akgün İ, Sağsöz S. (1999). Determination of some cytological characters of wild orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) growing in Erzurum district. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23(EK1), 219-228.
- Tosun M, Akgun I, Taspınar MS, Kanlı M (2002). Determination of variations of some enzymes in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) ecotypes. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science*, 52(2), 110-115.
- Tomekpe K, Lumaret R (1991). Association between quantitative traits and allozyme heterozygosity in a tetrasomic species: *Dactylis glomerata*. *Evolution*, 359-370.
- Trejo-Calzada R, O'Connell MA (2005). Genetic diversity of drought-responsive genes in populations of the desert forage *Dactylis glomerata*. *Plant science*, 168(5), 1327-1335.
- Tsvelev NN (1983). *Grasses of the Soviet Union*. Oxonian Press Pvt. Ltd.
- Tucker S, Vitins A, Pikaard CS (2010). Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Current opinion in cell biology*, 22(3), 351-356.
- Tuna M, Khadka DK Shrestha MK Arumuganathan K, Golan-Goldhirsh A (2004). Characterization of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations of the Thrace Region of Turkey based on ploidy and DNA polymorphisms. *Euphytica*, 135(1), 39-46.
- Tuna M, Teykin E, Buyukbaser A, Budak H (2007) Nuclear DNA variation in the grass genus *Dactylis* L. *Molec. Breed. Forage and Turf Conf. Sapporo Japan*
- Tuna M (2015), Yazılı görüşme, NKÜ Tarla Bitkileri Bölümü. Tekirdağ.
- Tutois S, Cloix C, Mathieu O, Cuvillier C, Tourmente S (2002) Analysis of 5S rDNA loci among *Arabidopsis* ecotypes and subspecies. *Genome Lett.* 1: 115–12.
- Tükel T, Hatipoglu R (1994). Researches on Morphological, Biological and agricultural characters of cocksfoot plant (*Dactylis glomerata* L.) in Cukurova Region. EU. Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Association of Field Crops Science, Statements of Meadow-Pasture and Forage Crops, 44-47.
- Tyler B, Borrill M (1983) The use of wild species in forage grass breeding. *Genetika* 15:387–396.
- Vaillant I, Tutois S, Cuvillier C, Schubert I, Tourmente S (2007). Regulation of *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant and cell physiology*, 48(5), 745-752.
- Vaio M, Speranza P, Valls JF, Guerra M, Mazzella C (2005). Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the *Quadrifaria* group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany*, 96(2), 191-200.
- Van Dijk GE (1961) The inheritance of harsh leaves in tetraploid cocksfoot. *Euphytica* 13:305–313.
- van Santen E, Sleper DA (1996). Orchardgrass. p. 503-534. In: L.E. Moser et al. (eds.), *Cool-season Forage Grasses*. Amer. Soc. Agron., Madison, WI.

- Vanzela A L, Cuadrado A, Guerra M (2003). Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 26(2), 199-201.
- Vilhar B, Vidic T, Jogan N, Dermastia M (2002). Genome size and the nucleolar number as estimators of ploidy level in *Dactylis glomerata* in the Slovenian Alps. *Plant Systematics and Evolution*, 234(1), 1-13.
- Volkov RA, Komarova NY, Hemleben V (2007). Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression. *Systematics and Biodiversity*, 5(3), 261-276.
- Volkov AR, Panchuk, I. I. (2014). 5S rDNA of *Dactylus glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, (12, № 1), 3-11.
- Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV, Hosiawa-Baranska M, Maluszynska J, Hemleben V (2017). Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biology*, 17(1), 21.
- Wang CJR, Harper L, Cande WZ (2006). High-resolution single-copy gene fluorescence *In situ* hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. *The Plant Cell*, 18(3), 529-544.
- Wang K, Song X, Han Z, Guo W, John ZY, Sun J, & Zhang T. (2006). Complete assignment of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by translocation and fluorescence *In situ* hybridization mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(1), 73-80.
- Wang K, Guo W, Zhang T (2007). Development of one set of chromosome-specific microsatellite-containing BACs and their physical mapping in *Gossypium hirsutum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(5), 675-682.
- Wang Q, Wang J, Zhang Y, Zhang Y, Xu S, Lu Y (2015). The Application of Fluorescence *In situ* Hybridization in Different Ploidy Levels Cross-Breeding of Lily. *PloS one*, 10(5), e0126899.
- Wang K, Yu W (2016). *In situ* hybridization in rice (*Oryza sativa*). *Current Protocols in Plant Biology*, 89-106.
- Walling JG, Pires JC, Jackson SA (2005). Preparation of samples for comparative studies of plant chromosomes using *In situ* hybridization methods. *Methods Enzymol* 395: 443-460.
- Weider LJ, Elser JJ, Crease TJ, Mateos M, Cotner JB, Markow TA. (2005). The functional significance of ribosomal (r) DNA variation: impacts on the evolutionary ecology of organisms. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 219-242.
- Weiss-Schneeweiss H. A. N. N. A, & Schneeweiss GM (2003). Karyological investigations of selected Angiosperms from Georgia and Azerbaijan. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*, 45, 49-56.
- Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Siljak-Yakovlev S, Baeza CM, Parker J (2003). Karyotype evolution in South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Plant Systematics and Evolution*, 241(3-4), 171-184.
- Wendel JF (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225–249.
- Wetschnig W (1991). Karyotype morphology of some diploid subspecies of *Dactylis glomerata* L.(Poaceae). *Phyton*, 31, 35-55.
- Wolny E, Hasterok R (2009). Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. *Annals of botany*, 104(5), 873-881.
- Wolny E, Braszewska-Zalewska A, Kroczeck D, & Hasterok R. (2015). *In situ* analysis of epigenetic modifications in the chromatin of *Brachypodium distachyon* embryos. *Plant signaling & behavior*, 10(5), e1011948.
- Xie W, Zhang X, Cai H, Huang L, Peng Y, Ma X (2010). Genetic maps of SSR and SRAP markers in diploid orchardgrass using the pseudo-testcross strategy. *Genome*, 54(3), 212-221.

- Xie W, Robins J. G, & Bushman B. S. (2012). A genetic linkage map of tetraploid orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) and quantitative trait loci for heading date. *Genome*, 55(5), 360-369.
- Xie W, Bushman B. S, Ma Y, West M. S, Robins J. G, Michaels L, & Stratton S. D. (2014). Genetic diversity and variation in North American orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and breeding lines. *Grassland science*, 60(3), 185-193.
- Xie W. G, Zhang X. Q, Ma X, Cai H. W, Huang L. K, Peng Y, & Zeng B. (2010a). Diversity comparison and phylogenetic relationships of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) germplasm as revealed by SSR markers. *Canadian journal of plant science*, 90(1), 13-21.
- Xie W. G, Zhang X. Q, Cai H. W, Liu W, & Peng Y. (2010b). Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Biochemical systematics and ecology*, 38(4), 740-749.
- Xie W. G, Lu X. F, Zhang X. Q, Huang L. K, & Cheng, L. (2012). Genetic variation and comparison of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and wild accessions as revealed by SSR markers. *Genet. Mol. Res*, 11, 425-433.
- Xu WW, Sleper DA, Chao S (1995). Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) with RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 91(6-7), 947-955.
- Xu SS, Liu Z, Zhang Q, Niu Z, Jan CC, Cai X (2016). Chromosome Painting by GISH and Multicolor FISH.
- Yan HD, Zhang XQ, Zeng B, Cheng L, Nie G, Ji Y, Huang LK (2013). Evaluating rust resistance and field investigating over-summer conditions of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasms. *Acta Agrestia Sinica*, 21(4), 720-728.
- Yan H, Zhang Y, Zeng B, Yin G, Zhang X, Ji Y, Ma X (2016). Genetic Diversity and Association of EST-SSR and SCoT Markers with Rust Traits in Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Molecules*, 21(1), 66.
- Yaneshita M, Kaneko S, Sasakuma T (1999). Allotetraploidy of *Zoysia* species with  $2n=40$  based on a RFLP genetic map. *Theoretical and applied genetics*, 98(5), 751-756.
- Zhang H, Dawe RK (2012). Total centromere size and genome size are strongly correlated in ten grass species. *Chromosome research*, 20(4), 403-412.
- Zeng B, Wang GZ, Zuo FY, Chen ZH, Zhang XQ (2012). Genetic diversity analysis of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) accessions with sequence-related amplified polymorphism (SRAP) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11(67), 13075-13084.
- Zeng B, Zhang Y, Huang LK, Jiang XM, Luo D, Yin G (2014). Genetic diversity of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasms with resistance to rust diseases revealed by Start Codon Targeted (SCoT) markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54, 96-102.
- Zhong CX, Marshall JB, Topp C, Mroczek R, Kato A, Nagaki K, Dawe RK (2002). Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. *The Plant Cell*, 14(11), 2825-2836.
- Zhong S (2006). Study on crossing of different ploidy of *Dactylis glomerata*. *Southwest. China J. Agric. Sci.* 19: 1034- 1038
- Zohary D (1956). Cytogenetic studies in the polyploid complex of *Dactylis glomerata* L. University of California, Berkeley.
- Zohary D, Nur U (1959). Natural triploids in the orchard grass, *Dactylis glomerata* L., polyploid complex and their significance for gene flow from diploid to tetraploid levels. *Evolution*, 13(3), 311-317.

## ÖZGEÇMİŞ

Hüseyin Keleş, 1983 Adıyaman doğumlu olup, ilk ve orta öğrenimini Malatya'nın Doğanşehir ilçesinde tamamlamıştır. Lisans eğitimini Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Biyoloji bölümünde (2004-2008), yine aynı üniversitede Biomühendislik ve Bilimleri bölümünde (2009-2012) yüksek lisans eğitimini tamamlamıştır. Doktora tezini ise (2012-2019) Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri bölümünde tamamlamıştır.

**Lisans Tezi:** Süt Örneklerinden İzole edilen Koagülaz Negatif *Staphylococcus* Türlerinin Beta Laktamaz Üretimi Açısından Taranması ve Metisiline Direnç Geni Varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Tayini **Danışman: Prof. Dr. Emel Banu BÜYÜKÜNAL**

**Yüksek Lisans Tezi:** Bazı Yabani *Vicia* Türlerinin Karyotipik Analizi Ve Bitkisel Özelliklerinin Belirlenmesi **Danışman: Prof. Dr. İskender TİRYAKİ**

**Doktora Tezi:** Floresan *In Situ* Hibridizasyon Yöntemi ile *Dactylis* Taksonlarının Ribozomal DNA Bölgelerinin Karşılaştırılması **Danışman: Prof. Dr. Metin TUNA**

## YAYINLAR

- Tiryaki, I., **Keleş, H.** (2012). Reversal of the Inhibitory Effect of Light and High Temperature on Germination of *Phacelia tanacetifolia* Seeds by Melatonin. **Journal of Pineal Research**. 52(3):332-339.
- Tiryaki, İ., **Keleş, H.** (2013). *Phacelia tanacetifolia* Benth. Tohumlarında Işık Ve Yüksek Sıcaklık İnhibisyonunun Melatonin İle Tersine Çevrilmesi. Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi, 10-13 Eylül 2013, Konya.
- Keleş, H.**, Zulkadir, G., Tiryaki, İ. (2013). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin Abiyotik Stres Şartlarında Çimlendirilen Arı Otu (*Phacelia tanacetifolia* B.) Tohumları Üzerine Etkileri. Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi, 10-13 Eylül 2013, Konya.
- Zulkadir, G., **Keleş, H.**, Tiryaki, İ. (2013). UV Işığın Arı Otu (*Phacelia tanacetifolia* B.) Tohumlarının Çimlenme Performansı Üzerine Etkileri. Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi, 10-13 Eylül 2013, Konya.
- Tiryaki, I., Topu, M., **Keleş, H.**, Erol, A. (2011). Farklı Tuz ve Borik Asit Uygulamalarının Korunga (*Onobrychis subsp.*) Meyvelerinin Çimlenme Performansı Üzerine Etkisi. Türkiye 9. Tarla Bitkileri Kongresi, 12-15 Eylül 2011, Bursa.
- Tiryaki, I., Topu, M., **Keleş, H.** (2011). Elektrik Akımının Arı Otu (*PhaceliaTanacetifolia* Bentham ) Tohumlarının Çimlenme Performansı Üzerine Etkileri. Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, 14-17 Haziran 2011, **Samsun**, Cilt-II Sy.150-154.

- Keleş, H., Savaş Tuna G., Nizam I., Tuna M., 2015. Bazı Diploid *Dactylis* Taksonlarının Mitoz Kromozomları Üzerinde 5S ve 45S rDNA Bölgelerinin Fiziki Olarak Haritalanması. 11. Tarla Bitkileri Kongresi. Çanakkale
- Savaş Tuna, G., G. Yücel, **H. Keles**, I. Nizam, E. Cabi, M. Tuna, 2015. Ploidy Determination in *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn Populations Collected From Eastern Anatolia Region of Turkey by Using Flow Cytometer. International Workshop on Latest Technologies for Crop Improvement, Antalya, Turkey
- Tuna, M., **H. Keles**, G. Savaş Tuna, I. Nizam, E.E. Teykin, 2015. Genome size and chromosomal diversity in the grass genus *Dactylis* L. II. International Plant 24 Breeding Congress and Eucarpia-Oil and Protein Crops Conference. Antalya, Turkey.
- Tuna, M., **H. Keles**, N. Ohmido, R. Hasterok, 2015. Comparison of ribosomal DNA sites and numbers in diploid and polyploid *Dactylis* taksons. The 5th Assian Chromosome Colloquium. Bangkok. Tailand.
- Savaş Tuna G., **H. Keleş**, D. Göçmen, V. Gülerüz, İ. Nizam, E. Cabi, A. Yazıcı, Ş. Çakal, G. Yücel, M. Tuna, 2015. Flow sitometri ile çok yıllık buğdaygil yem bitkisi genetik kaynaklarının karakterizasyonu. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, Çanakkale
- Tuna M., **H. Keleş**, G. Savaş Tuna, İ. Nizam, E. E. Teykin, G. Yücel. 2015. Moleküler sitogenetik metotlar ile *Dactylis* L. genomlarının analizi. 4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Konferansı, 21. 08. 2015, Afyon.

**Yayınlanacak:**

- Keles H.**, Tiryaki I. and Sevimay C.S. (2019). Nuclear DNA content, Morphological and karyotype evolution of *Vicia* subgenus