

**FLOW SİTOMETRİ İLE BAZI İSPANAK
AKSESYONLARININ ÇEKİRDEK DNA
İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Özcan YAVAŞ
Yüksek Lisans Tezi

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Murat DEVECİ

2017

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FLOW SİTOMETRİ İLE BAZI İSPANAK AKSESİYONLARININ
ÇEKİRDEK DNA İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Özcan YAVAŞ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. MURAT DEVECİ

TEKİRDAĞ-2017

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Murat DEVECİ danışmanlığında, Özcan YAVAŞ tarafından hazırlanan “Flow Sitometri İle Bazı Ispanak Aksesyonlarının Çekirdek DNA İçeriklerinin Belirlenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Prof. Dr. Metin TUNA

İmza :

Üye : Prof. Dr. Yalçın KAYA

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat DEVECİ

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FLOW SİTOMETRİ İLE BAZI İSPANAK AKSESYONLARININ ÇEKİRDEK DNA İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Özcan YAVAŞ

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat DEVECİ

Bu araştırmanın amacı, ülkemiz koşullarında kışlık sebze olarak performanslarının belirlenmesi için yurt içi ve yurt dışından elde edilmiş olan 53 ıspanak (*Spinacia olercea* L.) aksesyonunun flow sitometri ile ilk defa ploidi düzeylerini belirlemektir. Araştırma verilerine göre; Çekirdek DNA içerikleri arasında ıspanak aksesyonlarının istatistiki olarak önemli ($P<0.01$) olduğu saptanmıştır. Araştırmada kullanılan ıspanak aksesyonlarının ortalama çekirdek DNA içeriği 2,225 pg/2C ile 2,059 pg/2C arasında değişmektedir. En yüksek ortalama 2.225 pg ile PI 222270 aksesyon numaralı Esfenaj çeşidi olduğu belirlenmiştir. En düşük değer 2.059 pg PI 531451 nolu aksesyon numaralı Matador çeşidi olduğu belirlenirken, bu aksesyonu aynı önem grubunda bulunan PI 499373 aksesyon numaralı Godir çeşidi takip etmiştir. Ispanak çekirdek DNA içerikleri genelde 0.003 ile 0.096'lık bir standart sapma ile birbirine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan popülasyonların saf olup, başka tür ve varyeteye ait bitki içermediği sonucuna varılmıştır. Ispanağın çekirdek DNA analiz sonuçlarına göre çalışılan tüm ıspanak aksesyonlarının aynı ploidi seviyesine sahip olduğu şeklinde düşünülmüştür. Çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık gösteren bazı bitkilerin kromozom sayıları $2n=12$ olarak saptanmış ve dolayısıyla diploid oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmada kullanılan aksesyonların tamamının diploid olduğu kabul edilmiştir. 2C DNA içeriklerine göre Ward metodu ile yapılan kümeleme analizi sonuçlarına göre iki ana küme altında sekiz farklı kümenin olduğu görülmüştür. Aksesyonların kümelenmesi çoklu karşılaştırma testi benzer şekilde gerçekleşmiştir.

Bu veriler sonucunda yapılan çalışmaya konu olan 53 ıspanak aksesyonu ile ileride yapılacak ıslah çalışmalarında araştırmacılara önemli bir zaman ve emek sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Ispanak (*Spinacia olercea* L.), flow sitometri, çekirdek DNA içeriği, ploidi, kromozom sayısı

2017, 51 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF NUCLEAR DNA CONTENT OF SOME SPINACH ACCESSIONS BY FLOW CYTOMETER.

Özcan YAVAŞ

Namık Kemal University
Institute of Science
Department of Horticulture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat DEVECİ

The aim of this research is to determine the core DNA content of 53 spinach (*Spinacia oleracea* L.) accessions obtained from domestic and abroad sources for the flow cytometry. Ploidy levels of accessions were determined and chromosome numbers were counted within the variation group ($P < 0.01$). The average core DNA content of spinach accessions used in the study ranged between 2.225 pg / 2C and 2.059 pg / 2C. The highest average core DNA content (2.225 pg) was obtained from PI 222270 Esfenaj variety while the lowest value (2.059 pg) was obtained from PI 222270 Matado variety, followed by PI 499373 Godir variety. The core DNA contents of accessions were shown to be relatively stable with standard deviation of 0.003 to 0.096. Results indicate that genotypes were consistent with the same ploidy levels within the group. Because of the numbers of genotypes that differ in nuclear DNA content was measured as $2n=12$, they indicate that all accessions are expected to be diploid. For this reason, it is assumed that all of the accessions used in the study are diploid. According to the clustering analysis results of the 2C DNA contents by the Ward method, it was observed that eight sub clusters were formed under two main clusters. The clustering of accessions was performed in a similar manner to the multiple comparison test. As a result, this data will save time and labor convenience in the breeding study to be done with the 53 spinach accessions which is the study subject.

Key words: Spinach (*Spinacia oleracea* L.), flow cytometry, nuclear DNA content, ploidy, number of chromosomes.

2017, 51 pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR TARAMASI	8
2.1. Ispanak.....	8
2.2.Flow Sitometri Nedir	9
2.3.Flow Sitometrinin Çalışma Prensibi	10
2.4.Flow sitometri ve kullanım alanları	11
2.5.Flow sitometrinin tarımsal araştırmalarda kullanım alanları	12
2.6.Kromozomların sayımı ve ploidi düzeyinin belirlenmesi.....	14
2.7.Ispanakta kromozom sayımı	16
3. MATERYAL ve METOD	18
3.1. Materyal.....	18
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Bitkilerin yetiştiriciliği.....	20
3.2.2. Flow sitometri ile Çekirdek DNA Analizi (pg)	23
3.2.3. Ispanak aksesyonlarının ploidi düzeylerinin belirlenmesi.....	31
3.2.4. Kromozomların sayımı	31
3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi.....	33
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	34
4.1.Flow sitometri ile Çekirdek DNA Analizi (pg).....	34
4.2.Ispanak aksesyonlarına ait Cluster analizi	39
4.3. <i>Spinacia oleracea</i> aksesyonlarının kromozom sayısının tespit edilmesi.....	41
5. SONUÇ	44
6. KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	51

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1.	Ülkelere göre ıspanak üretimi.....	8
Çizelge 2.2.	Bölgelere göre ıspanak üretimi.....	9
Çizelge 3.1.	Projede kullanılan ıspanak aksesyonlarının ad, akseyon no ve orijinleri.....	18
Çizelge 4.1.	Bazı ıspanak (<i>Spinacia oleracea</i> L.) aksesyonlarının varyans analizi tablosu.....	34
Çizelge 4.2.	Bazı ıspanak aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri (pg) ve önem grupları.....	35

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1.	İklim odasında çok gözlü saksılarda torf içerisine tohum ekimi.....	20
Şekil 3.2.	İklim odası otomatik kontrol panosunun dıştan ve içten görünümü.....	21
Şekil 3.3.	200 litre hacmindeki besin çözelti ile doldurulan hidroponik tanklarının görünümü.....	22
Şekil 3.5.	İklim odasında farklı ıspanak aksesyonlarının çıkış sonrası bakım ve gözlemleri.....	23
Şekil 3.6.	İspanak aksesyonlarına ait yaprak dokularının jilet yardımı ile parçalanması..	25
Şekil 3.7.	İspanak aksesyonlarına ait yaprak dokularına a) Buffer ilavesi, b) Süzme işlemi, c) ve d) Staining solüsyon ilavesi.....	26
Şekil 3.8.	Partec marka marka flow sitometri cihazı ile bitkilerin yaprak dokularında çekirdek DNA miktarlarının belirlenmesi.....	27
Şekil 3.9.	Çekirdek DNA'sının flow stometri ile analizi sonucu bilgisayar monitörüne yansıyan histogram.....	28
Şekil 3.10.	Flow sitometri ile ıspanağın (<i>Spinacia oleracea</i> L.) çekirdek DNA analizi sonucu bilgisayar monitörüne yansıyan histogram.....	29
Şekil 3.11.	İspanak genotipinin ve fiğın flow sitometride histogram değerleri.....	30
Şekil 3.12.	İspanak aksesyonlarına ait kromozom sayılarının Olympos marka BX 51 model ışık mikroskobunda belirlenmesi ve Rt Slider model CCD dijital kamera ile fotoğraflanması.....	33
Şekil 4. 1.	İspanak ve Fiğ G1 piklerinin birbirlerine göre pozisyonları.....	39
Şekil 4.2.	Farklı ıspanak ve Fiğ G1 piklerinin birbirlerine göre pozisyonları.....	39
Şekil 4.3.	İspanak aksesyonları 2C DNA içeriklerine göre Ward metodu ile yapılan kümeleme analizi.....	40

Şekil 4.4.	Diploid ($2n=12$) 1. Grup ıspanak aksesyonlarına ait mitoz kromozomlarının görünüşü.....	42
Şekil 4.5.	Diploid ($2n=2x=12$) 5. grup <i>Spinacia oleracea</i> L. aksesyonlarından mitoz kromozomlarının görünüşü.....	42
Şekil 4.6.	Diploid ($2n=2x=12$) 9. grup <i>Spinacia oleracea</i> L. aksesyonlarından mitoz kromozomlarının görünüşü.....	43

SİMGELER DİZİNİ

bp	: baz çifti
cm	: santimetre
g	:gram
ISSR	:Inter Simple Sequence Repeat
kg	:kilogram
m	:metre
maks.	:maksimum
mbp	:mega baz çifti
mg	:miligram
min.	:minimum
ml	:mililitre
mM	:miliMolar
ort.	:ortalama
pg	:pikogram
PI	:Propidium İodide
RAPD	:Random Amplified Polymorphic DNA
RIP	:Ribozom İnaktive Edici Enzim
RNaz	:Ribonükleaz
SRAP	:Sequence related amplified polymorphism
USA	:Amerika Birleşik Devletleri
USDA	:Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı
µl	:mikrolitre

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamın seçiminde, yürütülmesinde, sonuçlandırılması ve her aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Murat DEVECİ'ye, çalışmamın tüm aşamalarında bilgilerinden faydalandığım saygıdeğer tüm Namık Kemal Üniversitesi Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı akademik kadrosuna, yapılan ölçümlerde her türlü yardımı yapan, zaman harcayan, emek veren Namık Kemal Üniversitesi Bahçe Bitkileri 2016-2017 yılı lisans öğrencilerine teşekkür ederim.

Tez çalışması boyunca bana verdikleri manevi destek, göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ekim, 2017

Özcan YAVAŞ

1. GİRİŞ

Dilimizde Kazayaklılar familyası olarak adlandırılan *Chenopodiaceae* familyasında sebze olarak kullanılan ıspanak (*Spinacia oleracea* L.), kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva* Alef.) ve pazı (*B. vulgaris* L. var. *cicla* Moq.) vardır. Birçok ülkede ev bahçelerinde meraklı ailelerce yetiştirilerek yenilen *Atriplex hortensis* L., çayır ve meralarda kendiliğinden yetişen ve “yabani pazı” olarak bilinen *A. halimus* L. ve “kara parlak pazı” denilen *A. nitens* Schkuhr. bu familyanın bitkileridir. Ayrıca, tarlalarda yabancı ot olarak çıkan, “sirken” veya bazı yerlerde “hıştır” olarak adlandırılan *Chenopodium album* L., “kazayağı” veya “it üzümü” olarak isimlendirilen *C. foliosum* (Moenench) ve “pis kokulu kazayağı” olarak bilinen *C. vulvaria* L. yine bir kenopoddur.

Dilimizdeki ıspanak ismi, ıspanağın Acemce ve Arapça karşılıkları olan Esfanah ve Esfenakh isimlerinden doğmuştur. Ayrıca bitkinin genus ismi olan *Spinacia*'nın kökeni İspanyolcada kullanılan *spanachia* veya Latince diken anlamına gelen *spina* kelimelerinden kaynaklandığı da bilinmektedir. Bitkinin Latince tür ismi olan *oleracea* kelimesi de yine İspanyol kökenli bir kelime olup, dilimizdeki salata olarak kullanılan ve yaprakları yenilen sebzelere verilen genel bir ad olan yeşillik kelimesinin karşılığıdır.

İspanaklar, tohumlarının dikenli olup olmadığına göre iki ayrı botanik varyeteye ayrılırlar. Bunlar: *Spinacia oleracea* L. var. *oleracea*: Tohumları dikenli olanlar ile *Spinacia oleracea* L. var. *inermis* Moench: Tohumları dikensiz olanlar.

Bazı yazarlar tarafından *Spinacia tetrandia* Roxb. olarak adlandırılan bitkinin ıspanağın atası olduğu belirtilmektedir. İspanak $2n=2x=12$ kromozoma sahip diploid bir bitkidir (Şalk ve ark. 2008).

İspanakgiller (*Amaranthaceae*), içerisinde 160 cins ve 2400 tür içeren bir bitki familyasıdır. Bu türlerin çoğu ot ve çalıdır, çok azı ağaç ve sarmaşıktır. En başta subtropik ve tropik bölgelerde olmak üzere dünyanın pek çok yerinde bulunabilir. Familya üyelerinin çoğu daha serin ılıman bölgelerde de bulunur. APG II sisteminde bu familya *Caryophyllales* takımına yerleştirilmiştir. Daha evvelden *Chenopodiaceae* içinde yer alan bitkileri de artık içine almaktadır. İyi bilinen *Chenopodioid* türler arasında pancar, ıspanak, kaz ayağı bulunur. *Amaranthaceae*'nin *Chenopodiaceae*'dan farkı, zar gibi ince petalleri ve halka şeklinde birleşmiş stamenlerdir. *Chenopodiaceae*'nin bu gruba dahil edilmesinden evvel *Amaranthaceae*'e sadece 65 cins ve 900 tür bulunmaktaydı.

İspanak, kış aylarında halkımızın yeşil sebze gereksinimlerini karşılayabilen sınırlı sayıdaki sebze türlerinden birisidir. Nüfusumuzun hızla artması, insan beslenmesinde

hayvansal gıdaların ihtiyacı tam olarak karşılayamaması ve nihayet sebzelerin gerek insan sağlığı ve gerekse insan beslenmesi yönünden oynadığı rolün anlaşılması, sebze tüketiminin büyük bir hızla artmasına sebep olmaktadır (Bayraktar ve ark. 1978).

Ispanakların ihtiva ettiği **secretin** adlı maddenin tesiri ile sindirim sistemi üzerinde olumlu bir etkisi vardır. Küçük çocuklar, genç ve ihtiyarların diyetlerinde (böbrek hastaları hariç) ıspanak önemli yer tutar. Anemik hastaların beslenmesinde akla gelen ilk bitki ıspanaktır. Ayrıca göğüs hastalıklarında, ağız ve boğaz ağrılarında, şeker hastalıklarında, şişmanlık ve kabıza karşı halk arasında daima kullanılmaktadır. Birçok ülkede havuç suyu ile beraber alınmak suretiyle kanı zenginleştirdiği bilinmektedir. Bunlardan başka bileşiminde bulunan sodyum, potasyum ve bilhassa magnezyum dolayısıyla çocukların ve gençlerin gelişmeleri üzerinde çok önemli rol oynadığı da bilinmektedir. Ispanağın içerdiği besin maddeleri, vitaminler ve mineral maddeler Tablo 5'te verilmiştir. İçerdiği besin maddeleri yönünden besleyici yönü olmamakla beraber, ıspanak demir ve özellikle çiğ ıspanak potasyum bakımından zengindir. Kalsiyum bakımından da zengin olmasına rağmen, bu elementin oksalat formunda olması sebebiyle, sindirim sisteminde kalsiyumun hazmedilmesi mümkün olmamakta, idrar yoluyla olduğu gibi atılmakta ve hatta bu sebeple böbrek taşı rahatsızlığı çekenlerde yenilmesi tavsiye edilmemektedir. Ispanağın esas önemi içerdiği vitaminler sebebiyledir; A ve C vitaminleri bakımından zengindir ve ihtiva ettiği folik asit sebebiyle de kansızlığın tedavisinde iyi bir destektir ve kalbin çok iyi bir dostudur. Bu sebeple, özellikle çiğ olarak hazırlanan salatası, sağlık açısından son derece faydalıdır (Şalk ve ark. 2008).

Tek yıllık sebze olan ıspanağın anavatanının güney Türkistan, Kafkasya, Nepal yani batı Asya olduğu kabul edilmiştir. 2000 m yüksekliğe kadar çıkabilen bir sebzedir. Kültürü yapılan ıspanağın *Spinacia tetandra* Roxb'dan geliştiği kabul edilmiştir. Bu türün Afganistan, İran ve Türkistan'da sebze olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ispanak başlangıçta buralardan Çin'e daha sonrada haclı seferleri sırasında Avrupa'ya gelmiştir. Ispanağın Avrupa'ya Araplar tarafından İspanya üzerinden geldiği ayrı bir tahmindir. Ispanağın MS 7. Yüzyılda Çin'de 16. Yüzyıldan itibaren Avrupa'da yaygın olarak yetiştirildiği bilinmektedir. İlk önceleri tohumları dikenli olan *Spinacia oleracea* var. *inermis* üretilmiş daha sonra da tohumları dikensiz olan ıspanaklar yayılmıştır. Dikenli tohumlu ıspanaklar çevre şartlarına dayanıklı olarak yaprak meydana getirme gibi üstün bazı özelliklere sahipse de tohumlardaki dikenlik ekim ve tüketimde büyük sakıncalar doğurduğu için artık üretilmemektedir. Ancak ev önü bahçelerinde meraklılarınca yetiştirilmektedir. Ispanak üretimi çok büyük oranda kuzey yarım kürede yayılmış olup üretimi kuzey Avrupa ülkelerinde de yapılabilmektedir (Vural ve ark. 2000).

FAO'nun **2005** yılı verilerine göre dünyada toplam 828610 hektar alanda 1 2985 360 ton ıspanak üretimi gerçekleştirilmiştir. Dünya ıspanak üretimi içerisinde en fazla paya sahip olan ülkeler sırasıyla; Çin (%85), ABD (% 3), Japonya (%2), Türkiye (%2) ve Kore'dir (%1) (<http://www.fao.org>). Türkiye'de 2005 yılında 22500 hektar alanda toplam 220000 ton ıspanak üretimi gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, 2005 yılında dünyada 93890 ton ıspanak dışsatımı gerçekleştirilmiştir. Dünya ıspanak dışsatımı içerisinde en fazla paya sahip olan ülkeler sırasıyla; ABD (%24), Çin (%21), Meksika (%13), Hollanda (%10) ve İspanya'dır (%8) (<http://www.fao.org>). Türkiye 2005 yılında 860 ton ıspanak dışsatımı yapmıştır (Engindeniz 2008).

Dünyada 867.728 ha alanda ıspanak yetiştirilmekte ve bu alanda 20.980.488 ton ıspanak üretimi gerçekleşmektedir. Dünyada, ıspanak üretiminde % 85'lik payıyla Çin ilk sırada yer almaktadır. Çin'i sırasıyla Amerika Birleşik Devletleri, Japonya ve Türkiye takip etmektedir (Anonim 2012).

Ülkemizin hemen hemen her yerinde kış aylarında yetiştirilebilmektedir. Ispanağın birden fazla çeşidi mevcuttur ve yaprakları 2-30 cm uzunluğunda ve 1-15 cm genişliğinde olabilmektedir. Genellikle dünyada 3 tip ıspanak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bunlar; kıvrıkcık kabartılı yapraklara sahip taze tüketim için üretilenler, düz yapraklı kıvrımsız genellikle gıda sanayine yönelik üretilenler ve son olarak da bebek mamaları ve salatalarda hoş tadı ve nazik yapısı için kullanılmak üzere üretimi yapılanlardır. Ticari olarak genellikle kıvrıkcık olmayan düz yapraklı çeşitlerin üretimi, hasadı ve bitkilerin düzgün görünüşü için tercih edilmektedir (LeStrange ve ark. 1999).

Doğal kaynakların gün geçtikçe azalması, her alanda olduğu gibi tarımda da yeni arayışları ortaya çıkarmaktadır. Sanayileşme ve kentleşme nedeniyle tarım alanları azalmakta buna karşın bu alanlardan beslenecek insan sayısı hızlı bir biçimde artmaktadır. Bu nedenle, yürütülen araştırmalar birim alandan elde edilecek verimi maksimuma çıkarmak üzerine yoğunlaşmaktadır (Erdem ve ark. 2010a, 2010b).

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye de küresel iklim değişikliği, kurak ve yarı kurak alanların genişlemesine ek olarak kuraklığın süresinde ve şiddetindeki artışlar, çölleşme süreçlerini, tuzlanma ve erozyonu da tetikleyeceği bildirilmektedir (Anonim 2017a, Türkeş 1994).

Uzun yıllardan beri süregelen ekolojik sorunların kalıcı bir şekilde çözüme kavuşturulabilmesi ise ucuz ve güvenilir gıda kaynağı olan sebze alanlarının daha verimli kullanma ve tarım alanlarında sebze üretimine daha geniş yer ayırma ile mümkündür. Bunu

gerçekleştirebilmek için de yüksek verim ve kalite değerlerine sahip, lokal ekolojilere uyum sağlamış yeni sebze tür ve çeşitlerine acilen gereksinim bulunmaktadır (Teykin 2011).

Dünyanın önde gelen sebze üreticisi ülkeleri arasında yer almasına karşın Türkiye’de birim alandan elde edilen verim oldukça düşüktür ve ayrıca bölgeler arasında da verim farklılıkları oldukça fazladır. En yüksek verim Akdeniz Bölgesi’nde alınmaktadır ve bunda hiç kuşkusuz, bölgenin iklim avantajının ve seracılık bölgesi olmasının büyük etkisi vardır. Ancak bu bölgede, üretimde daha yüksek girdi kullanıldığı ve diğer bölgelere göre çok daha modern yetiştirme teknikleri ile çalışıldığı da göz ardı edilmemelidir. Buna karşılık; özellikle İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde birim alandan alınan verim oldukça düşüktür. Bu bölgelerde ürün seçiminde daha dikkatli davranılması gerekmektedir. Bu bölgeler için bölgenin iklim şartlarının dikkate alınması ve daha uygun tür ve çeşitlerin (soğuklara dayanıklı, erkenci vs.) seçimi verimi yükseltebilecek potansiyeldedir. Buna ek olarak, Ege ve Marmara bölgelerinde de verimin biraz daha artırılması söz konusu olabilecektir (Abak ve ark. 2010).

Türkiye’nin, sebzeler de dahil olmak üzere, çiftçilerin seleksiyonu sonucu oluşan ve halen büyük varyasyon gösteren eski kültür bitkilerine ait yerel çeşitler bakımından eşsiz bir ülke olduğu da belirtilmelidir (Bayraktar 1973, Tan 1998, Karagöz, 2003). Önceleri, yabani bitkilerden yapılan seçimle başlayan bu bitki kültürleri, Türkiye’nin orijin merkezi olmadığı, ancak çevre ülkelerle tarih boyunca yapılan alışverişler sonucunda ülkemize giren birçok farklı bitki türü ile de desteklenmiştir. Bunun en önemli nedenleri arasında Anadolu’nun, coğrafi konumu gereği sahip olduğu avantajlar gösterilebilmektedir. Anadolu; a) çok eski çağlardan beri birçok medeniyete ev sahipliği yapmış, b) İpek Yolu üzerinde bir köprü gibi işlev görmüş ve Asya ile Avrupa’yı birleştirmiş, c) farklı kültür mozaiklerini bünyesinde barındırmış, d) iki kıtanın birleştiği ve üçüncüye de çok yaklaştığı yerdeki konumu nedeniyle önemli bir ticaret merkezi olmuştur. Diğer yandan Türkiye, Avrupa ve Orta Doğu’nun en geniş biyolojik çeşitliliğine sahip ülkesi olarak bilinmektedir (Heywood 1995). Coğrafyasında on iki farklı endemizm merkezi barındıran Türkiye’nin, florasının da yaklaşık üçte biri endemiktir ve sahip olduğu biyolojik çeşitlilik bakımından tüm ülkeler arasında dokuzuncu sırada yer almaktadır (Karagöz 2003). Biyolojik çeşitliliğin oluşmasında, ekolojik çeşitliliğin de büyük bir payı vardır. Bugün Türkiye’de herhangi bir sebze türünde yüzlerce, hatta binlerce farklı populasyon bulmak mümkündür. Farklı türlere ait olan ve populasyon niteliği gösteren yerel kültür çeşitlerinin bazıları, halen tüketiciler tarafından yoğun talep görmekte ve çiftçiler tarafından da üretilmektedir. Bunun yanında, yerel çeşitlerin üretiminin terkedilmiş olduğu ve artık sadece gen bankalarında muhafaza edildiği de bir gerçektir. Fakat, bunların

tamamının gen bankaları tarafından muhafaza altına alındığını da söylemek mümkün değildir (Tan 1998).

Değişik bölge şartlarına uyabilecek yeni çeşitlerin geliştirilmesi, ekim alanlarının genişletilebilmesi için yapılacak en önemli çalışmalardan birisidir. Bitki ıslah çalışma yöntemleri istenilen özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesinde önemli rolü bulunmaktadır. Oluşturulan ıslah programları daha sağlıklı, kısa sürede, daha verimli ve daha etkin olarak hedeflenen amaçlara ulaşma şansını daha da arttırmış olacaktır (Gülcü 2016).

Yeni çeşitlerin geliştirilmesi çalışmalarının başarıya ulaşabilmesi için üzerinde ıslah çalışması yapılacak tür veya bu türe ait genetik kaynaklar hakkında yeterli biyolojik, taksonomik, genetik ve agronomik bilgi birikimine gereksinim vardır. Bu tür bir bilgi birikimine sahip olmadan başlanacak bir ıslah çalışmasının başarıya ulaşma şansı yok denecek kadar azdır.

Bitki ıslahının başarısında önemli yeri olan genetik varyasyonlar, ülkemizin çeşitli yörelerinde farklı türlerde görülen ve değerlendirilmesi gereken zengin kaynaklardır. Tarımsal biyoçeşitliliğin ortaya konması, toplanması ve korunması bitkisel çeşitliliğin sürdürülebilirliği için önemlidir. Uzun yıllar boyunca sürdürülen sebze yetiştiriciliğinde görülen tabii melezlemeler ve insan eliyle yapılan seleksiyonlar sonucu ortaya çıkan popülasyonlara diğer ülkelerden getirilen yetiştirme materyallerinin katılmasıyla ulusal bitki genetik kaynakları her geçen gün zenginleşmiştir. Anavatani arasında ülkemizde yer aldığı sebze türleri yönünden büyük tarımsal biyoçeşitlilik izlenirken çeşitli nedenlerle bu çeşitlilik genetik erozyona neden olmaktadır (Bozokalfa ve Eşiyok 2010).

Türün sahip olduğu genom yapısı, cins içerisinde yer alan diğer türler ile olan ilişkileri ile geçirdikleri evrimin anlaşılması, taksonomik sınıflandırılması ve ploidi düzeyi yukarıda anılan ve ıslah programı başlatılmadan önce uygun stratejilerin seçilmesi büyük gereksinim duyulan önemli bir bilgidir. Hassas ve güvenilir bir yöntemle elde edilmiş çekirdek DNA içeriği bilgisi yukarıda anılan ve gereksinim duyulan konuların tümüne ışık tutabilecek niteliktedir. Çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesinde flow sitometri bugün kullanılan en hızlı, ve güvenilir bir yöntem olup, kullanımı son yıllarda artmaktadır (Teykin 2011).

Flow sitometri; kan hücrelerinin hızlı ve hassas bir şekilde sayımı ve analizi amacıyla geliştirilmiş bir metottur. Teknolojinin hızla ilerlemesi ve farklı floresan boyaların geliştirilmesi, flow sitometriyi biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan önemli bir analiz yöntemi olmuştur. Flow sitometrinin bitki hücre ve organellerinde kullanımı yaklaşık 20 yıl önce başlamış olup, günümüzde her geçen gün artmaktadır. Flow sitometri, bitkilerde

geniş kullanıma sahip olmasına rağmen, bugüne kadar en fazla çekirdek DNA analizinde kullanılmıştır (Örkü 2016, Dolezel ve Bartos 2005).

Çekirdek DNA içeriği, hücre çekirdeğinin içerisinde bulunan toplam DNA miktarını ifade eder ve genellikle “C” değeri olarak ölçülür. Çekirdek DNA içeriği bilgisi taksonomik ve ıslah çalışmaları için son derece yararlıdır. Taksonomi, bitki ıslahı, bitki koruma ve moleküler biyoloji olmak üzere pek çok farklı alanlarda kullanılan önemli bir karakterdir. Farklı bitki türlerinde yapılan araştırmalar göstermiştir ki her genomun DNA içeriği genellikle sabit ve her tür için karakteristiktir. Bitki nukleuslarındaki DNA miktarlarının değişmezliği organizmalarda anahtar rol oynamaktadır (Gülcü 2016).

Çekirdek DNA içeriği terimi ilk defa Swift (1950) tarafından kromozom sayısı ile meydana gelebilecek karışıklıkları önlemek için ortaya atılmıştır. Herhangi bir genotipin „C“ değeri (1C değeri), DNA sı henüz replike olmamış haploid çekirdeğin (n kromozom sayısına sahip) DNA içeriği olduğu belirtilmiştir (Bennett ve Leitch 1995, Tuna 2009).

Çekirdek DNA içeriği hem bir bitkinin hücreleri arasında hem de aynı türün farklı bireyleri arasında değişmeden sabit kalmakta ve bu nedenle türlere özel olmaktadır (Bennett ve Leitch 1995). Türler arasında ise çekirdek DNA içeriği bakımından önemli düzeyde farklılıklar gözlenmektedir. Bu nedenle çekirdek DNA içeriği bilgisi taksonomik ve evrim çalışmaları için son derece yararlıdır (Rees ve Walter 1965, Price ve Bachman 1975, Ohri 1998, Özkan ve ark. 2003). Murray (2005) yeni türlerin oluşumunda çekirdek DNA içeriğinin bitki morfolojisinden daha önce farklılaştığını bu yüzden de, eğer bir tür içerisinde çekirdek DNA içeriği farklılığı belirlenmişse bunun tür içinde taksonomik çeşitliliğin ve yeni bir tür oluşum sürecinin varlığını gösteren bir belirti olabileceğini açıklamıştır.

Bennett and Smith (1976)’e göre çekirdek DNA içeriği ilk zamanlarda kimyasal analiz ve mikrodensitometri metodları ile belirlenmekteyken, günümüzde flow sitometri yüksek hızı ve hassasiyeti nedeniyle çekirdek DNA analizlerinde tercih edilen yöntem olmuştur (Gülcü 2016).

Flow sitometrede, hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüleritesi açısından değerlendirilmesidir (Demirel 1995). Bundan dolayı hedeflenen yapı ya da hücre önce fluoresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya (nükleik asitlere özel propidium iodide) kullanılarak belirlenir (Collier 2000).

Flow sitometri analizi hedeflenen yapı ve hücrelerinin sayısını türünü çok kısa sürede, ucuz ve etkin bir şekilde belirleyebilir (Karaboz ve ark. 2008).

Germplazm koleksiyonlarında karakterizasyon ve korumada iyi oluşturulmuş araştırma ve ıslah programlarında ploidi değerlendirilmesi çok önemli bir yer tutmaktadır

(Tuna ve ark. 2001). Ploidi belirlenmesi ençok olarak boyanmış kök uçlarından yapılmaktadır (Karp 1991). Fakat bu metot ağır ve fazla bitki üzerinde çalışılması zordur. Son yıllarda ploidi seviyelerinin belirlenmesinde flow sitometri çok kullanılan bir yöntem olmuştur (Bennet ve ark. 2000). Flow sitometrinin sağladığı bu avantajlar sebebiyle son yıllarda ekirdek DNA analizinin bitki ıslahı ve genetiğinde kullanımını giderek artmaktadır.

Bu nedenle yapılan çalışmamız ile ıspanağın genetik kaynaklarının elde edilerek ileride yapılacak ıslah çalışmalarında kışlık sebze olarak ülkemiz ekolojik koşullarındaki performanslarının iyileştirilmesinde, yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesinde faydalı olacağı kuşkusuzdur.

Bu tezin amacı, ülkemiz koşullarında kışlık sebze olarak performanslarının belirlenmesi için yurt içi ve yurt dışından elde edilmiş olan 53 ıspanak (*Spinacia olercea* L.) aksesyonunun ıslah çalışmalarında kullanılmadan önce ön araştırma kapsamında flow sitometri yöntemi kullanarak ekirdek DNA içerikleri ile aksesyonların ploidi düzeylerini saptamak ve bu yöntemi populusyonlar içerisindeki karışıklıkları belirlemede kullanmaktır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Ispanak

Ispanak (*Spinacia oleracea* L., $2n = 2x = 12$) önemli ve besleyici yeşil yapraklı sebzedir ve zengin bir karotenoid, folat, vitamin C, kalsiyum ve demir kaynağıdır (Xu et al. 2017).

Latince adı *Spinacia oleracea* L. olan ıspanak, Chenopodiaceae familyasında yer almaktadır. Serin iklim sebzelerinden olan ıspanağın anavatanı güney Türkistan, Kafkasya, Nepal olup yaprakları tüketilmektedir. 2012 yılında Çin, 19 513 000 ton ıspanak üretimi ile ilk sırada yer alırken, Türkiye 222 225 ton üretim ile dünyada Japonya'dan sonra 4.sırada yer almaktadır (Çizelge 2.1). Bu nedenle ıspanağın ülkemizin ekonomisi açısından önemi büyüktür ABD, ıspanak üretiminde son zamanlarda artış göstermiştir. Ispanak, yoğunlukla Ege, Batı Karadeniz, Batı Anadolu bölgelerinde yetiştirilmektedir (Çizelge 2.2). Ispanak sıcak bölgelerde yaz sonları ve kış aylarında soğuk bölgelerde ise kış ve ilkbahar döneminde üretilmektedir. Kış mevsimi boyunca bütün bölgelerimizde yoğun bir şekilde tüketilmektedir. Taşıma ve ulaşım imkanlarının artması ve iyileştirilmesi sonucu kış boyunca güney ve batı bölgelerimizde üretilen ıspanak, iç ve doğu bölgelerimize pazarlanmaktadır. Ispanağın dondurulmuş olarak pazarlanabilmesi yanında çorba ve çocuk maması sanayinde kullanılması da üretimi olumlu yönde etkilemiştir (Ekşi ve ark. 2014).

Çizelge 2.1. Ülkelere göre ıspanak üretimi (FAO, 2011 ve 2012)

	2011	2012
Çin	18 782 961	19 513 000
ABD	409 360	354 050
Japonya	263 500	275 000
Türkiye	221 632	222 225
Endonezya	160 513	154 964

Çizelge 2.2. Bölgelere göre ıspanak üretimi (TÜİK, 2011 ve 2012)

Bölgeler	Ispanak (ton) (2011)	Bölgeler	Ispanak (ton) (2012)
Ege	53.777	Ege	53.074
Batı Karadeniz	47.619	Batı Karadeniz	46.779
Batı Anadolu	35.968	Batı Anadolu	35.774
Doğu Marmara	34.485	Doğu Marmara	35.288
Akdeniz	29.459	Akdeniz	30.656
Batı Marmara	11.910	Batı Marmara	12.031
G.Doğu Anadolu	517	G. Doğu Anadolu	847

Ispanaklar, tohumlarının dikenli olup olmadığına göre iki ayrı botanik varyeteye ayrılırlar. Bunlar: *Spinacia oleracea* L. var. *oleracea* (Tohumları dikenli olanlar), *Spinacia oleracea* L. var. *inermis* Moench (Tohumları dikensiz olanlar). Bazı yazarlar tarafından *Spinacia tetrandia* Roxb. olarak adlandırılan bitkinin ıspanağın atası olduğu belirtilmektedir. Ispanak $2n=2x=12$ kromozoma sahip diploid bir bitkidir (Şalk ve ark. 2008).

Spinacia oleracea L. (ıspanak), iki büyük metasentrik, iki uzun subtelosentrik, iki kısa alt telosentrik, iki akrosentrik ve dört alt metasentrikten oluşan, $2n = 2x = 12$ kromozoma sahip hem erkek hem de dişi bitkiler bulunan dioik bir türüdür (Lan et al. 2006).

S. oleracea L. *Mazeran* bitkilerinden hazırlanan kök uç hücrelerinin metafaz ve prometafaz mikroskop gözlemlerinde hem erkek hem de dişi ıspanak bitkilerinde $2n = 12$ kromozom varlığı tespit edildi (Fujito et al. 2005).

2.2. Flow Sitometri Nedir

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Flow sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir (Yurtsever 2016). Günümüzde flow sitometri ya da akım sitometri terimleri kullanılmaktadır. Hedeflenen yapı ya da hücre önce fluoresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya (nükleik asitlere özel propidium iodide) kullanılarak işaretlenir. Bazı durumda ise klorofil gibi maddeler kendileri fluoresan özelliğe sahiptir (Kanev ve Muranlı 2016).

Flow sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın

önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (Karaboz ve ark. 2008).

Flow sitometrinin çalışma prensipleri 1870 yıllara kadar eski olsa da 1969 yılında argon lazerinin kullanılmaya başlaması, 1980 yılında ayırma işleminin bulunması ve son 10 yıldır sürekli olarak geliştirmesiyle günümüze kadar gelişmiştir (Demirel 1995).

2.3. Flow Sitometrinin Çalışma Prensibi

Her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan floresen ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur (Dunphy 2004).

Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek askıda olmalıdır. Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresen ışığı yayarlar.

Sitometri her bir hücre için aynı anda birçok parametre ölçer:

- ✓ Hücre çapı ile yaklaşık orantılı olarak düşük açıda ileri saçılma yoğunluğu
- ✓ Hücre içindeki granül yapı sayısı ile yaklaşık orantılı olarak ortogonal (90°) saçılma yoğunluğu
- ✓ Birçok dalga boyundaki floresen yoğunluğu

Fluoresen yoğunluğu her bir hücre için eş zamanlı olarak birçok farklı dalga boylarında ölçülür. Floresen propları hücrelerin spesifik bileşenlerinin sayılarını rapor etmek için kullanılır. Floresen antikolarlar daha çok spesifik yüzey reseptörleri yoğunluklarının rapor edilmesinde kullanılır ve böylece geçiş genleri ifade eden hücreler de dahil olmak üzere farklılaşmış hücre tiplerinin alt populasyonları da belirlenir. Bunlar floresen hale getirilerek, virüslerin veya hormonların yüzey reseptörleri ile bağı ölçülebilir. Hücreler arası bileşenler ile toplam DNA/ hücre (hücre çevrimleri analizlerine izin verecek şekilde), yeni sentez edilmiş

DNA, DNA veya mRNA oluşturan özel nükleotid filamentoz aktin ve antikor elde edilebilecek herhangi bir yapıyı kapsayacak şekilde fluorosen proplar ile veriler toplanabilir.

Flow sitometri aynı zamanda hücreler arası serbest kalsiyum, zar potansiyeli, pH veya serbest yağ asitlerindeki hızlı değişiklikleri de izleyebilir.

Flow sitometreler; akışkanlar, lazer optikler, elektronik dedektörler, analog dijital çevrimciler ve bilgisayarları içerir. Optik kısım lazer ışığı yayar ve ışını birkaç hücre çapının oluşturduğu demet üzerine odaklar (Karaboz ve ark. 2008).

2.4. Flow sitometri ve kullanım alanları

Çimen ve ark. (2016)' da ploidi ıslahı yoluyla çekirdeksiz yeni turunçgil çeşitlerini geliştirmek amacıyla tetraploid bitki elde edilmesinde bitkilerden alınan yaprak örneklerinde flow sitometri yoluyla ploidi analizi yapılmıştır.

Flow sitometri ile çok yıllık buğdaygil yem bitkisi genetik kaynaklarının karakterizasyonu isimli çalışmalarında, ıslah programlarında kullanmak amacıyla Doğu Anadolu Bölgesi dağlık bölgelerinden toplanmış olan 169 buğdaygil yem bitkisi popülasyonunun (*Festuca* sp., *Koeleria* sp. ve *Agropyron* sp.) çekirdek DNA içerikleri flow sitometri yöntemi ile ilk defa belirlenmiş ve popülasyonların ploidi düzeyi ile safiyetlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Tuna ve ark. 2016).

Primer mikroskop özellikleri kullanılarak hücrelerin biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin senelerdir saptanmasına karşılık, artık flow sitometri tekniği yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Flow sitometri, çeşitli hücrelerin bir süspansiyon halinde bir akış kanalı boyunca ard arda geçmesi ve bu sırada hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre ayrılması esasına dayanan bir teknik ve cihazdır. Bu cihaz ile hücrenin yüzey ve iç proteinleri, organelleri ve diğer bileşenleri analiz ve ayrımı, lazer ve elektronik teknolojisi kullanılarak büyüklük, granülarite ve floresans emisyonu esasına göre yapılmaktadır. Tıpta, Akış sitometri cihazı ile analiz için hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla; kan, kemik iliği, beyin, omurilik sıvısı, alveoler lavaj sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, doku biyopsi örnekleri, parafin bloktaki dokular, hücre kültürü örneklerinde rahatlıkla kullanılabilir. Flow sitometri yöntemi sıklıkla hücre ölümü, hücresel özellikler ve proliferasyonun belirlenmesi; mikroorganizma (hücre içi bakteri, virüs, bakteri ve alg) sayısı ve tür analizi yapılması; parazit ve mantar belirlenmesi; hücre kültüründe virüs, bakteri ve hücre sayımı; nötral yağ içeriğinin belirlenmesi; bağıl klorofil içeriğine bağlı alt popülasyonların, türlerin ve bireylerin belirlenmesi; alglerde toksik madde etkileri; LC50 değerlerinin bulunmasında; alglerde

sitotoksik çalışmalarda ve ekotoksikoloji çalışmalarında önemli bir şekilde kullanılmaktadır (Kanev ve Muranlı 2016).

Flow sitometri yöntemi yaklaşık elli yıldır bitkilerde çekirdek DNA miktarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu çalışmada endemik *Dianthus ingoldbyi* Turill bitkisinin çekirdek DNA miktarı flow sitometri yöntemiyle belirlendi. Materyal olarak sağlıklı yaprak dokusu kullanıldı. *D. Ingoldbyi*'e ve internal standart olarak kullanılan *Hordeum vulgare* 'ye ait yaprak parçaları MgSO₄ tamponu içinde kesilerek çekirdekler çıkarıldı. Süspansiyon naylon süzgeç ile süzülerek santrifüj edildi. Çökelti üzerine RNase ve Propidium iodide eklenmiş tampon ilave edilerek 37°C de 20 dakika bekletildi. Boyanan çekirdekler EPICS XL (Beckmann Coulter) model flow sitometri cihazı ile analiz edildi. Analizler on farklı bitkiden üç tekrarlı olarak yapıldı. *D. ingoldbyi* 'nin 2C çekirdek DNA miktarı 2.48 pg (0.03) olarak hesaplandı. Bitkilerde çekirdek DNA miktarlarının bilinmesi, moleküler biyoloji, bitki sistematığı ve ekolojisini de içine alan pek çok disiplin için oldukça önemlidir. Bununla birlikte coğrafik koşullar, bitki yaşam formları ve ekipman maliyeti nedeniyle angiospermilerin ancak %1,4 'ünün çekirdek DNA miktarı bilinmektedir. Bu çalışma ile endemik bir tür olan *D. ingoldbyi* 'nin 2C çekirdek DNA miktarı hesaplanarak, angiosperm çekirdek DNA miktarı bilgilerine katkı sağlandı (Meriç ve Güler 2008).

Ülkemizde son yıllarda morfolojik ve genetik karakterizasyonun yanında bitkilerde sitolojik karakterizasyonda oldukça önem kazanmaktadır. Sitolojik düzeyde yapılan çalışmalarda ise kromozomal incelemeler, stomalar düzeyde incelemeler ve flow sitometri analizleri kullanılmaktadır. Sitolojik çalışmalarda kullanılan tekniklerin, çevresel koşullardan etkilenmemesi, analizin bitkinin herhangi bir parçasında ya da büyüme döneminde yapılabilmesi, analiz sayısının zamanla ve materyalle sınırlı olmaması, analizin bitkinin çok küçük örneklerinde yapılabilmesi de sitolojik çalışmaların önemini arttırmıştır. Ayrıca ıslahta istenilen özelliklerin taranabilmesi için çeşitlerin sitolojik yapıları arasındaki ilişkinin bilinmesi önemli rol oynamaktadır (Özgen ve ark. 2000).

Mikrobiyologlar açısından flow sitometrik metodun en önemli özelliği, her bireysel hücre için veri toplanmasıdır. Bu durum, araştırmacının bir populasyon içindeki dağılım özelliğini veya özelliklerini ölçebilmesini sağlar (Winson ve Davey 2000).

2.5. Flow sitometrinin tarımsal araştırmalarda kullanım alanları

Ülkemizin farklı bölgelerinden *Lagenaria siceraria* türüne ait yaklaşık 400 adet genotip toplanmış ve bunların 338'inin morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır. (Yetisir ve

ark. 2007, Yetisir ve ark. 2008, Yetisir ve ark. 2010). Islah çalışmalarında genotipler arasındaki ploidi seviyelerindeki farklılıklar üreme engelleri oluşturur ve gen akışını olumsuz etkiler. Bu nedenle ıslah çalışmalarına geçilmeden önce bireyler arasındaki ploidi seviyesindeki farklılıkların ve bu farklılıkların derecesinin tespiti önem taşımaktadır. Flow sitometri; son yıllarda, kolaylığı, hızı, hassasiyeti ve güvenilirliğinden dolayı ploidi analizlerinde tercih edilen bir yöntemdir. Ülkemizin farklı bölgelerinden toplanan ve yurt dışı kaynaklardan temin edilmiş olan su kabağı genotiplerinin çekirdek DNA içerikleri ve bununla birlikte ploidi düzeyleri Flow sitometri yöntemi ile saptanmıştır. Ölçüm yönteminden kaynaklanan standart sapma da hesaba katıldığında değerlendirmeye alınan *Lagenaria siceraria* aksesyonlarında poliplodi durumunun olmadığı görülmüştür (Ersoy ve ark. 2014).

Bamya; yetiştirilen sebzeler arasında üretiminin zorluğu sebebiyle ülkemizde yetiştiriciliği ve ıslahı gereken yere ulaşamamıştır. Bunda en büyük etkenlerden bir tanesi ıslahta materyal olarak kullanılacak çeşitlerin sitolojik durumları hakkında yeterli düzeyde bilginin olmamasıdır. Yetiştiriciliği yapılan bamya çeşit ve lokal popülasyonlarının ploidy düzeyi ile ilgili güvenilir bilgiler bulunmamaktadır. Bitkilerde ploidi düzeyi klasik olarak ışık mikroskobu ile kök ucu dokularından hazırlanmış preparatlar üzerindeki mitoz kromozomlarını sayarak saptanmaktadır. Ancak bu yöntem, bol miktarda bölünen hücreye sahip genç ve hızlı büyüyen kök ucu materyaline gereksinim duyar ve oldukça yavaş ve zahmetlidir. Buna ilave olarak bamya gibi küçük ve yüksek sayıda kromozoma sahip bitkilerde sık sık hatalara da sebep olabilmektedir. Hücre çekirdeği içerisindeki DNA miktarı ile ploidi düzeyi arasında çok sıkı bir ilişki olmasından dolayı çekirdek DNA içeriği bilgisi ploidy düzeyinin bir göstergesi olarak kullanılabilir. Bugün çekirdek DNA içeriğinin flow sitometri ile nispeten cüzi bir maliyet ile hızlı ve hassas bir şekilde belirlenebilmesi yöntemi bugün ploidy analizlerinde tercih edilir hale getirmiştir. Bu yapılan çalışmanın amacı flow sitometri ile Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanmış yaklaşık 20 farklı bamya çeşit ve lokal popülasyonlarının ploidy düzeyini ilk defa belirlemektir. Yapılan çalışma sonucunda elde ettiğimiz sonuçlara göre bamya çeşit ve lokal popülasyonlarının çekirdek DNA içeriklerinin 2,88 pg/2C ile 3,00 pg/2C arasında değiştiği tespit edilmiştir. Çekirdek DNA analizi sonuçlarına göre bu çalışma kapsamında incelenen tüm bamya çeşit ve lokal popülasyonlarının aynı ploidy düzeyine sahip olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca bir bamya bitkisinde kromozom sayımı yapılarak çekirdek DNA içeriği ile ilişkilendirilmiş ve böylece tüm çeşit ve lokal popülasyonların ploidy düzeyi belirlenmiştir (Örkçü ve ark. 2014).

Tuna ve Cabi (2014), "Bazı buğdaygil yem bitkisi türlerine ait popülasyonların çekirdek DNA içeriklerinin flow sitometri yöntemiyle belirlenmesi ve ploidy analizi ile tür

teşhisinde kullanımı” isimli araştırmalarında buğdaygil yem bitkisi genetik kaynaklarının ıslah programlarına dahil edilmeden önce muhakkak karakterize edilmelerinin gerekli olduğunu bu tür çalışmalar içinde flow sitometrinin řu an mevcut olan en hassas, hızlı, ucuz ve güvenilir metot olduğunu bildirmişlerdir.

Teykin (2011), 83 *Bromus catharticus* Vahl. aksesyonunun flow sitometri yöntemiyle çekirdek DNA içeriklerini belirlediği araştırmasında, 81 aksesyonun 11.79 pg 2C–1 ile 13.72 pg 2C–1 arasında ve hekzaploid olduklarını bildirmiştir. Çekirdek DNA içeriği bariz olarak çok yüksek olan (19.66 ve 19.41 pg 2C–1) iki aksesyonun ise başka türe ait olduğunu bildirmiştir.

Tuna (2009), çekirdek DNA içeriğinin tarımsal araştırmalarda kullanım alanları 1. ploidy analizi 2. ploidy düzeyi stabilitesinin kontrolü, 3. haploid ve double haploid hatların üretimi, 4. yeni ploidy düzeylerinin belirlenmesi, 5. aneuploid bitkilerin belirlenmesi, 6. erken gelişme dönemlerinde cinsiyet belirlenmesi, 7. türler arası melezleme, 8. somatik melezleme, 9. hücre döngüsü analizi olarak sıralandığını bildirmiştir.

Festuca cinsi içerisinde türlerin monoploid çekirdek DNA içeriğinin (2C DNA içeriği/temel kromozom seti sayısı) 1.58 ile 4.03 pg arasında değişmektedir (Bennett and Leitch, 2004). *Festuca* cinsi içerisindeki monoploid çekirdek DNA içeriği bakımından gözlenen bu farklılığın cinsin sınıflandırılmasında yararlı olduğu saptanmıştır (Lourerio ve ark., 2007).

Tuna ve ark. (2001), dört *Bromus* türünün 322 aksesyonun ploidy düzeylerini saptamak için yaptıkları çalışmada, her bir aksesyondan 10 bitkinin DNA içeriğini tespit etmek için Flow sitometri yöntemi ile çalışmışlardır. Seçilen aksesyonlarda ortalama DNA içeriklerinin ploidi seviyeleri ile bağlantılı olduğu, bu aksesyonların DNA içeriklerinin farklı ploidy seviyelerini temsil ettiklerini gösterdiğini tespit etmişlerdir. Tetraploid, octaploid ve decaploid aksesyonların nükleer DNA içeriğinin diploid aksesyonlardan yaklaşık olarak 2, 4 ve 5 defa daha büyük olduğunu belirlemişlerdir.

2.6. Kromozomların sayımı ve ploidi düzeyinin belirlenmesi

Bitkilerin ploidi düzeyi geleneksel olarak yavaş ve çok fazla iş gücüne gereksinim gösteren feulgen veya asetokarmin ile boyanmış kök ucu dokularından yapılmış preparatlar üzerindeki mitoz kromozomlarını ışık mikroskobu ile sayarak belirlenmektedir. Ancak, yöntem genetik kaynak koleksiyonlarında olduğu gibi çok sayıda bitki örneğinin analiz edilmesinin gerektiği durumlarda ploidi düzeyi belirlemede pratik ve kullanışlı değildir. Buna

ilave olarak, kromozomları küçük ve ploidi düzeyi yüksek olan türlerde bu yöntem ile ploidi analizi oldukça zahmetlidir ve çoğunlukla da genetik kaynakların yanlış sınıflandırılmasına neden olmaktadır (Tuna ve Cabi 2014).

Bir türü belirlemek için morfolojik, genetik ve sitolojik çalışmalardan bitki ıslahçıları yararlanmak durumundadırlar. Herhangi bir türün kesinlik kazanması sadece belirli bir alanda yapılan karakterizasyon çalışmaları yeterli olmamaktadır. Bir türün sistematikteki klasik yerini tayin etmek ve bazı ıslah sorunlarını çözebilmek için, o türün çekirdek DNA içeriğinin hesaplanması, ploidi düzeyinin belirlenmesi, kromozomların sayısı, kromozomlarının büyüklüğü, morfolojisi, boyanması, sentromerlerinin kromozom üzerindeki yeri ve şeklinin nasıl olduğunun bilinmesi lazımdır (Akçelik 2009).

Ohri (1998) bir cins içerisinde aynı kromozom sayısına sahip çok sayıda türün bulunduğu durumlarda varsa türler arasındaki çekirdek DNA içeriği farklılıklarının türlerin teşhisi ve sınıflandırılmalarında çok etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Geleneksel olarak bitkilerin ploidy düzeyi feulgen veya asetokarmin ile boyanmış kök uçlarından hazırlanmış preparatlar üzerinde bulunan mitoz kromozomlarını ışık mikroskobu yardımıyla sayarak tespit edilmektedir (Karp 1991). Bitki genetik kaynaklarının karakterize edilmesi örneğinde olduğu gibi çok sayıda örnekte ploidy düzeyinin belirlenmesinde kullanılabilir pratik ve kullanışlı bir yöntem değildir. Ayrıca, kromozomları küçük ve ploidy düzeyi yüksek olan türlerde kromozom sayarak ploidy belirlenmesi oldukça zordur ve çoğunlukla da genetik kaynakların yanlış sınıflandırılmasına neden olmaktadır (Brummer ve ark. 1999).

Bitkilerin sahip olduğu tüm kromozomlar hücre çekirdeğinde bulunduğundan, çekirdek DNA miktarları ploidy düzeyinin ifadesi olarak düşünülmektedir (Lu ve ark. 1998). Önceleri bitki çekirdek DNA miktarları feulgen mikrospektrofotometri ile tespit edilmekteydi (Bennett ve Smith 1976). Son yıllarda, kolaylığı, hızı ve güvenilirliğinden dolayı flow sitometri ploidi belirlenmesinde tercih edilen yöntem olmuş (Rayburn ve ark. 1989, Heslop-Harrison 1995) ve *Panicum virgatum* L. (Hultquist ve ark. 1997, Lu ve ark. 1998), Manda otu (*Buchloe dactyloides*) (Johnson ve ark. 1998) yonca (*Medicago sativa* L.) (Brummer ve ark. 1999), bazı yeşil alan türleri (Arumuganathan ve ark. 1999), kılçıksız brom (*Bromus inermis* L.) (Tuna ve ark. 2001), ve domuz ayrığı (*Dactylis* L.) (Tuna ve ark. 2007) cinslerinde başarıyla kullanılmıştır.

Genom başına çekirdek DNA miktarı hem tek bir bitkinin hücreleri arasında hemde aynı türün farklı bireyleri arasında değişmeyerek sabit kalmakta ve bu yüzden de türlere özel olmaktadır (Bennett ve Leitch 1995). Bir bitki hücresindeki DNA miktarı C harfi ile pikogram

cinsinden belirtilir. C değeri haploid genom; 2C değeri ise diploid somatik genomun DNA miktarını ifade etmektedir. Angiospermilerin çekirdek DNA larına ait C değerleri 0.1 pg ile 125 pg arasında değişmektedir Pikogram cinsinden belirlenen DNA miktarları nükleotid baz çiftine (1pg = 980 Mbp) dönüştürülebilmektedir. Genom başına çekirdek DNA miktarı hem tek bir bitkinin hücreleri arasında hemde aynı türün farklı bireyleri arasında 2 değişmeyerek sabit kalmakta ve bu yüzden de türlere özel olmaktadır (Bennett ve ark. 2000). Çekirdek DNA miktarlarının türlere özel olması, çekirdek DNA'sı değerlerini taksonomi, evrim ve moleküler genetik çalışmaları için vazgeçilmez temel bilgi yapmaktadır (Bennett and Leitch 1995).

Çekirdek DNA miktarları *Vicia* (Chooi 1971), *Solanaceae* (Narayan 1987) ve *Bromus* (Tuna ve ark. 2001) cinslerinde de kullanılarak türlerin genomik karakterizasyonu ve evrimlerinin incelenmesinde başarıyla kullanılmıştır.

2.7. Ispanakta kromozom sayımı

Ispanakta Koto çeşidine ait bitkilerde kromozom sayımı ezme yayma preparasyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Viyolde yetiştirilen bitkilerden kök örnekleri alınmıştır. Çimlenen ve yeterli uzunluğa ulaşan kök uçları kesilerek, ilk işlem için 16:30 ve 09:00'da α -monobromonaftaline konulmuştur ve 16 saat 4 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra kök uçları 3:1 absölü alkol:glasiyal asetik asit karışımında tespit edilmiştir. Tespit işlemi sonrasında %70'lik alkolde buzdolabında depolanmış ve kök uçları boyamada aseto-orsein ve feulgen kullanılmıştır. Aseto-orseinde yapılan çalışmada, kök uçları buzdolabından çıkarılarak kök uçları, 1N HCl'de oda sıcaklığında 5-6-7-10-12 dakika oda koşullarında hidroliz edilmiştir. Kök uçları %2'lik aseto-orsein boyası ile oda sıcaklığında iki saat boyanmıştır. Boyanan kök uçlarının, %45'lik asetik asit ile ezme preparatları hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar, sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Feulgende yapılan çalışmada, kök uçları buzdolabından çıkarılarak kök uçları, 1N HCl'de 5-6-7-10-12 dakika sıcak su banyosunda hidroliz edilmiştir. Kök uçları feulgen boyasında oda sıcaklığında iki saat boyanmıştır. Boyanan kök uçlarının, %45'lik asetik asit ile ezme preparatları hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar, sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. 16:30 da α -monobromonaftaline alınan kök uçlarında metafaz safhası gözlenmiştir. Feulgende yapılan boyamada, aseto-orseinde yapılan boyamaya göre daha iyi sonuç alınmıştır (Ekşi ve ark. 2014).

Ispanak, $2n=12$ kromozom yapısına sahip dioik bir bitki olup, sitolojik açıdan ilk kez Stomps (1911) tarafından araştırılmıştır. Daha sonra birçok araştırmacı bu bitki ile çalışmalar yapmıştır (Winge 1917, Sinotvu 1929, Tuschnjakowa 1929).

Ispanakta sitogenetik analiz ile ilgili yapılan çalışmada P.I. 169671, Spica, Universal, Jiromaru, Early Hybrid (99 x 951 x Virginia Savoy) çeşitlerinde kök ucu ile kromozom çalışması yapılmıştır. İlk aşamada kök uçlarına %0.07-0.1 kolhisin uygulanmıştır. Ön uygulamadan sonra kök uçları 24 saat 3:1 asetik asitte bekletilmiştir. Kök uçları, 1N HCl'de 58-60°C'de 0.5-2 dakika süresince hidroliz edilmiş ve feulgen boyasında 2-3 saat oda sıcaklığında boyanmıştır. Boyamadan sonra kök uçları aseto karmen ile ezilmiştir (Izuka ve Janick 1962).

Ispanak ile aynı familyada olan şeker pancarında (*Beta vulgaris* L.), homozigot hatta yapılan çalışmada, karyotip analizini belirlemek amacıyla kök uçlarından yararlanılmıştır. Ön muamele maddesi olarak 0.002 mol oxyquinoline uygulanmıştır. Kök uçları asetik asitte (1:3) fikse edilmiş ve buzdolabında depolanmıştır. Buzdolabından çıkarılan kök uçları, 1N HCl'de 60°C'de 5 dakika süresince bekletilmiştir. Hidrolizden sonra kök uçları, lakto-propiyonik orcein maddesine aktarılmıştır (Dyer, 1963). Ortalama kromozom uzunluğu 2.46 p olarak bulunmuş ve en uzun ve en kısa kromozom arasındaki fark 2.46 s olarak belirlenmiştir (Bosemark ve Bormotov 1971).

2. MATERYAL ve METOD

Araştırmada; Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri İklim Odası ile Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bitki Genetiği ve Sitogenetiği laboratuvarından faydalanılmıştır.

3.1. Materyal

Araştırmamızda kullanılacak ıspanak aksesyonları Amerika'da bulunan USDA (United States Department of Agriculture)'dan temin edilmiştir. Çalışmamızda toplam 53 ıspanak aksesyonu kullanılmış olup bunlara ait liste izelge 3.1 de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Projede kullanılan ıspanak aksesyonlarının ad, akseyon no ve orijinleri

No	Accession No	Orijin	Bitki İsmi
1	PI 254565	Afghanistan	Polack
2	PI 167434	Belgium	Cavallius
3	PI 179589	Belgium	Giant Spinach
4	PI 179595	Belgium	Victoria
5	PI 360710	France	Samos Hybrid
6	PI 266926	Germany	Universal
7	PI 608712	Germany	Spi 153/89
8	PI 531449	Hungary	Hegyko
9	PI 531451	Hungary	Matador
10	PI 531454	Hungary	Mosonmagyarovari
11	PI 222270	Iran	Esfenaj
12	PI 251507	Iran	Espinage
13	PI 209645	Iran, Fars	No. 2
14	PI 176371	İtaly	Monstrans Viroflag
15	PI 227230	Japan	Jiromaru
16	PI 508504	Korea, South	Summer Green
17	PI 358260	Macedonia	Radoviski
18	PI 274042	Menşei bilinmiyor	Best Of All
19	PI 274044	Menşei bilinmiyor	Early Giant
20	PI 274048	Menşei bilinmiyor	Giant Early Leaf
21	PI 321020	Menşei bilinmiyor	Wushe Waka Maru

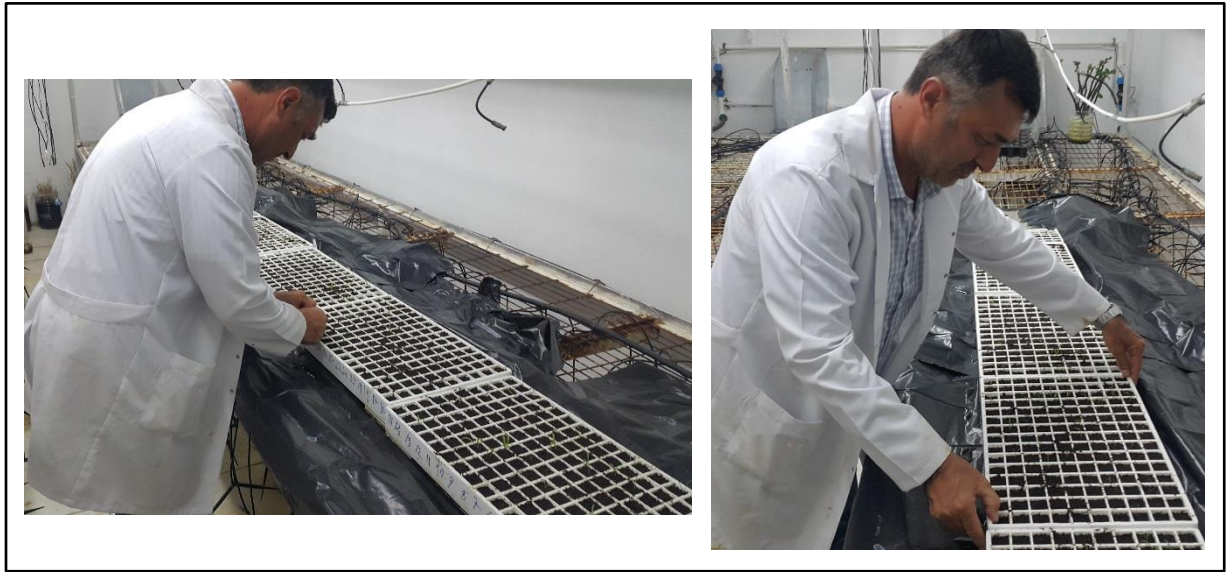
No	Accesion	Orijin	Bitki İsmi
22	PI 339545	Menşei bilinmiyor	101-2
23	PI 303138	Netherlands	Princess Juliana
24	PI 360895	Netherlands	Nores
25	PI 358248	Serbia and Monteneg	OhrIDski
26	PI 358254	Serbia and Monteneg	Sirokolisten
27	PI 379548	Serbia and Monteneg	Prilepski
28	PI 379549	Serbia and Monteneg	Stipski
29	PI 379552	Serbia and Monteneg	Skopski
30	PI 499373	Soviet Union	Godir
31	PI 249920	Spain	Espinaca Veroflay
32	PI 262161	Spain	Nostruosa Wireflay
33	NSL 28218	Sweden	Viking
34	PI 179507	Syria	Beledi
35	PI 164965	Turkey	Cornell ID #242
36	PI 165012	Turkey	Cornell ID #244; Harlan 88
37	PI 167098	Turkey	Cornell ID #250; Harlan 295
38	PI 169026	Turkey	Cgn 9499; Harlan 2920; B
39	PI 176776	Turkey	Cornell ID #59; Harlan 9452
40	PI 177558	Turkey	Harian 4403
41	PI 206753	Turkey	Cornell ID #29; Godfray 1133
42	Ames 23664	Denmark, Copenhagen	Spi 151/93
43	NSL 6084	United States, California	Giant Thick Leaved/Nobel
44	NSL 4683	United States, Maryland	Dixie Market
45	NSL 81329	United States, Maryland	Bouquet
46	NSL 26513	United States, Michigan	Resistoflay
47	NSL 6097	United States, Minnesota	Northland
48	NSL 6097	United States, Missouri	Va Savoy Blight Resistant
49	NSL 6088	United States, New York	Blight Resistant Savoy
50	NSL 6099	United States, Pennsylvani	Nobel/Giant Thick Leaved
51	NSL 6557	United States, Washington	Old Dominion
52	NSL 28217	United States, Wyoming	Mt Evergreen
53	NSL 81328	Unites States, Maryland	Duet

3.2. Yöntem

3.2.1 Bitkilerin Yetiştiriciliği

Araştırmada bitkilerin yetiştiriciliği Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü iklim odasında yapılmıştır.

Deneme kontrollü koşullar altında +40°C ile -20°C sıcaklıklar arasında ayarlanabilen iklim odasında kurulmuştur. Araştırmada iklim odası, 22/18°C (gündüz /gece) sıcaklık, %70 nem, 10/14 (aydınlık/gece) saatlik fotoperiyodik düzende, 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetine sahip olacak şekilde ayarlanmıştır. Tohum ekimi yetiştirme odasında yetiştirme masaları üzerinde plastik multipotlara yapılmıştır (Şekil 3.1). Ispanak tohumları torf içerisine ekilmiş ve normal bakım işlemleri yapılarak (Şalk ve ark. 2008) yetiştirme odalarında ıspanak için uygun şartlarda bitkiler ilk gerçek yaprakların görüldüğü döneme kadar çok gözlü saksılarda yetiştirilmiştir.



Şekil 3.1. İklim odasında çok gözlü saksılarda torf içerisine tohum ekimi

İlk gerçek yaprakların görüldüğü dönemde Brechner ve deVilliers (2012)'tarafından hazırlanan besin çözeltisine göre hidroponik sisteme alınmışlardır (Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.5). Bitkiler iklim odasında 800 ml hacminde (13x11cm ebatlarında) perlit içeren saksılarda yetiştirilmişlerdir (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).



Şekil 3.2. İklim odası otomatik kontrol panosunun dıştan ve içten görünümü



Şekil 3.3. 200 litre hacmindeki besin çözelti ile doldurulan hidroponik tanklarının görünümü



Şekil 3.4. İklim odasında kontrollü koşullarda 800 ml hacminde perlit içeren saksılarda ıspanakların görünümü.



Şekil 3.5. İklim odasında farklı ıspanak Aksesyonlarının çıkış sonrası bakım ve gözlemleri.

3.2.2. Flow sitometri ile Çekirdek DNA Analizi (pg)

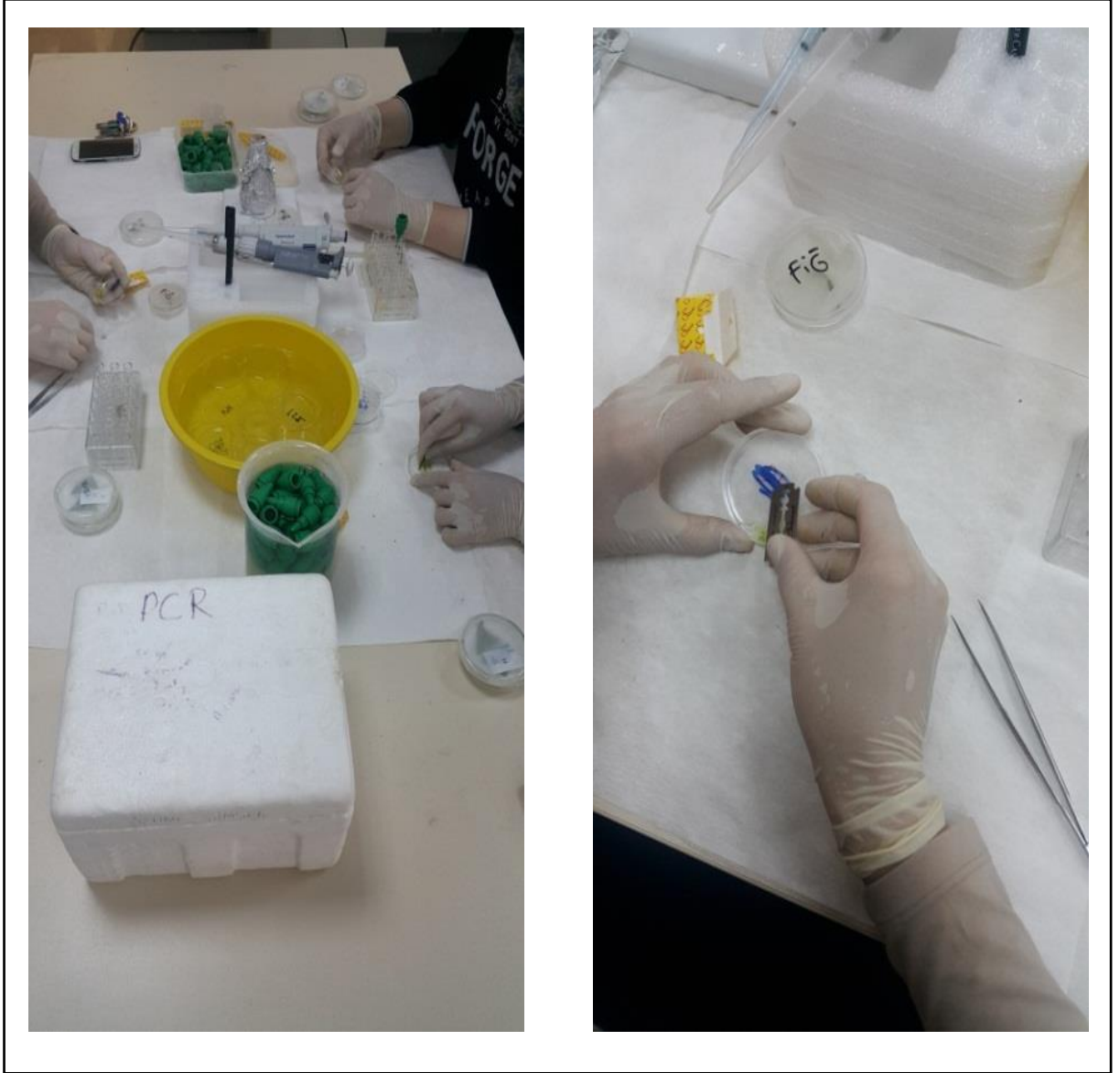
Çalışmamızda florasan boya olarak DAPI kullanılmış olup, Partec firmasının ticari kitleri kullanılarak hazırlanmıştır. Örnekler Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Sitogenetik Laboratuvar'ında Partec marka marka flow sitometri cihazı ile analiz edilmişlerdir. Çekirdek DNA analizi için öncelikle aşağıda sunulmuş olan protokol kullanılarak ıspanak yaprak dokularından nukleus izolasyonu yapılmıştır (Tuna, 2014).

Çekirdek DNA analizi: Çekirdek DNA analizi için bitki yaprak dokularından hücre çekirdeği izolasyonunda Partec firmasının hazır kitleri kullanılmıştır. Prosedürün uygulanışı aşağıdaki gibidir.

1. Yaklaşık olarak 0,5 cm² büyüklüğünde taze yaprak dokusu petri kabına konur ve üzerine 500 µl Extraction Buffer ilave edilir
2. Yaprak dokusu keskin jilet ile 30-60 saniye süresince küçük parçalara ayrılana kadar parçalanır. Bu şekilde hazırlanmış örnek petri kabı içerisinde hafifçe 10-15 saniye kadar çalkalanır.
3. Çalkalama işleminden sonra 40 saniye kadar petri kabında bekletilen örnek Partec marka 50 µl CellTrics filtre ile süzülerek tüp içerisine transfer edilir.
4. Tüp içerisine daha önce hazırlanmış 2ml staining solüyon ilave edilerek hazırlanan örnek ışıksız bir ortamda 30-60 dakika inkübe edilir.

Bu sürenin sonunda izole edilmiş olan hücre çekirdekleri flow sitometri cihazı kullanılarak analiz edilir.

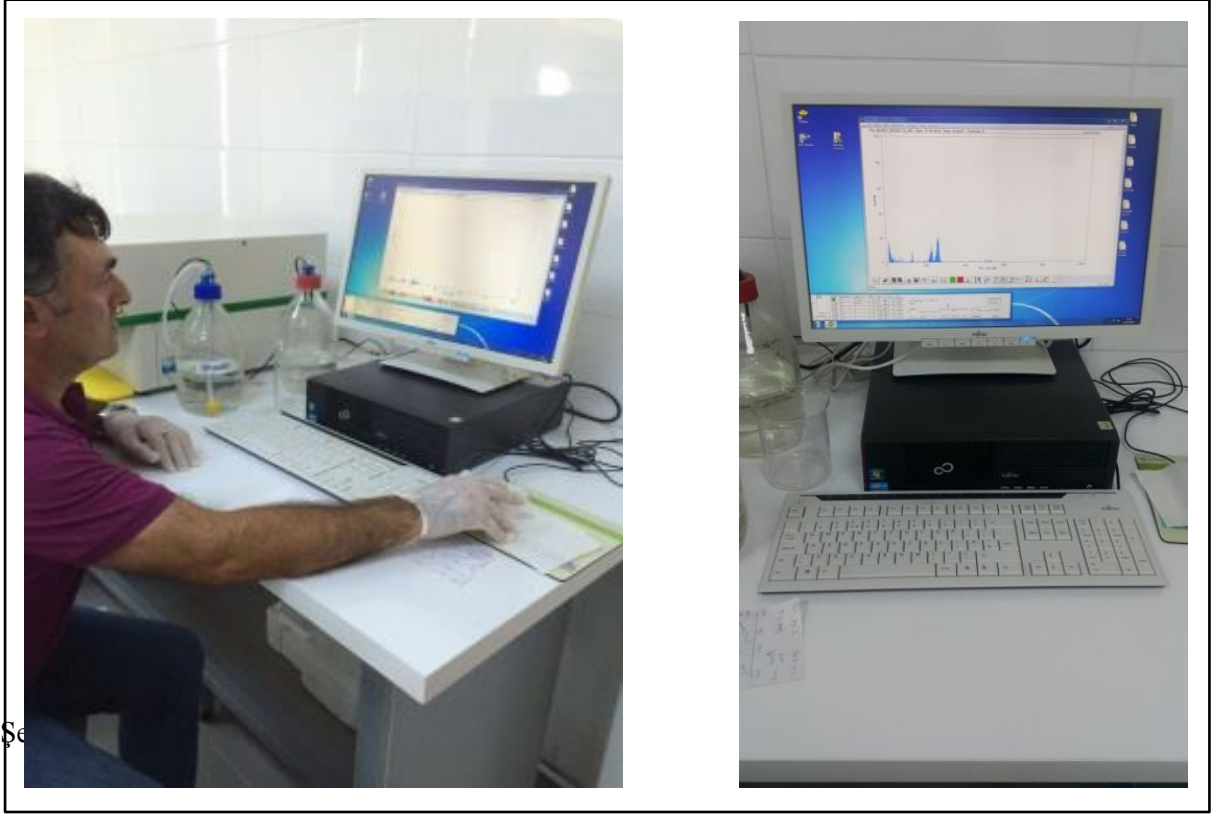
Yukarıda verilen yöntemle göre muamele edilmiş bitki dokusu hücreleri mekanik olarak birbirinden ayrılmış, hücre çekirdekleri serbest kalmış, çekirdek zarı buffer tarafından içerilen bazı kimyasal maddeler tarafından zedelenmiş ve çekirdek zarı üzerinde delikler meydana gelmiştir. Solusyonun içerdiği propidium iodide (nükleik asitlere bağlanma özelliğine sahip florasan boya), bu deliklerden yararlanarak çekirdek içerisine girmiş ve nükleik asitlere bağlanmıştır. Burada çekirdeğin içerisine giren Dapi miktarı, çekirdek içerisinden bulunan DNA miktarı ile orantılıdır. Çekirdek DNA içeriği arttıkça çekirdek içerisine giren ve bağlanan Dapi miktarı da aynı oranda artmaktadır. Bu yöntemle muamele edilmiş hücre çekirdeği flow sitometri analizi sırasında lazer ışığı önünden geçerken içerdiği PI miktarı (dolaylı olarak DNA içeriği) ile doğru orantılı olarak florasan ışığı yayar.



Şekil 3.6. Ispanak aksesyonlarına ait yaprak dokularının jilet yardımı ile parçalanması

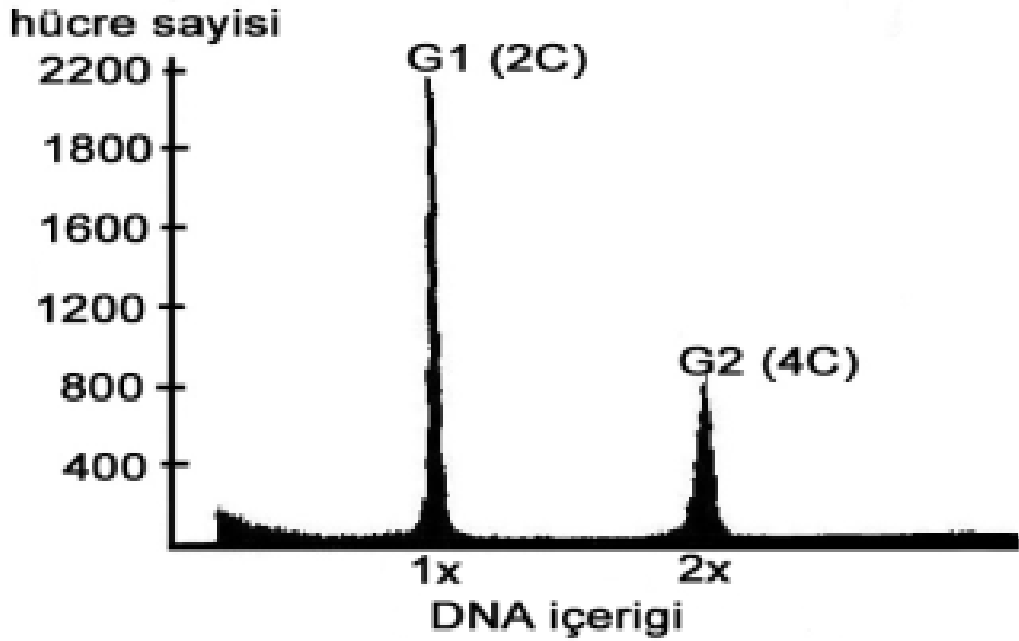


Şekil 3.7. Ispanak aksesyonlarına ait yaprak dokularına
a) Buffer ilavesi,
b) Süzme işlemi,
c) ve d) Staining solüsyon ilavesi



Şekil 3.8. Partec marka marka flow sitometri cihazı ile bitkilerin yaprak dokularında çekirdek DNA miktarlarının belirlenmesi

Yayılan florasanlar cihazın içerisinde bulunan optik bölümlerde bir dizi işlemten geçtikten sonra elektrik sinyallerine dönüşür ve cihaza bağlı olan bilgisayar monitörüne histogram olarak yansır (Şekil 3.9). Histogramın dikey eksenini; analiz edilen hücre sayısını, yatay eksenini ise; analiz edilen örneklerin florasan yoğunluğunu göstermektedir. Yatay eksenin sağına doğru gittikçe florasan yoğunluğu dolayısıyla DNA içeriği artmaktadır.

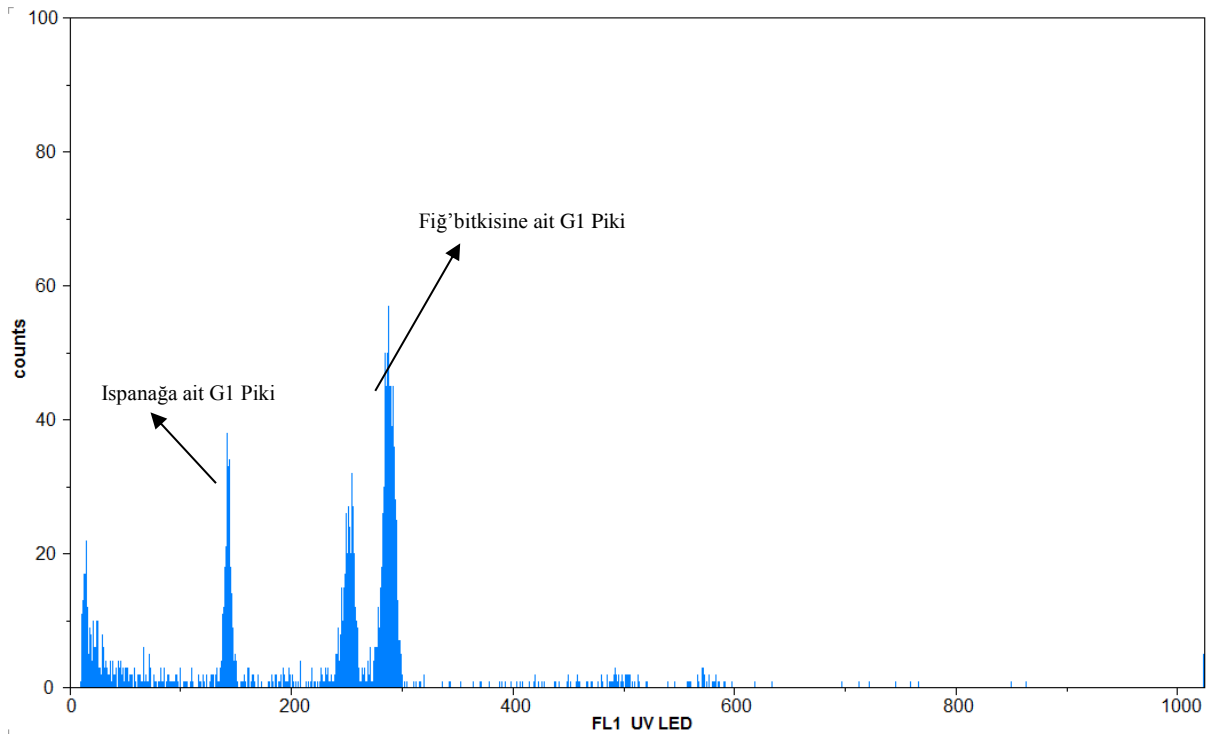


Şekil 3.9. Çekirdek DNA'sının flow stometri ile analizi sonucu bilgisayar monitörüne yansıyan histogram

Histogramın en solunda bulunan geniş kısım büyük ölçüde parçalanmış çekirdek, kromozomlar, plastitler, ve diğer organellere aittir. Sağlıklı yaprakların dikkatli bir şekilde kıyılması ile kısım minimize edilebilir. Bu geniş kısma ek olarak histogram, birisi daha yüksek iki ince pik ve aralarında bir düzlük içermektedir. Histogramın bu şekilde oluşmasının nedeni, örneklerin hazırlandığı dokuyu meydana getiren hücrelerin örnek hazırlama sırasında, hücre döngüsünün değişik aşamalarında bulunmasıdır. Hücrelerin bir kısmı mitoz aşamasından yeni çıkmışken (bölünme henüz gerçekleştiğinden çekirdek replike olmamış DNA içeriğine sahip), bir kısmı mitoz aşamasına girmek için son hazırlıklarını yapmaktadır (çekirdek replike olmuş DNA içeriğine sahip). Hücrelerin geri kalan kısmı da bu iki aşamanın arasında bulunan DNA sentez (S fazı) aşamasında bulunmaktadır. Histogramın solunda görülen uzun tepe noktası analiz için hazırlanmış örneğin içerisinde bulunan DNA'sı replike edilmemiş hücreleri temsil eder ve G1 tepe noktası olarak ifade edilir. Bu tepe noktasını oluşturan hücreler 2C DNA içeriğine sahiptirler. Histogramın sağında bulunan ve nispeten daha kısa olan tepe noktası ise DNA'sı replike edilmiş hücreleri temsil eder ve G2 tepe noktası olarak ifade edilir. Bu tepe noktasını oluşturan hücreler 4C DNA içeriğine sahiptirler. İki tepe noktası arasında yer alan aralık ise S fazında olan hücreleri temsil eder. Bu hücrelerde DNA sentezi devam ettiğinden herbiri farklı miktarda çekirdek DNA içeriğine (G1 ile G2 arasında) sahiptirler. Bu nedenle de tepe noktası oluşturamayıp yatay eksene paralel bir eğri oluştururlar.

Flow sitometri ile yapılan rutin çekirdek DNA analizlerinde her örnek için yaklaşık 10000 çekirdeğin DNA içeriği belirlenir ve ortalaması analiz edilen örneğin çekirdek DNA içeriği olarak sunulur. Hassas bir analiz için histogram üzerinde bulunan pikler mümkün olduğunca düzgün, ince ve uzun olmalıdır. Piklerin şekli flow sitometri cihazını kalibre ederek ve örneği dikkatli hazırlayarak iyileştirilebilir. Varyasyon katsayısı (CV) pik genişliğinin istatistiksel ölçümüdür ve florasan boncuklar kullanılarak ölçülmeli ve ayarlanmalıdır. Çekirdek DNA içeriği analizinde güvenli bir yorum için CV değeri %3-5 civarında olmalıdır.

Bir bitkinin çekirdek DNA içeriği mutlak olarak belirlenmek istenirse, bu bitkinin DNA içeriği, DNA içeriği bilinen bir standart ile kıyaslanır. Standart olarak çekirdek DNA içeriği bilinen bir bitki kullanılacaksa standart bitkinin dokuları da analiz edilecek örneğe ait dokularla birlikte aynı anda hazırlanır. Bu şekilde hazırlanmış bir örnek analiz edildiğinde elde edilecek olan histogram 2 yerine 4 pik içerir (Şekil 3.10).

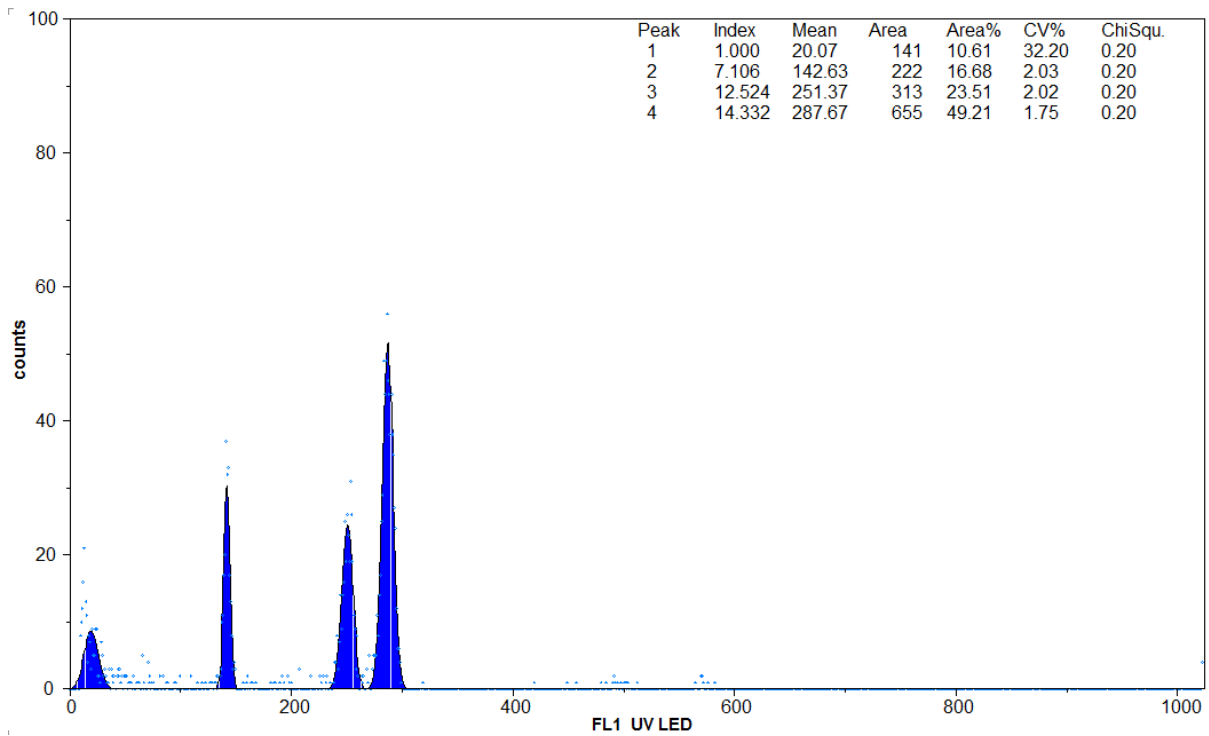


Şekil 3.10. Flow sitometri ile ıspanağın (*Spinacia oleracea* L.) çekirdek DNA analizi sonucu bilgisayar monitörüne yansıyan histogram (standart bitki olarak fiğ bitkisi kullanılmıştır)

Şekil 3.10’da görülen histogramda ıspanak ile standart olarak fiğ kullanılmıştır. Fiğ 3,65 pg DNA içeriğine sahiptir. Histogramda birinci dar tepe noktası ıspanağa, üçüncü tepe noktası fiğ bitkisine aittir.

Bu piklerin soldan ilk ikisi analiz edilen örneğe, üçüncüsünde standart bitkiye aittir. Piklerin hangilerinin örneğe hangilerinin standarda ait olduğunu saptamak için örnek ile standardın dokularından hazırlanmış numuneler önce ayrı olarak analiz edilirler ve piklerin yerleri gözlenir. Bir örneğin mutlak çekirdek DNA içeriği, örnek ile seçilen standardın G1 piklerinin florasana yoğunluklarına ait değerler kullanılarak aşağıdaki formül aracılığıyla pikogram (1pg = 10-12 g) olarak hesaplanır.

$$\text{Çekirdek DNA miktarı (pg)} = \frac{\text{DNA miktarı bilinmeyen türe ait florasana yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}}{\text{Standarda ait örneğin florasana yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}} \times \text{Standardın DNA içeriği}$$



Şekil 3.11. Ispanak genotipinin ve fiğın flow sitometride histogram değerleri

Şekil 3.11'deki örneğe göre bu hesaplama yapılacak olursa örneğin florasana yoğunluğu 142,63 standartın (fiğ) florasana yoğunluğu 251,37 standartın DNA ağırlığı 3,65 pg olarak alınmıştır. Buna göre bu ıspanak genotipinin genom büyüklüğü $(142,63/251,37) \times 3,65 = 2,07$ pg olarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Ispanak aksesyonlarının ploidi düzeylerinin belirlenmesi

Geleneksel olarak ploidi bitki kök ucu hücrelerinde mitotik kromozomları sayarak belirlenmektedir. Yöntem çok fazla zaman, iş gücü ve yüksek oranda bölünen hücreye gereksinim duymaktadır. Bunlara ek olarak kromozomları küçük veya çok fazla olan türlerde yanlış tespitlere neden olabilmektedir. Özellikle bitki genetik kaynaklarında olduğu gibi çok sayıda bitkinin ploidi düzeyinin belirlenmesi gerektiği durumlarda bu yöntem oldukça yetersiz kalmaktadır.

Tüm bitki kromozomları, hücre çekirdeğinde yer almaktadır ve bitkilerin çekirdek DNA içeriği ile ploidy düzeyleri arasında doğru orantılı bir ilişki bulunmaktadır. Bu ilişki göz önünde bulundurularak çekirdek DNA içeriğinin ploidi düzeyi belirlemede kullanılabilirdiği düşünülmüştür. Çekirdek DNA içeriğini hızlı ve hassas bir şekilde belirleyen flow sitometri cihazının geliştirilmesini izleyen yıllarda, çekirdek DNA içeriği birçok araştırmacı tarafından ploidi düzeyinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Her aksesyon için 3 tek bitki ayrı ayrı analiz edilecek çekirdek DNA analizleri belirlenecek ve ortalaması alınarak aksesyon ortalaması hesaplanacaktır. Flow analizleri tamamlandıktan sonra bitkilerin çekirdek DNA içerikleri kromozom sayıları ile ilişkilendirilecektir. Bunun için öncelikle aksesyonlar çekirdek DNA içeriği miktarına göre gruplara ayrılacaktır. Daha sonra her gruptan en az birinin kromozomları sayılarak bitkilerin çekirdek DNA miktarları ile kromozom sayıları ilişkilendirilmiş olacaktır. Böylece sadece bir bitkinin mitoz kromozomlarını sayarak tüm bitkilerin ploidi düzeyleri belirlenmiş olacaktır (Lu ve ark. 1998, Tuna ve ark. 2001, Tuna ve ark. 2004).

3.2.4. Kromozomların sayımı

Kromozom sayımı çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık gösteren ıspanak aksesyonları arasından seçilen birkaç bitki üzerinde yapılmıştır. Kromozom sayımı bitki kök uçlarında bulunan ve hızlı bölünme gösteren meristematik hücrelere sahip dokular kullanılarak ezme yöntemiyle hazırlanmış slaytlar üzerinde morfolojisi düzgün ve iyi dağılmış mitoz kromozomlarının sayılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Kök uçlarının elde edilmesi ve ilk işlem: Kök uçları saksılarda yetiştirilmekte olan ergin bitkilerden elde edilmiştir. Bu amaçla sabahın erken saatlerinde (8-10) bitkiler saksılarından çıkartılmış ve beyaz görünümlü hızlı büyümekte olan kök uçları 1,5 cm uzunluğunda kesilerek içerisinde 8-hydroxyquinoline solüsyonu bulunan küçük cam şişelere yerleştirilmiştir. Kök uçları buz kabı içerisinde buzdolabına (+4 0C) yerleştirilerek 16-20 saat süresince inkübe edilmiştir

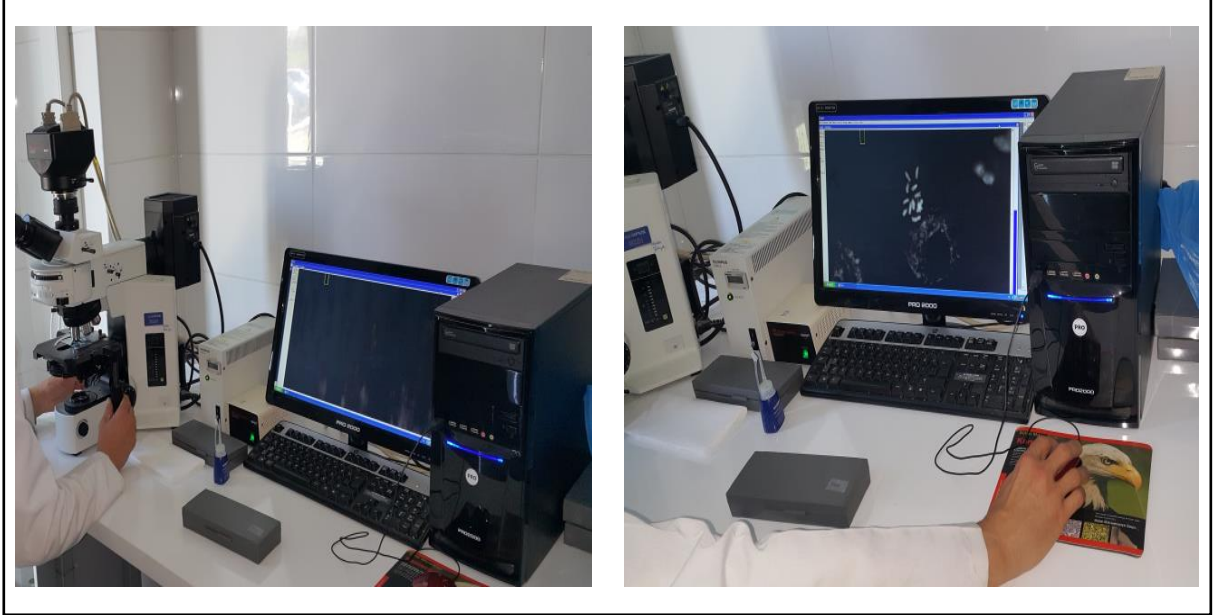
Tespit: Cam şişe içerisindeki solüsyon boşaltıldıktan sonra, yerine yeni hazırlanmış olan farmer çözeltisi (3 kısım % 99 luk etil alkol + 1 kısım glasiyal asetik asit) doldurulmuştur. Kök uçları böylece tespit edilmiş olur. Tespit edilmiş olan kök uçları 1 gün oda şartlarında bekletildikten sonra uzun süre depolanabilecekleri sıcaklığın 2-4 0C civarında bulunduğu bir soğutucu içerisine transfer edilmiştir.

Preparatların hazırlanması:

Kök uçlarının selulaz enzimleri ile muamele edilmesi: Farmer solüsyonu içerisinde bulunan kök uçları enzim solüsyonuna transfer etmeden önce 4 defa 5-6 dakika için 1x enzim bufferı içerisinde bekletilerek farmer solüsyonu kök ucu dokularından tamamen uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kök uçları enzim solüsyonuna (Cellulose RS, Cellulase calbiocem ve Pectinase) transfer edilmiş ve 37 0C de enzim ile tamamen digest edilene kadar inkübe edilmiştir.

Preparat yapmada kullanılacak olan kök uçları enzim solüsyonundan çıkartılarak buz üzerine yerleştirilmiş bir kap içerisinde bulunan 1x enzim bufferine transfer edilmiştir. Bu şekilde muamele edilmiş olan kök uçlarından preparatlar bir damla %45 lik asetik asit kullanılarak ezme yöntemiyle hazırlanmıştır. Preparatlar faz kontrastı olan bir mikroskop ile hızlı bir şekilde kontrol edilerek çok sayıda iyi dağılmış mitoz kromozomuna sahip hücreye sahip olan preparatlar seçilerek lamelin çıkartılabilmesi için bir saat için kuru buz üzerine yerleştirilmiş (ya da -80°C de) ve lamel uzaklaştırıldıktan sonra slaytlar bir gün oda şartlarında kurutulmuştur. Kurumuş olan preparatlar üzerine bir damla DAPI boyası ilave edilerek üzerine lamel yerleştirilmiştir. Ertesi preparatlar floresan mikroskop altında incelenerek mitotik kromozom sayımı yapılmıştır.

Fotğraf çekimi: Morfolojisi düzgün sayılabilen ve kromozom sayısı tam olan hücrelerin kromozomları sayılmış ve hazırlanan slaytlar Olympus marka BX 51 model ışık mikroskopunda hücrelerin fotoğrafları $10 \times 100 = 1000$ kez büyütülerek spot marka Rt Slider model CCD dijital kamera ile çekilmiştir.



Şekil 3.12. Ispanak aksesyonlarına ait kromozom sayılarının Olympus marka BX 51 model ışık mikroskopunda belirlenmesi ve Rt Slider model CCD dijital kamera ile fotoğraflanması

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Ispanak aksesyonlarına ait çekirdek DNA içeriklerinin istatistiksel analizi 3 tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre SPSS istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılık ile önemliliğin belirlenmesinde duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Flow sitometri ile Çekirdek DNA Analizi (pg)

Amerika Birleşik Devleti'nde bulunan USDA (United States Department of Agriculture)'dan temin edilen toplam 53 ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) aksesyonunun flow sitometri yöntemi yardımıyla çekirdek DNA içerikleri ve ploidi düzeyleri ile kromozom sayılarının belirlenmesine ait elde edilen veriler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1.'de flow sitometri analizleri sonucunda çalışmada ele alınan ıspanak aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri (genom hacmi) arasında istatistiksel olarak önemli ($P<0.01$) farkların olduğu belirlenmiştir. Ortaya çıkan bu farkların standart sapma değerleri ve önemlilik gurupları Çizelge 4.2'de ve onlardan bazılarına ait flow histogramları Şekil 4.1 de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Bazı ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) aksesyonlarının varyans analizi tablosu

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Aksesyon	0,256	52	0,005	2,798	$P<0.01$
Hata	0,187	106	0,002		
Genel	0,443	158			

Çizelge 4.2'nin incelenmesinden anlaşılacağı gibi 53 ıspanak aksesyonları arasında ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 2,225 pg ile 2,059 pg arasında değişmektedir. En yüksek ortalama 2.225 pg ile PI 222270 aksesyon numaralı Esfenaj çeşidi olduğu belirlenmiştir. En düşük çekirdek DNA içeriği 2.059 pg PI 531451 nolu aksesyon numaralı Matador çeşidi olduğu belirlenirken, bu aksesyonu aynı önem grubunda bulunan PI 499373 aksesyon numaralı Godir çeşidi takip etmiştir.

Çizelge 4.2. Bazı ıspanak aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri (pg/2C) ve önem grupları

No	Aksesyon No	Bitki İsmi	Çekirdek DNA içeriği (pg/2C)	Standart Sapma	T*Sx	Güven aralığı		Önem Grubu	
						Min.	Maks.		
34	PI 222270	Esfenaj	2,225	0,047	0,038	2,187	2,263	A	1. Grup
4	NSL 6088	Blight Resistant Savoy	2,204	0,08	0,066	2,138	2,270	AB	2. Grup
5	NSL 6097	Northland	2,204	0,012	0,010	2,194	2,214	AB	
25	PI 379548	Prilepski	2,192	0,038	0,031	2,161	2,223	ABC	3. Grup
9	NSL 28217	Mt Evergreen	2,189	0,004	0,004	2,185	2,192	ABC	
1	Ames 23664	Spi 151/93	2,188	0,096	0,078	2,110	2,266	ABC	
32	PI 251507	Espinage	2,184	0,019	0,016	2,168	2,199	ABC	
27	PI 379552	Skopski	2,183	0,013	0,011	2,173	2,194	ABC	
10	NSL 28218	Viking	2,181	0,037	0,030	2,151	2,211	ABCD	4. Grup
15	PI 254565	Polack	2,181	0,06	0,049	2,132	2,229	ABCD	
6	NSL 6099	Nobel/Giant Thick Leaved	2,177	0,055	0,045	2,132	2,222	ABCDE	5. Grup
7	NSL 6557	Old Dominion	2,175	0,075	0,061	2,114	2,236	ABCDE	
47	PI 164965	Cornell ID #242	2,174	0,024	0,020	2,155	2,194	ABCDE	
43	PI 167434	Cavallius	2,172	0,043	0,035	2,137	2,207	ABCDE	
21	PI 358254	Sirokolisten	2,172	0,031	0,026	2,146	2,197	ABCDE	
50	PI 206753	Cornell ID #29; Godfray 1133	2,168	0,045	0,037	2,131	2,204	ABCDE	

No	Aksesyon No	Bitki İsmi	Çekirdek DNA içeriği (pg/2C)	Standart Sapma	T*Sx	Güven aralığı		Önem Grubu	
						Min.	Maks.		
30	PI 262161	Nostruosa Wireflay	2,164	0,037	0,030	2,134	2,194	ABCDE	5. Grup
46	NSL 6097	Va Savoy Blight Resistant	2,164	0,042	0,034	2,129	2,198	ABCDE	
48	PI 167098	Cornell ID #250; Harlan 295	2,158	0,021	0,017	2,141	2,175	ABCDE	
33	PI 227230	Jiromaru	2,157	0,015	0,012	2,145	2,169	ABCDE	
45	NSL 81328	Duet	2,155	0,075	0,062	2,093	2,216	ABCDE	
51	PI 165012	Cornell ID #244; Harlan 88	2,152	0,079	0,064	2,088	2,217	ABCDE	
52	PI 176776	Cornell ID #59; Harlan 9452	2,150	0,068	0,055	2,095	2,206	ABCDE	
3	NSL 6084	Giant Thick Leaved/Nobel	2,147	0,055	0,045	2,102	2,193	ABCDE	
53	PI 177558	Harian 4403	2,146	0,007	0,006	2,140	2,152	ABCDE	
49	PI 169026	Cgn 9499; Harlan 2920; B	2,143	0,068	0,055	2,088	2,199	ABCDE	
26	PI 379549	Stipski	2,138	0,041	0,033	2,105	2,172	ABCDE	
16	PI 274042	Best Of All	2,136	0,024	0,020	2,117	2,156	ABCDE	
39	PI 303138	Princess Juliana	2,130	0,031	0,025	2,105	2,155	ABCDE	
31	PI 266926	Universal	2,130	0,014	0,012	2,119	2,142	ABCDE	
2	NSL 4683	Dixie Market	2,128	0,003	0,003	2,125	2,131	ABCDE	
17	PI 274044	Early Giant	2,127	0,051	0,041	2,085	2,168	ABCDE	
37	PI 608712	Spi 153/89	2,125	0,02	0,016	2,109	2,141	ABCDE	
23	PI 360710	Samos HybrID	2,125	0,037	0,030	2,095	2,155	ABCDE	

No	Aksesyon No	Bitki İsmi	Çekirdek DNA içeriği (pg/2C)	Standart Sapma	T*Sx	Güven aralığı		Önem Grubu	
						Min.	Maks.		
41	PI 179595	Victoria	2,117	0,015	0,012	2,105	2,129	ABCDE	5. Grup
28	PI 508504	Summer Green	2,117	0,052	0,042	2,074	2,159	ABCDE	
38	PI 274048	Giant Early Leaf	2,116	0,031	0,025	2,091	2,142	ABCDE	
14	PI 249920	Espinaca Veroflay	2,116	0,017	0,014	2,102	2,130	ABCDE	
19	PI 339545	101-2	2,115	0,027	0,022	2,093	2,136	ABCDE	
13	PI 209645	No. 2	2,110	0,006	0,005	2,105	2,115	ABCDE	
24	PI 360895	Nores	2,108	0,067	0,055	2,053	2,163	ABCDE	
36	PI 531449	Hegykoï	2,102	0,027	0,022	2,081	2,124	BCDE	6. Grup
42	PI 176371	Monstrans Viroflag	2,100	0,047	0,038	2,062	2,138	BCDE	
11	PI 179507	Beledi	2,096	0,009	0,007	2,089	2,104	BCDE	
22	PI 358260	Radoviski	2,091	0,035	0,029	2,062	2,119	BCDE	
18	PI 321020	Wushe Waka Maru	2,090	0,034	0,028	2,062	2,118	BCDE	
12	PI 179589	Giant Spinach	2,088	0,025	0,021	2,067	2,109	BCDE	
20	PI 358248	OhrIDski	2,086	0,028	0,023	2,064	2,109	BCDE	
8	NSL 26513	Resistoflay	2,084	0,009	0,007	2,077	2,091	BCDE	7. Grup
35	PI 531454	Mosonmagyarovari	2,083	0,028	0,023	2,060	2,106	CDE	
44	NSL 81329	Bouquet	2,062	0,025	0,021	2,041	2,083	DE	8. Grup
40	PI 499373	Godir	2,059	0,022	0,018	2,041	2,077	E	9. Grup
29	PI 531451	Matador	2,059	0,028	0,023	2,036	2,082	E	

Elde edilen bulgular neticesinde 53 *Spinacia olerace* L popülasyonu kullanılmış ve her popülasyondan 3 bitki analiz edilmiştir. Analiz edilmiş 3 bitkinin ortalaması alınarak popülasyon ortalamaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.). Flow sitometri sonuçlarına göre ıspanak aksasyonlarının ortalama çekirdek DNA içeriklerinin 2.225 pg/2C ile 2.059 pg/2C arasında değiştiği gözlenmiştir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 de bazı ıspanak bitkileri ile standart olarak kullanılan fiğ (*Vicia sativa*) bitkilerine ait G1 piklerinin birbirine göre pozisyonları görülmektedir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu popülasyonların çekirdek DNA ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1.) ve ıspanak popülasyonlarının 9 farklı gruba ayrıldığı gözlenmiştir. 1. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.225 pg/2C olan tek bir popülasyon yer almaktadır. 2. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.204 pg/2C olan 2 popülasyon yer almaktadır. 3. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.192 pg/2C ile 2.183 pg/2C olan 5 popülasyon, 4. grupta ortalama çekirdek DNA içerikleri 2.181 pg/2C olan 2 popülasyon, 5. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.177 pg/2C ile 2.108 pg/2C olan 31 popülasyon, 6. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.102 pg/2C ile 2.086 pg/2C olan 8 popülasyon, 7. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.083 pg/2C olan 1 popülasyon, 8. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.062 pg/2C olan 1 popülasyon ve son grup olan 9. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.059 pg/2C olan 2 popülasyon yer almaktadır.

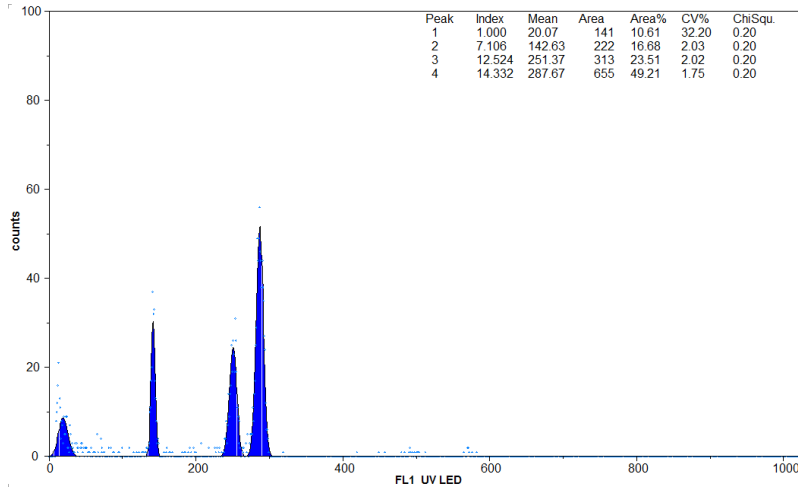
Arumuganathan ve Earle (1991), bazı önemli bitki türlerinin Çekirdek DNA miktarları isimli çalışmalarında İspanağın (*Spinacia oleracea* L.) önceki çalışmalarda çekirdek DNA miktarının 1.9 pg/2C olarak tespit edildiğini araştırmacıların yaptığı çalışmalarında 2.05 pg/2C (989 Mbp/1C= 1.025 pg/1C) olarak tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Araştırmacıların bulunduğu sonuçlar ile çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar arasındaki küçük farklılığın kullanılan florasan boya ve standart bitkiden kaynaklanmıştır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar Fujito ve arkadaşlarının (2015) farklı *Spinacia* türlerinde homomorfik ve heteromorfik seks kromozomları üzerinde yaptıkları çalışmalarında elde ettikleri sonuçlar ile büyük benzerlik göstermektedir.

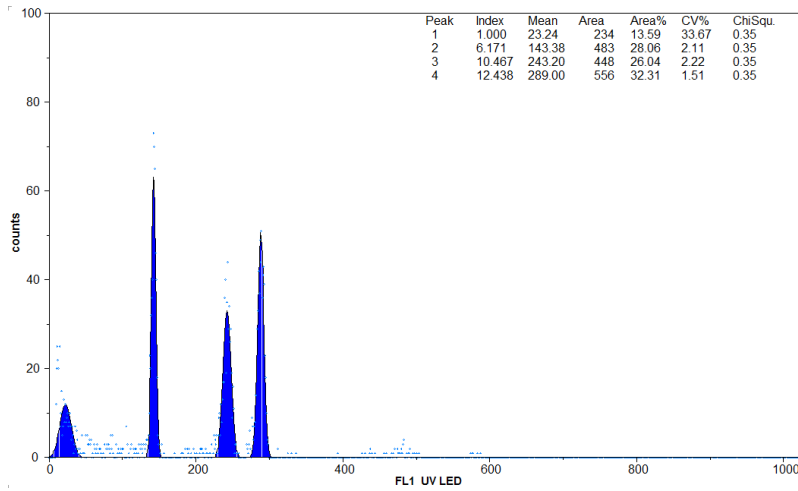
Fujito ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada 2C çekirdek DNA içeriklerinin 1.66-1.79 pg arasında değiştiğini saptamışlardır. İki çalışmanın sonucu arasında gözlenen farklılığın, çalışmalarda kullanılan metot ve standart bitkinin farklı olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Araştırmacıların farklı *Spinacia* türlerinin flow sitometride çekirdek DNA analizi için şeker pancarını standart bitki olarak kullanmışlardır. Oysa çalışmamızda 53 ıspanak

aksesyonunun çekirdek DNA miktarlarının ölçümünde standart bitki olarak fiğ bitkisi kullanılmıştır. Aradaki görülen ufak farklılıkların buradan kaynaklandığı düşünülmüştür.

Farklı ıspanak aksesyonları için analiz edilen 3 bitkinin çekirdek DNA içerikleri genelde 0.003 ile 0.096'lık bir standart sapma ile (Çizelge 4.2) birbirine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar yöntemin hassasiyetinin ne kadar yüksek olduğunu ve aynı zamanda populasyonların saf olup başka tür ve varyetelere ait bitkileri içermediğini işaret etmektedir.



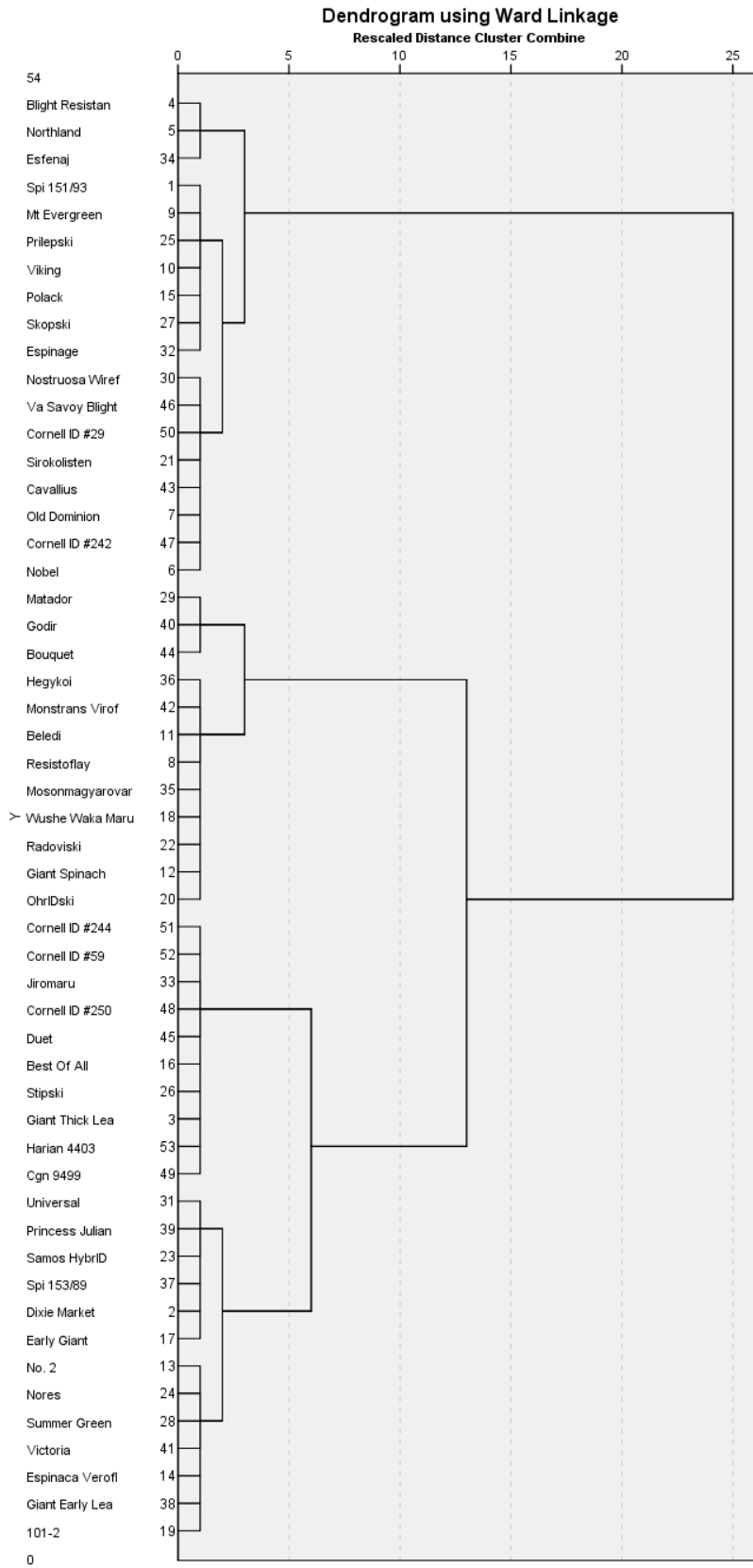
Şekil 4.1. Ispanak ve Fiğ G1 piklerinin birbirlerine göre pozisyonları



Şekil 4.2. Farklı ıspanak ve Fiğ G1 piklerinin birbirlerine göre pozisyonları

4.2. Ispanak aksesyonlarına ait Cluster analizi

İncelenen aksesyonların 2C DNA içeriklerine göre Ward metodu ile yapılan kümeleme analizi sonuçlarına göre iki ana küme altında sekiz farklı kümenin olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Şekilde de görülebileceği gibi aksesyonların kümelenmesi çoklu karşılaştırma testi benzer şekilde gerçekleşmiştir.



Şekil 4.3. Ispanak aksesyonları 2C DNA içeriklerine göre Ward metodu ile yapılan kümeleme analizi

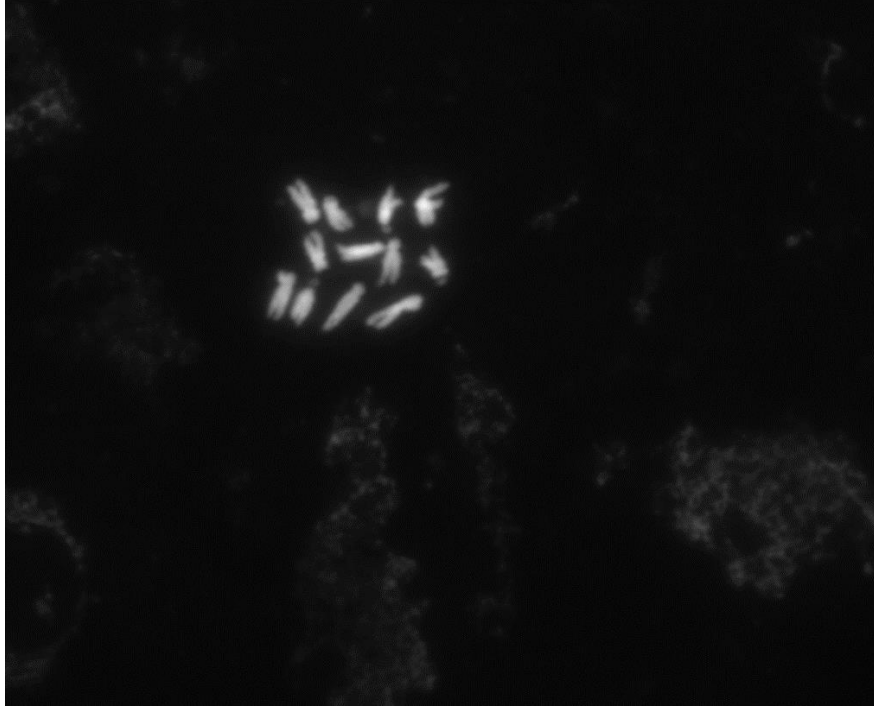
4.3. *Spinacia oleracea* aksesyonlarının kromozom sayısının tespit edilmesi

Spinacia oleracea'ya ait 53 aksesyonun çekirdek DNA içeriklerini ploidy düzeyleri ile ilişkilendirmek için her gruptan 2 bitkinin mitoz kromozomları sayılmış ve ortalama çekirdek DNA içeriği bakımında kromozom sayılarının $2n=12$ olduğu belirlenmiştir. Denememizde kullanılan *Spinacia oleracea* aksesyonlarının diploit kromozom sayılarına ait resimler aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

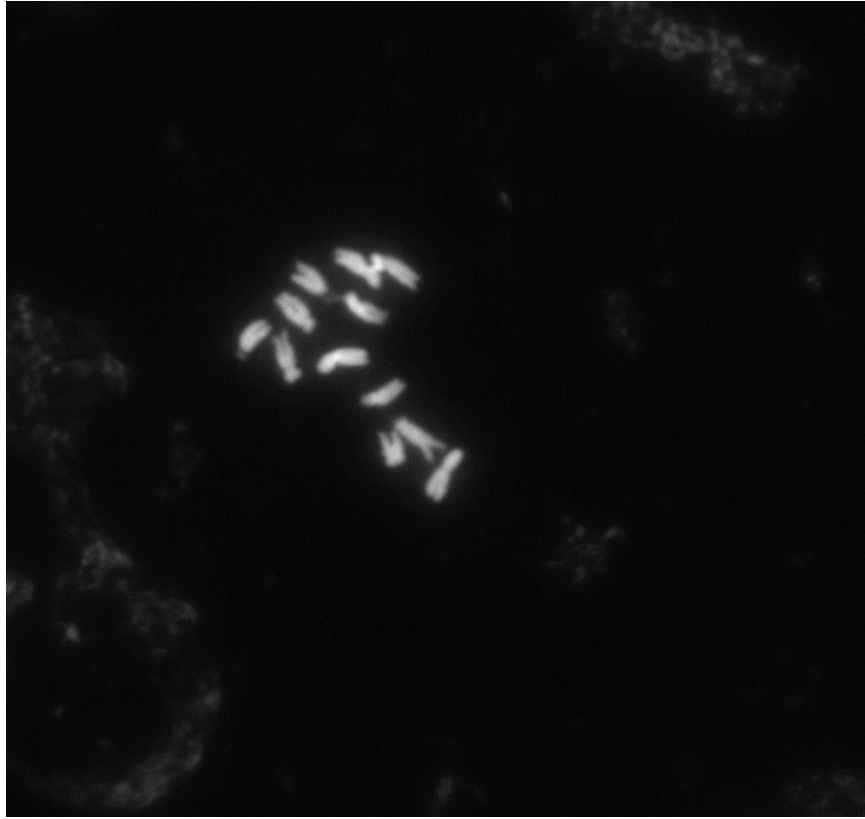
Flow sitometri yardımıyla çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık gösteren bazı bitkilerin kök uçlarından elde edilen meristem dokuları kullanılarak yapılan preparatlar üzerinde florasana mikroskobu ile mitoz kromozomu sayımlarında, 1. 5. ve 9. gruptaki bitkilerden alınan örneklerde $2n=12$ kromozoma sahip olduğu gözlenmiştir.

Bu sonuçlara bakarak diğer bitkilerin kromozomlarını saymaya gerek kalmamış ve hepsinin 12 kromozom taşıdığı kabul edilmiştir. Diğer bir deyişle bu çalışmada kullanılan tüm aksesyonların farklı araştırmacılarında ıspanaklar üzerine yaptıkları farklı çalışmalarda olduğu gibi (Bemis ve Wilson 1953, Ito et al. 2000, Lan et al. 2006, Şalk ve ark. 2008, Deng et al. 2015, Fujito et al. 2015, Takahata et al. 2016, Anonim 2017c, Xu et al. 2017) diploid olduğu anlaşılmıştır.

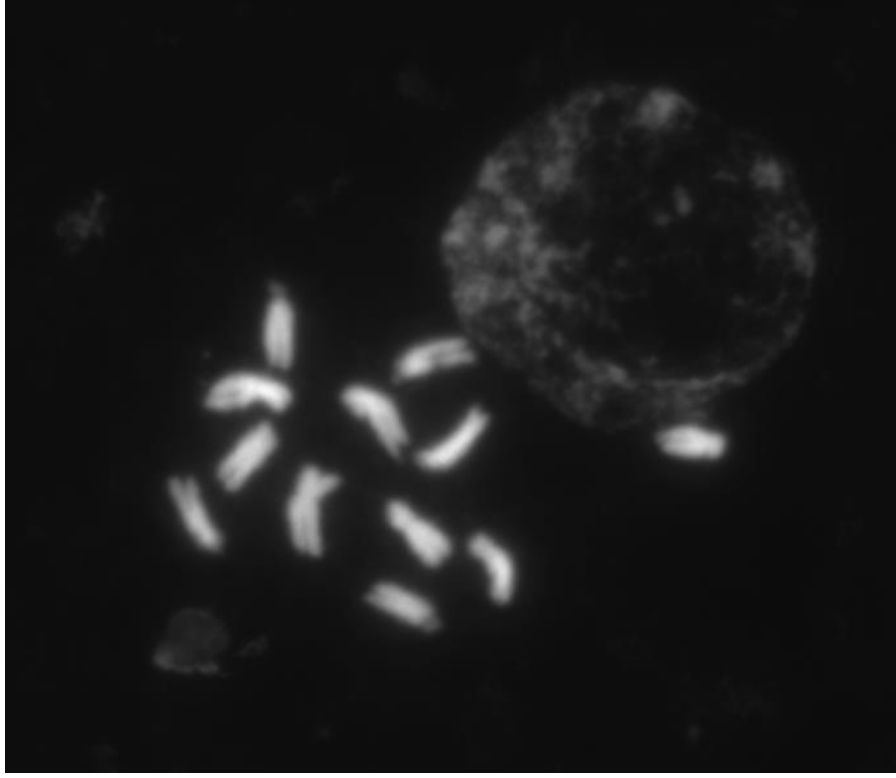
Çekirdek DNA içeriği, hem aynı türün farklı bireyleri arasında, hem de bir bitkinin hücreleri arasında, değişmeden sabit kalmakta ve bu nedenle türlere özel olmaktadır (Bennett ve Leitch, 1995). Türler arasında ise çekirdek DNA içeriği bakımından önemli düzeyde farklılıklar gözlenmektedir. Bu nedenle, çekirdek DNA içeriği taksonomik ve evrim çalışmaları için son derece yararlıdır (Price ve Bachmann 1975; Ohri, 1998; Özkan ve ark., 2003).



Şekil 4.4. Diploid ($2n=12$) 1. Grup ıspanak aksesyonlarına ait mitoz kromozomlarının görünüşü



Şekil 4.5. Diploid ($2n=2x=12$) 5. grup *Spinacia oleracea* L. aksesyonlarından mitoz kromozomlarının görünüşü.



Şekil 4.6. Diploid ($2n=2x=12$) 9. grup *Spinacia oleracea* L. aksesyonlarından mitoz kromozomlarının görünüşü.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Flow sitometri ile bazı ıspanak aksesyonlarının çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi isimli araştırmada, flow sitometri yöntemi ile 53 ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) aksesyonunun çekirdek DNA içerikleri belirlenmiş ve çekirdek DNA içeriği bilgisi ile bitkilerin kromozom sayıları ilişkilendirilerek ploidi düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Yapılan flow sitometri analizleri sonucunda, çekirdek DNA içerikleri arasında istatistiksel olarak önemli ($P < 0.01$) farkların olduğu belirlenmiştir. *Spinacia oleracea* L. aksesyonlarının ortalama çekirdek DNA içeriği 2,225 pg/2C ile 2,059 pg/2C arasında değişmektedir. En yüksek ortalama 2,225 pg ile PI 222270 aksesyon numaralı Esfenaj çeşidi olduğu belirlenmiştir. En düşük değer 2.059 pg PI 531451 nolu aksesyon numaralı Matador çeşidi olduğu belirlenirken, bu aksesyonu aynı önem grubunda bulunan PI 499373 aksesyon numaralı Godir çeşidi takip etmiştir. Ispanak çekirdek DNA içerikleri genelde 0,003 ile 0,096 lık bir standart sapma ile bir birine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan populasyonların saf olup, başka tür ve varyeteye ait bitki içermediği sonucuna varılmıştır. Çekirdek DNA içeriği 2,225 pg/2C ile 2,059 pg/2C arasında değişen tüm aksesyonların kromozom sayısının $2n=12$ olduğu kabul edilmiştir.

Ispanak aksesyonlarının 2C DNA içeriklerine göre Ward metodu ile yapılan kümeleme analizi sonuçlarına göre iki ana küme altında sekiz farklı kümenin olduğu görülmüştür. Aksesyonların kümeleneşmesi çoklu karşılaştırma testi benzer şekilde gerçekleşmiştir.

Çekirdek DNA içeriği, hem aynı türün farklı bireyleri arasında, hem de bir bitkinin hücreleri arasında, değişmeden sabit kalmakta ve bu nedenle türlere özel olmaktadır. Türler arasında ise çekirdek DNA içeriği bakımından önemli düzeyde farklılıklar gözlenmektedir. Bu nedenle, çekirdek DNA içeriği taksonomik ve evrim çalışmaları için son derece yararlıdır.

Bu veriler sonucunda yapılan çalışmaya konu olan 53 ıspanak aksesyonu ile yapılacak ıslah çalışmalarında araştırmacılara zaman ve emek açısından avantaj sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abak K, Düzyaman F, Şeniz V, Gülen H, Pekşen A, Kaymak HÇ (2010). Sebze Üretimini Geliştirme Yöntem ve Hedefleri. VII. Ziraat Kongresi, 11-15.
- Akçelik E (2009). Bazı Yabani Korunga (*Onobrychis* Sp.) Türlerinin Kromozom Sayılarının Tespiti ve Karyotip Analizi. (Yüksek Lisans Tezi), 55 sayfa, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Anonim (2017). Küresel ısınma ve Türkiye. <https://hayattakalmak.wordpress.com/iklim-degisikliginin-turkiye-uzerindeki-olasi-etkileri/> (erişim tarihi, 01.09.2017).
- Anonim (2017b). Ispanakgiller. <https://www.turkcebilgi.com/%C4%B1spanakgiller> (erişim tarihi, 01.09.2017).
- Anonim (2017c). 28. Chromosome Counts in *Spinacia oleracea* L. <http://ccdb.tau.ac.il/Angiosperms/Amaranthaceae/Spinacia/Spinacia%20oleracea%2L>
- Anonim (2012). FAO. <http://www.fao.org> (erişim tarihi, 20.05.2014).
- Arumuganathan K, Earle ED (1991). Nuclear DNA Content of some Important Plant Species. Plant molecular biology reporter, 9(3): 208-218.
- Arumuganathan K, Tallury SP, Fraser ML, Bruneau AH, Qu R (1999). Nuclear DNA Content of Thirteen Turfgrass Species by Flow Cytometry. Crop sci. 39:1518-1521.
- Bayraktar K (1973). Sebze Yetiştirme Cilt I., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 110.
- Bayraktar, K, Vural H, Şalk A, Turhan K, Boztok EK (1978). Bazı Bürüksel Lahanası Çeşitlerinde Devamlı ve Tek Hasat Yöntemleri ve Uç Almanın Verime Etkisi Üzerinde Araştırmalar. Bilgehan Matbahası.
- Bemis WP, Wilson GB (1953). A New Hypothesis Explaining the Genetics of Sex Determination: In *Spinacia oleracea* L. Journal of Heredity, 44(3), 91-95.
- Bennett MD, Leitch IJ (2004). Angiosperm DNA C-values database <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ (2000). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and Their Modern Uses-807 New Estimates. Ann. Bot. (London) 86:859-909.
- Bennett MD, Leitch IJ (1995). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. Ann. Bot. (London) 76:113-176.
- Bennett MD, Smith JB (1976). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 274:227-276.

- Bozokalfa MK, Eşiyok D (2010). Biber (*Capsicum annum* L.) Aksesyonlarında Genetik Çeşitliliğin Agronomik Özellikler ile Belirlenmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 47(2).
- Brechner M, deVilliers D (2012). A Handbook for the Production of CEA-Grown Hydroponic Spinach. Cornell Controlled Environment Agriculture (CEA). Cornell University.<http://www.cornellcea.com/attachments/Cornell%20CEA%20baby%20spinach%20handbook.pdf>
- Brummer EC, Cazcarro PM, Luth D (1999). Ploidy Determination of Alfalfa Germplasm Accessions Using Flow Cytometry. Crop Sci. 39:1202-1207.
- Bosemark N, Bormotov V (1971). Chromosome Morphology in a Homozygous Line of Sugar Beet. Hilleshog Seed Company, Landskrona, Sweden Institute of Genetics and Cytology, Belorussian Academy of Sciences, Minsk, U.S.S. R.
- Chooi WY (1971). Variation in Nuclear DNA Content in the Genus *Vicia*. Genetics. 68:195-211.
- Collier JL (2000). Flow Cytometry and The Single Cell in Phycology, Journal of Phycology, 36: 628-644. Doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99215.x.
- Çimen B, Yeşiloğlu T, İncesu M, Yılmaz B, Kaçar YA (2016). Bazı Turunçgil Genotiplerinden Tetraploid Bitki Elde Edilmesi. Derim, 2016, 33 (2):175-188.
- Deng C, Zhang WL, Cao ., Wang SJ, Li SF, Gao WJ, Lu LD (2015). Rapid Cloning and Bioinformatic Analysis of Spinach Y Chromosome-Specific EST Sequences. Journal of genetics, 94(4), 705-713.
- Demirel D (1995). Flow Stimetrik DNA analizinin Temel Prensipleri, Türk patoloji Dergisi, 11(2): 64-65.
- Dolezel J, Bartos J, (2005). Plant DNA Flow Cytometry and estimation of Nuclear Genome Size. Annals of Botany, 95:99-110. doi:10.1093/aob/mci005.
- Dunphy CH (2004). Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. Arch. Pathol. Lab. Med. 128:9, 1004-1022.
- Dyer A.F (1963). The Use Of Lacto-Propionic Orcein in Rapid Squash Methods for Chromosome Preparations. Stain Technol. 38:85-90.
- Ekşi C, Tıraş Z, Keleş D, Denli N, Büyükalaca S (2014). Ispanakta (*Spinacia oleracea* L.) Kromozom Sayımı Üzerine Çalışma. 10. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildiriler Kitabı, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, sf:283-288, 2-4 Eylül 2014, Tekirdağ.
- Elçi Ş, (1982). Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, 165s, Elazığ.
- Engindeniz S, (2008), Ispanak Üretiminde Maliyet ve Karlılık Analizi, Hasad-Bitkisel Üretim, 272:85-90.

- Erdem T, Arın L, Erdem Y, Polat S, Deveci M, Okursoy H, Gültaş HT (2010a). Yield and Quality Response Of Drip Irrigated Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Under Different Irrigation Regimes, Nitrogen Applications and Cultivation Periods, *Agricultural Water Management*, 97 (5):681-688 pp.
- Erdem T, Arın L, Erdem Y, Polat S, Deveci M, Okursoy H, Gültaş HT (2010b). Crop Water Stress Index For Assessing Irrigation Scheduling of Drip Irrigated Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Agricultural Water Management*, 98(1): 148-156 pp.
- Ersoy D, Ersoy Y, Cabi E, Denli N, Yetişir H ve Tuna M., 2014. Flow Sitometri ile Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Toplanmış Olan *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. (Su Kabağı) Populasyonlarının Çekirdek DNA İçeriklerinin Belirlenmesi ve Populasyonların Ploidi Düzeylerinin Saptanması. 10. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildiriler Kitabı, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, sf:181, 2-4 Eylül 2014, Tekirdağ.
- Fujito S, Takahata S, Suzuki R, Hoshino Y, Ohmido N, Onodera Y (2015). Evidence for a Common Origin of Homomorphic and Heteromorphic Sex Chromosomes in Distinct *Spinacia* Species. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(8), 1663-1673.
- Gülcü R (2016). Bazı Kılçıksız Brom (*Bromus inermis* L.) Aksesyonlarının Çekirdek DNA İçeriklerinin Belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi 34 sayfa, Tekirdağ.
- Heywood VH (1995). The Mediterranean Flora in The Context of World Diversity *Ecologia Mediterranea*, 21(1-2), 11-18.
- Heslop-Harrison JS (1995). *Flow Cytometry and Genome Analysis*. Probe 5:14-17.
- Heslop-Harrison J, and Schwarzacher T (1996). *Flow Cytometry and Chromosome Sorting: In Plant Chromosomes*, laboratuar manuel edited by Kiichi Fuki and Shigeki Nakayama, p.85-106.
- Hultquist SJ, Vogel KP, Lee DJ, Arumuganathan K, Kaepler S (1997). DNA Content and Chloroplast DNA Polymorphisms Among Accessions of Switchgrass From Remnant Midwestern Prairies. *Crop Sci*. 37:595-98.
- Iiuzak M, Janick J (1962). Cytogenetic Analysis of Sex Determination in *Spinacia oleracea* L. Department of Horticulture, Purdue University, Lufayette, Indiana
- Ito M, Ohmido N, Akiyama Y, Fukui K, Koba, T (2000). Characterization of Spinach Chromosomes by Condensation Patterns and Physical Mapping of 5S and 45S rDNAs by FISH. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(1), 59-62.
- Johnson PG, Riordan TP, Arumuganathan K (1998). Ploidy Level Determinations in Buffalograss Clones and Populations. *Crop Science*, 38:478-482.
- Karagöz A (2003). Plant Genetic Resources Conservation in Turkey. *Acta Horticulturae* 598: 17-25.
- Kanev MO, Muranlı FDG (2016). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(1), 33-38.

- Karaboz İ, Kayar E, Akar S (2008). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 06(2): 1-18. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702080201.pdf.
- Karp A (1991). Cytological Techniques. P. C4:1-13. In K. Lindsey (ed.) Plant Tissue Culture Manual. Kluwer, Dordrecht, the Netherlands.
- Lan T, Zhang S, Liu B, L, X, Chen R Song W (2006). Differentiating Sex Chromosomes of the Dioecious *Spinacia oleracea* L.(spinach) by FISH of 45S rDNA. Cytogenetic and Genome Research, 114(2), 175.
- Lee JM (1994) Cultivation of graft ed vegetables. I. Current status, graft ing methods and benefi ts. HortScience 29: 235-239.
- LeStrange M, Koike S, Valencia J, Chaney W (1999). Spinach Production in California.Vegetable Research and Information Center.
- Lu K, Kaepler SM, Vogel KP, Arumuganathan K, Lee DJ (1998). Nuclear DNA Content and Chromosome Numbers in Switchgrass. Great Plains Research 8 (Fall 1998): 269-80.
- Lourerio J, Kopecky D, Castro S, Santos C, Silveira P (2007). Flow Cytometric and Cytogenetic Analyses of Iberian *Peninsula Festuca* ssp. Plant Systematics and Evolution. 269: 89-105.
- Meriç Ç, Güler N (2008). Dianthus ingoldbyi Turrill'de Çekirdek DNA Miktarının Flow Sitometri Yöntemiyle Belirlenmesi. 19. Ulusal Biyoloji Kongre Özetleri. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 23-27 Haziran 2008, Sayfa 371, Trabzon.
- Murray BG, (2005). When does Intraspecific C-Value Variation Become Taxonomically Significant? Annals of Botany, 95(1):119-125.
- Narayan RKJ (1987). Nuclear DNA Changes, Genome Differentiation and Evolution in Nicotiana (Solanaceae). Pl. Syst. Evol. 157:161-180.
- Ohri D (1998). Genome Size Variation and Plant Systematics. Ann. Bot., 82 (Suppl.A.):750-812.
- Örkcü P (2016). Farklı Lokasyonlardan Temin Edilen Bamyacı Genotiplerinin Morfolojik ve Sitolojik Karakterizasyonu. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 85 sf, Tekirdağ.
- Örkcü P, Polat S, Savaş GT, Tuna M (2014). Türkiye'de Yetiştirilen Bamyacı (*Abelmoscus esculentus*) Çeşitinin Farklı Lokal Populasyonlarının Ploidi Düzeylerinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi. 10. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildiriler Kitabı, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, sf:537, 2-4 Eylül 2014, Tekirdağ.
- Özgen M, Adak MS, Söylemezoğlu G, Ulukan H (2000). Bitkisel Gen Kaynaklarının Korunma ve Kullanımında Yeni Yaklaşımlar. V. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, sf: 259-284, 17-20 Ocak 2000, Ankara.

- Özkan H, Tuna M, Arumuganathan K, (2003). Non-Additive Changes in Genome Size During Allopolyploidization in the Wheat (*Aegilops-Triticum*) Group. *Journal of Heredity*, 94 (3):260-264.
- Price HJ, Bachman K, (1975). DNA Content and Evolution in The Microseridinae. *Am. J. Bot.*, 62: 262-267.
- Rayburn AL, Auger JA, Benzinger EA, Hepburn AG (1989). Detection of Intraspecific DNA Content Variation in *Zea mays* L. By Flow Cytometry. *J. Exp. Bot.* 40:1179-1183.
- Rees H, Walter MR (1965). Nuclear DNA and the Evolution of Wheat. *Heredity*, 20: 73-82.
- Sinotvu Y (1929). Chromosome Studies in Some Dicecious Plants With Special Reference to the Allosomes. *Cytologia* I: 109-191.
- Şalk A., Arın L., Deveci M., Polat S (2008). Özel Sebzeçilik. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ders Kitabı, Tekirdağ.
- Tan A (1998). Current Status of Plant Genetic Resources Conservation in Turkey. In: Int. Symposium on In Situ conservation of Plant Genetic Diversity. N. Zencirci, Z. Kaya, Y. Anikster ve W.T. Adams (eds.) Central Research Institute for Field Crops. 5-16.
- Takahata S, Yago T, Iwabuchi K, Hirakawa H, Suzuki Y, Onodera Y (2016). Comparison of Spinach Sex Chromosomes with Sugar Beet Autosomes Reveals Extensive Synteny and Low Recombination at the Male-Determining Locus. *Journal of Heredity*, 107(7), 679-685.
- Teykin EE (2011). Flow Sitometri ile *Bromus catharticus* vahl Aksesyonlarının Çekirdek DNA İçeriklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. NKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 30 sf, Tekirdağ.
- Tuna GS, Keleş H, Göçmen D, Güteryüz V, Nizam İ, Evre, C, Tuna M (2016). Flow Sitometri ile Çok Yıllık Buğdaygil Yem Bitkisi Genetik Kaynaklarının Karakterizasyonu. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2016, 25 (Özel sayı-2):7-12:
- Tuna M, Cabi E (2014). Bazı Buğdaygil Yem Bitkisi Türlerine Ait Populasyonların Çekirdek Dna İçeriklerinin Flow Sitometri Yöntemiyle Belirlenmesi Ve Ploidy Analizi İle Tür Teşhisinde Kullanımı. <http://acikerisim.nku.edu.tr:8080/xmlui/handle/20.500.11776/2119>. Erişim tarihi:5.8.2017.
- Tuna M (2014). Flow sitometri ve tarımsal araştırmalarda kullanımı. II. Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda kullanımı Eğitim Programı. Tekirdağ.
- Tuna M (2009). Bitkilerde Çekirdek DNA İçeriğinin Flow Sitometri İle Belirlenmesi ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanım Alanları. Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, Cilt I, Sunulu Bildiriler, 683-687, 19-22 Ekim, Hatay.
- Tuna M, Teykin E, Büyükbasar A (2007). Nuclear DNA Content and Ploidy Determination of *Dactylis* Germplasm Accessions Using Flow Cytometer. Eucarpia Conference, Proceedings of XIXth Congress of Fodder Crops and Amenity Grasses, Kopenhag, Denmark.

- Tuna M, Khadka DK, Shrestha MK, Arumuganathan K, Golan–Goldhirsh A (2004). Charecterization of Natural Orchardgrass Populations of Thrace of Turkey Based on Ploidy and DNA Polymorphisms. *Euphytica*, 88:25-34.
- Tuna M, Vogel KP, Arumuganathan K, Gill KS (2001). DNA Content and Ploidy Determination of Bromegrass Germplasm Accessions by Flow Cytometry. *Crop Science*, Vol. 41, p: 1629-1634, September–October.
- Tuschntakmo W (1929). Untersuchungfeinber die Kernbeschaffenheiteni gend ioischerflanzer. *Planta*7: 427-443.
- Türkeş M (1994). Artan Sera Etkisinin Türkiye Üzerindeki Etkileri, *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi*, 321: 71
- Vural H, Eşiyok D, Duman İ (2000). *Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme)*. Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova–İzmir.
- Winge Ö 1917. The Chromosomes Their Number and General Significance. *Compt Rend. Trav. Lab.Carlsherg* 13: 131-295.
- Winson MK, Davey HM (2000). Flow Cytometric Analysis of Microorganisms, *Methods*, 21, 231-240.
- Xu C, Jiao C, Sun Cai X, Wang X, Ge C,.... Wang Q (2017). Draft Genome of Spinach and Transcriptome Diversity Of 120 Spinacia Accessions. *Nature Communications*, 8, 15275. <http://Doi.Org/10.1038/Ncomms15275>
- Yetişir H, Kurt Ş, Sarı N, Tok MF (2007) Rootstock potential of Turkish Lagenaria siceraria germplasm for watermelon: plant growth, graft compatibility, and resistance to Fusarium. *Turk J Agric For* 31: 381-388.
- Yetişir H, Sari N, Solmaz İ, Titiz KS (2010) An Overview on Watermelon Grafting in Turkey. *Cucurbitaceae* 2010: 315-317.
- Yetişir H, Şakar M, Serçe S (2008) Collection and Morphological Characterization of Lagenaria Siceraria Germplasm from the Mediterranean Region of Turkey. *Genet Resour Crop Eval* 55: 1257-1266.
- Yurtsever Z (2016). *Kanser Hücresi Oluşumu Üzerine Hidrojen Sülfid Açığa Çıkaran Ajanların Etkisinin Araştırılması*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

06.02.1967 tarihinde Edirne' nin Keşan ilçesinde doğdu. İlk orta ve lise eğitimimi Keşan da tamamladıktan sonra 1994 yılında Trakya Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü nü kazandı. 1999 yılında ziraat mühendisi ünvanını aldı. 20 yıl yabancı bir şirkette ayçiçek satış pazarlama ve araştırma görevinde bulundu. 2 yıl yerli bir zirai ilaç firmasında Marmara Bölge Müdürlüğü görevinde bulundu. Halen çalışmış olduğu firmada 4 yıldır Marmara Bölge Müdürlüğünün yanında Tohum Teknik Müdürlüğü görevine devam etmektedir. Evli ve üç çocuk babasıdır.