



Flow Sitometri ile Bazı Ispanak Aksesyonlarının Çekirdek DNA İçeriklerinin Belirlenmesi

Murat Deveci^{1*}, Özcan Yavaş¹, Nihan Şahin¹, Metin Tuna²

¹Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 59100 Tekirdağ, Türkiye

²Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 59100 Tekirdağ, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş 23 Kasım 2017
Kabul 01 Aralık 2017

Anahtar Kelimeler:

Spinacia oleracea L.
Çekirdek DNA içeriği
Flow sitometri
Ploidi
Kromozom sayısı
Kümeleme analizi

* Sorumlu Yazar:

E-mail: muratdeveci@nku.edu.tr

Ö Z E T

Bu araştırmanın amacı, yurt dışından elde edilmiş olan 53 ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) aksesyonunun flow sitometri ile ploidi düzeylerini belirlemektir. Araştırma verilerine göre; ıspanak aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri arasındaki farklılıkların istatistiki olarak önemli olduğu saptanmıştır. Araştırmada kullanılan ıspanak aksesyonlarının ortalama çekirdek DNA içeriği 2,225 pg/2C (Esfenaj çeşidi) ile 2,059 pg/2C (Matador ve Godir çeşitleri) arasında değişmiştir. Kök ucu meristem dokuları kullanılarak yapılan kromozom sayımlarında analiz edilen tüm bitkilerin 2n=12 kromozoma sahip oldukları ve dolayısıyla diploid oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmada kullanılan aksesyonların tamamının diploid olduğu kabul edilmiştir. 2C DNA içeriklerine göre yapılan kümeleme analizi sonuçlarına göre iki ana küme altında sekiz farklı kümenin oluştuğu görülmüştür. Aksesyonların kümeleneceği çoklu karşılaştırma testinde de benzer sonucu vermiştir. Ispanak aksesyonlarında ploidi seviyelerini belirlemeye yönelik olarak yapılan bu çalışma sonucunda çalışmaya konu olan 53 ıspanak aksesyonu ile ileride yapılacak ıslah çalışmalarında araştırmacılara önemli bir zaman, enerji ve emek tasarrufu sağlayacaktır.

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 6(2): 239-246, 2018

Determination of Nuclear DNA Content of Some Spinach Accessions by Using Flow Cytometer

ARTICLE INFO

Research Article

Received 23 November 2017
Accepted 01 December 2017

Keywords:

Spinacia oleracea L.
Nuclear DNA content
Flow cytometer
Ploidy
Chromosome number
Clustering analysis

*Corresponding Author:

E-mail: muratdeveci@nku.edu.tr

ABSTRACT

The aim of this research is to determine ploidy levels of 53 spinach (*Spinacia oleracea* L.) accessions obtained from abroad sources by using flow cytometry. According to the results of the statistical analysis, the differences among DNA content of accessions were statistically important. The average DNA content of spinach accessions used in the study ranged between 2.225 pg/2C (Esfenaj accession) and 2.059 pg/2C (Matador and Godir accessions). The mean nuclear DNA of accessions shown to be relatively stable due to low standard deviation (0.003-0.096). Based on the mitotic chromosome analyses of the some plants with different DNA contents, mitotic chromosome number of the all plants analyzed in the study were determined as 2n=12. These results indicate that all the accessions used in the study are diploid although their DNA content is significantly vary. According to the clustering analysis of the 2C DNA contents results, it was observed that eight sub clusters were formed under two main clusters. The clustering of axioms was performed in a similar manner to the multiple comparison test. As a result, the data will save time and labor convenience in a further breeding studies deal with the same 53 spinach accessions of our study.

DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i2.239-246.1718>

Giriş

Dilimizde “Kazayağigiller” veya “Sirkengiller” olarak adlandırılan Chenopodiaceae familyasında sebze olarak değerlendirilen ıspanak (*Spinacia oleracea* L.), kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva* Alef.) ve pazı (*B. vulgaris* L. var. *cicla* Moq.) yer almaktadır. Birçok ülkede ev bahçelerinde meraklı ailelerce yetiştirilerek tüketilen *Atriplex hortensis* L., çayır ve meralarda kendiliğinden yetişen ve “yabani pazı” olarak bilinen *A. halimus* L., “kara parlak pazı” denilen *A. nitens* Schkuhr., 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 bu familya içerisinde bulunmaktadır. Ispanaklar, tohumlarının dikenlilik durumuna göre tohumları dikenli (*Spinacia oleracea* L. var. *oleracea*) ve dikensiz (*Spinacia oleracea* L. var. *inermis* Moench) olmak üzere iki botanik sınıfa ayrılırlar. 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).

Değişik bölge şartlarına uyabilecek yeni çeşitlerin geliştirilmesi, ekim alanlarının genişletilebilmesi için yapılacak en önemli çalışmalardan birisidir. Bu bağlamda, bitki ıslah yöntemleri değişik iklim şartlarında yetiştirilebilen özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Oluşturulan ıslah programları kısa sürede daha sağlıklı, daha verimli ve daha etkin olarak hedeflenen amaçlara ulaşma şansını 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. Türün sahip olduğu genom yapısı, cins içerisinde yer alan diğer türler ile olan ilişkileri ile geçirdikleri evrimin anlaşılması, taksonomik sınıflandırılması ve ploidi düzeyi ıslah programı başlatılmadan önce doğru stratejilerin seçilmesi açısından 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 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 (Ohri, 1998; Özkan ve ark., 2003). Günümüzde çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesinde en hızlı ve güvenilir yöntem “flow sitometri” yöntemidir (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 yapmıştır. 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 analizlerinde kullanılmıştır (Dolezel ve Bartos, 2005; Örkücü, 2016). Flow sitometri analizi hedeflenen yapı ve hücrelerinin sayısını çok kısa sürede, ucuz ve etkin bir şekilde belirleyebilir (Karaboz ve ark., 2008).

Germplazm koleksiyonlarının karakterizasyonu ve korunmasında, iyi oluşturulmuş araştırma ve ıslah programlarında ploidi değerlendirilmesi çok önemli bir yer tutmaktadır (Tuna ve ark., 2001). Ploidi seviyesinin belirlenmesi aynı zamanda kök uçlarında kromozom sayımı şeklinde de yapılabilmektedir (Karp, 1991). Ancak yöntemin yavaşlığı ve fazla bitki üzerinde çalışma zorluğu alternatif yöntemler arayışını ortaya çıkartmış, bu amaçla flow sitometri en çok kullanılan yöntem olmuştur (Bennet ve ark., 2000).

Tüm bu bilgiler ışığında, yapılan bu çalışmanın amacı, ülkemiz koşullarında kışlık sebze olarak performanslarının belirlenmesi için yurt dışından elde edilmiş olan 53 ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) aksesyonunun ıslah çalışmalarında kullanılmadan önce ön araştırma kapsamında flow sitometri yöntemi kullanarak çekirdek DNA içerikleri ile ploidi düzeylerini belirlemek amaçlanmıştır. Böylece ıspanağın genetik kaynakları elde edilerek, ileride yapılacak ıslah çalışmalarına ışık tutması hedeflenmiştir

Materyal ve Metod

Araştırmada; Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü İklim Odası ile Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında yürütülmüştür.

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 Çizelge 1’de verilmiştir.

Yöntem

Bitkilerin yetiştirilmesi: Tohum ekimi yetiştirme odasında, yetiştirme masaları üzerinde çok gözlü (6×8) plastik multipotlara (52×38 cm) yapılmıştır. Ispanak tohumları yerli yeşil bitki torfu (Genta Tarım, Türkiye) içerisine ekilmiş ve bakım işlemleri Şalk ve ark. (2008)’na göre yapılmıştır. Ispanak fideleri ilk gerçek yaprakları görülene kadar yetiştirme odasında çok gözlü saksılarda 20°C sıcaklıkta ve %70 nemde tutulmuştur. Fideler ilk gerçek yaprakların görüldüğü dönemde iklim odasına alınmış ve 800 ml hacminde (13 × 11 cm ebatlarında) perlit içeren saksılarda Brechner ve deVilliers (2012)’e göre hazırlanan besin çözeltisi ile yetiştirilmişlerdir. İklim odası, 22/18°C (gündüz /gece) sıcaklık, %70 nem, 10/14 (aydınlık/karanlık) saatlik fotoperiyodik düzende, 400 µmol m⁻²s⁻¹ ışık şiddetine sahip olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 1 Araştırmada kullanılan ıspanak aksesyonlarının, aksesyon numarası, orijinleri ve çeşit isimleri

No	Aksesyon No	Orijin	Çeşit adı
1	PI 254565	Afganistan	Polack
2	PI 167434	Belçika	Cavallius
3	PI 179589	Belçika	Giant Spinach
4	PI 179595	Belçika	Victoria
5	PI 360710	Fransa	Samos HybrID
6	PI 266926	Almanya	Universal
7	PI 608712	Almanya	Spi 153/89
8	PI 531449	Macaristan	Hegyko
9	PI 531451	Macaristan	Matador
10	PI 531454	Macaristan	Mosonmagyarovari
11	PI 222270	İran	Esfenaj
12	PI 251507	İran	Espionage
13	PI 209645	İran, Fars	No. 2
14	PI 176371	İtalya	Monstrans Viroflag
15	PI 227230	Japonya	Jiromaru
16	PI 508504	Güney Kore	Summer Green
17	PI 358260	Makedonya	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
22	PI 339545	Menşei bilinmiyor	101-2
23	PI 303138	Hollanda	Princess Juliana
24	PI 360895	Hollanda	Nores
25	PI 358248	Sırbistan ve Karadağ	OhrIDski
26	PI 358254	Sırbistan ve Karadağ	Sirokolisten
27	PI 379548	Sırbistan ve Karadağ	Prilepski
28	PI 379549	Sırbistan ve Karadağ	Stipski
29	PI 379552	Sırbistan ve Karadağ	Skopski
30	PI 499373	Sovyetler Birliği	Godir
31	PI 249920	İspanya	Espinaca Veroflay
32	PI 262161	İspanya	Nostruosa Wireflay
33	NSL 28218	İsveç	Viking
34	PI 179507	Suriye	Beledi
35	PI 164965	Türkiye	Cornell ID #242
36	PI 165012	Türkiye	Cornell ID #244; Harlan 88
37	PI 167098	Türkiye	Cornell ID #250; Harlan 295
38	PI 169026	Türkiye	Cgn 9499; Harlan 2920; B
39	PI 176776	Türkiye	Cornell ID #59; Harlan 9452
40	PI 177558	Türkiye	Harian 4403
41	PI 206753	Türkiye	Cornell ID #29; Godfray 1133
42	Ames 23664	Danimarka, Copenhagen	Spi 151/93
43	NSL 6084	ABD, California	Giant Thick Leaved/Nobel
44	NSL 4683	ABD, Maryland	Dixie Market
45	NSL 81329	ABD, Maryland	Bouquet
46	NSL 26513	ABD, Michigan	Resistoflay
47	NSL 6097	ABD, Minnesota	Northland
48	NSL 6097	ABD, Missouri	Va Savoy Blight Resistant
49	NSL 6088	ABD, New York	Blight Resistant Savoy
50	NSL 6099	ABD, Pennsylvania	Nobel/Giant Thick Leaved
51	NSL 6557	ABD, Washington	Old Dominion
52	NSL 28217	ABD, Wyoming	Mt Evergreen
53	NSL 81328	ABD, Maryland	Duet

Çekirdek DNA'sının belirlenmesi (pg): Çekirdek DNA analizleri Tarla bitkileri Ana Bilim Dalı Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında bulunan PARTEC marka Flow sitometri (Partec, GmbH, Japonya) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çekirdek DNA analizinde iklim

odasında yetişmekte olan ıspanakların taze yaprak dokuları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler her populasyon için 3 bitki üzerinde ayrı ayrı yapılmış ve populasyon ortalaması hesaplanmıştır.

Analizlerde Ispanaklar için fiğ bitkisi internal standart olarak kullanılmıştır. Çalışmada florasan boya olarak DAPI kullanılmış olup PARTEC firmasının hazır kitleri kullanılmış ve üretici firmanın protokolü kullanılarak ıspanak yaprak dokularından nukleus izolasyonu yapılmıştır (Tuna ve Cabi, 2014).

Çekirdek DNA analizi: Bitki yaprak dokularından hücre çekirdeği izolasyonunda prosedürün uygulanışı aşağıdaki gibidir.

Yaklaşık olarak 0,5 cm² büyüklüğünde taze yaprak dokusu petri kabına konulmuş ve üzerine 500 µl Extraction Buffer ilave edilmiştir. Yaprak dokusu keskin jilet ile 30-60 saniye süresince küçük parçalara ayrılana kadar parçalanmış, bu şekilde hazırlanmış örnek petri kabı içerisinde hafifçe 10-15 saniye kadar çalkalanmıştır. Bu sürenin sonunda izole edilmiş olan hücre çekirdekleri flow sitometri cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

Bir örneğin mutlak çekirdek DNA içeriği, örnek ile seçilen standardın G1 piklerinin florasan yoğunluklarına ait değerler kullanılarak aşağıda sunulan formül aracılığıyla pikogram (1 pg = 10-12 g) olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ç-DNA} = \frac{\text{DNA M}}{\text{ST}} \times \text{SDNA İçeriği}$$

- Ç-DNA :Çekirdek DNA miktarı (pg)
DNA M :DNA miktarı bilinmeyen türe ait florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)
ST :Standarda ait örneğin florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)
SDNA :Standardın DNA içeriği

Ploidi düzeylerinin belirlenmesi: Her aksesyon için 3 bitki ayrı ayrı analiz edilecek çekirdek DNA analizleri belirlenmiş ve ortalaması alınarak aksesyon ortalaması hesaplanmıştır. Flow sitometri analizleri tamamlandıktan sonra bitkilerin çekirdek DNA içerikleri kromozom sayıları ile ilişkilendirilmiştir. Bunun için, öncelikle aksesyonlar çekirdek DNA içeriği miktarına göre gruplara ayrılmış, daha sonra her gruptan en az birinin kromozomları sayılarak bitkilerin çekirdek DNA miktarları ile kromozom sayıları ilişkilendirilmiştir. Böylece sadece bir bitkinin mitoz kromozomlarını sayarak tüm bitkilerin ploidi düzeyleri belirlenmiştir (Lu ve ark., 1998; Tuna ve ark., 2004; Tuna ve ark., 2001).

Kromozomların sayımı: Mitotik kromozom sayımları çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık gösteren ıspanak aksesyonları arasından seçilen birkaç bitki üzerinde yapılmıştır. Mitotik kromozom sayımında hızlı bölünen meristematik hücrelere sahip kök ucu dokuları kullanılmıştır. Kök ucu hasadı serada yetiştirilmekte olan ergin bitkilerden sabah erken saatlerde yapılmıştır. Hasad edilen kök uçları yaklaşık 4°C de 16 saat 8-hidroxiquinoline solusyonu ile muamele edilmiş ve daha sonra kök uçları farmer solusyonuna transfer edilmiştir. Preparatlar Tuna ve Hasterok, 2016 da açıklandığı üzere enzim yöntemi kullanılarak hazırlanmış ve preparatlar üzerinde morfolojisi düzgün ve iyi dağılmış mitoz kromozomlarının sayımı gerçekleştirilmiştir.

Fotoğraf Çekimi: Morfolojisi düzgün, sayılabilen ve kromozom sayısı tam olan hücreler florasan mikroskobu (Olympos, BX51) ve mikroskoba bağlı CCD dijital kamera (Spot CCD, Rt Slider, Amerika) ile fotoğraflanmıştır.

Verilerin Değerlendirilmesi

Tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak kurulan denemede, ıspanak aksesyonlarına ait çekirdek DNA içeriklerine ait veriler SPSS istatistik paket programı (SPSS-PASW Statistics 18) kullanılarak değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılığın (P<0,01) belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Aynı zamanda birimleri, değişkenleri birbiriyle benzer alt kümelere (grup, sınıf) ayırmaya yardımcı olan çok değişkenli istatistiksel analiz yöntemlerinden biri olan Ward Bağlantı kümeleme yöntemi ile aksesyonlar gruplandırılmıştır (Özdamar, 2004).

Bulgular ve Tartışma

Çekirdek DNA Analizi (pg)

Amerika Birleşik Devletlerin'de 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 Çizelge 2 ve Çizelge 3'de verilmiştir. Çizelge 2'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 önemlilik gurupları ve standart sapma değerleri Çizelge 3'de sunulmuştur. Çizelge 3'ün 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 çeşidinden elde edilmiştir. En düşük çekirdek DNA içeriğinin ise 2,059 pg PI 531451 nolu aksesyon numaralı Matador çeşidinde olduğu belirlenirken, bu aksesyonu aynı önem grubunda bulunan PI 499373 aksesyon numaralı Godir çeşidi takip etmiştir.

Çizelge 3'de ıspanak populasyonlarının 9 farklı gruba ayrıldığı gözlenmiştir. Birinci grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2,225 pg/2C olan tek bir populasyon yer almaktayken, 2. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2,204 pg/2C olan 2 populasyon yer almıştır. 3. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2,192 pg/2C ile 2,183 pg/2C olan 5 populasyon, 4. grupta ortalama çekirdek DNA içerikleri 2,181 pg/2C olan 2 populasyon, 5. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2,177 pg/2C ile 2,108 pg/2C olan 31 populasyon, 6. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2,102 pg/2C ile 2,086 pg/2C olan 8 populasyon, 7. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2,083 pg/2C olan 1 populasyon, 8. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2,062 pg/2C olan 1 populasyon ve son grup olan 9. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2,059 pg/2C olan 2 populasyon yer almıştır.

Çizelge 2 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 3 Bazı ıspanak aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri (pg/2C) ve önem grupları

Aksesyon No	Çeşit adı	Çekirdek DNA içeriği (pg/2C)	Standart Sapma	Önem Grubu
PI 222270	Esfenaj	2,225	0,047	a 1. Grup
NSL 6088	Blight Resistant Savoy	2,204	0,08	ab 2. Grup
NSL 6097	Northland	2,204	0,012	ab
PI 379548	Prilepski	2,192	0,038	abc
NSL 28217	Mt Evergreen	2,189	0,004	abc
Ames 23664	Spi 151/93	2,188	0,096	abc 3. Grup
PI 251507	Espinage	2,184	0,019	abc
PI 379552	Skopski	2,183	0,013	abc
NSL 28218	Viking	2,181	0,037	abcd 4. Grup
PI 254565	Polack	2,181	0,06	abcd
NSL 6099	Nobel/Giant Thick Leaved	2,177	0,055	abcde
NSL 6557	Old Dominion	2,175	0,075	abcde
PI 164965	Cornell ID #242	2,174	0,024	abcde
PI 167434	Cavallius	2,172	0,043	abcde
PI 358254	Sirokolisten	2,172	0,031	abcde
PI 206753	Cornell ID #29; Godfray 1133	2,168	0,045	abcde
PI 262161	Nostruosa Wireflay	2,164	0,037	abcde
NSL 6097	Va Savoy Blight Resistant	2,164	0,042	abcde
PI 167098	Cornell ID #250; Harlan 295	2,158	0,021	abcde
PI 227230	Jiromaru	2,157	0,015	abcde
NSL 81328	Duet	2,155	0,075	abcde
PI 165012	Cornell ID #244; Harlan 88	2,152	0,079	abcde
PI 176776	Cornell ID #59; Harlan 9452	2,150	0,068	abcde
NSL 6084	Giant Thick Leaved/Nobel	2,147	0,055	abcde
PI 177558	Harian 4403	2,146	0,007	abcde
PI 169026	Cgn 9499; Harlan 2920; B	2,143	0,068	abcde 5. Grup
PI 379549	Stipski	2,138	0,041	Abcde
PI 274042	Best Of All	2,136	0,024	abcde
PI 303138	Princess Juliana	2,130	0,031	abcde
PI 266926	Universal	2,130	0,014	abcde
NSL 4683	Dixie Market	2,128	0,003	abcde
PI 274044	Early Giant	2,127	0,051	abcde
PI 608712	Spi 153/89	2,125	0,02	abcde
PI 360710	Samos HybrID	2,125	0,037	abcde
PI 179595	Victoria	2,117	0,015	abcde
PI 508504	Summer Green	2,117	0,052	abcde
PI 274048	Giant Early Leaf	2,116	0,031	abcde
PI 249920	Espinaca Veroflay	2,116	0,017	abcde
PI 339545	101-2	2,115	0,027	abcde
PI 209645	No. 2	2,110	0,006	abcde
PI 360895	Nores	2,108	0,067	abcde
PI 531449	Hegyko	2,102	0,027	bcde
PI 176371	Monstrans Viroflag	2,100	0,047	bcde
PI 179507	Beledi	2,096	0,009	bcde
PI 358260	Radoviski	2,091	0,035	bcde
PI 321020	Wushe Waka Maru	2,090	0,034	bcde 6. Grup
PI 179589	Giant Spinach	2,088	0,025	bcde
PI 358248	OhrIDski	2,086	0,028	bcde
NSL 26513	Resistoflay	2,084	0,009	bcde
PI 531454	Mosonmagyarovari	2,083	0,028	cde 7. Grup
NSL 81329	Bouquet	2,062	0,025	de 8. Grup
PI 499373	Godir	2,059	0,022	e 9. Grup
PI 531451	Matador	2,059	0,028	e

Arumuganathan ve Earle (1991) yürüttükleri bir çalışmada, ıspanağın çekirdek DNA içeriğini 2,05 pg/2C (989 Mbp/1C= 1,025 pg/1C) olarak tespit etmişler ve önceki çalışmalarda bu değerin 1,9 pg/2C olduğunu belirtmişlerdir. Fujito ve ark. (2015) ise farklı *Spinacia* türlerinde homomorfik ve heteromorfik seks kromozomları üzerinde yaptıkları çalışmalarında 2C çekirdek DNA içeriklerinin 1,66-1,79 pg arasında değiştiğini saptamışlardır. Araştırmacıların bulduğu sonuçlar ile çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar arasındaki farklılığın, kullanılan metod, florasan boya ve standart bitki farkından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim araştırmacılar farklı *Spinacia* türlerinin flow sitometri ile çekirdek DNA analizinde standart bitki olarak şeker pancarını kullanmışlardır, oysa çalışmamızda standart bitki olarak fiğ bitkisi kullanılmıştır.

Farklı ıspanak aksesyonları için analiz edilen 3 bitkinin çekirdek DNA içeriklerinin 0,003 ile 0,096'lık bir standart sapma ile (Çizelge 3) birbirine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar yöntemin hassasiyetinin ne kadar yüksek olduğunu ve aynı zamanda popülasyonların saf olup başka tür ve varyetelere ait bitkileri içermediğini göstermektedir.

Kümeleme (Cluster) Analizi

2C DNA içeriği incelenen aksesyonların yapılan kümeleme analizi sonucunda oluşturulan dendogramda iki ana küme altında sekiz alt küme oluşturduğu görülmektedir (Şekil 1). Aynı değerler ile gerçekleştirilen varyans analizi sonrasında yapılan çoklu karşılaştırma testinde de kümeleme analizine benzer sonuçlar gözlenmiştir (Çizelge 3). Aksesyonlar arasında istatistiki olarak farklılık olmasına rağmen Şekil 1 incelendiğinde oluşan alt kümelerin kendi içlerindeki uzaklığın çok fazla olmadığı ($d < 5$) söylenebilir. Bunun sebebinin aksesyonlar arasında ploidi düzeyinde farklılık görülmemesi olduğu öne sürülebilir. Yine de ana kümelerinin ayırım uzaklığının yüksek olması ($d = 25$) aksesyonlar arasında önemli düzeyde farklılıklar olabileceğinin göstergesidir. Bu farklılıkların kaynağının ploidi farklılıkları yerine Bennett ve Leitch (2005) tarafından da belirtildiği gibi farklı miktarda kodlanmayan tekrarlanan DNA bölgeleri, satelit DNA, intronlar ya da psödo genler olması daha muhtemel görülebilir.

Kromozom sayısı

Çekirdek DNA içeriklerini ploidi düzeyleri ile ilişkilendirmek için yapılan kromozom sayımlarında alınan örneklerin $2n = 12$ kromozoma sahip olduğu gözlenmiştir. Araştırmada kullanılan bazı ıspanak aksesyonlarının diploid kromozom sayılarına ait resimler Şekil 2, 3 ve 4'de sunulmuştur.

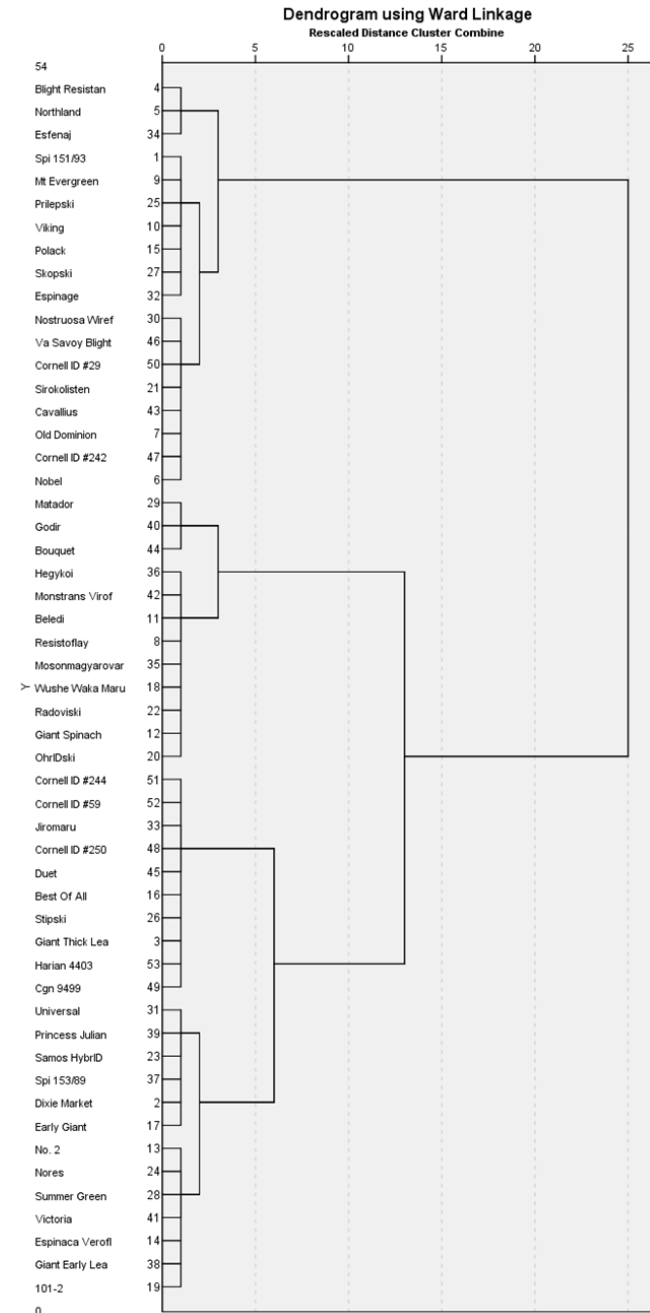
Bu sonuçlara bakarak diğer bitkilerin kromozomlarını saymaya gerek kalmamış ve hepsinin 12 kromozom taşıdığı kabul edilmiştir. Elde edilen bu sonuç ıspanakta farklı araştırmacılar tarafından (Fujito ve ark., 2015; Şalk ve ark., 2008; Takahata ve ark., 2016; Xu ve ark., 2017) yapılan ve ıspanağın diploid olduğunu gösteren çalışmalar ile paralellik göstermiştir.

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 ark., 2000). Türler arasında ise

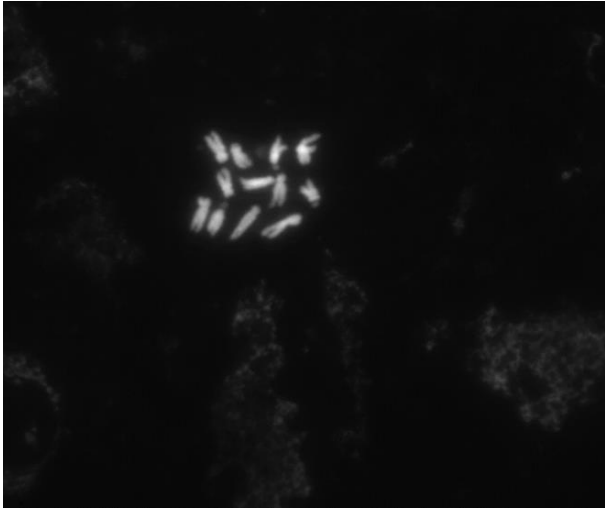
çekirdek DNA içeriği bakımından yaklaşık 1000 kat farklılık gözlenebilmektedir. Bu nedenle, çekirdek DNA içeriği taksonomik ve evrim çalışmaları için son derece yararlıdır (Ohri, 1998; Özkan ve ark., 2003).

Sonuç ve Öneriler

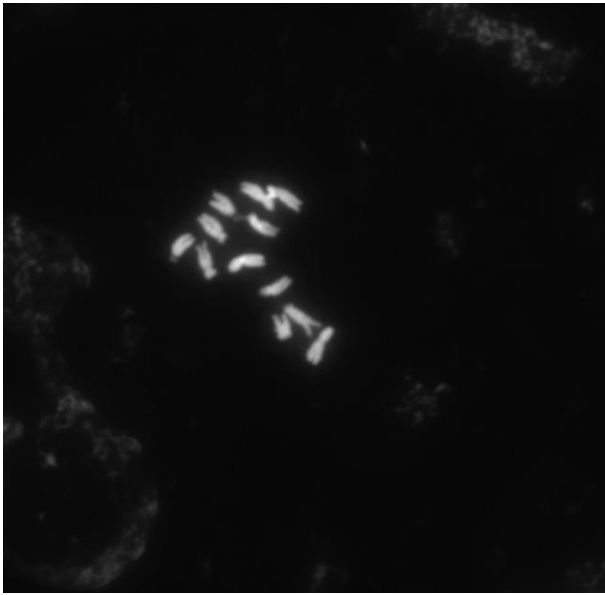
Flow sitometri ile bazı ıspanak aksesyonlarının çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi amaçlı araştırmada, flow sitometri yöntemi ile 53 ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) aksesyonunun çekirdek DNA içerikleri belirlenmiş ve çekirdek DNA içeriği bilgisi ile bitkilerin kromozom sayıları ilişkilendirilerek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



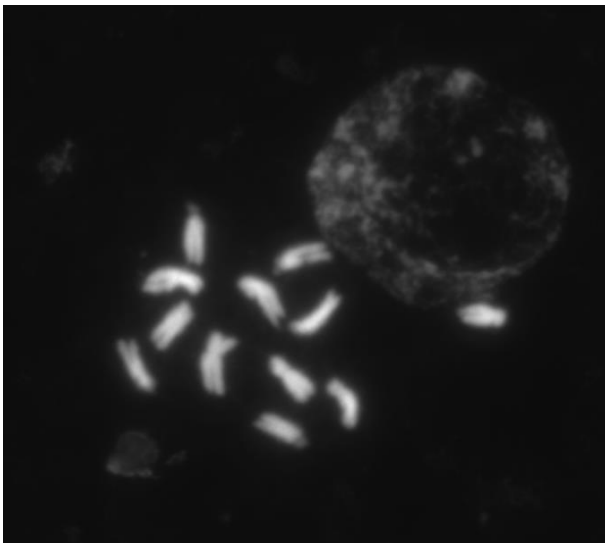
Şekil 1 Ispanak aksesyonları 2C DNA içeriklerine göre kümeleme analizi dendogramı



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



Şekil 3 Diploid ($2n=2x=12$) 5. grup ıspanak aksesyonlarına ait mitoz kromozomlarının görünüşü



Şekil 4 Diploid ($2n=2x=12$) 9. grup ıspanak aksesyonlarına ait mitoz kromozomlarının görünüşü

Yapılan çekirdek DNA içeriği analizlerinde standart sapmanın 0,003 ile 0,096 arasında ve oldukça düşük olarak gerçekleşmiş olması aksesyonların saf olup, başka tür veya varyeteye ait tohum içermediğini işaret etmektedir. Buna ek olarak standart sapmanın düşük olması analizlerin yüksek bir hassasiyetle yapılmış olduğunda göstermektedir. *Spinacia oleracea* L. aksesyonlarının ortalama çekirdek DNA içeriği 2,225 pg/2C ile 2,059 pg/2C arasında değişmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, ıspanak aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri arasındaki ($P<0,01$) farkların önemli olduğu belirlenmiştir. 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. Godir çeşidi takip etmiştir. Bununla birlikte çekirdek DNA içeriği 2,225 pg/2C ile 2,059 pg/2C arasında değişen tüm aksesyonların kromozom sayısının $2n=12$ olduğu kabul edilmiştir. DNA içeriği 2,225 pg/2C ile 2,059 pg/2C arasında değişen tüm aksesyonların kromozom sayısının $2n=12$ olduğu kabul edilmiştir.

ıspanak aksesyonlarının 2C DNA içeriklerine göre Ward metodu ile yapılan kümeleme analizi sonuçlarına göre iki ana küme altında sekiz farklı kümenin oluştuğu 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.

Araştırma ile elde edilen bu veriler, çalışmaya konu olan 53 ıspanak aksesyonu ile yapılacak ıslah çalışmalarında araştırmacılara zaman ve emek açısından avantaj sağlayacaktır.

Kaynaklar

- Arumuganathan K, Earle ED. 1991. Nuclear DNA Content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3): 208-218.
- 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. 2005. Genome size evolution in plants. in: the evolution of the genome. Gregory, T.R., (Ed.), Elsevier Academic Press, Burlington, MA., pp: 89-162.
- 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> [Erişim:17.01.2016].
- 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.
- 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 içeriklerinin belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 34 s, Tekirdağ.
- 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. [Erişim:10.02.2016].
- Karp A. 1991. Cytological techniques. P. C4:1-13. In K. Lindsey (ed.) Plant Tissue Culture Manual. Kluwer, Dordrecht, the Netherlands.
- 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.
- Ohri D. 1998. Genome size variation and plant systematics. Ann. Bot., 82 (Suppl.A.): 750-812.
- Örkcü P. 2016. Farklı lokasyonlardan temin edilen banya genotiplerinin morfolojik ve sitolojik karakterizasyonu. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 85 s, Tekirdağ.
- Özdamar K. 2004. Paket programlar ile istatistiksel veri analizi (çok değişkenli analizler). Kaan Kitabevi, 279s, Eskişehir.
- 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.
- Şalk A, Arın L, Deveci M, Polat S. 2008. Özel sebzecilik. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ders Kitabı, Onur Grafik, Matbaa ve Reklam, 480s, İstanbul.
- 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 içeriklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. NKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 30 s, Tekirdağ.
- Tuna M, Vogel KP, Arumuganathan K, Gill KS. 2001. DNA content and ploidy determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry. Crop Science, 41: 1629-1634.
- Tuna M, Khadka DK, Shrestha MK, Arumuganathan K, Golan-Goldhirsh A. 2004. Characterization of natural orchardgrass populations of Thrace of Turkey based on ploidy and DNA polymorphisms. Euphytica, 88: 25-34.
- Tuna M, Cabi E. 2014. Bazı buğdaygil yem bitkisi türlerine ait populasyonların çekirdek DNA içeriklerinin flow sitometri yöntemiyle belirlenmesi ve ploidy analizi ile tür teşhisinde kullanımı. <http://acikerisim.nku.edu.tr:8080/xmlui/handle/20.500.11776/2119>. [Erişim tarihi:5.8.2017].
- Tuna M, Hasterok R. 2016. Florasan insitu hibridizasyon ve tarımsal araştırmalarda kullanımı. Workshop. Haziran, 2016. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ
- Xu C, Jiao C, Sun H, Cai X, Wang X, Ge C, Zheng Y, Liu W, Sun X, Xu Y, et al. 2017. Draft genome of spinach and transcriptome diversity of 120 spinach accessions. Nature Communications, 8, 15275. <http://doi.org/10.1038/Ncomms15275>. [Erişim tarihi:5.8.2017].