

**FLOW SİTOMETRİ İLE *Bromus catharticus* Vahl
AKSESYONLARININ ÇEKİRDEK DNA
İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Eyüp Erdem TEYKİN

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

DANIŞMAN: Doç. Dr. Metin TUNA

2011

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FLOW SİTOMETRİ İLE *Bromus catharticus* Vahl AKSESYONLARININ
ÇEKİRDEK DNA İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Eyüp Erdem TEYKİN

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Metin TUNA

TEKİRDAĞ-2011

Her hakkı saklıdır.

Doç. Dr. Metin TUNA danışmanlığında, Eyüp Erdem TEYKİN tarafından hazırlanan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Metin TUNA

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Canan TUNA

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nevin ŞAFAK

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Flow Sitometri ile *Bromus catharticus* Vahl aksesyonlarının çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi

Yüksek Lisans Tezi

Eyüp Erdem TEYKİN

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Metin TUNA

Bu yüksek lisans tezinde amaç, yurt dışından sağlanmış olan 83 *Bromus catharticus* aksesyonunun çekirdek DNA içeriklerini flow sitometri ile ilk defa belirlemek ve elde edilen çekirdek DNA bilgisinden yararlanarak aksesyonların ploidi düzeyleri ile varsa aksesyonlarda tür ve varyete karışıklıklarını saptamaktır.

Elde edilen sonuçlara göre araştırmada kullanılan *B. catharticus* aksesyonları arasında 2C çekirdek DNA içeriği 2 aksesyon (PI 138221 ve PI 655178) hariç 11.79 (PI 595116) pg ile 13.72 pg (PI 273869) arasında değişim göstermiştir. Yukarıda anılan iki aksesyonun çekirdek DNA içeriğinin (19.66 ve 19.41 pg) bariz olarak diğerlerinden farklı olması bu iki aksesyonu oluşturan bitkilerin *B. catharticus* türüne ait olmayıp başka bir *Bromus* türüne ait olduğunun göstergesidir. Her bir aksesyon için analiz edilen 8 bitkinin çekirdek DNA içerikleri genelde 0.04 ile 0.2 lik bir standart sapma ile bir birine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan popülasyonların saf olup, başka tür ve varyeteye ait bitki içermediği anlaşılmaktadır.

Çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık gösteren bazı bitkilerin kromozom sayıları $2n=42$ olarak saptanmış ve dolayısıyla heksaploid oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmada kullanılan aksesyonların tamamının heksaploid olduğu kabul edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Parlak Brom, *Bromus catharticus*, çekirdek DNA içeriği, Flow sitometri, ploidi

2011, 30 sayfa

ABSTRACT

Msc. Thesis

Determination of nuclear DNA content of *Bromus catharticus* Vahl Accessions by Flow Cytometer.

Eyüp Erdem TEYKİN

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Science

Main Science Division of Fields Crops

Supervisor : Doç. Dr. Metin TUNA

The objective of this study is to determine nuclear DNA content of 83 *Bromus catharticus* Vahl accessions obtained from gene banks by flow cytometer and use the information to determine ploidy and purity of the accessions.

Based on the results of the study, 2C nuclear DNA content of the *B. catharticus* accessions, except two accessions (PI 138221 ve PI 655178) varied between 11.79 (PI 595116) pg and 13.72 pg (PI 273869). Nuclear DNA content of the two accessions mentioned above were clearly higher (19.66 and 19.41 pg) than the rest of the accessions. Therefore, the plants included by these two accessions (PI 138221 and PI 655178) should belong to a different *Bromus* species. Standart deviation of the accessions were quite low (generally between 0.04 and 0.2) and therefore, indicates that *B. catharticus* accessions are highly pure and they don't include any plants belong to any other species or variety.

Chromosome numbers of the *B. catharticus* plants with different DNA content determined to be $2n=42$ by using light microscope. Therefore, ploidy of all the accessions accepted as hexaploid.

Key words: Paire Grass, *Bromus catharticus*, nuclear DNA content, Flow cytometry, ploidy

2011, 30 page

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3.MATERYAL VE YÖNTEM	7
3.1. Materyal	7
3.2. Yöntem	7
3.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi	7
3.2.2. Fidelerin Viyollere Şaşırtılması ve Yetiştirilmesi	7
3.2.3 Çekirdek DNA Analizi	12
3.2.3.1 Yöntemin aşamaları:	12
3.2.4 Kromozomların sayımı	13
3.2.4.1. Bitki kök uçlarının elde edilmesi	13
3.2.4.1.1 Ergin bitkilerden kök ucu eldesi	14
3.2.4.1.2 Tohumların çimlendirilmesiyle kök ucu eldesi	14
3.2.4.2. İlk işlem:	14
3.2.4.3. Tespit:	14
3.2.4.4. Feulgen Boyasının Hazırlanması	14
3.2.4.5. Boyamanın Yapılması	15
3.2.4.6. Preparatların Hazırlanması	15
3.2.4.7. Kromozomların fotoğraflanması	16
3.2.5. Verilerin İstatistik Yöntemler İle İncelenmesi	16
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	17
5. SONUÇ	24
6. KAYNAKLAR	25
TEŞEKKÜR	29
ÖZGEÇMİŞ	30

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 3.1. Bir <i>B. catharticus</i> bitkisinin salkım çıkarma başlangıcında tarlada görünüşü	11
Şekil 4.1. a. PI 595116 nolu aksesyon (11.79 pg), b. PI 368880 nolu aksesyonu (12.48 pg), c. PI 238021 nolu aksesyon (13.39 pg) , d. PI 138221 nolu aksesyonu (19.73pg).	19
Şekil. 4.2. PI 273869 nolu aksesyonun mitoz kromozomlarının görünüşü (2n=42).	23

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan <i>Bromus catharticus</i> aksesyonlarının aksesyon numaraları ve orijinleri	8
Çizelge 4.1. <i>Bromus catharticus</i> aksesyonlarının pg olarak ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri.	21
Çizelge 4.2. spss istatistik programı ile hesaplanan hata kareler ortalamaları ve önemlilikler	23

1. GİRİŞ

Sağlıklı refah toplumlarında insan sağlığı ve beslenmesi için gerekli olan hayvansal gıdaların devam ettirilebilir bir şekilde üretimi sağlanmalıdır. Hayvansal gıdaların yeterli düzeyde üretilebilmesi ise hayvan varlığının korunabilmesine bağlıdır. Bununla birlikte ülkemizin nüfusu oldukça yüksek bir hızla artarken; bir süredir hayvan varlığımız ve dolayısıyla hayvansal üretimimizde dikkat çekici bir gerileme görülmektedir. Bu durum, 2010 yılının başlarında çok ciddi bir şekilde hissedilmeye başlanmıştır. Bundan dolayı ülkemizde yükselen hayvansal ürün fiyatları, özellikle etin fiyatı gerek yazılı gerekse görsel medyada uzun bir süredir ana gündem maddelerinden birini oluşturur hale gelmiştir. Son birkaç aydır da et üretimi yapan büyük firmalar zarar ettikleri gerekçesiyle üretimlerini durdurmak zorunda kaldıklarını duyurmaktadırlar.

Ülkemiz hayvancılığının bugün karşı karşıya bulunduğu bu sorunun en önemli nedenlerinden biri hayvancılığımızın ana besin kaynağı olan kaba yem yeterli düzeyde üretilmemesi ve üretim maliyetinin yüksek olmasıdır. Uzun yıllardan beri süregelen bu kaba yem sorununun kalıcı bir şekilde çözüme kavuşturulabilmesi ise ucuz ve güvenilir yem kaynakları olan çayır mera alanlarını daha verimli kullanma ve tarım alanlarında yem bitkisi üretimine daha geniş yer ayırma ile mümkündür. Bunu gerçekleştirebilmek için de yüksek verim ve kalite değerlerine sahip, lokal ekolojilere uyum sağlamış yeni yem bitkisi tür ve çeşitlerine acilen gereksinim bulunmaktadır.

Bromus catharticus Vahl ülkemizin iklimine sahip birçok ülkede yaygın olarak yetiştirilen önemli bir serin mevsim buğdaygil yem bitkisi olup, hem otlatma amacıyla meralarda hem de kuru ot üretimi amacıyla tarım alanlarında yetiştirilmektedir. Ülkemizde ise günümüze kadar bu tür ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *B. catharticus* yem bitkisi olarak yüksek biyolojik verimi yanında, kuraklığa diğer serin mevsim buğdaygil yem bitkilerinden daha dayanıklı olmasından dolayı ülkemizin birçok bölgesinde başarı ile yetiştirilerek kaba yem sorununun çözümüne katkı sağlama ihtimali yüksek olan bir türdür. Bu nedenle *B. catharticus* genetik kaynaklarının elde edilerek yem bitkisi olarak ülkemiz ekolojik koşullarındaki performanslarının belirlenmesi ve uygun *B. catharticus* çeşitlerinin geliştirilmesinin yerinde olacağı kuşkusuzdur.

Ancak 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. Bugün birçok yem bitkisi türü için sahip olduğumuz bilgilerin diğer kültür bitkilerine kıyasla çok daha kısıtlı olması, yem bitkileri ıslahının bu bitkilere nazaran geri olmasının en önemli nedenlerinden biridir.

Türün sahip olduğu genomların 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 seçilmesinde büyük gereksinim duyulan bilgilerin en önemlileridir. Hassas ve güvenilir bir yöntemle elde edilmiş çekirdek DNA içeriği bilgisi yukarıda anılan ve gereksinim duyulan konuların tümüne ışık tutabilecek niteliktedir. Flow sitometri bugün çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesinde kullanılan en duyarlı, hızlı ve güvenilir bir yöntem olup, bu amaçla kullanımı son yıllarda yaygınlaşmaktadır.

Bu tezin amacı, Trakya bölgesi koşullarında yem bitkisi olarak performanslarının belirlenmesi için yurt dışından elde edilmiş olan 83 *Bromus catharticus* aksesyonunun çekirdek DNA içeriklerini flow sitometri ile ilk defa belirleyerek, aksesyonların ploidi düzeylerini saptamak ve populasyonlar içerisindeki karışıklıkları belirlemede kullanmaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bromus cinsi, *Gramineae* familyasının *Festucea* oymağının bir üyesidir (Wolff ve ark., 1995). Smith (1970)'in yapmış olduğu sınıflandırmaya göre *Bromus* cinsi altı alt gruba ayrılmıştır. Bu altı alt gruptan biri olan *ceratochloa*, gen merkezi Kuzey Amerika, Meksika ve Güney Amerika'da bulunan 6 oktaploid tür ile Güney Amerika'da yetişen 7 heksaploid türü içermektedir. *Bromus catharticus* Vahl gen merkezi Güney Amerika olan bu 7 heksaploid türden birisi olup, tek veya iki yıllık bir serin mevsim buğdaygil türüdür. Kompleks bir tür *B. catharticus* Vahl, *Bromus uniloides* H. B. K., *Bromus schraderi* Kunth ve *Bromus willdenowii* Kunth gibi botanik adlarla da bilinmektedir (Hume, 1990). Matthei (1986) *B. catharticus*'un Arjantin'de "cebasilla", Şili'de "lanca", "lanco", "cebadilla", "pasto del perro" adıyla bilindiğini, Pavlik (1995) ile Wolff ve arkadaşları (1995) Amerika Birleşik Devletleri'nde "chilean brome", "cebadilla criolla", "cebadilla australiana", ve "rescue grass", ve Yeni Zellanda'da "praire grass" adlarıyla anıldığını bildirmişlerdir. *Bromus catharticus* Vahl ülkemizde ise parlak brom adı ile tanınmaktadır. Planchuelo (2006) morfolojik incelemeler yaptığı çalışmasında *B. stamineus* veya *B. cebadilla* olarak bilinen türün aslında *B. catharticus*'un bir varyetesi olduğunu saptamıştır.

B. catharticus'un doğal gelişim alanı Güney And dağlarından Arjantin Patogonyasına uzanan ve Şili'yi de içeren coğrafi bölgedir (Gutierrez ve Pensiero 1998). Matthei (1986) türün Şili'nin dağlık kesiminden sahil kesimine kadar geniş bir dağılım gösterdiğini bildirmiştir.

B. catharticus uzun boylu, dik gelişen, yumak oluşturan ve geniş yapraklar taşıyan az sayıda kalın sapa sahip bir bitkidir (Hume, 1991a). *B. catharticus* türü içerisinde yer alan bitkiler generatif gelişme için soğuklamaya (vernelizasyon) ihtiyaç duymayıp, uzun gün şartlarında bahar ortalarından sonbahar ortalarına kadar sürekli generatif saplar oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Hume, 1991b).

B. catharticus kışın soğuk, ve yazın sıcak ve kurak aylarında diğer çok yıllık serin mevsim buğdaygil türlerine göre daha iyi performans göstermektedir (Fraser 1982; Belesky ve ark., 2006). Wilson (1977) ise gelişme bakımından *B. catharticus* türünün en az *Lolium perenne* ve *Lolium multiflorum* kadar iyi performans gösterdiğini bildirmiştir. Burges ve ark. (1986) yılın soğuk zamanlarına kadar vejetatif gelişimini

sürdürmesi ve kurağa daha dayanıklı olması gibi özellikleri nedeniyle *B. catharticus*'a geleneksel serin iklim çayır mera bitkilerinde verimin azaldığı zamanlarda bile üretkenliğini devam ettirebilme yeteneği kazandırdığını bildirmektedir.

Daha önce yapılmış olan morfolojik karakterlere dayalı incelemelerde tür içerisinde büyük bir varyabilite olduğu tespit edilmiştir (Perez Lopez, 1975; Szpiniak ve ark. 1995; Von der Pahlen, 1975; Arturi 1983; Pahlen 1986; Garcia ve Arturi 1992; Spiniak 1995; Wolff 1996; Pistrole 1999). Aulcino ve Arturi (2002) Arjantin'deki *B. catharticus* popülasyonları arasındaki fenotipik değişkenlikler ve varyabilitenin belirlenmesi amacıyla yürüttükleri çalışmalarında kantitatif özellikler üzerindeki genetik ve çevresel etkileri incelemişlerdir. Araştırmacılar, yürüttükleri çalışmada toplam fenotipik varyasyonun büyük oranda çevresel etmenlerden kaynaklandığını gözlemiş ve türde fenotipik özelliklerin büyük bir esneklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bununla beraber moleküler marker sistemleri kullanılarak tür üzerinde günümüze kadar yapılmış olan tek araştırmada türün genetik çeşitliliğinin sanıldığı kadar yüksek olmadığı saptanmıştır (Puecher ve ark., 2001).

Frame ve Morrison (1988) yaptıkları çalışmada *Bromus catharticus*'un sindirilebilirliğinin *Lolium perenne*'den biraz daha düşük olmakla birlikte, *Phleum pratense*, *Phalaris arundinacea* ve *Dactylis glomerata*'dan çok daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *B. catharticus*'un suda çözünebilir karbonhidrat oranının *Lolium multiflorum*'dan daha düşük bir değere sahip iken *Dactylis glomerata* ve *Phelum pratense*'den belirgin derece yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Hume (1991a) çalışmasında, *B. catharticus* ve *Lolium multiflorum* arasındaki önemli gelişim ve kalite kriterlerini karşılaştırmalı olarak incelemiştir. Bu çalışmada *B. catharticus*'un daha kısa boylu olmasına karşın daha çok kardeşlendiği, *L. multiflorum*'a göre daha fazla yaprak aksamı oluşturduğu ve daha derine inen, toprağa daha fazla yayılmış köklere sahip olduğunu saptamıştır. Gelişmiş ve derine giden kökleri, *B. catharticus*'un nitrojen fakiri topraklarda bile nitrojen içeriğinin yüksek olmasını sağladığı saptanmıştır (Hume ve Lucas 1987).

Parneix ve Barloy (1982) yaptıkları araştırmada *B. catharticus* bitkisinin besin değeri ve suda çözünebilir karbonhidrat miktarının başaklanmaya kadar artış gösterdiğini saptamışlardır. Fraser (1982) araştırmasında yalın olarak ekilen *B. catharticus* çeşitlerinin 8600 kg/ha ile 16800 kg/ha arasında kuru madde ürettiklerini

tespit etmiştir. Aynı çalışmada yalın olarak ekilen yoncanın kuru madde üretiminin 18500-19500 kg/ha arasında olduğu saptanmıştır. Yonca ile *B. catharticus*'un karışım halinde birlikte ekilmesinde ise kuru madde üretiminin 19000-22400 kg/ha arasında olduğu saptanmıştır. Hume (1991b) yaptığı bir çalışmada yüksek verim ve yüksek kaliteli yem elde etmek için biçim zamanının belirlenmesinde kuru madde oranı, kimyasal bileşikler ve hazmolabilirliğin dikkate alınması gerektiğini bildirmiştir.

Fransa (Simon ve ark., 1983) ve İngiltere'de (Ingram, 1984) yapılan araştırmalarda *B. catharticus*'un kültür çeşitlerinin ot verimi bakımından *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *L. perenne* x *L. multiflorum* melezleri, *Dactylis glomerata* ve *Festuca arundunacea* Schreb den daha iyi olduğu saptanmıştır.

Bromus catharticus'un çiçeklenmesi üzerine yapılan çalışmalarda, cleistogamik (çiçekler açılmadan döllen) ve chasmogamik (çiçekler açıldıktan sonra dölenen) olmak üzere iki çeşit çiçeklenme biçimi sergilediği, genelde otogam bir bitki olmakla birlikte çok düşük oranda allogam özellikte sergilediği gözlemlenmiştir (Caldera ve Pahlen 1984, Naranjo 1985, Pahlen 1986 ve Morant 1990). Bu türde chasmogamic çiçeklenme genellikle bahar başında ortaya çıkarken, cleistogamic çiçekler bahar sonunda belirirler ve yaz boyunca varlıklarını sürdürürler. (Perez Lopez 1975). Ragonese ve Marco, 1941 ile 1943 tarihli çalışmalarında *B. catharticus*'ta çiçeklenme zamanının fotoperiyot ve toprak nemi tarafından belirlendiğini söylemektedirler. Karim (1970) generatif gelişimin uzun fotoperiyot döneminde olduğunu bildirmiştir.

Falloon ve Hume (1988) yaptıkları alan çalışmalarında başakta gelişen bir pas türü olan *Ustilago bullata* Berk. pas'ının *B. catharticus* türünün yem verimi üzerine olan etkilerini incelemiştir. Bu çalışmada *U. bullata* pas'ının çiçeklenme sorunlarına yol açarken, başak sayısını azalttığı gözlemlenmiştir. *U. bullata* pas'ının biçilen yaprak ve sapların tekrar gelişiminde başarısızlığa yol açarak yem verimini düşürdüğü saptanmıştır. Buna ek olarak aynı çalışmada, *U. bullata* ile enfekte olan bitkilerin bakteriyel hastalıklara daha duyarlı hale gelip hayatta kalma oranlarının düştüğü gözlenmiştir.

Fallon'un çalışmalarında (1976; 1979) *Ustilago bullata* pasının *B. catharticus* türünün yem verimini büyük ölçüde düşürdüğü saptanmıştır. Araştırmacı yaptığı bu çalışmalarda bitkinin arazide tesisinin, tutunmasının ve üretkenliğinin bu pas tarafından azaltıldığını saptamıştır. Bu pasın en dikkat çekici etkisi, enfekte olan bitkilerin

tümünün (pas görülmeyen bitkiler hayatlarını sürdürürlerken) çıkışı izleyen 9-10 aylık bir sürenin sonunda ölmeleri olmuştur. Pas nedeniyle oluşan bitki ölümünün aşırı yağışlar ve göllenme stresinin yol açtığı ölümlerden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Fisher ve Holton nun (1957) sera koşullarında yürüttükleri çalışmalarında *U.bullata* ile enfekte olan bitkilerin kök patojenlerine karşı, enfekte olmayan bitkilere oranla, çok daha hassas oldukları tespit edilmiştir. Öte yandan tohumların ekimden önce fungusla muamele edilmesiyle hasata kadar pas sorununun önemli ölçüde engellendiği saptanmıştır (Fallon ve Rolstonu, 1986).

B. cartharticus üzerine yapılan sitogenetik çalışmalarda temel kromozom sayısı $x=7$ olarak bulunmuştur. Naranjo (1985) tarafından yapılan çalışmalarda *B. catharticus*'un $2n=42$ kromozom sayısı ile A, B, ve C genomlarına sahip hekzaploid bir tür olduğu saptanmıştır.

Sahip olduğu üstün özelliklerden dolayı son yıllarda *B. catharticus*'a duyulan ilgi artmaya başlamıştır. Ancak, diğer serin mevsim buğdaygil türlerine kıyasla *B. catharticus* hakkında mevcut olan bilgi birikimi çok daha sınırlıdır. Ülkemizde ise bu tür ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan aksesyonlar Western Regional Plant Introduction Station (Pulmann, Washington, ABD) bünyesinde bulunan gen bankasından temin edilmiş olup aksesyonların tam listesi Çizelge 3.1 de özetlenmiştir. Bir *B. catharticus* bitkisinin görünüşü ise Şekil 3.1 de sunulmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi

Tohumların çimlendirilmesi işlemine 2010 yılı Şubat ayında başlanmıştır. Tohumlar çapı 90 mm olan petri kapları içerisine yerleştirilmiş çimlendirme kağıtları üzerinde çimlendirilmiştir. Çimlendirme işlemi oda şartlarında gerçekleştirilmiş olup, tohumlarda mantari enfeksiyon gelişmesini engellemek amacıyla su yerine taze hazırlanmış captain solüsyonu kullanılmıştır. Kurumayı önlemek için çimlenme işlemi tamamlanana kadar petri kaplarına gerektiğçe su eklenmiştir.

3.2.2. Fidelerin Viyollere Şaşırtılması ve Yetiştirilmesi

Her aksesyon için petri kabı içerisinde çimlenmiş tohumlardan en iyi gelişmiş olan 10 fide çalışmada kullanmak amacıyla viyollere şaşırtılmış ve viyoller Tarla Bitkileri Bölümüne ait plastik sera içerisine yerleştirilmiştir. Çekirdek DNA analizleri tamamlanana kadar bitkiler plastik sera içerisinde yetiştirilmiştir. Viyollerin doldurulmasında 3 birim bahçe toprağı, 1 birim dere kumu ve 1 birim torf kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan *Bromus catharticus* Vahl aksesyonlarının aksesyon numaraları ve orijinleri

SIRA	PI	TÜR ADI	TOPLANDIĞI YER
1	10432	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	A.B.D.
2	138221	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Şili
3	162779	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Arjantin
4	168564	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Avusturalya
5	187000	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	
6	193144	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Uruguay
7	195476	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Güney America
8	197845	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	
9	197848	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	
10	202360	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	
11	202693	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Uruguay
12	204157	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Uruguay
13	217583	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Hindistan
14	217593	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Hindistan
15	219802	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Şili
16	219804	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Şili
17	238251	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>elatus</i>	
18	273869	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Etyopya
19	283202	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Fransa
20	283203	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Uruguay
21	283204	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Japan
22	284108	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Şili
23	284109	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Güney Amerika
24	284110	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Güney Amerika
25	284111	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Güney Amerika
26	284788	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Avusturalya
27	292258	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	İngiltere
28	304864	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Arjantin
29	306289	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Bolivya
30	309955	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Brezilya
31	309957	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Brezilya
32	316173	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Avusturalya
33	316173	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Avusturalya
34	316174	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Avusturalya
35	316177	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Avusturalya
36	331170	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	Arjantin
37	331172	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Arjantin
38	338633	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	Fas
39	365571	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	Avusturalya

40	365572	<i>Bromus catharticus var. rupestris</i>	Avusturalya
41	366015	<i>Bromus catharticus var. rupestris</i>	Arjantin
42	366016	<i>Bromus catharticus var. rupestris</i>	Uruguay
43	368026	<i>Bromus catharticus var. rupestris</i>	Arjantin
44	368027	<i>Bromus catharticus var. rupestris</i>	Arjantin
45	368860	<i>Bromus catharticus var. rupestris</i>	Arjantin
46	371968	<i>Bromus catharticus var. rupestris</i>	Arjantin
47	376930	<i>Bromus catharticus var. rupestris</i>	Eski Sovyetler Birliđi
48	377533	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Japonya
49	409137	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Güney Amerika
50	409138	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Güney Amerika
51	413792	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Fransa
52	413792	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Fransa
53	442077	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Japonya
54	442078	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Japonya
55	442081	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Japonya
56	442082	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Japonya
57	442083	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Japonya
58	469233	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Yeni Zellanda
59	469243	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
60	477987	<i>Bromus catharticus var. rupestris</i>	Fransa
61	595114	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
62	595115	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
63	595116	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
64	595117	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
65	595118	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
66	595119	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
67	595120	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
68	595122	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
69	595128	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	A.B.D.
70	618750	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Fransa
71	634279	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Fransa
72	634280	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Fransa
73	636668	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Arjantin
74	642838	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Şili
75	655178	<i>Bromus catharticus var. catharticus</i>	Şili
76	ARBR37		Arjantin
77	ARBR01		Arjantin
78	ARBR06		Arjantin
79	ARBR12		Arjantin
80	ARBR14		Arjantin
81	ARBR19		Arjantin

82	BAR 501
83	BARENO

Şekil 3.1. Bir *B. catharticus* bitkisinin salkım çıkarma başlangıcında tarlada görünüşü



3.2.3 Çekirdek DNA Analizi

Çekirdek DNA analizi her aksesyon için 8 tek bitki üzerinde yapılmış ve 8 bitkinin ortalaması alınarak aksesyonun ortalama çekirdek DNA içeriği belirlenmiştir. Analizde bitki dokusu olarak plastik serada yetiştirilmekte olan genç ve sağlıklı bitkilerinden elde edilen taze yaprak dokuları kullanılmıştır. Çalışmada standart olarak 8.5 pg DNA içeriğine sahip olan domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* L.) bitkisi kullanılmıştır.

Çekirdeklerin izolasyonu Arumuganathan ve Earle (1991) tarafından geliştirilen yöntemle Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Sitogenetik Laboratuvar'ında yapılmıştır. İzole edilen çekirdekler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarına transfer edilerek laboratuvarında bulunan Coulter marka flow sitometri cihazı ile analiz edilmişlerdir. İzole edilmiş olan çekirdekler analiz edilene kadar buz içerisinde ve ışık görmeyecek şekilde korunmuşlardır.

Çekirdek DNA izolasyonunda kullanılan yöntem aşağıdaki gibidir.

Solüsyonların hazırlanması.

Solüsyon (A)

20 ml MgSO₄ buffer

20 mg Dithiothreitol

500 µl PI stok

550 µl TritonX 100 stok

Solüsyon (B)

5 ml solüsyon (A)

10 µl RNase, DNase free

3.2.3.1 Yöntemin aşamaları:

- 1- Genç ve sağlıklı bitkilerden 30-40 mg taze yaprak dokusu hasat edilir.
- 2- Yaprak dokusu buz içerisinde bekletilen petri kabına yerleştirilir.
- 3- Petri kabı içerisine 1 ml solüsyon (A) eklenir.

4- Yaprak dokusu solüsyon içerisinde keskin jilet (bistürü) yardımıyla çok küçük parçalara ayrılana kadar parçalanır

5- Parçalama işlemi tamamlandıktan sonra petri kabı içerisindeki solüsyon 35 µ naylon filtrelerden geçirilerek 1.5 ml ependorf tüplerine transfer edilir.

6- Ependorf tüpleri 14000 rpm de 10 sn santrifuj edilerek izole edilmiş olan hücre çekirdekleri tüpün dibine çöktürülür ve tüp içerisindeki solüsyon boşaltılır.

7- Küçük bir pelet şeklinde ependorf tüpün dibinde çöktürülmüş olan nukleuslar tüp içerisine ilave edilen 400 µl lik solüsyon (B) içinde çözülür.

8- Örnekler 37⁰C de 15-20 dakika bekletilir.

9- Örnekler flow sitometri cihazına yüklenerek analiz edilirler.

Analiz sonucu ortaya çıkan değerler

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

Denkleminde yerlerine yazılarak her örnekteki çekirdek DNA içeriği pikogram cinsinden bulunur.

3.2.4 KROMOZOMLARIN SAYIMI

Kromozom sayımı çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık gösteren *Bromus catharticus* 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.

3.2.4.1. Bitki kök uçlarının elde edilmesi

Bitki kök uçları hem saksılarda yetiştirilen ergin bitkilerden hem de tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen yeni sürgünlerden elde edilmiştir.

3.2.4.1.1 Ergin bitkilerden kök ucu eldesi

Kök ucu elde etmede kullandığımız bitkiler doğal koşullarda yetiştirilmiştir. Bu yüzden sitolojik çalışmalara uygun kök uçları ancak ilkbaharda (Nisan) elde edilebilmiştir. Kök ucu hasadı sabah 08.00 ile 09.00 arasında yapılmıştır. Saksıların dibinde beyaz görünümlü hızlı büyüyen kök uçları keskin bir makasla kesilerek temizlenmek amacıyla hemen soğuk su içerisine bırakılmıştır.

3.2.4.1.2 Tohumların çimlendirilmesiyle kök ucu eldesi

Her aksiyon için yaklaşık 10 tohum içerisinde suyla ıslatılmış çimlendirme kağıtları bulunan petri kaplarına aralıklı olarak yerleştirilmiş ve oda şartlarında bekletilmiştir. 24 saat sonra petri kapları buz dolabına transfer edilerek 4 °C de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra petri kapları tohumlar çimlenene kadar 20 °C de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Kök uçları 1-1.5 cm kadar büyüyünce hasad edilmiştir.

3.2.4.2. İlk işlem:

Her iki yöntem ile elde edilen kök uçları, içerisinde soğuk su (4 °C) bulunan küçük şişelere transfer edilmiş ve 24 saat bekletilmiştir.

3.2.4.3. Tespit:

Şişe içerisindeki su boşaltılarak üzerine yeni hazırlanmış olan Farmer çözeltilisi (3 kısım % 99 luk etanol + 1 kısım glacial asetik asit) doldurulmuştur. Kök uçları böylece tespit edilmiş ve uzun süre korunabilmiştir.

3.2.4.4. Feulgen Boyasının Hazırlanması

Kromozomların boyanmasında yapısında kristal halde bazik fuksin bulunan Feulgen boyası kullanılmıştır.

Feulgen boyası, Elçi (1982)'nin metoduna göre aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

- 1 g kristal haldeki bazik fuksin alınarak 8 cm çapında bir saat camı içerisinde ezilmiştir.
- Toz haline getirilmiş fuksin bazik 500 ml lik bir erlenmayere transfer edilmiştir.
- Toz halindeki bazik fuksin üzerine kaynamış 200 ml distile su yavaş yavaş dökülmüş ve bir cam çubuk yardımıyla sürekli karıştırılmıştır.

- Isısı 50°C'ye düşene kadar solusyonun karıştırılmasına devam edilmiştir.
- Boyaya 20 ml HCl ilave edilerek filtre kağıdı yardımıyla süzölmüştür.

Süzölen boyaya 2 g potasyum metabisölfite ($K_2S_2O_3$) eklenerek 2 dakika boyunca karıştırılmış ve kapaklı bir şişeye transfer edilerek 24 saat buzdolabında dinlendirilmiştir

3.2.4.5. Boyamanın Yapılması

%70'lik alkolden çıkarılan kök uçları birkaç kez saf su ile yıkanmıştır. Bu yıkama işlemleri sonrasında kök uçları 1 N HCl asit çözeltisi içerisinde 60°C'de 20 dk inkübe edilerek hidroliz edilmiştir. Hidroliz işlemleri sonrasında kök uçları tekrar saf su ile yıkayıp bir saat kadar Feulgen boyası içerisinde bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra kromozom boyanmasının daha iyi olabilmesi için kök uçları 15 dakika saf suda yıkanmıştır (Elçi, 1982).

3.2.4.6. Preparatların Hazırlanması

Preparat hazırlamak için; %45'lik asetik asitten bir damla lam üzerine konulup keskin bir jiletle kök ucunun koyu viole renk almış olan 1- 2 mm'lik uç kısmı kesilmiştir. %45'lik asetik asitten ok uçlu iğne yardımıyla bir damla alınarak kesilen kök ucunun üzerine getirilmiş ve sonra kök ucu bu damla içerisinde jilet yardımıyla iyice parçalanmıştır. Bu parçacıkların üzerine lamel kapatılarak bir elin başparmağı ile lamel oynatılmadan tutulup diğere ele alınan kurşun kalemin arka kısmıyla lamele hafifçe vurulmuştur. Böylece hem hücrelerin daha iyi dağılması sağlanmış hem de hücreler yassılaştırılarak mitotik evrelerin görünümü kolaylaştırılmıştır. Preparatın içinde kalan hava kabarcıklarını gidermek için, lamelin kenarına %45'lik asetik asit damlatılmış ve bu damla lamelin kenarında dolaştırılarak kabarcıkları giderilmiştir. Fazla asit kurutma kağıdı ile çekilmiştir. Daha sonra, preparat kurutma kağıdı arasına konulmuş ve lamelin her tarafına aynı şiddetle temas edecek şekilde başparmak ile kuvvetlice bastırılmıştır. Böylece, parçacıkların tek bir hücre tabakası haline gelmesi sağlanmıştır (Elçi, 1982).

3.2.4.7. Kromozomların fotoğraflanması

Hazırlanan slaytlar olympus marka BX 51 model ışık mikroskobuna yerleştirildikten sonra, hücrelerin fotoğrafları $10 \times 100 = 1000$ kez büyütülerek spot marka Rt Slider model CCD dijital kamera ile çekilmiştir.

3.2.5. Verilerin İstatistik Yöntemler İle İncelenmesi

B. catharticus aksesyonlarına ait çekirdek DNA içeriklerinin istatistiksel analizi 8 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. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Araştırmada kullanılan 83 *Bromus catharticus* aksesyonuna ait çekirdek DNA içeriği (genom hacmi) sonuçları Çizelge 4.1 de ve onlardan bazılarına ait flow histogramları Şekil 4.2 de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre araştırmada kullanılan *B. catharticus* aksesyonları arasında 2C çekirdek DNA içeriği 2 aksesyon (PI 138221 ve PI 655178) hariç 11.79 (PI 595116) pg ile 13.72 pg (PI 273869) arasında değişim göstermiştir. Yukarıda anılan iki aksesyonun çekirdek DNA içeriğinin (19.66 ve 19.41 pg) bariz olarak diğerlerinden farklı olması bu iki aksesyonu oluşturan bitkilerin *B. catharticus* türüne ait olmayıp başka bir *Bromus* türüne ait olduğunun göstergesidir.

Konu ile ilgili olarak yapılan literatür taramalarında, *B. catharticus* çekirdek DNA içeriği ile ilgili daha önce yapılmış tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmada Klos ve ark. (2009) *B. catharticus*'un sinonimi olan *B. valvidianus*, *B. willdenowii*, ve *B. stamineus* popülasyonlarının çekirdek DNA içeriklerini sırasıyla 14.35, 12.72 ve 13.79 olarak bildirmişlerdir. Bu bakımdan daha önce yürütülmüş olan bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar benzerlik göstermektedir. Klos ve ark. (2009) *B. catharticus* için elde ettiği minimum ve maksimum 2C çekirdek DNA içeriklerine ait değerler bu çalışmada elde edilen sonuçlardan sırasıyla yaklaşık olarak 0.7 ve 0.9 pg daha yüksek bulunmuştur. İki çalışmanın sonucu arasında gözlenen farklılığın nedeni, çalışmalarda kullanılan metot, cihaz ve standart bitkinin farklı olması söylenebilir. Benzer durumlar diğer bazı bitki türlerinde de gözlenmiştir (Tuna ve ark., 2001; Tuna ve ark. 2004 ve Eilam ve ark., 2007).

Çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık gösteren bazı bitkilerin kök uçlarından elde edilen meristem dokuları kullanılarak yapılan preparatlar üzerinde ışık mikroskobu ile mitoz kromozomu sayımlarında, tüm bitkilerin 42 kromozoma sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bu nedenle diğer bitkilerin kromozomlarını saymaya gerek kalmamış ve hepsinin 42 kromozom taşıdığı kabul edilmiştir. Diğer bir deyişle PI 138221 ve PI 655178 nolu aksesyonlar hariç bu çalışmada kullanılan tüm aksesyonların hexaploid olduğu anlaşılmıştır. Bu iki aksesyonun (PI 138221 ve PI 655178) hangi türe ait olduğu henüz belirlenmemiş olup, kromozomlarının sayımı da yapılmamıştır.

Her bir aksesyon için analiz edilen 8 bitkinin çekirdek DNA içerikleri genelde 0.04 ile 0.2'lik bir standart sapma ile birbirine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar popülasyonların saf olup başka varyetelere ait bitkileri içermediğini işaret etmektedir.

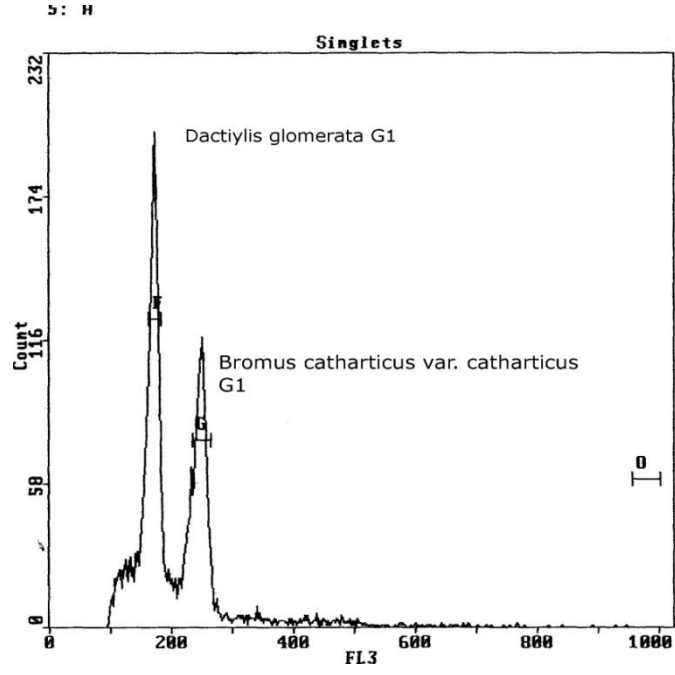
Çalışmada kullanılan *B. catharticus* aksesyonlarının en düşük çekirdek DNA içeriğine sahip olanı (11.79 pg) ile en yüksek (13.72 pg) çekirdek DNA içeriğine sahip olanı arasında 1.93 pg lık (%15) farklılık bulunmaktadır. Yapılan istatistiki analizler sonucunda çalışmada kullanılan aksesyonlar arasındaki çekirdek DNA içeriği farklılığının $P < 0.01$ düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1)

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. Angiospermiler arasında bu farkın yaklaşık olarak 2000 kat (0.063 pg ile *Genlisea margaretae* ve 125 pg ile *Fritillaria assyriaca*) olduğu bildirilmektedir (Bennett and Smith, 1976; Greilhuber et al., 2006). Bu nedenle, çekirdek DNA içeriği taksonomik ve evrim çalışmaları için son derece yararlıdır (Rees ve Walters, 1965; Price ve Bachmann 1975; Ohri, 1998; Özkan ve ark., 2003).

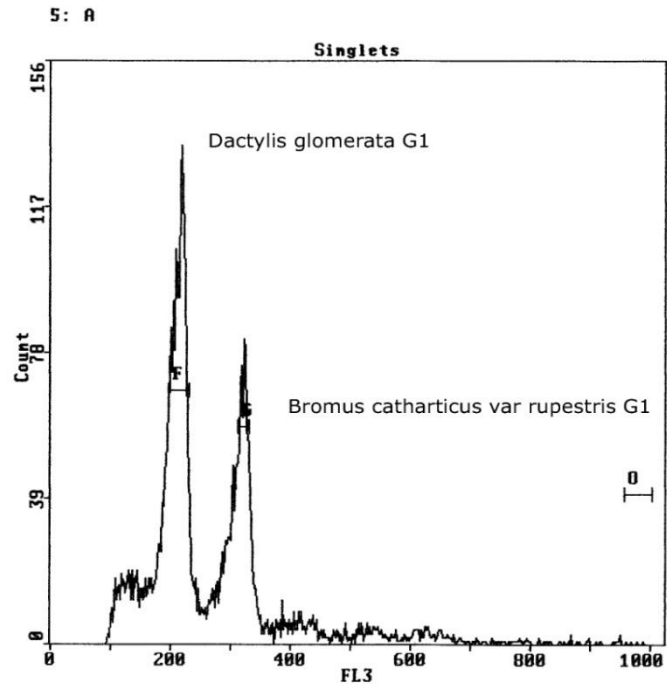
Bromus cinsinin *Ceratochloa* seksiyonu içerisinde yer alan *B. catharticus* kompleksi başlangıçta birkaç türe ayrılmaktaydı. Fakat daha sonra tür olarak kabul edilen bu taksonlar *B. catharticus* adı altında toplanmışlardır (Williams ve ark. 2011). Çalışma sonuçlarımız bu bilgiyi doğrulamakta ve *B. catharticus* kompleksinin büyük bir taksonomik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir. Aksesyonlar arasında çekirdek DNA içeriği bakımında gözlenen büyük farklılık aynı zamanda *B. catharticus* kompleksi içerisinde yeni türlerin (speciation) oluşum sürecinin başlamış olduğunu işaret etmektedir. Ancak varyasyonun süreklilik gösteren bir varyasyon olması bu farklılaşmanın henüz tamamlanmadığını ve halen devam eden bir süreç olduğunu işaret etmektedir. Diğer taraftan bu süreklilik gösteren varyasyon kompleksin içerisinde bulunan taksonların birbirleri ile hala kolayca melezlenebildiklerinden dolayı aralarında fazla miktarda genetik materyal değişimi yaptıkları söylenebilir.

Şekil 4.1. a. PI 595116 nolu aksesyon (11.79 pg), b. PI 368880 nolu aksesyonu (12.48 pg), c. PI 238021 nolu aksesyon (13.39 pg) , d. PI 138221 nolu aksesyonu (19.73pg).

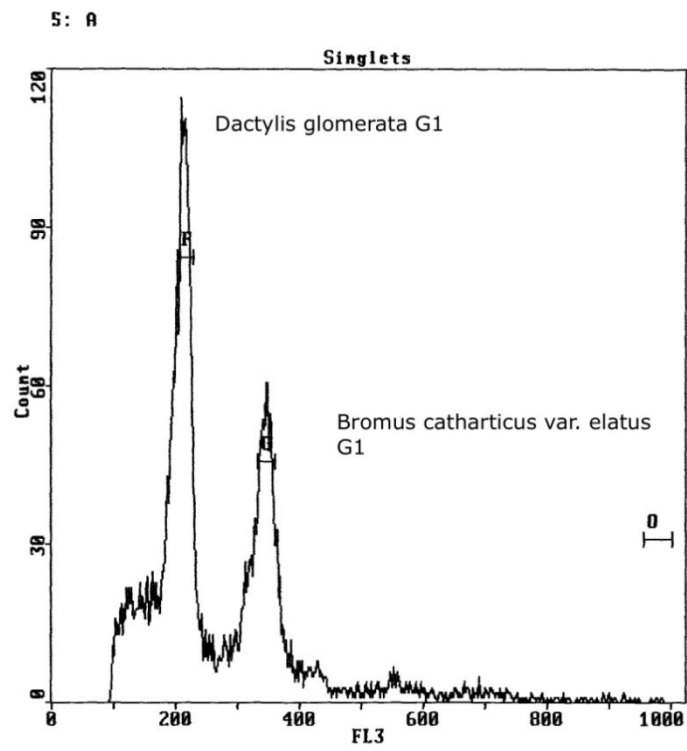
(a)



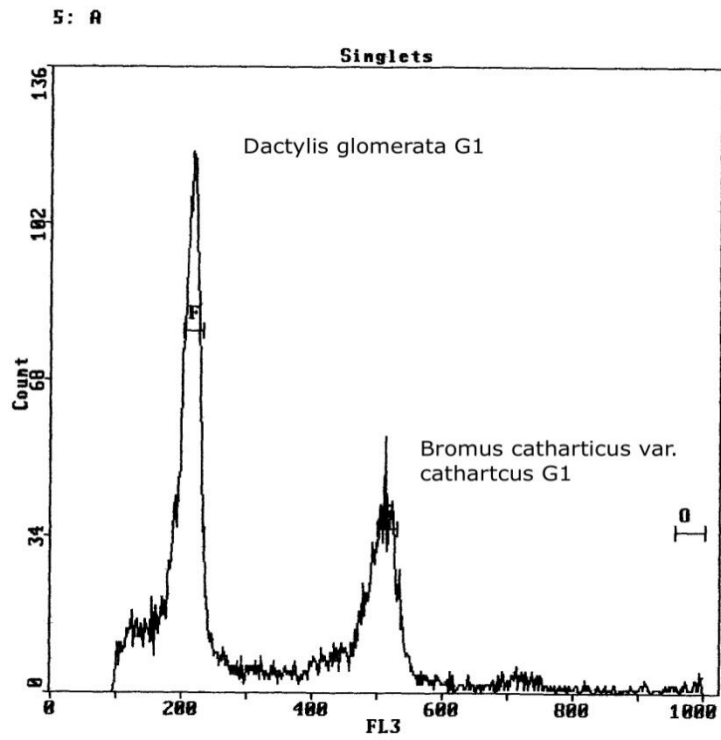
(b)



(c)



(d)



Çizelge 4.1 *Bromus catharticus* aksesyonlarının pg olarak ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri. (Aynı harfi taşıyan aksesyon ortalamaları arasındaki fark önemli değil iken farklı harfleri taşıyan çeşit ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir).

Aksesyon no	Tür Adı	DNA içeriği ortalaması	Standart Sapma	istatistik grub
595116	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,79</u>	<u>0,11</u>	E
595118	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,81</u>	<u>0,1</u>	E
413792	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,92</u>	<u>0,09</u>	DE
595122	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,92</u>	<u>0,22</u>	DE
ARBR01		<u>11,92</u>	<u>0,23</u>	DE
10432	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,93</u>	<u>0,28</u>	DE
595117	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,93</u>	<u>0,15</u>	DE
193144	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,94</u>	<u>0,04</u>	CDE
284108	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,96</u>	<u>0,1</u>	BCDE
316173	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,96</u>	<u>0,14</u>	BCDE
202360	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,97</u>	<u>0,08</u>	BCDE
338633	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,97</u>	<u>0,13</u>	ABCDE
595115	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>11,99</u>	<u>0,12</u>	zABCDE
316173	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12</u>	<u>0,35</u>	yzABCDE
442082	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12</u>	<u>0,13</u>	yzABCDE
377533	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,01</u>	<u>0,11</u>	yzABCDE
202693	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,03</u>	<u>0,17</u>	wyzABCD
304864	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,03</u>	<u>0,12</u>	vwyzABCD
292258	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,04</u>	<u>0,19</u>	vwyzABCD
195476	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,05</u>	<u>0,07</u>	vwyzABCD
283202	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,05</u>	<u>0,17</u>	uvwyzABCD
636668	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,05</u>	<u>0,15</u>	uvwyzABCD
ARBR 37		<u>12,05</u>	<u>0,15</u>	tuvwyzABCD
284110	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,06</u>	<u>0,16</u>	stuvwyzABCD
168564	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,08</u>	<u>0,08</u>	stuvwyzABCD
442083	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,08</u>	<u>0,27</u>	stuvwyzABCD
284788	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,1</u>	<u>0,1</u>	stuvwyzABCD
331172	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,1</u>	<u>0,15</u>	stuvwyzABCD
204157	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,14</u>	<u>0,16</u>	rstuvwyzABCD
316174	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,14</u>	<u>0,09</u>	rstuvwyzABCD
413792	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,14</u>	<u>0,16</u>	rstuvwyzABCD
442078	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,14</u>	<u>0,35</u>	rstuvwyzABCD
634279	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,14</u>	<u>0,22</u>	rstuvwyzABCD
ARBR12		<u>12,14</u>	<u>0,16</u>	rstuvwyzABCD
283204	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,15</u>	<u>0,11</u>	rstuvwyzABCD
442081	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,15</u>	<u>0,12</u>	rstuvwyzABC
197845	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,17</u>	<u>0,04</u>	qrstuvwyzAB

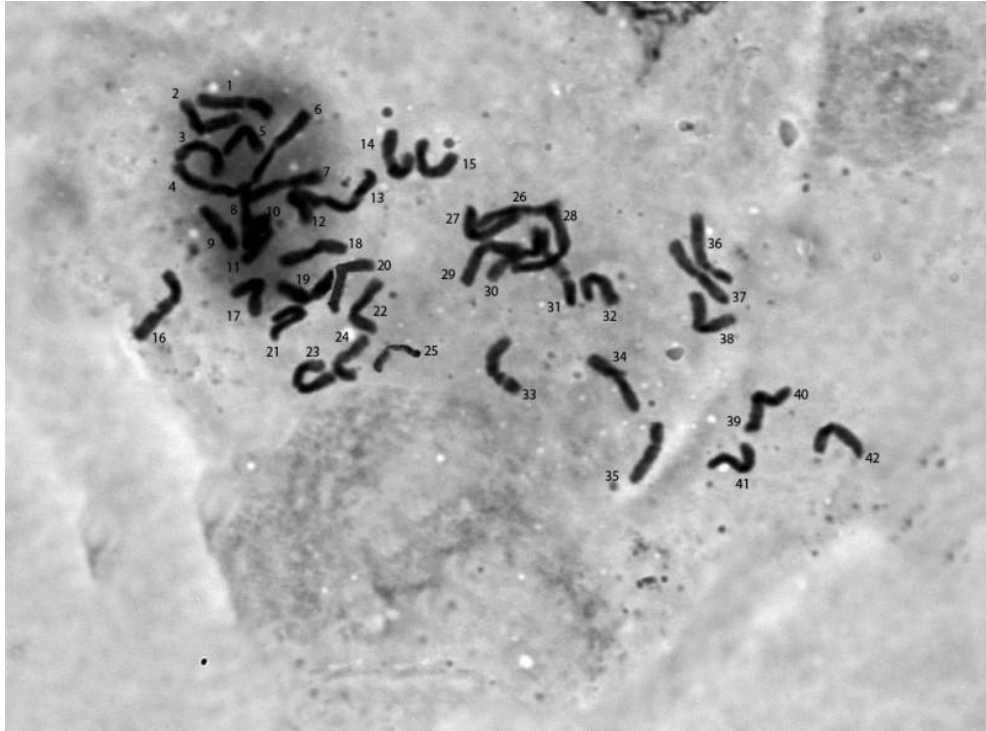
634280	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,18</u>	<u>0,16</u>	qrstuvwxyzAB
469233	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,19</u>	<u>0,19</u>	qrstuvwxyzAB
309955	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,2</u>	<u>0,13</u>	qrstuvwxyzA
197848	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,21</u>	<u>0,21</u>	pqrstuvwxyzA
217583	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,21</u>	<u>0,12</u>	pqrstuvwxyzA
283203	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,22</u>	<u>0,15</u>	pqrstuvwxyzA
618750	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,22</u>	<u>0,17</u>	pqrstuvwxyz
217593	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,23</u>	<u>0,21</u>	opqrstuvwxyz
ARBR06		<u>12,23</u>	<u>0,11</u>	nopqrstuvwxyz
365571	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,26</u>	<u>0,14</u>	nopqrstuvwxyz
595114	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,27</u>	<u>0,15</u>	mnoqrstuvwxyz
ARBR19		<u>12,27</u>	<u>0,09</u>	mnoqrstuv
187000	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,28</u>	<u>0,23</u>	mnoqrst
309957	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,29</u>	<u>0,15</u>	lmnopqrs
162779	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,3</u>	<u>0,23</u>	lmnopqrs
469243	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,3</u>	<u>0,18</u>	lmnopqrs
ARBR14		<u>12,31</u>	<u>0,16</u>	klmnopqr
284109	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,34</u>	<u>0,1</u>	jklmnopqr
365572	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,35</u>	<u>0,14</u>	jklmnopqr
595120	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,36</u>	<u>0,16</u>	ijklmnopq
331170	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,39</u>	<u>0,13</u>	ijklmnopq
366016	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,4</u>	<u>0,08</u>	ijklmnop
595128	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,44</u>	<u>0,1</u>	hijklmno
366015	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,46</u>	<u>0,03</u>	hijklmn
368027	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,49</u>	<u>0,07</u>	hijklm
368860	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,49</u>	<u>0,2</u>	hijkl
376930	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,52</u>	<u>0,12</u>	hijk
368026	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,55</u>	<u>0,16</u>	hij
371968	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,56</u>	<u>0,07</u>	hi
642838	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,6</u>	<u>0,11</u>	h
477987	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i>	<u>12,7</u>	<u>0,19</u>	g
219804	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,9</u>	<u>0,14</u>	fg
284111	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,95</u>	<u>0,19</u>	fg
316177	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>12,97</u>	<u>0,16</u>	efg
BAR 501		<u>13,06</u>	<u>0,14</u>	efg
219802	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>13,1</u>	<u>0,08</u>	efg
BARENO		<u>13,11</u>	<u>0,13</u>	ef
595119	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>13,12</u>	<u>0,13</u>	e
409138	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>13,19</u>	<u>0,12</u>	e
409137	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>13,2</u>	<u>0,08</u>	e
442077	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>13,22</u>	<u>0,12</u>	e
238251	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>elatus</i>	<u>13,44</u>	<u>0,18</u>	d
306289	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>13,6</u>	<u>0,12</u>	cd

273869	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>13,72</u>	<u>0,2</u>	c
655178	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>19,41</u>	<u>0,27</u>	b
138221	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>catharticus</i>	<u>19,66</u>	<u>0,15</u>	a

Çizelge 4.2. spss istatistik programı ile hesaplanan hata kareler ortalamaları ve önemlilikler

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Aksesyon	724,473	82	8,835	290,55	P<0,01
Hata	15,892	523	0,03		
Genel	740,365	605			

Şekil. 4.2. PI 273869 nolu aksesyonun mitoz kromozomlarının görünüşü (2n=42).



5. SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen çekirdek DNA analizi sonuçlarına göre çalışmada kullanılan 83 aksesyondan 2 tanesinin *B. catharticus* kompleksi içerisinde yer alan taksonlardan (alt tür veya varyete) olmayıp, başka bir *Bromus* türüne ait olduğu anlaşılmıştır. Bu 2 aksesyon hariç çalışmada kullanılan tüm aksesyonların heksaploid olduğu, ve aksesyonların saflıklarının yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca çekirdek DNA analizi sonuçlarına göre *B. catharticus* kompleksinin büyük bir taksonomik çeşitliliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı Trakya bölgesine uygun yeni *B. catharticus* çeşitlerinin geliştirilmesi amacıyla yapılacak olan melezleme çalışmalarında mayoz bölünme esnasında kromozom eşleşmelerinde probleme sebebiyet verebileceğinden ebeveynlerin çekirdek DNA içerikleri dikkate alınmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Arturi MJ ve ark. (1983). Variabilidad y correlaciones en cebadilla criolla. Revista de la Facultad de Agronomía de la Plata 59: 191-197.
- Arumuganathan K, Earle E D (1991). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Molecular Biology Reporter, 9, 229- 241.
- Aulcino M B ve Arturi MS (2002). Phenotypic Diversity In Argentinean Populations Of *Bromus catharticus* (Poaceae). Genetic And Environmental Components Of Quantitative Traits. New Zealand Journal Of Botany 40(2): 223-234.
- Belesky DP, Ruckle JM ve Abaye A O (2006). Seasonal distribution of herbage mass and nutritive value of Prairiegrass (*Bromus catharticus* Vahl) Grass and Forage Science Volume 62: 301–311.
- Bennett MD, Smith JB (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B 274:227-274.
- Cladera JL ve Pahlen A Von der (1984). Genetic and population study of esterases on *Bromus catharticus* Vahl. Boletín de Genética del Instituto Fitotécnico de Castelar 12: 25-30.
- Débora I, Puecher, Claudio G. Robredo, Raúl D. Rios ve Pedro Rimieri(2001) Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. populations and cultivars with RAPD and AFLP markers. EUPHYTICA Volume 121, Number 3, 229-236,
- Eilam T, Anikster Y, Millet E, Manisterski J, Sagi-Assif O, Feldman M (2007). Nuclear DNA amount in diploid Triticeae species. Genome, 50 :1029-1037.
- Elçi Ş (1982). Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, 165s, Elazığ
- Eteve A (1982). The Main Characteristics Of *Bromus catharticus* In Lates Technical Information On *Bromus catharticus*. Pp. 1AE-8AE. Bureau de Promotion de Varietes Fourragenes, Paris.
- Eteve G, Hiroux G, Catoir JM (1979). Relationship between sugar content of different varieties of pea (*Pisum sativum*) and their winter adaptation. Annales de l'Amelioration des Plantes v. 29(5) p. 557-562
- Falloon RE (1976). Effect of infection by *Ustilago bulata* on vegetative growth of *Bromus catharticus*. New Zealand Journal of Agricultural Research 19, 249-254.
- Falloon RE (1979). Further studies on the effects of infection by *Ustilago bulata* on vegetative growth of *Bromus catharticus*. New Zealand Journal of Agricultural Research 22, 621-626.

- Falloon RE ve Rolston MP (1986). Heat smut of prairie grass controlled by treating seed with ergosterol biosynthesis inhibitor fungicides. Proceedings of the 39th New Zealand Weed and Pest Control Conference, 54-59.
- Fischer GW ve Holton CS (1957). Biology and Control of The Smut Fungi, 622pp. The Ronald Press, New York.
- Frame J ve Morrison MW (1988). Herbage productivity of prairie grass, reed canary-grass and phalaris. Grass and Forage Science Volume 46, Issue 4, pages 417–425.
- Fraser TJ (1982). Evaluation of grasslands matua prairie grass and grasslands maru phalaris wiht and without lecerne in canterbury. New Zealand Journal of exprimental agriculture 10:235-237.
- Garcia M ve Arturi M (1992). Variabilidad Fenotipica En Progenies De *Bromus Catharticus* Vahl. Originadas De Flores Chasmogamos Y Cleistogamos. Revista De La Facultad De Agronomia De La Plata 68: 27-33. Argentina.
- Garwood EA, Tyson KC ve Sinclair J (1979). Use of water by six grass species. 1. Dry-matter yields and response to irrigation. The Journal of Agricultural Science 93: 13-24
- Garwood EA ve Sinclair J (1979), Use of water by six grass species. 2. Root distribution and use of soil water. The Journal of Agricultural Science , 93: 25-35.
- Greilhuber J, Borsch T, Müller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W (2006). Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. Plant Biology 8: 770–777.
- Gutierrez HF ve Pensiero JF (1998). Sinopsis de las especies arhentinias del genoro Bromus. Darwiniana 35:75-192.
- Hume DE (1991 a). Effect of cutting on preduction and tillering in prairie grass compared with two ryegrass species. 1. Vegetative plants annals of botany 68 1991
- Hume DE (1991 b). Effect of cutting on preduction and tillering in prairie grass compared with two ryegrass species. 2. Reprductive plants annals of botany 68 1991
- Hume DE ve Lucas R J (1987). Effects of winter cutting management on growth and tiller numbers of six grass species, vol. 15, pp. 17-22
- Matthei O (1986). El genero Bromus L. (Poacea) en chile. Goyana 43: 47-110.
- Monica AU ve Arturi MJ (2008). Regional variation in argentinean populations of *Bromus catharticus* as measured by morphological divergence associated with environmental conditions. Analel del jardin bornico de Madrid vol 65:

- Morant A (1990). Determinacion del percentafe de fecundacion cruzada en cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.) unpublised MSc thesis, Universidad Nacional de Rosario, INTA Pergamino, Argentina.
- Mouchet C, Vecten J, Barloy J (1981). The set-up of the production cost of milk in the farms of "Ille-et-Vilaine". The part of the forage system [France]. Fourrages (no.81) p. 57-90
- Naronjo CA (1985). Estudios sitogenicos, bioquimicas y sistematicas en algunas especies americanas del genor Bromus (Gramineae). Unpublised PhD thesis, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina.
- Ohri D. (1998). Genome size variation and plant systematics. Ann. Bot., 82 (Suppl. A.): 750-812.
- 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, Bachmann K (1975). DNA content and evolution in the *Microseridinae*. Am. J. Bot., 62: 262-267.
- Rees H ve Walter MR (1965). Nuclear DNA and the evolution of wheat. Heredity. 20:73-82.
- Pahlen AW Von der. (1986). Evaluation of genetic variability of some native forage plants. Buletin de Genetica del Instituto Fitotecnico 14: 1-6.
- Parneix P (1981). Behaviour of a new fodder species *Bromus willdenowii* (Bellegarde cultivar) in the West of France. Sciences Agronomiques Rennes . (no. 2) p. 25-36
- Pavlick L (1995). Bromus L. Of North America. Royal British Colombia Museum, British Colombia, Canada.
- Pistrole S (1996). Reproductive behaviour of *Bromus catharticus* Vahl in natural and cultivated populations journal of genetic and breeding 50 1995
- Pistrole S, Wolf R, ve Bazzigalupi D (1999). Dormancy and seed germination in natural populations of *Bromus catharticus* Vahl. (cebadilla criolla). Journal of genetics and breeding 53: 47-55.
- Puecher DÍ ve ark. (2000). Genetic Varyabilty Measures Among *Bromus Catharticus* Vahl. Populations And Cultivars With RAPDS and AFLP markers. Euphytica 121: 229-236.
- Sangakkara R ve Roberts E (1985). Competition between grasses during establishment and early growth. I: Competition between seedlings grown in mixtures from seed. Zeitschrift für Acker- und Pflanzenbau 1985, vol. 155, pp. 51-59

- Sangakkara R, Roberts E, Watkin BR (1985). Relationships between seed characters and seedling growth of three herbage grasses. *Seed Science and Technology* v. 13(1) p. 219-225
- Sangakkara UR ve Roberts E (1985). Competition between grasses during establishment and early growth. *I.Z. Acker-und Pflanzenbau* 155, 51-59
- Szpiniak B ve ark. (1995). Analisis de la variacion de *Bromus catharticus* Vahl. en ambientes subhmedas secos de la replica Argentina con fires de mejoramiento. *Mendeliana* 11: 84-89.
- Tuna M, Khadka DK, Shrestha MK, Arumuganathan K, Golan-Goldhirsh A (2004) Characterization of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations of Thrace Region of Turkey based on ploidy and DNA polymorphisms. *Euphytica*, 135: 39-46.
- Tuna M, Vogel KP, Arumunagathan K, Gill KS. (2001). DNA Contents and Ploidy Determination of Bromegrass Germplasm Accessions by Flow Cytometer. *Crop Science* 41:1629 – 1634.
- Williams WM, Stewart AV, ve Williamson M L (2011). Genomics and Breeding Resources, Millet and Grasses. In *Wild Crop Relatives* edited by C. Kole. P. 15-30.
- Wilson GF (1977). Grasslands matua prairie grass. *Jorunal of the New Zealand Institute of Agricultural Science* 11:47-48.
- Wolff R ve ark (1996). Reproductive behavior of *Bromus catharticus* Vahl. (Cebadilla criolla) in natural and cultivated populations. *Journal of Genetics and Breeding* 50: 121-128.

TEŞEKKÜR

Bu tezin y¼r¼t¼lmesi sırasında bana sağladıkları her t¼rl¼ maddi ve manevi destek için dayılarım Sadullah Talat B¼y¼k¼nal ve Zekeriya B¼y¼k¼nal'a derin minnetlerimi sunmak vazifemdir.

Bu çalıőmayı y¼r¼t¼rken yaptıkları ilham verici eleőtirileri ve moral verici destekleri nedeniyle sayın hocam Yrd. Doç. Dr. İlker Nizam'a, Biyolog Sięnem Öney'e, Dr. Özg¼r Saęlam'a ve Araő. Gör. Serdar Polat'a yürekten teőekk¼r ederim.

Tezin yazımında sağladıkları rahat ortam ve gösterdikleri derin hoőt¼r¼ sebebiyle Böl¼m Baőkanım sayın Yrd. Doç. Dr . Devrim Oskay'a gön¼lden teőekk¼r ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Bu tezi hazırlayan Eyüp Erdem Teykin , İstanbul Bakırköy doğumludur. İlk ve orta öğretimini bu ilçede yapmış, Ataköy Lisesini bitirmiştir.

Lisans öğretimini Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde tamamlamıştır.

2008 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde araştırma görevlisi olan Eyüp Erdem Teykin, 2010 yılından beri Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünde görevine devam etmektedir.