

**BAZI *ALLIUM* TÜRLERİNDE
FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON
VE FARKLI BOYOMA TEKNİKLERİ
İLE KARYOTİP ANALİZİ**

Farzaneh PORDEL MARAGHEH

**Doktora Tezi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Bilim Dalı
Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU
2019
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI *ALLIUM* TÜRLERİNDE FLORESAN İN SİTU
HİBRİDİZASYON VE FARKLI BOYOMA TEKNİKLERİ İLE
KARYOTİP ANALİZİ

Farzaneh PORDEL MARAGHEH

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her Hakkı Saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**BAZI ALLIUM TÜRLERİNDE FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON VE
FARKLI BOYOMA TEKNİKLERİ İLE KARYOTİP ANALİZİ**

Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU danışmanlığında, Farzaneh PORDEL MARAGHEH tarafından yapılan bu çalışma/...../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı – Tahıllar ve Yemeklik Baklagiller Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/ oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan :

İmza :

Üye :

İmza :

Üye :

İmza :

Üye :

İmza :

Üye :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu/...../..... tarih ve/..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI *ALLIUM* TÜRLERİNDE FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON VE FARKLI BOYOMA TEKNİKLERİ İLE KARYOTİP ANALİZİ

Farzaneh PORDEL MARAGHEH

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

Birçok kültür ve süs bitkisi içeren *Allium*'un karyotipleri cins olarak nisbeten düşük düzeyde incelenmiştir. Cinsin karyotip yapısı hakkındaki bilgilerimizi artırmak için rRNA genlerinin kromozomal organizasyonu ve CMA/DAPI bantları incelenmiştir. Floresan in situ hibridizasyonda 5S ve 35S rDNA problemleri ile bantlama yöntemleri (gümüş boyama ve CMA3 / DAPI boyama) kullanılarak üç *Allium* L. kültür türünün karyotip analizi yapılmıştır. Analiz edilen *Allium* türleri, üç farklı temel kromozom sayısı ($x = 7, 8, 9$) ve üç farklı ploidi seviyesi (diploid, triploid ve tetraploid) göstermiştir. Çalışmamızda, rDNA bölgelerinin kromozomal organizasyonu, bu üç tür için (*A. oreophilum*, *A. sphaerocephalon*, *A. porrum*) ilk kez rapor edilmiştir. Analiz edilen *Allium* türleri içerisinde rDNA bölgelerinin sayısı ve lokalizasyonu bakımından yüksek düzeyde polimorfizm gözlenmiştir. 35S rDNA bölgelerinin floresan in situ hibridizasyon desenleri diploid türlerin 5S rDNA'larına göre daha polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Benzer kromozomlara sahip birkaç grup poliploid türler içerisinde rDNA'ya sahip kromozomlar arasından ayırt edilmiştir. Her bir grup otopoliploid durumlarının kökeni olduğu düşünülen *A. sphaerocephalon* L türünde olduğu gibi üç kromozom veya *A. porrum* L'de olduğu gibi dört kromozoma sahiptir. Analiz edilen türlerin genomlarında, sadece bazı 35S rDNA bölgelerinin transkripsiyonel olarak aktif olduğu gözlenmiştir. Florokrom bantlama, CMA3+ bantlarının analiz edilen tüm türlerde 35S rDNA bölgeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. rDNA dizileri, nükleolar düzenleyici bölgeler (NOR'lar) ve CMA / DAPI bantları, analiz edilen *Allium* türleri içerisinde iki ile beş çift homolog kromozomların ayırt edilmesine müsaade eden çok iyi kromozom işaretçileri olduğu teyit edilmiştir. rDNA, NOR bölgelerinin pozisyonları ve CMA / DAPI bantlarının sayıları kullanılarak elde edilen karyotipler çalışmamızda incelediğimiz türlerinin birbirlerinden kolaylık ile ayırt etmişler taksonlar arasında yüksek farklılıklar ortaya koymuşlardır.

2019, 80 sayfa

Anahtar Sözcükler: rDNA, *Allium*, Kromozom, FISH, CMA3 / DAPI bantlaması, NOR

ABSTRACT

Phd. Thesis

USAGE DIFFERENTIAL STAINING TECHNIQUES AND FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION IN *ALLIUM* SPECIES KARYOTYPE ANALYSES

Farzaneh PORDEL MARAGHEH

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops
Division of Cereals and Edible legumes

Supervisor: Prof. Dr. Kamil HALILOĞLU

The karyotypes of *Allium*, a genus that comprises many crops and ornamental plants, are relatively poorly studied. To extend our knowledge on karyotype structure of the genus, the chromosomal organization of rRNA genes and CMA/DAPI bands was studied. Fluorescence in situ hybridization using 5S and 35S rDNA probes and banding methods (silver staining and CMA3/DAPI staining) were used to analyze the karyotypes of three cultivated *Allium* L. species. Analyzed *Allium* taxa revealed three different basic chromosome numbers ($x = 7, 8, 9$) and three different ploidy levels (diploid, triploid, and tetraploid). The rDNA sites chromosomal organization is reported the first time for the three species (*A. oreophilum*, *A. sphaerocephalon*, *A. porrum*). The *Allium* species that were analyzed showed a high level of interspecies polymorphism in the number and localization of the rDNA sites. The fluorescence in situ hybridization patterns of 35S rDNA sites were more polymorphic than those of the 5S rDNA in the diploid species. Several groups of similar chromosomes could be distinguished among the chromosomes that had rDNA sites in the polyploid species. Each of the groups had three chromosomes (triploid *A. sphaerocephalon* L.) or four chromosomes (tetraploid *A. porrum* L.) suggesting their autopolyploid origin. In the genomes of analyzed species, only some of the 35S rDNA sites were transcriptionally active. Fluorochrome banding revealed that the CMA3 + bands were associated with the 35S rDNA sites in all of the species that were analyzed. The rDNA sequences, nucleolar organizer regions (NORs), and CMA/DAPI bands are very good chromosome markers that allowed to distinguished from two to five pairs of homologous chromosomes in analyzed *Allium* species. The karyotypes of the studied species could be clearly distinguished by the number and position of the rDNA sites, NORs, and CMA/DAPI bands, which revealed high interspecific differentiation among the taxa.

2019, 80 pages

Keywords: rDNA, *Allium*, Chromosomes, FISH, CMA3/DAPI banding, NOR

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, beş yıl boyunca değerli bilgilerini bizlerle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam; Sayın Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen hocalarım Bozena Kolano ve Robert Hasterok Polonya, silesia üniversitesinde ve çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olanlar değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Feulgen Boyama.....	18
3.3. Gümüş Boyama	20
3.3.1. Slaytların hazırlanması	20
3.3.2. Gümüş boyama.....	20
3.4. DAPI ve CMA3 Boyama	23
3.4.1. Slaytların hazırlanması	23
3.4.2. DAPI ve CMA3 reaksiyonu	23
3.5. Flöresan <i>in situ</i> Hibridizasyonu (FISH)	23
3.5.1. Slaytların hazırlanması	23
3.5.2. FISH analizi.....	23
3.5.2.a. Probların hazırlanması	23
3.5.2.b. Nükleotidlerin hazırlanması	24
3.5.2.c. dATP nukleotidi	24
3.5.2.d. dCTP nukleotidi	24
3.5.2.e. dGTP nukleotidi	24
3.5.2.f. dTTP nukleotidi	24
3.5.2.g. Prob DNA'nın işaretlenmesi	25
3.5.2.h. Probe DNA 25srDNA	25
3.5.2.i. Probe DNA 5srDNA	26

3.5.2.i. Denaturasyon ve hibridizasyon karışımı	26
3.5.2.j. Yıkama işlemi	29
3.5.2.k. Probun immüno belirlenmesi	29
3.5.2.l. Slaytların görsel incelenmesi ve fotoğraflarının çekilmesi:	31
3.6. Solusyonların Hazırlanması	32
3.6.1. 8-hidroksikinolin	32
3.6.2. 5N HCl	32
3.6.3. Fiksasyon solüsyonu.....	32
3.6.4. 10 mM Sitrik tampon	33
3.6.5. Enzim solusyonlarının hazırlanması	33
3.6.6. Gümüş nitrat solüsyonu.....	33
3.6.7. 0.01 M Borat Tamponu (pH:9).....	33
3.6.8. McIlvanie tampon (pH:7)	33
3.6.9. 1M MgCl ₂	34
3.6.10. DAPI Stok solüsyon	34
3.6.11. DAPI (1:10) solüsyonu.....	34
3.6.12. DAPI+vectashield solüsyonu	34
3.6.13. Kromo stok solüsyonu.....	34
3.6.14. CMA+3 çalışma solüsyonu	34
3.6.15. 20×SSC.....	35
3.6.16. 2×SSC.....	35
3.6.17. 0.1SSC.....	35
3.6.18. Tween /4×SSC.....	35
3.6.19. Formamide-Sigma F-7503	35
3.6.20. %10 SDS (sodium dodecyl sulphate)	36
3.6.21. %50 dekstran sulfat (DS)	36
3.6.22. Engelleme solusyonu.....	36
3.6.23. RNase için tampon	36
3.6.24. RNase	37
3.6.25. 10× PBS buffer, pH=7	37
3.6.26. FITC- conjugated anti-digoxigenin (Roche-1207741).....	37
3.6.27. FITC- conjugated Anti-Sheep(Jackson immunoresearch 313-096-003).....	37

4. ARASTIRMA BULGULARI	38
4.1. Feulgen Boyama	38
4.1.1. <i>Allium oreophillum</i>	38
4.1.2. <i>Allium shearocephalon</i>	40
4.1.3. <i>Allium porrum</i>	43
4.2. GÜMÜŞ boyama	45
4.2.1. <i>Allium oreophillum</i>	46
4.2.2. <i>Allium shearocephalon</i>	49
4.2.3. <i>Allium porrum</i>	51
4.3. DAPI ve CMA3	53
4.3.1. <i>Allium oreophillum</i>	53
4.3.2. <i>Allium shearocephalon</i>	55
4.3.3. <i>Allium porrum</i>	57
4.4. FISH	60
4.4.1. <i>Allium oreophillum</i>	60
4.4.2. <i>Allium sphaerocephalon</i> :	62
4.4.3. <i>Allium porrum</i>	64
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	67
KAYNAKÇA	73
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AP	Alkali fosfataz
BCIP	Bromo-4-kloro-3-indolilfosfat
DAB	Diaminobenzidin
DIG-dUTP	Digoksygenin-11-Dutp
DS	Dextran sulfate
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
GISH	Genomic <i>in situ</i> hybridization
ISH	<i>in situ</i> hybridization
NBT	Nitro-mavi tetrazolyum
NOR	nuclear organizing region
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
POD	Peroksidaz
rDNA	ribozomal DNA
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribozomal RNA
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SSC	Salin sodium citrate
SWD	Steriled distilled water

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>Allium porrum</i> tohumları nemlendirilmiş filtre kağıdı üzerine ekimleri	17
Şekil 3.2. <i>Allium sphaerocephalon</i> ve <i>Allium oreophilum</i> yumruları çimlendirme için saksılara dikimi.....	18
Şekil 3.3. A: 8-hidroksikinolin solüsyonu içerisinde kök uçları B. Schiff'in reaktifi içerisinde kök uçları C. Kök ucu örnekleri lam üzerine yayılarak asetik asit damlası yardımı ile ezilmiştir D. slaytlar mikroskop altında incelenmesi için, lamel soğuk uygulaması	19
Şekil 3.4. A: Slaytlar borat tamponunda, B.gümüş nitrat solusyonu uygulaması, C. Naylon tülün slaytlar üzerine kapatılması D slaytların üzerine naylon tül örtülmüş hali.....	21
Şekil 3.5. A: Slaytların nemli ortama konulması B. Slaytların nemli ortamda inkübasyonu C. Slaytların saf su ile yıkanması.....	22
Şekil 3.6. Solüsyonlar tup içinde sıcak su banyosunda	27
Şekil 3.7. Slaytlar ısıtma tablası üzerindeki görüntüsü.....	28
Şekil 3.8. Slaytlar plastik örtü ile kaplanmış ve nemli bir ortamda inkübe edilmiştir.....	28
Şekil 3.9. Slaytlar sırası ile yıkanma kabında	29
Şekil 3.10. Slaytlar üzerine reaksiyonu durdurmak için durdurma solusyonu eklenmesi.....	30
Şekil 3.11. Slaytların üzerine anti body-anti sheep ve durdurma ajanı eklenmesi	30
Şekil 3.12. Slaytlar sıcak su banyosunda bekletilmeleri.....	31
Şekil 3.13. 8-hidroksikinolin şişede foil ile kapatılıp ve karıştırıcı üzerinde bekletilir.	32
Şekil 3.14. Formamide-Sigmanin hazır şekli.....	36
Şekil 3.15. FITC- conjugated anti-digoxygenin	37
Şekil 4.1. <i>A. oreophillum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları ($2n=2x=16$)	39
Şekil 4.2. <i>A. oreophillum</i> türünde Feulgen boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri	40
Şekil 4.3. <i>A.sphaerocephalon</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları.....	41

Şekil 4.4. <i>A. shearocephalon</i> türünde Feulgen boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri	42
Şekil 4.5. <i>A. porrum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları.....	43
Şekil 4.6. <i>A. porrum</i> türünde Feulgen boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri.....	45
Şekil 4.7. <i>A. oreophillum</i> türünün gümüş nitrat ile boyanmış mitotik metafaz kromozomları	46
Şekil 4.8. <i>A. oreophillum</i> türünde Gümüş boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri.....	47
Şekil 4.9. <i>A. shearocephalon</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları	49
Şekil 4.10. <i>A. shearocephalon</i> türünde Gümüş boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri.....	50
Şekil 4.11. <i>A. porrum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları.....	51
Şekil 4.12. <i>A. porrum</i> türünde Gümüş boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri	52
Şekil 4.13. <i>A. oreophillum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları	53
Şekil 4.14. <i>A. oreophillum</i> türünde A) CMA3 ve B) DAPI boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri	55
Şekil 4.15. <i>A. shearocephalon</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları	55
Şekil 4.16. <i>A. shearocephalon</i> türünde A) CMA3 ve B) DAPI boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri	57
Şekil 4.17. <i>A. porrum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları.....	57
Şekil 4.18. <i>A. porrum</i> türünde A) CMA3 ve B) DAPI boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri	60
Şekil 4.19. <i>A. oreophillum</i> türünün FISH metodu ile boyanmış mitotik metafaz kromozomları ($2n=2x=16$), □ 25S rDNA ve □ 5S rDNA olarak kullanılır	61
Şekil 4.20. <i>A. oreophillum</i> türünde FISH metodu ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri	61
Şekil 4.21. <i>A. sphaerocephalon</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları ($2n=3x=24$), □ 25S rDNA ve □ 5S rDNA olarak kullanılır	63

Şekil 4.22. <i>A.sphaerocephalon</i> türünde FISH metodu ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri.....	63
Şekil 4.23. <i>A.porrum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomları $2n=4x=32$, $\square$ 25S rDNA ve $\square$ 5S rDNA olarak kullanılır.....	65
Şekil 4.24. <i>A.porrum</i> türünde FISH metodu ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Prob DNA 25srDNA hazırlamasında kullanılan solusyonlar ve miktarları.....	25
Çizelge 3.2. Prob DNA 5srDNA hazırlamasında kullanılan solusyonlar ve miktarları.....	26
Çizelge 3.3. Denaturasyon ve hibridizasyon aşamasında kullanılan solusyonlar ve miktarları.....	27
Çizelge 3.4. Kullanılan floresan renkler ve uyarma ve emisyon miktarları	31
Çizelge 4.1. <i>Allium oreophillum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri	39
Çizelge 4.2. <i>Allium shearocephalon</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri.....	42
Çizelge 4.3. <i>Allium porrum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri	44
Çizelge 4.4. <i>Allium oreophillum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri	48
Çizelge 4.5. <i>Allium shearocephalon</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri.....	50
Çizelge 4.6. <i>Allium porrum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri	52
Çizelge 4.7. <i>Allium oreophillum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri	54
Çizelge 4.8. <i>Allium shearocephalon</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri.....	56
Çizelge 4.9. <i>Allium porrum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri	59
Çizelge 4.10. <i>Allium oreophillum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların boy özellikleri.....	62
Çizelge 4.11. <i>Allium sphaerocephalon</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların boy özellikleri.....	64

Çizelge 4.12. <i>Allium porrum</i> türüne ait mitotik metafaz kromozomların boy özellikleri.....	66
--	----

1. GİRİŞ

Allium L. cinsi 800'den fazla tür içermektedir (Fritsch *et al.* 2010) ve monokotiledon cinsinin en geniş üyesidir. *Allium* 15 monofilik alt cinsten oluşmaktadır (Friesen *et al.* 2006). Bu çalışmada analiz edilen türler, *Allium* alt cinsine ait *A. porrum L.*, ve *A. sphaerocephalon L.* türleri ile *Porphyroprason* alt cinsine ait *A. oreophilum C.A. Mey* türleridir. *Allium*, kuru subtropik bölgelerden Holartik bölgeye kadar uzanan geniş bir alana yayılmış değişken bir gruptur (Friesen *et al.* 2006; Li *et al.* 2010;). Birçok *Allium* türü içerisinde ekonomik olarak önem taşıyan, soğan (*A. cepa L.*), demet soğan (*A. fistulosum*), pırasa (*A. porrum*), sarımsak (*A. sativum*), ve *A. moly L.* veya *A. sphaerocephalon L.* (Fritsch *et al.* 2010) gibi birçok süs bitkisini de kapsamaktadır. Bu cins, özellikle yaşam formu (yumru veya rizom) ve ekolojik habitus gibi farklı morfolojik karakterler açısından çok büyük varyasyon göstermektedir (Stearn 1992). Bununla beraber, *Allium* sitogenetik düzeyde yüksek çeşitliliğe sahiptir. Örneğin genom büyüklüğü açısından bazı türler arasında 10.64 kat fark bulunmaktadır (1C değeri *A. altynolicum* N. Friesen'de 7 pg iken bu değer *A. validum* S.Watson'da 74.50 pg'dır) (Ohri *et al.* 1998; Ricroch *et al.* 2005), ayrıca türler arasında kromozom sayısında da çeşitlilik gözlenmektedir. *Allium* üç farklı temel kromozoma sahiptir ve bunlar, $x = 7, 8$ (çoğu türlerde gözlenir) ve $x = 9$ 'dur (Jones and Rees 1968). Diploid formları hariç bu cins, birçok poliploid türü içerir ve ploidi düzeyindeki çeşitlilik $2x$ ile $10x$ aralığında değişmektedir (Bennett *et al.* 2000; de Sarker *et al.* 1997). Poliploitlerin çoğunun kaynağı bilinmese de, allopoliploid (örn. *A. sacculiferum* Maxim.) ve otopoliploid (örn. *A. porrum*) türler bulunmaktadır (Stack and Roelofs 1996; Shibata and Hizume 2002; Seo *et al.* 2007) ayrıca *Allium* $\times$ *cornutum* örneğinde olduğu gibi üç ebeveyn kaynaklı türlerde yer almaktadır (Fredotovic *et al.* 2014).

Moleküler sitogenetik çalışmalar sadece birkaç tür için gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalar başlıca *A. cepa*, *A. fistulosum* ve *A. wakegi* Araki (*A. cepa* ve *A. fistulosum* arasındaki bir diploid hibrit; Shibata and Hizume 2002) üzerinde yapılmıştır. Ardışık ve farklı yerlerde bulunan tekrarlı bölgelerin dizilerinin kromozom üzerindeki yerleri, bu türlerin ıslah programları, evrimsel analizler ve karyotip yapılarının belirlenmesinde

etkin kromozom işaretçileri olarak değerlendirilmektedir (Do *et al.* 2001; Shibata and Hizume 2002; Fajkus *et al.* 2016; Kirov *et al.* 2017). Birkaç *Allium* türünün rDNA bölgelerinin kromozomal desenleri veya C-bantlama desenleri analiz edilmesine rağmen, çoğunlukla *Allium* türleri üzerinde yapılan karyolojik çalışmalar, kromozomların sayısı ve morfolojisi üzerine odaklanmıştır (Murin 1964; de Sarker *et al.* 1997; Dolatyari *et al.* 2018). Bu durum, *Allium* cinsinin karyotip yapısı hakkında daha fazla açıklamalar getirmeye ihtiyaç olduğunu göstermektedir. rDNA dizilişlerinin “house-keeping” genleri olarak çok fazla bulunması ve nisbeten korunmuş yapıları, özellikle model olmayan organizmalarda çok fazla kullanılan kromozomal işaretçiler yapmaktadır (Volkov *et al.* 2004; Roa and Guerra 2015). 18S-5.8S-25S (35S) ve 5S ribozomal RNA’ları kodlayan nüklear ribozomal RNA genleri, korunan gen bölgelerini ve bir veya birkaç lokusta ardışık olarak dizilim gösteren transkript bölgeleri ve farklı düzeyde transkript olan bölgeleri ihtiva etmektedir (Alvarez and Wendel 2003; Volkov *et al.* 2004). 35S rDNA dizileri, nükleolar organizatör bölgelerinde (NORs) bulunmaktadır buna karşılık 5S rDNA’nın ardışık dizileri çoğunlukla NOR bölgelerinden bağımsız olarak yer almaktadır (Volkov *et al.* 2004; Heslop-Harrison and Schwarzacher 2011). 5S ve 35S rDNA dizileri ile floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi bir çok bitki türünde kromozomların belirlenmesinde kullanışlı bir işaretleyici olarak hizmet vermektedir ve birçok bitki türünde filogenetik çalışmalar ve kromozomların fiziksel haritalarının çıkarılmasında kullanılmaktadır (Hasterok *et al.* 2006; Jang *et al.* 2013; Kolano *et al.* 2013; Roa and Guerra 2015). FISH yöntemi ile ribozomal DNA’nın haritalanması, çeşit, ıslah hatları ve gen kaynaklarının etkin bir şekilde tanımlanmasında sıklık ile kullanılmaktadır. Marasek-Ciolakowska and Podwyszynska (2008) yaptıkları bir çalışmada uzun süre mikroçoğaltılan lalelerde, rDNA dizilişi ile FISH yöntemi kullanarak genom yapısını tekrar yapılandırmışlardır.

Bu çalışmanın amacı, rDNA dizileri ve bantlama yöntemlerinin, kültüre alınmış bazı *Allium* türlerinde karyotipleme ve kromozom tanımlama için etkili kromozom işaretçileri olup olmadığını değerlendirmektir. FISH yöntemi rRNA gen bölgelerinin dağılışı desenlerini, gümüş boyama *Allium* türlerinde 35S rDNA bölgelerinin transkripsiyonel aktivitesini belirlenmek için kullanılmıştır. Bununla beraber, CMA3 ve

DAPI ile çift boyama yöntemi rDNA bölgeleri ve pozitif CMA3 bantları arasındaki ilişkilerini tespit etmek için kullanılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Allium türleri genel olarak toprak altında fazla derinlere ulaşmayan saçak köklere sahiptir. Toprakta köklerin ulaştığı derinlik seviyesi 18 cm civarında olurken, köklerin kalınlıklarının ise 0,5 ile 2 mm arasında olduğu belirtilmektedir (Brewster 2008).

Allium cinsine ait bitkiler, soğan dokuları ezildiğinde veya tatlarına bakıldığında ortaya çıkan acı koku veya tat ile tanınmaktadırlar. Bu cinse ait bitkiler iki yıllık veya çok yıllık soğanlı bitkilerdir. Bitki soğanları gövdenin yeraltı kısmının köküne tutturulmuş ve şişkin yaprak tabanlarınca oluşmuştur. Birkaç türde daha az şişkin olan, çok uzun nitelikte yaprak esaslı kılıflar bulunmaktadır. Diğerlerinde rizomlar ve depo kökler göze çarpmaktadır (Jones 1991).

Gövde yapısının ise depo yapraklarının alt tarafında yassı bir biçimde rozet formunda olduğu bilinmektedir. Gövdenin orta kısmını çiçek sapını oluşturma görevine sahip olan büyüme ucu yer almaktadır. Gövdeden salınan yaprakların oluşumları dıştan içe şeklinde gerçekleşmektedir. Bu durumda en yaşlı niteliğe sahip yaprak en dışarıda konumlanan yapraktır. Soğan yaprağının gelişimini tamamlaması halinde iç kısmında boşluk yer almaktadır (Günay 1992).

Soğan türlerinin çiçeklenme süreci gövdenin orta kısmında yer alan büyüme ucunun çiçek sapını oluşturmaya başlamaktadır. Oluşan sürgünde yaprak bulunmaz ve ucunda huni biçiminde çiçek tablası yer almaktadır. Tablanın yüzeyinde iki veya dört parça yapılı zar katmanı bulunmaktadır. Tabla çiçek tomurcuklarının primordiumlarını ihtiva etmektedir. Primordiumlar zaman içerisinde genişledikçe, yüzeyi kaplayan zar yapısı da büyümekte ve esnemektedir. Çiçeklerin açılma döneminde ise bu zarın yırtıldığı görülmektedir. Soğan çiçeklerinde protandri niteliği gözlenmektedir. Çiçekler ortaya çıktığı zaman dişi organ tam anlamıyla olgunlaşmasını tamamlamadığı için, dişi organın tozlanması ya aynı tablada bulunan diğer çiçeklerden gelen polenlerle ya da bir

başka tablaya ait polenlerle gerçekleşmek zorundadır. Bu durumun sonucu olarak soğan bitkisi tamamen yabancı tozlanan bitkiler kategorisinde yer almaktadır (Günay 1992).

Soğan başının oluşumu ise rozet gövde üstünde yer almakta olan yaprakların besin depolaması sonucu form değiştirmesi ile olmaktadır. Bu süreçte baş büyüklüğü arttıkça en dışta yer almakta olan yaprağın su kaybedip kuruması ve dış kabuğu oluşturmaları durumu gerçekleşmektedir. En dışta yer alan kuru kabuğun ardından gelen yapraklarda kalınlığın giderek artışı söz konusudur. Ürün çeşidine bağlı olarak farklılık arz edecek şekilde dış kabuk rengi kahverengi, sarı, beyaz, mor veya kırmızı şeklinde değişiklik gösterebilmektedir (Rabinowitch and Brewster 1990).

Allium cinsi genellikle *Liliaceae*'de sınıflandırılmaktadır. Ancak bazı taksonomistler bu cinsi *Amaryllidaceae* veya *Alliaceae*'de ayrı bir familya olarak konumlandırmayı tercih etmektedir. Bu konudaki anlaşmazlığın kaynağı çiçeklenme yapısı ile ilişkilidir. Bu anlaşmazlık *Liliaceae*'nin üst ovaryumunun *Amaryllidaceae*'nin şemsiye biçiminde çiçeklenmesinden daha fazla ağırlık taşıyıp taşımadığı sorusundan kaynaklanmaktadır (Jones 1991).

Allium cinsi kapsamındaki tür sayısı yaklaşık olarak 600 adettir. Bu türlerin genel itibarıyla dünyanın ılıman kuzey yarım küresi boyunca yaygın bir şekilde bulunduğu kaydedilmiştir. Türlerin 500'den fazlası, başta Rusya'da olmak üzere Eski Dünya'da, Avrupa'nın yanı sıra Kuzey Afrika ve Asya'yı da kapsamaktadır. Yeni Dünya'da yaklaşık 80 tür bulunmaktadır ve bunlar büyük ölçüde batı ABD ile sınırlı olmakla beraber Meksika ve Guatemala'ya kadar uzanmaktadır (Jones 1991).

Frenk soğanı (*A. schoenoprasum*), Kuzey Amerika ve Avrasya'da bulunan tek türdür; ve yayılımı Kuzey Kutbu'ndan Etiyopya ve Sri Lanka'ya kadar güneye uzanır. *Allium* türleri insanlar tarafından yüzyıllardır kullanılmaktadır. Bu türlerin Mısır, Roma, Yunanistan ve Çin'in eski uygarlıklarının yazıtlarında, gıda kaynağı olarak önemlerine atıfta bulunmaktadır. Yenilenebilir soğanın tarihi geçmişine ilişkin bilgilendirici açıklamalar Stearn (1944) ve Jones ve Mann (1963) tarafından verilmektedir.

Bir besin kaynağı olarak kullanımlarına ek olarak, *Allium* türleri süs bitkileri olarak da değerlendirilmektedir ve bu amaçla 100'den fazla tür kullanılmaktadır. Ekili yenilebilir formların (Frenk soğanı hariç) Yakın Doğu ya da Doğu Asya kökenli olduğu bilinmektedir. Frenk soğanı ve Çin frenk soğanı (*A. tuberosum*) türleri, yabani formlardan çok az bir miktar fark ile değişmeye devam etmektedir. Yiyecek olarak kullanılan türler ise, soyları izlenemeyecek kadar uzun zamandır seçilmekte ve kültüre alınmaktadır. Toplanan ve yenilen birkaç tür bulunmaktadır; *A. ursinum*, *A. victorialis*, *A. tricoccum*, *A. paradoxum*. *Allium* cinsine ait bazı yabani türler de hayvanlar tarafından tüketilmektedir.

Soğan gelişiminde sıcaklık ve ışıklanma ile ilgili parametrelerin bitki gelişiminde büyük önemi bulunmaktadır. Soğanlar gelişimlerinin erken dönemlerinde serin nitelikte havaya (12,8°C) ve kısa gün uzunluğuna gereksinim duymaktadır. Fakat baş bağlama döneminde soğan başının gelişimi ve büyümesi için yüksek sıcaklıklara (21 ile 24-27°C) eşlik eden kuru ve yağışsız hava şartlarının bulunması gerekli olmaktadır. Soğan -10°C'ye kadar olan sıcaklıklara dayanabilmektedir. Bu nedenle soğuğa dayanıklı sebzeler kategorisinde bulunmaktadır (Butt 1968).

Gelişimi için kullanılacak toprakların nitelikleri hafif nitelikli, geçirgin yapıda, organik madde içeriğince zengin olması yer almaktadır. Hassas olduğu nitelikler arasında toprak pH'sı ile kuraklık ve tuz stresi yer almaktadır. Soğanın ideal pH isteği 6,0 ile 7,0 arasındadır. Bunlara ek olarak soğan bitkisinin sodyum ve bor toksisitesine de son derece hassas olduğu bilinmektedir (Brown 2000). Bir bütün olarak *Allium* cinsinde üç temel kromozom sayısından bahsetmek mümkün olmaktadır: =7, =8 ve =9. Sitolojik olarak incelenen türlerin büyük çoğunluğu $2n=8$ olacak şekilde diploittir. Bu temel kromozom sayısına sahip grup içerisinde tüm yenilebilir *Allium* türleri yer almaktadır. Bir sonraki en yaygın grup 7 kromozom içeren gruptur. Bu grubu 9 kromozom içeriğine sahip türler takip etmektedir. İntraspesifik poliploidi yaklaşık 50 vakada bildirilmektedir (Federov 1969) ve bu vakaların 29'unda fazlalık B-kromozomları bildirilmiştir (Jones 1983).

Allium türleri simetrik ve düzgün karyotipleri ile ünlüdür. Geniş bir tür yelpazesinde, kromozomlar düzenli olarak metasentriktir veya çoğu submetasentriktir. Tek tek kromozomlar arasındaki uzunluk farkları küçüktür ve kesinti olmaksızın seriyi bozmamak için birbirleri ardına düzenli bir biçimde sıralanmışlardır. Evrim sürecinde, karyotip pek çok türde büyük ölçüde korunmuştur, böylece yapılan herhangi bir değişiklik, tüm kromozomları ve tüm türleri aynı şekilde etkilemiştir. Bu genel eğilimin ana istisnası, nükleolus düzenleyicileri taşıyan kromozomlardır. Nükleolar kromozomlar, inversiyonlar, translokasyonlar ve sentromer yanlış bölünmeleri aracılığıyla yapısal yeniden düzenlemelerin kanıtlarını gösterir. Nükleolar kromozomlar genellikle bütün içerisindeki tek asimetrik çifttir (Ved Brat 1965). Türler içindeki polimorfizmler, nükleolar çifti için evrimin oldukça aktif olduğunu ve satellitlerin boyutunda ve mevcut ikincil daralmaların sayısındaki varyasyonun, frenk soğanı, sarımsak (*A. sativum*) ve adi soğan türünde (*A. cepa*) iyi tanındığını göstermektedir (Bougourd and Parker 1976).

Yalnızca morfolojik çalışmaların değil, çalışma materyali olan bitki kaynağının genetiksel açıdan da etkin yönetiminin sağlanması, uygun tekniklerle karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi de son derece önemli ve öncelikli çalışmalar arasında yer almaktadır (Kresovich and McFerson 1992).

Bitkilerin sahip olduğu gen kaynaklarının korunması ve doğru bir şekilde değerlendirilmesi için, öncelikli olarak üzerinde çalışılan bitki türü ve cinsine ait bilgilerin doğru ve sistematik biçimde değerlendirilmesi gerekmektedir. Buna ek olarak gen kaynaklarına ait bilgilerin ayrıntılı bir biçimde kayıt altına alınması ve akabinde bu kaynağın zaman içerisinde yaşadığı genetik değişimlerin takibi gerekli olmaktadır. Gen kaynağının zaman içerisindeki değişimi ile ilişkili olan takibin yapılması, bitkinin ileriki çalışmalarda kullanımları için gerekli niteliklere sahip olup olmadığını belirlemek ve genetik değişimlerinin boyutlarını bilgi dahilinde bulundurmakla ilişkilidir (Özgen vd 2000).

Uluslararası Bitki Genetik Kaynakları Enstitüsü (IPGRI) kayıtları dikkate alındığında dünya çapında gen bankaları dahilinde, kayıtları yer alan *Allium* türlerinin 27.000 adet civarında bulunduğu bilinmektedir. Bu kayıtlı türler içerisinde en büyük orana sahip olan türün *Allium cepa* (%46,7) olduğu ifade edilmekteyken, *A. sativum* (%16,7) ve *A. porrum* (%7,9) türleri de diğerlerine nazaran yüksek bir orana sahiptir. Diğer *Allium* türlerinin ve yabani formlarının toplamının yaklaşık olarak %28,7 olduğu bildirilmektedir (Kik 2008).

Brezilya'da gerçekleştirilen bir çalışma kapsamında 64 farklı tropik ve subtropik *Allium* genotipleri karakterize edilmiş ve farklılıkları ortaya konulmuştur. Morfolojik, agronomik ve biyokimyasal parametrelerin incelendiği çalışmada, VAL 14 ile Beta Cristal çeşitleri arasındaki genetik uzaklığın en fazla olduğu, EX3000 ve Regia çeşitleri arasındaki genetik uzaklığın ise en düşük seviyede olduğu belirlenmiştir (Buzar *et al.* 2007).

İspanya'da yetişen 86 soğan çeşidi üzerinde yapılan bir çalışma kapsamında çeşitler morfolojik ve biyokimyasal parametreler bakımından incelenmiştir. Suda çözünabilir kuru madde, sukroz, früktoz, baş şekli ve sıklık, sıklık ile suda çözünabilir madde şeklinde parametrelerin ve bu parametreler arasındaki ilişkilerin istatistiksel açıdan önemli olduğu kaydedilmiştir (Mallor *et al.* 2011).

Soğan bitkisinin ıslahında kendilenen bitkilerde büyük ölçüde kendileme depresyonu ile karşılaşmaktadır. Saf hatların kendi aralarında melezlenmesi durumunda yeniden güçlü bireylerin eldesi sağlanmaktadır. Bu doğrultuda ortaya çıkan hibrit soğan bitkilerinin ebeveyn bitkilerden çok daha yüksek verime sahip olduğu, baş olgunlaşma zamanı, boyu, şekli ve rengi yönünden tek tipte olmaktadır (Jones and Davis 1944).

Soğan türünün tohumun ekilmesi ile hasat edilmesi arasında geçen sürenin iki yıl olması, ıslah çalışmalarının çalışma süresi bakımından oldukça uzun olmasına neden olmaktadır. Tek yıllık sebzelere kıyasla ıslah çalışmaları son derece yavaş ilerleyen soğan türünün ıslah sürecini kısaltmak amacıyla hibrit tohum üretimi önemli bir hale

gelmiştir. Bu kapsamda Amerika, Japonya ve bazı Avrupa ülkelerinin hibrit soğan tohumu üretmede yaptıkları çalışmalar sonucu, soğan türüne ait hibrit tohumlarının kullanımı son derece yaygınlaşmıştır. Türkiye’de ise hibrit tohum üretiminde dahi oldukça büyük problemler barındırmaktadır. Dışa bağımlılığın söz konusu olduğu hibrit tohum üretimi konusunda gerekli homojeniteyi sağlayamadan üretim yapıyor oluşu, büyük bir kısmının açık alanda tozlanan popülasyonlardan oluşuyor olması hibrit tohum üretiminde gelişimi sınırlandırmaktadır (Özokutanoğlu 2013).

İran’ın farklı bölgelerinden elde edilmiş 23 farklı soğan çeşidi kullanılarak yapılan bir çalışmada, soğan bitkilerinde varyasyonun en fazla görüldüğü parametre olarak baş ağırlığını (%21,19) edilmiştir. Varyasyonun en düşük seviyede gözlemlendiği parametre ise, toplam verim (%5,26) olarak belirtilmiştir. Eldeki veriler doğrultusunda yapılan kümeleme analizinde temelde 3 büyük grup elde edilmiştir. Numaralandırılan gruplardan ilkinin diğer ikisine kıyasla daha uzak nitelikler taşıyor olması dolayısıyla, hibrit çeşit üretimi amaçlı çalışmalarda bu gruba ait bir çeşidin ebeveyn olarak çalışmaya dahil edilebileceği ifade edilmiştir (Manbachi *et al.* 2012).

Tosun, (2006) tarafından bir çalışmada bazı *Allium* türlerinin morfolojik, anatomik, sitotaksonomik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Numunelerin kökleri, gövdeleri ile yapraklarının enine kesitleri incelenmiş, karşılaştırmalar yapılmıştır. Çalışma kapsamında yer alan bitkilerden *A. ampeloprasum* türünün $2n=40$ kromozom içeren diploid bir tür olduğu saptanmıştır. *A. ampeloprasum*, *A. scorodoprasum*, *A. szovitsii* türlerinin gövdelerinden elde edilen enine kesitlerde sklerankimatik halkaya rastlanmamış, bu kesitlerin genel görünümünün yuvarlak nitelik arz ettiği, iletim demetlerinin dairesel bir biçimde dağınık dizilim sergilediği ifade edilmiştir. *A. stamineum* ve *A. szovitsii* türlerinin gövde enine kesitlerinin merkezlerinde bir öz boşluğu yer almaktadır. Sitotaksonomik çalışmalar kapsamında diploid olduğu tespit edilen *A. ampeloprasum* türünün kromozomlarının oldukça büyük olduğu kaydedilmiştir. Stoma frekanslarının da incelendiği çalışmada en yüksek frekansın %59 ile *A. scorodoprasum* türüne ait olduğu belirlenirken, en düşük frekansa sahip türün %30’luk bir değer ile *A. szovitsii* olduğu kaydedilmiştir (Tosun 2006).

Allium cinsine ait 37 türün dahil edildiği bir çalışmada polenler farklı mikroskoplar kullanılarak karşılaştırmalı bir biçimde analiz edilmişlerdir. Kullanılan mikroskoplar; ışık mikroskobu (IM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile transmisyon elektron mikroskobu (TEM) olarak sıralanmıştır. Çalışmada kullanılan polen preparatlarının hazırlığı Wodehouse (1935) ile Erdtman (1960) yöntemlerine göre yapılmıştır. Palinolojik tanımlamaları da yapılan preparatların ışık mikroskobu ile incelendiğinde, monosulkat, monosulkat-operkulat, prolat, heteropolar ve bilateral simetrik olduğu kaydedilmiştir. Araştırma kapsamında yer alan türlerin tamamında sulkusun distalden proksimale doğru uzandığı ifade edilmiştir. İncelenen türlerin sistematik biçimde ayrımının yapılmasında yaşanan problemlerin giderilmesi açısından kullanılabilecek ayırt edici nitelik olarak sulkusun üzerinde yer alan parçalı overkulum varlığı ile ornamentasyon özelliklerinden faydalanılabileceği öne sürülmüştür (Güler ve Pehlivan 2006).

17 adet endemik soğan türünün incelendiği bir çalışmada mikromorfolojik açıdan incelemeler yapmak adına taramalı elektron mikroskobundan faydalanılmıştır. Endemik türlerin birbirlerinden farklı olarak belirleyici nitelikleri tespit edilmiş, bu nitelikler de tohum şekli, testa hücre şekilleri, kutikular ornamentasyonlar olarak kaydedilmiştir. Bu nitelikler arasından en belirleyici olanının, türler arasında hatta seksiyonlar arasındaki farklılıklarda dahi ortaya koyabilmeyi sağlayan niteliğin tohum yüzeyi ornamentasyonu olduğu ifade edilmiştir (İlarslan ve Koyuncu 1997).

Allium cinsinin karyotiplerinin düzgünlüğüne rağmen Levan (1935), örneklerindeki türlerden birinde (*A. fragrans*, $2n=2x=18$) en uzun kromozom uzunluğunun *A. schoenoprasum*'da bulunan en kısa olanın üç katı olduğunu belirtmiştir ($2n=2x=16$). Kromozom boyutlarının ölçümleri, nükleer genomlardaki nicel varyasyonu belirlemek için nükleer DNA tahminleriyle yenilenmiştir ve son zamanlarda yapılan araştırmalar *Allium* cinsi içindeki geniş bir varyasyonun olduğunu doğrulamıştır.

Jones (1983) tarafından yapılan bir veri derlemesinde, =8 grubundaki diploitler arasında DNA değerlerinin; *A. matriculae*'deki çekirdek başına maksimum 46×8 pg değerinden

A. sibiricum'da 15-2 değerine kadar değiştiği bulunmuştur. Poliploidler ve üç temel kromozom sayı grubunun temsilcileri göz önüne alındığında, tetraploid *A. globosum*'daki yaklaşık 75 pg'lik en yüksek miktardan diploid *A. sibiricum*'daki en düşük 15 pg arasındaki değerlerde değiştiğini bildirmiştir.

Ökaryotik türlerde olduğu gibi, *Allium* 'lardaki nükleer genetik malzemenin büyük bir kısmı tekrarlayan DNA dizileri biçimindedir. Bu tür DNA'nın oranı, *A. sativum*, *A. porrum*, *A. cepa* ve *A. molis*'de %65'den yüksek, *A. ascalonicum*'da %44'e kadar düşük olacak şekilde değişmektedir (Ranjekar ve diğerleri, 1978). Tekrarlanan DNA, tek kopya dizilimlerle birlikte kromozomlar boyunca serpiştirilmiştir (Stack and Comings, 1979; Evans ve diğerleri, 1983). Karavanov ve Iordansky (1973), en önemli kültür türlerinden olan, *A. cepa* ve *A. fistulosum*, eşsiz DNA sekansı içeriği için sırasıyla %68 ve %57, uzun tekrarlar için %29 ve %8 değerlerini bildirmiştir. Ortadaki tekrarlayan fraksiyon *A. cepa*'da %3, *A. fistulosum*'da %35 oranındadır.

Sitolojik düzeyde kromozom organizasyonunun kalitatif yönü üzerine yapılan çalışmalar, esas heterokromatin bileşenini görselleştirmek için Giemsa C-bantlama tekniklerinin kullanılmasıyla büyük ölçüde ilerlemiştir. Kültür türlerinin çoğunda bu C bantları oldukça küçüktür ve kromozom kollarının uçlarıyla sınırlıdır (Vosa, 1976a). Buna rağmen, bantların büyüklüğü ve konumu için bazı polimorfizmler bulunmaktadır ve bu polimorfizmler farklı çeşitlerin tanımlanmasında ve türlerin ilişkileri ile soylarının izlenmesinde yararlı belirteçler olarak hizmet edebilmektedir. Bazı *Allium* türlerinde, özellikle paniculatum grubuna ait yabani süs bitkilerinde, bant profilleri çok daha güçlü bir şekilde gözlenmiş ve C-heterokromatinin toplam kromozom uzunluğunun %30'una kadarını oluşturabildiğini göstermektedir (Vosa 1976b; Loidl 1979, 1983).

Tek nükleotid polimorfizm belirteçleri (SNPs), insersiyon ve delesyon (INDELs) durumlarının tespiti ile basit dizi tekrarlarının (SSRs) tespit edilmesi hedefiyle, geniş çaplı bir sekanslama çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda çalışmada 25 farklı soğan genotipinden faydalanılmıştır. Kullanılan genotiplerin 10 farklı genom bölgesi dahilinde; 327 SNP, 37 SSR ile 34 INDEL tespiti gerçekleştirilmiştir. Daha önceki

alışmalar, bilinen pedigree kayıtları ile kıyaslandığında en etkili ayrımı yapabilen belirtecin SSR belirteçleri olduğu ifade edilmiştir (Jakşe *et al.* 2005).

Genetik benzerliklerin saptanması ve moleküler belirteç olarak bir tek nükleotid polimorfizm belirteci geliştirebilmek adına 89 farklı soğan hattı üzerinde bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda 56 tane EST-SSR ile üç adet gSSR belirteci kullanılmıştır. Her bir hattan elde edilecek DNA rnekleri bitkilerin yapraklarından elde edilmiştir. Yapılan alışmalar sonunda kümeleme analizleri yapılmış ve gruplar uzun gün, kısa gün ve Hindistan kökenli genotipler şeklinde belirlenmiştir (McCallum *et al.* 2008).

Hindistan’da yetiştirilen kısa gün soğanlarından 14 çeşit ile uzun gün soğan çeşitlerinden 2 adedinin yer aldığı bir çalışmada genetik benzerlik oranları incelenmiştir. Bu doğrultuda genetik analizlerin yapılabilmesi için 24 adet EST-SSRs (ACM set) moleküler belirtecinden faydalanılmıştır. Kullanılan moleküler markörlerin 21 tanesinin üzerinde çalışılan soğan genotipleri üzerinde polimorfik bantlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar neticesinde elde 64 adet farklı allel varlığı ifade edilmiş, en fazla fragmentin gözlendiği lokusların ise ACM-101 ile ACM-132 olduğu kaydedilmiştir. İçerdikleri fragmentlerin aynılığı doğrultusunda benzerlik oranları saptanmaya çalışılan türlerden Nashik Red ile Poona Red isimli çeşitlerin %100 oranında benzerlik ihtiva ettiği, Alisa Craig ile Brigham Yellow Globe isimli çeşitlerin ise benzerlik oranlarının %25,7 oranı ile en az seviyede olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada yer alan üç çeşidin bazı allelerinin yalnızca bu çeşitlere spesifik olduğu gözlenmiş ve bu doğrultuda bu allellerin DNA parmak izi çalışmalarında kullanılabilirliğine değinilmiştir (Mahajan *et al.* 2009).

Soğan bitkisinde yaşanan genetik durulmuşluk durumunun testini gerçekleştirebilmek adı bazı SSR moleküler belirteçlerinin kullanıldığı bir çalışmada; hem genetik durulmuşluğun test edilmesi hem de bu amaçla primer tasarlanması hedeflenmiştir. Bu kapsamda çalışmacıların daha önceden geliştirmiş oldukları “SSR finder” adlı program kullanılarak 1049 adet SSR primerinin geliştirilmesi sağlanmıştır. Elde edilen

primerlerin 100 adedi 14 farklı soğan çeşidinde kümeleme çalışmaları gerçekleştirebilmek adına kullanılmıştır. Aynı biçimde üretilen 20 farklı SSR primeri de soğan durulmuşluğunun testinde üç farklı soğan ıslah hattında test edilmiştir. Elde edilen verilere göre, durulmuşluk ile ilişkili olarak incelenen üç hattın %15, %71, %97 oranlarında homojenlik gösterdiği ve bu amaçla kullanılan SSR moleküler belirteç setinin soğan bitkisindeki durulmuşluk analizleri için kullanılabilir olduğu ifade edilmiştir (Kim *et al.* 2012).

Bitki sitogenetiği alanı, Barbara McClintock'ın mısır konusundaki öncü çalışmaları (*Zea mays*) tarafından büyük ölçüde etkilenmiştir. Ona ait olan tek kromozomların kesin olarak tanımlanma yöntemi, mısır genomunun yapısı ve dinamik davranışı ile ilgili büyük keşiflere izin vermiştir (Creighton *et al.* 1931; McClintock 1929, 1932, 1938, 1941, 1984). Karmin bazlı kromatin boyama prosedürleri kullanılarak McClintock, bireysel kromozomların hepsinin, iki ölçülü kombinasyonu ile tek bir mayotik çekirdekten, kromozomların nispi uzunlukları ve kol oranlarıyla benzersiz bir şekilde tanımlanabileceğini göstermiştir (McClintock 1929). Bu yaklaşımın çeltik (*Oryza sativa*) (Shastri *et al.* 1960; Misra *et al.* 1967), sorgum (*Sorghum propinquum*) (Magoon *et al.* 1961) ve domates (*Lycopersicon esculentum*) (Barton *et al.* 1950; Ramanna *et al.* 1967) dahil olmak üzere diğer bitki türlerinde sitogenetik harita gelişimi için faydalı olduğunu kanıtlamıştır. Bununla birlikte, benzer büyüklükteki kromozomlara sahip bitki türleri, kesin sitogenetik çözünürlük ve karyotipleme için ek tekniklerin geliştirilmesini gerektirmiştir.

1968'de Caspersson ve arkadaşları, bitki kromozomları üzerinde ek bantlama desenleri, Q bantları üretmek için floresan boya kinakrin kullanmıştır (Caspersson *et al.* 1968). 1972'de Vosa ve Marchi, Giemsa C-bantlamasını, fasulye (*Vicia faba*), omurgalı sarımsak (*Allium carinatum*) ve mısırın kromozomları üzerindeki Q-bantlamasıyla karşılaştırmıştır. Kromozom bantlama tekniklerinin geliştirilmesi, mayotik kromozomlardan daha kolay elde edilen somatik kromozomların yararlılığına büyük ölçüde katkı sağlamıştır. Giemsa boyama teknikleri, bireysel çeltik prometafaz kromozomlarının (Kurata *et al.* 1978) ve ayrıca diploid çavdar (*Secale cereale*) (Gill *et*

al. 1974) ve Emir arpa (*Hordeum vulgare*) (Linde-Laursen 1975) bitkileri için karyotip gelişiminin tanımlanmasına izin vermiştir.

Bitkiler için sitolojik teknikleri iyileştirme çabasında olan Schweizer, soğuk ön işlemlerin, *Vicia faba* hariç, çalışılan türlerin çoğu için kromozom görselleştirmesini arttırdığını göstermiştir (Schweizer 1973). Optimum boyama koşullarında bile, tüm kromozomları açıkça ayırt edebilme yeteneği, bazı bitki türlerinde kromozomların doğal morfolojik benzerlikleri ile engellenebilmektedir (Mok *et al.* 1976; Pijnacker *et al.* 1984; Yu *et al.* 1991).

Yıllar boyunca, karmin bazlı ve bantlama tekniklerinin varyasyonları farklı bitki türlerinin sitogenetik karakterizasyonu için adapte ve optimize edilmiştir (Schweizer 1973; Gill *et al.* 1974; Linde-Laursen 1975; Kurata *et al.* 1978; Lavania 1978; Yu *et al.* 1991). Bu klasik yaklaşımların kromozom karakterizasyonu için paha biçilmez olduğu kanıtlanmıştır. Ancak kromozomlar üzerinde spesifik DNA sekanslarının doğrudan görselleştirilmesine izin veren yerinde hibridizasyonun gelişmesi sitolojiyi moleküler biyoloji ile birleştirerek ileriye doğru kuantum sıçramasına neden olmuştur (Gill and Friebe 1998; Harper and Cande 2000).

Sitogenetik hücre içerisindeki elementleri takip ederek kalıtımın işleyişini anlamaya çalışan bir bilim dalıdır. Klasik sitogenetik dönemden, modern moleküler sitogenetik döneme geçiş kalıtımın temel unsuru olan deoksiribonükleik asit (DNA) moleküllerinin teknolojik gelişmeyle orantılı olarak görüntülenebilmesiyle iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk adım, hücre içerisindeki kromozomların doğal yapısını bozmadan diğer bir ifadeyle, *in situ* şartlarda hibridizasyon yapabilme kabiliyetinin geliştirilmesiyle başlamıştır (Gall and Pardue 1969). Bu başlangıç asıl ivmesini prob DNA'nın radyoaktif moleküllerle işaretlenmiş/labellenmiş sentezden, floresan moleküllerle işaretlenmiş/labellenmiş senteze geçmesiyle göstermiştir (Langer-Safer *et al.* 1982). Dolayısıyla prob DNA'nın teknolojik gelişmeyle birlikte işaretlenme ve hibridizasyon sonrası görüntülenme yöntemi en önemli ilerletici faktör olmuştur.

In situ hibridizasyon (ISH) tekniklerinin geliştirilmesi, doğal kromozom morfolojisine bakılmaksızın, üzerinde çalışılacak herhangi bir türe ait sitogenetik analiz için fırsatlar yaratmıştır (Gall and Pardue 1969; Pardue and Gall 1969, 1975; John *et al.* 1969). Bitkilerde, ISH problemlerini yapmak için radyoaktif izleyici veya modifiye nükleotitlerin (biyotin, digoksinin veya flüoresan kısımlara eklenmiş) kullanımı, hücrelerde, çekirdeklerde ve ayrı ayrı kromozomlarda mikroskobik görselleştirme ile tamamlayıcı dizilerin lokalizasyonuna izin vermektedir (John *et al.* 1969; Peacock *et al.* 1981; Ambros *et al.* 1986; Shen *et al.* 1987; Xu and Earle 1994; Fransz *et al.* 1996). Doğrudan ve dolaylı floresans in situ hibridizasyon (FISH), son 25 yılda, Jiang ve Gill tarafından gözden geçirildiği haliyle, yaygın bir şekilde uygulanmıştır (Jiang and Gill 2006).

Günümüzde moleküler sitogenetik yöntemlerin temelinde floresans in situ hibridizasyonu (FISH) bulunmaktadır. FISH'te çoğunlukla mitoz bölünmenin metafaz aşamasındaki kromozomlar görsel estetikliği ve elde edilebilme kolaylığı sebebiyle tercih edilmektedir. Bu sebeple, FISH ile kromozomlar üzerinde belirli DNA dizilerinin yeri tespit edilebilmektedir. FISH'in hassasiyet ve spesifikliğı/kesinliğı, diğer bir çok kromozomları tanımlama esasına dayanan sitogenetik yöntemlere göre daha fazladır (de Jong *et al.* 1999). Görüntüleme, prob DNA-sinyal arttırımındaki teknolojik gelişmelerle birlikte moleküler rekombinant DNA teknolojilerinin de entegre edilmesiyle uygulanan FISH tekniğı sitogenetik çalışmalara modern bir perspektif kazandırmıştır (Figueroa and Bass 2010). Çok kısa zamanda FISH genom analizi çalışmalarında büyük etkilere sahip olmaya başlamıştır. Bu etkiler içerisinde, çok hızlı bir teknik olması ve hızlı sonuç göstermesi, hibridizasyon ve hibridizasyonu tespit etme etkinliğinin yüksek olması, boyutsal çözünürlüğünün fazla olması, kısa sürede çok sayıda hücrenin analizine imkan sağlaması gibi özellikleri öne çıkmaktadır (de Jong *et al.* 1999; Jiang and Gill 2006).

Her ne kadar FISH, benzersiz veya düşük kopyaya sahip dizileri haritalamak için yaygın olarak kullanılsa da, kromozom tanıma kokteylleri üretmek ile yakından ilişkili bitki türlerinde veya poliploidlerde genom ilişkilerini araştırmak için tekrarlayan diziyi lokalize etmek için de kullanılmaktadır (Lysak *et al.* 2001; Lysak *et al.* 2003; Kato *et al.* 2004; Lamb and Birchler 2006). FISH'in yapısal, karşılaştırmalı ve fonksiyonel

genomikteki geniş uygulamaları, bitki genom araştırmalarını tamamlamak, hızlandırmak veya yönlendirmek için bitki sitogenetiğini eşsiz bir konuma yerleştirmektedir (Suzuki *et al.* 1991; Albini 1994).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, *Allium* cinsine ait *Allium oreophilum* (Sultan soğanı), *Allium sphaerocephalon* (yılan sarımsağı) ve *Allium porrum* (Pırasa) bitkileri kullanılmıştır. *A.porrum* Krolland PlantiCo Zielonki tohumluk firması ve *A. sphaerocephalon*, *A. oreophilum* yumruları Benex Bahçe Ürünleri firmasından (Chrzypsko Wielkie, Polonya) temin edilmiştir.

Bitkilerin yetiştirilmesi: *Allium porrum* tohumları nemlendirilmiş filtre kağıdı üzerine ekimleri yapılmış ve oda sıcaklığında 4 gün bekletildikten sonra kök ucu örnekleri alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Allium porrum* tohumları nemlendirilmiş filtre kağıdı üzerine ekimleri

Allium sphaerocephalon ve *Allium oreophilum* yumruları, toprak karışımı (1 vermiculite ve 1 torf) içeren saksılara ekilmiştir. Bir hafta sonra kök ucu örnekleri alınmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Allium sphaerocephalon* ve *Allium oreophilum* yumruları çimlendirme için saksılara dikimi

3.2. Feulgen Boyama

Allium sphaerocephalon ve *Allium oreophilum* türleri için kök uçları, Silesian Üniversitesi seralarında saksı ortamında yetişen soğancıkların 1,5-2 cm uzunluğundaki kök uçları alınmıştır. *Allium porrum* türü için petri kaplarında çimlendirilen bitkiciklerin köklerinden örnekler alınmıştır. Kök uçları, 3–5 saat süresince 8-hidroksikinolin solüsyonu içerisinde bekletilmiş (Şekil 3A) ve 3:1 etanol/asetik asit içerisinde fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler, 5N HCL ile oda sıcaklığında muamele edilmiş ve hemen akabinde örnekler oda sıcaklığında Schiff'in reaktifine aktarılmıştır ve burada kök ucu dokusu mor rengi alıncaya kadar bekletilmiştir (yaklaşık 30 dk) (Şekil 3B). Daha sonra kök ucu örnekleri lam üzerine yayılarak asetik asit damlası yardımı ile ezilmiştir (Şekil 3C). Daha sonra slaytlar mikroskop altında incelenmesi için, lamel

soğuk uygulaması (kuru buz üzerinde 15 dakika bekletilir) ile ayrılmış (şekil 3D) aynı gün içerisinde analiz edilmiş veya daha sonra inceleme yapılacak ise $+4^{\circ}\text{C}$ 'de birkaç gün bekletilmiştir. Bu çalışmamızda Yaklaşık 250 adet slayt hazırlanmış ve 5 adeti analiz için kullanılmıştır.



Şekil 3.3. A: 8-hidroksikinolin solüsyonu içerisinde kök uçları B. Schiff'in reaktifi içerisinde kök uçları C. Kök ucu örnekleri lam üzerine yayılarak asetik asit damlası yardımı ile ezilmiştir D. slaytlar mikroskop altında incelenmesi için, lamel soğuk uygulaması

3.3. Gümüş Boyama

3.3.1. Slaytların hazırlanması

Kullanılacak slaytlar alkol/eter (1:1) karışımı ile temizlemiştir. Alınan kök uçları 8-hidroksikinolin içinde 4 saat sürede bekletilmiş ve daha sonra fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. Fiksasyon solusyonu içerisinde kök örnekleri +4°C sıcaklıkta en az 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra kökler sitrik tampon içerisinde 3 kez her defa 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra sitrik tampon pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Enzim solusyonu kök örneklerinin üzerine eklenmiş ve 37°C’de yaklaşık bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplerden enzimler mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve tüplere sitrik tamponu eklenmiş ve 4°C’de buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Kök örnekleri, analiz için lam üzerine yerleştirilmiş ve daha sonra lamel kapatılarak ezme ve yayma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Gümüş boyama

Slaytlar, 0.01M borat tamponunda (pH 9.2) 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş (şekil 4A), sonra slaytlar iki kez damıtılmış suyla durulanıp kurutulduktan sonra her slayta taze hazırlanmış 50 µl gümüş nitrat solusyonu uygulanmıştır (Şekil 4B). Sonra slaytların üzerine naylon tül örtülmüş (Şekil 4C,D) ve nemli bir ortamda (şekil 5A) 42°C’de ortalama 1 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır (inkübasyon süresi türe göre farklılık gösterir) (şekil 5B). Çalışmamızda, *Allium oreophilum* için 50 dakika, *Allium sphaerocephalon* 80 dakika ve *Allium porrum* türü için 40 dakika bekletilmiştir, slaytlar üç kez saf su ile yıkanıp kurulanmıştır (Şekil 5C). Slaytlar kuruduktan sonra lamel, yapıştırıcı ile lama yapıştırılmış ve mikroskop altında incelenmiştir. Gümüş boyama çalışmasında yaklaşık 100 adet kadar slyte hazırlanmış en iyi 5 tanesi analiz için kullanılmıştır.



Şekil 3.4. A: Slaytlar borat tamponunda, B.gümüş nitrat solusyonu uygulaması, C. Naylon tülün slaytlar üzerine kapatılması D slaytların üzerine naylon tül örtülmüş hali



Şekil 3.5. A: Slaytların nemli ortama konulması B. Slaytların nemli ortamda inkübasyonu C. Slaytların saf su ile yıkanması

3.4. DAPI ve CMA3 Boyama

3.4.1. Slaytların hazırlanması

DAPI ve CMA3 analizlerinde kullanılacak slaytların hazırlanması 3,2,1 bölümünde belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

3.4.2. DAPI ve CMA3 reaksiyonu

Her bir slayt üzerinde 40 µl CMA3 çalışma solusyonu damlatılarak uygulama yapılmış ve naylon ile örtülmüştür. Uygulama yapılmış slaytlar, karanlıkta 1 saat bekletilmiş, daha sonra saf su ile durulanmış ve slaytların üzerine DAPI+vectashield solusyonundan 10 µl eklenip lamel ile örtülmüştür. Daha sonra slaytlar 2 gün boyunca 37°C'de inkübe edilmiş ve mikroskop altında incelemeler gerçekleştirilmiştir.

3.5. Flöresan *in situ* Hibridizasyonu (FISH)

3.5.1. Slaytların hazırlanması

FISH analizlerinde kullanılacak slaytların hazırlanması 3.3.1 bölümünde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. FISH analizi

3.5.2.a. Probların hazırlanması

İki adet prob kullanılmıştır. Bunlar, 25s rDNA ve 5s rDNA'dır.

3.5.2.b. N kletidlerin hazırlanması

Her bir nukleotidin çalışma konsantrasyonu 0.4 mM'dır. Nukleotid stok solusyonundan (100 mM) aşağıdaki şekilde çalışma konsantrasyonu hazırlanır.

3.5.2.c. dATP nukleotidi

2  l dATP nukleotid stok solusyonuna 48  l EB tampon çözeltisi eklenir ve 4 mM dATP solusyonu hazırlanır. Daha sonra, 10  l 4 mM dATP ile 90  l EB tampon karıştırılarak 100  l 0.4 mM dATP elde edilir.

3.5.2.d. dCTP nukleotidi

2  l dCTP nukleotid stok solusyonuna 48  l EB tampon çözeltisi eklenir ve 4 mM dCTP solusyonu hazırlanır. Daha sonra, 10  l 4 mM dCTP ile 90  l EB tampon karıştırılarak 100  l 0.4 mM dCTP elde edilir.

3.5.2.e. dGTP nukleotidi

2  l dGTP nukleotid stok solusyonuna 48  l EB tampon çözeltisi eklenir ve 4 mM dGTP solusyonu hazırlanır. Daha sonra, 10  l 4 mM dGTP ile 90  l EB tampon karıştırılarak 100  l 0.4 mM dGTP elde edilir.

3.5.2.f. dTTP nukleotidi

2  l dTTP nukleotid stok solusyonuna 48  l EB tampon çözeltisi eklenir ve 4 mM dTTP solusyonu hazırlanır. Daha sonra, 10  l 4 mM dTTP ile 90  l EB tampon karıştırılarak 100  l 0.4 mM dTTP elde edilir.

3.5.2.g. Prob DNA'nın işaretlenmesi

5s rDNA problemleri, digoxigenin-11-dUTP (1mM:Roche,1093 088) ile, 25s rDNA tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (1mM Roche,1534 378) ile işaretlenmiştir. Etiketleme işleminde Roche firmasından temin edilen kit (976 776) kullanılmıştır.

3.5.2.h. Probe DNA 25srDNA

İlk olarak aşağıda sıralanan etiketleme karışımı buz üzerinde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Prob DNA 25srDNA hazırlamasında kullanılan solusyonlar ve miktarları

Solusyon	Hacim (µl)
dCTP (0.4 mM),	2.5µl
dATP (0.4 mM)	2.5µl
dGTP (0.4 mM)	2.5µl
prob DNA (25s rDNA)	6 µl
dTTP (0.4 mM)	1.67 µl
tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (1mM)	0.83 µl
10×buffer	2 µl
Nick translation enzyme	2 µl
Toplam	20 µl

Bu aşamada 20 µl olarak hazırlanmış etiketleme karışımı, PCR cihazında nick translasyon işlemine tabi tutulmuştur. PCR cihazı; 90 dakika 15°C, 10 dakika 65°C ve 4°C (∞) bekletecek şekilde programlanmıştır. Bu aşamadan sonra eşleşmemiş nukleotidlerin uzaklaştırılması için etanol çöktürmesi yapılmıştır. PCR işlemi sonrası tüplere 2µl 3M NaAc (1/10 oranında) ve 50 µl etanol (2.5 x oranında) eklenmiş ve en az 2 saat -20°C'de bekletilmiş ve 13 krpm'de santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan DNA peleti uygun hacimde 1xTE tampon içerisinde çözdürülmüş ve analize kadar -20 °C saklanmıştır.

3.5.2.i. Probe DNA 5srDNA

İlk olarak aşağıda sıralanan etiketleme karışımı buz üzerinde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Prob DNA 5srDNA hazırlamasında kullanılan solusyonlar ve miktarları

Solusyon	Hacim (µl)
dCTP (0.4 mM),	2.5µl
dATP (0.4 mM)	2.5µl
dGTP (0.4 mM)	2.5µl
prob DNA (5s rDNA)	6 µl
dTTP (0.4 mM)	1.67 µl
digoxigenin-11-dUTP (1mM:Roche,1093 088)	0.83 µl
10×buffer	2 µl
Nick translation enzyme	2 µl
Toplam	20 µl

Bu aşamada 20 µl olarak hazırlanmış etiketleme karışımı, PCR cihazında nick translasyon işlemine tabi tutulmuştur. PCR cihazı; 90 dakika 15°C, 10 dakika 65°C ve 4°C (∞) bekletecek şekilde programlanmıştır. Bu aşamadan sonra eşleşmemiş nukleotidlerin uzaklaştırılması için etanol çöktürmesi yapılmıştır. PCR işlemi sonrası tüplere 2µl 3M NaAc (1/10 oranında) ve 50 µl etanol (2.5 x oranında) eklenmiş ve en az 2 saat -20°C’de bekletilmiş ve 13 krpm’de santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan DNA peleti uygun hacimde 1xTE tampon içerisinde çözdürülmüş ve analize kadar -20°C saklanmıştır.

3.5.2.i. Denaturasyon ve hibridizasyon karışımı

Bu aşamada prob ve örnek DNA’nın tek dizin haline getirilmesi ve tekrar eşleşmesi sağlanmıştır. Hibridizasyon karışımı aşağıdaki sıraya göre hazırlanmış ve iyice karıştırılmıştır.

Çizelge 3.3. Denaturasyon ve hibridizasyon aşamasında kullanılan solusyonlar ve miktarları

Solusyon	$\mu\text{l/slayt}$	Final konsantrasyon
%100 formamid	20	%50
%50 w/v dekstran sulfat	8	%10
20 x SSC	4	2x
%10 SDS w/v SDS	2	%0.5
prob DNA (25SrDNA)	2	25-100 ng/slayt
Prob DNA (5SrDNA)	2.4	25-100 ng/slayt
Steril Distile su	1.6	
Toplam	40	

2- Hibridizasyon karışımı 10 dakika süresince 80°C ve hızlı bir şekilde buz ortamına aktarılarak 10 dakika bekletilerek denaturasyon işlemi gerçekleştirilir.



Şekil 3.6. Solüsyonlar tup içinde sıcak su banyosunda

3- Her bir slayta 38 μl denature olmuş hibridizasyon karışımı eklenir ve plastik örtü (coverslip) ile kapatılır. Daha sonra slaytlar, ısıtma tablası üzerine alınır ve 70-90 °C’de 5-10 dakika bekletilir.



Şekil 3.7. Slaytlar ısıtma tablası üzerindeki görüntüsü

4-Daha sonra slaytlar plastik örtü ile kaplanmış vaziyette bir gün boyunca inkübatörde 37°C bekletilerek soğutulur.

5- Slaytların üzerine 50 μ l RNase solusyonu eklenmiştir. RNase solusyonunu; 1485 μ l 2 $\times$ SSC tampon çözeltisi ve 15 μ l RNase'den oluşmaktadır. Daha sonra slaytlar plastic örtü ile kaplanmış ve 1 saat boyunca inkübatörde 37°C bekletilmiştir (Şekil 3.8)



Şekil 3.8. Slaytlar plastik örtü ile kaplanmış ve nemli bir ortamda inkübe edilmiştir.

3.5.2.j. Yıkama işlemi

Bu aşamada, DNA-DNA eşleşmesi yapmamış problemlerin uzaklaştırılması sağlanır. İlk olarak slaytların lamaları uzaklaştırılır ve yıkama kaplarında 42°C'de 2×SSC tampon çözeltisinde 4 dakika, daha sonra 2 kez 5 dakika olacak şekilde 0.1×SSC tampon çözeltisinde ve son olarak 3 kez 3 dakika olacak şekilde SSC tampon çözeltisinde 42°C ve 3 kez 3 dakika olacak şekilde SSC tampon çözeltisinde oda sıcaklığında yıkama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Slaytlar sırası ile yıkanma kabında

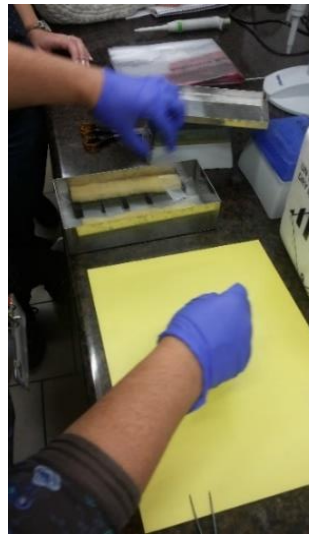
3.5.2.k. Probun immuno belirlenmesi

1- Slaytlar üzerine reaksiyonu durdurmak için 50-150 µl arası engelleme solusyonu eklenmiş ve 20 -30 dakika beklenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Slaytlar üzerine reaksiyonu durdurmak için durdurma solusyonu eklenmesi

- 2- Slaytlar üzerinden plastik lamel kaldırılır ve slaytlar üzerine 5 μ l FITC conjugated anti digoxigenin ve 30 μ l engelleme solusyonu (toplam 35 μ l) eklenmiş ve 1saat 37 °C’de inkübe edilmiştir.
- 3- İnkübasyon sonrası, slaytlar tween 4×SSC tamponu ile 3 kez 8 dakika 37 °C’de sıcak su banyosunda bekletilerek yıkanmıştır.
- 4- Slaytların üzerine 5 μ l anti body-anti sheep+ 30 μ l engelleme solusyonu (toplam 35 μ l) eklenmiş ve 1saat 37 °C’de inkübe edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Slaytların üzerine anti body-anti sheep ve durdurma ajanı eklenmesi

5- Slaytlar, tween 4×SSC tamponu 3 kez 8 dakika 37 °C’de sıcak su banyosunda bekletilerek yıkanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Slaytlar sıcak su banyosunda bekletilmeleri

3.5.2.1. Slaytların görsel incelenmesi ve fotoğraflarının çekilmesi:

1. Daha sonra slaytlar sırası ile %70 etanolde 1 dakika,%90 etanolde 1 dakika ve %96 etanolde 1 dakika bekletilmiş ve sonrasında kurutma kaplarında kurutulmuştur.
2. Kurutulmuş slaytların üzerine 10µl DAPI Stock+vectashield eklenmiş ve mikroskop gözlemlerine kadar +4 °C’de bekletilmiştir.

Çizelge 3.4. Kullanılan floresan renkler ve uyarma ve emisyon miktarları

	Renk Uyarma maks. (Nm)	Emisyon maks. (Nm)
AMCA Mavi	399	446
Fluorescein Green	494	523
CY3 Kırmızı	552	565
Rhodamine Red	555	580
Texas Kırmızı Kırmızı	590	615

3.6. Solusyonların Hazırlanması

3.6.1. 8-hidroksikinolin

1 litre saf su içine 0.28 gr 8- hidroksikinolin eklenir ve manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılır. 8-okxyqunoline solusyonu ışığa hassas olduğu için karıştırma ve saklama şişesinin üzerini aliminyum folyo ile kapatılır. Kullanılincaya kadar +4 °C'de saklanır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. 8-hidroksikinolin şişede foil ile kapatılıp ve karıştırıcı üzerinde bekletilir.

3.6.2. 5N HCl

1 L 5N HCl hazırlamak için, 507 ml saf suya 493 ml 537'lik HCL eklenir.

3.6.3. Fiksasyon solüsyonu

3 hacim etanol 1 hacim asetik asit karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.6.4. 10 mM Sitrik tampon

Sitrik tampon için 2.1 gr sitrik asit monohidrat 100 ml saf suda karıştırılır ayrıca 2.94 gr trisodium sitrat dihidrat (Poch, 200-6753) 100 ml saf suya konup eritilinceye kadar karıştırılır. Daha sonra iki çözelti karıştırılarak -20°C derin dondurucuda saklanır. Analiz için, 90 ml saf su ile derin dondurucuda bekletilen karışımdan 10 ml eklenenlerek 10 mM sitrik tampon çözeltisi hazırlanır.

3.6.5. Enzim solusyonlarının hazırlanması

Çalışmada selüloz ve pektinaz enzimleri kullanılmıştır. Aspergillustan (sigma=c1184-5 ku) alınan 0.1 gr selüloz ile 0.1 gr pektinaz (sigma=p4716-25 ku) 10 mM sitrik tampon içerisine eklenip karıştırılır ve küçük tüpler içine konularak -20 °C saklanır.

3.6.6. Gümüş nitrat solüsyonu

Gümüş boyama için 1gr gümüş nitrat 2 ml saf suya eklenir ve karıştırılır.

3.6.7. 0.01 M Borat Tamponu (pH:9)

Hazır olarak alınabilir ve +4°C dolapta tutulur. 1:1oranında saf su ile karıştırılarak kullanılır.

3.6.8. Mcilvanie tampon (pH:7)

200M disodium hidrojen fosfat ile 100 mM sitrik asitin karıştırılması ile elde edilir. Bu tamponun çalışma solusyonu, 3 ml Mcilvanie tampon çözeltisi, 3 ml saf su ve 30 µl 1 M MgCl₂ eklenmesi ile elde edilir.

3.6.9. 1M Mgcl₂

12.18 gr Mgcl₂'e 60 ml saf su ilave edilerek hazırlanır

3.6.10. DAPI Stok solüsyon

10 mg DAPI, 5ml saf suya eklenerek hazırlanır. DAPI çalışma solusyonu 998 µl Mcilvanie tampon çözeltisine 2 µl DAPI stok solusyonundan eklenerek hazırlanır. (FISH analizi için)

3.6.11. DAPI (1:10) solüsyonu

10µl DAPI stok solusyonuna 90 µl saf su eklenerek hazırlanır.

3.6.12. DAPI+vectashield solüsyonu

100 µl vectashield solusyonuna (Vectorlabs H-1200) 6 µl DAPI eklenerek hazırlanır.

3.6.13. Kromo stok solüsyonu

10mg CMA+3'ne 2ml kromomisin tamponu eklenerek hazırlanır

3.6.14. CMA+3 çalışma solüsyonu

100 µl Kromo stok solusyonuna 900 µl kromomisin tamponu eklenerek hazırlanır.

3.6.15. 20×SSC

800 ml litre saf su içine: 175.3 g NaCl (3M) ve 88.3 g tri-sodyum sitrat dihidrat (0.3M) eklenmiş, karıştırılmış, pH 7'ye ayarlanmış ve 1 litreye tamamlanmış ve sterilize edilmiştir.

3.6.16. 2×SSC

100ml 20×SSC solusyonu ile 900ml dH₂O karıştırılmıştır.

3.6.17. 0.1SSC

50 ml 2×SSC solusyonu ile 950ml dH₂O karıştırılarak hazırlanmıştır.

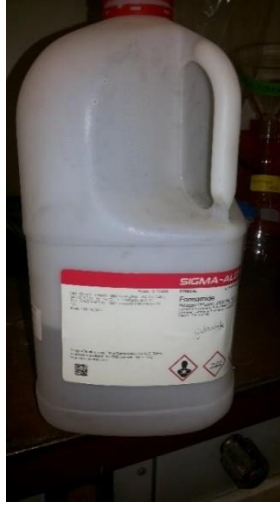
3.6.18. Tween /4×SSC

200ml 20×SSC solusyonu ile 2ml Tween 20 (Sigma P 1379) ve 798 ml dH₂O eklenerek hazırlanmıştır.

3.6.19. Formamide-Sigma F-7503

500 ml formamide için:

25 gr "Amberlite" IRN-150L monobed mixed resin (Merck 55179 4K) ile 500ml formamide eklenerek hazırlanır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Formamide-Sigmanın hazır şekli

3.6.20. %10 SDS (sodium dodecyl sulphate)

10gr SDS (Sigma L 4390)100 ml saf su içerisinde çözeltir ve filter strelize edilir.

3.6.21. %50 dekstran sulfat (DS)

50 gr dekstran sulfat 100 ml saf su içerisinde çözeltir

3.6.22. Engelleme solusyonu

20 ml 20xSSC solusyonu ve 5 gr yağsız süt tozu ile 80 ml steril saf su ile karıştırılır. 2 ml'lik hacimlerde -20 °C'de saklanır.

3.6.23. RNase için tampon

50 ml tampon için:10mM Tris HCLve15mM NaCl ile 50ml saf su karıştırılır.

3.6.24. RNase

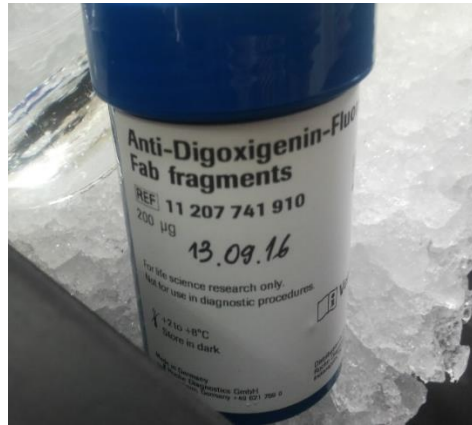
10 ml RNase tampon ile 0.1 gr RNase (ribonuclease A from bovin pancreas, Sigma-R-5503) karıştırılır.

3.6.25. 10× PBS buffer, pH=7

Bunu hazırlamak için A ve B solusyonları hazırlanır. A solusyonunu hazırlanmak için 450ml saf su içerisine 6.3 gr Na_2HPO_4 ve 36.82 gr NaCl eklenir ve karıştırılır. B solusyonu için, 100ml saf su içerisine 1.56 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 8.18 gr NaCl eklenir ve karıştırılır. Daha sonra solusyon A'nın içerisine solusyon B'den pH 7 oluncaya dek eklenir ve 500 ml tampon çözelti elde edilir. Otoklav sterilizasyonu uygulanır.

3.6.26. FITC- conjugated anti-digoxygenin (Roche-1207741)

200 μg anti-dig-fl + 1ml saf su (Şekil 3.15)



Şekil 3.15. FITC- conjugated anti-digoxygenin

3.6.27. FITC- conjugated Anti-Sheep(Jackson immunoresearch 313-096-003)

1 μl FITC-conjugated anti-sheep antibody+ 49 μl blocking reagent

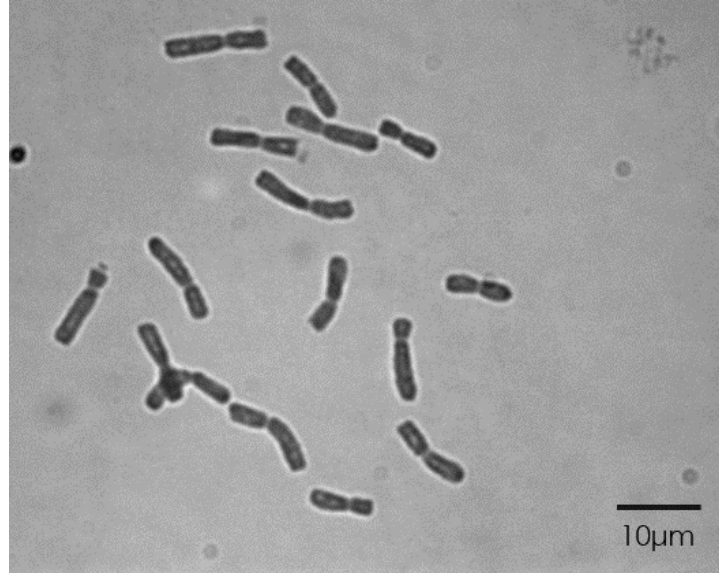
4. ARASTIRMA BULGULARI

4.1. Feulgen Boyama

Analiz yapılan *Allium* türlerinde temel kromozom sayısı $x = 8$ olarak bulunmuştur. Analiz edilen türler içerisinde, sultan soğanının (*A. Oreophillum*) diploit ($2n=16$), yılan soğanının (*A. sphaerocephalon*) triploit ($2n=24$) ve pırasanın (*A. porrum*) tetraploit ($2n=32$) olduğu tespit edilmiştir. Yapılan karyotip çalışmaları sonucunda, *Allium* türlerinde metasentrik kromozomların çoğunlukta olduğu submetasentrik ve subtelosentrik kromozomların da bulunduğu belirlenmiştir.

4.1.1. *Allium oreophillum*

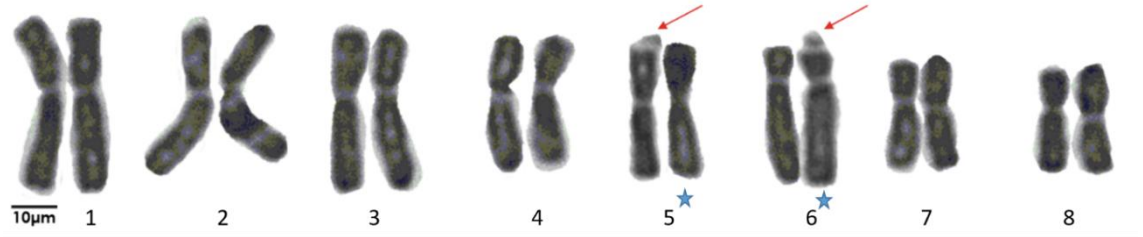
A. oreophillum türünün mikroskop altında 400x büyütülmüş kromozom görüntüsü şekil 5'te sunulmuştur. Analiz edilen *A. oreophillum* türünün kromozom boylarının 6.96 ile 12.42 μm arasında değiştiği gözlenmiştir. En kısa kromozom boyu 6.96 μm ile 8.1 numaralı kromozom, en uzun ise 12.42 μm ile 1.1 numaralı kromozom olmuştur. Yıldızlı olarak gösterilen (kromozom 9.1 ve 10.2) kromozomlarda NOR bölgelerinin bulunduğu ve bu bölgelerin 5.8S, 18S ve 28S ribozomal RNA'yı kodladıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.1). *A. oreophillum* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 3.09 ile 6.2 numaralı kromozomda gerçekleşmiş ve en düşük kol indeksi ise 1.08 ile 7.2 numaralı kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. oreophillum* türü değerlendirildiğinde 2 homolog kromozomun (7.1, 7.2, 8.1, ve 8.2 numaralı kromozomlar) metasentrik, 5 homolog kromozomun (1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 4.1, 4.2, 5.1, ve 5.2 numaralı kromozomlar) submetasentrik ve 1 homolog kromozomun (6.1, 6.2) subtelosentrik olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. *A. oreophillum* türüne ait mitotik metafaz kromozomları ($2n=2x=16$)

Çizelge 4.1. *Allium oreophillum* türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri

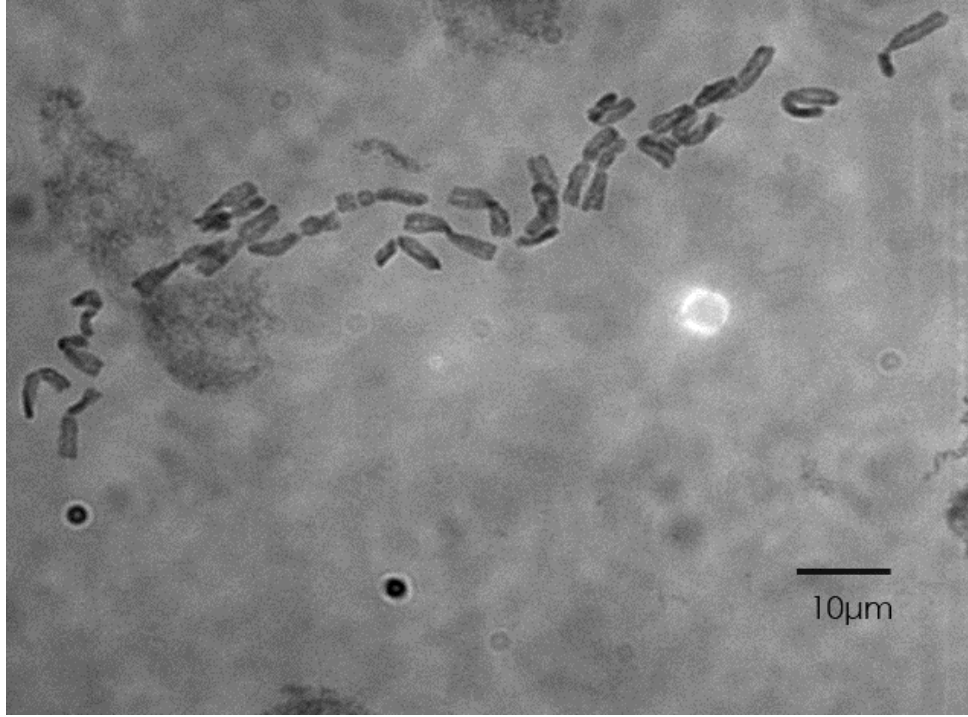
Homolog kromozom no		Kromozom boyu (μm)	p	q	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	12.42	4.57	7.85	1.7177243	sm
	2	12.06	4.46	7.6	1.7040359	sm
2	1	11.83	4.33	7.5	1.7321016	sm
	2	11.82	4.32	7.5	1.7361111	sm
3	1	11.6	4.2	7.4	1.7619048	sm
	2	11.36	4.16	7.2	1.7307692	sm
4	1	10.23	3.23	7	2.1671827	sm
	2	9.93	2.93	7	2.3890785	sm
5	1	9.4	3.4	6	1.7647059	sm
	2	9.6	3.5	6.1	1.7428571	sm
6	1	9.14	2.24	6.9	3.0857377	st
	2	9.53	2.33	7.2	3.0901288	st
7	1	7.73	2.87	4.86	1.6933798	m
	2	8.32	4	4.32	1.08	m
8	1	6.96	2.66	4.3	1.6165414	m
	2	7.63	3.55	4.08	1.1492958	m



Şekil 4.2. *A. oreophillum* türünde Feulgen boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

4.1.2. *Allium shearocephalon*

A. shearocephalon türünün mikroskop altında 400x büyütülmüş kromozom görüntüsü şekil 7’te sunulmuştur. Analiz edilen *A. shearocephalon* türünün kromozom boylarının 7.97 µm ile 13.16 µm arasında değiştiği gözlenmiştir. En kısa kromozom 7.97 µm ile 8.3 nolu kromozom, en uzun kromozom ise 13.16 µm ile 1.1 numaralı kromozom olarak belirlenmiştir. *A. shaerocephalon* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 5.1 numaralı kromozomda 1.78 değeri ile gerçekleşmiş buna karşılık en düşük kol indeksi ise 1.01 değeri ile 1.1 numaralı kromozomda gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Kromozom tipleri açısından *A. shaerocephalon* türü değerlendirildiğinde, en fazla metasentrik kromozom tipi (21 kromozomda) gözlenmiştir ve bunu 3 adet kromozom ile subtelosentrik kromozom tipi takip etmiştir. 17.2 nolu kromozomda NOR bölgesinin bulunduğu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *A.shearocephalon* türüne ait mitotik metafaz kromozomları ($2n=3x=24$)

Çizelge 4.2. *Allium shearocephalon* türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri

Homolog kromozom no		Kromozom boyu (μm)	p	q	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	13.16	6.51	6.65	1.0215054	m
	2	12.28	4.67	7.61	1.6295503	m
	3	11.33	4.72	6.61	1.4004237	m
2	1	11.45	4.93	6.52	1.3225152	m
	2	11.25	4.55	6.7	1.4725275	m
	3	11.05	5.39	5.66	1.0500928	m
3	1	11.16	5.05	6.11	1.209901	m
	2	10.34	4.68	5.66	1.2094017	m
	3	10.52	4.45	6.07	1.3640449	m
4	1	10.28	5.1	5.18	1.0156863	m
	2	10.01	4.3	5.71	1.327907	m
	3	10.64	4.46	6.18	1.3856502	m
5	1	10.23	3.67	6.56	1.7874659	sm
	2	9.61	3.51	6.1	1.7378917	sm
	3	10.3	3.79	6.51	1.7176781	sm
6	1	9.93	3.89	6.04	1.5526992	m
	2	9.8	4.74	5.06	1.0675105	m
	3	9.72	4.14	5.58	1.3478261	m
7	1	9.95	4.89	5.06	1.0347648	m
	2	9.49	4.05	5.44	1.3432099	m
	3	9.09	3.85	5.24	1.361039	m
8	1	8.52	3.59	4.93	1.3732591	m
	2	8.76	3.36	5.4	1.6071429	m
	3	7.97	3.31	4.66	1.407855	m



Şekil 4.4. *A. shearocephalon* türünde Feulgen boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

4.1.3. *Allium porrum*

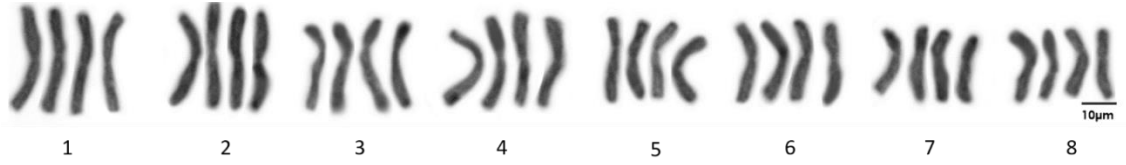
A. porrum türünün mikroskop altında 400x büyütülmüş kromozom görüntüsü şekil 9’da sunulmuştur. Analiz edilen *A. porrum* türünün kromozom boylarının 14.57 ile 24.18 μm arasında değiştiği gözlemiştir. En kısa kromozom 14.57 μm ile 8.4 nolu kromozom, en uzun kromozom ise 24.18 μm ile 1.2 numaralı kromozom olarak belirlenmiştir. *A. porrum* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 8.4 numaralı kromozomda 2.98 değeri ile gerçekleşmiş buna karşılık en düşük kol indeksi ise 1.006 değeri ile 2.3 numaralı kromozomda gözlenmiştir (Çizelge 4.3). Kromozom tipleri açısından *A. porrum* türü değerlendirildiğinde, 16 adet kromozomda submetasentrik kromozom tipi (16 ve geri kalan 16 adet kromozomda ise metasentrik kromozom tipi gözlenmiştir. *A. porrum* türünün tetraploit karyogramı Şekil 4.5’de sunulmuştur.



Şekil 4.5. *A. porrum* türüne ait mitotik metafaz kromozomları $2n=4x=32$

Çizelge 4.3. *Allium porrum* türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri

Homolog Kromozom no		Kromozom boyu (µm)	p	q	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	23.24	8.73	14.51	1.66208477	m
	2	24.18	11.58	12.6	1.0880829	m
	3	22.78	10.1	12.68	1.25544554	m
	4	22.79	10.36	12.43	1.19980695	m
2	1	22.46	11	11.46	1.04181818	m
	2	22.29	9.75	12.54	1.28615385	m
	3	21.87	10.9	10.97	1.00642202	m
	4	22.31	10.75	11.56	1.07534884	m
3	1	22.08	5.61	12.33	2.19786096	sm
	2	21.32	7.82	13.5	1.726342	sm
	3	20.4	7.3	13.1	1.7929	sm
	4	21.58	7.48	14.1	1.8850	sm
4	1	20.03	7.63	12.4	1.62888283	m
	2	19.17	7.17	12	1.673640	m
	3	18.93	7.04	11.89	1.688920	m
	4	18.93	7.11	11.82	1.662447	m
5	1	18.37	5.49	12.88	2.34608379	sm
	2	18.22	5.09	13.13	2.57956778	sm
	3	18.16	6.16	12	1.94805	sm
	4	18.19	6.39	11.8	1.846635	sm
6	1	17.94	6.8	11.14	1.6382	m
	2	17.63	6.9	10.73	1.555072	m
	3	17.48	6.92	10.56	1.52601156	m
	4	17.62	7.79	9.83	1.2618742	m
7	1	16.57	5.2	11.37	2.18653846	sm
	2	16.5	5.22	11.28	2.16091954	sm
	3	16.48	6.08	10.4	1.71052632	sm
	4	16.41	5.82	10.59	1.81958763	sm
8	1	15.28	5.31	9.97	1.87758945	sm
	2	15.03	5.39	9.64	1.78849722	sm
	3	15.84	5.84	10	1.71232877	sm
	4	14.57	2.28	6.8	2.98245614	sm

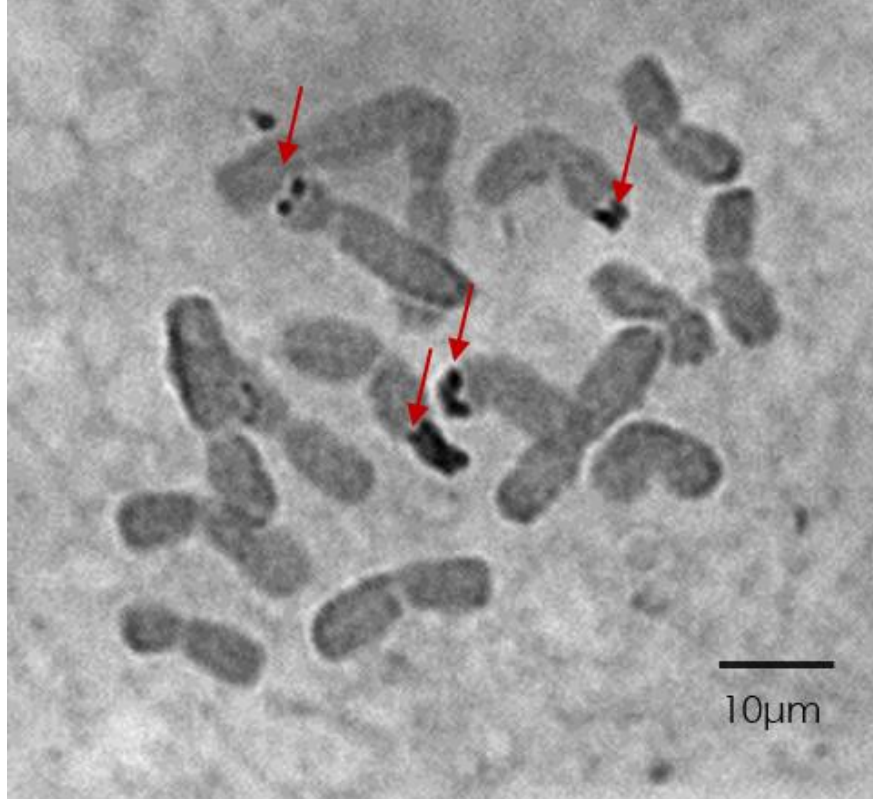


Şekil 4.6. *A. porrum* türünde Feulgen boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

4.2. GÜMÜŞ boyama

Gümüş boyama, nükleolar organizatörü bölgeleri (NOR) ile ilişkili proteinlerin boyanmasında kullanılmaktadır (Ag-NORs) ve 35S rDNA gen bölgesinin transkripsiyonel olarak aktif olan lokuslarını göstermektedir. Bu çalışmada, analizi yapılan türler içerisinde 35S rDNA gen bölgesinin transkripsiyonel olarak aktif olduğu en az bir çiftten fazla olan lokuslar gözlenmiştir. Çoğu zaman 35S rDNA lokusu pozitif CMA3 bantları ile birlikte yer almıştır.

4.2.1. *Allium oreophillum*

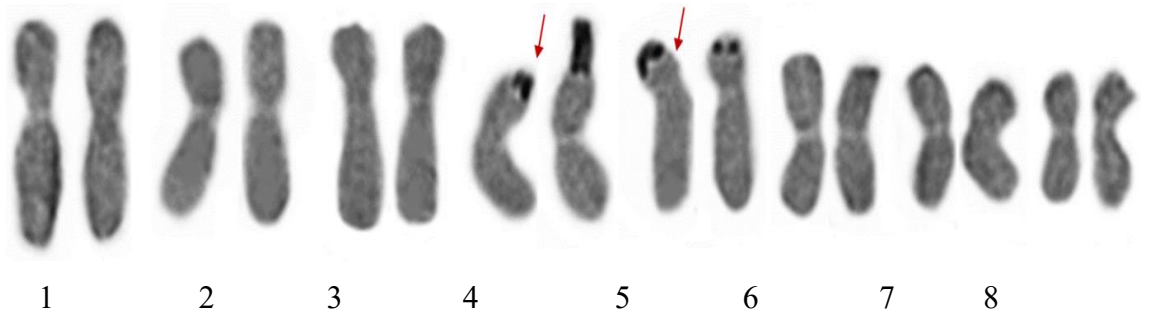


Şekil 4.7. *A.oreophillum* türünün gümüş nitrat ile boyanmış mitotik metafaz kromozomları ($2n=2x=16$)

Gümüş boyama sonucunda, sadece 4 lokusun transkripsiyonel olarak aktif olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7). Gümüş boyama yöntemi ile oluşturulan karyogram incelendiğinde, 4. ve 5. homolog kromozonlarda aktif 35S rDNA lokusu gözlenmiştir (Şekil 4.8).

Gümüş boyama analizinden elde edilen *A. oreophillum* türünün kromozom boylarının 7.07 ile 13.43 μm arasında değiştiği gözlenmiştir. *A. oreophillum* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 3.45 ile 5.1 numaralı kromozomda gerçekleşmiş. en düşük kol indeksi ise 1.12 ile 2.1 numaralı kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. oreophillum* türü değerlendirildiğinde kromozomlarda 10 adet kromozomda (1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 6.1, 6.2, 7.1, 7.2, 8.1, 8.2

numaralı kromozomlar) metasentrik, 2 adet kromozomda (3.1, 3.2) submetasentrik, ve 4 adet kromozomunda (4.1, 4.2, 5.1, 5.2) ise subtelosentrik olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

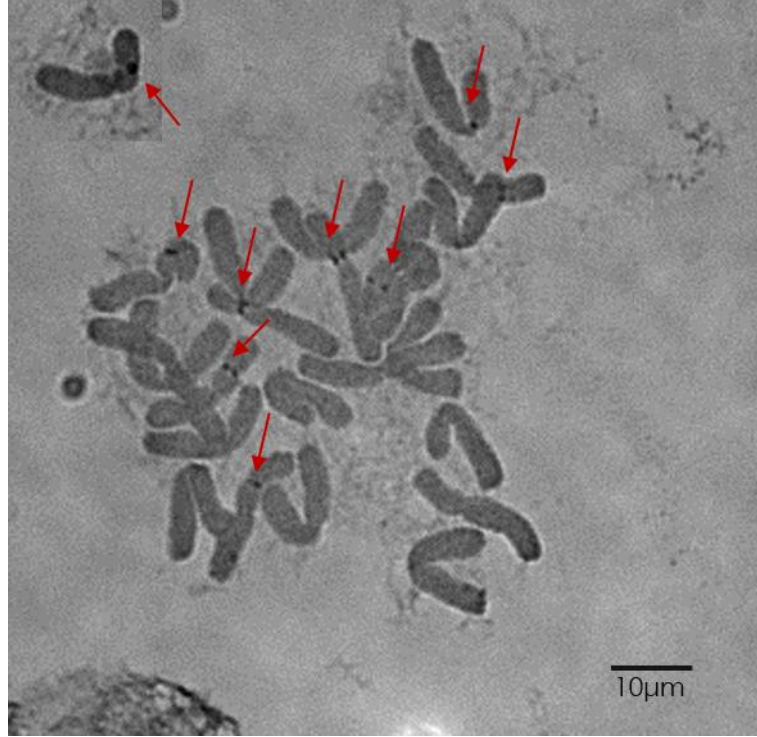


Şekil 4.8. *A. oreophillum* türünde Gümüş boyama ile elde edilmiş mitotic metafaz kromozomlarının karyotipleri

Çizelge 4.4. *Allium oreophillum* türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri

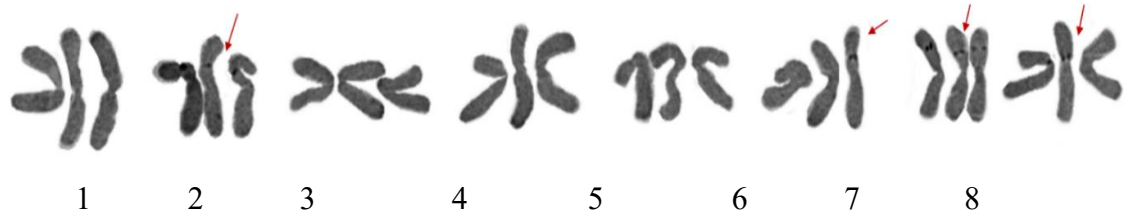
Homolog kromozom no		Kromozom boyu (µm)	p	q	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	13.43	5.92	7.51	1.26858108	m
	2	12.79	5.04	7.75	1.53769841	m
2	1	11.61	5.46	6.15	1.12637363	m
	2	10.6	4.49	6.11	1.36080178	m
3	1	11.32	4.12	7.2	1.74757282	sm
	2	10.55	3.5	7.05	2.01428571	sm
4	1	11.3	2.8	8.5	3.03571429	st
	2	11.06	2.48	8.58	3.45967742	st
5	1	10.8	2.55	8.25	3.23529412	st
	2	9.45	2.3	7.15	3.10869565	st
6	1	10.53	4.51	6.02	1.33481153	m
	2	8.07	3.2	4.87	1.521875	m
7	1	8.27	3.8	4.47	1.17631579	m
	2	8.49	3.41	5.08	1.48973607	m
8	1	7.07	2.77	4.3	1.55234657	m
	2	7.62	2.87	4.75	1.65505226	m

4.2.2. *Allium shearocephalon*



Şekil 4.9. *A. shearocephalon* türüne ait mitotik metafaz kromozomları ($2n=3x=24$)

Gümüş boyama sonucunda sadece 8 lokusun transkripsiyonel olarak aktif olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9). Gümüş boyama metot ile oluşturulan karyogram incelendiğinde; 2, 6, 7, ve 8 numaralı kromozom gruplarına ait kromozomlarda 35S rDNA lokusu belirlenmiştir (Şekil 4.10). Gümüş boyama ile analiz edilen *A. Shearocephalon* türünün kromozom boylarının 9.39 ile 14.29 μm arasında değiştiği gözlenmiştir. *A. Shearocephalon* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 5.1 numaralı kromozomda 2.27 ile gerçekleşmiştir, buna karşılık en düşük kol indeksi ise 1.05 ile 6.2 numaralı homolog kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. shearocephalon* türü değerlendirildiğinde 1.1, 1.2, 1.3, 3.1, 3.2, 3.3, 4.1, 4.2, 4.3, 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, ve 7.3 numaralı kromozomların metasentrik geriye kalan diğer kromozomların ise submetasentrik olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

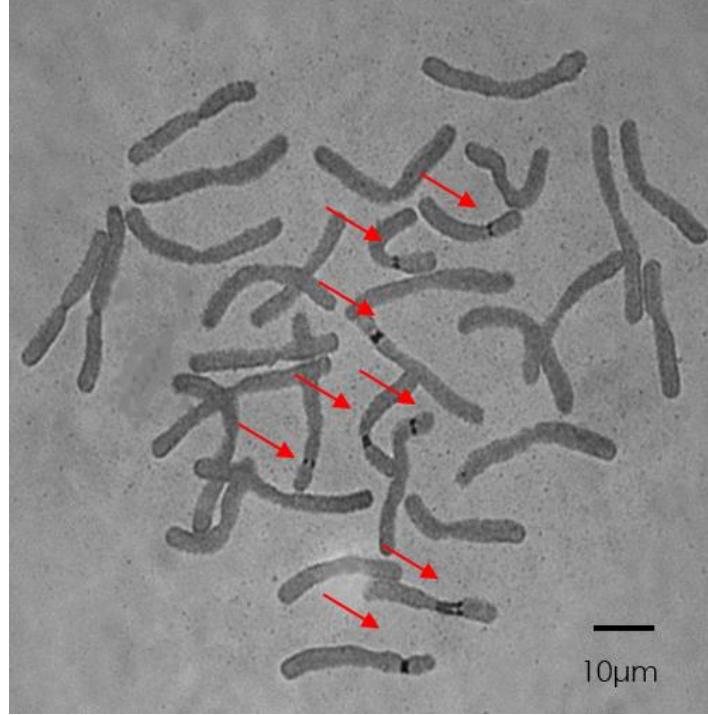


Şekil 4.10. *A.shearocephalon* türünde Gümüş boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

Çizelge 4.5. *Allium shearocephalon* türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri

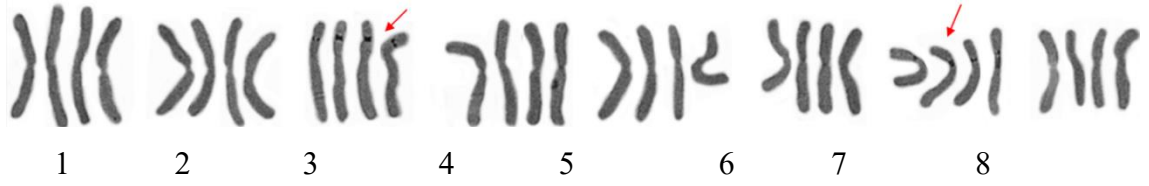
Homolog kromozom no		Kromozom boyu (µm)	q	p	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	14.29	7.41	6.88	1.0770349	m
	2	13.66	7.6	6.06	1.2541254	m
	3	12.95	7.16	5.79	1.2366149	m
2	1	12.5	8.2	4.3	1.906976	sm
	2	11.74	8.12	3.62	2.2430939	sm
	3	10.99	7.02	3.97	1.768262	sm
3	1	11.73	6.64	5.09	1.3045187	m
	2	11.14	7.63	4.51	1.691796	m
	3	11.64	7.14	4.5	1.58666	m
4	1	11.57	6.85	4.72	1.451271	m
	2	11.65	6.24	5.41	1.1534196	m
	3	11.51	6	5.51	1.0889292	m
5	1	11.46	7.96	3.5	2.2742857	sm
	2	11.43	7.5	3.93	1.9083969	sm
	3	11.17	7.22	3.95	1.8278481	sm
6	1	11.09	6.3	4.79	1.3152401	m
	2	11.03	5.66	5.37	1.0540037	m
	3	10.54	6.34	4.2	1.5095238	m
7	1	10.89	5.76	5.13	1.122807	m
	2	10.47	6.45	4.02	1.6044776	m
	3	10.94	6.7	4.24	1.5801887	m
8	1	10.88	7.14	3.74	1.9090909	sm
	2	10.28	6.94	3.34	2.07784	sm
	3	9.39	6.4	2.99	2.14046	sm

4.2.3. *Allium porrum*



Şekil 4.11. *A. porrum* türüne ait mitotik metafaz kromozomları $2n=4x=32$

Gümüş boyama sonucunda sadece 8 lokusun transkripsiyonel olarak aktif olduğunu gözlenmiştir (Şekil 4.11). Gümüş boyama metodu ile oluşturulan karyogram incelendiğinde, 3 ve 7 kromozom gruplarına ait kromozomların 35S rDNA lokusuna sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12). Gümüş boyama yöntemi ile analiz edilen *A. porrum* türünün kromozom boylarının 19.85 ile 43.11 μm arasında değiştiği gözlenmiştir. *A. porrum* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 8.4 numaralı kromozomda 2.78 ile gerçekleşmiştir buna karşılık en düşük kol indeksi ise 1.01 ile 1.3 numaralı kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. porrum* türü değerlendirildiğinde en fazla metasentrik kromozom tipi (24 adet: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 7.1, 7.2, 7.3, ve 7.4 numaralı kromozomlarda) gözlenmiştir ve geriye kalan 8 adet kromozomda ise submetasentrik kromozom tipi gözlenmiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.12. *A. porrum* türünde Gümüş boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

Çizelge 4.6. *Allium porrum* türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri

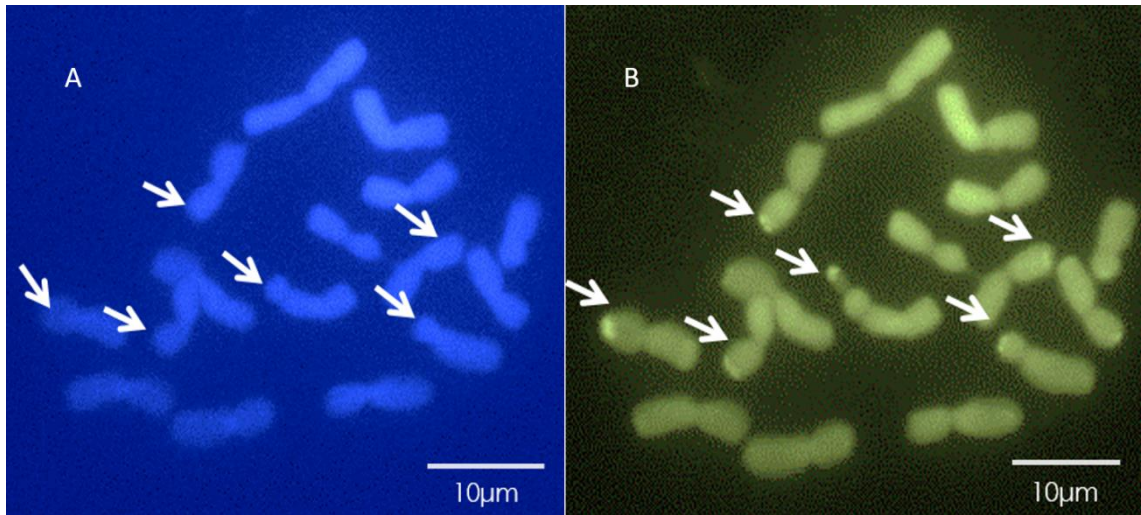
Homolog Kromozom no		Kromozom boyu (µm)	q	p	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	43.11	22.51	20.6	1.09271845	m
	2	38.72	20.44	18.28	1.11816193	m
	3	36.77	18.56	18.21	1.01922021	m
	4	33.8	17.67	16.13	1.09547427	m
2	1	32.79	17.25	15.54	1.11003861	m
	2	32.45	16.4	16.05	1.02180685	m
	3	32.38	19.99	12.39	1.6133979	m
	4	32.36	18.89	13.47	1.40237565	m
3	1	31.5	19.97	11.53	1.73200347	sm
	2	31.34	19.87	11.47	1.73234525	sm
	3	31.61	20.2	11.41	1.7703768	sm
	4	30.42	19.5	10.92	1.7857142	sm
4	1	30.71	17.21	13.5	1.27481481	m
	2	29.43	15.73	13.7	1.14817518	m
	3	29.25	16.04	13.21	1.21423164	m
	4	27.18	16.38	10.8	1.51666667	m
5	1	27.44	17.2	10.24	1.6796875	m
	2	26.65	16.55	10.1	1.63861386	m
	3	27.35	16.92	10.43	1.622243	m
	4	26.51	15.84	10.67	1.48453608	m
6	1	26.28	15.05	11.23	1.34016028	m
	2	26.13	14.86	11.27	1.31854481	m
	3	26.03	14.56	11.47	1.26939843	m
	4	25.84	13.89	11.95	1.1623431	m
7	1	25.69	14.53	11.16	1.30197133	m
	2	25.41	14.18	11.23	1.26268923	m
	3	25.03	14.56	10.47	1.39063992	m
	4	24.57	14.62	9.95	1.46934673	m
8	1	23.72	16.9	6.82	2.47800587	sm
	2	22.5	14.35	8.15	1.7607362	sm
	3	24.7	16.63	8.07	2.06071871	sm
	4	19.85	14.61	5.24	2.78816794	sm

4.3. DAPI ve CMA3

Bu çalışmada, kromomisin (CMA3) ve DAPI floresan boyama teknikleri ile karyotip çalışması yapılmıştır. Kromomisin ile GC baz çiftleri açısından zengin kromozom bölgeleri, DAPI ile AT baz çiftleri bakımından zengin bölgelerin işaretlenmesi gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. *Allium oreophillum*

A. oreophillum türünde 6 pozitif CMA3 bandı gözlenmiştir (şekil 4.13). Pozitif CMA3 bantları ile beraber lokalize olmuş negatif DAPI (DAPI-) bantları da tespit edilmiştir. Kromomisin ve DAPI boyama metotları ile oluşturulan karyogram incelendiğinde 5, 6 ve 7. homolog kromozom çiftlerinde CMA3 + bantları belirgin olarak gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.13. *A.oreophillum* türüne ait mitotik metafaz kromozomları ($2n=2x=16$)

A) DAPI boyaması sonucu kromozomların görünümü

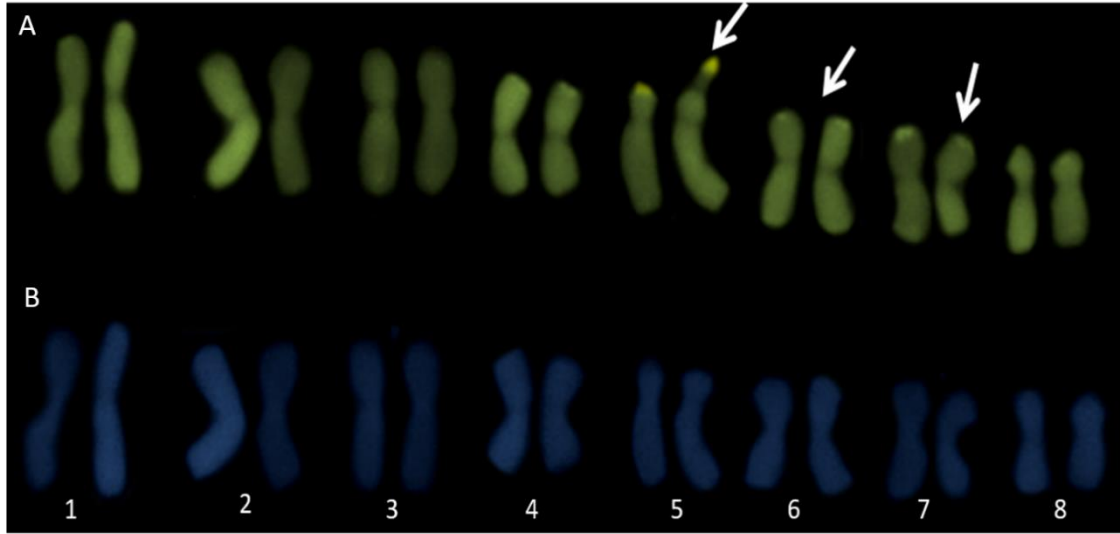
B) Kromomisin boyaması sonucu kromozomların görünümü

Kromomisin ve DAPI floresans boyama yöntemi ile analiz edilen *A. oreophillum* türünün kromozom boylarının 5.87 ile 13.37 μm arasında değiştiği gözlenmiştir. *A. oreophillum* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek

kol indeksi 6.35 ile 5.1 numaralı kromozomda gerçekleşmiştir, en düşük kol indeksi ise 1.05 ile 7.1 numaralı kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. oreophillum* türünde en fazla metasentrik kromozom tipi (10 adet kromozomda; 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 4.1, 4.2, 6.1, 6.2, 7.1, 7.2 numaralı kromozomlar) gözlenmiştir bunu submetasentrik kromozom tipi (4 adet; 3.1, 3.2, 8.1, 8.2 numaralı kromozomlar) ve subtelosentrik kromozom tipi (2 adet; 5.1 ve 5.2 numaralı kromozomda) takip etmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *Allium oreophillum* türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri

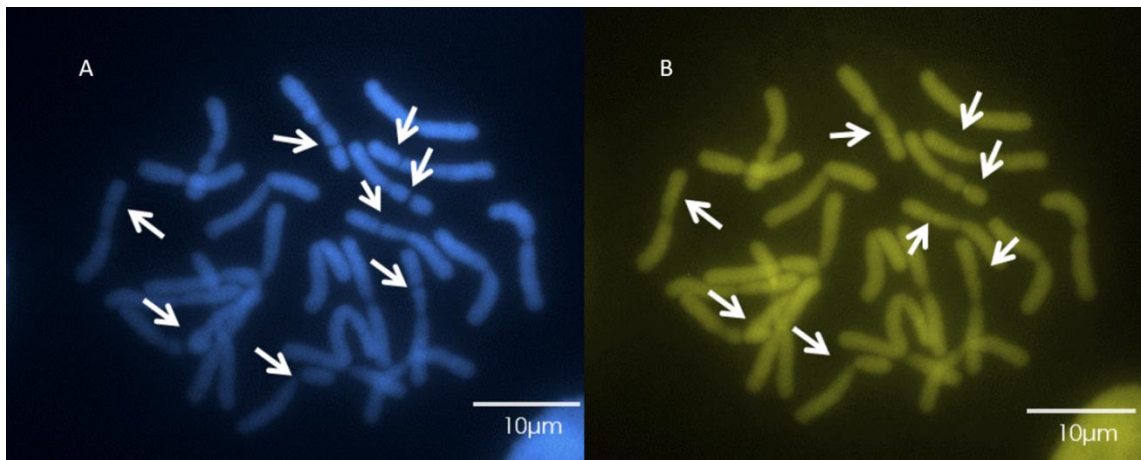
Homolog kromozom no		Kromozom boyu (µm)	q	p	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	13.37	7.46	5.91	1.262267343	m
	2	10.66	7	4.2	1.666666667	m
2	1	10.49	5.44	5.05	1.077227723	m
	2	10.26	5.84	4.42	1.321266968	m
3	1	9.29	6.04	3.25	1.858461538	sm
	2	9.3	6	3.3	1.818181818	sm
4	1	8.82	4.92	3.9	1.261538462	m
	2	9.04	4.94	4.1	1.204878049	m
5	1	8.82	7.62	1.2	6.35	st
	2	8.01	6.61	1.4	4.721428571	st
6	1	8.31	4.65	3.66	1.270491803	m
	2	8.53	4.69	3.84	1.221354167	m
7	1	7.08	3.62	3.46	1.046242775	m
	2	8.62	4.77	3.85	1.238961039	m
8	1	7.26	5.05	2.21	2.285067873	sm
	2	5.87	4.15	1.72	2.412790698	sm



Şekil 4.14. *A. oreophillum* türünde A) CMA3 ve B) DAPI boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

4.3.2. *Allium shearocephalon*

A. shearocephalon'da sekiz pozitif CMA3 bandı tespit edilmiştir. Pozitif CMA3 bantları ile beraber lokalize olmuş negatif DAPI (DAPI-) bantları da gözlenmiştir (şekil 4.15). Kromomisin ve DAPI boyama metotları ile oluşturulan karyogram incelendiğinde 5, 7 ve 8. kromozom gruplarında CMA3 + bantları belirgin olarak gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. *A. shearocephalon* türüne ait mitotik metafaz kromozomları ($2n=3x=24$)

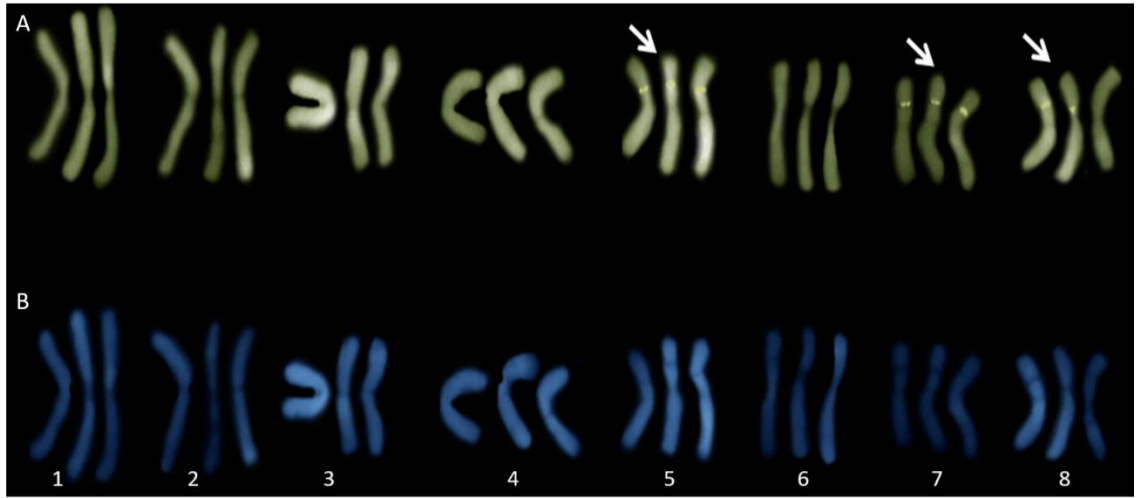
A) DAPI boyaması sonucu kromozomların görünümü

B) Kromomisin boyaması sonucu kromozomların görünümü

Kromomisin ve DAPI floresan boyama yöntemi ile analiz edilen *A. shearocephalon* türünün kromozom boylarının 13.35 ile 21.28 μm arasında değiştiği gözlenmiştir. *A. shearocephalon* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 8.2 numaralı kromozomda 2.9 ile gerçekleşmiştir buna karşılık en düşük kol indeksi ise 1.03 ile 1.3 numaralı kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. shearocephalon* türü değerlendirildiğinde 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2, 3.3, 4.1, 4.2, ve 4.3 numaralı kromozomların metasentrik, 5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.2 ve 8.3 numaralı kromozomların ise submetasentrik kromozom tipine sahip olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. *Allium shearocephalon* türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri

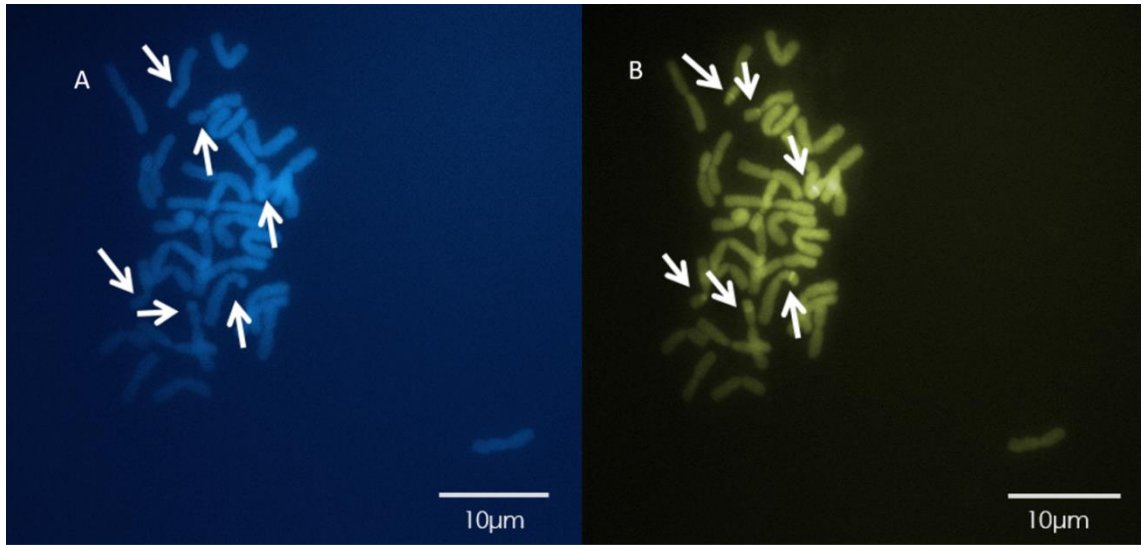
Homolog kromozom no		Kromozom boyu (μm)	p	q	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	21.28	7.89	13.39	1.6970849	m
	2	20.21	9.85	10.36	1.0517766	m
	3	19.43	9.63	9.8	1.0176532	m
2	1	18.01	8.39	9.62	1.1466031	m
	2	17.73	7.24	10.49	1.448895	m
	3	17.63	8.47	9.16	1.081464	m
3	1	17.17	6.57	10.6	1.6133942	m
	2	16.97	7.77	9.2	1.1840412	m
	3	16.77	6.56	10.21	1.5564024	m
4	1	16.49	8.12	8.37	1.0307882	m
	2	16.17	7.77	8.4	1.0810811	m
	3	16.04	7.61	8.43	1.107753	m
5	1	15.99	5.49	10.5	1.912568	sm
	2	15.95	5.55	10.4	1.873873	sm
	3	15.23	4.37	10.86	2.4851259	sm
6	1	14.94	5.36	9.58	1.7873134	sm
	2	14.26	4.66	9.6	2.06008	sm
	3	14.18	5.19	8.99	1.732177	sm
7	1	14.07	4.9	9.17	1.8714286	sm
	2	14.16	5.21	8.95	1.717850	sm
	3	13.79	5.1	8.69	1.7039216	sm
8	1	13.76	5.09	8.67	1.7033399	sm
	2	13.35	3.35	10	2.9850746	sm
	3	13.87	4.77	9.1	1.907756	sm



Şekil 4.16. *A. shearocephalon* türünde A) CMA3 ve B) DAPI boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

4.3.3. *Allium porrum*

A. porrum türünün 3 ve 8. kromozom grubunda 6 adet pozitif CMA3 bandı gözlenmiştir (Şekil 4.17A ve 4.18). Pozitif CMA3 bantları ile beraber lokalize olmuş negatif DAPI (DAPI-) bantları da gözlenmiştir (Şekil 4.17B).



Şekil 4.17. *A. porrum* türüne ait mitotik metafaz kromozomları $2n=4x=32$

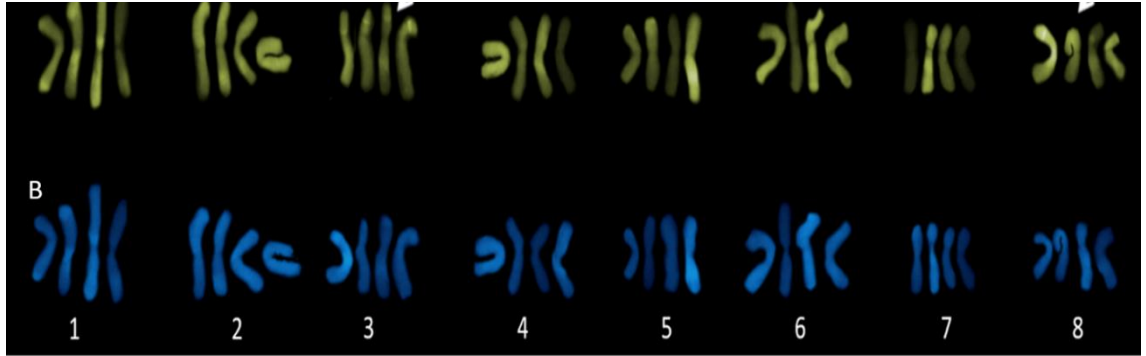
A) DAPI boyaması sonucu kromozomların görünümü

B) Kromomisin boyaması sonucu kromozomların görünümü

Kromomisin ve DAPI floresan boyama yöntemi ile analiz edilen *A. porrum* türünün kromozom boylarının 9.98 ile 18.73 μm arasında değiştiği gözlenmiştir. *A. porrum* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 8.3 numaralı kromozomda 2.74 ile gerçekleşmiş buna karşılık en düşük kol indeksi ise 1,03 ile 2.4 numaralı kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. porrum* türü değerlendirildiğinde 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 6.1, 6.2, 6.3, ve 6.4 numaralı kromozomların metasentrik 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 8.1, 8.2, 8.3, ve 8.4 numaralı kromozomların ise submetasentrik olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *Allium porrum* türüne ait mitotik metafaz kromozomların bazı özellikleri

Homolog Kromozom no		Kromozom boyu (µm)	p	q	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	18.73	6.95	11.78	1.69496403	m
	2	16.22	6.49	9.73	1.49922958	m
	3	15.22	6.56	8.66	1.32012195	m
	4	15.1	6.88	8.22	1.19476744	m
2	1	14.98	6.19	8.79	1.42003231	m
	2	14.35	6.93	7.42	1.07070707	m
	3	14.9	7.24	7.66	1.05801105	m
	4	14.23	6.99	7.24	1.03576538	m
3	1	14.02	5.07	8.95	1.765286	sm
	2	13.45	4.5	8.95	1.98888889	sm
	3	14.03	5.07	8.96	1.7672838	sm
	4	13.91	4.71	9.2	1.95329087	sm
4	1	13.7	6.39	7.31	1.14397496	m
	2	13.63	6.55	7.08	1.08091603	m
	3	13.12	6.39	6.73	1.05320814	m
	4	11.78	4.38	7.4	1.68949772	m
5	1	13.31	5.94	7.37	1.24074074	m
	2	12.39	5.48	6.91	1.26094891	m
	3	12.87	4.95	7.92	1.6	m
	4	12.04	4.91	7.13	1.452138	m
6	1	12.9	5.54	7.36	1.32851986	m
	2	12.01	4.99	7.02	1.40681363	m
	3	11.5	4.87	6.63	1.3613963	m
	4	10.77	4.88	5.89	1.20696721	m
7	1	10.42	3.57	6.85	1.91876751	sm
	2	10.66	3.56	7.1	1.99438202	sm
	3	10.58	3.59	6.99	1.94707520	sm
	4	10.21	3.53	6.68	1.8923512	sm
8	1	10.55	3.66	6.89	1.88251366	sm
	2	10.45	4	10.38	2.595	sm
	3	10.57	2.82	7.75	2.74822695	sm
	4	9.98	3.64	6.34	1.74175824	sm



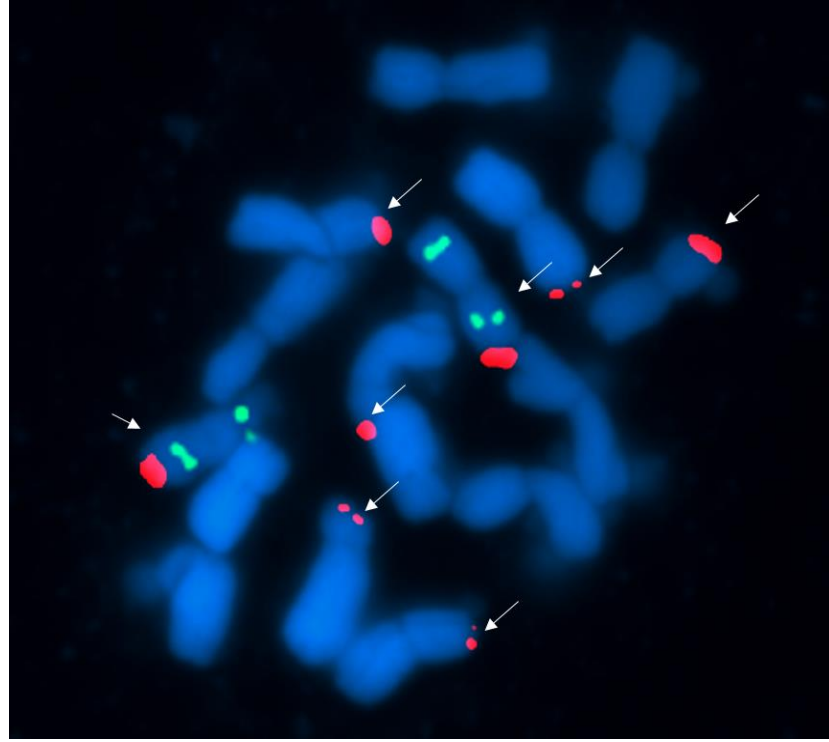
Şekil 4.18. *A. porrum* türünde A) CMA3 ve B) DAPI boyama ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

4.4. FISH

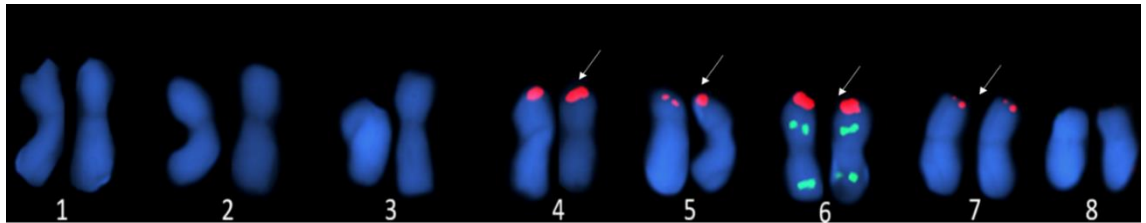
Gelişmiş stomoleküler teknik olarak FISH, DNA dizilerinin fiziksel olarak kromozom üzerinde haritalanmasını sağlar. Araştırmamızda, prob olarak 5S ve 25S rDNA bölgeleri kullanılarak FISH yöntemi ile rRNA gen lokuslarının dağılımı analiz edilmiştir.

4.4.1. *Allium oreophillum*

FISH analizi sonucu *A. oreophillum* türünün kromozom görüntüsü şekil 6.19’te sunulmuştur. Analiz edilen *A. oreophillum* türünün kromozom boylarının 3.75 ile 6.63 μm arasında değiştiği gözlenmiştir. En kısa kromozom boyu 3.75 μm ile 8.2 numaralı kromozom, en uzun ise 6.63 μm ile 1.1 numaralı kromozom olmuştur. *A. oreophillum* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 3.36 ile 5.1 numaralı kromozomda gerçekleşmiş ve en düşük kol indeksi ise 1.01 ile 1.1 numaralı kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. oreophillum* türü değerlendirildiğinde 12 adet kromozomun (1.1 ,1.2, 2.1, 2.2. 3.1. 3.2. 6.1. 6.2. 7.1. 7.2. 8.1 ve 8.2 numaralı kromozomlar) metasentrik, 2 adet kromozomun (5.1 ve 5.2 numaralı kromozomlar) submetasentrik ve 2 adet kromozomun (4.1, 4.2) subtelosentrik olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.10).



Şekil 4.19. *A. oreophillum* türünün FISH metodu ile boyanmış mitotik metafaz kromozomları ($2n=2x=16$), □ 25S rDNA ve □ 5S rDNA olarak kullanılır



Şekil 4.20. *A. oreophillum* türünde FISH metodu ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

A. oreophillum ($2n = 16$)'nın somatik hücrelerinde 4, 5, 6 ve 7 kromozom çiftlerinin kısa kolunun uç kısımlarında (subterminal) dört çift 25S rDNA lokusu gözlenmiştir. Altıncı kromozom çifti üzerinde 4 adet 5S rDNA hibridizasyon sinyali tespit edilmiştir. Bu sinyaller 6. kromozom çiftinin kısa ve uzun bacaklarında yer almıştır.

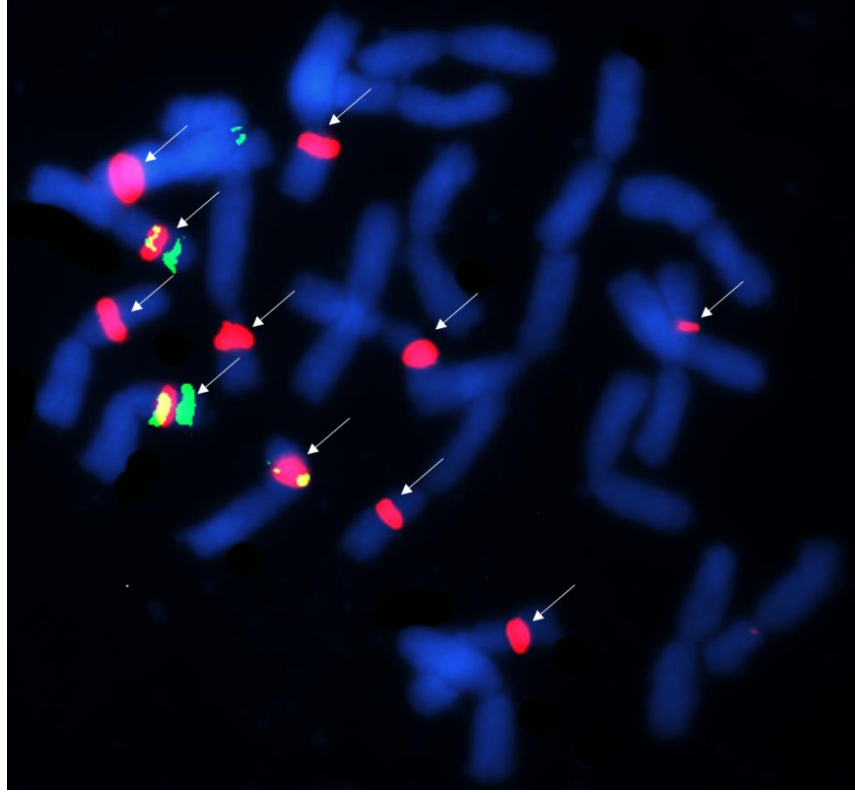
Çizelge 4.10. *Allium oreophillum* türüne ait mitotik metafaz kromozomların boy özellikleri

Homolog kromozom no		Kromozom boyu (µm)	p	q	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	6.63	3.29	3.34	1.0151976	m
	2	6.17	2.44	3.73	1.5286885	m
2	1	5.98	2.28	3.7	1.622807	m
	2	5.92	2.2	3.72	1.6909091	m
3	1	5.92	2.21	3.71	1.678733	m
	2	5.82	2.42	3.4	1.4049587	m
4	1	5.95	2.17	3.78	1.7419355	sm
	2	5.27	1.88	3.39	1.8031915	sm
5	1	5.45	1.25	4.2	3.36	st
	2	5.05	1.2	3.85	3.2083333	st
6	1	5.21	2.48	2.73	1.1008065	m
	2	5.15	1.91	3.24	1.6963351	m
7	1	5.22	2.12	3.1	1.4622642	m
	2	5.16	2.03	3.13	1.5418719	m
8	1	4.26	1.64	2.62	1.597561	m
	2	3.75	1.55	2.62	1.6903226	m

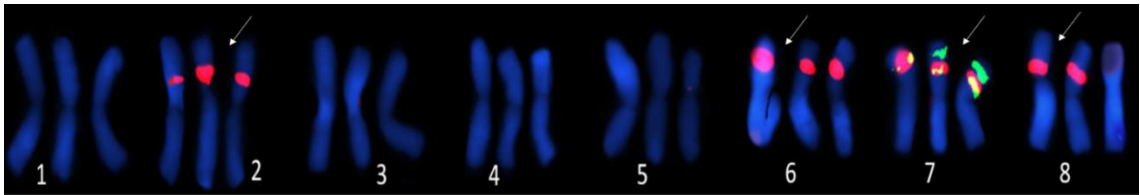
4.4.2. *Allium sphaerocephalon*

A. sphaerocephalon türünün kromozom görüntüsü şekil 6.21’te sunulmuştur. Analiz edilen *A. sphaerocephalon* türünün kromozom boylarının 6.69 ile 10.08 µm arasında değiştiği gözlenmiştir. En kısa kromozom boyu 6.69 µm ile 8.3 numaralı kromozom, en uzun ise 10.08 µm ile 1.1 numaralı kromozom olmuştur. *A. sphaerocephalon* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 3.56 ile 4.1 numaralı kromozomda gerçekleşmiş ve en düşük kol indeksi ise 1.02 ile 6.1 numaralı kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. sphaerocephalon* türü değerlendirildiğinde 15 adet kromozomun (1.1. 1.2, 1.3. 2.1. 2.2. 2.3. 4.1. 4.2. 4.3. 7.1. 7.2. 7.3. 8.1. 8.2 ve 8.3 numaralı kromozomlar) metasentrik ve geriye kalan 9 adet

kromozomun (3.1, 3.2, 3.3, 5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2 ve 6.3 numaralı kromozomlarda) submetasentrik olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.11).



Şekil 4.21. *A. sphaerocephalon* türüne ait mitotik metafaz kromozomları ($2n=3x=24$), □ 25S rDNA ve □ 5S rDNA olarak kullanılır



Şekil 4.22. *A. sphaerocephalon* türünde FISH metodu ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

5S rDNA'nın hibridizasyon sinyalleri 7. kromozom grubunun iki kromozomunun kısa kolları üzerinde lokalize olmuştur. Her bir kromozom iki adet 5S rDNA genleri lokusa sahip olduğu gözlenmiş ve bunlar 35S rDNA lokusunu kapsayan bölge içerisinde yer almıştır.

Çizelge 4.11. *Allium sphaerocephalon* türüne ait mitotik metafaz kromozomların boy özellikleri

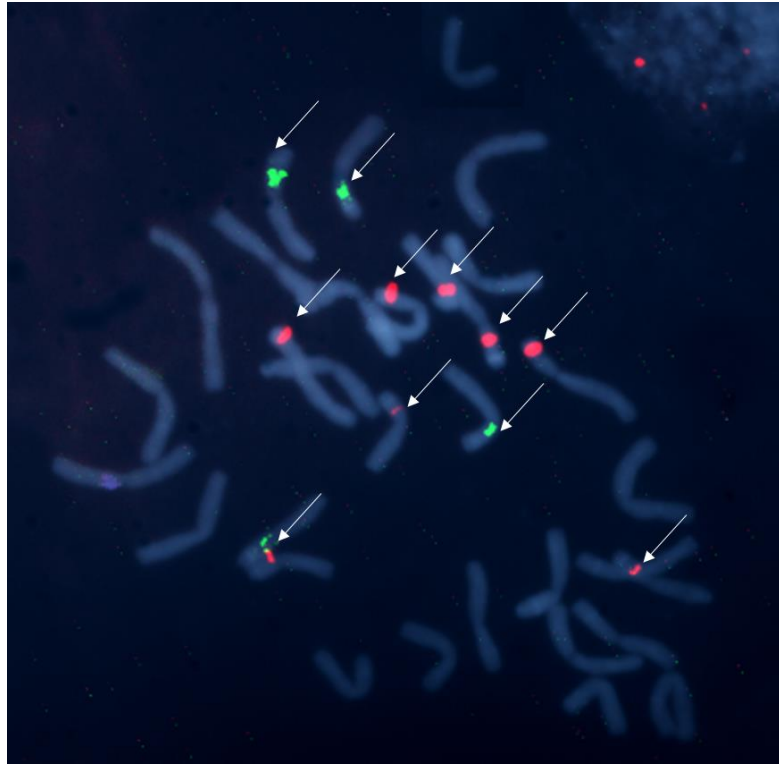
Homolog kromozom no		Kromozom boyu (µm)	p	q	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	10.08	7.45	3.35	2.22388059	sm
	2	9.8	6.5	3.3	1.96969697	sm
	3	9.46	6.55	2.91	2.25085911	sm
2	1	9.44	6.85	2.59	2.64478764	sm
	2	9.14	6.02	3.12	1.92948718	sm
	3	9.22	6.73	2.49	2.70281124	sm
3	1	9.1	4.7	4.4	1.06818182	m
	2	9.03	4.64	4.39	1.05694761	m
	3	8.99	4.8	4.19	1.14558473	m
4	1	8.59	6.71	1.88	3.56914894	sm
	2	8.51	6.45	2.06	3.13106796	sm
	3	8.31	6.2	2.11	2.93838862	sm
5	1	8.4	5.05	3.35	1.50746268	m
	2	8.17	4.73	3.44	1.375	m
	3	8.11	4.61	3.5	1.31714286	m
6	1	8.11	4.11	4	1.0275	m
	2	7.94	4.64	3.3	1.40606061	m
	3	7.88	4.64	3.24	1.43209877	m
7	1	7.83	5.46	2.37	2.30379747	sm
	2	7.39	4.75	2.64	1.79924242	sm
	3	7.74	5.09	2.65	1.92075447	sm
8	1	7.5	5.4	2.1	2.57142857	sm
	2	7.29	4.79	2.5	1.916	sm
	3	6.69	4.48	2.21	2.02714932	sm

4.4.3. *A. porrum*

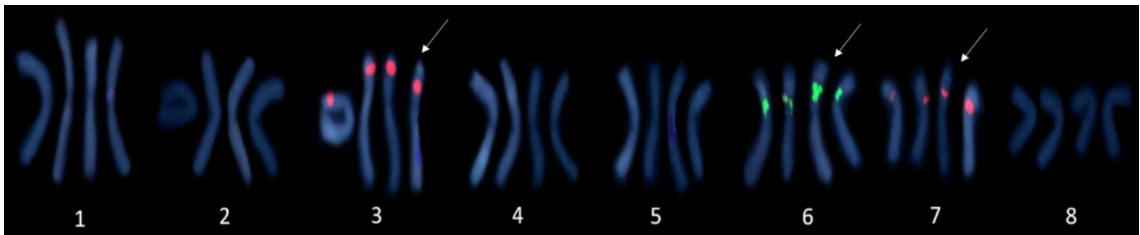
A. porrum türünün kromozom görüntüsü Şekil 4.23'te sunulmuştur. Analiz edilen *A. porrum* türünün kromozom boylarının 8.16 ile 13.35 µm arasında değiştiği gözlenmiştir. En kısa kromozom boyu 8.16 µm ile 8.3 numaralı kromozom, en uzun ise 13.35 µm ile 1.1 numaralı kromozom olmuştur. *A. porrum* türü kromozomları kol indeksi açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kol indeksi 2.55 ile 8.2 numaralı kromozomda gerçekleşmiş ve en düşük kol indeksi ise 1.004 ile 1.1 numaralı kromozomda gözlenmiştir. Kromozom tipleri açısından *A. porrum* türü değerlendirildiğinde 24 adet kromozomun (1.1. 1.2, 1.3. 1.4. 2.1. 2.2. 2.3. 2.4. 3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 4.1. 4.2. 4.3. 4.4. 5.1. 5.2. 5.3. 5.4. 7.1. 7.2. 7.3 ve 7.4 numaralı kromozomlar) metasentrik ve geriye kalan 8

adet kromozomun (6.1. 6.2 ,6.3. 6.4. 8.1. 8.2. 8.3 ve 8.4 numaralı kromozomlarda) ise submetasentrik olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

A. porrum ($2n = 32$)'nın somatik hücrelerinde 3 ve 7. kromozom grubu içerisinde yer alan tüm kromozomlarda 25S rDNA lokusu gözlenmiştir (şekil 4.24). Altıncı kromozom grubuna ait 4 adet kromozomun kısa bacakları üzerinde 5S rDNA hibridizasyon sinyali tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.23. *A.porrum* türüne ait mitotik metafaz kromozomları $2n=4x=32$, □ 25S rDNA ve □ 5S rDNA olarak kullanılır



Şekil 4.24. *A.porrum* türünde FISH metodu ile elde edilmiş mitotik metafaz kromozomlarının karyotipleri

Çizelge 4.12. *Allium porrum* türüne ait mitotik metafaz kromozomların boy özellikleri

Homolog Kromozom no		Kromozom boyu (µm)	q	p	Kol indeksi	Kromozom tipi
1	1	13.35	6.69	6.66	1.0045045	m
	2	13.24	7.19	6.05	1.1884298	m
	3	12.89	7.5	5.39	1.3914657	m
	4	12.56	6.64	5.92	1.1216216	m
2	1	11.95	6.87	5.08	1.3523622	m
	2	11.62	6.4	5.22	1.2260536	m
	3	11.98	7.66	5.32	1.4398496	m
	4	11.38	5.9	5.48	1.0766423	m
3	1	11.67	6.98	4.69	1.4882729	m
	2	11.52	6.28	5.24	1.19847328	m
	3	11.44	6.56	4.88	1.3442623	m
	4	11.11	5.94	5.17	1.1489362	m
4	1	10.99	6.83	4.16	1.64182692	m
	2	10.54	5.77	4.77	1.2096436	m
	3	10.29	6.33	3.96	1.5984848	m
	4	10.12	5.39	4.73	1.1395349	m
5	1	10.01	5.75	4.26	1.3497652	m
	2	9.56	5.7	3.86	1.4766839	m
	3	9.32	5.51	3.81	1.4461942	m
	4	9.32	5.11	4.21	1.21377672	m
6	1	9.04	6.44	2.6	2.47692307	sm
	2	9.37	6.42	2.95	2.1762712	sm
	3	9.34	6.53	2.81	2.3238434	sm
	4	9.22	6.38	2.84	2.24647887	sm
7	1	8.73	5.01	3.72	1.3467742	m
	2	8.7	5.1	3.6	1.4166667	m
	3	8.53	4.58	3.95	1.1594937	m
	4	8.52	5.16	3.36	1.53571428	m
8	1	8.5	5.49	3.01	1.8239203	sm
	2	8.31	5.97	2.34	2.5512821	sm
	3	8.2	5.25	2.95	1.77966101	sm
	4	8.16	5.79	2.37	2.443038	sm

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında analizi yapılmış olan *Allium* türlerinin, literatürde bu cinse dair belirtilen üç temel kromozom sayısını ($x=7, 8, 9$) ihtiva ettiği tespit edilmiştir (Jones and Rees, 1968). Somatik kromozomların $2n= 14, 16, 18$ kromozom sayısı taşıdığına dair elde edilen bulguların yalnızca literatür verileriyle değil, aynı zamanda Bitki Kromozom Sayısı Endeksinde belirtilen verilerle de örtüştüğü görülmektedir (www.tropicos.org/Project/PCN).

Diploid nitelik taşıyan soğan türlerinden *A. nigrum* haricindeki örneklerin karyogramlarında homolog kromozomların tespiti kolay bir biçimde gerçekleştirilmiştir. *Allium* cinsine ait türlerin karyotiplerinde kromozomları homolog çiftler halinde görüntülemenin zorluğuna rağmen, bu tez çalışması kapsamında görüntülemeleri yapılabilmektedir. Bu durumun özellikle 35S rDNA lokuslarını içeren kromozomlarda belirgin bir şekilde görülebiliyor olması, kromozomların hibrit nitelikleri taşıdıkları ile ilişkili bir durum ihtiva etmektedir. *Allium* cinsi içerisinde yer alan diploid türler ile tek ploid içeren türlerin varlığına ek olarak; çoğunlukla analiz edilen *A. porrum* gibi tetraploid, *A. sphaerocephalon* gibi hekzaploid veya *A. cornutum* gibi triploid gibi poliploid türler de yer almaktadır (Fredotovic *et al.* 2014).

Elde edilen sonuçlara bakıldığında, *A. porrum* ile *A. sphaerocephalon* türlerinin karyotipleri ile sinaptik davranışlarının diğerlerinden farkını izah etmede, bu türlerin otopoliploid olabilme ihtimalinin son derece olası bir açıklama olduğu düşünülmektedir (Stack and Roelofs 1996; Loidl and Jones 2004). İsimleri verilen türlerde rDNA lokuslarının kromozomal organizasyonuna rastlamak, otopoliploidi ihtimalini güçlendiren veri niteliğindedir. rDNA lokuslarının kromozomal nitelikleri düşünüldüğünde, otopoliploidi bilgisini destekleyecek benzer kromozom grupları içeriğinde benzer rDNA lokuslarının varlığını tespit etmek son derece kolay olmaktadır. *A. sphaerocephalon* karyotipinde bahsedilen rDNA modeline sahip olan kromozomların poliploidizasyon sonrasında belirgin bir şekilde uzunluk farklılığı sergilediği tespit edilmiştir. Bu durumun kromozomların reorganizasyonu ihtimalini akıllara getirdiği

yadsınamaz bir gerçektir. Literatürde yer alan önceki çalışmalar *A. sphaerocephalon*'un hem diploid hem triploid hem de tetraploid kromozom grupları içeren karışık bir tür olduğunu açıkça göstermektedir (Johnson and Ozhatay 1996). Bu kromozom gruplarının hangi kaynaklardan geldiğine dair bir çalışmanın varlığına rastlanmamıştır. Bu amaçla türlerin poliploidi kökenlerine ışık tutulması için hem filogenetik hem de sitogenetik (GISH) yöntemlerin kullanımı ile daha yoğun çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında yer alan *A. oreophilum*, *A. sphaerocephalon* ve *A. porrum* isimlerindeki üç tür için rDNA lokalizasyonları tespit edilmiştir. *A. fistulosum* numunesi için elde edilen rDNA lokusları sayısı ile lokalizasyonlarının daha önce gerçekleştirilen çalışmalarla korelasyon sergilediği açıkça görülmektedir (Lee *et al.* 1999; Son *et al.* 2012; Kirov *et al.* 2017).

A. sativum bitkisinin kromozomları üzerinde yapılan incelemede bir kromozom çiftinin kısa kolunda yalnızca iki çift 5S rDNA lokusu tespit edilmesine rağmen, literatürde aynı türe ait 5S rDNA lokusu sayısının biri uzun kolda, diğer ikisi aynı kromozomun kısa kolunda olacak şekilde üç adet olarak belirlendiği rapor edilmiştir (Lee *et al.* 1999; Son *et al.* 2012). rDNA gen lokusu sayısındaki intraspesifik polimorfizmlerin gözleendiği bu durum; *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Prospero* gibi pek çok türde de gözlenmiştir (Jang *et al.* 2013; Kolano *et al.* 2013; Kolano *et al.* 2015).

Ortanca bitkilerinin karyotiplerinin genellikle bir veya iki çift interstisyel 5S rDNA lokusu ile iki çift 35S rDNA lokusuna sahip oldukları bilinmektedir (Roa and Guerra 2012; Garcia *et al.* 2017; Vitales *et al.* 2017). Bu tez kapsamında üzerinde çalışılan *Allium* türlerinde interstisyel ile perisentromerik pozisyonda daha fazla olacak şekilde ikiden fazla 5S rDNA lokus çifti bulunduğu ortaya koyulmaktadır (Vitales *et al.* 2017; <http://www.plantrdnadatabase.com>).

Birçok angiosperm türlerinde olduğu gibi *Allium* türlerinde de kısa kolda subtelomerik pozisyonda 35S rDNA lokuslarının daha sık bir şekilde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu

lokusların sayılarının diploid türlerde bir ila dört çift arasında değiştiği belirlenmiştir (Roa and Guerra 2012). *Allium*'un poliploid türlerinin somatik hücrelerinde (triploid *A. sphaerocephalon*) 35S rDNA'ya ait 12 hibridizasyon sinyali gözlenmiştir. Bunlara ek olarak şüana kadar rDNA lokusları bakımından analiz edilen *Allium* türü sayısının 30'un altında olması dolayısıyla, cins içerisindeki rDNA lokuslarının dağılımına dair genel bir sonuç çıkarmanın zorluğu aşıkardır.

Allium cinsinde 35S ve 5S rDNA ile elde edilen kromozomal desenlerin son derece değişken olduğu düşünülmektedir (<http://www.plantrdnadatabase.com/>). Bu durum yalnızca *Allium* cinsi ve türlerine özgü bir durum değildir. *Brassica* ile *Paphiopedilum* dahil, birçok farklı bitki cinsinde aynı durumun varlığı rapor edilmiştir (Hasterok *et al.* 2006; Lan and Albert 2011). Diğer pek çok türle benzer bir nitelik arz edecek şekilde, *Allium* türlerinde de 35S rDNA lokuslarına ait FISH diyagramlarının, 5S rDNA diyagramlarına kıyasla daha polimorfik olduğu belirlenmiştir (Jang *et al.* 2016; Chiarini *et al.* 2017; Garcia *et al.* 2017).

Bu duruma ek olarak *A. sorrum* türüne ait 5S rDNA lokus sayısında intraspesifik olarak polimorfizm varlığı saptanmıştır. Bitkiye ait karyogramda yer alan homolog kromozomlar arasındaki lokus dağılımında farklılıklar tespit edilmiştir. rDNA lokuslarındaki sayısal varyasyon ile ilişkili olan bu durum; hem tarımı yapılan birçok bitki türünde (örneğin *Brassica rapa*, *Amaranthus caudatus*; Hasterok *et al.* 2006; Kolano *et al.* 2013) hem de yabani türlerde sıklıkla görülmektedir (örneğin, *Prospero autumnale*; Jang *et al.* 2013). Bunlara ek olarak rDNA lokus sayılarının pek çok bitki türünde ve cinslerde (örneğin, *Glycine*, *Daucus*) korunduğuna dair kanıtlar da mevcuttur (Iovene *et al.* 2008; Singh *et al.* 2001).

rDNA lokuslarına ait sayısal, pozisyonel veya spesifik olmayan varyasyon durumlarını açıklamak için; transpozon aracılı olaylar, homolog/homolog olmayan eşitsiz geçiş ile gen dönüşümü ve kromozomal yeniden düzenlemeler, lokus replikasyonu/silinmesi gibi çeşitli mekanizmalardan faydanılmıştır. Fakat eldeki verilerin *Allium*'daki varyasyonların mekanizmalarını daha ayrıntılı açıklanması için yeterli olmadığı

düşünülmektedir (Thomas *et al.* 1996; Altinkut *et al.* 2006; Datson and Murray 2006; Raskina *et al.* 2008).

Koromozomlarda AT ile GC baz çiftleri bakımından zengin bölgelerin tespit edilmesi için kromomisin A3 (CMA3) ve DAPI ile çift floresan boyama tekniğinden faydalanılmıştır (Schweizer 1976). Analizi gerçekleştirilen *Allium* türlerinin çoğunda, 35S rDNA lokuslarının daha önceden tespiti gerçekleştirilen GC bakımından zengin kromatin blokları olduğu anlaşılmıştır (Guerra 2000).

Maragheh *et al.* (2019) yaptıkları çalışmada, *A. oreophilum* ve *A. sphaerocephalon* türlerinde CMA3 + bantlarının sayısı, 35S rDNA lokuslarının sayısından daha küçük olduğunu, *A. karatoviense*, *A. moly* ve *A. fistulosum* türlerinin 35S rDNA lokuslarının sayısından daha fazla CMA3 + bant varlığı olduğunu bildirmişlerdir. *A. moly* türünde tespit edilen iki adet ilave CMA3+ bandının, 5S rDNA lokuslarına karşılık geldiği belirtmişlerdir. 5S rDNA lokusları ile GC bakımından zengin heterokromatin oluşumu arasındaki ilişkiye dair literatürde son derece az veri bulunmaktadır (Cabral ve diğerleri, 2006; Hamon ve diğerleri, 2009; Kolano ve diğerleri, 2013). Gerçekleştirilen bu gözlemin hem 5S rDNA dizi bileşimlerini hem de bitişik heterokromatin doğasına dair bilgi taşıdığı düşünülmektedir.

Maragheh *et al.* (2019) bazı *Allium* türlerinin sitogenetiği üzerine yaptıkları çalışmada *A. karataviense* türünün sadece iki adet ilave CMA3 + bant taşıdığını gözlemişler ve bu bantların 35S rDNA veya 5S rDNA ile birlikte lokalize olup olmadığı araştırmamışlardır. *A. fistulosum* türünde gözlenen CMA3 bantlarının literatürde verilen diyagramdan farklı nitelik arz ettiği belirtmişlerdir. Bu türün CMA3 + bantlarının dağılımının, *A. cepa* türünde tespit edilen diyagrama benzer nitelik arz ettiği tespit edilmiştir (Kim *et al.* 2002). CMA3+ bantların satellit tekrarlarından oluşan heterokromatin bantlarına da karşılık gelebileceği düşünülmektedir (Do *et al.* 2001; Chiarini *et al.* 2014; da Costa Silva *et al.* 2014).

A. cepa ile *A. fistulosum* türlerinde her bir kromozom kolunun terminal pozisyonlarından birinde CMA3+ bantların varlığına rastlanmıştır. Bu bantların benzerlik bakımından birbirine son derece yakın olan türlerde tespit edilen terminal heterokromatin ile aynı yerde gözlemlendiği dikkat çekmektedir (Do *et al.* 2001; Fesenko *et al.* 2002; Kirov *et al.* 2017).

Maragheh *et al.* (2019) bazı *Allium* türlerinin sitogenetiği üzerine yaptıkları çalışmada, pozitif DAPI bantları yalnızca AT bakımından zengin heterokromatin bloklarının varlığını *A. nigrum* türünde tespit etmişlerdir. Bu bantların pozitif CMA3 ile 35S veya 5S rDNA lokusları ile kolokalize olduğu anlaşılmıştır. DAPI+/CMA3+ varyasyonunun bitkilerde az görünen bir durum olmasına rağmen *Cestrum* cinsinde bu varyasyonunun varlığı rapor edilmiştir (Fernandes *et al.* 2009). Bu duruma ek olarak, CMA3+ ve DAPI+ bantların aslında kolokalize olmamış olmaları, ancak kromozomlara çok yakın pozisyonlara yerleşmiş olmaları da ihtimal dahilindedir. Çalışmamızda, düşük çözünürlük ve yüksek oranda yoğunlaşmış mitotik kromozomların kullanımı ile bahsi geçen bu iki farklı kromatin bandının ayırt edilmesi mümkün olmamıştır.

rRNA genlerinin sayısı, ribozomların bir araya gelmesinin devamlılığı açısından bir ilişki bulunmamaktadır. Sadece rDNA genlerinin küçük bir kısmı transkrip olmaktadır. 35S rDNA lokuslarının ise sadece önemli kısımları ökaryotların çoğunda heterokromatinize edilmektedir (Volkov *et al.* 2004). Diploid olan *Allium* türlerinde, türe bağlı olarak bir veya iki çift 35S rDNA lokusunun transkripsiyonel olarak aktif olduğu gözlenirken, tetraploid *A. porrum*'da dört çift rDNA lokusunun transkripsiyonel olarak aktif olduğu tespit edilmiştir. Triploid *A. sphaerocephalon*'un karyotipinde 35S rDNA lokuslarının yalnızca üçte birinin aktif olduğu tespit edilmiştir. Bu türün 35S rDNA lokusu içeren dört ayrı grup kromozom (her grup içerisinde üç kromozom bulunmaktadır.) içermektedir. Grup içeriğindeki kromozomlardan yalnızca bir tanesinin NOR bölgesi olduğu belirlenmiştir. Bahsedilen bu iki türün kökeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu iki türde de rDNA bölgelerinin susturulması (nükleolar baskınlık durumu) neticesinde elde edilenler pek çok melez ile allopoliploidlerde belirlenmiştir (Pikaard 2000; Tucker *et al.* 2010). Yapılan rDNA gen susturma işlemi

temelde DNA metilasyonu ile histon modifikasyonlarında değişiklikler gerçekleştirilmesi şeklinde ortaya koyulan düzenleme işlemidir. Bu işlemin sonucunda hibridizasyon veya poliploidizasyon arından NOR bölgelerinin bu şekilde epigenetik açıdan düzenlenmesi; nukleolar baskınlığa eğilimi olan hibrit veya allopoliploidlerin ana alt genomları arasında bir takım değişkenlikleri ortaya çıkarabilmektedir (Tucker *et al.* 2010; Borowska-Zuchowska and Hasterok 2017).

Sonuç olarak filogenetik analizlere katkı sağlaması açısından sitogenetik çalışmalar son derece önemlidir. Sitogenetik, modern ışlah programları kapsamında araştırıcıya gerekli olan genom bilgilerini ve evrimsel parametrelerle ilişkili verileri en faydalı şekilde aktarım yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Gerçekleştirilen bu tez çalışması, rDNA dizilerinin *Allium* türlerinde oldukça iyi birer kromozom belirteçleri olduğunu ortaya koymuştur. rDNA lokuslarının kromozomal yapıları bakımından yüksek değişkenliğe sahip olmasının, rDNA sekansları dolayısıyla FISH çalışmalarına uygun olma durumlarının *Allium* karyotiplerini karşılaştırmalı bir biçimde analiz etme gerekliliği ortaya çıktığında son derece faydalı araçlar olabileceğini açıkça göstermektedir. Ortaya koyulan bu tez çalışmasında elde edilen veriler göstermiştir ki; hibridizasyon sinyalleri bakımından zenginliği araştırmada, çeşitli bantlarla ortaya koyulan modellerin incelenmesinde, hibrit veya poliploid türlerin orijinlerinin belirlenmesinde de oldukça faydalı olacaktır. Bu tez çalışması ile önemli bazı *Allium* türlerinin rDNA kromozomal organizasyonunun karşılaştırmalı analiz edilmiştir. Ayrıca, rDNA lokus organizasyonunun ve bu cins kapsamındaki evrimin tam olarak anlaşılması için, özellikle yabani türlerin kullanımı ile daha geniş bir örneklemenin yapılması zorunluluktur.

KAYNAKÇA

- Albini S., 1994. A karyotype of the *Arabidopsis thaliana* genome derived from synaptonemal complex analysis at prophase I of meiosis. *Plant J*, 5:665–72.
- Altinkut, A., Raskina, O., Nevo, E., Belyayev, A., 2006. En/Spm-like transposons in Poaceae species: transposase sequence variability and chromosomal distribution. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11, 214-230.
- Alvarez I, Wendel JF., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol* 29:417–434
- Ambros PF, Matzke MA, Matzke AJ., 1986. Detection of a 17 kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 94:11–8.
- Anandhan, S., Mote, S.R. and Gopal, J., 2014. “Evaluation of onion varietal identity using SSR markers”, *Seed Science and Technology* 42, 279–285.
- Astley, D., Innes, N.L. and Van der Meer, Q.P., 1982. Genetic resources of *Allium* species, *IBPGR secretariat*, Rome, Italy, s.38.
- Barton DW., 1950. Pachytene morphology of the tomato chromosome complement. *Am J Bot*, 37:639–43.
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ., 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses - 807 new estimates. *Ann Bot* 86:859–909. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1253>
- Borowska-Zuchowska, N., Hasterok, R., 2017. Epigenetics of the preferential silencing of *Brachypodium stacei*-originated 35S rDNA loci in the allotetraploid grass *Brachypodium hybridum*. *Sci. Rep.* 7, 5260.
- Bougourd, S. M. and Parker, J. S., 1976. Nucleolar-organiser polymorphism in natural populations of *Allium schoenoprasum*. *Chromosoma* 56: 301-307.
- Brewster, J.L., *Onions and Other Vegetable Alliums*, *CAB International*, Cambridge, 2008.
- Butt, A.M., 1968. Vegetative growth, morphogenesis and carbohydrate content of the onion plant as a function of light and temperature under field- and controlled conditions. PhD Thesis, *Ain Shams University*, Netherlands, s. 35-89.
- Buzar, A.G.R., Oliveira, V.R. and Boiteux, L.S., 2007. “Estimating genetic diversity of onion germplasm via morphological, agronomic, and biochemical descriptors”, *Horticultura Brasileira* 25, 527-532.
- Cabral, J.S., Felix, L.P., Guerra, M., 2006. Heterochromatin diversity and its colocalization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillarias* species (Orchidaceae). *Genet. Mol. Biol.* 29, 659–664.
- Caspersson, T., Farber, S., Foley, G.E., 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res*; 49:219–22.
- Chiarini, F., Moreno, N., Moré, M., Barboza, G., 2017. Chromosomal changes and recent diversification in the Andean genus *Jaborosa* (Solanaceae). *Bot J. Linn. Soc.* 183, 57-74.
- Creighton HB, McClintock B., 1931. A correlation of cytological and genetical crossing-over in *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 17:492–7.

- Cunha, C.P., Hoogerheide, E.S.S., Zucchi, M.I., Monteiro, M. and Pinheiro, J.B., 2012. "New microsatellite markers for garlic, *Allium sativum* (Alliaceae)", American Journal of Botany 99, 17-19.
- da Costa Silva, S., Mendes, S., Soares Filho, W.d.S., Pedrosa-Harand, A., 2014. Chromosome homologies between Citrus and Poncirus—the comparative cytogenetic map of mandarin (*Citrus reticulata*). Tree Genet. Genomes 11, 811.
- Datson, P., Murray, B.G., 2006. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? Chromosome Res. 14.
- de Jong, JH, Fransz P, Zabel P., 1999. High resolution FISH in plants - techniques and applications. Trends Plant Sci 4:258-263.
- de Sarker D, JohnsonMAT, Reynolds A, Brandham PE., 1997. Cytology of the highly polyploid disjunct species, *Allium dregeanum* (Alliaceae), and of some Eurasian relatives. Bot J Linn Soc 124:361–373. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1997.tb02002.x>
- Do, G.S., Seo, B.B., Yamamoto, M., Suzuki, G., Mukai, Y., 2001. Identification and Chromosomal Location of Tandemly Repeated DNA Sequences in *Allium cepa*. Genes Genet. Syst. 76, 53-60.
- Dolatyari A, Saeidi Mehrvarz S, Shahzadeh Fazeli SA, Naghavi MR, Fritsch RM., 2018. Karyological studies of Iranian *Allium* L.(Amaryllidaceae) species with focus on sect. Acanthoprason. 1.Mitotic chromosomes. Plant Syst Evol 304:583–606. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1489-5>
- Evans, I. J., James, A. M. and Barnes, S., 1983. Organisation and evolution of repeated DNA sequences in closely related plant genomes. /. Molec. Biol. 170: 803-826.
- Fajkus P., 2016. *Allium* telomeres unmasked: the unusual telomeric sequence (CTCGGTTATGGG)_n is synthesized by telomerase. Plant J 85:337–347. <https://doi.org/10.1111/tpj.13115>
- Federov, A. A. (ed.), 1969. Chromosome Numbers of Flowering Plants. Academy of Sciences of the USSR, Leningrad.
- Fernandes, T., Rego, L.d.N.A.d.A., Nardy, M., Yuyama, P.M., Vanzela, A.L.L., 2009. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. Genet. Mol. Biol. 32, 320-327.
- Fesenko, I.A., Khrustaleva, L.I., Karlov, G.I., 2002. Organization of the 378-bp satellite repeat in terminal heterochromatin of *Allium fistulosum*. Russ. J. Genet. 38, 745-753.
- Figueroa DM, Bass HW., 2010. A historical and modern perspective on plant cytogenetics. Brief Funct Genomics 9:95-102.
- Fransz PF, Stam M, Montijn BM., 1996. Detection of singlecopygenes and chromosome rearrangements in *Petuniahybrida* by fluorescence in situ hybridization. Plant J;9:767–74.
- Fredotovic, Z., Samanic, I., Weiss-Schneeweiss, H., Kamenjarin, J., Jang, T.S., Puizina, J., 2014. Triparental origin of triploid onion, *Allium x cornutum* (Clementi ex Visiani, 1842), as evidenced by molecular, phylogenetic and cytogenetic analyses. BMC Plant Biol. 14.
- Friesen N, Fritsch RM, Blattner FR., 2006. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. Aliso: a journal of systematic and evolutionary. Botany 22:372–395

- Fritsch RM, Blattner FR, Gurushidze M., 2010. New classification of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb & Berthel.) Rouy (Alliaceae) based on molecular and morphological characters. *Phyton* 49:145–220
- Gall JG, Pardue ML., 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63:378–383.
- Gall JG, Pardue ML., 1969. Formation and detection of RNADNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 63:378–83.
- Garcia, S., Kovařík, A., Leitch, A.R., Garnatje, T., 2017. Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. *The Plant Journal* 89, 1020–1030.
- Gill BS, Friebe B., 1998. Plant cytogenetics at the dawn of the 21st century. *Curr Opin Plant Biol*, 1:109–15.
- Gill BS, Kimber G., 1974. The Giemsa C-banded karyotype of rye. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1247–9.
- Guerra, M., 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23, 1029–1041.
- Gurushidze M, Fritsch RM, Blattner FR., 2010. Species-level phylogeny of *Allium* subgenus *Melanocrommyum*: incomplete lineage sorting, hybridization and trnF gene duplication. *Taxon* 59:829–840
- Güler, Ü., Pehlivan, S., 2006. Pollen Morphology of Some Species Belonging to *Codonoprasum* and *Allium* Sections of *Allium* (Liliaceae-Alliaceae) genus, *Biologia*, Bratislava, 61/4: 449–455.
- Günay, A., 1992. Özel Sebze Yetiştiriciliği. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 2, 1–28, Ankara.
- Hamon, P., Siljak-Yakovlev, S., Srisuwan, S., Robin, O., Poncet, V., Hamon, S., deKochko, A., 2009. Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: a revised view of species differentiation. *Chromosome Res.* 17, 291–304
- Harper LC, Cande WZ., 2000. Mapping a new frontier; development of integrated cytogenetic maps in plants. *Funct Integr Genomics*, 1:89–98.
- Hasterok, R., Wolny, E., Hosiawa, M., Kowalczyk, M., Kulak-Ksiazczyk, S., Ksiazczyk, T., Heneen, W.K., Maluszynska, J., 2006. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. *Ann. Bot.* 205–216.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T., 2011. Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant J* 66:18–33
- Hirave, P.S., Wagh, A.P., Alekar, A.N. and Kharde, R.P., 2015. “Performance of red onion varieties in kharif season under akola conditions”, *Journal of Horticulture* s. 2.
- Iovene, M., Grzebelus, E., Carputo, D., Jiang, J., Simon, P.W., 2008. Major cytogenetic landmarks and karyotype analysis in *Daucus carota* and other Apiaceae. *Am. J. Bot.* 95, 793–804.
- IPCN Chromosome Reports, <http://www.tropicos.org/Project/IPCN>, 05.03.2019.
- İlarslan, H., Koyuncu, M., 1997. Türkiye’de Yetişen Bazı Endemik *Allium* (Soğan) Türlerinin Tohum Morfolojileri, *Ot Sistematik Botanik Dergisi* 4 (1) : 99–116.
- Jakše, J., Martin, W., McCallum, J. and Havey, M.J., 2005. “Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar

- identification”, *Journal of The American Society for Horticultural Science* 130(6), s. 912-917.
- Jang, T.S., Emadzade, K., Parker, J., Temsch, E.M., Leitch, A.R., Speta, F., Weiss-Schneeweiss, H., 2013. Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *Bmc Evol. Biol.* 13, 136.
- Jang, T.-S., McCann, J., Parker, J.S., Takayama, K., Hong, S.-P., Schneeweiss, G.M., Weiss-Schneeweiss, H., 2016. rDNA loci evolution in the genus *Glechoma* (Lamiaceae). *Plos One* 11, e0167177.
- Jiang J, Gill BS., 2006. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, 49:1057–68.
- Jiang J, Gill BS., 2006. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW., 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223:582–7.
- Johnson, M.A.T., Ozhatay, N., 1996. Cytology of *Allium* sect. *Allium*, In: Mathew, B. (Ed.), *A Review of Allium sect. Allium*. Royal Botanic Gardens, Kew pp. 17-40.
- Jones RN., 1991. Cytogenetics of *Alliums*. In: Tsuchiya T, Gupta PK (eds) *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*, Part B. Elsevier, Amsterdam, pp 215-227.
- Jones, H. A. and Mann, L. K., 1963. *Onions and their Allies*. Interscience Publications, New York.
- Jones, H.A. and Davis, G.N., 1944. “Inbreeding and heterosis and their relation to the development of new varieties of onions”, *USDA Technical Bulletin* 874, 1-28.
- Jones, R. N., 1983. Cytogenetic evolution in the genus *Allium*. In: Swaminathan, M. S., Gupta, P. K. and Sinha, U. (eds). *Cytogenetics of Crop Plants*. Macmillan India, New Delhi.
- Jones, R.N., Rees, H., 1968. Nuclear DNA variation in *Allium*. *Heredity* 23, 591-605.
- Karavanov, A. A. and Iordansky, A. B., 1973. Comparative study of genome structure in *A. cepa* L. and *A. fistulosum* L. *Molekulyarnaya Biologiya* 7: 453-460.
- Kato A, Lamb JC, Birchler JA., 2004. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *ProcNatlAcad SciUSA*, 101:13554–9.
- Khar, A., Lawande, K. and Negi, K., 2011. “Microsatellite marker based analysis of genetic diversity in short day tropical Indian onion and cross amplification in related *Allium* spp.”, *Genetic Resources and Crop Evolution* 58, 741-752.
- Kik, C., 2008. “*Allium* genetic resources with particular reference to onion”, *Acta Horticulturae* 770, 135-138.
- Kim, E.S., Punina, E.O., Rodionov, A.V., 2002. Chromosome CPD(PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. *Russ. J. Genet.* 38, 392-398.
- Kim, H.J., Lee, H.R., Hyun, J.Y., Song, K.H., Kim, K.H., Kim, J.E., Hur, C.G. and Harn, C.H., 2012. “marker development for onion genetic purity testing using SSR finder”. *Korean Journal of Breeding Science* 44(4), 421-432.
- Kirov, I.V., Kiseleva, A.V., Van Laere, K., Van Roy, N., Khrustaleva, L.I., 2017. Tandem repeats of *Allium fistulosum* associated with major chromosomal landmarks. *Mol. Genet. Genomics* 292, 453-464.

- Kolano, B., Saracka, K., Broda-Cnota, A., Maluszynska, J., 2013. Localization of ribosomal DNA and CMA3/DAPI heterochromatin in cultivated and wild *Amaranthus* species. *Sci. Hortic.* 164, 249-255.
- Kolano, B., Siwinska, D., McCann, J., Weiss-Schneeweiss, H., 2015. The evolution of genome size and rDNA in diploid species of *Chenopodium* s.l. (Amaranthaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 179, 218-235.
- Kresovich, S. and McFerson, JR., 1992. Assessment and management of plant genetic diversity: consideration of intra- and interspecific variation. *Field Crop Research* 29, 185-204.
- Kurata N, Omura T., 1978. Karyotype analysis in rice I. A new method for identifying all chromosome pairs. *Jpn J Genet*, 54:251–5.
- Lamb JC, Birchler JA., 2006. Retroelement genome painting: cytological visualization of retroelement expansions in the genera *Zea* and *Tripsacum*. *Genetics*, 173:1007–21.
- Lan, T., Albert, V.A., 2011. Dynamic distribution patterns of ribosomal DNA and chromosomal evolution in *Paphiopedilum*, a lady's slipper orchid. *Bmc Plant Biol.* 11, 126.
- Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC., 1982. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:4381-4385.
- Lavania UC., 1978. Differential staining and plant chromosomes— progress in cytogenetics. *Curr Sci*, 47:255–60.
- Lee, G.A., Kwon, S.J., Park, Y.J., Lee, M.C., Kim, H.H., Lee, J.S., Lee, S.Y., Gwag, J.G., Kim, C.K. and Ma, K.H., 2011. “Cross-amplification of SSR markers developed from *Allium sativum* to other *Allium* species”, *Scientia Horticulturae* 128, 401–407.
- Lee, S.H., Do, G.S., Seo, B.B., 1999. Chromosomal localization of 5S rRNA gene loci and the implications for relationships within the *Allium* complex. *Chromosome Res.* 7, 89-93.
- Levan, A., 1935. Cytological studies in *Allium*. VI. The chromosome morphology of some diploid species of *Allium*. *Hereditas* 20: 289-330.
- Linde-Laursen I., 1975. Giemsa C-banding of the chromosomes of "Emir" barley. *Hereditas* 81:285–9.
- LiQ-Q, Zhou S-D, HeX-J, YuY, ZhangY-C, Wei X-Q., 2010. Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. *Ann Bot* 106:709–733. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq177>
- Loidl, J., 1983. Some features of heterochromatin in wild *Allium* species. *Plant System Evol.* 143: 117-131.
- Loidl, J., 1979. C-band proximity of chiasmata and absence of terminalisation in *Allium flavum* (Liliaceae). *Chromosoma* 73: 45-51.
- Loidl, J., Jones, G.A., 2004. Synaptonemal complex spreading in *Allium*. *Chromosoma* 93, 420-428.
- Lysak MA, Fransz PF, Ali HBM, et al., 2001. Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. *PlantJ*, 28:689–97.

- Lysak MA, Pecinka A, Schubert I., 2003. Recent progress in chromosome painting of Arabidopsis and related species. *Chromosome Res*;11:195–204.
- Magoon ML, Shambulinguppa KG. 1961. Karyomorphology of *Sorghum propinquum* and its bearing on origin of 40- chromosome sorghum. *Chromosoma*, 12:460–5.
- Mahajan, V., Jakše, J., Havey, M.J. and Lawande, K.E., 2009. “Genetic fingerprinting of onion cultivars using SSR markers”, *Indian Journal of Horticulture* 66, 62-68.
- Mallor, C., Arnedo-Andrés, M.S. and Garcés- Claver, A., 2014. “Assessing the genetic diversity of Spanish *Allium cepa* landraces for onion breeding using microsatellite markers”, *Scientia Horticulturae* 170, 24–31.
- Mallor, C., Carravedo, M., Estopañan, G. and Mallor, F., 2011. “Characterization of genetic resources of onion (*Allium cepa* L.) from the Spanish secondary center of diversity”, *Spanish Journal of Agricultural Research* 9 (1), 144-155.
- Manbachi, M., Khodadadi M., Abdoosi, V., Rahmatizadeh, A. and Majdi, S., 2012. “Survey of yield and bulb quantitative and qualitative traits in Iranian onion morphotypes”, *International Journal of Agricultural Science and Research* 3(6), 31-38.
- Maragheh FP, Janus D,1 Senderowicz M, Haliloglu K, & Kolano B., 2019. Karyotype analysis of eight cultivated *Allium* species. *Journal of Applied Genetics* doi:10.1007/s13353-018-0474-1
- Marasek-Ciolakowska A, Podwyszynska, M., 2008. Somaclonal variation in long-term micropropagated tulips (*Tulipa gesneriana* L.) determined by FISH analysis. *Floriculture Ornamental Biotech* 2:65–72
- McCallum, J., Thomson, S., Pither-Joyce, M., Kenel, F., Clarke, A. and Havey, M.J., 2008. “Genetic diversity analysis and single-nucleotide polymorphism marker development in cultivated bulb onion based on expressed sequence tag-simple sequence repeat markers”, *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133, 810-818.
- McClintock B., 1929. Chromosome morphology in *Zea mays*. *Science*, 69:629.
- McClintock B., 1932. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*, 26:234–82.
- McClintock B., 1938. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics*, 23:315–76.
- McClintock B., 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 226:792–801.
- Misra RN, Shastri SVS., 1967, Pachytene analysis in *Oryza*. VIII. Chromosome morphology and karyotypic variation in *O. sativa*. *IndianJ Genet & Plant Breed*, 27:349–68.
- Mitrová, K., Svoboda, P. and Ovesná, J., 2015. “The selection and validation of a marker set for the differentiation of onion cultivars from the Czech Republic”, *Czech Journal of . Genetic and Plant Breeding* 51(2), 62–67.
- Mok DWS, Mok MC. A, 1976. modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. *JHered*, 67:187–8.
- Ohri D, Fritsch R, Hanelt P., 1998. Evolution of genome size in *Allium* (Alliaceae). *Plant Syst Evol* 210:57–86

- Özgen, M., Adak, M.S., Söylemezoğlu, G. ve Ulukan, H., 2000. “Bitkisel gen kaynaklarının korunma ve kullanımında yeni yaklaşımlar”, *V. Türkiye Ziraat Mühendisliği Kongresi*, Ankara, s. 259-284, 17-21 Ocak.
- Özokutanoğlu, E., 2013. Moleküler markır kullanarak bazı yerel soğan (*Allium cepa* L.) çeşitlerinde ve ıslah edilen saf hatlarda sitoplazmaların belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, s. 18-33.
- Pardue ML, Gall JG., 1975. Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. *Methods Cell Biol*; 10:1–16.
- Pardue ML, Gall JG., 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *ProcNatlAcad SciUSA*, 64:600–4.
- Peacock WJ, Dennis ES, Rhoades MM., 1981. Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. *ProcNatl Acad SciUSA*, 78:4490–4.
- Pijnacker LP, Ferwerda MA., 1984. Giemsa C-banding of potato chromosomes. *CanJ GenetCytol*;26:415–9.
- Pikaard, C.S., 2000. The epigenetics of nucleolar dominance. *Trends Genet.* 16, 495-500.
- Plant rDNA database, <http://www.plantrdnadatabase.com/>, 05.03.2019.
- Rabinowitch, H.D. and Brewster, J.L. 1990. The Genus *Allium*, Onions and Allied Crops, v.1, **CRC Press** s: 5-23 .
- Ramanna MS, Parkken P., 1967. Structure of and homology between pachytene and somatic metaphase chromosomes of tomato. *Genetica*, 38:115–33.
- Ranjekar, P. K., Pollotta, D. and Lafontaine, J. G., 1978. Analysis of plant genomes. V. Comparative study of molecular properties of DNAs of seven *Allium* species. *Biochem. Genet.* 16: 957-969.
- Raskina, O., Barber, J.C., Nevo, E., Belyayev, A., 2008. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 120.
- Ricroch A, Yockteng R, Brown SC, Nadot S., 2005. Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome* 48:511–520.<https://doi.org/10.1139/g05-017>
- Roa F, Guerra M., 2015. Non-random distribution of 5S rDNA sites and its association with 45S rDNA in plant chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 146:243–249
- Roa, F., Guerra, M., 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *Bmc Evol. Biol.* 12.
- Schweizer D., 1973. Differential staining of plant chromosomes. *Chromosoma* ;40:307–20.
- Schweizer, D., 1976. Reverse fluorescent chromosome-banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58, 307–324.
- Seo jH, Lee BH, Seo BB, Yoon H-S., 2007. Identification of a molecular marker and chromosome mapping of the 5S rRNA gene in *Allium sacculiferum*. *J Plant Biol* 50:687–691. <https://doi.org/10.1007/bf03030614>
- Shastri SVS, Ranga Rao DR, Misra RN., 1960. Pachytene analysis in *Oryza*. I. Chromosome morphology in *Oryza sativa*. *IndianJ Genet & Plant Breed*, 20:15–21.
- Shen DL, Wang ZF, Wu M., 1987. Gene mapping on maize pachytene chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 95:311–4.

- Shibata F, Hizume M., 2002. The identification and analysis of the sequences that allow the detection of *Allium cepa* chromosomes by GISH in the allodiploid A. wakegi. *Chromosoma* 111:184–191. <https://doi.org/10.1007/s00412-002-0197-1>
- Singh, R.J., Kim, H.H., Hymowitz, T., 2001. Distribution of rDNA loci in the genus *Glycine* Willd. *Theor. Appl. Genet.* 103, 212-218.
- Son, J.-H., Park, K.-C., Lee, S.-I., Jeon, E.-J., Kim, H.-H., Kim, N.-S., 2012. Sequence variation and comparison of the 5S rRNA Sequences in *Allium* Species and their chromosomal distribution in four *Allium* species. *J. Plant Biol.* 55, 15-25.
- Stack, S. M. and Comings, D. E., 1979. The chromosomes and DNA of *Allium cepa*. *Chromosoma* 70: 161-181.
- Stack, S.M., Roelofs, D., 1996. Localized chiasmata and meiotic nodules in the tetraploid onion *Allium porrum*. *Genome* 39, 770-783.
- Stein, W. T., 1944. Notes on the genus *Allium* in the Old World. Its distribution, names, literature, classification and garden-worthy species. *Herbertia* 11: 11-34.
- Stearn, W.T., 1992. How many species of *Allium* are known? *KewMag* 9:180–181
- Suzuki HY, Futsuhara F, Takaiwa F., 1991. Localization of glutelin gene in rice chromosome by in situ hybridization. *JpnJGenet*, 66:305–12.
- Thomas, H., Harper, J.A., Meredith, M.R., Morgan, W.G., Thomas, I.D., Timms, E., King, I.P., 1996. Comparison of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res.* 4, 486-90.
- Tosun, Z., 2006. Geyve ve Çevresinde Doğal Yayılış Gösteren Bazı *Allium* L. Türleri Üzerinde Morfolojik, Anatomik ve Sitotaksonomik Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Tucker, S., Vitins, A., Pikaard, C.S., 2010. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 351-356.
- Ved Brat, S., 1965a. Genetic systems in *Allium*. I. Chromosome variation. *Chromosoma* 16: 486-499.
- Vitales, D., D'Ambrosio, U., Gálvez, F., Kovařík, A., Garcia, S., 2017. Third release of the plant rDNA database with updated content and information on telomere composition and sequenced plant genomes. *Plant Syst Evol.* 303, 1115–1121.
- Volkov, R., Medina, F., Zentgraf, U., Hemleben, V., 2004. Organization and molecular evolution of rDNA nucleolar dominance and nucleolus structure, In: Esser, K., Luttge, U., Beyschlag, W., Murata, J. (Eds.), *Progress in Botany*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Vosa CG, Marchi P., 1972. Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. *Nat New Biol*, 237:191–2.
- Vosa, C. G., 1976a. Heterochromatic patterns in *Allium*. I. The relationship between the species of the *Cepa* group and its allies. *Heredity* 36: 383-392.
- Vosa, C. G., 1976ft. Heterochromatic banding patterns in *Allium*. II. Heterochromatin variation in species of the *paniculatum* group. *Chromosoma* 57: 119-133.
- Xu J, Earle ED. 1994. Direct and sensitive fluorescence in situ hybridization of 45S rDNA on tomato chromosomes. *Genome*, 37:1062–5.
- Yu H, Liang GH, Kofoed KD. 1991. Analysis of C-banding chromosome patterns of *Sorghum*. *Crop Sci*, 31:1524–7.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İran'ın Erdebil şehrinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Erdebil'de tamamladı. 2007-2011 Mohagheghe Ardebil Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümünden mezun oldu. 2011-2013 yılları arasında Erdebil Azad Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Islahı Anabilim Dalında Yüksek Lisansını tamamladı ve uzman olarak Tarım Kredi Kooperatifleri Ardebil Bölge Müdürlüğü'nde çalışmaya başladı. 2014 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Anabilim Dalında Doktora başladı. 2016 - 2017 yılında Erasmus programını dahilinde Polonya, Silesia Üniversitesi'nde sitogenetik alanında çalışarak doktora çalışmasını tamamladı.