T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE DOĞAL VEJETASYONUNDAN SEÇİLEN ÇOK YILLIK ÇİM (*Lolium perenne* L.) GENOTİPLERİNİN ITS (İç Transkribe Boşluklar) VE KARYOTİP ANALİZLERİ İLE FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ

İrfan ÖZER

DOKTORA TEZİ

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

MART - 2015

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İrfan ÖZER

Tarih: 02.03.2015

ÖZET

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE DOĞAL VEJETASYONUNDAN SEÇİLEN ÇOK YILLIK ÇİM (*Lolium perenne* L.) GENOTİPLERİNİN ITS (İç Transkribe Boşluklar) VE KARYOTİP ANALİZLERİ İLE FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ

İrfan ÖZER

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman: Doç.Dr. Ahmet TAMKOÇ
Doç.Dr. Tuna UYSAL

2015, 83 Sayfa

Jüri
Doç.Dr. Ahmet TAMKOÇ
Prof.Dr. Mevlüt MÜLAYİM
Doç. Dr. Hakan GEREN
Doç. Dr. Ramazan ACAR
Doç. Dr. Mehmet Ali AVCI

Çok yıllık çim, çim bitkisi olarak kullanılması, otunun lezzetli ve besin değerinin yüksek olması, hayvanlar tarafından sevilerek tüketilmesi nedeniyle yeşil alanlarda, çayır ve meralarda bulunması arzu edilen bir bitkidir. Bu çimlerden daha iyi faydalanabilmek için ıslahına ihtiyaç vardır. Çim ıslahının başarısında ise, ıslahta kullanılacak olan genotiplerin akrabalık ilişkilerinin bilinmesi büyük önem arz eder. Bu amaçla Orta Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin doğal vejetasyonundan toplanmış olan çok yıllık çim genotiplerinin akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi için karyolojik ve moleküler analizler ayrıntılı bir şekilde yapılmıştır. Genotiplerin kromozom sayıları 2n = 14 olarak tespit edilmiştir. Karyomorfolojileri oldukça değişken olup, genotiplerin çeşitli karyotip formüllere sahip olduğu bulunmuştur. Moleküler analizlerde, ITS (rDNA) ve rpl32 (cpDNA) gen bölgeleri amplifiye edilmiş ve çok yıllık çimlerin filogenetik ağacını oluşturmak için dizilenmiştir. ITS ve rpl32 gen bölgelerinden elde edilen genel verilere göre, çok yıllık çim genotiplerinin en olası ortak atası, *Schenodorus* alt cinsinin en belirgin diploid temsilcisi *F. arundinaceae* ile yakın ilişkilidir. Ayrıca, tek yıllık türlerin (*L. rigidum* veya *L. temulentum* gibi) önceleri çok yıllık atasal çim formlarına genetik olarak katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmüştür. Tek yıllık ve çok yıllık genotipler arasındaki doğal melezlemeler, ardından geri çaprazlamalar (cins içi ve cinsler arası) filogenetik ağaçlarda çıkarımı daha fazla zorlaştıran yüksek politomilerden sorumlu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: cpDNA, ITS, karyomofoloji, kromozom, *Lolium*, rDNA, rpl32

ABSTRACT

Ph.D THESIS

THE DETERMINATION OF DIFFERENCES AMONG PERENNIAL RYEGRASS (*Lolium perenne* L.) GENOTYPES WHICH ARE SELLECTED NATURAL VEGETATIONS BY ITS (INTERNAL TRANSCRIBE SPACER) AND KARYOTYPING ANALYSES IN TURKEY

İrfan ÖZER

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN DEPARTMENT OF FIELD CROPS

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet TAMKOÇ
Assoc. Prof. Dr. Tuna UYSAL
2015, 83 Pages

Jury
Jurry: Assoc. Prof. Dr. Ahmet TAMKOÇ
Prof. Dr. Mevlüt MÜLAYİM
Assoc. Prof. Dr. Hakan GEREN
Assoc. Prof. Dr. Ramazan ACAR
Assoc. Prof. Dr. Mehmet Ali AVCI

Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is a plant desirable in the meadows and pastures, used as the truf grass, due to its palatability and high nutritive value of grass and lovingly consumed by herbivore. There is a need improved for to better take advantage than from this turf. In the breeding success of the grass, is fairly importance knowing the kinship of genotypes to be used in breeding.To this end, the perennial ryegrass genotypes were collected from natural vegetatiton of Central Anatolia and Mediterranean Regions karyologic and molecular analyses were performed detailed in these sampled populations. In karyologic studies, chromosome numbers and morphologies were determined for each population. The counts confirmed the previous reports given as 2n=14 for each of them. It was founded that the karyomorphology was fairly variable and the populations had several karyotype formulas. In the molecular analyses, ITS(rDNA) and rpl32(cpDNA) gene regions were amplified and sequenced to construct the phylogenetical tree of perennial ryegrass. According to general data obtained from ITS and rpl32 gene regions, the most probable common ancestor of the perennial ryegrass populations has the closest affinity to the *Schenodorus* subgenus, of which *F.arundinaceae* is the most prominent diploid represantative. Additionally, it is considered that the annual species (like *L. rigidum* or *L. temulentum*) may have contributed genetically to the former perennial ancestral forms. The natural hybridizations between annual and perennial populations(infrageneric or intergeneric) followed by introgression is hold responsible from highly polytomies in gene trees, and furthermore makes difficult interfering phylogeny.

Key words: cpDNA, ITS, karyomorphology, chromosome, *Lolium*, rDNA, rpl32

ÖNSÖZ

Doktora çalışma konumu belirleyen ve her aşamasında yardımlarını esirgemeyen bilgi ve tecrübesinden faydalandığım sayın hocam Doç. Dr. Ahmet TAMKOÇ'a, laboratuar çalışmalarımın her aşamasında ve değerlendirilmesinde engin bilgi ve tecrübesinden faydalandığım sayın hocam Doç. Dr. Tuna UYSAL'a en kalbi şükranlarımı sunarım. Tez izleme komitemde bulunan ve çalışmamın yönlendirilmesine katkı sağlayan sayın hocalarım Prof. Dr. Mevlüt MÜLAYİM ve Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL'a, gerek sera, gerekse laboratuar çalışmalarıma yardımcı olan Dr. Emine ATALAY, Arş. Gör. Ela Nur ŞİMŞEK, Uzman Meryem BOZKURT ve biyoloji bölümü yüksek lisan öğrencileri Betül Sena TEKKANAT ile Ahmet Emre CEYLAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Diğer yandan TÜBİTAK 106O159 nolu projeleri kapsamında doğal vejetasyondan topladıkları çok yıllık çim genotiplerini tez çalışmamda materyal olarak kullanmama izin veren başta proje yürütücüsü danışmanım Doç. Dr. Ahmet TAMKOÇ ve proje ekibinde görev alan Doç. Dr. Mehmet Ali AVCI ve Dr. Abdullah ÖZKÖSE'ye teşekkür ederim.

Çalışma süresince büyük anlayış gösteren, çalışmama yoğunlaşmamı teşvik eden eşim ve çocuklarıma da ayrıca sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmamı 13101033 nolu proje ile destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne (BAP) ayrıca teşekkür ederim.

İrfan ÖZER
KONYA - 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

2.1. *Lolium perenne* L.' ile Yakın Cins ve Türlerde Yapılan Karyolojik Çalışmalar **6**

2.2. *Lolium perenne* L.' ile Yakın Cins ve Türlerde Yapılan Moleküler Markırlara Dayalı Çalışmalar **10**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **17**

3.1. Materyal **17**

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Genotiplerin ve *Lolium* L. Çimlerinin Bazı Morfolojik ve Taksonomik Özellikleri **18**

3.2. Yöntem **24**

3.2.1. Karyolojik yöntem **25**

3.2.1.1. Kök ucu örneklerinin alınması **25**

3.2.1.2. İlk işlem **25**

3.2.1.3. Materyalin tespiti **26**

3.2.1.4. Materyalin muhafazası **26**

3.2.1.5. Hidroliz **26**

3.2.1.6. Boyama **27**

3.2.1.7. Mikroskop incelemeleri için preparatların hazırlanması **27**

3.2.1.8. Kromozom boylarının ölçülmesi **28**

3.2.1.9. Kromozomların oransal boylarının hesaplanması **28**

3.2.1.10 Kromozom kol indeksleri ..……...….**28**

3.2.1.11 İdiogramların çizilmesi…… ……...…….**29**

3.2.1.12. Karyogramların yapılması …… ……..……..…….**29**

3.2.2. Moleküler yöntem……..……..**31**

3.2.2.1. DNA izolasyonu ..……..……**32**

3.2.2.2. PCR-ITS (İç transkribe bölgelerin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması) ……..……...**32**

3.2.2.3. PCR- *rpl32*…….…….……**33**

3.2.2.4. PCR ürününün saflaştırılması…….……**33**

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA…….…….34

4.1. Karyolojik Bulgular……..……..…….**34**

4.2. Moleküler Bulgular……..…….……**47**

4.2.1. DNA izolasyon sonuçları……..…….**47**

4.2.2. ITS analizi…….…….**48**

4.2.3. *rpl32* analizi…….……..**57**

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER…….…….66

KAYNAKLAR…….……..72

ÖZGEÇMİŞ……...81

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

bp: Baz çifti

°C: Santigrat derece

cpDNA: Kloroplast DNA

CG: Sentromerik gradient

cm: Santimetre

CTAB: Setil Trimetil Amonyum Bromür

dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetikasit

EST: Expressed Sequence Tags

ETS: Dış transkripsiyonu dizisi

FISH: Fluorescense In Situ Hybridization (moleküler sitogenetik teknik)

GISH: Genomik insituhidrolidizasyon

HCl: Hidroklorik asit

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat (Basit Diziler Arası Tekrarlar)

ITS: Internal Transcribe Space (İç transkribe boşluklar)

kb: Kilo baz

LP: Çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.)

m: Metre

Mg: Magnezyum

ml: Mililitre

mm: Milimetre

n: Haploid kromozom sayısı

2n: Diploid kromozom sayısı

N: Normal

nm: Nanogram

PCA: Ana Unsur Analizleri

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çogaltılmış DNA polimorfizmi)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

rpm: Dakikadaki döngü

SSR: Simple Sequence Repeat (Basit Sekans Tekrarları)

TAE: Tris-Asetik asit-EDTA (Tampon Çözeltisi)

TÜBİTAK: Türkiye Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Kurumu

x: Temel kromozom sayısı

µl: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun 7 milyarı aştığı günümüzde ülkemiz nüfusu da 76 milyona ulaşmıştır (Anonim, 2014). Hızla artan bu nüfusun en büyük problemi beslenmedir. Hâlbuki, tarımsal üretim açısından dünyanın kendi kendine yeten ender ülkeleri arasında yer alan ülkemizin artan nüfusunun en büyük problemi ise, dengeli beslenememesi dolayısıyla, hayvansal proteinin yeterince sağlanamamasıdır. Bunun sebebi hayvan varlığımızın yeterli olmaması değil, mevcut hayvan varlığımızın verimlerinin düşük yerli ırklardan oluşması, çayır ve mera alanlarımızın bilinçsizce kullanılması sonucu tahrip edilerek ot verimlerinin düşük olması, dolayısıyla hayvanların ihtiyacı olan kaliteli kaba yemin yeterince sağlanamaması ve tarla tarımı içerisinde yem bitkileri ekimine gereken önemin verilmemesinden kaynaklanmaktadır (Eser ve ark., 1990; Avcıoğlu ve ark., 2000). Ülkemiz insanının dengeli beslenmesine katkı sağlayacak, hayvan varlığımızın ihtiyacı olan kaliteli kaba yemin karşılanabilmesi, mevcut çayır mera alanlarımızda yapılacak ıslah çalışmalarıyla, bu alanların kaliteli ot verimlerinin artırılmasının yanında tarla tarımı içerisinde ot verimi ve kalitesi yüksek yem bitkilerinin ekimine yer verilmesi ile mümkün olacaktır. Tarla tarımı içerisinde ekimine yer verilecek en önemli yem bitkilerinden biri de çok yıllık çimdir.

Çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.) dünyada çim bitkisi olarak ilk kültüre alınan ve yaygın olarak kullanılan bir bitkidir (Avcıoğlu, 1997). Bu nedenle ülkelerin oluşturdukları gen bankalarında önemli düzeyde hattın olduğu Çizelge 1.1'de görülmektedir (Reid ve ark., 1994). Çizelge 1.1 incelenmesinden de anlaşılacağı üzere ülkelerin bazılarının gen bankalarında bulunan çok yıllık çimlere ait çim ıslah hatlarının, yabani hatlardan çok olduğu görülmektedir.

Çizelge 1.1. Bazı ülkelerin *Lolium perenne* L.'ye ait başlıca gen kaynakları, merkezler ve hat sayıları

Ülke/Şehir	IH	YH	YP	B	Toplam
New Zealand (Palmerston North)	4400	-	-	1500	5900
Australia (Hamilton)	2538	-	-	993	3531
Poland (Radzikow)	-	2035	-	-	2035
France (Clermont- Ferrand)	700	600	10	200	1510
United Kingdom (Aberystwyth)	356	1044	-	319	1719
Japan (Tsukuba)	-	-	-	817	817
Germany (Braunschweig)	220	80	50	50	400
United States (Pulman)	-	-	-	410	410
Ireland (Carlow)	47	500	25	-	572
					16894

Islah hatları **(IH),** Yabani hatlar **(YH)**, Yabani popülasyon **(YP),** Bilinmeyen **(B)**
Kaynak: Özköse (2012) tarafından, Reid ve ark., 1994'den aktarılmıştır.

Diğer yandan yeşil alan tesisi ve yem bitkisi olarak dünyanın ılıman bölgelerinde geniş alanlarda kültürü yapılan ve önemli bir çim bitkisi olan çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.) (Bolaric ve ark., 2005a; Bolaric ve ark., 2005b), Avrasya'nın ılıman bölgeleri ile Kuzey Afrika'nın yerli bitkisidir (Hoover ve ark., 1948; Watson ve Dallwitz, 1994; Watson ve Dallwitz, 1999). Ülkemizin doğal florasında da oldukça fazla bulunmakta (Açıkgöz, 1994) olup, yabancı döllektirler. Bu sebepten dolayı popülasyon içerisinde yüksek derecede varyasyonlar gösterirler (Bolaric ve ark., 2005b). Yapraklarının koyu yeşil, tüysüz görünüşte ve parlak bir yapıda olması, çok kardeşlenmesi, uygun ekim ve bakımı yapıldığında tek düze bir bitki örtüsü oluşturması gibi, önemli özelliklere sahip bir bitkidir (Açıkgöz, 1994). Genel manada kısa ömürlü çok yıllık olup, normal şartlarda karışımlardan 3-4 yıl sonra kaybolurlar. Esas olarak serin-nemli iklimlerin, kışları sert olmayan ve serin nemli yazlara sahip bölgelere uyum sağlayan ve her türlü çim alanı oluşturulmasında kullanılabilecek, yumak teşkil eden, yeniden gelişimi iyi, çiğnenmeye karşı oldukça dayanıklı bir türdür (Açıkgöz, 1994; Avcıoğlu, 1997; Sağlamtimur ve ark., 1998).

Çok yıllık çim nemli ve düzenli yağış alan bölgelerde mera bitkisi, yeşil veya kuru ot üretimi ve silo yemi olarak kullanılması, yetiştirilmesinin kolay olması, biçim ve otlanma sonrası çok hızlı gelişmesi, ot kalitesinin yüksek olması, otunun lezzetli olması, lezzetliliğini ve besleme değerini biçildikten sonra da koruması, sindirilebilme oranını ve besleme değerini kaybetmemesi (Elçi, 1978; McGrath, 2008) gibi pek çok özellikleri ile kısa süreli mera tesisinde önemli bir gen kaynağı ve tercih noktasıdır (Holmes, 1980; Eraç ve Ekiz 1985; Açıkgöz 1991; Manga, 1988). Saf olarak ekilebildiği gibi baklagillerle karışım halinde yetiştirilebilir. Bu özelliği ile geniş alanlarda kullanımı bulunmaktadır. Merada kullanılma yanında ot, silaj, toprak koruma ve çim bitkisi olarak da kullanılması sebebiyle, Batı Avrupa bitki ıslahçılarını bu bitki üzerinde çalışmaya yöneltmiştir (Holmes, 1980; Reiwe ve Mondart, 1985).

Ülkemizde kırsaldan şehre doğru büyük bir göçün olması sebebiyle, kırsal nüfus azalırken şehirlerin nüfusu hızla artmakta, düzensiz ve plansız bir şekilde yapılaşmadan dolayı, doğal alanlarımız hızla tahrip edilerek yok olmaktadır. Bu yok oluş sebebiyle, şehir yaşamının vazgeçilmezi olan beton binalar, kalabalık ve gürültülü araç trafiği, stresli iş ortamları gibi daha pek çok sebepten insanımızın psikolojisi bozulmaktadır. Oluşan bu stresli ortamlarda insanımızın birazcık nefes alabileceği, rahatlayabileceği ve günün yorgunluğunu atabileceği yeşil alanlara ihtiyacı vardır. Günümüzde şehir planlamacılar modern şehirleri planlarlarken bu ihtiyaçları göz önünde bulundurarak

parklar, bahçeler, futbol sahaları, hipodromlar, golf alanları gibi pek çok spor ve oyun alanları, karayolu, demiryolu, havaalanları etrafında yeşil alanlar oluşturulmayı göz önüne almak zorundadırlar. Günümüzde, yeni oluşturulan şehirlerdeki evlerin bahçelerinde, hastane, okul, resmi kurum ve kuruluşların etraflarında, turistik ve dinlenme tesislerinde ve fabrika sahaları gibi insanların yeşile ihtiyaç duyduğu pek çok yerde yeşil alanlar tesis edilmektedir (Özköse, 2012).

Ayrıca ülkemizin ekonomik kalkınma ve refah düzeyinin artmasına, sosyal yaşamın ve çevre bilincinin gelişmesine paralel olarak, yeşil alana olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Ancak bu alanların tesisinde kullanılacak, ülkemiz şartlarına uygun geliştirilmiş henüz yerli bir çim çeşidi bulunmamaktadır. Dolayısıyla, yeşil alan tesisinde kullanılan çimlerin tamamı yabancı firmalar tarafından geliştirilen çeşitlerden oluşmaktadır. Geliştirilen bu çeşitlerin ise, ülkemizin iklim, toprak, hastalık ve zararlılarına karşı dayanıklılık açısından adaptasyonu yeterli olmamakta ve kısa sürede bozulmaktadır. Bu ise aynı zamanda çim alanlarının bakım masraflarını artırmaktadır.

Hâlbuki ülkemizin doğal florası çeşit geliştirmek için çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.) türlerinin çeşitliliği bakımından oldukça zengin ve çim ıslahı yönünden büyük bir genetik potansiyele sahiptir (Elçi, 2005). Bu güne kadar bu zenginlikten ülkemiz ıslahçıları ve araştırıcıları yeterince yararlanamamış, çimlerle ilgili çalışmalar daha çok yurt dışında ıslah edilmiş çeşitlerin adaptasyonu ve genel çim özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalardan ileriye gidememiştir. Sınırlı sayıda da olsa yerli genotiplerin toplanmasına yönelik çalışmalarda ise, ıslah aşamasına geçilmemiş ve henüz yerli çok yıllık çim çeşitleri tescil edilememiştir.

Bu sebeple ülkemizin iklim, toprak, hastalık ve zararlılarına dayanıklı çeşitlerin ıslah edilerek geliştirilmesi, çim alanlarının bozulma sürecini uzatacak ve bakım masrafları azaltılmış olacaktır. Aynı zamanda her yıl çim tohumluğu ve rulo çim ithalatı için yurt dışına ödenen döviz gitmeyecek ve tüm katma değer yurt içinde kalacaktır. Bunun yanında tohum maliyetinin de önemli ölçüde azalacağı, yem bitkisi olarak değerlendirilebilecek olanların da hayvancılığımızın ihtiyacı olan kaliteli kaba yemin karşılanmasına katkıda sağlayacağı düşünülmektedir.

Çünkü ülkemizin meralarında hayvanlarımızı besleyecek, mera toprağını koruyabilecek, kökleriyle toprağı tutan, kuvvetli gelişen, toprağı iyi örten ve çok iyi yem verebilen bir bitki gen kaynağına ihtiyaç vardır. Meraları çok iyi durumda olan ülkeler bile böyle bir gen kaynağının peşindedirler. Bu ihtiyacın karşılanmasında,

bitkisel özelliklerinin ve kullanım alanlarının çokluğu sebebiyle, çok yıllık çimi önemli kılar (Sancak, 1994).

Çok yıllık çimin kullanım alanının zenginliği ve ülkemiz vejetasyonunun çeşit geliştirmek için gerekli materyal konusunda oldukça geniş bir potansiyele sahip olması, yerel çeşitlerin geliştirilmesinde ümitlerimizi artırmaktadır. Ülkemizin sahip olduğu çok farklı iklim özellikleri, diğer bitkilerde olduğu gibi çim bitkileri tohumculuğu açısından da geniş bir imkan sunmaktadır. Bunun için yapılacak her türlü araştırma ve ıslah çalışmalarına çok büyük ihtiyaç vardır. Yerli çim çeşidinin geliştirilmesi, ülkemiz tohumluk ihtiyaçlarının karşılanmasına önemli katkı sağlayacağı gibi, benzer ekolojilere sahip ülkelerin çim tohumu ihtiyaçlarının karşılanmasında, dolayısıyla çim tohumu ihracat imkânlarının geliştirilmesine de önemli katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak araştırmaya konu olan çok yıllık çim bitkisinin kullanım alanının çok olması ve ülkemiz ekonomisine önemli katma değer sağlayacağı düşünüldüğünde, araştırmanın önemi bir kat daha artırmaktadır. Çünkü yaptığımız karyotipleme, ITS (İç Transkribe Boşluklar) ve *rpl32* analizleri ile doğal ortamlarından toplanan 18 çok yıllık çim gen kaynağının kromozom tiplendirmeleri yapılıp, moleküler analizlerle evrimsel ilişkileri belirlenmiş ve farklılıkları ortaya konulmuştur. Bulunan bu sonuçların, daha sonra çeşit geliştirme amacıyla, yapılacak melezleme çalışmalarına temel oluşturması düşünülmüştür.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Naylor ve Rees (1958) tarafından, Akdeniz fitocoğrafik bölgesinin *Lolium* cinsinin yabancı döllek türlerinin atasal tiplerini içerdiği bildirilmektedir.

Bazı araştırıcılar tarafından çok yıllık çimin, çok yıllık kısa ömürlü, yumak teşkil ederek gelişen bir bitki olduğu, yeşil veya kuru ot üretimi, silo yemi ve mera bitkisi olarak kullanılabileceği rapor edilmektedir. Aynı zamanda yetiştirilmesinin kolay olması, biçim sonrası çok hızlı gelişmesi, ot kalitesinin yüksekliği, saf olarak ekilebildiği gibi baklagillerle karışım halinde yetiştirilebilmesi gibi özelliklerinden dolayı, dünyada oldukça geniş alanlarda kültürünün yapıldığı bildirilmektedir (Elçi, 1978; Holmes, 1980; Eraç ve Ekiz, 1985; Manga, 1988; Açıkgöz 1991; Sancak, 1994).

Briggs (1978), doğal olarak yayılış gösteren çim populasyonlarındaki gen akışı ve melezlemelerin, ayrıca gerçekleşen geri çaprazların, geniş spektrumlu varyasyonlara neden olduğunu, bu durumun *Lolium* cinsi içerisinde biyolojik olarak tür tanımlamasını zorlaştırmakla kalmayıp, taksonlar arası ayırtedici bir karakter bulma konusunda sınırlamalar getirdiğini, hayat formlarına göre yapılan tasnifte bu özelliği kontrol altında tutan birkaç genin olduğunu ve bu genlerin ortam şartlarından kolayca etkilenerek aktivasyonunu değiştirebilmesi sebebiyle, çok yıllık veya tek yıllık ayrımını zorlaştırdığını rapor etmiştir.

Diğer yandan Elçi (1978) ve Açıkgöz (1991) tarafından, çok yıllık çimin iklim istekleri bakımından nemli ve ılıman iklimi sevdiği, kurağa ve soğuğa dayanıklılığının zayıf olduğu ve kışları; ılıman, yağışlı, yazları ise; nemli geçen bölgelerde iyi geliştiği rapor edilmiştir. Aynı araştırıcılar ağır geçen kış şartlarından bitkinin büyük zarar gördüğünü, buna karşılık kışları ılıman geçen bölgelerde gelişmesine devam ettiğini, kışları sert geçen, drenaj probleminin olduğu, yazları kurak geçen bölgelere tolerans göstermediğini, en iyi gelişimini nötr veya hafif asit, drenajlı ve verimli topraklarda gösterdiğini ve yağışın düzenli olduğu yerlerde, gübre uygulanan hafif topraklarda gelişiminin iyi olduğu bildirilmektedir.

Holmes (1980) tarafından, çok yıllık çim bitkisi tesisinin çok kolay yapılabildiği, ak üçgül veya çayır üçgülü ile diğer buğdaygillere göre yem kalitesi bakımından iyi bir karışım oluşturduğu, ayrıca çok yıllık çimin tohum hasatının kolay, veriminin ve hazmolunabilir madde oranının yüksek olması sebebiyle, batı Avrupalı ıslahçıların bu bitki üzerinde çalışmalara yönelttiği rapor edilmiştir.

Arcioni ve Mariotti (1983) yaptıkları çalışmada, *L. perenne* L. ve *L. multiflorum* Lam.'un kendileme ve türlerarası melezlemesinde, belirleyici izoenzim olarak fosfoglukoizomeraz enziminin kullandıklarını, türler arası melezleme oranını *L. perenne* x *L. multiflorum*'da % 47.5, karşılıklı çaprazlamada ise % 26.7 olarak tespit etmişlerdir. Araştırıcılar kendileme oranını ise *L. perenne*'de % 7.72, *L. multiflorum*'da ise % 7.76 belirlemişlerdir.

Reiwe ve Mondart (1985) ise, çok yıllık çimin toprak koruma ve çim bitkisi olarak da kullanılabilmesinin yanında, üstün bir yem değerine sahip olması ve yüksek oranda hazmolunabilir maddeler (% 80) içermesi sebebiyle mera, ot ve silaj bitkisi olarak da kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bunun yanında Açıkgöz (1991) tarafından ise, çok yıllık çimin otlandıktan sonra hızlı gelişmesi, otunun lezzetli olması, gelişmesinin ileri safhalarında da lezzetliliğini kaybetmemesi, otunun sindirilme değerini koruması ve ayrıca kısa ömürlü olması gibi daha pek çok sebepten dolayı kısa süreli mera tesisinde tercih edilebileceği bildirilmektedir.

2.1. *Lolium perenne* L. ile Yakın Cins ve Türlerde Yapılan Karyolojik Çalışmalar

Bazı araştırıcılara göre çimlerin türleşmesinde iki önemli mekanizma vardır. Bunlardan ilki poliplodi olup, önemli bir mekanizma olarak önerilmektedir. Çimlerin türleşmesindeki ikinci mekanizma ise kromozomal yeniden düzenlemeler olarak bildirilmekte ve bu mekanizmanın kaynağı olarak da, mayozdaki düzensiz kromozom eşleşmelerine sebep olan inversiyonlar, translokasyonlar ve mikrodelesyonlar gösterilmektedir. Bu kromozomal değişimler yeni kromozomal kombinasyonların ve dolayısıyla yeni türlerin oluşumunun kaynağı olduğu, özellikle *Triticaceae* cinsi ile çimler arasında çeşitli büyük ölçekli kromozomal yeniden düzenlemelerin varlığına dikkat çekilmektedir (Naylor, 1960; Zielinski, 1987; Ramana ve Jacobsen, 2003; Sim ve ark., 2005).

Bazı araştırıcılar tarafından kromozomların oransal boylarının hesaplanmasında, her kromozomun boyunun, hücrede bulunan kromozomların toplam boyuna bölünüp, her ploidi düzeyi için 25 katsayı ile çarpılarak bulunması temeline dayandırılmaktadır (Heneen, 1962; Elçi, 1965; Elçi, 1966a; Elçi, 1966b; Elçi, 1966c; Elçi, 1975; Elçi, 1994)

Lolium perenne ile *Festuca pratensis* üzerinde sitolojik çalışmalar yapan Essad (1962), *Lolium perenne*'nin kromozom boylarının 3.0-5.1 µm arasında olduğu; II, III ve IV. kromozomlarda ikincil yapılar bulunduğunu bildirmiş, bitki kromozomlarının kol indekslerinin birinci kromozomda 0.87, ikincide 0.90, üçüncü ve dördüncüde 0.59, beşincide 0.94, altıncıda 0.49 ve yedincide ise 0.54 rapor etmiştir. Ayrıca araştırıcı tarafından bu çalışmada 2n=14 suni melez bitkiler elde ettiği bildirmiştir.

Kromozom morfolojisi üzerine araştırmalar yapan Levan ve arkadaşları (1964), sentromerin bulunduğu yere göre kromozomları, metasentrik, submetasentrik, telosentrik ve terminal olarak dört ana grupta toplamışlardır.

Elçi (1965, 1966a, 1966b, 1966c, 1975, 1994) tarafından, yapılan kromozom çalışmalarının çoğunda, doymuş halde α-monobromonaftalin çözeltisini kullandığı ve bu çözelti içerisinden alınan kök ucu örneklerinin 4°C'de buzdolabında 16 saat süreyle bekletilmesinin, daha sonra glasial asetik asitte 30 dakika tespit işlemine tabii tutulmasının başarılı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, hidroliz işlem süresinin kullanılacak olan materyalin özelliğine göre, 60 °C'de 1 N HCl'de 10-20 dakika arasında değişebileceği, hidroliz sonucunda çıkarılan kök uçlarının, boyamak için Feulgen'de yaklaşık 1 saat bekletilmesi gereketiği ve preparatlarında ezme preparat olarak % 45'lik asetik asit kullanılarak hazırlanabileceğini bildirmiştir. Diğer yandan araştırıcı kromozomların boyanmasında feulgenin yanında asetokarminin de kullanılabileceği, gerek feulgen gerekse asetokarmin ile boyanan preparatları, devamlı hale getirmek için ise alkol buharı ile euparal veya kanada balsamının yer değiştirmesi yöntemlerinin kullanıldığını rapor etmiştir. Karyotip analizleri için kromozomların kol indekslerinin ve kromozomların oransal boylarının hesaplanmasında aşağıdaki formüllerin, kromozomların oransal boy hesaplamalarında ise, her genom için 25 katsayısını kullanıldığını bildirmiştir.

$$\text{Kol indeksi} = \frac{\text{Kısa kol boyu}}{\text{Uzun kol boyu}}$$

$$\text{Oransal boy} = \frac{\text{Kromozom boyu}}{\text{Hücredeki bütün kromozomların toplam boyu}} \times 50$$

Malik ve Thomas (1966) tarafından, *Lolium* ve *Festuca* türlerinde karyotipleme çalışmaları yapılmış, çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin sorunlu gruplarda evrimsel geçmişin ortaya konmasında faydalı olduğu rapor edilmiştir. Buna göre sitotaksonomik kıyaslamalarda, önemli karakterler olan oransal kromozom uzunluğu, sentromer pozisyonu, satelitlik sayısı, sekonder boğum değerlendirilerek Allogam veya autogam *Lolium* ve *Festuca* türleri karyomorfolojilerine göre değerlendirilmiştir.

Malik (1967) ise, yabancı döllek tek yıllık bir tür olan *Lolium rigidum*'un karyotip formülü açısından oldukça çeşitliliğe sahip bir tür olduğunu, kromozom morfolojisi açısından en farklılaşmış tür olarak gösterildiğini, dolayısıyla *Lolium* cinsi çimlerin ortak atasal formu olduğunu rapor etmiştir.

Terrell (1968) tarafından, *Lolium* cinsine bağlı *L. perenne, L. rigidum* ve *L. multiflorum* türlerinin yabancı döllek, *L.loliaceum, L. persicum, L. remotum* ve *L. temulentum*'un ise kendine döllek olduğu, bu türlerin hepsinin diploid kromozom sayısına sahip olduğu ve yoğun ıslah çalışmaları sebebiyle tetraploid kültürlerin de varlığından bahsedilmektedir (Polok, 2007).

Sağsöz (1974) ve Ünal (1988 ve 1992) tarafından, çok yıllık çim bitkisi üzerindeki karyotip çalışmalarında, kök uçlarının ilk işlemi, tespit işlemi, köklerin hidrolizi, boyama, preparat yapma ve önemli gördükleri preparatları devamlı yapma tekniğini, Elçi (1965, 1966a, 1966b, 1966c, 1975, 1994)'ye göre yaptıkları bildirilmiştir.

*Lolium perenne'*de trisomik özelliğin incelendiği çalışmada Lewis ve ark. (1980), kök ucunda kromozom sayımı için kromozomların boyanmasında Feulgen kullandıklarını bildirmişlerdir.

Elçi (1982 ve 1994) kromozom çalışmalarında, kök uçlarında ilk işlem için çeşitli çözeltiler kullanılabileceğini, bunlardan en çok kullanılanlarının; erimekte olan buz, α-monobromonaftalin, paradiklorobenzen, 8-hidroksikinolin, kolşisin ve kumarin olduğunu rapor etmiştir.

Morgan ve arkadaşları (1988) yaptıkları bir sitogenetik çalışmada, kök ucu mitozunda ilk işlem olarak, kök ucunu henüz buz tutmakta olan suda 16 saat bekletiklerini, fiksasyon için 3 ölçek alkol ve 1 ölçek asetik asit kullandıklarını, fiksasyonu tamamlanan kök ucu örneklerini Feulgen ile boyadıklarını ve ayrıca boyamada % 1.5'luk asetokarmin de kullandıklarını, ezme preparat tekniği ile de preparatları hazırladıklarını bildirmişlerdir.

Lolium perenne x *Festuca arundinacea* melezinde çalışmalar yapan Slesaravichyus (1988), en iyi kök ucu mitozunun 30-40 °C'de, 2-3 saat α-monobromonaftalinde bekleterek elde ettiğini rapor etmiştir.

Golblatt (1996) tarafından, mikroskop incelemeleri için boyama işlemi tamamlanmış olan kök ucu örneklerinden, ezme tekniği kullanılarak preparatlar yapılmış ve bu preparatlar üzerinde, somatik metafazda *Lolium* genotiplerinin kromozom sayıları belirlenmiştir.

Bazı araştırıcılar tarafından, çim türlerinden kılçıksız başak yapısına sahip *Lolium perenne* L., coğrafik izolasyon ve mikroklimatik şartlar altında kolayca farklılaşabilen veya tek yıllık çim populasyonları ile melezleşerek yeni çok yıllık çimlerin oluşumuna katkıda bulunan atasal bir tür olarak rapor edilmiştir (Cresswell ve ark., 2001; Polok, 2005).

Hua ve arkadaşları (2006) çim bitkilerinin 6 genotipi (*Lolium perenne* ve *Festuca arundinacea*) üzerinde yapmış oldukları çalışmada, kromozom sayılarını 2n=2x=14 olarak tespit etmişler ve bütün kromozomları median ve submedian sentromerik yapıya sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Kıvrak ve Tamkoç (2006) tarafından bazı bezelye hatları üzerinde yaptıkları kromozom çalışmalarında, çimlendirme dolabında çimlendirilen tohumların 2-3 cm uzunluğundaki köklerin uçlarından 1-1.5 cm uzunluğunda kestiklerini, kesilen kök uçlarını 24 saat +4 ^{0}C'de α-bromonaftanaftalin eriyiği içerisinde beklettiklerini, daha sonra yarım saat glasiyel asetik asit içerisinde tespit işlemini gerçekleştirdiklerini ve % 70'lik alkol içerisinde muhafaza ettiklerini, materyali su banyosunda 13 dakika 60 ^{0}C'de 1 N HCl asitte hidroliz ettiklerini, hidroliz işleminden sonra materyalı Feulgen içerisinde 30 dakika bekleterek boyama işlemini gerçekleştirdiklerini ve boyanan materyalden ezme preparatlar hazırladıklarını bildirmişlerdir.

Elçi ve Sancak (2009) yapılacak sitogenetik çalışmalarda kök ucu mitozunda çok çeşitli çözeltiler kullanılabileceğini ve bu çözeltilerden birinin de 8-hidrosikinolin olduğunu bildirmişlerdir.

Sharifen ve arkadaşları (2009) tarafından, özellikle *Lolium rigidum*'da olmak üzere, İran'da yetişen 6 *Lolium* türüne ait 8 popülasyonun karyotip karakteristikleri cinsin tek yıllık ve çok yıllık ekotiplerine daha açık bir bakış sağlamak amacıyla, karşılaştırmalı biçimde analiz edilmiştir. Tüm popülasyonların temel kromozom sayısı x = 7 olarak belirlenmiştir. Tetraploid (2n = 4x = 28) *Lolium* x *hybridum* dışında ploidi

seviyesi 2n = 2x = 14 olarak rapor edilmiştir. Tüm popülasyonların kromozomları metasentrik olarak rapor edilmiştir.

ZhiYong ve arkadaşları (2010) tarafından *Poeae* cinsinin 3 farklı genotipinde yapmış oldukları karyotip analizi sonucunda *Poeae*'nin iki türünün üç farklı genotipinin tamamında kromozom morfolojileri uydulu, median ve submedian olarak tespit edilmiştir. Kromozom sayıları ise *Agrostis stolonifera*'da 2n=30, *Lolium perenne*'de ise 2n= 14 olarak bulunmuştur.

Shinozuka ve arkadaşları (2011) tarafından, yapılan karyomorfolojik analizlerle, *L. perenne* veya çok yıllık olduğu düşünülen çim populasyonlarının tamamının aynı kromozom sayısına (2n=14) sahip olduğu belirlenmiştir.

Abbas (2014) tarafından, İran'daki *Lolium* cinsine ait 20 populasyon üzerinde yapılan karyolojik çalışmalarda, 16 tanesinin diploid (2n=2x=14) kromozoma sahip iken, 4 tanesinin tetraploid (2n=4x=28) kromozoma sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırıcı ayrıca varyans analizleri sonunda kısa kol, uzun kol ve toplam kromozom uzunlukları bakımından da populasyonlar arasında önemli farklılıklar bildirilmiştir.

2.2. *Lolium perenne* L. ile Yakın Cins ve Türlerde Yapılan Moleküler Markırlara Dayalı Çalışmalar

Bazı araştırıcılara göre, özellikle büyük ölçüde korunmuş kodlayıcı bölgeler içeren nüklear genom bölgeleri (18S, 26S, 5.8S), familya ve üst seviyede problemlerin çözülmesine imkan vereceği, hızlı bir biçimde evrimleşen ITS ve ETS bölgeleri yakın akraba cinslerin ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında ve tür düzeyindeki analizlerde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Appels ve Dvorak, 1982; Appels ve Honeycutt, 1986; Riven ve ark., 1986; Rodgers ve Bendich, 1987; Jorgensen ve Cluster, 1988; Bobola ve ark., 1992; Govindaraju ve Culli, 1992; Hamby ve Zimmer, 1992).

Total genomik DNA izolasyonlarında kullanılan Doyle ve Doyle (1987)'nin metodu Soltis ve ark. (1991) ve Cullings (1992) tarafından 1991'de modifiye edilerek daha kullanılışlı hale getirilmiştir.

Bulińska-Radomska ve Lester (1988)'in bildirdiğine göre daha önce yapılan DNA ve protein analizlerine dayalı filogenetik çalışmalarda çimlerin atası ile ilgili raporlarda ortak görüşün çok yıllık *L. perenne* veya tek yıllık *L. rigidum* taksonlarının olabileceği yönünde olmakla birlikte, genel eğilim diğer çok yıllık çimlerden gen akışı ile (cinsler arası doğal melezleme) tek yıllık çimlerden çok yıllık formların veya

taksonların ortaya çıkışı noktasındadır. Buna ek olarak, protein temelli çalışmalarda *Lolium*'un atasal formlarının çok yıllık diğer akraba çimler ile ilişkili olabileceği araştırıcı tarafından önerilmiştir.

Swofford ve Olsen (1990) tarafından filogenetik analizlerde görsel olarak DNA dizilerinin baz çiftleri haline hizalanarak veri matrikslerinin oluşturulabileceği bildirilmiştir.

White ve arkadaşlarının (1990) bildirdiklerine göre, moleküler düzeydeki çalışmalar genelde ribozomal DNA (rDNA) ITS (Internal transcribed spacer) bölgelerini içeren çalışmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Aynı araştırıcılar tarafından ITS bölgelerinin incelenmesinin son yıllarda uygulanan bir yöntem olduğu ve bu bölgelerin hızla evrimleşmesi sebebiyle bir cinsin, türün ve hatta popülasyonların incelenmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir.

Baldwin (1992) tarafından iki kopya bölgesinin (ITS1 ve ITS2), yakın akraba olan taksonların karşılaştırılmasındaki kullanışlılığı nedeniyle, daha 1990'lı yıllarda bu bölgeler üzerinde hızlı bir şekilde çalışılmaya başlandığını bildirmiştir. Aynı araştırıcı, ITS baz dizilerinin, *Angiosperm*'lerde değişik seviyelerde filogenetik açıdan kullanışlı olduğunu, elde edilen verilerin, genetik sürüklenmelere yönelik etkili sinyaller ortaya koyduğunu belirlemiştir.

Charmet ve Balfourier (1994) *Lolium* cinsi çimlerde türlerarası ilişkileri belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada, çimlerin ortak atasının *Lolium rigidum* ile ilişkili olduğunu savunmuştur.

Baldwin ve arkadaşları (1995) ise, moleküler biyolojideki son gelişmelerin, türe özgü gen bölgelerinin belirlenmesine ve bitki türlerinin tanımlanmasına imkân verdiğini, buna yönelik olarak, rDNA'nın ITS bölgelerinin, bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarda sıklıkla başvurulan yöntemlerden biri haline geldiğini rapor etmişlerdir. Araştırıcılar ITS bölgelerinin, genomik DNA üzerindeki rDNA tekrarları içinde yerleşmiş olduğunu, bu bölgelerin, rDNA'nın alt birimleri ile transkribe edildiğini ve korunmuş bölgelerin (18S, 5.8S ve 28S) birbirinden ayıran iki kısımdan (ITS1 ve ITS2) oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Stammers ve arkadaşları (1995) tarafından, RAPD-PCR tekniği *Lolium* ve *Festuca* cinslerinin türleri arasında filogenetik ilişkileri belirlemek için kullanılmıştır. Sonuç olarak *L. multiflorum* ve *L. perenne* birlikte kümelenirken, tek yıllık çim türleri ayrı bir kümelenme göstermiştir.

Charmet ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan çalışmada, sekiz *Lolium* ve 11 *Festuca* türü arasında filogenetik akrabalıklarını incelemek amacıyla ITS sekansları kullanılmıştır. ITS sekanslarından tahmini yer değiştirme oranı arasındaki korelasyon çok yüksek bulunmuş (0.94), ITS çıkarımlı ağaç özellikle *Lolium* türlerinin ayrılması için çok daha iyi bir ayrım gücü göstermiştir.

Malyshev (1997)'ye göre, ITS1 ve ITS2 bölgelerinin varyasyon dereceleri bitki gruplarına göre farklılık göstermektedir. Araştırıcı, araştırmalarda ITS dizilerinin, cpDNA baz dizilerinden çok daha fazla değişkenlik gösterdiğini ve daha bilgilendirici olduğunu bildirmiştir.

Bazı araştırıcılar tarafından, son yıllarda bitkilerin tanımlanmasında morfolojik karakterlerin yanı sıra moleküler verilerin kullanılmasının hız kazandığı rapor edilmiştir (Mummenhoff ve ark., 1997; Liu ve ark., 2002; Graham ve Olmstead, 2000).

ITS bölgesi, türlerin teşhis edilmesinde morfolojik verilere oranla büyük kolaylık sağladığını bildiren bazı araştırıcılara göre, bu bölgenin filogenetik çalışmalarda oldukça fazla tercih edildiği bildirilmiştir (Cerbah ve ark., 1998; Eddie ve ark.,2003).

Grebenstein ve arkadaşları (1998) tarafından, *Avenea* ve diğer çim türlerinde ITS1 ve ITS2 rDNA dizilerinden esinlenerek moleküler filogenetik ilişkiler belirlenmiştir. ITS dizilerine dayalı olarak, bu alt familya içerisindeki bazı cins ve alt oymakların sınırları belirlenmiş biyocoğrafik ve ekolojik patternleri tanımlanmıştır.

Pašakinskienė ve arkadaşları (1998) tarafından, bazı *Lolium* ve *Festuca* türleri arasındaki benzerlik GISH (Genomik insituhidrolidizasyon) DNA - DNA melezlemesi ve Southern Blot teknikleri ile analiz edilmiştir. Sonuçlar *Lolium multiflorum* ve allohekzaploid *Festuca arundinacea* türü arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Baldwin (1999) yaptığı çalışmada, bazı bitki gruplarında ITS1 ve ITS2'de yüksek oranda varyasyonla karşılaşırken, bazılarında ise, nükleotit varyasyonunun az bir dizisine rastlamıştır. Toplam DNA değerlendirmelerinde; çoğu gruplarda ITS dizinlerinin, cpDNA baz dizinlerinden çok daha fazla değişkenlik gösterdiği ve daha bilgilendirici olduğu sonucuna varmıştır.

Baldwin ve Markos (1999) ise, ITS ve trnL-f bölgelerinin bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarında, son yıllarda çok sık kullanılan bir bölge olduğu bildirilmiştir. Bu araştırıcılara göre, moleküler veriler önceden bilinen klasik taksomik yöntemlerle tam olarak aydınlatılamayan sistematik problemleri, etkin bir şekilde çözmektedir. Bu

amaçla kullanılan moleküler yöntemlerden birisi de nrDNA bölgesi üzerinde bulunan ITS bölgelerinin olduğu rapor edilmiştir.

Cosgrove ve arkadaşları (1999) tarafından, çok yıllık *L. perenne* türü ile iki yıllık, hatta bazı çevresel faktörler altında kısa ömürlü çok yıllık çim olarak değerlendirilen *L. multiflorum* türünü, çoğu zaman tohum ve çiçek yapıları bakımından ayırmanın biyolojik tür kavramına göre mümkün olmayacağı belirtilmiştir.

Filogenetik analizlerde kullanılan parsimony ve diğer metodların analizlerinin yapıldığı PAUP 4.0 programı Swofford (1999) tarafından geliştirilmiştir.

Gaut ve arkadaşları (2000) tarafından, ITS dizi verilerine dayalı olarak *Festuca – Lolium* kompleksinin üyeleri arasında genetik çeşitlilik ve filogenetik ilişkiler ortaya çıkarılmıştır. Veriler daha önceki raporlarla uyumlu olarak 2 büyük *Festuca* kladının varlığını ortaya koymuştur. Kladlardan biri dar yapraklı çimlerden oluşurken, diğeri *Lolium* ile ilişkili *Festuca*'lardan oluşmuştur.

L. perenne ile *L. multiflorum* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda iki takson arasında yüksek genetik benzerliğin olduğu belirlenmiş ve çalışmalar sadece çekirdek DNA'sı ile sınırlı olmayıp, kloroplast ve mitokondrial DNA ile ilgili gen bölgeleri için de rapor edilmiştir (Bulińska-Radomska ve Lester, 1985; Loos, 1993; Baldwin, 1999; Bennett ve ark., 2002).

Jones ve arkadaşları (2002) tarafından, *Lolium perenne* ve diğer *Poaceae* genomlarını içeren bir genetik haritalama yapılmıştır. 4 farklı laboratuarın işbirliği ile gerçekleştirilen çalışmada; EST, izoenzim, AFLP, RFLP analizleri ile perennial *Lolium* türüne ait moleküler bir bağlantı haritası oluşturulmuştur. Sonuçta bu gen haritasının yüksek oranda korunduğu ortaya çıkarılmıştır. Düşük bir sinteni çimlerde belirlenmiştir. *Lolium* türleri arasında taksonomik ilişkilerin yakın olduğuna karar verilmiştir.

Torrecilla ve Catalán (2002) tarafından, geniş yapraklı ve dar yapraklı *Festuca* soyları nükleer ITS dizilerine dayalı olarak araştırılmış ve filogenileri ortaya konmuştur. *Festuca* cinsine ait Batı Akdeniz'de doğal olarak yetişen 32 örnek, evrimsel ilişkileri ortaya koymak için çalışılmıştır. Filogenetik analizler 2 farklı kladın varlığını ortaya koymuştur. Geniş yapraklı *Festuca* kladı ardışık kardeş grupların divergensini gösterir. İnce yapraklı seksiyonel grupları içeren klad parafiletik bir küme oluşturur.

Ghariani ve arkadaşları (2003) tarafından, *Lolium perenne* türünün genetik çeşitliliği ISSR markırları ile belirlenmiştir. Tunus'ta yayılış gösteren *Lolium perenne* assesiyonlarının yüksek seviyede genetik çeşitlilik içerdiği rapor edilmiştir. Dahası hem kültür, hem de yabani tiplerin yüksek derecede açılımının olduğu tespit edilmiştir.

Catalan ve arkadaşları (2004) tarafından, *Lolium* cinsinin yer aldığı *Loliinae* alt oymağı ve onun akrabaları ile ilgili ITS ve trnL-F dizilerine dayalı filogenetik çalışmalar yapılmıştır. Bu gen bölgeleri üzerindeki gerçekleştirilen Parsimoni ve Bayeziyan analizleri *Loliinae* alt oymağının monofiletik olduğunu ortaya koyarken, geniş yapraklı *Festuca* kladı için iyi çözüm vermemiştir.

Kopecký ve arkadaşları (2006) tarafından, *Festulolium* (*Lolium x Festuca*)'un genom evrimi ve oluşumu hakkında FISH ve GISH analizleri yapılmıştır. Çalışmada *Festulolium* üstün zirai karakteristiklerinden (ürün performansı) dolayı melezlerinin artan bir biçimde dünyanda bir yem çimi olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

McGrath ve arkadaşları (2006) tarafından *Lolium perenne* türünün kloroplast genomundan, *Lolium* ve diğer çim bitkisi cinsleri için kloroplast mikrosatelitli markırlar geliştirilmiş ve test edilmiş, tek bir lokus dışında her bir lokusun ikiden – altı allele değişen seride polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Zwierzykowski ve ark., (2006) tarafından filogenetik olarak *Lolium* cinsinin en olası ortak atasının *Schedonorus* alt cinsiyle ilişkili belirgin bir diploid temsilcisi olan *F. pratensis* olduğu rapor edilmiştir.

Polok (2007) tarafından daha önce çim üzerine gerçekleştirilen rRNA ve lözin tRNA gen bölgesine dayalı filogenetik çalışmalarda, çok yıllık *L. perenne* veya diğer melez orjinli populasyonlar arası doğal olarak meydana gelen melezlemelerin yanı sıra, yakın ilişkili bir çim cinsi olan *Festuca* taksonları ile gerçekleşen geri çaprazlamalar, aynı taksonun farklı populasyonları arasındaki farklılaşmaların kaynağı olabileceği bildirilmiştir.

Quintanar ve arkadaşları (2007) tarafından, *Aveneae* oymağının filogenisi araştırılmıştır. Çalışmada nüklear ITS dizileri ve plastid *trn*T-F gen dizilerine bağlı olarak *Aveneae-Poeae-Seslerieae* kompleksinin filogenisi yapılandırılmıştır. Plastid diziler öz *Aveneae* soyunun eski *Aveneae* ve *Poeae* gruplardan ayrıldığını güçlü bir şekilde desteklemiştir. *Koeleriinae*, *Aveninae* ve *Agrostidinae*, bu öz *Aveneae*'nın ana grupları olarak belirlenmiştir.

Inda ve arkadaşları (2008) tarafından ılıman kuşağı çimlerinin en büyük altı oymağından biri olan *Loliinae*'de, divergensi ve biyocoğrafik analizler gerçekleştirilmiştir. Filogeniyi yapılandırmak ve divergensi zamanını hesaplamak için bayeziyan yaklaşımları kullanılmıştır. Sonuçta geleneksel olarak yapılan dar ve geniş yapraklı *Festuca* tür ayrımı sürdürülmüştür.

Tehrani ve arkadaşları (2009) tarafından İran'da yetişen kamışsı yumak türlerinin popülasyon yapısı ve genetik çeşitliliği ile ilgili bir çalışma genomik SSR ve EST-SSR markır analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada İran'ın kuzey, güney ve batı dağlarından dokuz doğal popülasyondan 37 birey, altısı genomik SSR, beşi EST-SSR primer çifti ile analiz edilmiştir.

Cahoon ve arkadaşları (2010), *Lolium arundinaceum* var. *KY31* plastome'nin (kamışsı yumak) analizi ve tam sekansını tanımlamak için, kamışsı yumağın Plastome'sinin % 56'sı protein-kodlama (29 tRNA, 4 rRNA ve varsayılan kodlama bölgesi) genlerinden oluşan kodlama bölgesidir. Tüm plastome verileri kullanılan filogenetik analizler kamışsı yumağın *L. perenne* ile çok yakın hizalandığı göstermiştir. *L. perenne* ile *L. arundinaceum* (*syn: Festuca arundinacea*) gruplarının üretme kabiliyetine göre önceki gözlemlerle uyuştuğu belirlenmiştir.

Hand ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmaya göre, zirai olarak önemli mera bitkisi olan kamışsı yumak olarak bilinen *Festuca arundinacea*; 3 büyük morfotipten oluşan (kıtasal, Akdeniz ve rizomlu) bir tür kompleksi olarak tanımlanan allohekzaploid bir bitkidir. Morfotipleri arasında yapılan bazı çaprazlamalarda gözlenen hibrit kısırlığının, bağımsız bir biçimde farklı diploid ana soylardan kaynaklandığını önermiştir. Sonuçta, bu çalışma ile iki düşük kopya gen bölgesi dizileri ile kamışsı yumak ve yakın ilişkili *Lolium* bitkilerinin farklı morfotiplerinin filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmıştır.

Harper ve arkadaşları (2011) tarafından, *Lolium perenne* ve *Festuca pratensis* türlerinde, dışarıdan gen girişi sitolojik ve moleküler karekterizasyon ile belirlenmiştir. İlişkili türler arasında kromozom parça değişimleri veya dış kaynaklı gen girişinin hedef alınan özelliklerin genetik kontrolünü belirlemede önemli bir kaynak sağladığı rapor edilmiştir. Yedi monozomik yer değişimli soy *Festuca pratensis* ve alıcı *Lolium perenne* arasında üretilmiş ve her soyun farklı kombinasyonları ortaya çıkarılmıştır. Moleküler markırlar ve GISH, spesifik bir bağlantı grubun her bir monosomik yer değişimde *Festuca pratensis* kromozomlarında varlığını belirlemek için kullanılmıştır. Sonuç olarak önemli bir sinteni, ele alınan türler arasında makro seviyede bulunmuştur. Buna karşın türler arasındaki kromozomal translokasyonların düşük bir seviyede olduğu belirlenmiştir.

Tamkoç ve Arslan (2011) tarafından yapılan araştırmada aynı lokasyonda yetişen *Poa* türleri arasındaki genetik yakınlığın, farklı lokasyonlarda yetişenlere göre

daha fazla olduğu tespit edilmiş, bunun sebebi olarak ise doğal melezlemelerin olması olarak rapor edilmiştir.

Diekman ve arkadaşları (2012) tarafından, *L. perenne* türünün daha önce dizisini belirlemiş oldukları kloroplast genomuna özgü 9 adet SSR mikrosatelit markırı geliştirilmiştir. Bu markırların *L. perenne* kloroplast genomunda genetik olarak çeşitlilik gösteren bölgeler hakkında bilgi verici olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılara göre bu markırlar (belirleyiciler) *Lolium* ve farklı çim türlerinde genetik çeşitliliği karakterize etmek için başarılı bir biçimde kullanılmıştır.

Ma ve arkadaşları (2013) tarafından, *Lolium* türleri arasındaki genetik ilişkiler RAPD markırları ile ortaya çıkarılmıştır. Rastgele seçilen 50 primerden 13 tanesi verimli profiller vermiştir. Seçilen 367 RAPD fragmentinin % 95.9'u tüm *Lolium* asesiyonları (örnekleri) için polimorfik olduğu belirlenmiştir. Elde edilen dendogramda kendine döllek türler *L.persicum, L. temulentum, L. rematum* ve *L. subulatum* birlikte yer alırken, yabancı tozlaşan türler *L. multiflorum, L. perenne* ve *L. canariense* birlikte 2. kladda pozisyon almıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak TÜBİTAK 106O159 nolu proje (Anonim, 2009) kapsamında doğal vejetasyondan toplanıp, çim ıslahı programında kullanılmak üzere TÜBİTAK 110O312 nolu proje (Anonim, 2013) dahilinde seçilen 15 adet genotip ile başlanmıştır. Daha sonra genotiplerden birinin hastalanıp ölmesi sonucunda araştırma dışında bırakılmıştır. Buna karşılık TÜBİTAK 106O159 proje dahilinde toplananlardan 4 adet genotip daha ilave edilerek 18 adet genotiple çalışmaya devam edilmiştir. Materyal olarak kullanılan genotiplerin örnek numarası ve genotip adları Çizelge 3.1.'de, lokaliteleri, enlem, boylam ve yükseltileri Çizelge 3.2'de, morfolojik özellikleri ise Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Lolium* cinsine ait genotip adları ve kodları

Örnek No	Örnek Kodu	Genotip Adı
1	**LP 1**	A -24
2	**LP 2**	A -43
3	**LP 3**	A -134
4	**LP 4**	A -149
5	**LP 5**	A-155
6	**LP 6**	B-1
7	**LP 7**	B-35
8	**LP 8**	B-59
9	**LP 9**	B-110
10	**LP 10**	B-117
11	**LP 11**	G-500
12	**LP 12**	G-501
13	**LP 13**	G-504
14	**LP 14**	G-506
15	**LP 15**	234
16	**LP 16**	601
17	**LP 17**	602
18	**LP 18**	603

Çizelge 3.2. Genotiplere ait lokalite, enlem, boylam ve yükseltileri

Genotip Adı	Lokasyon Adı	Enlem (Kuzey)	Boylam (Doğu)	Yükselti (m)
A-24	Cihanbeyli-Konya	38.42	32.44	989
A-43	Ankara-Kulu arası - ANKARA	39.26	32.51	1091
A-134	Akşehir - KONYA	38.27	31.19	981
A-149	Akşehir - KONYA	38.29	31.21	983
A-155	Akşehir - KONYA	38.30	31.22	984
B-1	Akören - KONYA	37.28	32.14	1181
B-35	Kırkpınar köyü, Çifteler-ESKİŞEHİR	39.12	31.07	914
B-59	Karaman-Mut arası - MERSİN	36.56	33.16	1500
B-110	Seydişehir-Taraşçı - KONYA	37.27	31.40	1219
B-117	Şarkikaraağaç - Beyşehir arası	37.45	31.24	1139
G-500	Yarpuz - ANTALYA	37.08	31.50	1257
G-501	Yarpuz - ANTALYA	37.09	31.51	1240
G-504	Akbelenli - ANTALYA	37.35	30.52	966
G-506	Eğrigöl - ANTALYA	36.55	32.12	2067
234	Eskil (SıcakYaylası)-AKSARAY	38.12	33.23	1011
601	Eskil (SıcakYaylası)-AKSARAY	38.10	33.24	1010
602	Eskil (SıcakYaylası)-AKSARAY	38.11	33.24	1017
603	Eskil (SıcakYaylası)-AKSARAY	38.11	33.23	1007

Kaynak**:** TUBİTAK 110O312 nolu projeden alınmıştır.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Genotiplerin ve *Lolium* L. Çimlerinin Bazı Morfolojik ve Taksonomik Özellikleri

Lolium L.;

Tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık, ince uzun yapraklar düz veya kıvrılmış, sıklıkla aurikuleyttir. Çiçek durumu sıkı bir terminal ikili başak şeklinde; başakçıklar karşılıklı almaşık dizilimlidir. Başak ekseni gluma ve çiçek üzerinde ayrılmıştır. Başakçıklar sesil, az çok sıkı, 3-16 (-22) çiçekli, en üst çiçekler olgunlaşmamıştır. Glumanın her ikisi mevcut ve terminal başakçıklara benzer, alt gluma diğer tüm başakçıkları kuşatmıştır. Lemma 5-9 damarlı, dışta halkasal, kılçıklı veya kılçıksızdır. Karyopsis sıkı lemna ve palea tarafından hafifçe sarılmıştır. Embryo eliptik; hilum karyopsisin uzunluğuna paralel bir biçimde olukludur (Terrel, 1968).

Lolium (Çim) cinsinin ismi ilk kez Virgil'in Georgic adlı romanında geçmektedir. Taksonomisi oldukça karmaşık olup, çok sayıda sinonim isim bulunmaktadır. Yaygın isimleri belli yöre ve coğrafyaya göre değişebilmektedir (Çizelge 3.5). *Lolium* ismi *L. temulentum* türüyle ilişkili olarak, sıkıntılı bazı tohumlar için verilen eski bir Latince isimdir. Cins, çoğunluğu tek yıllık olan tanınmış sekiz türden oluşmaktadır (Çizelge 3.4). *Lolium* türleri oldukça kısa (10 cm) olabilecekleri

gibi uzun gövdeli de (150cm) olabilmektedir. Bir çimin *Lolium* olup olmadığına hızlı bir biçimde iki adet glumasına bakarak karar verilebilir. Bitkiler biseksüeldir ve hermafrodit çiçeklidir. Üç tür; *L. perenne, L. rigidum* ve *L. multiflorum* rüzgârla tozlaşan yabancı dölek (allogam) türlerdir. Diğer dört tür *L. loliaceum, L. persicum, L. remotum, L. temulentum* kendine döllek (Otogam) türlerdir. *L. canarience* orta seviyede yabancı döllek bir özellik gösterir. Tüm türleri diploid (2n=14) kromozom sayısına sahiptir ve yoğun ıslah çalışmalarından dolayı tetraploid kültürleri mevcuttur. Ortalama habloid nüklear DNA içeriği 5 pg olup, 2.2 - 6.9 pg arasında değişim aralığına sahiptir (Terrel, 1968).

Lolium cinsi eski dünya türlerini içerir. Çoğu türü ılıman kuşak boyunca dünyanın geniş bir alanına yayılmış olmasına rağmen, Avrupada, Ilıman Asyada ve Kuzey Afrika'da doğal olarak yayılış gösterir. En yaygın bilinen iki türü *L. perenne ve L. multiflorum*'dur. *L. multiflorum* İtalyan çimi olarak bilinir ve en iyi Akdeniz ikliminde yetişir. Buna karşın, *L. perenne* diğer herhangi bir çim türünden daha kuzeyde yayılış gösterir. Soğuk alanlara adapte olmuştur ve soğuğun öldürücü etkisinden zarar görmez. Bu türün tek yıllık çimlerden daha kurak ve ekstrem sıcaklıklara daha hassas olması oldukça ilginç bir özelliğidir.

Lolium cinsinin üyeleri ılık nemli iklimlere adapte olmuştur. Bununla birlikte geniş bir aralıkta iklim ve toprak özelliklerine tolerans gösterir. Oldukça ağır, verimli ve nemli topraklarda daha iyi yetişir. Ancak daha hafif yeterince nemli topraklarda da yetişir. Oldukça asidik ve bazik toprakları tolere edebilmesine rağmen, toprağın optimum pH'sı 5.5-7.5 arasında değişen asidik değerlerinde daha fazla verim gösterirler.

Çalışmada kullanılan çok yıllık çim genotiplerinin morfolojik özellikleri Çizelge 3.3'de gösterilmiştir. Çizelge'in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi bitki boyu bakımından en yüksek değer 36.4 cm ile B-110 genotipinde ölçülürken, en düşük değer ise 29.9 cm ile G-504 genotipinde ölçülmüştür. Bu iki genotipin toplandığı yükselti (Çizelge 3.2) ile bitki boyu arasında doğru bir orantının olduğu görülmektedir. Öyle ki G-504 genotipinin toplandığı yükseklik 966 m iken, B-110 genotipi 1219 m yükseklikten toplanmıştır. Ancak diğer genotipler açısından incelendiğinde böyle bir durumun olmadığı, yani yükseltiye bağlı olarak bitki boyunun artmadığı, toplandıkları lokasyonlar göz önüne alındığında, ekolojik şartların bitki boyu üzerine etkili olduğu söylenilebilir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan genotiplerin morfolojik özellikleri*

Genotip ismi	Bitki Boyu (cm)	Başak Boyu (cm)	Bitki boyu / Başak boyu Oranı	Son Boğum Uzunluğu (cm)	Yaprak Boyu (cm)	Yaprak Eni (cm)	Yaprak boyu / Yaprak Eni Oranı	Yaprak Dokusu (1=dar narin, 9=geniş kaba)	Yoğunluk (1=çok seyrek, 9=maksimum yoğukluk	Büyüme şekli (1=dik, 9=yatı)	Mevsimsel Renk Değişimi (1=saman sarısı, kahverengi 9=koyu yeşil)	Başaklanma Eğilimi (1=yok ya da çok zayıf, 9=çok güçlü)
A-24/LP1	34.4	15.2	2.26	5.1	6.5	3.7	1.76	2.6	4.8	6.5	6.8	7.0
A-43/LP2	33.7	13.6	2.48	8.3	7.7	4.1	1.88	5.2	4.4	1.6	7.3	8.0
A-134/LP3	31.2	12.6	2.48	6.7	9.3	4.1	2.27	5.0	5.6	6.8	5.8	5.0
A-149/LP4	30.8	13.4	2.30	4.6	8.2	3.8	2.16	3.1	4.7	4.5	6.3	5.4
A-155/LP5	31.0	12.5	2.48	4.7	9.3	4.5	2.07	4.6	5.6	6.8	6.6	5.2
B-1/LP6	32.4	13.4	2.42	4.5	7.4	3.5	2.11	5.2	3.0	6.4	6.6	5.9
B-35/LP7	33.1	13.0	2.55	5.3	8.1	3.4	2.38	4.1	5.1	6.0	6.9	7.7
B-59/LP8	30.2	11.8	2.56	5.3	6.0	3.7	1.62	4.9	4.2	6.3	6.7	6.9
B-110/LP9	36.4	14.2	2.56	7.2	8.3	3.8	2.18	4.3	4.1	3.9	5.4	8.0
B-117/LP10	33.3	11.2	2.97	6.0	6.9	4.0	1.73	5.2	4.3	3.4	6.9	7.1
G-500/LP11	32.7	11.9	2.75	7.2	5.1	2.4	2.13	3.2	6.2	3.2	6.1	8.3
G-501/LP12	32.8	12.5	2.62	7.1	6.1	3.1	1.97	4.3	6.1	3.2	5.5	8.1
G-504/LP13	29.9	11.0	2.72	4.9	5.0	2.3	2.17	5.0	6.2	5.7	5.7	6.8
G-506/LP14	34.8	14.0	2.49	6.3	5.6	2.5	2.24	3.2	5.7	2.6	5.4	8.6

Kaynak: TUBİTAK 110O312 nolu projeden alınmıştır.
***:** Bu çalışmada kullanılan 234, 601, 602 ve 603 nolu genotipler sonradan dahil edildiği için bunlara ait veriler olmadığından çizelgeye konulmamıştır.

Taksonomik açıdan oldukça önemli olan başak boyu bakımından genotipler incelendiğinde, en yüksek başak boyu 15.2 cm ile A-24 genotipinde tespit edilirken, en düşük başak boyu 11.0 cm ile G-504 genotipinde tespit edilmiştir. Bu değerler yükselti açısından değerlendirildiğinde başak boyuna yükseltinin etki etmediği, her iki genotipinde alındığı yükseltilerin hemen hemen birbirine yakın değerlerde olduğu görülmektedir (Çizelge 3.2)

Genotiplerin son boğum uzunluklarına bakıldığında, 4.5 cm (B-1) ile 8.3 cm (A-43) arasında değiştiği görülmektedir. Son boğum uzunluğu bakımından minimum ve maksimum değerlere sahip ele alınan genotiplerin doğal yayılım alanındaki

yükseltilerinin yakın olması, ele alınan iki parametrenin korelasyon göstermediğine işaret etmektedir.

Morfolojik karakterlerden yaprak boyu ve eni açısından genotipler incelendiğinde en uzun yaprak boyunun 9.3 cm ile A-134 ve A-155 genotiplerine ait olduğu görülürken, en kısa yaprak boyunun ise 5.0 cm ile G-504 genotipine ait olduğu belirlenmiştir. Yaprak eni açısından ise en dar yaprağın 2.3 cm ile G-504 genotipine ait iken, en geniş yaprak ise 4.5 cm genişlik ile A- 155 genotipinde belirlenmiştir. Bu üç genotipin de hemen hemen aynı yükseltiden toplanması nedeniyle, yaprak boyu ve eni üzerine yükseltinin önemli etkisinin olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.2).

Yaprak dokusu açısından genotipler incelendiğinde A-24 genotipinin en dar ve narin (2.6), A-43, B-1 ve B-117 genotiplerinin ise en geniş ve kaba (5.2) yapıya sahip olduğu görülmektedir. Bu dört genotip açısından yükseltilere bakıldığında yaprak dokusunun yükselti artıkça geniş ve kabalaştığı sonucuna varılabilinir.

Bitki yoğunluğu açısından genotipler incelendiğinde yoğunluğun yükseltiye bağlı olarak değişmediği, en yoğun bitki gelişiminin 6.2 ile G-500 ve G-504 genotiplerinde, en düşük bitki yoğunluğunun ise 3.0 ile B-1 genotipinde olduğu görülmektedir (Çizelge 3.3).

Genotiplerin dik, yarı dik ve yatık formuna sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 3.3). Çizelge'nin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere en dik büyüme formuna A-134 ve A-155 (6.8) genotipleri, en yatık büyüme formuna ise genotip A-43 (1.6) genotipi sahiptir. Yükeltiye bağlı büyüme formlarının genel olarak birkaç genotip dışında ters orantılı olduğu görülse de, bunu söylemek pek mümkün olmayabilir.

Araştırma konusu genotipler mevsimsel renk değişimleri bakımından, hemen hemen tamamının koyu yeşile yakın bir renge sahip olduğu görülmektedir. Yükseltiyle mevsimsel renk değişimleri arasında bir korelasyon belirlenememiştir.

Genotiplerin başaklanma eğilimlerine bakıldığında bu özellik açısından çalışmada kullanılan genotipler açısından yüksek değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak her iki çizelgenin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere morfolojik karakterler üzerine yükseltinin tek başına etkili olmadığı, bunun yanında genotiplerin genetik yapısı ile ekolojik şartların etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.4. *Lolium* L. türlerinin özelliklerine göre sınıflandırılması

Türler	***L. canariense***	***L. loliaceum***	***L. persicum***	***L. remotum***	***L. temulentum***	***L. multiflorum***	***L. perenne***	***L.rigidum***
Yaşam süresi	Tek yıllık	Tek yıllık	Tek yıllık	Tek yıllık	Tek yıllık	Tek yıllık/iki yıllık	Çok yıllık	Tek yıllık
Bitki rengi			Parlak yeşil, parlak	Sarımsı yeşil	Mavimsi gri yeşil	Canlı yeşil	Canlı yeşil	Parlak, canlı yeşil
Büyüme şekli	Dik	Dik	Dik	Dik	Dik	Dik	Dik	Dik / anat
Bitki boyu	30-67 cm	9-52 cm	14-45 cm	40-80 cm	20-120 cm	20-100 cm	12-80 cm	26-70 cm
Başak boyu	10-20 cm	4-23 cm	3-21 cm	2-23 cm	5-40 cm	15-45 cm	3-30 cm	3-30 cm
Omurga	Yarı yuvarlak	Köşeli	Yarı yuvarlak	Yarı yuvarlak	Yarı yuvarlak	Yarı yuvarlak	Yarı yuvarlak	Yarı silindirik
Başakçıklar	Dikdörtgen, yanlamasına, basık	Kama şeklinde, yanlamasına basık	Dikdörtgen, yanlamasına, basık	Dikdörtgen, yanlamasına, basık	Dikdörtgen, yanlamasına, basık	Dikdörtgen, yanlamasına, basık	Dikdörtgen, yanlamasına, basık	Dikdörtgen, yanlamasına, basık
Başakta başakçıkların sayısı	7-15	4-21	3-12	3-20	5-26	5-38	5-37	2-20
Başakçıkların eni	1-4 mm	1-2 mm	1-7 mm	1-5 mm	3-8 mm	3-5 mm	2-4 mm	1-4 mm
Başakçıkların boyu	6-24 mm	3-7 mm	12-22 mm	5-16 mm	12-26 mm			
Bir başakçıktaki çiçek sayısı	5-9	2-5	4-7	2-10	2-15	11-12	5-11	2-9
Kılçıklar	+	+/-	+	-	+/-	+	-	-
Kavuz	Sürekli	Yandan, sürekli	Sürekli	Sürekli	Sürekli	Sürekli	Sürekli	Sürekli
Kavuz boyu	3-28 mm	5-27 mm	7-23 mm	5-16 mm	7-30 mm	5-18 mm	4-15 mm	4-20 mm
İç kavuz	Mızrak şeklinde, 5-7 damarlı	Oval , 5- damarlı	Mızrak şeklinde, 3-5 damarlı	Yumurtamsı, 3-7 damarlı	Yuvarlak eliptik, 5-9 damarlı	Dikdörtgen, 5 damarlı	Dikdörtgen , 5 damarlı	Mızrak şeklinde, 3-5 damarlı
İç kavuz yüzeyi	Tüysüz	Pürüzsüz yada pürüzlü	-					
İç kavuz boyu	3-10 mm	5-6 mm	7-12 mm	3-5 mm	4-9 mm	4-8 mm	4-9 mm	3-8 mm
Pulcuk	İç kavuzdan bir kez boylu	İç kavuz boyunca	İç kavuzdan daha uzun	İç kavuz boyunca	İç kavuz boyunca	İç kavuzdan daha kısa	İç kavuzdan daha kısa	İç kavuzdan daha kısa
Yaprağın dizilişi		Dalgalı		Dalgalı	Dalgalı	Dalgalı	Kıvrımlı	Dalgalı
Yaprak kını	Tüysüz, gevşek	Tüysüz, şişmiş	Tüysüz, kapalı	Tüysüz	Tüysüz, açık	Tüysüz, açık	Tüysüz, kapalı	Tüysüz, şişkin
Kılıç yaprak boyu	5-21 cm	6-12 cm	3-20 cm	10-27 cm	13-28 cm	6-30 cm	5-30 cm	10-17 cm
Yaprak kenarları	Pürüzlü	Pürüzsüz	Pürüzlü	Pürüzlü	Pürüzsüz	Pürüzlü	Belli belirsiz kaba	Pürüzsüz
Yaprak yüzeyi	Pürüzsüz ya da pürüzlü	Belirgin bir orta damarla pürüzsüz	Pürüzlü	Pürüzsüz	Pürüzsüz ya da tüylü	Belirgin bir yaprak orta damarı ile pürüzsüz	Pürüzsüz	Pürüzsüz
Yakacık		Tüysüz			Tüysüz	Dar, zarsı	Tüysüz	
Kulakçık	Hilal şeklinde	Tüysüz	Daha sonra ortaya çıkar	Yok ya da hilal şeklinde	Hilal şeklinde, tüysüz	Hilal şeklinde, tüysüz, dar	Hilal şeklinde tüysüz	Hilal şeklinde ya da yok
Dilcik	Zarsı, 1-2 mm	Zarsı, 1-2 mm	Zarsı, 1-2 mm	Zarsı, 1-2 mm	Zarsı, 1-3 m	Zarsı, 1-2 mm	Zarsı, 1 mm	Zarsı, 1-2 mm
Karyopsis	Tohum kabuğu ile yapışık, ellipsoid. 3-5 mm uzunluğunda	Tohum kabuğu ile yapışık, ellipsoid. 1-5 mm uzunluğunda	Tohum kabuğu ile yapışık, ellipsoid. 5-7 mm uzunluğunda	Tohum kabuğu ile yapışık, ellipsoid. 5-7 mm uzunluğunda				Pericarp ile yapışık, iğ şeklinde, 2-6 mm uzunluğunda
Kökler					İpklisi	Dallanmış, ipliksi	Adventif kökleri dallı	

Kaynak: Polok 2007 tarafından, Terrel (1968); Szafer ve ark. (1986); Weiller ve ark. (1995); Bennet (1997);Bussan ve Trainor (2001); Clayton ve ark. (2006)'dan özetlenmiştir.

Çizelge 3.5. *Lolium* için kabul edilen ve eşanlamlı adları

Kabul edilen isimler	Eşanlamlıları	Yaygın isimleri	Döllenmebiçimleri
***Lolium canariense* Steud**			Karışık
***Lolium loliaceum* Bory&Chaub**	*L. crassiculme* Rech.f. *L. lepturoides* Boiss. *L. rigidum var.rottboliodes* Held. Ex Boiss. *L. rigidum ssp. Lepturoides (Boiss)* Senen&Mauricio *L. subulatum* Vis *Rottboellia loliaceum* Bory & Chaub		Kendine döllek
***Lolium persicum* Boiss & Hohen ex Boiss.**	*L. dorei Boivin* *L. dorei var. Laeve* Boivin	İran karaçayırı İran çimi	
***Lolium remotum* Schrank**	*L. temulentum ssp. Remotum (Schrank)* A.Löve & D.Löve *L. linicola* A.Braun	Keten karaçayırı	
***Lolium temulentum* L.**	*L. arvense With.* *L temulentum var. Arvense (With.)* Lilja *L. temulentum var. Leptochaeton* A. Braun *L. temulentum var. Macrochaeton* A. Braun	Karaçayır Karaçayır çimi Zehirli karaçayır	
***Lolium multiflorum* Lam.**	*L. aristatum* Lag. *L. gaudinii* Parl. *L. italicum* A.Braun *L. multiflorum var. diminutum* Mutuel *L. multiflorum var. muticum* DC. *L. perenne ssp. multiflorum* (Lam.) Husnot *L. perenne var. aristatum* Wild. *L. perenne var. multiflorum* (Lam.) Parnell *L. siculum* Parl	Tek yıllık çim İtalyan çimi Karaçayır	Yabancı döllek
***Lolium perenne* L.**	*L. cristatum* L. ex Nyman *L. multiflorum var. ramosum* Guss. Ex Arcang *L. perenne var cristatum* Pers. Ex B.D Jackson *L. perenne ssp. perenne* L	Taraklı çim İngiliz çimi Çok yıllık çim	
***Lolium rigidum* Gaudin**	*L. parabolicae* Senen ex Samp. *L. perenne ssp. rigidum* (Gaudin) A.&D. Löve *L. strictum* C. Presl	Çok yıllık sert çim Wimmera çokyıllık çim	

Hibrid türler	
Kabul edilen isim	**Hibrid arası**
Lolium x hybridum	*L. multiflorum x L. perenne*
Lolium multiflorum x remotum	*L. multiflorum x L. remotum*
Lolium multiflorum x temulentum	*L. multiflorum x L. temulentum*
Lolium perenne x remotum	*L. multiflorum x L. remotum*
Lolium perenne x rigidum	*L. perenne x L. rigidum*

Kaynak: Polok, 2007 tarafından (Avrupa bitki örtüsü (2007) ve Uluslar arası birleşik sınıflandırma sisteminden (2007)) özetlenmiştir.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada, materyal olarak 18 farklı çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.) genotipi kullanılmış; süreklilikleri, klonlanıp 12 cm çapındaki saksılara dikilerek sera şartlarında sağlanmıştır. Sera şartlarında yetiştirilemeye devam edilen bu genotiplerden kök uçları ile taze yaprak örnekleri alınarak, kök uçları karyolojik çalışmalarda, yaprak örnekleri ise moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. Toplanan yapraklar silika jel içerisine alınmış ve silika jel içerisinde kurutulmuş, sağlıklı yapraklardan DNA izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada ITS, *rpl32* ve kromozom çalışması için kullanılan örnekler Çizelge 3.3'de verilmiştir. Aynı zamanda Gen Bankasından (NCBI) *Lolium multiflorum, Lolium perenne, Lolium rigidum, Lolium temulentum var arvense* ve dış grup olarak *Festuca gigantea, Festuca pratensis* ve *Festuca arundinaceae* (ITS ve *rpl32*) ait türlerin dizileri alınarak veri matriksine eklenmiştir.

Çizelge 3.6. Nümerik, karyolojik ve moleküler çalışmalarda kullanılan örnekler

Kolek. kodu	Örnekler	ITS	*rpl32*	Kromozom	Karyotip
LP1_A24	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP2_A43	*Lolium perenne*		+	+	+
LP3_A134	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP4_A149	*Lolium perenne*	+	+		
LP5_A155	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP6_B1	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP7_B35	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP8_B59	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP9_B110	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP10_B117	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP11_G500	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP12_G501	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP13_G504	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP14_G506	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP15_234 (ANAÇ)	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP16_601	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP17_602	*Lolium perenne*	+	+	+	+
LP18_603	*Lolium perenne*	+	+	+	+
KJ599446_rpl32 KJ598998_ITS	*Lolium multiflorum*	+	+		
KJ599447_RPL32 KJ598999_ITS	*Lolium perenne*	+	+		
KJ599448_RPL32 KJ599000_ITS	*Lolium rigidum*	+	+		
KJ599411_RPL32 KJ598964_ITS	*Lolium temulentum* var. *arvense*	+	+		
KJ599444_RPL32 AF171180_ITS	*Festuca pratensis*	+	+		
EF379060_ITS	*Festuca gigantea*	+			
KJ599440_RPL32	*Festuca arundinacea*		+		

3.2.1. Karyolojik yöntem

Lolium cinsine ait doğal vejetasyondan toplanmış genotiplerin karyolojik çalışmaları, Üniversitemizin Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Sitogenetik laboratuarı ile Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Bitki Biyolojisi laboratuarında gerçekleştirilmiştir.

Karyotip analizi için gerekli somatik kromozomlar, kök ucu meristem hücrelerinden elde edilmiştir. Kullanılacak materyal aşağıdaki yöntem ile hazırlanmıştır.

3.2.1.1. Kök ucu örneklerinin alınması

Kök uçlarında metafazın en iyi gözlemlendiği saati belirlemek amacıyla, bir ön çalışma yapılmıştır. Bu ön çalışma neticesinde istenilen kök ucu örneklerine sabah 09.00-10.00 saatleri arasında alınan örneklerde ulaşılmıştır. Daha sonra her sabah aynı saatler arasında bitkilerin ekili olduğu 12 cm çapındaki saksılar ters çevrilip, kontrol edilmiş ve gelişmeleri iyi olan kök uçlarından 1.0-1.5 cm uzunluğunda kesilerek alınmıştır (Sağsöz, 1974; Sancak, 1994; Ünal, 1992). Alınan örnekler ilk işlem sıvısı içerisine konulmuştur.

3.2.1.2. İlk işlem

İlk işlem sıvısı olarak ilk önce doymuş α-monobromonaftalin çözeltisi (250 ml damıtık suya 3-4 damla α-monobromonaftalin) kullanılmıştır. Kesilen kök uçları, içinde çözelti bulunan tüplere konularak, ağızları kapatılmış, daha sonra materyal farklı iki sürede (3-4 saat ile 16 saat) +4 °C' de buzdolabında bekletilmiştir (Elçi, 1966a; Elçi, 1982; Slesaravichyus, 1988; Ünal, 1992). Yapılan bu ön çalışmada en uygun bekletme zamanının +4 °C'de 16 saat bekletmenin olduğunun belirlenmesine rağmen, istenilen sonuca tam olarak ulaşılamamıştır. Bunun üzerine saksılardan yeni kök uçları alınarak bu kez ilk işlem sıvısı olarak 8-hidrosikinolin denenmiştir. Bu deneme neticesinde +4 ^{o}C'de sekiz saat 8-hidrosikinolin çözeltisinde bekletmenin kök uçlarında iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Böylelikle çalışmanın devamında ilk işlem sıvısı olarak bu çözelti kullanılmıştır.

3.2.1.3. Materyalin tespiti

İlk alınan örneklerde yapılan ilk işlemden sonra tüpler buzdolabından çıkarılarak içindeki α-monobromonaftalin çözeltisi süzülmüş ve tüplere bu kez glasial asetik asit konulup, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek kök uçlarının tespit işlemi yapılmıştır (Elçi, 1966a; Elçi, 1982; Ünal, 1992; Sancak, 1994; Elçi ve Sancak, 2009). Bu tespit işleminde istenilen sonuca ulaşılamayınca alınan yeni kök uçları bu kez +4 ºC'de 24 saat Karnoy çözeltisiyle fiske edilmiştir. Bu işlem neticesinde arzu edilen sonuca ulaşılmış ve kök uçları Karnoy çözeltisiyle fiske edilerek çalışmaya devam edilmiştir.

3.2.1.4. Materyalin muhafazası

İlk örneklerdeki tespit işleminden hemen sonra tüplerde bulunan glasial asetik asit hemen boşaltılarak, o an kullanılmayacak olan kök uçları % 70'lik alkol içerisinde +4° C' de buzdolabında depolanarak muhafaza altına alınmıştır (Sağsöz, 1974; Sancak, 1994). Bu muhafaza edilen örneklerden istenilen sonuç alınamayınca, daha sonra alınan kök uçları asetik alkol (Farmer) çözeltisinde yine +4 ºC'de buzdolabında muhaza altına alınmış ve bu kök uçlarından hazırlanan preparatlarda arzu edilen sonuca ulaşılmıştır.

3.2.1.5. Hidroliz

Tespit işleminden sonra ilk önce sıcak hidroliz yöntemi kullanılmış, bunun için kök uçları 3 defa 5'er dakika damıtık su ile yıkanmıştır. Bu yıkama ile tespit işleminden sonra hemen kullanılacak olan materyal glasial asetik asitten, buzdolabında muhafaza edilen materyal ise % 70' lik alkolden temizlenmiştir. Bu yöntemde en uygun hidroliz zamanının tespiti için temizlenen kök uçları su banyosunda 1 N HC1 içerisinde 60 °C'de 5-20 dakikaya kadar uzayan sürelerde hidroliz edilmiştir (Elçi, 1994; Elçi ve Sancak, 2009). Yapılan bu ön çalışma ile çok yıllık çimlerde en uygun sıcak hidroliz süresinin 12 dakika olduğu tespit edilmiştir. Ancak bununla yetinilmemiş ve soğuk hidroliz yöntemi de denenmiştir. Bu yöntemde ise kök uçları oda sıcaklığında bir saat 5 N HCl ile hidroliz edilmiştir. Bunun sonucunda soğuk hidrolizle muamele edilen kök uçlarında daha iyi sonuçların alındığı görülmüş ve çalışamaya bu yöntemle devam edilmiştir.

3.2.1.6. Boyama

Boyama işleminde Feulgen ve aseto-orsein kullanılmıştır. İlk örneklerde sıcak hidroliz yöntemi ile hidroliz edilen kök uçları 1 N HCl'den çıkarılıp, içerisinde Feulgen bulunan tüplere konulmuş, bu tüplerde oda sıcaklığında bir saat tutulduktan sonra, tüplerden çıkarılarak 10-15 dakika damıtık su içinde bekletilmiştir (Elçi, 1966a; Lewis ve ark., 1980; Elçi, 1982; Morgan ve ark., 1988; Ünal, 1988; Sancak, 1994). Feulgen uygulayarak hazırlanan boyama işleminde kromozomların boyayı içlerine iyi almadığı görülmüştür. Daha sonra kök uçları soğuk hidroliz yöntemi ile hidroliz edilip, % 45'lik asetik asit eklenen % 1'lik aseto-orsein ile boyama işlemine tabii tutulmuştur. Yapılan ön çalışmada, oda sıcaklığında bir saat bekletmenin, aseto-orsein uygulamasında yeterli olmadığı, en ideal bekletme zamanının 3-4 saat olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya bu yöntemle devam edilmiş, daha sonra boyanan bu kök uçlarından preparatlar hazırlanmıştır.

3.2.1.7. Mikroskop incelemeleri için preparatlarım hazırlanması

Mikroskop incelemeleri için boyama işlemi tamamlanmış olan kök uçlarından örnekler alınmış, ezme tekniği kullanılarak preparatlar yapılmış ve bu preparatlar üzerinde, somatik metafazda *Lolium* genotiplerinin kromozom sayıları belirlenmiştir (Golblatt, 1996). Bu preparatlar Elçi ve Sancak (2009)'a göre hazırlanmıştır. Buna göre, boyanmış olan kök ucu alınarak bir pens yardımı ile lam üzerine konulmuş, kurumayı önlemek için üzerine kök uçlarının hacmi kadar % 45'lik asetik asit damlatılmıştır. Daha sonra bistürü yardımı ile kökün uç kısmından 2-3 mm'lik kısmı kesilerek başka bir lamın üzerine alınmış ve burada çok küçük parçalara bölünmüştür. Bu parçalar ne kadar küçük olursa, preparatta hücrelerin dağılışının da o kadar iyi olduğu gözlemlenmiştir. Bölünen bu parçaların üzerine kök uçlarının hacmi kadar % 45'lik asetik asit ok uçlu iğle vasıtasıyla ilave edilmiş ve üzeri lamelle kapatılmıştır.

Daha sonra lam ve lamel, üzerinde lekeler oluşmaması için yumuşak dokulu bir kurutma kağıdının arasına alınarak bir elin baş parmağı ile lamel üzerinden oynatmadan tutulmuş, diğer ele alınan kurşun kalemin arkası ile kurutma kağıdı üzerinden lamele hafif hafif vurulmuş ve son olarak kalemin arkasıyla baskı uygulanmıştır. Böylece, hem hücrelerin daha iyi dağılması hem de yassılaşarak hücre içerisindeki tüm

kromozomların aynı düzlem üzerine gelmesi sağlanmıştır. Uygulanan vuruşun şiddeti ve baskı oranı kullanılan bitki materyallerine göre farklılık arz etmektedir.

3.2.1.8. Kromozom boylarının ölçülmesi

Hazırlanan preparatlardan kromozomları bir düzleme iyi dağılmış ve metafazın net bir şekilde göründüğü somatik hücrelerin fotoğrafları Olympus BX53 mikroskobu, Olympus DP72 digital kamera ve Leica DM 1000-Leica DFC290 ile çekilerek, daha sonra yapacağımız ölçüm ve değerlendirmelerde kullanılmak üzere bilgisayara kaydedilmiştir. Fotoğrafı çekilen preparatları daimi haline getirmek için, lam ile lamel sıvı nitrojen kullanılarak birbirinden ayrılmış; alkol serilerinden geçirilmiş ve hücrelerin üzerine entellan ilave edilip, lamel kapatılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (Essad, 1962).

3.2.1.9. Kromozomların oransal boylarının hesaplanması

Kromozomların oransal boylarının hesaplanmasında KAMERAM programından faydalanılmış olup, bu programın çalışma prensibi de daha önceki hesaplama yöntemleri ile uyum içerisindedir. Yani bu program da her kromozomun boyunun, hücrede bulunan kromozomların toplam boyuna bölünüp, her ploidi düzeyi için 25 katsayı ile çarpılarak bulunması temeline dayanmaktadır (Heneen, 1962; Elçi, 1965; Elçi, 1966a; Elçi, 1966b; Elçi, 1966c; Malik ve Thomas, 1966; Elçi, 1975; Elçi, 1994).

3.2.1.10. Kromozom kol indeksleri

Kromozomların oransal boyu ve kol indeksleri, bir karyotipteki homolog kromozomların belirlenmesinde kullanılır. Bunun için yine KAMERAM programında faydalanılmıştır. Bu program yardımıyla, homolog kromozomlar birbirinin yanına getirilmiştir. Daha sonra en uzun kromozom çiftinden başlayarak kromozomlar numaralandırılmıştır. Numaralandırmaya en uzun olan kromozom çiftine 1 verilerek yapılmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra, homolog kromozomun kısa kollarının boyu toplanıp, ortalaması alınarak, 1 numaralı kromozomun ortalama kısa kol boyu bulunmuştur. Aynı yöntem ile homolog kromozomun uzun kol boyu hesaplanmış, kısa kol ve uzun kol boylarının toplamı, bu kromozomun boyu olarak alınmıştır. Diğer

homolog kromozomlar için de aynı işlem yapılmıştır. Kromozomların kol indeksleri ise homolog kromozomların kol indekslerin toplanması ile bulunmuştur (Elçi, 1994; Kıvrak ve Tamkoç, 2006).

3.2.1.11. İdiogramların çizilmesi

Kromozomlara ait idiograların oluşturulmasında da yine KAMERAM programından faydalanılmış olup, idiogramlar bu program sayesinde yapılmıştır.

3.2.1.12. Karyogramların yapılması

Karyogramları yapmak için önceden tespit edilmiş, fotografları çekilmiş hücreler, KAMERAM programı sayesinde otomatik olarak oluşturulmuş ve daha sonra oluşturulan bu karyogramlar üzerinde manuel olarak düzenlemeler yapılıp, eşler halinde kromozomlar yan yana getirilerek karyogramlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karyogramlar üzerinde yukarda bahsedilen program aracılığı ile genotiplerin karyotip ölçümleri gerçekleştirilmiş ve çeşitli simetri indeksleri kullanılarak karyomorfoloji bakımından karşılaştırılmıştır. Kromozom morfolojisinde Levan ve ark., (1964) tarafından ileri sürülen terminoloji kullanılmıştır.

Her bir tür için diploid kromozom sayısı, değişim genişliği (range), en uzun/en kısa kromozom oranı, ortalama kısa kol uzunluğu, ortalama uzun kol uzunluğu, ortalama kromozom uzunluğu, toplam kromozom uzunluğu, ortalama sentromerik indeks (3.1) ve karyotip formülleri verilmiştir (Çizelge 4.4) . Ayrıca, her çeşit için intrakromozomal asimetri (3.2), interkromozomal asimetri (3.3), kromozom uzunluğu değişim katsayısı (3.6), sentromerik indeks değişim katsayısı (3.5) ve asimetri indeksi (3.7) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Hesaplamalarla ilgili formüller aşağıda verilmiştir.

$$\mathbf{CG} = \frac{\textit{Ortalama Kısa Kol Uzunluğu}}{\textit{Ortalama Kromozom uzunluğu}} \textit{ X 100} \qquad (3.1)$$

CG: Sentromerik gradient

$$A_1 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{q_i}{p_i}}{n} \quad (3.2)$$

A_1: Kromozom içi asimetri indeksi (0 ile 1 arası değer alır)

n: Homolog kromozom çiftlerinin veya gruplarının sayısı

qi: Homolog kromozom çifti veya grubunun kısa kol uzunluklarının ortalaması

pi: Homolog kromozom çifti veya grubunun uzun kol uzunluklarının ortalaması

$$A_2 = \frac{S_{CL}}{X_{CL}} \quad (3.3)$$

A_2: Kromozomlar arası asimetri indeksi

S_{CL}: Kromozom uzunluğu standart sapması

X_{CL}: Kromozom uzunluğu ortalaması

$$CV = \frac{S_{CL}}{X_{CL}} \text{ X } 100 \quad (3.4)$$

CV: Kromozom uzunluğu değişim katsayısı

S_{CL}: Kromozom uzunluğu standart sapması

X_{CL}: Kromozom uzunluğu ortalaması

$$CV_{CI} = \frac{S_{CI}}{X_{CI}} \text{ X } 100 \quad (3.5)$$

CV_{CI}: Sentromerik indeks değişim katsayısı

S_{CI}: Sentromerik indeks standart sapması

X_{CI}: Ortalama sentromerik indeksi

$$CV_{CL} = A_2 \text{ X } 100 = \frac{S_{CL}}{X_{CL}} \text{ X } 100 \qquad (3.6)$$

CV_{CL} : Kromozom uzunluğu değişim katsayısı

S_{CL} : Kromozom uzunluğu standart sapması

X_{CL} : Kromozom uzunluğu ortalaması

$$AI = \frac{CV_{CL} \text{ X } CV_{CI}}{100} \qquad (3.7)$$

AI : Asimetrik indeksi

CV_{CL} : Kromozom uzunluğu değişim katsayısı

CV_{CI} : Sentromerik indeks değişim katsayısı

Doğal vejetasyondan toplanan çok yıllık çim genotipleri üzerinde yaptığımız karyotip analizi ile bu genotiplerin kromozom özellikleri belirlenmiş ve ileride yapılacak ıslah çalışmalarına ışık tutması öngörülmüştür.

3.2.2. Moleküler yöntem

Lolium cinsine ait doğal vejetasyondan toplanmış genotiplerin moleküler çalışmaları, DNA Ekstraksiyonu ve ITS (İç Transkribe Boşluklar) Amplifikasyonu ve dizileme çalışmaları Üniversitemizin Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Bitki Biyolojisi laboratuarında gerçekleştirilmiştir. Diziler Macrogen (Kore) firmasının laboratuarlarında hizmet alımı yöntemiyle okutulmuştur.

Total genomik DNA'nın ekstraksiyonu, klonlanarak saksıya dikilmiş olan bitkilerden (genotip) taze yapraklar alınarak silika jel içerisine kurutulmuş, izolasyon bu yapraklardan Soltis tarafından modifiye edilen Doyle ve Doyle (1987)'ın metodu kullanılarak yapılmıştır (Soltis ve ark., 1991; Cullings, 1992). Çalışmalarımızda ITS (Çekirdek DNA) ve *rpl32* (Kloroplast DNA) bölgeleri aşağıdaki protokola göre PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile ayrı ayrı çoğaltılmıştır. PCR ürünleri QIAquick PCR saflaştırma Kiti (Qiagen Inc., Valencia, CA) ile saflaştırılmıştır. Nükleotit dizileri Chromas Lite 2.1 programında düzenlenmiştir. Diziler kontrol edildikten sonra MEGA

6 ve BioEdit ile hizalanmıştır. Filogenetik analizlerde DNA dizileri görsel olarak baz çiftlerinin kıyaslanmasıyla hizalanmış ve veri matrisleri oluşturulmuştur (Swofford ve Olsen, 1990). Filogenetik ağ (Network) Network4613 ve Parsimoni analizleri PAUP 4.0 beta sürümü ile gerçekleştirilmiştir (Swofford, 1999).

3.2.2.1. DNA izolasyonu

0.01 gr yaprak materyali eppendorf tüpüne konur. Üzerine 500 µl CTAB ekstraksiyon tamponu eklenir ve plastik çubukla homojen bir çözelti oluncaya kadar mekanik parçalama gerçekleştirilir. Örneğimiz 65 ºC'de 4 saat muamele edilir. 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Üzerine 500 µl kloroform ilave edilir. 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilir. Sıvı kısım yeni bir eppendorf tüpüne aktarılır. Üzerine tekrar 500 µl kloroform ilave edilir. 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilir. Açık krem renkli sıvı kısım tekrar yeni bir eppendorf tüpüne aktarılır. Üzerine amonyum asetat ve izopropanol eklenir. 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilir. Sıvı kısım atılır ve eppendorf tüpünün dibinde pellet kalır. 1 ml % 70'lik etanol eklenir. 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilir. Sıvı kısım atılır. Pellet kısmının kuruması için eppendorf tüpü 30 dakika vakumda bekletilir. 30 dakikanın sonunda eppendorf tüpüne 50 µl 1x TAE ilave edilir. 15 dakika 65 ºC'de su banyosunda tutulur. Daha sonra % 0.7'lik agaroz jele yüklenerek bantlar gözlenir. DNA konsantrasyonunda spektral ölçümler NANODROP 2000 spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır.

3.2.2.2. PCR-ITS (İç transkribe bölgelerin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması)

İzole edilen total DNA'nın 10 µl'si, 90 µl'lik PCR karışımına eklenmek suretiyle polimeraz zincir reaksiyonu için hazırlanır. Karışımın içeriği (Mix) aşağıdaki gibidir. dNTP karışımı (16 µl), tampon (10 µl), Primer 1 (2 µl), Primer 2 (2 µl), H_2O (55 µl), Mg (5 µl). ITS bölgesi çoğaltılması için düz primer olarak ITS1(düz) ve ITS4 (ters) primer olarak kullanılmıştır (White ve ark., 1990). Amplifikasyon 94 ºC'de 2 dakika, 80 ºC'de 5 dakika devam ederken Polimeraz enzimi ilave edilmiştir. Kullanılan primer dizileri şunlardır:

Primer dizileri; ITS1 F= 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4 R = 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Primerlerin birleşme basamağı için 50-60 ºC'e arasında değişen sıcaklık derecesi uygulanmıştır. Diğer 30 döngülük aşama 94 ºC'de 1.5 dakika, 57 ºC'de 2 dakika, 72 ºC'de 3 dakika (ilave uzama basamağı olarak 72 ºC'de 15 dakika) devam edilmiştir. PCR sonrası tüpler getirilerek örnekden 5 µl DNA çekilip; 2 µl distile su, 2 µl Bromofenol mavisi ile karıştırılarak % 1.2'lik agaroz jele yüklenmiştir. Yaklaşık 30 dakika yürütüldükten sonra, jel 10 dakika etidyum bromür içinde yıkanmış ve sonra 5 dakika saf suda tutulmuştur. Bu işlemden sonra, jellerin görüntüsü UVP GELDOC-IT 310 image sistemden alınarak bantlar değerlendirilmiştir.

3.2.2.3. PCR- *rpl32*

rpl32-trnL$^{(UAG)}$ kloroplast gen bölgesinin amplifikasyonu Shaw ve ark. (2007)'ın metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonda kullanılan primerlerin dizisi şöyledir; *trnL*$^{(UAG)}$: 5'-CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT-3'; rpL32-F: 5'-CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C-3'

3.2.2.4. PCR ürününün saflaştırılması

PCR-ITS ve PCR-*rpl32* ürünlerinin saflaştırma işlemi tamamen aynı manüele göre gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası 100 µl DNA örneği yeni bir tüpe alınmış ve üzerine 500 µl PB tamponu eklenmiştir. Elde edilen total hacim yeni bir tüpe aktarılmış ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alttaki sıvı kısım dökülmüş, üzerine 600 µl tam etanol ve 150 µl PE tamponu eklenmiştir. Sonra 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım dökülerek tekrar aynı süre ve rpm'de santrifüj gerçekleştirmiştir. Santrifüj sonrası 40 µl EB eklenmiştir.

1 dakika beklenmiş ve sonra 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sonuçta tüpümüzde 40 µl DNA kalmıştır. % 1.2'lik jele; 1 µl DNA, 4 µl H_2O, 2 µl bromofenol mavisi karıştırmak suretiyle yüklenmiştir. 30 dakikalık yürütmeden sonra bantları görmek için gerçekleştirilen aşama PCR' daki aşamanın tamamen aynısıdır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Karyolojik bulgular

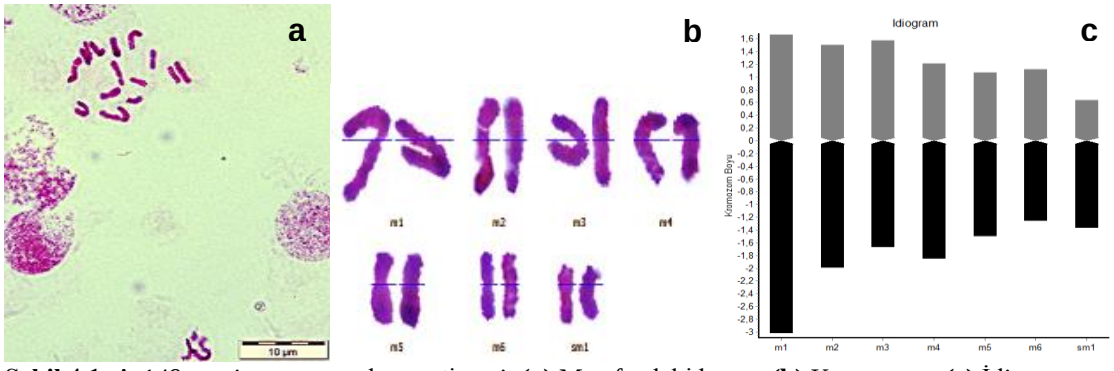
Bu tez çalışmasıyla, Orta Anadolu ve Akdeniz geçiş kuşağında doğal olarak yayılış gösteren 18 adet çok yıllık *Lolium* cinsi çim genotiplerine ait kromozom sayımı ve karyomorfolojisi ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak genotiplerin tamamının diploid kromozom sayısına sahip olduğu (2n=14) belirlenmiştir (Hua ve ark., 2006; ZhiYong ve ark., 2010). Karyolojilerinde, metasentrik ve submetasentrik yapıda olan iki tip kromozom bulunmakta olup, kromozomların çoğunluğunu metasentrik kromozomlar oluşturmaktadır (Çizelge 4.1). Poliploid olan herhangi bir populasyona rastlanmamıştır. Ele alınan genotipler kromozom sayısı bakımından stabil olmasına rağmen, karyotip formülü ve karyomorfolojileri bakımından büyük ölçüde çeşitlik ve varyasyon göstermiştir. Bu durum, ele alınan çok yıllık çim genotiplerinin büyük ölçüde kromozomal yeniden düzenlemelere uğradığını göstermektedir.

Çizelge 4.1. Genotiplerin kromozom sayısı ve kromozom tipleri

Genotip adı	**Kromozom sayısı (2n)**	**Kromozom numarası ve tipi**	
		Metasentrik	**Submetasentrik**
A-24	**14**	1, 2, 3	4, 5, 6, 7
A-43	**14**	1, 2, 3, 4, 5, 6	7
A-134	**14**	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	-
A-149	**14**	1, 2, 3, 4, 5, 6	7
A-155	**14**	2, 3, 4, 5, 6, 7	1
B-1	**14**	1, 2, 3, 4, 5, 6	7
B-35	**14**	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	-
B-59	**14**	1, 2, 3, 4, 5, 7	6
B-110	**14**	1, 2, 3, 4, 6	5, 7
B-117	**14**	1, 3, 4, 6	2, 5, 7
G-500	**14**	1, 2, 3, 4, 5	6, 7
G-501	**14**	1, 2, 3, 4, 5, 6	7
G-504	**14**	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	-
G-506	**14**	1, 3, 4, 6	2, 5, 7
234	**14**	1, 2, 3, 5, 6	4, 7
601	**14**	1, 2, 3, 4, 6	5, 7
602	**14**	1, 2, 3, 4, 5, 6	7
603	**14**	1, 2, 3, 4, 5	6, 7

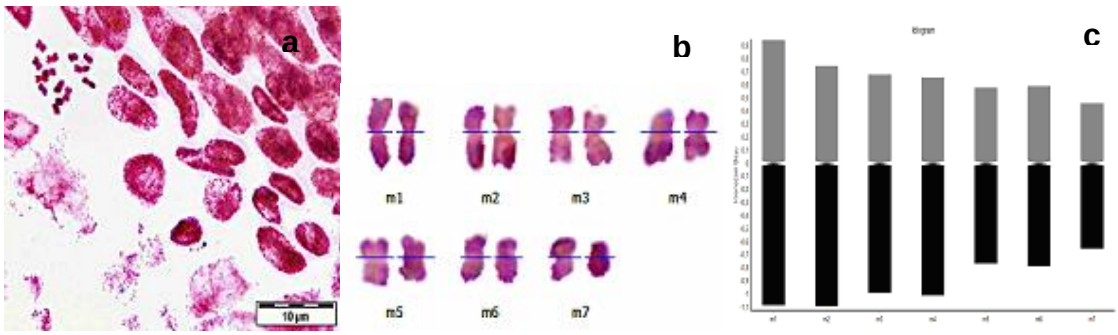
Çizelge 4.1'in incelenmesinden de anlaşılacağı üzere:

A-149 assesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. kromozomlar metasentrik, 7. kromozom ise submetasentrikdir (Şekil 4.1).



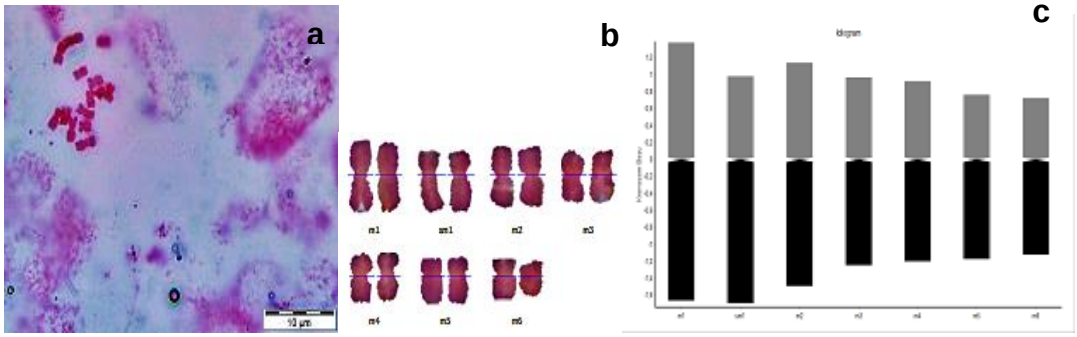
Şekil 4.1. A-149 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram görünümü

B-35 assesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, kromozomların tamamı metasentrikdir (Şekil 4.2).



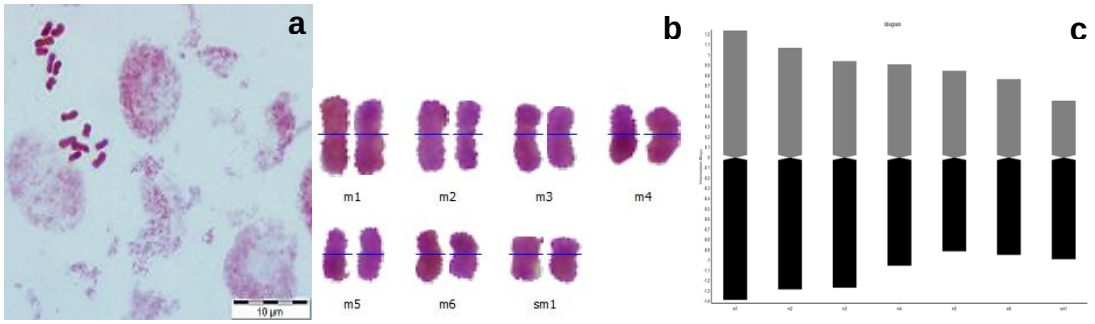
Şekil 4.2. B-35 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram görünümü

G-500 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 2., 3., 4. ve 5. kromozomlar metasentrik, 6. ve 7. kromozom ise submetasentrikdir (Şekil 4.3).



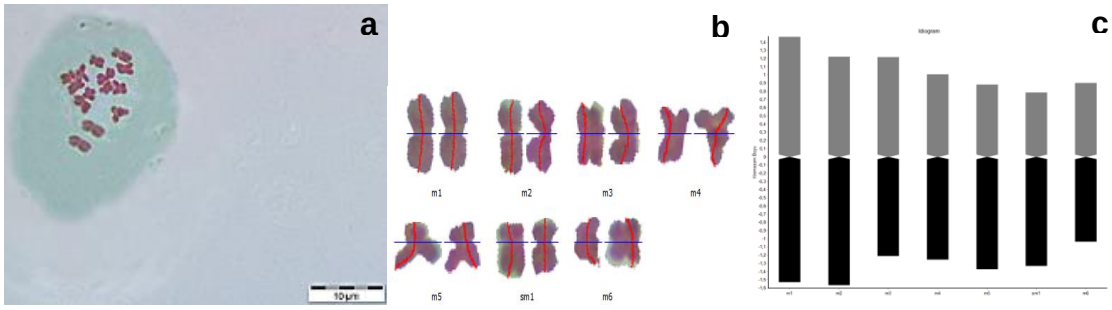
Şekil 4.3. G-500 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram görünümü

A-43 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 7. kromozom submetasentrik, geri kalan 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. kromozomlar ise metasentriktir (Şekil 4.4).



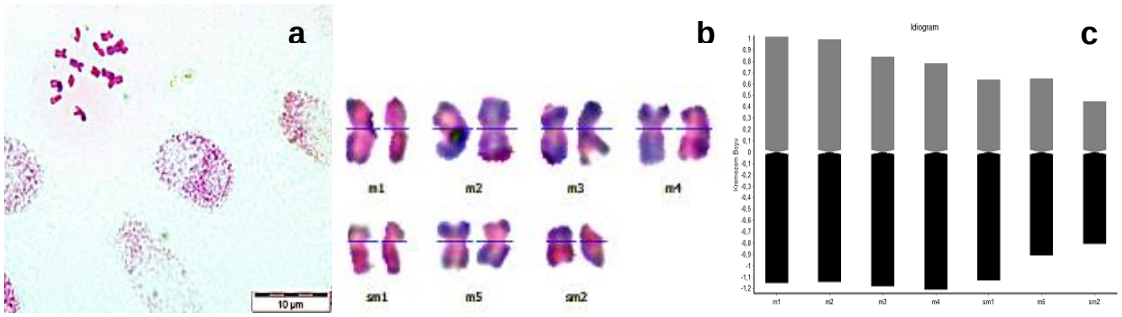
Şekil 4.4. A-43 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

B-59 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 2., 3., 4., 5. ve 7. kromozomlar metasentrik, 6. kromozom submetasentrikdir (Şekil 4.5).



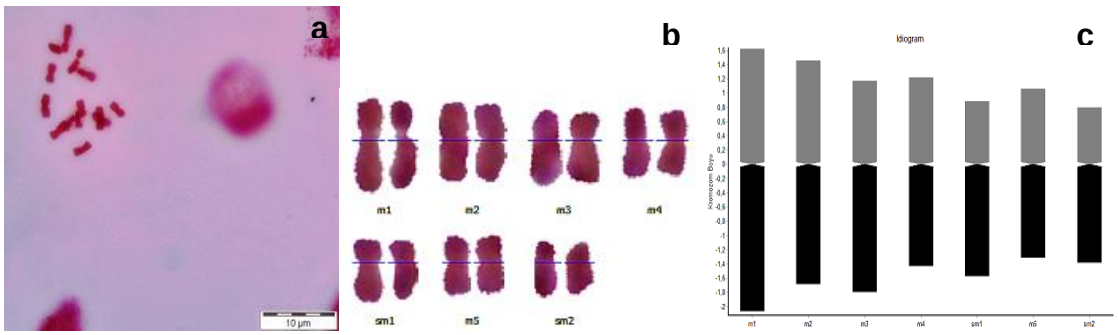
Şekil 4.5. B-59 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

601 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 5. ve 7. kromozomlar submetasentrik, diğer 1., 2., 3., 4. ve 6. kromozomlar ise metasentrik bulunmuştur (Şekil 4.6).



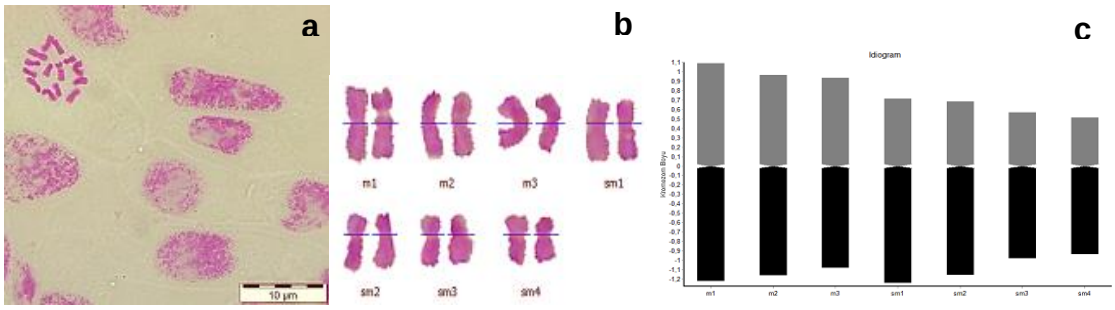
Şekil 4.6. 601 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

B-110 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 5. ve 7. kromozomlar submetasentrik, diğer 1., 2., 3., 4. ve 6. kromozomlar ise metasentriktir (Şekil 4.7).



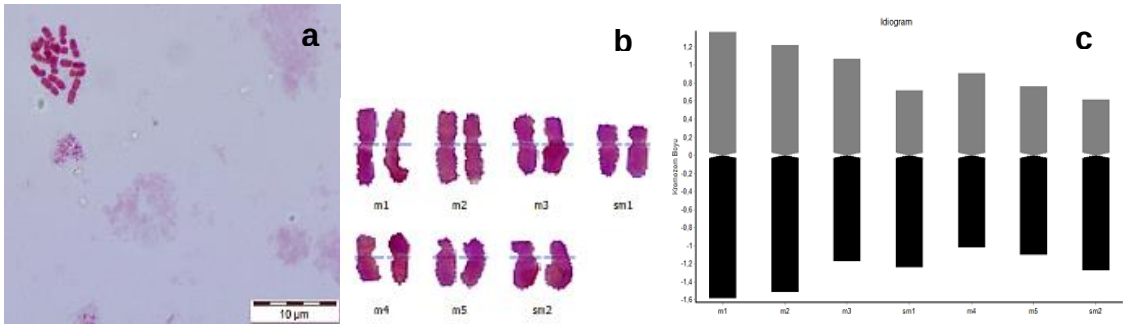
Şekil 4.7. B-110 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

A-24 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 2. ve 3. kromozom metasentrik, geri kalan 4., 5., 6. ve 7. kromozomlar ise submetasentrik olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).



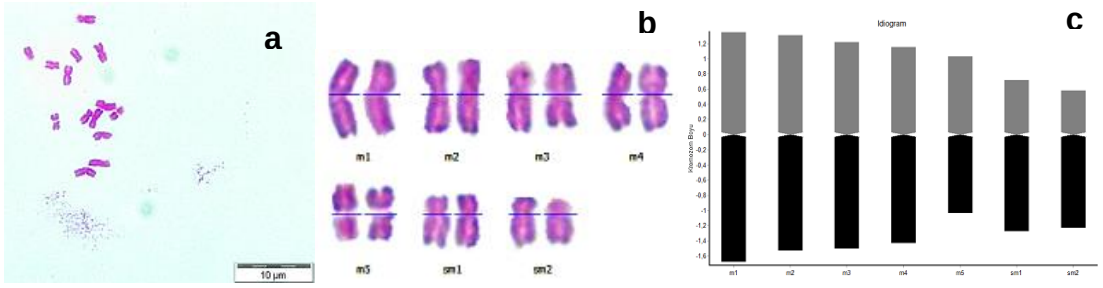
Şekil 4.8. A-24 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

234 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 4. ve 7. kromozomlar submetasentrik, geri kalan 1., 2., 3., 5. ve 6. kromozomlar ise metasentriktir (Şekil 4.9).



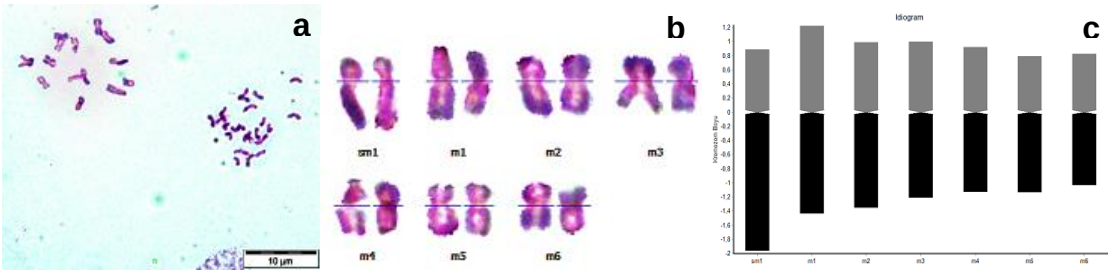
Şekil 4.9. 234 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

603 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 2., 3., 4. ve 5. kromozomlar metasentrik iken, sadece 6. ve 7. kromozomlar submetasentrikdir (Şekil 4.10).



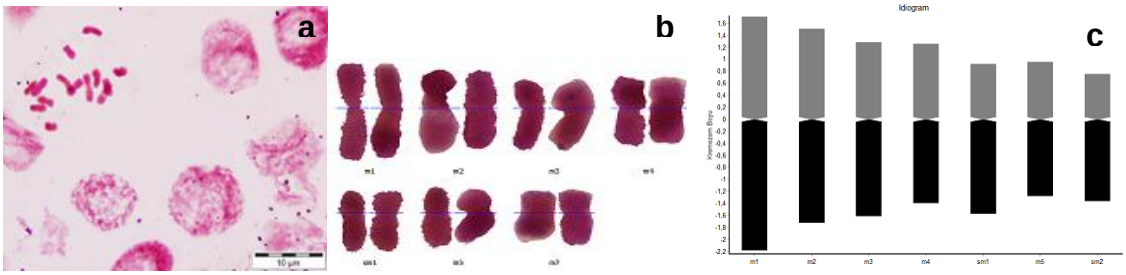
Şekil 4.10. 603 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

A-155 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 2., 3., 4., 5., 6. ve 7. kromozomlar metasentrik, 1. kromozom ise submetasentrikdir (Şekil 4.11).



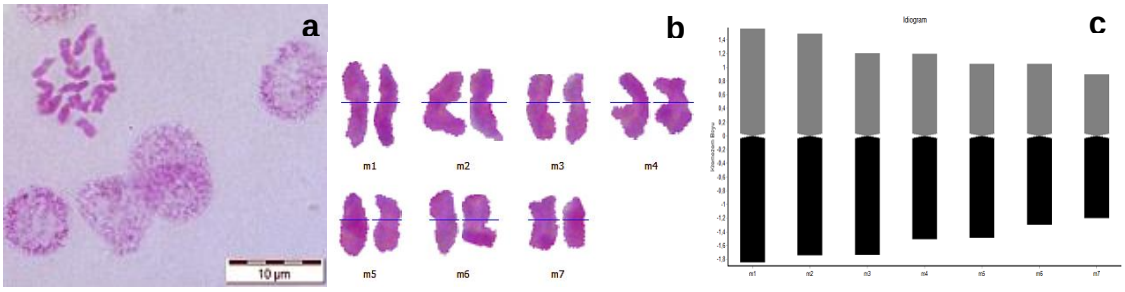
Şekil 4.11. A-155 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafaz, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

G-501 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. kromozomlar metasentrik, 7. kromozom ise submetasentrikdir (Şekil 4.12).



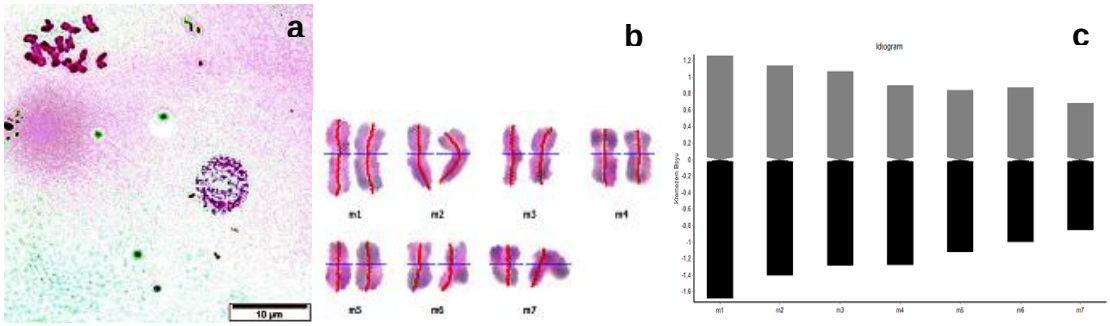
Şekil 4.12. G-501 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

G-504 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, tüm kromozomlar metasentrikdir (Şekil 4.13).



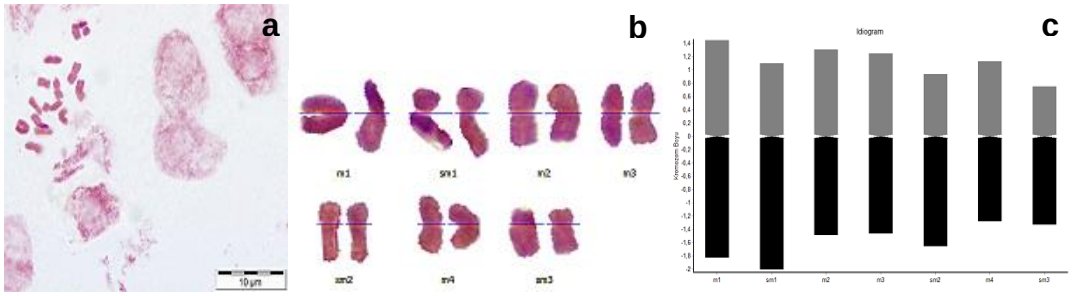
Şekil 4.13. G-504 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

A-134 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, tüm kromozomlar metasentrikdir (Şekil 4.14).



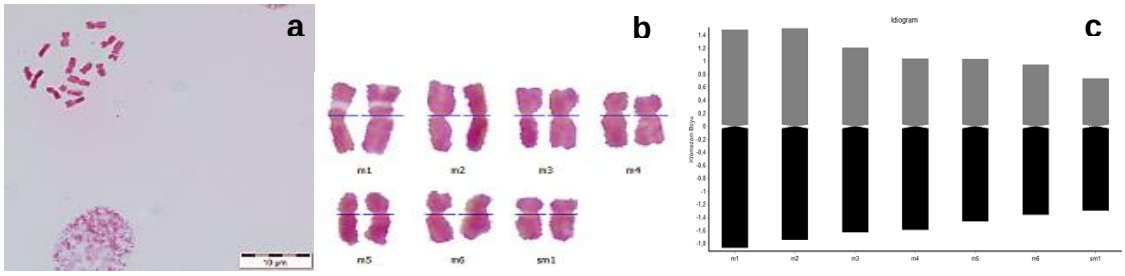
Şekil 4.14. A-134 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

G-506 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 3., 4. ve 6. kromozomların metasentrik, 2., 5. ve 7. kromozomların ise submetasentrik olduğu görülmektedir (Şekil 4.15).



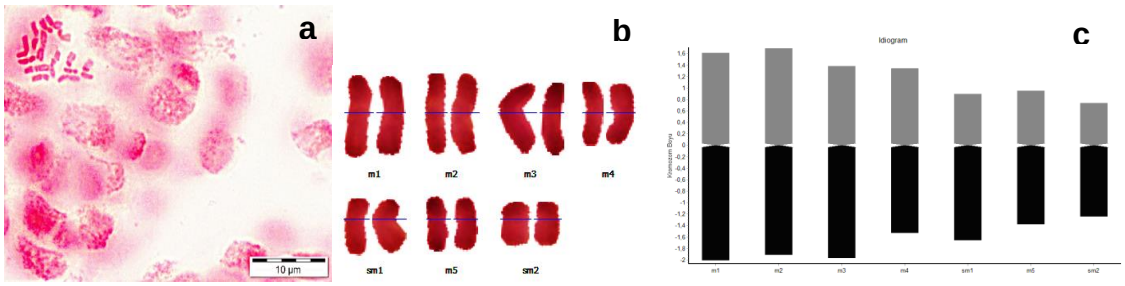
Şekil 4.15. G-506 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

B-1 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. kromozomların metasentrik, 7. kromozom ise submetasentrikdir (Şekil 4.16).



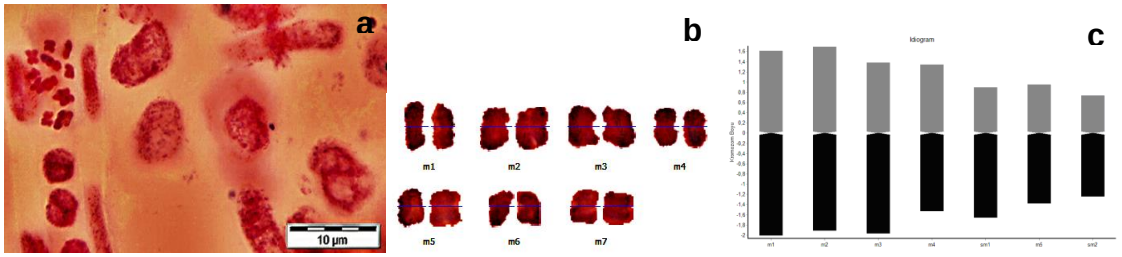
Şekil 4.16. B-1 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

602 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 2., 3., 4, 5. ve 6. kromozomların metasentrik, 7. kromozom ise submetasentrikdir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. 602 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

B - 117 asesiyon numaralı genotipe ait kromozom sayısı 2n=14 olarak belirlenmiş olup, 1., 3., 4. ve 6. kromozomların metasentrik, geri kalan 2., 5. ve 7. kromozomların ise submetasentrik olduğu görülmektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. B-117 asesiyon numaralı genotipe ait **(a)** Metafazdaki hücre, **(b)** Karyogram, **(c)** İdiogram grünümü

Çizelge 4.2. Çim (*Lolium* L.) genotiplerine ait kromozom ölçümleri: Değişim katsayısı (**D),** en uzun kromozomun en kısa kromozoma oranı (**DO),** kısa kol uzunluğu (**KKU),** uzun kol uzunluğu (**UKU),** kromozom uzunluğu (**KU),** toplam kromozom uzunluğu (**TKU),** sentromerik indeks (**SI),** karyotip formülü (**KF),** metasentrik (**m)** ve submetasentrik (**sm)**

No	Örnek Kodu	Genotiplerin Adı	2n	D Min-Maks	DO Maks/Min	KKU (µm) Ort±Ss	UKU (µm) Ort±Ss	KU(µm) Ort±Ss	TKU (µm)	SI Ort±Ss	KF
1	**LP 1**	A-24	14	1.45 - 2.32	1.598	0.78 (±0.20)	1.11 (±0.11)	1.89 (±0.29)	13.256	0.41 (±0.05)	6.m + 8.sm
2	**LP 2**	A-43	14	1.55 - 2.62	1.697	0.90 (±0.20)	1.12 (±0.17)	2.02 (±0.36)	14.172	0.44 (±0.04)	12.m + 2.sm
3	**LP 3**	A-134	14	1.54 - 2.94	1.917	0.96 (±0.18)	1.23 (±0.25)	2.20 (±0.43)	15.384	0.44 (±0.02)	14.m
4	**LP 4**	A-149	14	2.02 - 3.78	1.872	1.21 (±0.30)	1.74 (±0.37)	2.95 (±0.59)	20.643	0.41 (±0.06)	12.m + 2.sm
5	**LP 5**	A-155	14	1.81 - 2.86	1.577	1.01 (±0.20)	1.26 (±0.15)	2.27 (±0.34)	15.882	0.44 (±0.03)	14.m
6	**LP 6**	B-1	14	2.03 - 3.35	1.652	1.13 (±0.26)	1.57 (±0.19)	2.70 (±0.45)	0.42 (±0.03)	18.916	12.m + 2.sm
7	**LP 7**	B-35	14	1.06-2.01	1.888	0.66 (±0.14)	0.87 (±0.16)	1.52 (±0.29)	10.65	0.43 (±0.02)	14.m
8	**LP 8**	B-59	14	1.94 - 2.99	1.546	1.07 (±0.22)	1.33 (±0.17)	2.40 (±0.35)	16.778	0.44 (±0.04)	12.m + 2.sm
9	**LP 9**	B-110	14	2.18 - 3.69	1.691	1.17 (±0.27)	1.61 (±0.25)	2.78 (±0.48)	19.454	0.42 (±0.04)	10.m + 4.sm
10	**LP 10**	B-117	14	1.57 - 2.12	1.348	0.81 (±0.11)	0.98 (±0.09)	1.79 (±0.18)	12.564	0.45 (±0.02)	14.m
11	**LP 11**	G-500	14	1.53 - 2.86	1.869	0.94 (±0.25)	1.17 (±0.16)	2.10 (±0.40)	14.724	0.44 (±0.05)	10.m + 4.sm
12	**LP 12**	G-501	14	2.20 - 3.91	1.78	1.22 (±0.30)	1.62 (±0.27)	2.84 (±0.55)	19.887	0.43 (±0.03)	12.m + 2.sm
13	**LP 13**	G-504	14	2.10 - 3.42	1.625	1.21 (±0.22)	1.55 (±0.23)	2.76 (±0.44)	19.294	0.44 (±0.02)	14.m
14	**LP 14**	G-506	14	2.08 - 3.28	1.575	1.13 (±0.22)	1.58 (±0.25)	2.71 (±0.37)	18.962	0.41 (±0.05)	8.m + 6.sm
15	**LP 15**	234	14	1.86 - 2.95	1.585	0.95 (±0.26)	1.27 (±0.19)	2.22 (±0.41)	15.552	0.42 (±0.05)	10.m + 4.sm
16	**LP 16**	601	14	1.25 - 2.17	1.73	0.76 (±0.19)	1.08 (±0.14)	1.84 (±0.31)	12.891	0.41 (±0.04)	10.m + 4.sm
17	**LP 17**	602	14	1.98 - 3.62	1.825	1.23 (±0.34)	1.67 (±0.28)	2.90 (±0.60)	20.33	0.42 (±0.04)	10.m + 4.sm
18	**LP 18**	603	14	1.81 - 3.03	1.676	1.05 (±0.27)	1.38 (±0.20)	2.44 (±0.44)	17.055	0.43 (±0.06)	10.m + 4.sm

Karyomorfolojik verilere göre A-149, A-43 ve B-1 aynı karyotip formülü (6 m+1sm) paylaşmakla birlikte, kromozomal yapı açısından da oldukça benzer çim genotipleridir. Bu genotiplerle aynı karyotipik formülü paylaşmakla birlikte kromozom sırası açısından farklılık gösteren diğer iki genotip B-59 ve A-155'dir. A-155 genotipine ait kromozomların ilki submetasentrik olması ile diğerlerinden farklılaşmış görülmektedir. Tüm kromozomları metasentrik tipden oluşan genotipler B-35, G-504 ve A-134'dür. Bunlar muhtemelen çalışılanlar içerisinde kromozomal evrim açısından en az varyasyon içeren, en az farklılaşmış çim genotipleridir. Kromozom formülü 5m+ 2sm olan genotiplerden G-500 ve 603, 601, B-110 ve G-501 birbirleriyle benzerlik gösterirken 234 numaralı asesiyonun kromozomları sırasal düzende farklılık göstermektedir. A-24 nolu genotip sadece karyotip formülü (3m+4 sm) ile değil, aynı zamanda kromozomlarının çoğunluğunun submetasentrik kromozomlardan oluşması

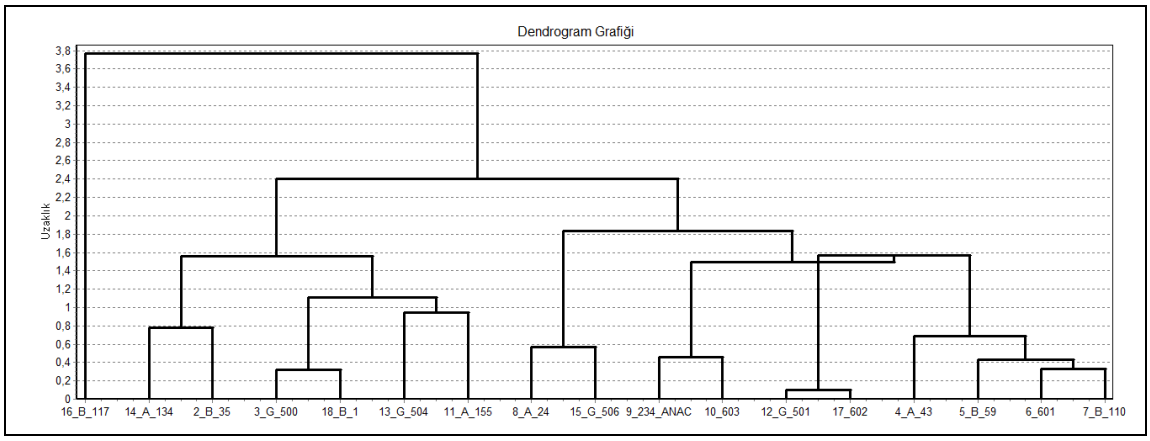
bakımından diğerlerinden oldukça farklılaşmış görülmektedir. En fazla kromozomal düzenlemeye uğramış çim genotiplerinden biri olarak A-24 gösterilebilir. Karyotip formülü 4m+3 sm olan sadece G-506 numaralı çim genotipidir. Dolayısıyla *Lolium* cinsine ait toplanan çim genotiplerinin karyotip formülleri açısından bir çeşitliliğe sahip olduğu ve karyomorfolojik açıdan oldukça farklılaştığı görülmektedir (Çizelge 4.2).

Toplanan genotiplerin asimetri indekslerine bakıldığında, B-117 numaralı Şarkikaraağaç civarından toplanan genotipin en düşük (0.47), Akşehir civarından toplanan A-149 numaralı genotipin ise en yüksek asimetri indeksine (2.85) sahip genotipler olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Buradan hareketle kromozom morfolojileri açısından A-149 numaralı genotipin en asimetrik kromozomlara sahip genotip olduğu, bu genotipin diğerlerine kıyasla kromozom morfolojisi bakımından oldukça farklı olduğu söylenebilir. Geri kalan çim genotiplerinin ise asimetri indeksi en

Çizelge 4.3. Çim (*Lolium* L) genotiplerine ait, intrakromozomal asimetri (**A_1**), **i**nterkromozomal asimetri (**A_2**), kromozom uzunluğu varyasyon katsayısı (**CV_{CL}**), kromozomal indeks varyasyon katsayısı (**CV_{CI}**) ve asimetri indeksi (**AI**)

İndis / Genotip	A1	A2	C VCL	C VCI	AI
A-24	0.302	0.151	15.065	12.084	1.820
A-43	0.199	0.177	17.697	8.707	1.541
A-134	0.214	0.196	19.582	3.722	0.729
A-149	0.295	0.199	19.941	14.276	2.847
A-155	0.262	0.152	15.171	11.247	1.706
B-1	0.285	0.165	16.540	7.210	1.193
B-35	0.243	0.192	19.165	4.915	0.942
B-59	0.193	0.144	14.444	10.018	1.447
B-110	0.271	0.174	17.404	9.713	1.690
B-117	0.169	0.102	10.151	4.660	0.473
G-500	0.286	0.173	17.261	7.152	1.235
G-501	0.252	0.194	19.361	7.664	1.484
G-504	0.224	0.159	15.921	4.443	0.707
G-506	0.278	0.138	13.806	12.175	1.681
234	0.255	0.186	18.565	12.627	2.344
601	0.299	0.169	16.903	10.266	1.735
602	0.274	0.205	20.545	10.158	2.087
603	0.242	0.180	18.048	13.519	2.440

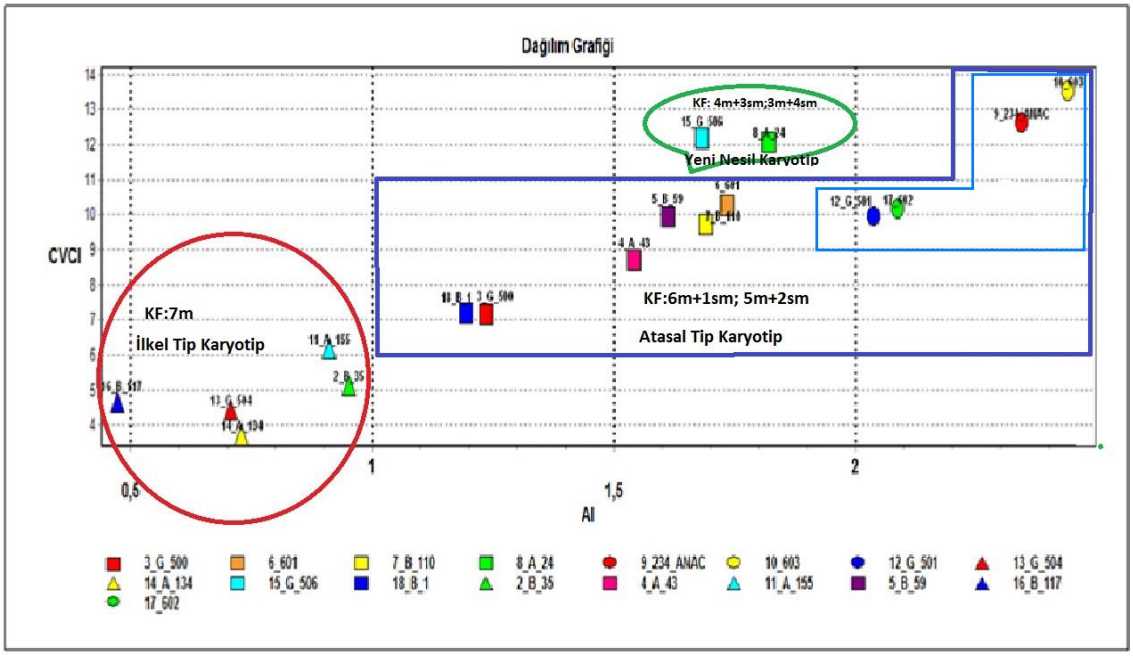
fazla 2.4 civarında olup, bu grupta yer alan çimlerin simetrik kromozomlardan az çok asimetrik kromozomlara doğru değişim gösterdikleri görülmektedir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.19. Çim (*Lolium* L.)genotiplerinin karyomorfolojik ilişkilerini gösteren dendogram

Çim (Lolium L.) genotiplerinin karyomorfolojik ilişkilerini gösteren dendograma göre, çalışılan genotipler içerisinde kromozom morfolojisi açısından en simetrik kromozomlara sahip olanı, B-117 numaralı Şarkikaraağaç civarından toplanan genotiptir (Şekil 4.19). Bu genotipin bulunduğu kladda yer alan çimler iki ana gruba ayrılmakta olup, dendogramın solunda A-134 ile B-35, G-500 ile B-1, G-504 ile A-155 yakın karyotipler olarak değerlendirilebilir. Dendogramın sağ ana kladında ise genotiplerin büyük çoğunluğu yer almakta olup, karyotipleri açısından B-110, G-501, B-59, A-43 benzerlik göstermektedir. Aynı klad içerisinde yer alan genotiplerden G-501 ile 602, 234 ile 603, A-24 ile G-506 ortak karyomorfolojik özelliklere sahiptir (Şekil 4.19).

Sentromer indeksi varyasyonu açısından en yüksek çeşitliliği gösteren genotip olan A-149 kromozom uzunluğu varyasyonu açısından da en yüksek değere sahip olan çimdir. Dolayısıyla, bu çim asesiyonu diğerlerine kıyasla daha fazla kromozomal değişimlere maruz kalmış olabilir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.20. Sentromer indeksi varyasyonu (CVCI) ve Asimetri indeksine (AI) göre oluşturulan dağılım grafiği

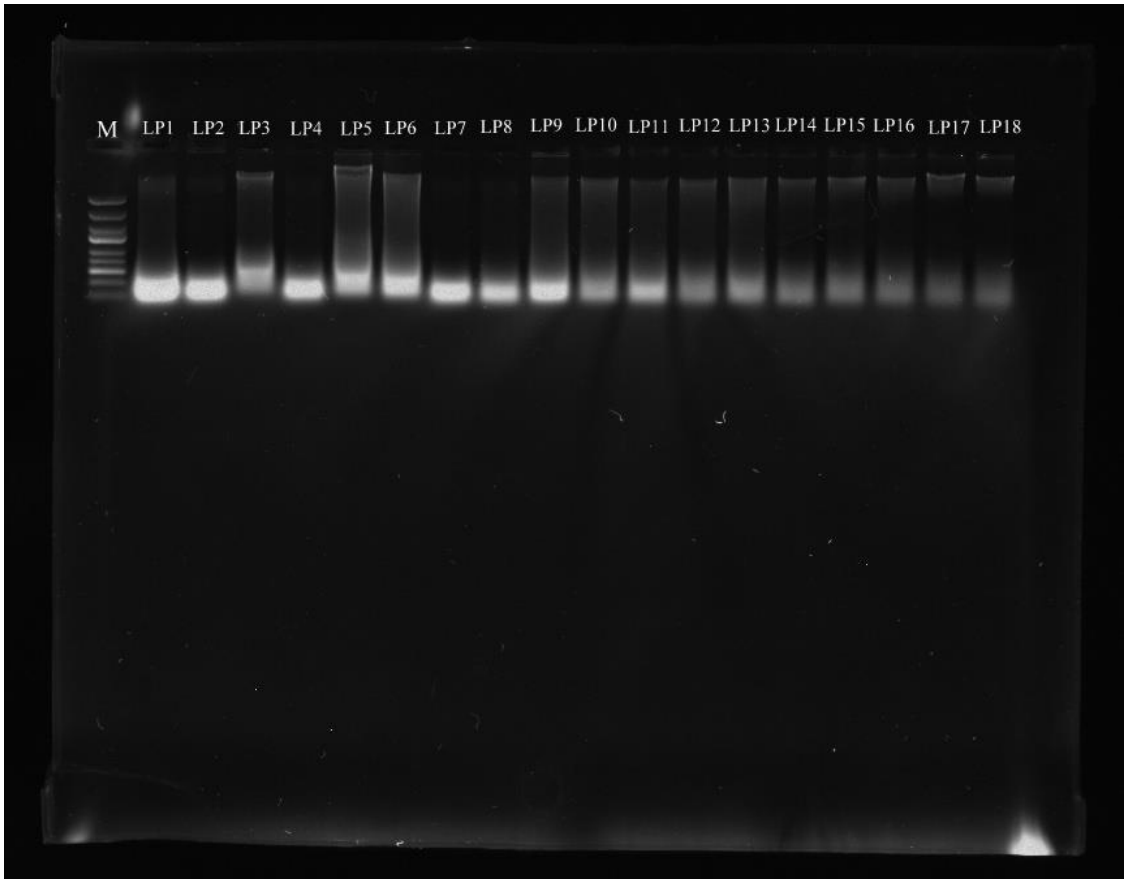
Sentromer indeksi ve asimetri indeksine göre oluşturulan dağılım grafiğine göre *Lolium* cinsine ait genotiplerin kromozom yapısı ve morfolojisi açısından 4 grupta değerlendirilmesi yapılabilir. Birinci grupta yer alan genotiplerin hem asimetri indeksi, hem de sentromer indeksi varyasyonu oldukça düşük görülmektedir (AI<1; CVCI<7). İlkel tipde simetrik kromozomlara sahip B-117 numaralı genotip kromozom varyasyonu açısından en düşük değerleri içermektedir ve dolayısıyla bu türün kromozomları sentromer indeksi ve kromozom varyasyonu açısından oldukça benzerdir (Şekil 4.20). G-504 ile A-134 numaralı genotiplerin kromozomları ele alınan değerler açısından oldukça benzer görülmektedir. Bu iki genotipin karyotip formüllerinin de aynı olduğu göz önüne alındığında aynı veya yakın ilişkili taksonlara ait genotipler olarak değerlendirilebilir. A-155 ve B-35 numaralı genotiplerin kromozomları sentromer indeksleri varyasyonu ve asimetri indeksi bakımından benzerlik göstermekle birlikte, karyotip formüllerinin farklı olması ile ayrılmaktadır. İkinci grupta yer alan B-1 ve G-500 genotipleri kromozomlarının asimetri indeksi ve sentromer indeks varyasyonu açısından ilişkili görülmektedir (1<AI<1.5; 7<CVCI<8). Bu genotiplerin kromozomları simetrik ve sentromer indeksi varyasyonu 3. ve 4. gruptaki genotiplere nispeten daha düşüktür (Atasal Tip Karyotip). Dolayısıyla ilk gruptaki genotiplere kıyasla kromozomlarının daha fazla varyasyon içerdiği söylenebilir. Aynı zamanda genotiplerin kromozomal değişimler ve yeniden düzenlemeler açısından 3. ve 4. gruba kıyasla daha

stabil olduğu anlamına gelir. Üçüncü grupta yer alan genotiplerden (1.5<AI<2; 8<CVCI<13) aynı karyotip formülünü paylaşan A-43 ve B-59 asimetri indeksi ve sentromer indeksi varyasyonu açısından da ilişkili görülmektedir. Dolayısıyla bu genotiplerin aynı taksona ait olduğu varsayılabilir. Bu grup içerisinde aynı karyotip formüle. setromer indeksi varyasyonuna ve asimetri indeksine sahip diğer ilişkili genotipler B-110 ve 601'dir. A-24 ve G-506 karyotip formülleri açısından benzersiz olan, aynı zamanda sentromer indeksi varyasyonu yüksek sayılabilecek genotiplerdir. Sonuç olarak bu iki genotipin kromozomal değişimler ve yeniden düzenlemeler açısından yüksek seviyede etkileşim gösteren, oldukça farklılaşmış çimler olduğu düşünülebilir (Yeni Nesil Karyotip). 4. Grupta yer alan genotiplerin tamamı aynı karyotip formülü paylaşmakta olup, tümü benzer asimetri ve sentromer indeksi varyasyonu göstermektedir (2<AI<2.5; 9<CVCI<14). Bu grup içerisinde yer alan G-501 ile 602'nin atasal tip karyotipi paylaşan genotiplerle yakın ilişkili olduğu söylenebilir. 234 ve 603 nolu genotiplerin kromozomlarının sentromer indeksi varyasyonu ve asimetri indeksi bakımdan yüksek değerler içeren yakın ilişkili genotipler olduğu görülmektedir. Son grupta yer alan genotiplerin diğer gruptakilere kıyasla kromozom simetrisi bakımından daha asimetrik kromozomlara sahip olduğu söylenebilir. Bununla birlikte sentromer indeksi varyasyonu açısından 3. grupta yer alan genotiplerle benzemekle birlikte, geri kalanlara kıyasla oldukça varyasyona uğramış görülmektedir (Şekil 4.20).

4.2. Moleküler Bulgular

4.2.1. DNA izolasyon sonuçları

Doğal vejetasyondan toplanan çok yıllık çimlerin izole edilen total DNA büyüklüğü DNA Ladder'a göre yaklaşık 10-15 kb'dır (Şekil 4.21). Elde edilen DNA'nın saflık dercesi ve konsantrasyonları Çizelge 4.6'da verilmiştir.



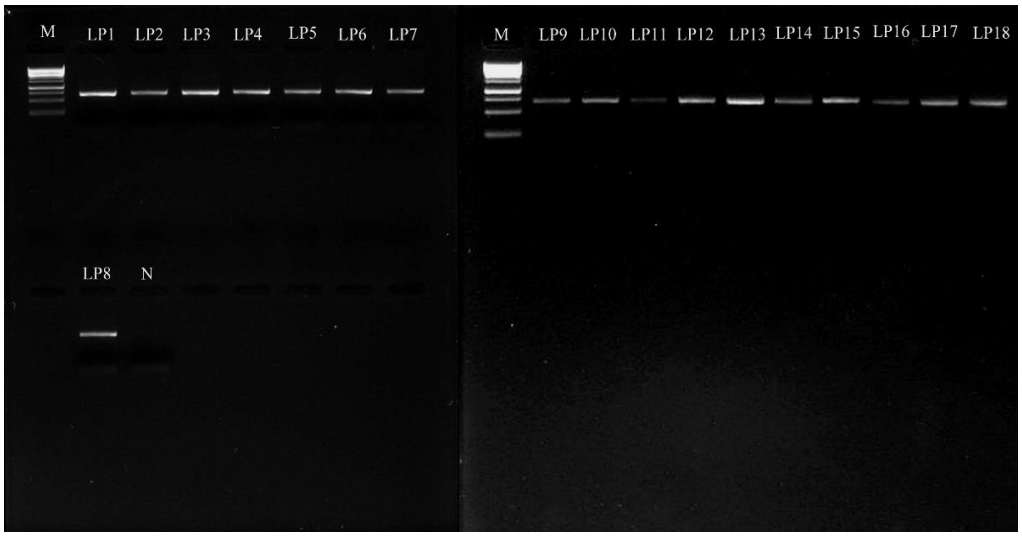
Şekil 4.21. Çok yıllık *Lolium perenne* genotiplerinin agaroz jel DNA görüntüsü

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan çim genotiplerinin nanodrop DNA ölçümleri

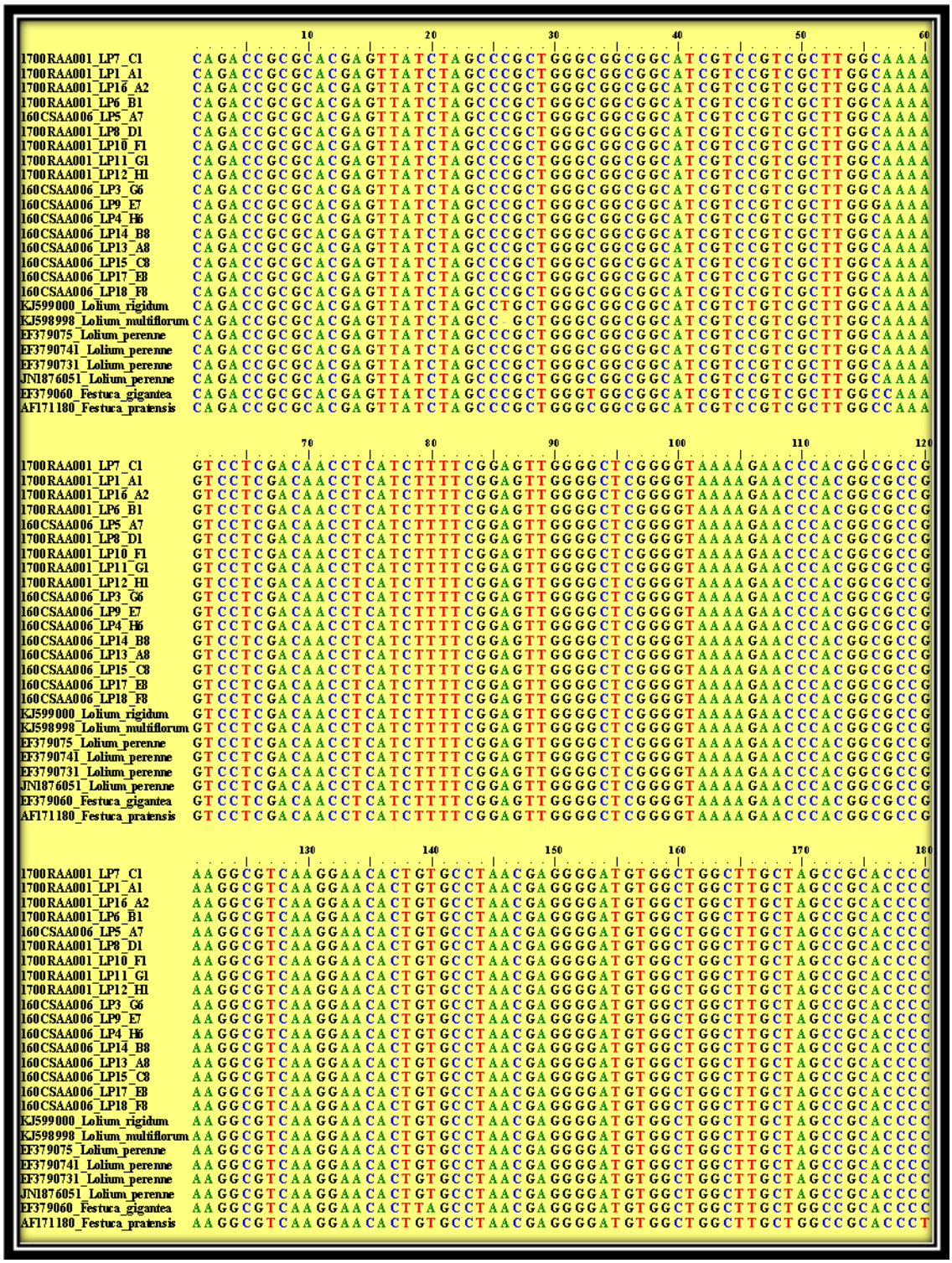
Örnek kodu	Nükleik asit konsantrasyonu (ng)	A260	A280	260/280
LP1	2467.3	49.345	24.177	2.04
LP2	1315.9	26.319	13.182	2
LP3	984.6	19.691	9.51	2.07
LP4	1143.1	22.861	11.404	2
LP5	1677.5	33.549	16.339	2.05
LP6	1617	32.34	15.782	2.05
LP7	1482.2	29.643	14.583	2.03
LP8	1641.1	32.823	16.302	2.01
LP9	2227.3	44.546	21.988	2.03
LP10	1334.6	26.692	13.236	2.02
LP11	1689.4	33.788	16.535	2.04
LP12	1096.7	21.935	10.711	2.05
LP13	1441.4	28.829	14.289	2.02
LP14	1182.9	23.658	11.786	2.01
LP15	1514.8	30.297	14.863	2.04
LP16	1556	31.121	15.326	2.03
LP17	1428.6	28.572	13.925	2.05
LP18	1705.6	34.112	16.833	2.03

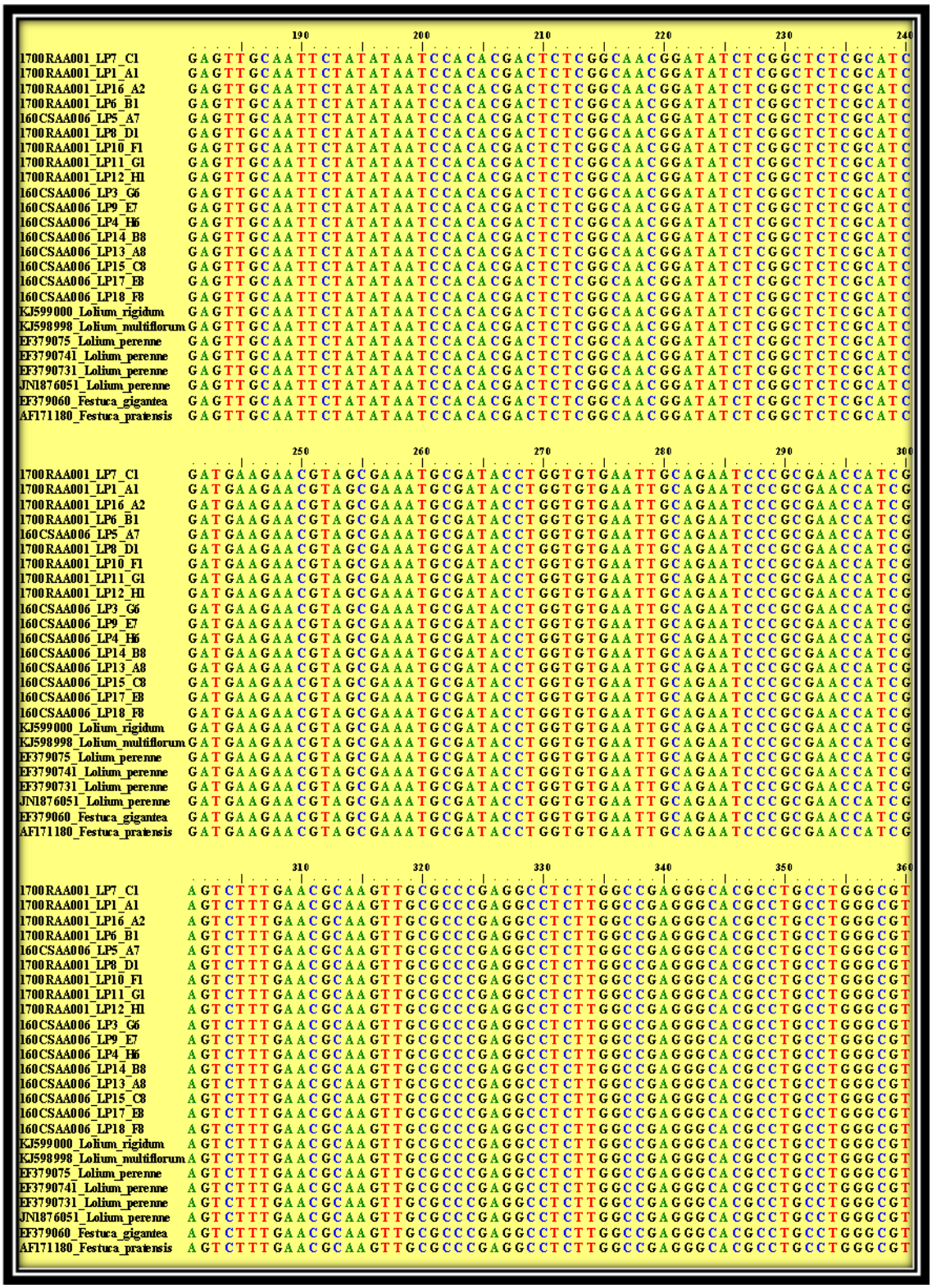
4.2.2. ITS analizi

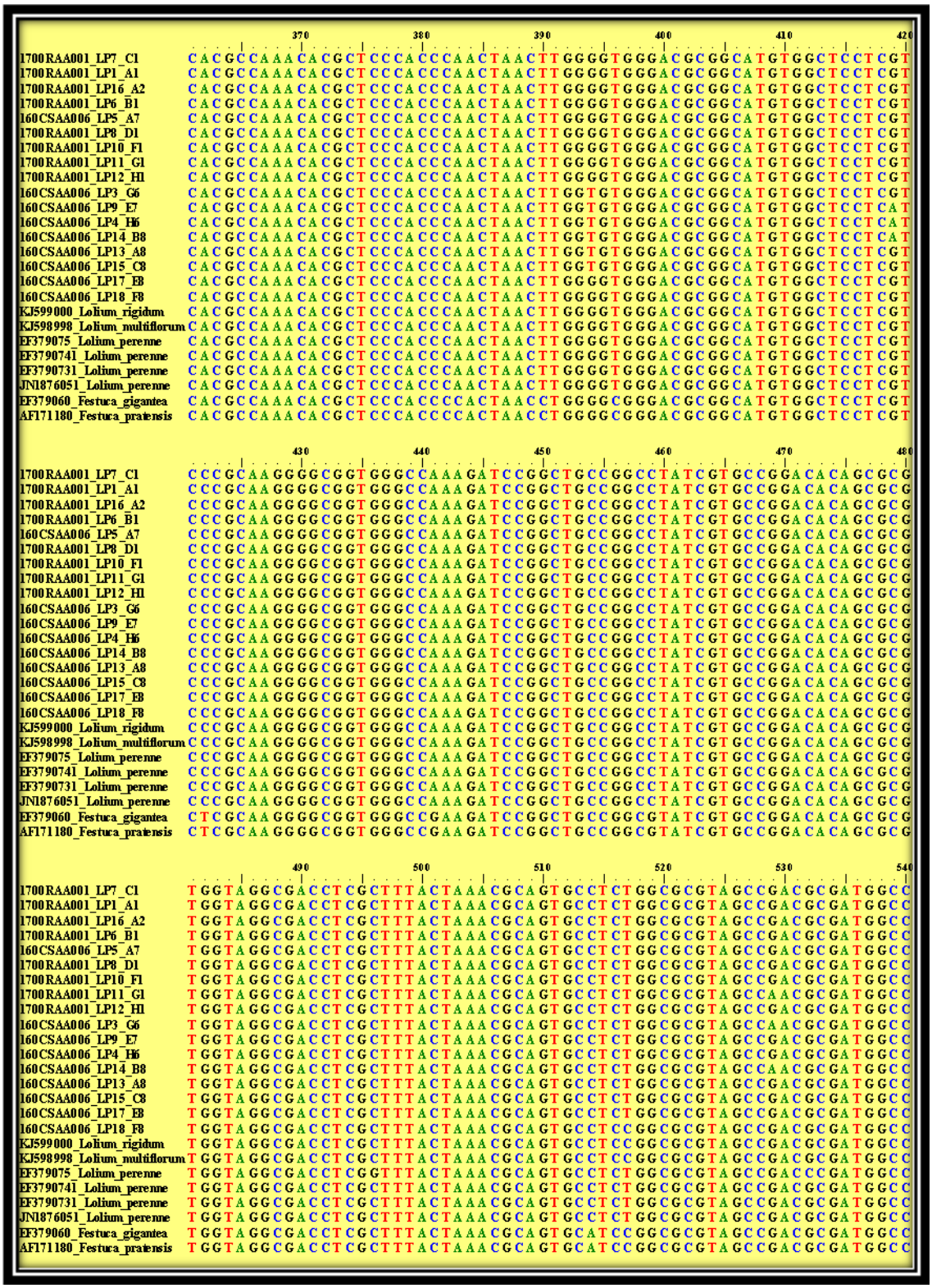
Amplifiye edilen ITS gen bölgesinin büyüklüğü 500-750 bp arasında bulunmuştur (Şekil 4.22). Bantlar oldukça belirgin düzgün ve dimer oluşumu görülmemesi nedeniyle saflaştırıldıktan sonra dizilenmiştir. Elde edilen ham diziler Bioedit programında hizalanarak (Şekil 4.23) veri matriksine dönüştürülmüştür.

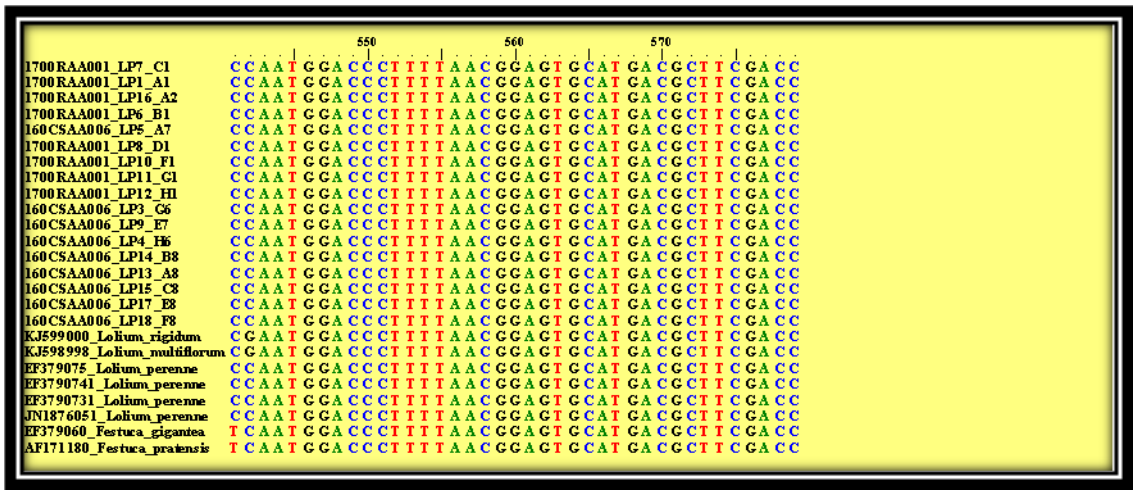


Şekil 4.22. Çok yıllık çim genotiplerine ait çoğaltılan ITS gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü


1700RAA001_LP7_C1
1700RAA001_LP1_A1
1700RAA001_LP16_A2
1700RAA001_LP6_B1
160CSAA006_LP5_A7
1700RAA001_LP8_D1
1700RAA001_LP10_F1
1700RAA001_LP11_G1
1700RAA001_LP12_H1
160CSAA006_LP3_G6
160CSAA006_LP9_E7
160CSAA006_LP4_H6
160CSAA006_LP14_B8
160CSAA006_LP13_A8
160CSAA006_LP15_C8
160CSAA006_LP17_E8
160CSAA006_LP18_F8
KJ599000_Lolium_rigidum
KJ598998_Lolium_multiflorum
EF379075_Lolium_perenne
EF3790741_Lolium_perenne
EF3790731_Lolium_perenne
JN1876051_Lolium_perenne
EF379060_Festuca_gigantea
AF171180_Festuca_pratensis

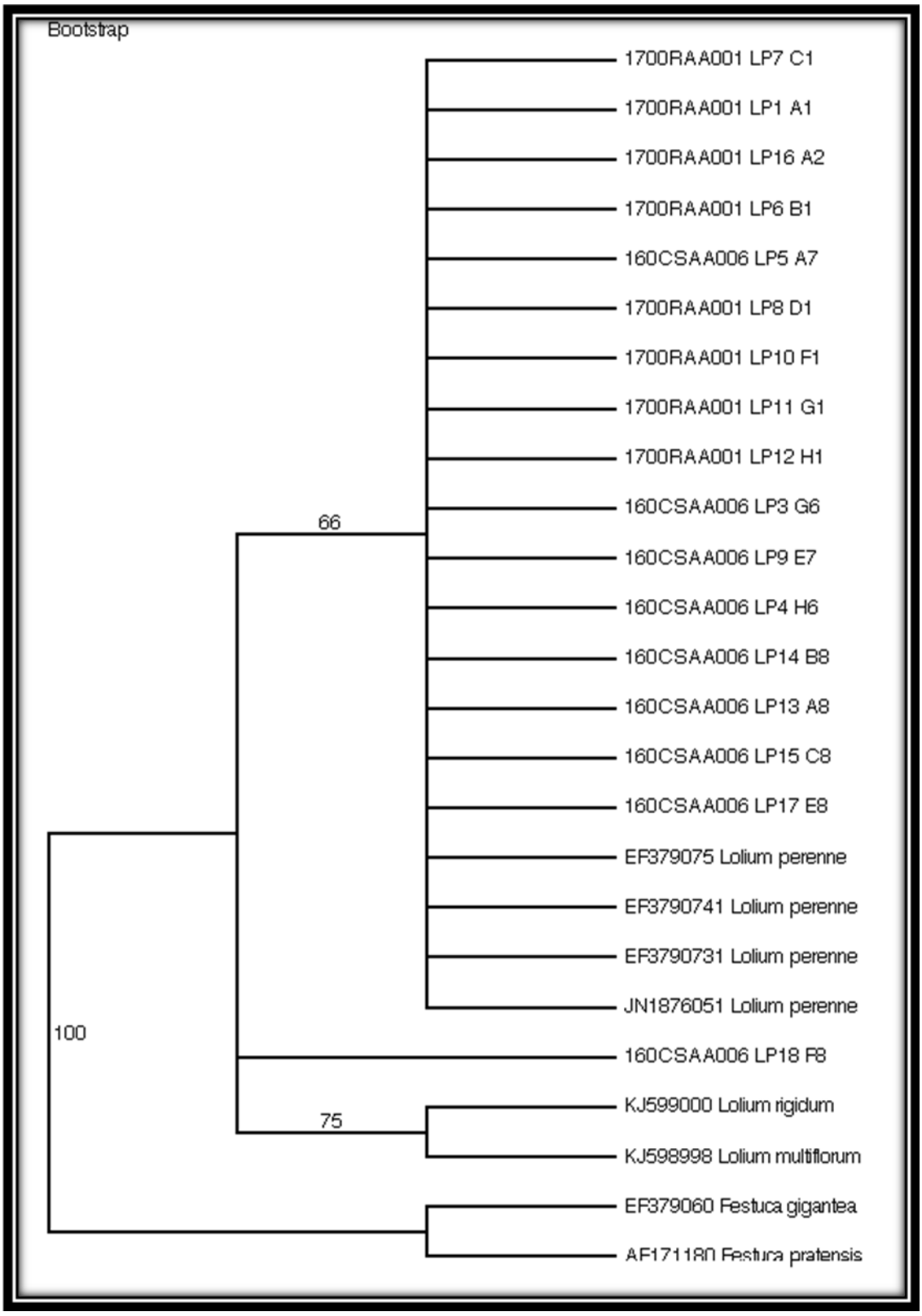

190 200 210 220 230 240
1700RAA001_LP7_C1 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
1700RAA001_LP1_A1 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
1700RAA001_LP16_A2 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
1700RAA001_LP6_B1 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
160CSAA006_LP5_A7 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
1700RAA001_LP8_D1 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
1700RAA001_LP10_F1 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
1700RAA001_LP11_G1 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
1700RAA001_LP12_H1 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
160CSAA006_LP3_G6 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
160CSAA006_LP9_E7 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
160CSAA006_LP4_H6 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
160CSAA006_LP14_B8 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
160CSAA006_LP13_A8 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
160CSAA006_LP15_C8 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
160CSAA006_LP17_E8 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
160CSAA006_LP18_F8 GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
KJ599000_Lolium_rigidum GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
KJ598998_Lolium_multiflorum GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
EF379075_Lolium_perenne GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
EF3790741_Lolium_perenne GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
EF3790731_Lolium_perenne GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
JN1876051_Lolium_perenne GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
EF379060_Festuca_gigantea GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
AF171180_Festuca_pratensis GAGTTGCAATTCTATATAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
250 260 270 280 290 300
1700RAA001_LP7_C1 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
1700RAA001_LP1_A1 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
1700RAA001_LP16_A2 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
1700RAA001_LP6_B1 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
160CSAA006_LP5_A7 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
1700RAA001_LP8_D1 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
1700RAA001_LP10_F1 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
1700RAA001_LP11_G1 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
1700RAA001_LP12_H1 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
160CSAA006_LP3_G6 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
160CSAA006_LP9_E7 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
160CSAA006_LP4_H6 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
160CSAA006_LP14_B8 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
160CSAA006_LP13_A8 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
160CSAA006_LP15_C8 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
160CSAA006_LP17_E8 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
160CSAA006_LP18_F8 GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
KJ599000_Lolium_rigidum GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
KJ598998_Lolium_multiflorum GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
EF379075_Lolium_perenne GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
EF3790741_Lolium_perenne GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
EF3790731_Lolium_perenne GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
JN1876051_Lolium_perenne GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
EF379060_Festuca_gigantea GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
AF171180_Festuca_pratensis GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCG
310 320 330 340 350 360
1700RAA001_LP7_C1 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
1700RAA001_LP1_A1 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
1700RAA001_LP16_A2 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
1700RAA001_LP6_B1 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
160CSAA006_LP5_A7 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
1700RAA001_LP8_D1 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
1700RAA001_LP10_F1 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
1700RAA001_LP11_G1 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
1700RAA001_LP12_H1 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
160CSAA006_LP3_G6 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
160CSAA006_LP9_E7 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
160CSAA006_LP4_H6 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
160CSAA006_LP14_B8 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
160CSAA006_LP13_A8 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
160CSAA006_LP15_C8 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
160CSAA006_LP17_E8 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
160CSAA006_LP18_F8 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
KJ599000_Lolium_rigidum AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
KJ598998_Lolium_multiflorum AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
EF379075_Lolium_perenne AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
EF3790741_Lolium_perenne AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
EF3790731_Lolium_perenne AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
JN1876051_Lolium_perenne AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
EF379060_Festuca_gigantea AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT
AF171180_Festuca_pratensis AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGT


370 380 390 400 410 420
1700RAA001_LP7_C1 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
1700RAA001_LP1_A1 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
1700RAA001_LP16_A2 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
1700RAA001_LP6_B1 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
160CSAA006_LP5_A7 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
1700RAA001_LP8_D1 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
1700RAA001_LP10_F1 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
1700RAA001_LP11_G1 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
1700RAA001_LP12_H1 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
160CSAA006_LP3_G6 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGTGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
160CSAA006_LP9_E7 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGTGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCAT
160CSAA006_LP4_H6 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGTGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCAT
160CSAA006_LP14_B8 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGTGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCAT
160CSAA006_LP13_A8 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGTGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
160CSAA006_LP15_C8 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGTGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
160CSAA006_LP17_E8 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
160CSAA006_LP18_F8 CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
KJ599000_Lolium_rigidum CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
KJ598998_Lolium_multiflorum CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
EF379075_Lolium_perenne CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
EF3790741_Lolium_perenne CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
EF3790731_Lolium_perenne CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
JN1876051_Lolium_perenne CACGCCAAACACGCTCCCACCCAACTAACTTGGGGTGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
EF379060_Festuca_gigantea CACGCCAAACACGCTCCCACCCCACTAACCTGGGGCGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
AF171180_Festuca_pratensis CACGCCAAACACGCTCCCACCCCACTAACCTGGGGCGGGACGCGGCATGTGGCTCCTCGT
430 440 450 460 470 480
1700RAA001_LP7_C1 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
1700RAA001_LP1_A1 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
1700RAA001_LP16_A2 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
1700RAA001_LP6_B1 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
160CSAA006_LP5_A7 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
1700RAA001_LP8_D1 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
1700RAA001_LP10_F1 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
1700RAA001_LP11_G1 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
1700RAA001_LP12_H1 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
160CSAA006_LP3_G6 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
160CSAA006_LP9_E7 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
160CSAA006_LP4_H6 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
160CSAA006_LP14_B8 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
160CSAA006_LP13_A8 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
160CSAA006_LP15_C8 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
160CSAA006_LP17_E8 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
160CSAA006_LP18_F8 CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
KJ599000_Lolium_rigidum CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
KJ598998_Lolium_multiflorum CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
EF379075_Lolium_perenne CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
EF3790741_Lolium_perenne CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
EF3790731_Lolium_perenne CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
JN1876051_Lolium_perenne CCCGCAAGGGGCGGTGGGCCAAAGATCCGGCTGCCGGCCTATCGTGCCGGACACAGCGCG
EF379060_Festuca_gigantea CTCGCAAGGGGCGGTGGGCCGAAGATCCGGCTGCCGGCGTATCGTGCCGGACACAGCGCG
AF171180_Festuca_pratensis CTCGCAAGGGGCGGTGGGCCGAAGATCCGGCTGCCGGCGTATCGTGCCGGACACAGCGCG
490 500 510 520 530 540
1700RAA001_LP7_C1 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
1700RAA001_LP1_A1 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
1700RAA001_LP16_A2 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
1700RAA001_LP6_B1 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
160CSAA006_LP5_A7 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
1700RAA001_LP8_D1 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
1700RAA001_LP10_F1 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
1700RAA001_LP11_G1 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCAACGCGATGGCC
1700RAA001_LP12_H1 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
160CSAA006_LP3_G6 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCAACGCGATGGCC
160CSAA006_LP9_E7 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
160CSAA006_LP4_H6 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
160CSAA006_LP14_B8 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCAACGCGATGGCC
160CSAA006_LP13_A8 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
160CSAA006_LP15_C8 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
160CSAA006_LP17_E8 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
160CSAA006_LP18_F8 TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCCGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
KJ599000_Lolium_rigidum TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCCGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
KJ598998_Lolium_multiflorum TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCCGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
EF379075_Lolium_perenne TGGTAGGCGACCTCGGTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACCCGATGGCC
EF3790741_Lolium_perenne TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
EF3790731_Lolium_perenne TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
JN1876051_Lolium_perenne TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCCTCTGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
EF379060_Festuca_gigantea TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCATCCGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC
AF171180_Festuca_pratensis TGGTAGGCGACCTCGCTTTACTAAACGCAGTGCATCCGGCGCGTAGCCGACGCGATGGCC



Şekil 4.23. *Lolium perenne* genotiplerinin bioedit ile hizalanmış ITS dizileri

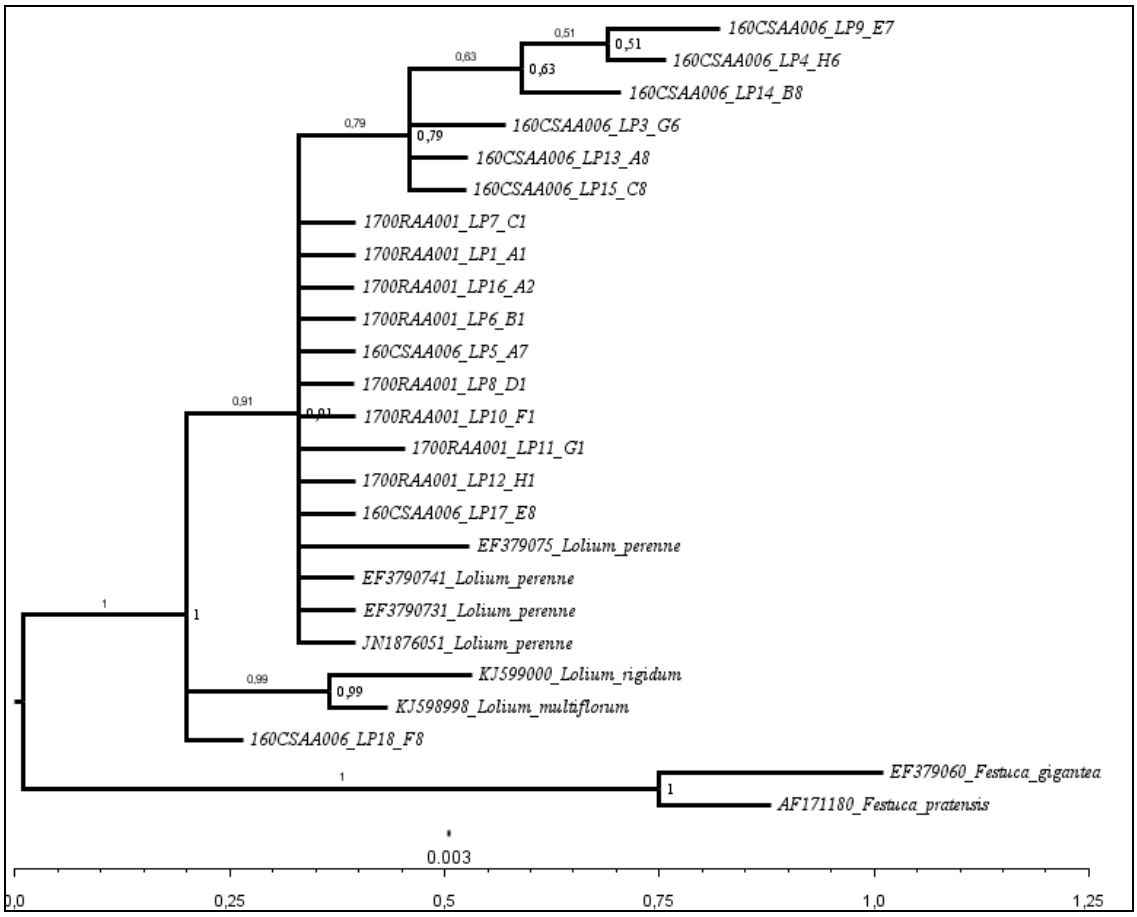
Çekirdek DNA'sına ait bir intron olan ITS gen bölgesi dizi analizlerimizden gelen 23 genotipe ait hizalanan veri matriksinin toplam uzunluğu 579 olup, bu veri matriksine ait 555 karakter sürekli, 9 karakter ise değişkendir (Şekil 4.23). Parsimoni için bilgi verici karakter sayısı ise 15'dir. Parsimoni analizlerinden gelen tutumluluk indeksi (CI) 0.727, Tutarlılık indeksi 0.625, Homoplasi indeksi ise 0.273 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak ITS gen bölgesine göre yapılandırılan filogenetik ağacın güven aralığında olduğu belirlenmiştir.



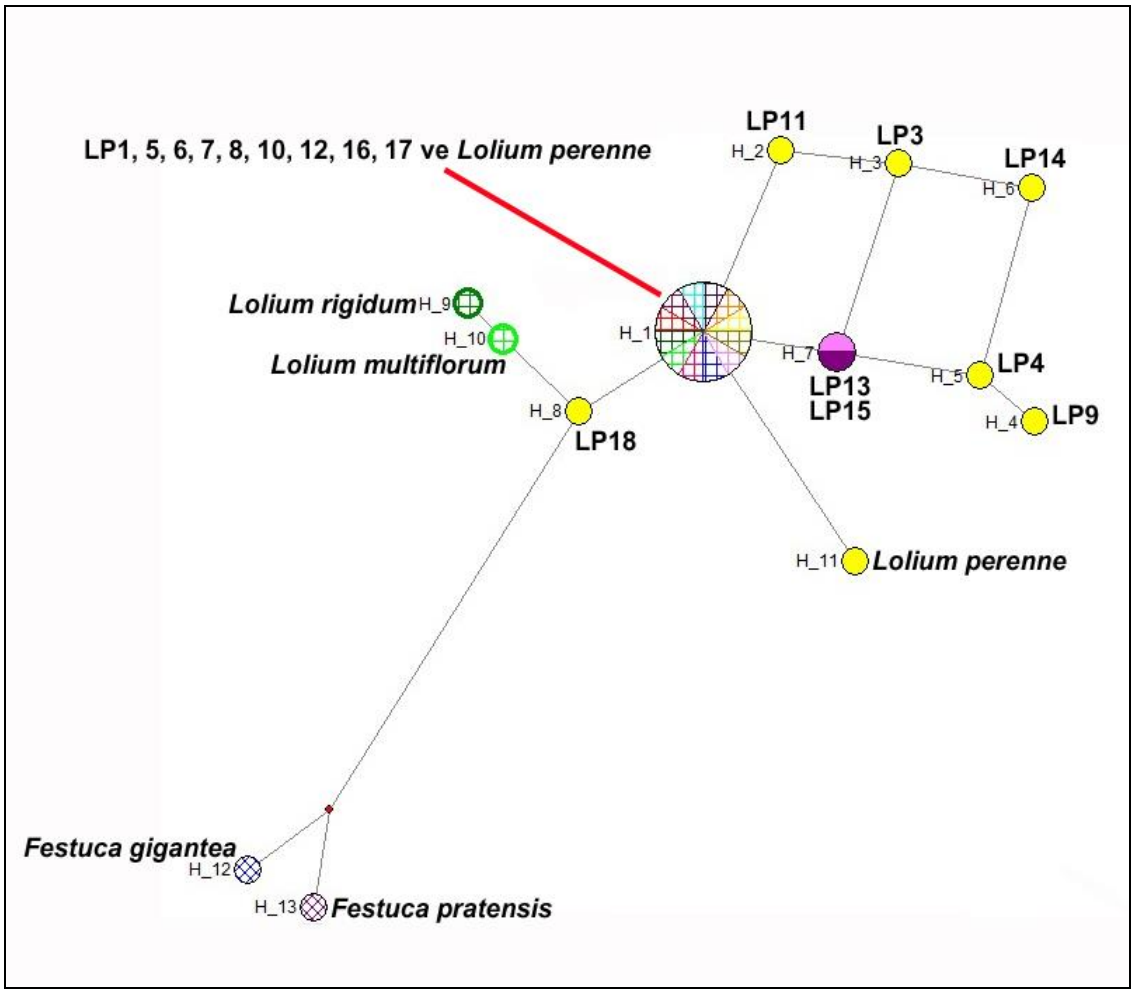
Şekil 4.24. ITS sekanslarına ait parsimoni analizleri ile oluşturulmuş *Lolium cinsi* taksonları *ve* genotiplerine ait filogenetik akrabalığı gösteren soyağacı

Çekirdek DNA'sına ait ITS intron bölgesinin hizalanmış nükleotit dizilerden oluşturulan veri matriksinden üretilmiş filogenetik ağaca göre, araştırmada kullanılan

çim kaynaklarının tamamı yabancı döllek çok yıllık çim *L. perenne* taksonunun yer aldığı bir politomik kladda yer almaktadır (BS % 66; PP: 0.91). Bu politomik klad içerisinde ITS dizileri bakımından LP18 nolu genotipinin dışındaki tüm doğadan toplanan çim genotiplerinin farklı coğrafyalardan örneklenen *L. perenne* taksonuna ait örneklerle uyumlu olduğu görülmektedir. LP18 nolu çim genotipinin *L. perenne* ve *L. multiflorum* veya alternatif olarak *L. perenne* ve *L. rigidum* arasında melez orjinli bir takson olduğu düşünülmektedir. Bayeziyan analizlerine göre Orta Anadolu ve Akdeniz bölgesinden toplanan çim genotipleri kendi arasında 2 alt klada ayrılmaktadır (Inda ve ark., 2008) (Şekil 4.25). Çözümlü alt kladda yer alanların filogenetik pozisyonu nispeten güçlü bir sonsal olasılık göstermektedir (PP:0.79). Bu alt kladda yer alan genotiplerden LP4, LP9 ve LP14 daha yakın ilişkili görülmektedir. LP3, LP13 ve LP15 ise bu alt klad içerisinde yer alan ancak politomiler nedeniyle filogenetik çıkarımı yapılamayan diğer genotiplerdir. Bunlar dışında kalan çok yıllık olduğu düşünülen çim genotiplerinin filogenetik durumu, ağaçta görülen derin politomiler nedeniyle belirlenememiştir. Tek yıllık ve çok yıllık genotipler arasındaki doğal melezlemeler ardından geri çaprazlamalar (cins içi ve cinsler arası) filogenetik ağaçlarda çıkarımı daha fazla zorlaştıran yüksek politomilerden sorumlu bulunmuştur (Şekil 4.24). Politomileri kırmak amacıyla Network analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.25. ITS sekanslarına ait bayeziyan analizleri ile oluşturulmuş *Lolium* cinsi taksonları ve popülasyonlarına ait filogenetik akrabalığı gösteren soyağacı



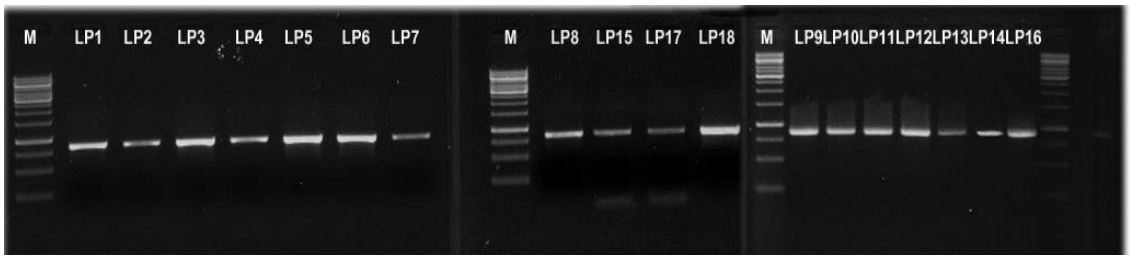
Şekil 4.26. ITS gen bölgesi hizalanmış dizilerinden üretilen *Lolium perenne* ve yakın ilişkili taksonlara ait filogenetik ağ

ITS gen bölgesine ait veri matriksinden oluşturulan network analizleri LP18 nolu çimin yabancı döllek çimlerden (*L.rigidum* x *L.perenne* veya *L. multiflorum* x *L. perenne*) orjinlenmiş bir taksona ait olabileceğini ortaya koymaktadır. Ağda, *L. multiflorum* ve *L. rigidum* taksonları ilişkili ribotiplere sahip taksonlar olarak görülmektedir (Şekil 4.26). Gen bankası NCBI'dan temin edilen *L. perenne* türüne ait farklı örnekler dâhil, çok yıllık çim olduğu düşünülerek toplanmış araştırma konusu genotiplerin büyük çoğunluğu ortak bir ribotipi paylaştığı bir kısmınında bu ribotipden türediği görülmektedir. Dolayısıyla *L. perenne* türüne ait farklı genotiplerin yaklaşık yarısı çekirdek DNA'sına ait ITS gen bölgesi bakımından yüksek seviyede benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu ortak ribotipden farklaşmış çok yıllık çimlerden LP13 ve LP15 filogenetik açıdan yakından ilişkili görülmektedir. Bu iki genotipe ait ortak ribotipden köken aldığı düşünülen diğer genotipler sırasıyla, LP3 ve LP4 görülmektedir. Bu populasyonların orjini olarak görülen LP13 nolu genotipin Antalya (Akdeniz Fitocoğrafik Bölgesi) yöresine ait olması anlamlı görülmektedir. Dahası genotiplerin

çoğu için ortak olan ribotipden türeyen LP11 ile LP3 genotipleri arasında filogenetik bir ilişki bulunmaktadır. LP4 ile LP9 yakın ilişkili türev ribotipler olarak değerlendirilebilir. NCBI'dan elde edilen H1 kodlu yabancı *L. perenne* türünün bu ribotipden türeyen bağımsız bir ağ pozisyonunda yer alması, filocoğrafik dağılıma uygun bir farklılaşma olarak değerlendirilebilir. Literatürden gelen bilgilere göre Akdeniz fitocoğrafik bölgesi *Lolium* cinsi yabancı döllek türlerinin atasal formlarını içermektedir (Naylor ve Rees, 1958; Inda ve ark., 2008).

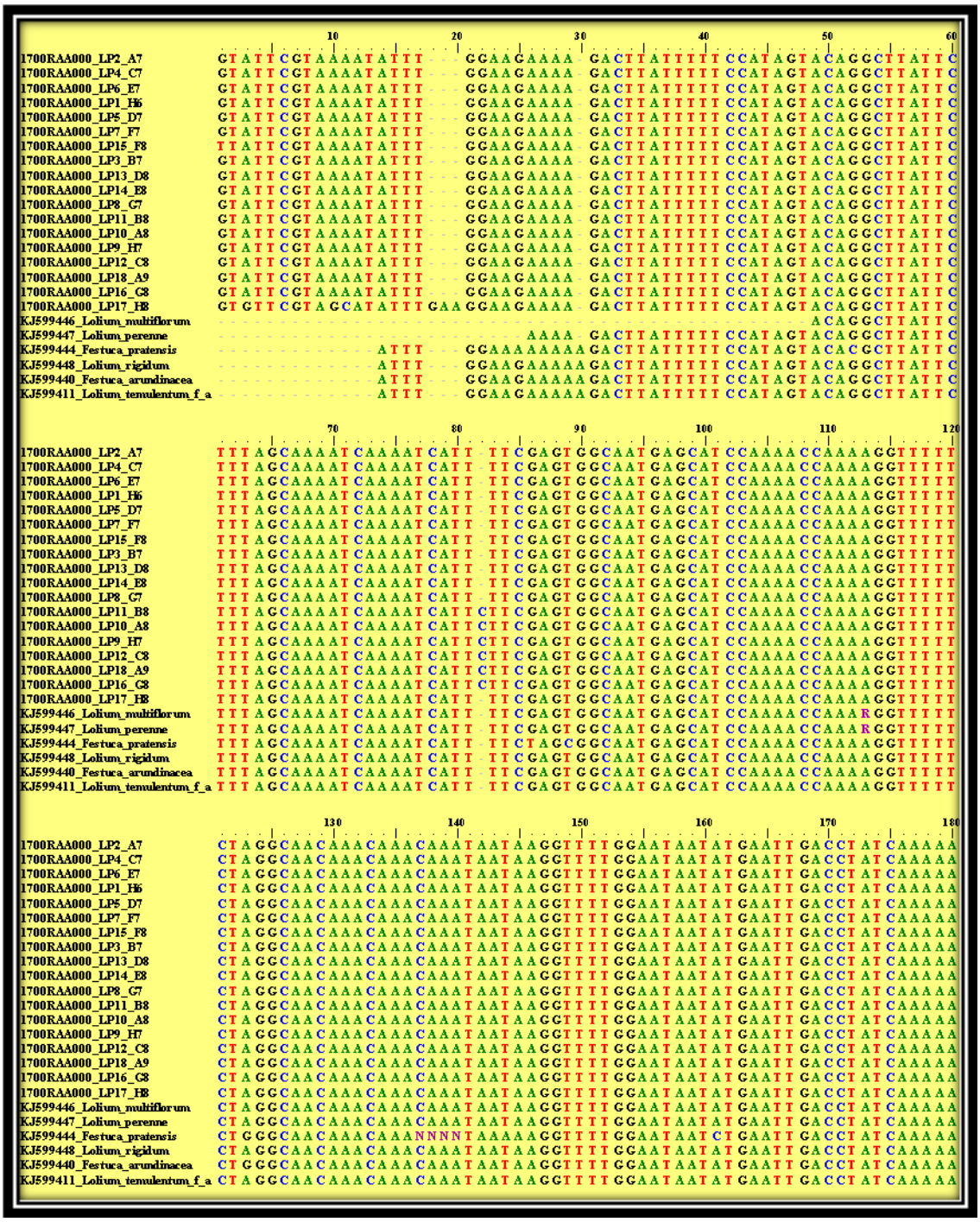
4.2.3. *rpl32* analizi

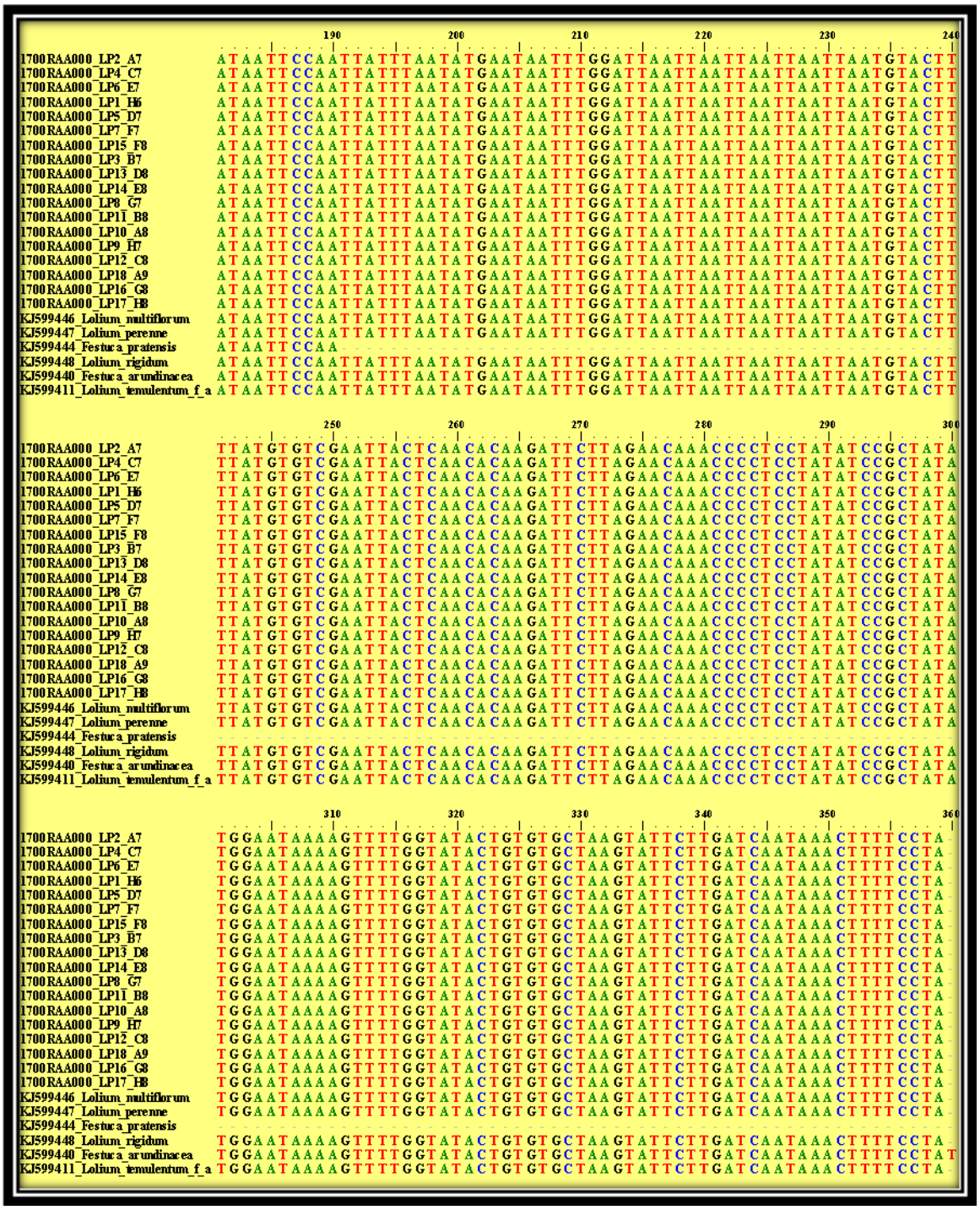
Amplifiye edilen *rpl32* gen bölgesinin büyüklüğü 900-1000 bp arasında bulunmuştur (Şekil 4.27). Bantlar oldukça belirgin düzgün ve dimer oluşumu görülmemesi nedeniyle saflaştırıldıkdan sonra dizilenmiştir. Elde edilen ham diziler Bioedit programında hizalanarak (Şekil 4.28), veri matriksine dönüştürülmüştür.

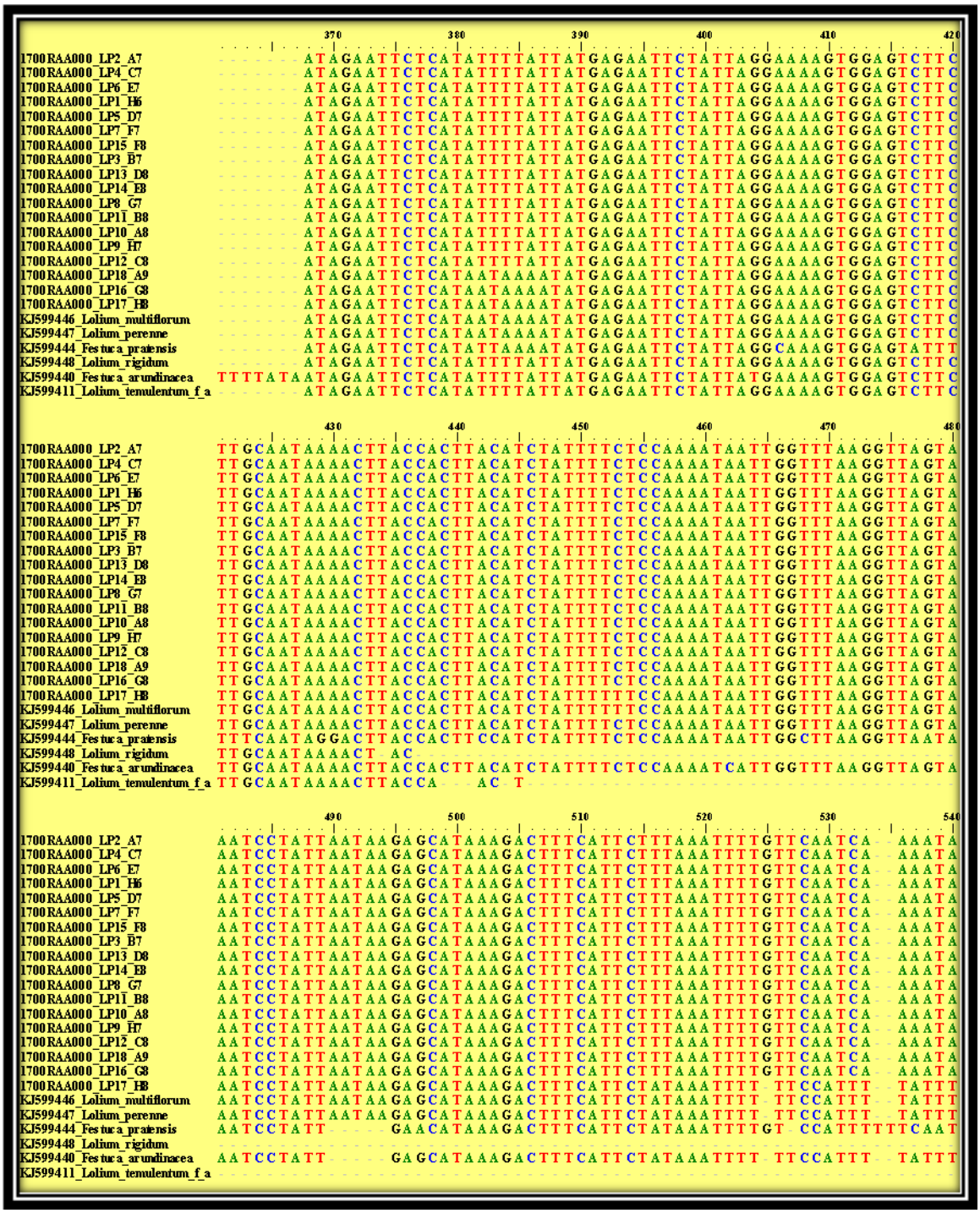


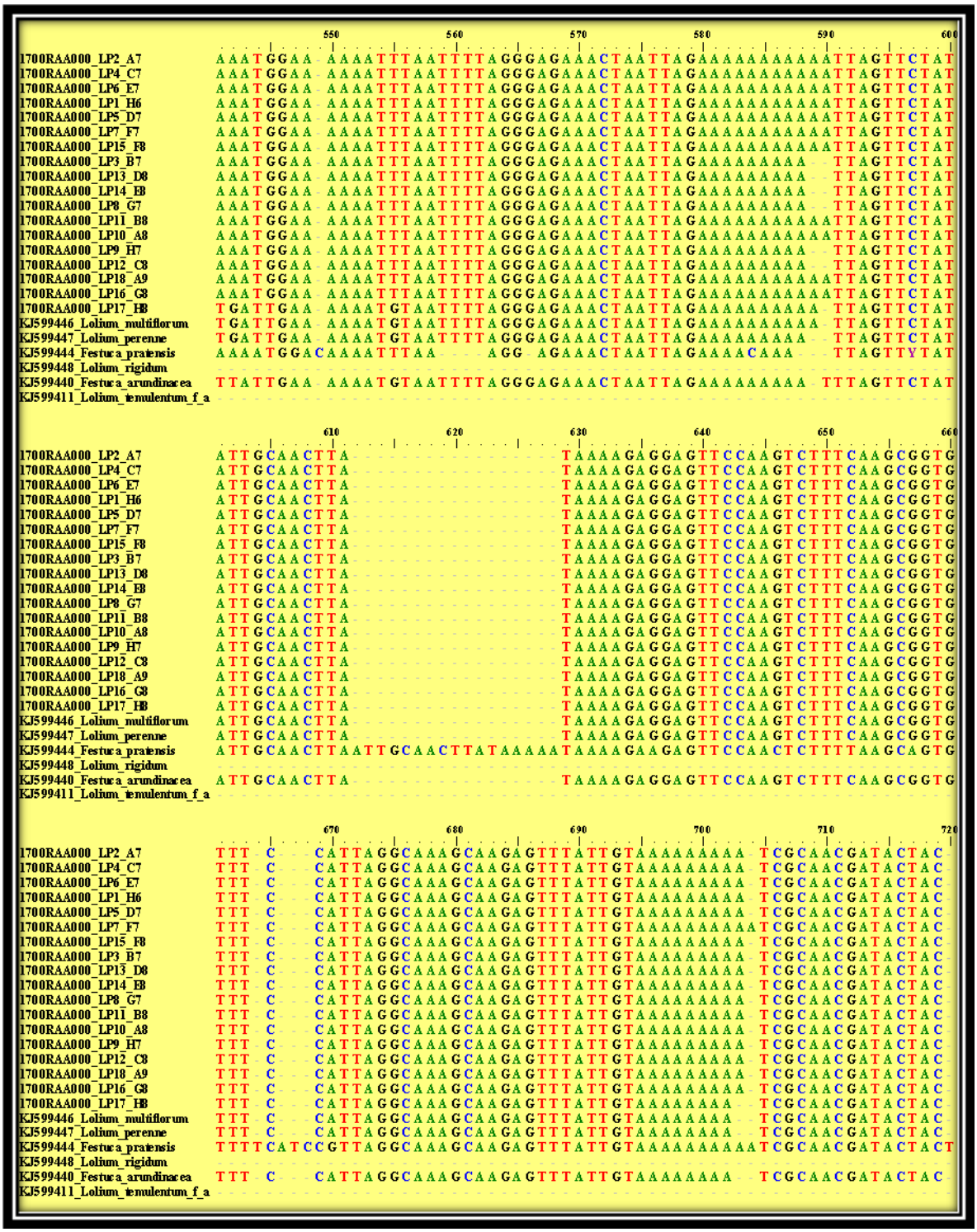
Şekil 4.27. Çok yıllık çim genotiplerine ait çoğaltılan *rpl32* gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü

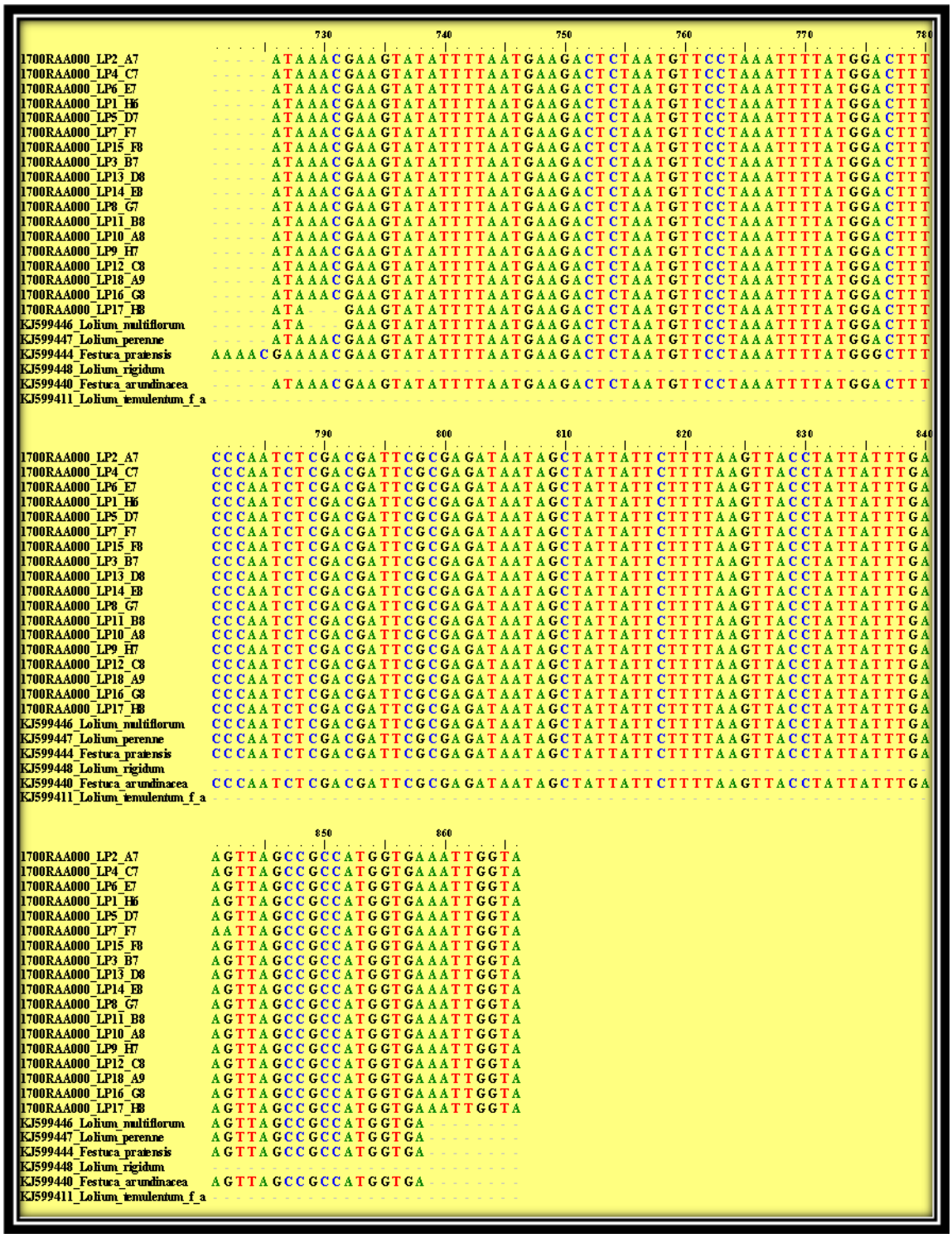
Kloroplast DNA'sına ait bir intron olan *rpl32* gen bölgesinden elde ettiğimiz verilere göre 24 taksona ait hizalanan veri matriksinin toplam uzunluğu 866, bu veri matriksine ait 812 karakter sürekli olup, 37 karakter ise değişkendir (Şekil 4.28). Parsimoni için bilgi verici karakter sayısı ise 17'dir. Parsimoni analizlerinden gelen tutumluluk indeksi (CI) 0.873, Tutarlılık indeksi 0.867, Homoplasi indeksi ise 0.127 olarak belirlenmiştir.


1700RAA000_LP2_A7
1700RAA000_LP4_C7
1700RAA000_LP6_E7
1700RAA000_LP1_H6
1700RAA000_LP5_D7
1700RAA000_LP7_F7
1700RAA000_LP15_F8
1700RAA000_LP3_B7
1700RAA000_LP13_D8
1700RAA000_LP14_E8
1700RAA000_LP8_G7
1700RAA000_LP11_B8
1700RAA000_LP10_A8
1700RAA000_LP9_H7
1700RAA000_LP12_C8
1700RAA000_LP18_A9
1700RAA000_LP16_G8
1700RAA000_LP17_H8
KJ599446_Lolium_multiflorum
KJ599447_Lolium_perenne
KJ599444_Festuca_pratensis
KJ599448_Lolium_rigidum
KJ599440_Festuca_arundinacea
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a

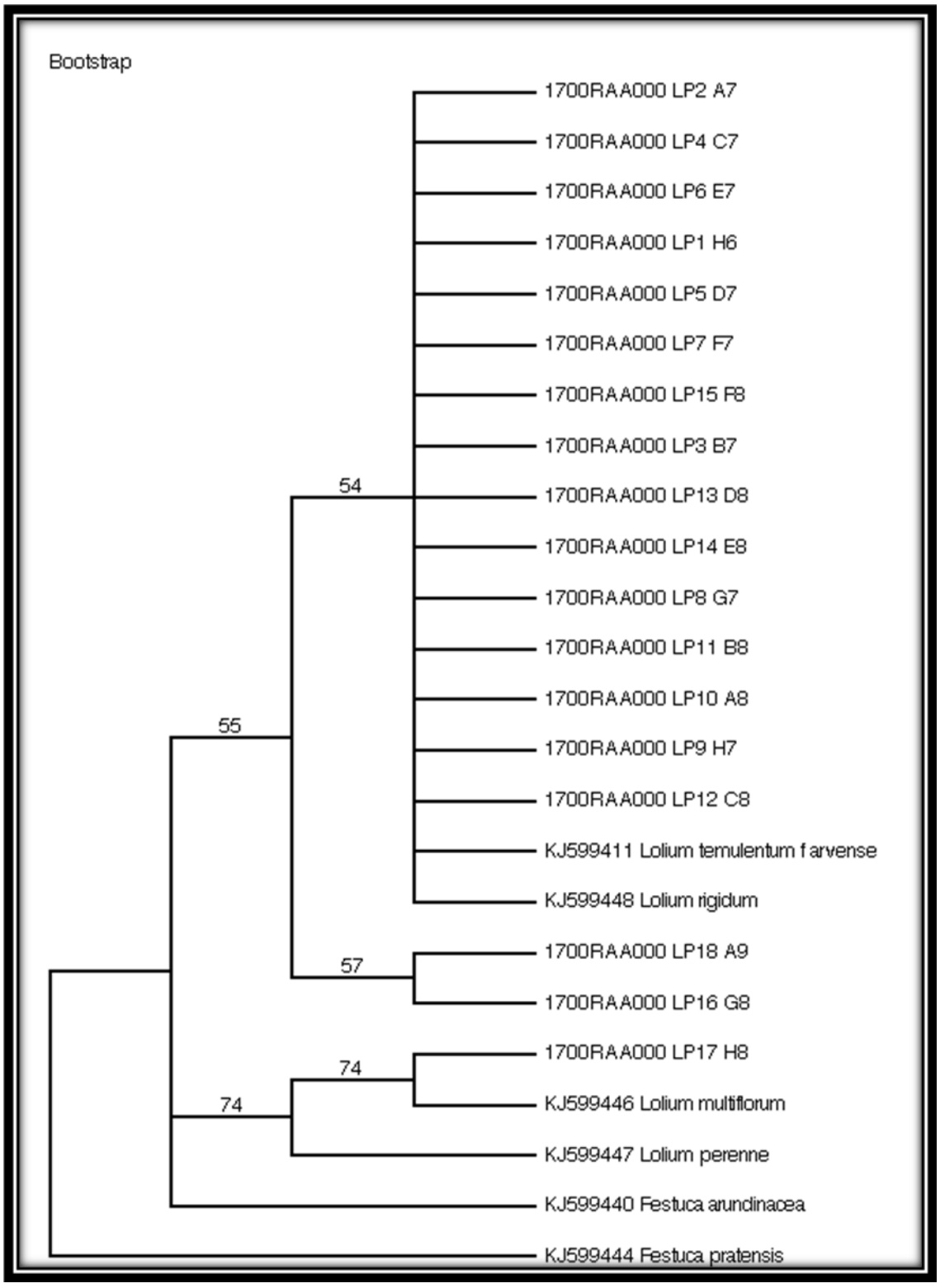

190 200 210 220 230 240
1700RAA000_LP2_A7 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP4_C7 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP6_E7 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP1_H6 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP5_D7 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP7_F7 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP15_F8 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP3_B7 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP13_D8 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP14_E8 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP8_G7 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP11_B8 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP10_A8 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP9_H7 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP12_C8 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP18_A9 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP16_G8 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
1700RAA000_LP17_H8 ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
KJ599446_Lolium_multiflorum ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
KJ599447_Lolium_perenne ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
KJ599444_Festuca_pratensis ATAATTCCAA
KJ599448_Lolium_rigidum ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
KJ599440_Festuca_arundinacea ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a ATAATTCCAATTATTTAATATGAATAATTTGGATTAATTAATTAATTAATTAATGTACTT
250 260 270 280 290 300
1700RAA000_LP2_A7 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP4_C7 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP6_E7 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP1_H6 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP5_D7 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP7_F7 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP15_F8 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP3_B7 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP13_D8 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP14_E8 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP8_G7 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP11_B8 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP10_A8 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP9_H7 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP12_C8 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP18_A9 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP16_G8 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
1700RAA000_LP17_H8 TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
KJ599446_Lolium_multiflorum TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
KJ599447_Lolium_perenne TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
KJ599444_Festuca_pratensis
KJ599448_Lolium_rigidum TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
KJ599440_Festuca_arundinacea TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a TTATGTGTCGAATTACTCAACACAAGATTCTTAGAACAAACCCCTCCTATATCCGCTATA
310 320 330 340 350 360
1700RAA000_LP2_A7 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP4_C7 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP6_E7 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP1_H6 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP5_D7 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP7_F7 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP15_F8 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP3_B7 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP13_D8 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP14_E8 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP8_G7 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP11_B8 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP10_A8 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP9_H7 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP12_C8 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP18_A9 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP16_G8 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
1700RAA000_LP17_H8 TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
KJ599446_Lolium_multiflorum TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
KJ599447_Lolium_perenne TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
KJ599444_Festuca_pratensis
KJ599448_Lolium_rigidum TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA
KJ599440_Festuca_arundinacea TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTAT
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a TGGAATAAAAGTTTTGGTATACTGTGTGCTAAGTATTCTTGATCAATAAACTTTTCCTA


370 380 390 400 410 420
1700RAA000_LP2_A7 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP4_C7 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP6_E7 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP1_H6 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP5_D7 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP7_F7 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP15_F8 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP3_B7 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP13_D8 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP14_E8 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP8_G7 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP11_B8 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP10_A8 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP9_H7 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP12_C8 ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP18_A9 ATAGAATTCTCATAATAAAATATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP16_G8 ATAGAATTCTCATAATAAAATATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
1700RAA000_LP17_H8 ATAGAATTCTCATAATAAAATATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
KJ599446_Lolium_multiflorum ATAGAATTCTCATAATAAAATATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
KJ599447_Lolium_perenne ATAGAATTCTCATAATAAAATATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
KJ599444_Festuca_pratensis ATAGAATTCTCATATTAAAATATGAGAATTCTATTAGGCAAAGTGGAGTATTT
KJ599448_Lolium_rigidum ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
KJ599440_Festuca_arundinacea TTTTATAATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTATGAAAAGTGGAGTCTTC
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a ATAGAATTCTCATATTTTATTATGAGAATTCTATTAGGAAAAGTGGAGTCTTC
430 440 450 460 470 480
1700RAA000_LP2_A7 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP4_C7 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP6_E7 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP1_H6 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP5_D7 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP7_F7 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP15_F8 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP3_B7 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP13_D8 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP14_E8 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP8_G7 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP11_B8 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP10_A8 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP9_H7 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP12_C8 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP18_A9 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP16_G8 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
1700RAA000_LP17_H8 TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTTTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
KJ599446_Lolium_multiflorum TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTTTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
KJ599447_Lolium_perenne TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGTTTAAGGTTAGTA
KJ599444_Festuca_pratensis TTTCAATAGGACTTACCACTTCCATCTATTTTCTCCAAAATAATTGGCTTAAGGTTAATA
KJ599448_Lolium_rigidum TTGCAATAAAACT-AC
KJ599440_Festuca_arundinacea TTGCAATAAAACTTACCACTTACATCTATTTTCTCCAAAATCATTGGTTTAAGGTTAGTA
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a TTGCAATAAAACTTACCA--AC-T
490 500 510 520 530 540
1700RAA000_LP2_A7 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP4_C7 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP6_E7 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP1_H6 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP5_D7 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP7_F7 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP15_F8 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP3_B7 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP13_D8 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP14_E8 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP8_G7 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP11_B8 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP10_A8 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP9_H7 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP12_C8 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP18_A9 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP16_G8 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTTTAAATTTTGTTCAATCA-AAATA
1700RAA000_LP17_H8 AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTATAAATTTT-TTCCATTT--TATTT
KJ599446_Lolium_multiflorum AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTATAAATTTT-TTCCATTT--TATTT
KJ599447_Lolium_perenne AATCCTATTAATAAGAGCATAAAGACTTTCATTCTATAAATTTT-TTCCATTT--TATTT
KJ599444_Festuca_pratensis AATCCTATT-----GAACATAAAGACTTTCATTCTATAAATTTTGT-CCATTTTTTCAAT
KJ599448_Lolium_rigidum
KJ599440_Festuca_arundinacea AATCCTATT-----GAGCATAAAGACTTTCATTCTATAAATTTT-TTCCATTT--TATTT
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a


550 560 570 580 590 600
1700RAA000_LP2_A7 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP4_C7 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP6_E7 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP1_H6 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP5_D7 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP7_F7 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP15_F8 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP3_B7 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAA--TTAGTTCTAT
1700RAA000_LP13_D8 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAA--TTAGTTCTAT
1700RAA000_LP14_E8 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAA--TTAGTTCTAT
1700RAA000_LP8_G7 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAA--TTAGTTCTAT
1700RAA000_LP11_B8 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP10_A8 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP9_H7 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAA--TTAGTTCTAT
1700RAA000_LP12_C8 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAA--TTAGTTCTAT
1700RAA000_LP18_A9 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP16_G8 AAATGGAA-AAAATTTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAAATTAGTTCTAT
1700RAA000_LP17_H8 TGATTGAA-AAAATGTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAA--TTAGTTCTAT
KJ599446_Lolium_multiflorum TGATTGAA-AAAATGTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAAA--TTAGTTCTAT
KJ599447_Lolium_perenne TGATTGAA-AAAATGTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAA--TTAGTTCTAT
KJ599444_Festuca_pratensis AAAATGGACAAAATTTAA---AGG-AGAAACTAATTAGAAAACAAA--TTAGTTYTAT
KJ599448_Lolium_rigidum
KJ599440_Festuca_arundinacea TTATTGAA-AAAATGTAATTTTAGGGAGAAACTAATTAGAAAAAAAAA--TTTAGTTCTAT
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a
610 620 630 640 650 660
1700RAA000_LP2_A7 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP4_C7 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP6_E7 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP1_H6 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP5_D7 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP7_F7 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP15_F8 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP3_B7 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP13_D8 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP14_E8 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP8_G7 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP11_B8 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP10_A8 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP9_H7 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP12_C8 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP18_A9 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP16_G8 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
1700RAA000_LP17_H8 ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
KJ599446_Lolium_multiflorum ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
KJ599447_Lolium_perenne ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
KJ599444_Festuca_pratensis ATTGCAACTTAATTGCAACTTATAAAAATAAAAGAAGAGTTCCAACTCTTTTAAGCAGTG
KJ599448_Lolium_rigidum
KJ599440_Festuca_arundinacea ATTGCAACTTA---------------TAAAAGAGGAGTTCCAAGTCTTTCAAGCGGTG
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a
670 680 690 700 710 720
1700RAA000_LP2_A7 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP4_C7 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP6_E7 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP1_H6 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP5_D7 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP7_F7 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAAATCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP15_F8 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP3_B7 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP13_D8 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP14_E8 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP8_G7 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP11_B8 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP10_A8 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP9_H7 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP12_C8 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP18_A9 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP16_G8 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
1700RAA000_LP17_H8 TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA--TCGCAACGATACTAC
KJ599446_Lolium_multiflorum TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA--TCGCAACGATACTAC
KJ599447_Lolium_perenne TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA--TCGCAACGATACTAC
KJ599444_Festuca_pratensis TTTTCATCCGTTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAAATCGCAACGATACTACT
KJ599448_Lolium_rigidum
KJ599440_Festuca_arundinacea TTT-C--CATTAGGCAAAGCAAGAGTTTATTGTAAAAAAAAA-TCGCAACGATACTAC
KJ599411_Lolium_temulentum_f_a



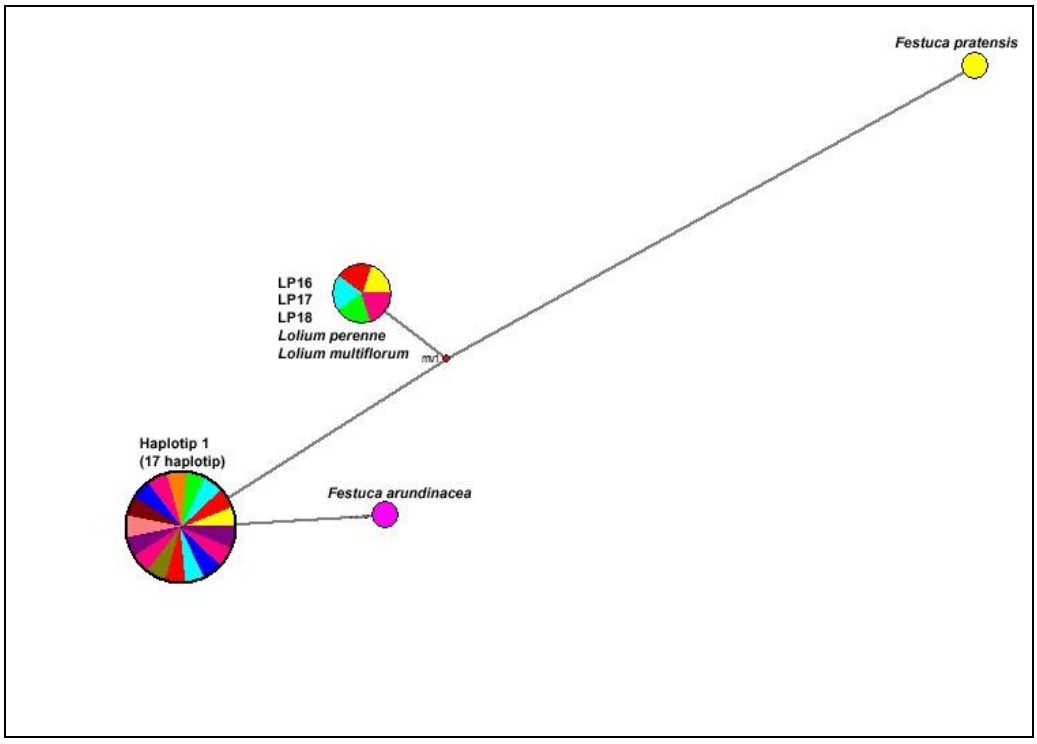
Şekil 4.28. *Lolium perenne* popülasyonlarının Bioedit ile hizalanmış *rpl32* dizileri



Şekil 4.29. *rpl32* sekanslarına ait Parsimoni analizleri ile oluşturulmuş *Lolium perenne* ait filogenetik akrabalığı gösteren soyağaç

Plastit DNA'sına ait *rpl32* gen bölgesi dizileri hizalanmış veri matriksine dayalı oluşturulan filogenetik ağacın çözüm gücü ITS dizilerine göre zayıf olup (Quintanar ve ark., 2007), ele alınan doğal çim kaynaklarının filogenetik ilişilerini net bir biçimde

ortaya koymada yeterli görülmemiştir (Malyshev, 1997). Derin politomilerin görüldüğü soyağacında maternal kalıtım açısından LP16, LP17 ve LP18 nolu genotiplerin geri kalan diğer doğal çimlerden ayrıldığı görülmektedir. LP17 nolu genotipin anneden gelen kalıtım açısından *L. multiflorum* ile benzerlik göstermesi, bu popülasyonun *L. temulentum (*alternatif olarak *L. rigidum)* ile *L. multiflorum* melezi olabileceği düşüncesini doğurmaktadır. Ayrıca maternal kalıtım açısından *L. temulentum* var. *arvense* ve *L. rigidum* taksonu ile geri kalan doğal çim kaynaklarımızın aynı kladı paylaşması, bu taksonların çok yıllık doğal çim genotiplerimizin genomuna atasal olarak katkıda bulunduğu izlenimini ortaya koymaktadır (Ma ve ark., 2013). Net olarak maternal ve organel kalıtımı açısından bu kladda yer alan genotiplerin tamamının tek yıllık *L. temulentum* ve *L. rigidum* taksonları ile ilişkili olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 4.29).



Şekil 4.30. *rpl32* genlerinin sekanslarının Network analizleri ile oluşturulmuş *Lolium* cinsi takson ve popülasyonlarına ait filogenetik ağ

Plastit DNA'nın *rpl32* gen bölgesine ait dizilerin hizalanmış veri matriksine dayalı oluşturulan network analizlerine göre LP16, LP17 ve LP18 nolu çok yıllık genotipler, birbirleriyle yakın ilişkili taksonlar olan *L. perenne* ve *L. multiflorum* ile aynı hablotipi paylaşmaktadır. Geri kalan doğal çim genotiplerimiz ve NCBI'dan elde edilen taksonlara ait organel DNA'sının *rpl32* gen bölgesi tek bir haplotipden

oluşmaktadır. Buna göre bu asesiyonların tamamı *rpl32* kloroplast geni açısından aynı veya yakın ilişkili tek yıllık çim taksonlarıyla yakından ilişkili görülmektedir (Şekil 4.30).

Sonuç olarak kloroplast DNA'sına ait gen bölgesi *rpl32*'ye göre, toplanan çim koleksiyonlarımızın tamamına yakınının maternal kalıtım açısından tek yıllık *L. temulentum* var. *arvense* ve *L. rigidum* taksonları ile ilişkili veya etkileşim içerisinde olduğu ortaya çıkmaktadır. LP16, LP17 ve LP18 numaralı genotiplerin ise çok yıllık ve tek yıllık çimler arasında meydana gelen dölakışı sonucu ortaya çıkan melez orjinli populasyonlara ait olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğada yayılış gösteren çok yıllık *Lolium* cinsi çim bitkilerinin, vejetatif ve generatif karakterler bakımından morfolojik esaslara göre ayrılması, taksonomik açıdan kolay görülmemektedir. Literatüre göre, çoğu zaman çok yıllık *L. perenne* türü ile iki yıllık, hatta bazı çevresel faktörler altında kısa ömürlü çok yıllık çim olarak değerlendirilen *L. multiflorum* türünü, tohum ve çiçek yapıları bakımından ayırmak biyolojik tür kavramına göre mümkün olmamaktadır (Cosgrove ve ark., 1999). Bu iki taksona ait farklı populasyonlar üzerinde yapılan PCA (Ana Unsur Analizleri)'ya dayalı çeşitli araştırmalarda ele alınan karakterlerin her iki türün farklı populasyonları arasında örtüştüğü rapor edilmiştir (Bulińska-Radomska ve Lester, 1985). Ayrıca doğal ortamlarının dışında gerçekleştirilen melezleme çalışmalarında başarılı sonuçların alınması nedeniyle, bu iki taksonun tek bir tür altında alt türler olarak değerlendirilmesine yönelik farklı araştırmacılar tarafından yapılan tavsiyeler bulunmaktadır (Arcioni ve Mariotti, 1983). Morfolojik çalışmaların dışında *Lolium* cinsi taksonları üzerinde gerçekleştirilen DNA veya protein temelli moleküler çalışmalarda da benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Mummenhoff ve ark., 1997; Liu ve ark., 2002; Graham ve Olmstead, 2000). *L. perenne* ile *L. multiflorum* türleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda iki takson arasında yüksek genetik benzerliğin olduğu belirlenmiştir. İlgili çalışmalar sadece çekirdek DNA'sı ile sınırlı olmayıp, kloroplast ve mitokondrial DNA ile ilgili gen bölgeleri için de rapor edilmiştir (Bulińska-Radomska ve Lester, 1985; Loos, 1993; Baldwin, 1999; Bennett ve ark., 2002). Daha önce yapılan DNA ve protein analizlerine dayalı filogenetik çalışmalarda çimlerin atası ile ilgili raporlarda ortak görüş çok yıllık *L. perenne* veya tek yıllık *L. rigidum* taksonlarının olabileceği yönünde olmakla birlikte, genel eğilim diğer çok yıllık çimlerden gen akışı ile (cinsler arası doğal melezleme) tek yıllık çimlerden çok yıllık formların veya taksonların ortaya çıkışı noktasındadır. Buna ek olarak, protein temelli çalışmalarda *Lolium*'un atasal formlarının çok yıllık diğer akraba çimler ile ilişkili olabileceği önerilmektedir (Bulińska-Radomska ve Lester, 1988). Başka bir bakış açısına göre, bazı çim uzmanları ortak atanın *L. rigidum* türü ile ilişkili olduğunu savunmaktadır (Malik, 1967; Charmet ve Balfourier, 1994). Bu bilgilerin dışında, evrimsel bir trend olarak ise, ITS ve *trnL-F*'nin kombine analizlerinden (Cerbah ve ark., 1998; Eddie ve ark.,2003) gelen bilgiler doğrultusunda, yaşam formunda çok yıllık uzun boylu yumaktan tek

yıllıkların cinsi *Lolium*'a doğru bir doğal gen akışının (Doğal melezleme veya geri çaprazlamalarla) ve dönüşümün olduğu iddia edilmektedir (Catalan ve ark., 2004).

Bu tez çalışmasıyla morfolojik gözlemelere dayalı olarak Orta Anadolu ve Akdeniz geçiş kuşağında doğal olarak yayılış gösteren çok yıllık *L. perenne* olduğu düşünülerek toplanan populasyonların sitogenetik ve moleküler verilere dayalı karakterizasyonu yapılmış ve elde edilen veriler çok yıllık çimlerin karyomorfolojileri, filogenetik ilişkileri ve türleşmeleri hakkında önemli sonuçlar vermiştir. Karyomorfolojik analizlerle, *L. perenne* veya çok yıllık olduğu düşünülen çim populasyonlarının tamamının aynı kromozom sayısına sahip olduğu belirlenmiştir (2n=14). Sayımlar daha önceki çalışmalardan gelen bilgilerle örtüşmekle birlikte (Abbas, 2014; Essad, 1962; Sağsöz, 1982; Sharifen ve ark., 2009; Shinozuka ve ark., 2011; Jones ve ark., 2002; Sim ve ark., 2005), bu çalışmada kullanılan hiçbir genotipte poliploidiye rastlanmamıştır. Bununla birlikte analizi yapılan genotipler kromozom formülü ve karyomorfolojileri bakımından oldukça çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitliliğin toplanan örneklerin morfolojik özellikleri açısından gözlenen varyasyon ile ilişkili olduğu düşünüldüğünde türleşmenin ana sebeplerinden biri olarak değerlendirilebilir. Çimlerin türleşmesinde poliplodi önemli bir mekanizma olarak önerilmektedir (Zielinski, 1987; Ramana ve Jacobsen, 2003). Ancak araştırma konusu doğal çok yıllık çim genotiplerin hiçbirinde poliploidinin belirlenememesi nedeniyle bu mekanizma üzerinde fazla durulmamıştır. Çimlerin türleşmesinde ikinci bir mekanizma kromozomal yeniden düzenlemelerdir ve bu mekanizmanın kaynağı olarak mayozdaki düzensiz kromozom eşleşmelerine sebep olan inversiyonlar, translokasyonlar ve mikrodelesyonlar gösterilmektedir. Bu kromozomal değişimler yeni kromozomal kombinasyonların ve dolayısıyla yeni türlerin oluşumunun kaynağı olmaktadır (Naylor, 1960). *Triticaceae* ve çimler arasında çeşitli büyük ölçekli kromozomal yeniden düzenlemelerin varlığı bilinmektedir (Sim ve ark., 2005). Benzer biçimde, karyomorfolojisi ortaya konan çok yıllık çimlerin farklı karyotip formüller içermesi (7m, 6m+1sm, 5m+2sm, 3m+4 sm, 4sm+3m) ve bu formüllerin bir kısmının (7m, 6m+1sm, 5m+2sm) aynı zamanda tek yıllık ve iki yıllık çim populasyonlarını kapsaması, kromozomal yeniden düzenlemelerin çimlerin türleşmesi ve farklılaşması açısından önemli bilgiler olduğunu göstermektedir. Literatürden gelen bilgilere göre *L. temulentum*, *L. rigidum* gibi tek yıllık çimler, analizlerimizde belirlenen karyotip formüllerinin çoğunu kapsamaktadır (Abbas, 2014). Bu komposizyon, araştırma konusu çok yıllık çimlerin kromozom sayı ve yapıları bakımından tek yıllık çimlerle benzerlik

gösterdiğini ve aralarında kromozomal uyum olduğunu göstermektedir. Yabancı döllek tek yıllık bir tür olan *L. rigidum* karyotip formülü açısından oldukça çeşitliliğe sahip bir tür olmakla birlikte, kromozom morfolojisi açısından en farklılaşmış tür olarak gösterilmekte, dolayısıyla *Lolium* cinsi çimlerinin ortak atasal formu olduğu bildirilmektedir (Malik, 1967). Böylece karyomorfolojik analiz sonuçlarımıza göre doğadan toplanan doğal çok yıllık çim kaynaklarının kromozomal orjin açısından birden fazla taksonla ilişkili olabileceği ortaya çıkmaktadır. Aynı taksona ait populasyonların ortak karyotip formülüne sahip olduğu, özellikle asimetri indeksi ve sentromer indeksi varyasyonu açısından benzerlik gösterenlerin, aynı tür veya taksonun farklı populasyonları olarak değerlendirilmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmaktadır. Literatürden anlaşıldığı kadarıyla başağı kılçıksız çim türlerinden çok yıllık *L. perenne* çoğrafik izolasyon ve mikroklimatik şartlar altında kolayca farklılaşabilen veya tek yıllık çim populasyonları ile melezleşerek yeni çok yıllık çimlerin oluşumuna katkıda bulunan atasal bir türdür (Polok, 2005; Cresswell ve ark., 2001). Ayrıca diğer yabancı döllek yakın ilişkili tek yıllık bir tür olan *L. multiflorum*'un iki yıllık hatta çok yıllık populasyonlarının olması, kimi taksonomistlere göre bu iki türün tek türde birleştirilmesi gerektiği önerisi göz önüne alındığı takdirde çalışmamızda toplanan asesiyonların doğrudan bir taksona adfedilmesi doğru görülmemektedir. Literatüre göre karyotip formülü 5m+2sm olan 3 çim türü *L. perenne*, *L. rigidum* ve *L. temulentum* rapor edilmektedir. Karyotip formülleri 6 m+1 sm olarak *L. rigidum, L. multiflorum, L. loliaceum* taksonlarına ait raporlar vardır (Abbas, 2014). Benzer biçimde tüm kromozomları metasentrik karyotipli (7m) *L. persicum, L. rigidum, L. multiflorum, L. loliaceum* taksonlarına ait bilgiler mevcuttur. Bunlardan tek yıllık *L. rigidum* ve *L. loliaceum* taksonları arasında morfolojik açıdan bir farklılık olmadığı gibi karyolojik açıdan yakın ilişkili olmaları nedeniyle aynı türün taksonları olarak değerlendirilmiş ve kromozomlarının asimetrik olduğu rapor edilmiştir (Abbas, 2014). Ayrıca karyomorfolojileri açısından simetrik kromozomlara sahip olan taksonların daha atasal, asimetrik olanların ise daha genç türemiş taksonlar olduğu kabul edilmektedir. Dağılım grafiğinden gelen bilgilere göre 1. ve 2. grupta yer alan populasyonların karyotip formülü ve kromozom asimetrisi göz önüne alındığında *L. rigidum, L. multiflorum* ve *L. perenne* taksonlarıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Ma ve ark., 2013). Genel olarak çalışma konusu genotiplerin ilkel tip karyotipe sahip olanları *L. rigidum* ile, atasal simetrik kromozom tipine sahip olanları *L. perenne* veya çok yıllık kısa ömürlü *L. multiflorum* ile (bu taksonların temel kromozom sayısı x=7 olan *F. pratensis* gibi bir

taksonla doğal melezleme ile tek yıllık çimlerden oluştuğunu düşünerek), genç (türemiş) daha asimetrik kromozom tipine sahip olanları tek yıllık ve çok yıllık çimler arası oluşan çok yıllık görünümlü melez çimler *(Lolium* x *hybridum, L. perenne* x *rigidum)* ile ilişkilendirebiliriz (Çizelge 4.3). Bunun dışında kalan özgün karyotipli populasyonları (3m+4sm, 4sm+3m) ülkemizin çok sayıda farklı habitat ve mikroklimaya sahip olduğunu göz önüne aldığımızda, *L. perenne* veya melez orjinli çok yıllıkların zamanın bir diliminde coğrafik veya genetik bir izolasyonla farklılaşarak oluşturduğu yeni taksonlar olabileceği (Yeni Nesil karyotip), ancak böyle bir teoriyi kabul edebilmek için daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği kanaatindeyiz. Bununla birlikte bazı araştırmacılar, Akdeniz fitocoğrafik bölgesinin cinsin ortak atasının merkezi olduğunu ve ortak atanında *L. rigidum* ile ilişkili olduğunu savunmaktadır. Akdeniz Bölgesi, Isparta Şarkîkaraağaç, Antalya Akbelenli yöresinden toplanan çok yıllık çim genotiplerinden karyotip formülü tamamen metasentrik kromozomlardan oluşan (7 m; ilkel veya atasal tip) sırasıyla, B-117 ve G-504 nolu genotipler morfolojik açıdan her ne kadar *L. perenne* türünün karakteristiklerini içerse de, karyomorfolojik özellikleri ve karyotip formülüyle *L. rigidum* türüyle ilişkili görülmektedir. Aynı yöreden toplanan diğer çok yıllık görünümlü 3 çim populasyonu ise (G-500, G-501 ve G-506) oldukça farklı karyotip formülleri içermekle birlikte, karyomorfolojileri bakımından da oldukça farklılaşmış görülmektedir (diyagrama göre 3. ve 4. grup). *Lolium* cinsinin atasal formu ve türleşmesi açısından bu bölge ve populasyonlarını bir model olarak düşünürsek, kromozomal açıdan çok yıllık çimlerin ortak atasının *L. rigidum* ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Moleküler ve taksonomik çalışmalara göre çalışma konusu *Lolium* cinsi, *Loliinae* alt oymağının üyelerinin yer aldığı monofiletik bir kladda yer almaktadır (Appels ve Dvorak, 1982; Appels ve Honeycutt, 1986; Riven ve ark., 1986; Rodgers ve Bendich, 1987; Jorgensen ve Cluster, 1988; Baldwin, 1992; Bobola ve ark., 1992; Govindaraju ve Culli, 1992; Hamby ve Zimmer, 1992; Baldwin ve ark.,1995; Charmet ve ark., 1997; Cerbah ve ark., 1998; Grebenstein ve ark., 1998; Baldwin ve Markos, 1999; Eddie ve ark.,2003). ITS ve *rpl32* gen bölgeleri analizlerine dayalı yapılan filogenetik analizler cinsin filogenetik çıkarımından ziyade tek yıllık ve çok yıllık populasyonlar arası ilişkilerin ortaya konması ve *Lolium* cinsinin atasal formu hususunda önemli bilgiler vermiştir. Özellikle kloroplast DNA'sı *Lolium* cinsinin maternal kalıtımında tek yıllık çimlerin önemli bir rolü olduğuna işaret etmesi nedeniyle, daha etkin bir çözüm üretmiştir (McGrath ve ark., 2006; Diekman ve ark.,

2012). *Rpl32* analizlerinden oluşturulan filogenetik ağaçta, çok yıllık doğal genotiplerin hemen hemen tamamı (LP17 hariç) çok yıllık çim kladında yer alırken, *L. multiflorum* ve *L. rigidum* ayrı bir kladda birlikte pozisyon almıştır. LP17 nolu genotip ise, bu iki kladın arasında melezvari bir biçimde yer almıştır. Çekirdek DNA'sından gelen bilgilere göre LP18 dışında ele alınan populasyonların tamamı çok yıllık ribotipe sahip görülmektedir. Kloroplast DNA analizlerine göre tek yıllık ve çok yıllık çimlerin iç içe geçtiği görülmektedir. Bu durum tek yıllık çim populasyonları ile çok yıllık *L. perenne* veya melez çim populasyonları arasında ciddi bir gen akışının varlığına işaret etmektedir. Bu bilgi Avrupa çim populasyonları ile ilgili verilerle uyumlu görülmektedir. Zira Avrupada doğal olarak yayılış gösteren *Lolium* cinsine ait çoğu çim populasyonunun sürekli varyasyona uğrayan melezler olduğuna dair raporlar vardır (Cresswell ve ark., 2001). Dolayısıyla, çok yıllık görünümlü melez orjinli populasyonların atasal soylarında farklı tek yıllık çim taksonlarının genetik açıdan katkısı olduğu düşünülmektedir. Doğal olarak yayılış gösteren çim populasyonlarındaki bu gen akışı ve melezlemeler, ayrıca gerçekleşen geri çaprazlar, geniş spektrumlu varyasyonlara neden olmakta (Ghariani ve ark., 2003) ve bu durum *Lolium* cinsi içerisinde biyolojik olarak tür tanımlamasını zorlaştırmakla kalmayıp, taksonlar arası ayırtedici bir karakter bulma konusunda sınırlamalar getirmektedir. Hayat formlarına göre yapılan tasnifte bu özelliği kontrol altında tutan birkaç genin olması ve bu genlerin ortam şartlarından kolayca etkilenerek aktivasyonunu değiştirebilmesi çok yıllık veya tek yıllık ayrımını zorlaştırmaktadır (Briggs, 1978). Böylece cinsin morfolojik karakterlere dayalı taksonomisinde ciddi problemler ortaya çıkmaktadır.

Doğal yayılışlı çimler (*Lolium sp.*) içerisinde çok yıllık özellik gösteren genotipler, çok yıllık çim olarak adlandırılırlar ve büyük ölçüde yabancı döllektirler. *Lolium* cinsine ait gerek tek yıllık, gerekse çok yıllık taksonlar arasında kromozomal uyumun yanı sıra eşeysel uyum çoğrafik izolasyonlar olmadığı sürece gen akışını kolaylaştırmaktadır. Böylece doğal melezlemeler sonucunda doğada sürekli melez orjinli populasyonlar oluştuğu düşünülmektedir (Kopecký ve ark., 2006). Benzer şekilde, Tamkoç ve Arslan (2011) yaptıkları çalışma sonunda, aynı lokasyonda yetişen bazı *Poa* türleri arasındaki genetik yakınlığın, farklı lokasyonlarda yetişenlere göre daha fazla olmasının sebebini doğal melezlemelere bağlamışlardır. Ayrıca çok yıllık *L. perenne* veya diğer melez orjinli populasyonlar arası doğal olarak meydana gelen melezlemelerin yanı sıra, yakın ilişkili bir çim cinsi olan *Festuca* taksonları ile gerçekleşen geri çaprazlamalar, aynı taksonun farklı populasyonları arasındaki

farklılaşmaların kaynağı olarak düşünülebilir. Daha önce çim üzerine gerçekleştirilen rRNA ve lözin tRNA gen bölgesine dayalı filogenetik çalışmalarda (Polok, 2007), *F. pratensis* türünün iki ayrı kladda yer alan *Lolium* taksonları arasında kalması yukarıdaki ilişkiyi desteklemektedir (Pašakinskienė ve ark., 1998). *rpl32* gen bölgesinden elde edilen filogenetik ağaçta *F. arundinacea* taksonunun *Lolium* kladında yer alması (Hand ve ark., 2010) bu durum ile uyumlu gözükmektedir (Tehrani ve ark.,2009; Cahoon ve ark., 2010) (Şekil 4.29). Böylece filogenetik olarak *Lolium* cinsinin en olası ortak atasının *Schedonorus* alt cinsiyle ilişkili belirgin bir diploid temsilcisi olan *F. pratensis* olduğu sonucuna varılabilir (Zwierzykowski ve ark., 2006; Harper ve ark.,2011). *Lolium* cinsi atasal açıdan bağımsız olarak evrimleşen iki farklı soya ayrılabilir (Polok, 2007). İlk kladda *L. persicum*, *L. remotum* ve *L. temulentum* (*Temulentum* Kladı) taksonlarının 2.7 milyon yıl önce oluştuğu düşünülmektedir. İkinci kladda (*Perenne* kladı) 2.35 milyon yıl önce *Schenodorus*'da kökenlenen *L. loliaceum*, *L. perenne subsp. perenne*, *L. perenne subsp. multiflorum* ve *L. rigidum* taksonları bulunmaktadır (Terrell, 1968; Stammers ve ark., 1995). Dolayısıyla kendine dölleklik her iki kladda bağımsız bir biçimde ortaya çıkmış gözükmektedir (Gaut ve ark., 2000; Torrecilla ve Catalán, 2002). Moleküler analizlerimizden elde ettiğimiz verilere göre genotiplerimizin evrimsel serüveni her iki klad ile de ilişkili görülmektedir. Maternal kalıtımdan gelen verilere göre (*rpl32*) oluşturulan filogenetik soyağacında bir yandan *L. temulentum* var. *arvense*, bir yandanda *L. rigidum* taksonlarının doğal çok yıllık genotiplerimiz ile aynı kladda yer alması bu durumu desteklemektedir. Dolayısıyla çok yıllık görünümlü doğal çim genotiplerinin ortaya çıkışında bağımsız bir biçimde bu iki tek yıllık taksonun katkısı olduğu düşünülmektedir. Karyolojik analizlerden gelen bilgilerimiz, özellikle tek yıllık karyotipe sahip genotiplerin varlığı bu durumu desteklemektedir.

Bu çalışmanın sonucuna göre, doğal vejetasyondan toplanan *Lolium* genotiplerinin çok yıllık özelliğe sahip olmalarını, doğrudan *Lolium perenne* türüne ait olmalarının yanında, tek yıllık atalarının çok yıllık *Lolium perenne* ya da *Festuca* cinsine ait taksonlarla doğal melezlenmelerinden almış olabilecekleri düşünülmektedir. Sonuçta, *Lolium* çimlerinin tek yıllık ortak ataları ile yabancı döllek çok yıllık *Festuca* taksonlarının etkileşimi ve doğal melezlemeleri ile ilkin çok yıllık atasal çimlerin oluşmuş olduğu ve daha sonra bu çok yıllık atasal *Lolium* taksonlarına ait populasyonların farklı evrimsel yolaklar ile farklı tek yıllık *Lolium* çimleri arasındaki etkileşimi sonucunda, yeni nesil çok yıllık görünümlü melez orjinli çok yıllık populasyonları oluşturduğu ihtimalini güçlendirmektedir.

KAYNAKLAR

Abbas, M.S., 2014, Karyological studies in the genus *Lolium* in Iran, *International Journal of Biosciences* (IJB), Vol. 4, No. 4, p. 176-183.

Açıkgöz, E., 1991, Yembitkileri, *Uludağ Üniversitesi Basımevi*, Bursa

Açıkgöz, E., 1994, Çim alanlar yapım ve bakım tekniği, *Çevre Ltd.Şti. yayınları*: 4, 1-24, Bursa.

Anonim, 2009, Doğal florada bulunan çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.) genotiplerinin toplanması ve ıslah amaçlı kullanılması, TÜBİTAK 106O159.

Anonim, 2013, Doğal flrodan toplanarak bazı özellikleri belirlenmiş çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.) genotiplerinin sentetik çeşit ıslah yöntemiyle geliştirilmesi, TÜBİTAK 110O312.

Anonim, 2014, Adrese dayalı nüfus kayıt sistemi 2013 nüfus sayımı sonuçları, *TUİK.*

Appels, R. and Dvorak, J., 1982, The wheat ribosomal DNA spacer region its structure and variation in populations among species, *Theoretical and Applied Genetics,* 63: 337-348.

Appels, R. and Honeycutt, R.L., 1986, rDNA: evolution over a bilion years, *In DNA Systematics*, Vol. II. Plants, ed. S. K. Dutta, pp. 81-135, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Arcioni, S. and Mariotti, D., 1983, Selfing and interspecific hybridization in *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* Lam. evaluated by phosphoglucoisomerase as izozyme marker, *Euphytica* 32:33- 40.

Avcıoğlu R., 1997, Çim tekniği, Yeşil alanların ekimi, dikimi ve bakımı, *Ege Üniversitesi Matbaası*, s. 271, Bornova-İzmir.

Avcıoğlu R., Açıkgöz E., Soya H. ve Tan A., 2000, Yem bitkileri üretimi, *Türkiye Ziraat Mühendisliği, V. Teknik Kongresi*, 17-21 Ocak, 2000.

Baldwin B.G., 1992, Phylogenetic utilitiy of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the *Compositae*, *Molecular Phylogeny evolution,*1, 3-16.

Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojcıechowoski, M.F., Campell, C.S. and Donoghue, M.J., 1995, The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 250-272.

Baldwin, B.G., 1999, New combinations and new genera in the North American tarweeds (*Compositae-Madiinae*), *NOVON*, 9(4), pp. 462-471.

Baldwin, B.G. and Markos, S., 1999, Phylogenetic utility of the externaal transcribed spacer (ETS) of 18S–26S rDNA, congruence of ETS and ITS trees of calycadenia (*Compositae*), *Mol. Phyl. Evol*., 10, 449-463.

Bennett, S.J., 1997, A phenetic analysis and lateral key of the genus *Lolium* (*Gramineae*), *Genet. Resour. Crop Ev* 44:63-72 (in Polok, 2007).

Bennett, S.J., Hayward, M.D. and Marshall, D.F., 2002, Electrophoretic variation as a measure of species differentiation between four species of the genus *Lolium*, *Genet. Resour. Crop Ev* 49:59-66.

Bobola, M.S., Smith, D.E. and Klein, A.S., 1992, Five major nuclear ribosomal repeats represent a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *P.mariana*, *Molecular Biology and Evolution* 9: 125-137.

Bolaric, S., Bart, S., Melchinger, A.E. and Posselt, U.K., 2005a. Genetic diversity in Eropean perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers, *Plant Beering* 124, 161-166

Bolaric, S., Bart, S., Melchinger, A.E. and Posselt, U.K., 2005b, Moleculer genetic diversity within and among German ecotypes in comparasion to Eropean perennial ryegrass cultıvars, *Plant Beering*, 124, 257-267.

Briggs, D.E., 1978, Barley, *New York: Chapman & Hall*, p.612.

Bulińska-Radomska, Z. and Lester, R.N., 1985, Relationships between five species of *Lolium (Poaceae), Plant Syst Evol* 148:169-175.

Bulińska-Radomska, Z. and Lester, R.N., 1988, Intergenic relationships of *Lolium*, *Festuca*, and *Vulpia* (*Poaceae*) and their phylogeny, *Plant Syst Evol* 159:217-227.

Bussan A.J. and Trainor, M., 2001, Persian darnel (*Lolium persicum*), *Montana State Weed Science (Internet), (cited 2006 Nov. 15)*, Available from: http://weeds.montana.edu/crop/persian-darnel.htm (in Polok, 2007).

Cahoon A.B., Sharpe R.M., Mysayphonh, C., Thompson, E.J.. Ward, A.D. and Lin, A., 2010, The complete chloroplast genome of tall fescue (*Lolium arundınaceum* ; *Poaceae*) and comparıson of whole plastomes from the family *Poaceae*, *American Journal of Botany* 97(1): 49–58.

Catalan P., Terrecilla P., Rodriquez, J.A.L. and Olmstead, R.G., 2004, Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe *Loliinae* and allies (*Poeae, Pooideae*) inferred from ITS and trnL-F sequences, *Mol Phylogenet Evol* 31:517-541.

Cerbah, M., Souza-Chies, T., Jubier, M.F., Lejeune, B. and Siljak-Yakovlev, S., 1998, Molecular phylogeny of the genus hypochaeris using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: Inference for chromosomal evolution, *Mol. Biol. Evol.*, 15/3, 15-345.

Charmet, G. and Balfourier, F.,1994, Isozyme variation and species relationships in the genus *Lolium L. (ryegrasses, Graminaceae*), *Theor Appl Genet* 87:641-649.

Charmet, G., Ravel, C. and Balfourier, F., 1997, Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA, *Theor. Appl. Genet.* 94: 1038-1046.

Clayton, W.D., Harman, K.T., Williamson, H. and Grass, B., 2006, The online world grass flora, 2006 onwards, (database on the Internet), *Royal Botanic Gardens, Kew*. Available from http://www.kew.org/data/grasses-db.html; (accessed 25 January 2007; 01:31) (in Polok, 2007).

Cosgrove, D., Casler, M. and Undersander, D., 1999, Ryegrass types for pasture and hay, *Agronomy Advice* FC (Internet), (cited 2006 Sept 10); 14.12.2. Available from:http://www.uwex.edu/ces/forage/pubs/ryegrass.htm.

Cresswell, A., Sackville-Hamilton, N.R., Roy, A.K. and Viegas, M.F., 2001, Use of AFLP makers to assess genetic diversity of *Lolium* species from Portugal, *Mol. Ecol.* 10: 229-241.

Cullings, K.W., 1992, Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies, *Molecular Ecology*, 1: 233–240.

Diekmann, K., Hodkinson, T.R. and Barth, S., 2012, New chloroplast microsatelite markers suitable for assessing genetic diversity of *Lolium perenne* and other related grass species, *Annals of Botany* page 1 of 13, doi:10.1093/aob/mcs044. available online at www.aob.oxfordjournals.org.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, phytochemistry bulletin *Botanical Society of America*, 19. 11-15.

Eddie, W.M.M., Gaskin, T.S.J., Haberle, R.C. and Jansena, R.K., 2003, Phylogeny of campanulaceae s. str. inferred from its sequences of nuclear ribosomal DNA, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 90-554.

Elçi, Ş., 1965, Memleketimizin önemli fiğ türlerinde kromozom sayılarının tesbiti ve kromozom morfolojisinin mukayesesi, *A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları*: 254, Ankara.

Elçi, Ş., 1966a, Çok yıllık çavdarın (*Secale aontanum* Guss) bazı morfolojik ve diğer özellikleri, meioz analizi ve kromozom morfolojisi ile tetraploid çok yıllık çavdarın elde edilmesi üzerinde araştırmalar, *A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları*: 281.

Elçi, Ş., 1966b, Yem bezelyesinde (*Pisum arvense* L.) kromozom sayısının tespiti ve karyotip analizi, *A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları*: 259.

Elçi, Ş., 1966c, Mitoz kromozomların tetkikinin zor olduğu bazı baklagil bitkilerinde kromozom sayımı ve karyotip analizi için elverişli bir metot, *A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları*: 177.

Elçi, Ş., 1975, Bazı kültür bitkilerinde hücre bölünmesi ve mitoz ile meiosiste kromozom konfigurasyonları, *Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları*: 99.

Elçi, Ş., 1978, Çim (*Lolium*) tarımı, *Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ziraat İşleri Genel Müdürlüğü Yayınları* A-13 0, Ankara.

Elçi, Ş., 1982, Sitogenetikte gözlemler ve araştırma yöntemleri, *Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları Biy*. 3, Elazığ.

Elçi, Ş., 1994, Sitogenetikte araştırma yöntemleri ve gözlemler, *100. Yıl Üniversitesi Yay*. No:18, Fen Edebiyat Fakültesi Yayın No: 16, s, 11-84,Van.

Elçi, Ş., 2005, Baklagil ve buğdaygil yem bitkileri, *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı*, 375-395, Ankara.

Elçi, Ş. ve Sancak C., 2009, Sitogenetikte araştırma yöntemleri ve gözlemler, *Ankara Üniversitesi, Ziraat Fak.* yay. no:1576, ders kitabı;528, s, 51-67, Ankara.

Eraç, A. ve Ekiz H., 1985, Yembitkileri yetiştirme, *A.Ü. Ziraat fakültesi yayınları*, Ankara.

Eser, D., Geçit, H.H., Avcıoğlu, R., Çiftçi, C.Y., Soya, H., Emeklier, H.Y. ve Tan, A., 1990, Türkiye'de yemlik ve yemeklik baklagil üretim ve sorunları, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 3.Teknik Kongresi,* Ziraat Mühendisleri Odası ve A.Ü. Ziraat Fakültesi, 8-12 Ocak s.351-360, Ankara.

Essad, S., 1962, Etüde gsnâtique et cytogenâtique des especes *Lolium perenne* L., *Festuca pratensis* Huds. et de leurs hybrids, *I.N.R.A., Anneles de L'Amelioraiton des plantes*, Wersailles.

Gaut, B.S., Tredway, L.P., Kubik, C., Gaut, R.L. and Meyer, W., 2000, Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (*Poaceae*) based on ITS sequence data, *Plant Syst Evol* 224:33-53.

Ghariani, S., Trifi-Farah, N., Chakroun, M., Marghali, S. and Marrakchi, M., 2003, Genetic diversity in Tunisian perennial ryegrass revealed by ISSR markers, *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 809–815, Netherlands.

Golblatt, D.S., 1996, Social Theory and the environment, *Westview Press*.

Govindaraju, D.R. and Culli, C.A., 1992, Ribosomal DNA variation among populations of a *Pinus rigida* Mill, (pitch pine) ecosystem: I. distribution of copy numbers, *Heredity* 69: 133-140.

Graham, S.W. and Olmstead R.G., 2000, Systematics utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of theb angiosperms, *American Journal of Botany*, 11-87**.**

Grebenstein, B., Röser, M., Sauer, W. and Hemleben, V., 1998, Molecular phylogenetic relationships in *Aveneae* (*Poaceae*) species and other grasses as inferred from ITS1 and ITS2 rDNA sequences *Pl. Syst. Evol*. 213:233-250, Austria.

Hamby, K.R. and Zimmer E.A., 1992, Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics, *In Molecular Systematics of Plants. eds. P. Soltis, D. Soltis and J. Doyle*, pp. 50- 91, *Chapman&Hall, New York.*

Hand, M.L., Cogan, N.O., Stewart, A.V. and Forster, J.W., 2010, Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium-Festuca* species complex, *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10:303.

Harper, J., Armstead, I., Thomas, A., James, C., Gasior, D., Bisaga, M., Roberts, L., King, I. and King, J., 2011, Alien introgression in the grasses *Lolium perenne* (perennial ryegrass) and *Festuca pratensis* (meadow fescue): the development of seven monosomic substitution lines and their molecular and cytological characterization, *Annals of Botany* Page 1 of 9, doi:10.1093/aob/mcr083. available online at www.aob.oxfordjournals.org.

Heneen, W.K., 1962, Karyotype studies in *Agropyron junceum*, *A.repens* and their sponaneous hybrids, *Hereditas* 48: 471-500.

Holmes, W., 1980, Grass its production and utilization, *Published for the British Grassland Society by Blackwell Scientific Publications.*

Hoover, M.M., Hein, M.A., Dayton, W.A. and Erlanson, C.O., 1948, Grass, *The Yearbook of Agriculture, 1948, United States Depertman Of Agriculture*, the superitendent of document, Washington, 25, D.D., USA, 675-677.

Hua, C., ZhengLai, H. and YuQiang, Q., 2006, Karyotype analysis on six genotypes of trufgrass, *Acta Prataculturae Sinica* Vol. 15, no.6, pp. 109-111.

Inda, L.A., Segarra-Moragues, J.G., Müler, J., Peterson, P.M. and Catalan, P., 2008, Dated historical biogeography of the temperate *Loliinae* (*Poaceae*, *Pooideae*) grasses in the northern and southern hemispheres, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46, 932–957.

Jones, E.S., Mahoney, N.L., Hayward, M.D., Armstead, I.P., Jones, J.G., Humphreys, M.O., King, I.P., Kishida, T., Yamada, T., Balfourier, F. and Et al., 2002, An enhanced molecular marker based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) reveals comparative relationships with other *Poaceae* genomes, *Genome* 45: 282-295.

Jorgensen, R.A. and Cluster, P.D., 1988, Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies, *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1238- 1247.

Kıvrak, N. ve Tamkoç, A., 2006, Bazı bezelye *(Pisum sativum* L.*)* hatlarında karyotip analizi, *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 20 (39): (2006) 105-113.

Kopecký, D., Loureiro, J., Zwierzykowski, Z., Ghesquière, M. and Doleqel, J., 2006, Genome constitution and evolution in *Lolium* x *Festuca* hybrid cultivars (*Festulolium*), *Theor Appl Genet*, 113:731–742.

Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A., 1964, Nomenculature for centromeric position on chromosomes, *Hereditas*, 52, p. 201-220.

Lewis, E.J., Humphreys, M.W. and Caton, M.P., 1980, Chromosome location of two isozyme loci in *Lolium perenne* using primary trisomics, *Theot. Appl. Genet*, 57, 237-239.

Liu, J.Q., Gao, T.G., Chen, Z.D. and Lu, A.M., 2002, Molecular phylogeny and biogeography of the Qinghai-Tibet plateau endemic nannoglottis, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23-307.

Loos, B.P., 1993, Allozyme variation within and between populations in *Lolium* (*Poaceae*), *Plant Syst Evol* 188:101-113.

Ma, X., Gu, X.-Y., Chen, T.-T., Chen, S.-Y., Huang, L.-K. and Zhang, X.-Q., 2013, Genetic relationships between *Lolium* (*Poaceae*) species revealed by RAPD markers, *Genet. Mol. Res.* 12 (3): 3246-3255.

Malik, C.P. and Thomas, P.T., 1966, Karyotypic studies in some *Lolium* and *Festuca* species, *Caryologia: Intarnational Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 19:2, 167-196.

Malik, C.P., 1967, Cytogenetic studies of the F2 hybrid of *L. multiflorum* x *L. rigidum* and the species relationships in the genus *Lolium*, *Der Zuchter* 37:261-274.

Malyshev, S., 1997, Molecular markers in mapping plant genome, *Molecular Biology*, 31-163.

Manga, İ., 1988, Buğdaygil yembitkileri kültürü ders notları, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları* No:40, Samsun.

McGrath, S., Hodkinson, T.R., Salamin, N. and Barth, S., 2006, Development and testing of novel chloroplast microsatelite markers for *Lolium perenne* and other grasses (*Poaceae*) from de novo sequencing and in silico sequences, *Molecular Ecolog Notes 6*, 449-452.

McGrath, S.K., 2008, The characterisation of genetic diversity of a collection of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), submission for Ph.D., September 2008, *University of Dublin*, Trinity College.

Morgan, W.G., Thomas, H. and Lewis, E.J., 1988, Cytogenetic studies of hybrids between *Festuca gigantea* Vill. and *Lolium multiflorum* Lam. *Plant Breeding*, 101, 335-343.

Mummenhoff, K., Franzke, A. and Koch, M., 1997, Molecular phylogenetic of thlaspi *Brassicaceae* based on chloroplast DNA restriction site variation and sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA, *Cand. J. Botany*, 75. 469.

Naylor, B., 1960, Species differentiation in the genus *Lolium*, *Heredity* 15:219-233.

Naylor, B. and Rees H., 1958, Chromosome size in *Lolium temulentum* and *Lolium perenne, Nature* 181:854 – 855.

Özköse, A., 2012, Ankara doğal florsından toplanan çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.) genotiplerinin bazı morfolojik ve tarımsal özelliklerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı*, Konya.

Pašakinskienė, I., Anamthawat-Jonsson, K., Humphreys, M.W., Paplauskiene,V. and Jones, R.N., 1998, New molecular evidence on genome relationships and chromosome identification in fescue (*Festuca*) and ryegrass (*Lolium*), *Heredity* 81:659– 665.

Polok, K., 2005, Evolutionary status of closely related Lolium taxa, In: Prus-Głowacki W. Pawlaczyk ME. Editors, Variability and evolution - new perspectives, *Poznań: Wydawnictwo Naukowe UAM.* p 195-208.

Polok, K., 2007, Molecular evolution of the genus *Lolium* L., *Studio Poligrafi Komputerowej "SQL", Olsztyn*, p. 18-24, 87-90.

Quintanar, A., Castroviejo, S. and Catalán, P., 2007, Phylogeny of *Aveneae* (*Poaceae*) inferred from nuclear and plastid DNA sequence analysis, *Am. J. Bot.* 94. 1554–1569.

Ramana, M.S. and Jacobsen, E., 2003, Relevance of sexual polyploidization for crop improvement - a review, *Euphytica* 133:3-18.

Reid, R., Bettencourt, E. and Tıbbits, S., 1994, Genetic resources for temperate perennial grass improvement programmes in Australia, New Zealand, *Journal of Agriculture Research*, 37, 439-444.

Reiwe, M.E. and Mondart, J.R., 1985, The ryegrasses, forages, *The sciences of grassland agriculture (Forth edition)*, p.35-52, USA.

Riven, C.J., Cullis, C.A. and Walbot, V., 1986, Evaluating quantitative variation in the genome of *Zea mays, Genetics* 113: 1009- 1019.

Rodgers, S.O. and Bendich, A.J., 1987, Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer, *Plant Molecular Biology* 9: 509-520.

Sağlamtimur, T., Tansı, V. ve Baytekin, H., 1998, Yem bitkileri yetiştirme, *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi*, Ders Kitabı No: C-74, Adana, s. 238.

Sağsöz, S., 1974, Diploid ingiliz çiminden (*Lolium perenne* L.) tetraploid ingiliz çiminin elde edilmesi imkânları bu bitkilerde mitoz ve meioz kromozomarı ile bazı morfolojik özelliklerin mukayesesi, *Atatürk Ü. Yayınları* No. 325, Zir. Fak. yay. no. 159, araştırma serisi no. 95, Erzurum.

Sağsöz, S., 1982, İngiliz çiminde (*Lolium perenne* L.) polen danesi büyüklüğünün stoma uzunluğu ve frekansının ploidi seviyesi ile ilişkisi üzerinde bir araştırma, *Atatürk Üniveristesi Yayınları* No: 595, Ziraat Fakültesi yayınları no: 276, araştırma Serisi no: 181, Erzurum.

Sancak, C., 1994, Kamışsı yumak (*Festuca Arundinacea* Schreb.) ve çok yıllık çim (*Lolium Perenne* L.)'in doğal kısır melezinden poliploid bitkiler elde edilmesi, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı* – Ankara.

Sharifen, F., Mozafari, J., Tavassoli, A. and Abbasi, M.R., 2009, Comparative karyotypic analysis of annual and perennial populations of *Lolium, Irian Journal of Rangelands and Forest Plant Breeding an Genetic Research*, Vol.17 No. 2, pp 182-194.

Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E. and Small R.L., 2007, "Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III", *American Journal of Botany*, 94, 275–288.

Shinozuka, H., Cogan, N.O.I., Spangenberg, G.C. and Forster, J.W., 2011, Comparative genomics in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.): Identification and characterisation of an orthologue for the rice plant architecture-controlling gene OsABCG5, *Hindawi Publishing Corporation, International Journal of Plant Genomics*, volume 2011, Article ID 291563. 12 pages doi: 10.1155/2011/291563.

Sim, S., Chang, T., Curley, J., Warnke, S.E., Barker, R.E. and Jung, G., 2005, Chromosomal rearrangements differentiating the ryegrass genome from the *Triticeae*, oat and rice genomes using common heterologous RFLP probles, *Theor Appl Genet* 110:1011-1019.

Slesaravichyus, A.K., 1988, Differential staining and identification of chromosomes of perennial ryegrass, fescue and their intergeneric hybrid, *Tsitologiya i Genetica* 22(1) 28-31.

Soltis, D.E., Collier, T.G. and Edgerton, M.L., 1991, The heuchera group (*Saxifragaceae)*: Evidence for chloroplast transfer and paraphyly, *Amer. J. Bot.* 78: 1091–1112.

Stammers, M., Harris, J., Evans, G.M., Hayward, M.D. and Forster, J.W., 1995, Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex, *Heredity* 74:19-27.

Swofford, D.L. and Olsen G.J., 1990, Phylogeny reconstruction, molecular systematics, Editörler: Hillis and Moritz, Sinauer Associates, *Sunderland*, MA:411-501.

Swofford, D.L., 1999, PAUP 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), *Sunderland, M.A,*. Sinauer Associates, Inc.

Szafer, W., Kulczyński, S. and Pawłowski, B., 1986, Polish plants, *Warszawa: PWN*. p.1018, (in: Polok, 2007).

Tamkoç, A. and Arslan, E., 2011, Inter and intra-spesific variation in SDS-PAGE of seed proteins of three *Poa* L. (*Poaceae*) species, Pak. J. Bot., 43(2): 1105-1110.

Tehrani, M.S., Mardi, M., Sahebi, J., Catalán, P. and Díaz-Pérez, A., 2009, Genetic diversity and structure among Iranian tall fescue populations based on genomic-SSR and EST-SSR marker analysis, *Plant Syst Evol*, 282:57–70.

Terrell, E.E., 1968, A taxonomic revision of the genus *Lolium*, *USDA Techn Bull*, 1392:1-65, (in: Polok, 2007).

Torrecilla, P. and Catalán P., 2002, Phylogeny of broad-leaved and fineleaved *Festuca* linages (*Poaceae*) based on nuclear ITS sequences, *Syst. Bot*. 27, 241–251.

Ünal, F., 1988, Kamışsı yumak (*Festuca arundinacea* Schreb.) X çok yıllık çim (*Lolium perenne* L.) doğal melezinden kolşisin etkisi ile amfidiploid elde edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* – Ankara.

Ünal, F., 1992, Kamışsı yumak (*Festuca arundinacea* Schreb.)'ta karyotipik bir çalışma, *Biol.Fac.Arts* Gazi Univ. 1: 1-14.

Watson, L. and Dallwitz, M.J., 1994, The grass genera of the world, 2. edition, *CAB İnternational, Wallingford Oxon OX10 8 DE*.

Watson, L. and Dallwitz, M.J., 1999, Grass genera of the world: description, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references (Internet),(cited 2006 Dec 12), Available from:http://biodiversity.uno.edu/delta/.

Weiller, C.M., Henwood, M.J., Lenz, J. and Watson, L., 1995, *Pooideae* (*Poaceae*) in Australia- description and illustrations (Internet), (cited 2006 Sept 27), Available from:htttp://muse.bio.cornell.edu/delta/ (in: Polok, 2007).

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W., 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, Pp. 315-322 In: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis. M. A.. D. H. Gelfand. J. J. Sninsky, and T. J. White, *Academic Pres, Inc.*. New York. ©W°.

ZhiYong, C., ZhongHong, H., JianXiong, J. and ZiLi, Y., 2010, Karyotype analysis of three different genotypes of *Poeae*, *Acta Prataculturae Sinica* Vol. 19, no.6, pp. 281-285.

Zielinski, R., 1987, Genetic variation of the liverwort genus Pellia with special reference to central European territory, Szczecin: *Wydawnictwa Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego*, 297 p. (Rozprawy i Studia series.).

Zwierzykowski, Z., Komsala, A., Zwierzykowska, E., Jones, N., Jokm, W. and Bocianowski, J., 2006, Genome balance in six successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis x Lolium perenne*, *Theor Appl Genet*,113:539 – 547.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : İrfan ÖZER
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Aydoğmuş – 1966
Telefon : (0532) 5720415 - (0332) 6172800
Faks : (0332) 6173158
e-mail : irfanozer@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		Adı. İlçe. İl	Bitirme Yılı
Lise	:	**Gazi Lisesi. Meram. Konya**	**1984**
Üniversite	:	**S.Ü. Ziraat Fakültesi**	**1989**
Yüksek Lisans	:	**S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü**	**1992**
Doktora	:	**S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü**	**-**

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
1997-2004	**ÇOMÜ. Ziraat Fak.**	**Uzman**
2004- …….	**S.Ü. Sarayönü MYO**	**Öğretim Görevlisi**

UZMANLIK ALANI: Çayır mera yem bitkileri yetitiriciliği ve ıslahı

YABANCI DİLLER: İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

1. Özer, İ., Demirer, T., Kaynaş, K., 2000, Değişik dozdaki tavuk gübresi kompostu ve örtü toprağı kalınlığının yemeklik mantar (*Agaricus bisporus*)'da verim ve kaliteye etkisi, *Türkiye VI. Yemeklik Mantar Kongresi*, 20-22 Eylül 2000. Bergama. 168-174.

2. Demirer, T., Özer, İ., 2000, Perlit, pomza, torf ve talaş ile karışımlarından oluşan örtü toprağının yemeklik mantar (*Agaricus bisporus*)'da verim ve kaliteye etkisi, *Türkiye VI. Yemeklik Mantar Kongresi*, 20-22 Eylül 2000, Bergama, 265-270.

3. Demirer, T., Özer, İ., 2000, Değişik sıvı yaprak gübrelerinin nohutta verim ve kaliteye etkisi, *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14 (21) : 107-117.

4. Gökkuş, A., Baytekin, Hakyemez, H.H., ve Özer, İ., 2001, "Çanakkale'nin sürülüp terk edilen çalılı meralarında yeniden bitki gelişimi", *Türkiye 4. Tarla Bitkileri Kongresi*, 17- 21 Eylül 2001, Tekirdağ, Cilt: III. Çayır Mera, Yem Bitkileri, 13-18. 2001.

5. Baytekin, H., Hakyemez, B.H., Özer İ. ve Gökkuş, A., 2003,"Çanakkale'de taban ve kıraç koşullarda kışlık ara ürün olarak yetiştirilen fiğde hasat zamanının ot verimi ve bazı tarımsal özelliklere etkisi", *Türkiye 5. Tarla BitkileriKongresi*, 13-17 Ekim 2003, Diyarbakır, II. Cilt. 70-73, 2003.

6. Demirer, T., Özer, İ., Koçtürk, O.M., Yeşilyurt, A., 2004, Effect of different leaf fertilizers on yield an quality in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Pakistan Journal of Biological Sciences,* 7 (3): 384-388

7. Demirer, T., Röck-Okuyucu, B, ve Özer, İ., 2005, Effect of different types and doses of Nitrogen fertilizers on yield and quality characteristics of mushrooms (*Agaricus bisporus* (Lange) Sing) cultivated on wheat straw compost, *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics,* 106 (1): 71-77 2005.

8. GÜL, M.K., EGESEL, C.Ö., ÖZER, İ., KAHRIMAN, F., 2007, *Brassica napus* ve *Brassica campestris* türlerinde farkli azot gübrelemesine göre fitosterol ve tokoferol içeriğinde oluşan değişiklikler, *Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi*, 25-27 Haziran 2007, Erzurum, cilt. 2, s. 637-640.

9. Egesel, C.Ö., Gül, M.K., Kahrıman, F., Özer, İ., ve Türk, F., 2008, The effect of nitrogen fertilization on tocopherols in rapeseed genotypes. *European Food Research and Technology*, 227 (3): 871-880, 2008.

10. Özer, İ.ve Bağcı, S.A., 2013, Determination of favorable soybean (*Glycine max* L. Merr.) genotypes for Konya ecological conditions, *International Plant Breeding Conferance*, 10-14 November 2013, Antalya /Turkey.

11. Özer, İ. ve Özkaynak, İ., 2014, Growing possibilities of some forage legumes direct sowing on stubble after wheat harvest in Konya ecolojical region, *2nd International Conference on Environmental Science and Technology*, Side 14-17 May 2014, Antalya / Turkey (Yüksek Lisans tezinden).

12. Özer, İ. ve Özkaynak, İ., 2014, Research on growing possibilities of Narbonne Vetch (*Vicia Narbonensis* L.) and Persian Clover (*Trifolium Resupinatum* L.) in no-till sytem under Konya ecolojical region, *2nd International Conference on Environmental Science and Technology*. Side 14-17 May 2014, Antalya / Turkey (Yüksek Lisans tezinden).

13. Özer, İ. ve Tamkoç, A., 2014, Effects of diffrent nitrogen doses on the growth trend and some agricultural properties of pea, *International Conference on Plant Biology and Biotechnology*, 28-30 May 2014, Almaty / Kazakistan.

14. Özer, İ. ve Bağcı, S.A., 2014, Determination of the soybean(*Glycine max* L. Merr.) varieties for favorable yield and quality in Central Anatolian conditions, International Conference on Plant Biology and Biotechnology, 28-30 May 2014, Almaty / Kazakistan.

15. Özer, İ., Bağcı, S.A., Uyanöz, R., 2014, Effects of organic fertilizer on yield and quality of safflower (*Carthamus tinctorius* L), *V International Agricultural Symposium "Agrosym 2014" Jahorina*, 23-26 October 2014, Bosnia and Herzegovina

16. Özer, İ. ve Tamkoç, A, 2014, Effects of diffrent nitrogen doses on the nutritional content of field pea seeds, *V International Agricultural Symposium "Agrosym 2014" Jahorina,* 23-26 October 2014, Bosnia and Herzegovina

Tez

Konya İli Anız Alanlarında Doğrudan Ekim Süreti İle Baklagil Yem Bitkileri Yetiştirme İmkanları Üzerine Bir Araştırma (Yüksek Lisans Tezi). Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı . 1992 - Konya