

## Türkiye’de Kültürü Yapılan İskenderiye Üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.) ve İran Üçgülü (*T. resupinatum* L.) Türlerinin Karyotip Özellikleri

Serdar DİRİHAN<sup>1</sup>

Eissa ZARIFI<sup>2\*</sup>

Derya GÜLOĞLU<sup>3</sup>

Cafer S. SEVİMAY<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Turku, Turku, Finland

<sup>2</sup> Genetics and Genetic Resources Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

<sup>3</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi Aksu Mehmet Süreyya Demiraslan Meslek Yüksekokulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü Organik Tarım Programı Isparta, Türkiye

<sup>4</sup> Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Dışkapı, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu yazar:

e-posta: ezarifi@agri.ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: Nisan 13, 2014

Kabul Tarihi: Mayıs 29, 2014

### Özet

Türkiye’de kültürü yapılan ve birbirinden farklı ekolojik koşullara adaptasyon gösteren İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.) ve İran üçgülü (*Trifolium resupinatum* L.) türlerinin karyotip analizi ve kromozom incelemeleri A. Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Sitoloji Laboratuvarı’nda yürütülmüştür. Çimlenen tohumlardan elde edilen kök uçları %1 *α*-bromonaftalin ve 8- hidroxykuinolin çözeltilerinde ilk işleme tabi tutularak, Sonra aseto demir hematoksin ile boyanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; her iki tür için de önceki çalışmalara uygun olarak kromozom sayıları  $2n = 2x = 16$  olarak doğrulanmıştır. İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.) ve İran üçgülü (*Trifolium resupinatum* L.) ortalama kromozom boyları sırasıyla  $3.45 \pm 0.06$  ve  $4.19 \pm 0.13$  olarak bulunmuştur. Önceki çalışmalarda tam olarak ortaya konulmadığı bildirilen İskenderiye üçgülü kromozomlarında satelit olgusu iki kromozom çiftinde tespit edilmiş, 1 numaralı kromozom  $3.26 \pm 0.37$  kol oranı ile submetasentrik, 7 numaralı kromozom ise  $1.23 \pm 0.10$  kol oranı ile metasentrik tipte kromozom olarak bulunmuştur. Satelit uzunlukları sırasıyla 1.51 ve 0.95  $\mu\text{m}$ ’dir. İran üçgülü. kromozomlarında ise ilk kez bir kromozom çiftinde heteromorfizme rastlanmıştır. Bu olgu karyotipte 2 numaralı kromozomun homologları olarak 2(1) numaralı olan  $1.16 \pm 0.10$  kol oranı ile metasentrik iken, 2(2) numaralı homolog ise  $2.17 \pm 0.52$  submetasentrik olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.), İran üçgülü (*Trifolium resupinatum* L.), heteromorfik kromozom, karyotip özellikleri

## Karyotype Features of Berseem Clover (*T. alexandrinum* L.) and Persian Clover (*T. resupinatum* L.) Species Which Cultivated in Turkey

### Abstract

Karyomorphological studies were carried out on two putative and cultivated *Trifolium* species in Turkey; berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) and persian clover (*T. resupinatum* L.), these two species extensively for their adaptation to different ecological conditions are cultivated as forage plant in Turkey. Meristematic cells of root tips (1 cm in length) were obtained from germinated seeds in petri dishes and pretreated in 1%  $\alpha$ -Bromonaphthalene and 8-Hydroxyquinoline solutions and stained in aceto iron hematoxyline with macerating stained roots by means of the enzyme cytase. The results showed that the Somatic chromosomes of these species are contains equal diploid chromosome number  $2n=2x=16$ ; Avarage chromosome length were  $3.45 \pm 0.06$  and  $4.19 \pm 0.13$  for berseem and persian clover, respectively. A phenomenon having satellite were found for four chromosome of berseem clover which was reported undefinite in previous studies; chromosome 1 and chromosome 7 were found submetacentric with the arm ratio  $3.26 \pm 0.37$  and metacentric with the arm ratio  $1.23 \pm 0.10$ , respectively. Sattelite lentghs of these chromosomes are 1.51 and 0.95  $\mu\text{m}$ . In persian clover chromosomes one pair was found having heteromorphism. This phenomenon was determined in karyotype that as the homologous of chromosome 2, 2(1) was metacentric with the arm ratio  $1.16 \pm 0.10$  and 2(2) was submetacentric with the arm ratio  $2.17 \pm 0.52$ .

**Key words:** *Trifolium alexandrinum* L., *Trifolium resupinatum* L., heteromorphic chromosome, karyotype

## GİRİŞ

Baklagiller familyasının en fazla sayıda uyeye sahip cinslerinden olan üçgüllerin (*Trifolium*) temel kromozom sayısının genellikle  $n=x=8$  olduğu bilinmektedir [8]. Bu bitki cinsinde yer alan türlerin ploidi seviyesi  $2x$ ’den  $8x$ ’e kadar değişmektedir [38]. *Trifolium* türlerinin kromozom sayılarında görülen bu yüksek varyasyon; translokasyon, inversiyon, duplikasyon ve delesyon gibi kromozomal evrim mekanizmalarının bu cins içerisinde çok işlek olduğunu göstermektedir [18].

Bu çalışmada inceleyeceğimiz İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.) ve İran üçgülü (*T.*

*resupinatum* L.) türleri aynı sayıda somatik kromozoma ( $2n=2x=16$ ) sahip olup, geleneksel ıslah yöntemleri kullanılarak başarılı melezlemeler gerçekleştirilememiştir. Bunun nedeni postzigotik yetersizlik bariyeri olarak açıklanmıştır. Bununla birlikte Kaushal vd. (2005) [10] ve Kumar (2001) [12], Hindistan’daki yerli hatları kullanarak yaptıkları çalışmada embriyo kurtarma tekniği ile *T. alexandrinum* L.  $\times$  *T. resupinatum* L. interspesifik melezleri geliştirmeyi başarmışlardır. Elde edilen melezlerin morfolojileri iki türe de benzeyen intermediyer özellikler göstermiştir. Böylece iki türün istenen özelliklerini taşıyan mezlere ulaşılabilmiştir.

İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.) baklagiller (Fabaceae) familyasına ait olan bir yem bitkisi olarak Batı Asya ve Kuzey Afrika'da yaygın bir şekilde doğal meralarda bulunabildiği gibi yetiştiriciliği de yapılmaktadır [11]. Yağışlı ya da sulama imkanının olduğu bölgelerde genellikle ot üretimi amacıyla yetiştirilen tek yıllık bir baklagil yem bitkisi olan İskenderiye üçgülü (*T. Alexandrinum* L.) ülkemizde özellikle Akdeniz ve Karadeniz Bölgeleri'nde doğal olarak bulunmaktadır [7]. İskenderiye üçgülü için daha önce yapılan çalışmalarda kromozom sayısı  $2n=2x=16$  [ 25, 5, 20, 4, 16 ve 17] ve bir çok araştırmacının çalışmaları  $2n=2x=16$ , Salimpour vd. (2008) 'e [30] göre ise  $2n=2x=16$ 'nin yanısıra  $2n=2x=14$  olan bitkilere de rastlanmış ve kromozomlarda satelitlerin olup olmadığı belirlenmemiştir.

İran üçgülü (*Trifolium resupinatum* L.) ise yüksek ve kaliteli ot verimi ile hayvansal üretimin temel kaynağı olan kaba yem gereksiniminin karşılanmasında önem arzeden yem bitkilerinden birisidir [29]. Tek yıllık bir baklagil yem bitkisi olan bu bitki kıyı bölgelerimizde kışlık olarak ekilmekte, kışı soğuk ve sert geçen bölgelerde ise yazlık ekilmesi önerilmektedir [35]. İran üçgülünün somatik kromozom sayısı  $2n=2x=16$  olarak belirlenmiştir [23, 22, 4, 9 ve 28]. Bununla birlikte bazı çalışmalar bu türün botanik varyeteleri için farklı kromozom sayıları olduğunu bildirmişlerdir [38].

Bu çalışmanın amacı karyotip ve kromozom yapısı bakımından daha önceki çalışmalarda farklı sonuçlara ulaşılan *T.alexandrinum* L. ve *T. Resupinatum* L. türlerinin bu özellikleri konusunda kesin bilgilere ulaşarak, farklı ekolojik koşullara adapte olmuş bu iki üçgül türünün ıslah olanaklarına ışık tutacak sonuçlar elde etmektir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada kullanılan İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L) tohumları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Gen Bankası'ndan; İran üçgülü (*T. resupinatum* L) tohumları ise Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş, laboratuvar çalışmaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Sitoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

### Sitogenetik Çalışmalar

Tohumlar javel solusyonu (9 sodyum hipoklorit: 1 su) içinde 30 dk. dezenfekte edildikten sonra petri kutularında filtre kağıtları arasında çimlendirilmiş, yaklaşık 0.5-1 cm

uzunluğundaki kök uçları sitogenetik incelemeler için alınmıştır. Kök uçları 0.002 mM 8- Hydroxykuinolin içinde buzdolabında +4 °C'de 4 saat bekletildikten sonra distile su ile 30 dk yıkanmıştır ve 32-48 saat Lewitsky (formaldehit ve kromik asit) çözücüsünde tespit edilmiştir [1, 2, 36, 37]. Kök uçları 30 dk distile suda yıkandıktan sonra 1 Normal NaOH ve 1 N HCl ile 60 °C'de 10 dk hidroliz edilmiştir ve 30-32 °C'de aseto demir hematoksilin ile 16 saat boyanmıştır [2, 21,37]. Boyama işleminden sonra sitaz enzimi ile hücre duvarlarının erimesi sağlanarak materyal mikroskobik incelemelere hazır hale getirilmiştir. Lam üzerine bir damla %45'lik asetik asit damlatılarak ezme (squash) işlemi gerçekleştirilmiştir.

Ezme işlemi tamamlanan preparatlar Olympus BH-2 mikroskobu ile incelenmiş ve bu mikroskoba bağlı DP72 dijital kamera ile fotoğraflanmıştır. Kromozom boyutları 10 metafaz plakası üzerinde, Micro Measure 3.3 software yazılımı kullanılarak ölçülmüştür [26]. Kromozom tipleri ve kromozomların sentromer pozisyonları Levan vd. (1964)'ne [15] göre belirlenmiştir. Karyotip değerleri SPSS16 bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, iki önemli *Trifolium* türünün kromozom sayılarını net bir şekilde belirleyebilmek için ileri bir teknik kullanılmıştır (Lewitsky fiksatif ve aceto-demir-hematoksilin boyası). Kromozomlar aseto-demir-hematoksilin ile 30-32 °C ve karanlık koşullarda 15-17 saat boyanmıştır [2, 21, 37], bu türlere ait tüm kromozomların iyi boyandığı ve kromozomların birer birer ayırtıldığı gözlenmiştir. Bulgularımız bu bitki türlerinin somatik kromozom sayıları için daha önce de bildirilen  $2n=2x=16$  gözlemini desteklemektedir [6,25, 13, 4, 17]. Kromozom morfolojisi bakımından bu iki tür belirgin bir şekilde farklılık göstermektedir. Farklılıklar kromozom boyutlarında, sentromerin pozisyonunda, ikincil yapılar da ya da satelitlerde ve bazı homolog kromozomlarda heteromorfik olarak tespit edilmiştir.

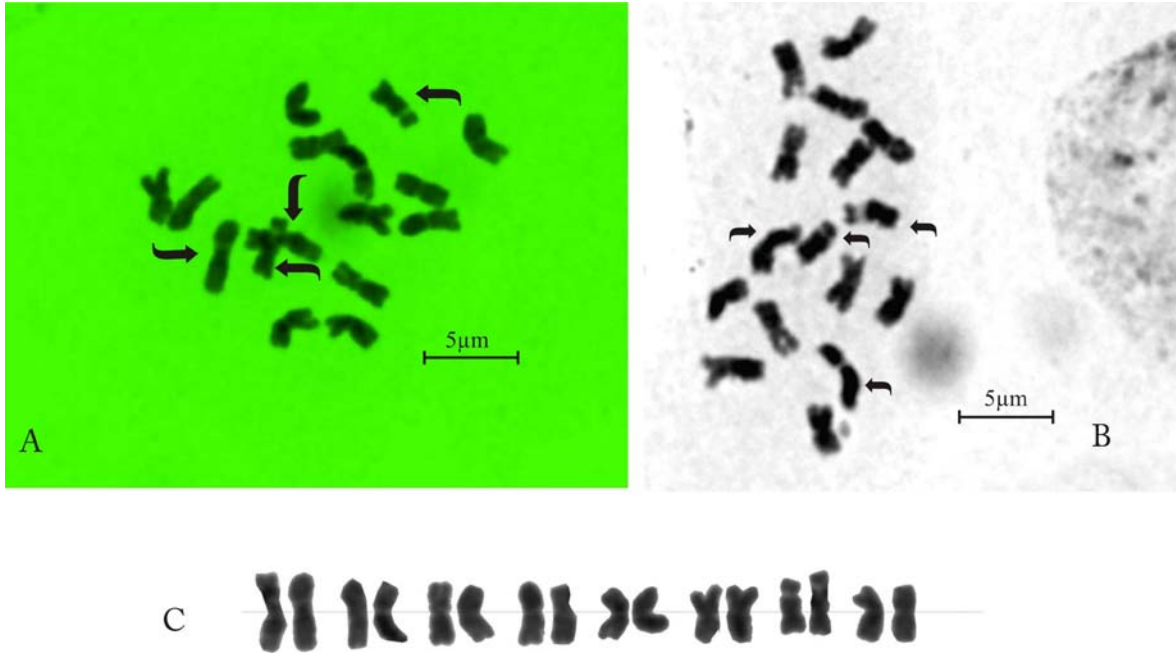
Somatik kromozom sayıları, karyotip formülleri, kromozom uzunlukları, ve total karyotip uzunluğu ve asimetri indeksleri (A1, A2) Romero Zarco (1986)' ya [27] göre belirlenmiştir. Simetri sınıflamaları Stebbins (1971)'e [33] göre yapılarak, *T. alexandrinum* L. ve *T. resupinatum* L. türleri için karyomorfolojik parametreler, metafaz kromozomları ve haploid idiogramları sırasıyla Çizelge 1, 2; Şekil 1, 2 ve 3'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.** İskenderiye üçgülünün (*Trifolium alexandrinum* L. (N=5)) ölçüme dayalı verileri ile oluşturulan karyotipi.

| Çift No         | Total (L+S)<br>µm | Uzun kol(L)<br>µm | Kısa kol (S)<br>µm | Kol Oranı<br>(AR=L/S) | CI<br>(S*100/(L+S)) | Sat  | Tip | L%           | S%           | RL%   |
|-----------------|-------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|------|-----|--------------|--------------|-------|
| 1               | 4.16± 0.19        | 1.98± 0.08        | 0.66± 0.08         | 3.26± 0.37            | 15.68               | 1.51 | st  | 7.19         | 2.42         | 15.09 |
| 2               | 3.82± 0.10        | 2.18± 0.06        | 1.63± 0.11         | 1.39± 0.12            | 42.55               | -    | m   | 7.92         | 5.93         | 13.85 |
| 3               | 3.61± 0.11        | 1.93± 0.06        | 1.67± 0.05         | 1.15± 0.03            | 46.43               | -    | m   | 7.02         | 6.08         | 13.09 |
| 4               | 3.44± 0.10        | 1.86± 0.11        | 1.58± 0.01         | 1.18± 0.07            | 46.14               | -    | m   | 6.78         | 5.74         | 12.51 |
| 5               | 3.29± 0.06        | 1.76± 0.04        | 1.52± 0.05         | 1.16± 0.06            | 46.37               | -    | m   | 6.41         | 5.55         | 11.96 |
| 6               | 3.13± 0.04        | 1.66± 0.04        | 1.46± 0.02         | 1.13± 0.03            | 46.83               | -    | m   | 6.05         | 5.32         | 11.36 |
| 7               | 3.07± 0.19        | 1.21± 0.10        | 0.99± 0.051        | 1.23± 0.10            | 32.65               | 0.95 | m   | 4.42         | 3.60         | 11.15 |
| 8               | 3.02± 0.06        | 1.71± 0.07        | 1.30± 0.05         | 1.33± 0.10            | 43.25               | -    | m   | 6.23         | 4.74         | 10.97 |
| <b>Ortalama</b> | <b>3.45± 0.06</b> | <b>1.79± 0.04</b> | <b>1.36± 0.04</b>  | <b>1.48± 0.09</b>     |                     |      |     |              |              |       |
| <b>Toplam</b>   | <b>27.55</b>      |                   |                    |                       |                     |      |     | <b>52.01</b> | <b>48.33</b> |       |

Kromozom formülü  $2n = 2x = 16 = 12m + 2m^{sat} + 2st^{sat}$ ; SC= 2A; A<sub>1</sub>= 0.24, A<sub>2</sub>= 0.12

**L:** Kromozom uzun kol uzunluğu (µm), **S:** Kromozomun kısa kol uzunluğu (µm), **CI:** Sentromer indeksi, **(m):** Metasentrik, **sm :** Submetasentrik, **st:** Subtelosentrik; Levan ve ark. (1964)'a [15] göre sentromer tipi, **Sat:** Satelit, SC= Simetri sınıflaması (Stebbins (1971) [33] 2A, Asimetri indeksi: A<sub>1</sub>= 0.24 ve A<sub>2</sub>= 0.12, Romero-Zarco (1986)'ya [27] göre, **N:** Karyotip belirlemede kullanılan mitotik metafaz sayısı, **L%** ve **S%:** Her bir kromozom için her kolun ne oranda olduğunu gösteren indeksler, **RL%:** Göreli kromozom boyları 10.97- 15.09 arasında değişmekte.



**Şekil 1.** A, B: Iskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L) kromozomlarının mitotik metafazda yayılışı, C: Şekil A'daki kromozomlar dikkate alınarak elde edilmiş karyogram ( $2n=2x=16$ ). Tüm metafazlarda dört satelitli kromozoma rastlanılmış, şekiller üzerinde oklarla işaretlenerek gösterilmiştir.

#### ***T. alexandrinum* L.**

*Trifolium alexandrinum* (İskenderiye üçgülü) Türkiye, Mısır, Pakistan, Hindistan ve Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak kültürü yapılan bir yem bitkisidir. Bu türün tüm somatik hücre incelemeleri daha önceki çalışmaların bulgularıyla da desteklenen ve diğer bazı üçgül türleri için de geçerli olan  $2n=2x=16$  kromozom sayısını göstermiştir [6, 24, 25, 3, 34, 13, 32]. Aseto-demir-hematoksilin boyası kullanılarak bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile kombine edilmiş karyotip analizi *Trifolium* cinsi için etkili bir yöntem olarak bilinmektedir [1, 2, 36, 37].

Kromozomların net bir şekilde kontrastı, daha fazla bir görüntüleme ile ardıışık ve tek tek morfolojik olarak ayırt edilebilmesi için preparatların sitoplazma ve hücre duvarı olmaksızın hazırlanması gerekmektedir (Şekil 1, 3; Çizelge 1).

*T. alexandrinum* L kromozomlarının morfolojik incelemesi ile 8 homolog kromozom tanımlanmıştır. Kromozom boyutlarındaki farklılık istatistiksel olarak önemli olup,  $3.02\pm 0.06$  ve  $4.16\pm 0.19$  µm aralığında değişmektedir (Çizelge 1). Sentromere bitişik bölgeler diğer bölgelerden daha fazla boyanmıştır (Şekil 1). Levan vd. (1964)'ne göre *T. alexandrinum* kromozomlarının en uzun olanı hariç tümü metasentriktir. En uzun kromozom ise submetasentrik olup, kısa kolu ikincil yapı olan bir satelite sahiptir ki bu kromozom uzunluğu ve morfolojisinin farklılığına dayalı olarak kolayca ayırt edilir. 1 ve 7 numaralı kromozomların kısa kollarının satelitli olup olmadığı şimdiye kadar bildirilmemiştir, fakat bu çalışmada ezme tekniği uygulaması ile tüm metafazlarda net bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 1). Bu satelitli kromozomlar (1 ve 7 numaralı kromozom çiftleri) boyut ve şekilleri bakımından farklı olup, 1 numaralı kromozom  $3.26\pm 0.37$  kol oranı ile submetasentrik, 7 numaralı kromozom ise  $1.23\pm 0.10$  kol oranı ile metasentriktir. Satelit uzunlukları sırasıyla 1.51 ve 0.95 µm bulunmuştur.

Bir metafaz için toplam kromozom boyu uzunluğu beş metafaz ortalaması dikkate alınarak  $2n=2x=16=27.55$  µm

olarak hesaplanmıştır. Ortalama kromozom uzunluğu ise  $3.45\pm 0.06$  µm olarak bulunmuştur.

#### ***Trifolium resupinatum* L.**

*Trifolium resupinatum* (İran üçgülü) yeşil ve kuru ot olarak kullanılabilen, kültürü yapıldığında 60 cm'ye kadar boylanabilen, otlama ve biçmeye maruz kaldığında rozet formu gösteren tek yıllık bir üçgül türüdür. Orta ve Güney Avrupa, Akdeniz ile Pencap'a kadar olan Güney Batı Asya'nın yerli bitkilerinden olup, İran, Afganistan ve Türkiye'nin soğuk kışlarında önemli bir kuru ot bitkisidir [38, 34, 11, 19, 14].

*T. resupinatum* L.'un somatik kromozom sayısı önceki çalışmalarda  $2n=2x=16$  olarak bildirilmiştir [6, 25, 31, 13, 4, 17]. Bununla birlikte bazı çalışmalar bu türün botanik varyeteleri için farklı kromozom sayıları olduğunu göstermiştir [38]. *T. resupinatum* L.'un karyotip analizi ve kromozom morfolojisi üzerine bir çalışma yapılmamış, fakat daha önce de değinildiği üzere sadece kromozom sayısı ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada *T. resupinatum* L.'un karyotip yapısı detaylı olarak ilk kez gösterilmiştir (Şekil 2. A, B, C ve D, 3., Table 2).;

*T. resupinatum* L. genomunun altı çift metasentrik (kromozom 3, 4, 5, 6, 7 ve 8) ve iki farklı tipte metasentrik ve submetasentrik (sırası ile kromozom 2(1) ve kromozom 2(2)) (Çizelge 2, Şekil 3,4) kromozomu olan bir çift kromozomdan oluştuğu bulunmuştur. Bu farklı tipte iki kromozomdan oluşan çiftin (kromozom 1) submetasentrik olanı kısa kolun sonunda uzunluğu ve görünür NOR bölgeleri ile kolayca ayırtedilebilen satelite sahip olup, bu satelitin boyu kromozomun kısa kolundan belirgin bir Şekil de uzundur. Karyotip analizi sonucunda elde edilen sekiz somatik kromozom çiftine ait tanımlayıcı bilgiler şöyledir:

Kromozom 1 en büyük ve  $2.75\pm 0.20$  kol oranı ile submetasentriktir. Kısa kolunda büyük bir satelite sahiptir. Satelit uzunluğu 2.66 µm'dir. Kromozom 1'in toplam kromozom uzunluğu ( $6.34\pm \mu\text{m}$ ) 21 diğer kromozomlardan belirgin bir Şekil de farklıdır.

Kromozom 2 (1) metasentrik olup, kol oranı  $1.16 \pm 0.10$ 'dir. Kromozom 2 (2) submetasentrik olup, kol oranı  $2.17 \pm 0.52$ 'dir. Kromozom 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 metasentrik olup kol oranları  $1.10 \pm 0.03$  ile  $1.22 \pm 0.04$  arasında değişmektedir. Toplam kromozom uzunlukları ise  $3.42 \pm 0.11$  to  $4.51 \pm 0.08$   $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir.

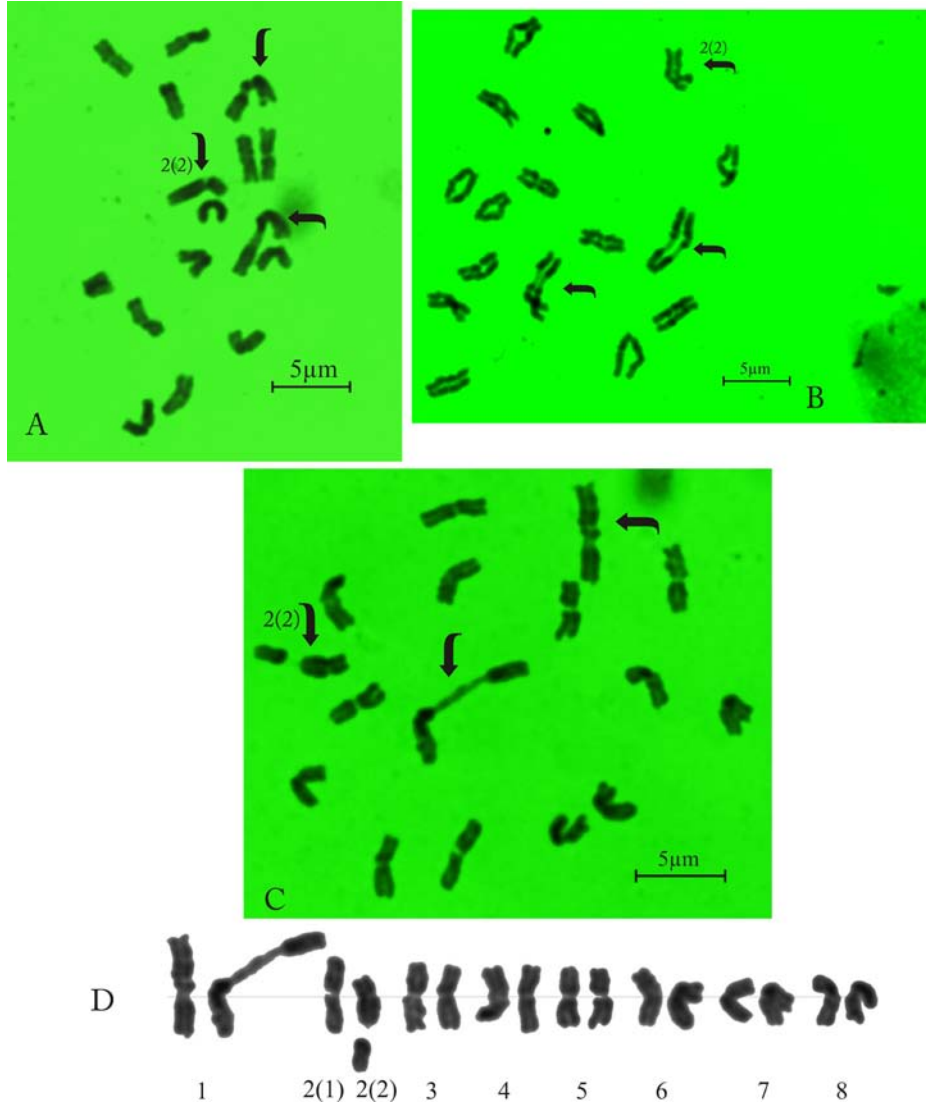
5 metafaz verisine dayalı olarak ortalama bir metafazdaki toplam kromozom uzunluğu  $2n=2x=16=33.51$   $\mu\text{m}$ , ortalama bir kromozom uzunluğu ise  $4.19 \pm 0.1$   $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur.

#### Heteromorfik Kromozomlar

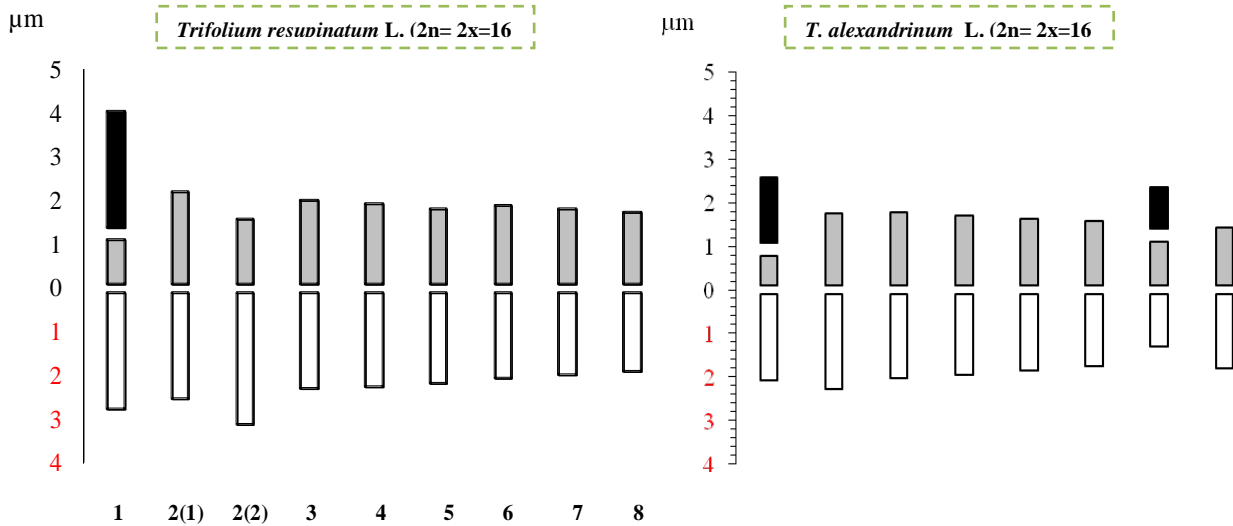
Tüm kromozomları ayrı ayrı tanımlamak için geliştirilmiş ezme tekniği kullanarak gerçekleştirdiğimiz *Trifolium resupinatum* L.'un sitolojik incelemelerinde, şaşırtıcı bir biçimde  $2n=2x=16$  kromozoma sahip olan bu türün tüm bireylerinin metafaz plakalarında 2 adet heteromorf kromozom belirlenmiştir. (Çizelge 2, Şekil 2,3). Bu fenomen daha önceki çalışmalarda belirtilmemektedir, Bundan ötürü çalışmamız *Trifolium* cinsinde nadir olarak görülebilecek heteromorf olgusunu ilk kez göstermektedir. Bu heteromorfik kromozomlar

karyotipte 2 numaralı kromozomun homologları olarak 2 (1) numaralı olan  $1.16 \pm 0.10$  kol oranı ile metasentrik bulunurken, 2 (2) numaralı homolog ise  $2.17 \pm 0.52$  submetasentrik olarak net bir şekilde tanımlanmıştır (Çizelge 2, Şekil 2,3).

Bulgularımız *T. resupinatum* L.'daki kromozom tipi değişimlerinin translokasyon, ters dönme, duplikasyon ve delesyonları içeren çeşitli kromozomal evrim mekanizmalarının etkin olabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan bu bitki türünde iki adet heteromorfik kromozomun varlığı belki de mayoz bölünme sürecindeki kromozomların ikili olarak biraraya gelişini değiştirerek temel kromozom sayısının  $x=7$  olarak gözlenmesine neden olmuş olabilir. Bazı çalışmaların *T. resupinatum* L. için botanik varyeteler olarak farklı kromozom sayılarıyla açıklamasının nedeni bu karyotip özelliğinden kaynaklanıyor olabilir [38]. Farklı kromozom sayıları bildiren bu çalışmalar heteromorf olgusunu kanıtlamaktadır. Sonraki çalışmalarda bu mekanizmaları gösterebilmek için C-bant, moleküler sitogenetik ve DNA markerleri kullanımına dayalı yöntemlere ihtiyaç vardır.



**Şekil 2.** A, B, C: İran ucgulu (*Trifolium resupinatum* L) kromozomlarının mitotik metafazda yayılışı D: Şekil C'den elde edilmiş karyogram ( $2n=2x=16$ ). Tüm metafazlarda iki büyük satelitli kromozom ile heteromorfik kromozomlara rastlanmıştır, oklarla gösterilmektedir



Şekil 3. İran üçgülünün (*Trifolium resupinatum* L. (2n= 2x= 16 )) ve Iskenderiye üçgülünün (*T. alexandrinum* L. (2n=2x=16)) haploid idiogramı.

Çizelge 2. İran üçgülünün [*Trifolium resupinatum* L. (N=5)] ölçüme dayalı verileri ile oluşturulan karyotipi.

| Çift No         | Total (L+S)<br>µm | Uzun kol(L)<br>µm | Kısa kol (S)<br>µm | Kol Oranı<br>(AR=L/S) | CI<br>(S*100/(L+S)) | Sat  | Tip | L%           | S%          | RL%      |
|-----------------|-------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|------|-----|--------------|-------------|----------|
| 1               | 6.34± 0.21        | 2.68± 0.09        | 1.00± 0.07         | 2.75± 0.20            | 15.66               | 2.66 | sm  | 8.01         | 2.98        | 18.93    |
| 2(1)            | 4.51± 0.08        | 2.42± 0.13        | 2.10± 0.08         | 1.16± 0.10            | 46.49               | -    | m   | 7.21         | 6.26        | 13.47    |
| 2(2)            | 4.50± 0.43        | 3.01± 0.37        | 1.49± 0.28         | 2.17± 0.52            | 33.09               | -    | sm  | 8.98         | 4.44        | 13.42    |
| 3               | 4.09± 0.10        | 2.20± 0.08        | 1.89± 0.04         | 1.17± 0.05            | 46.24               | -    | m   | 6.56         | 5.63        | 12.19    |
| 4               | 4.01± 0.08        | 2.17± 0.06        | 1.84± 0.02         | 1.18± 0.03            | 45.86               | -    | m   | 6.48         | 5.48        | 11.97    |
| 5               | 3.81± 0.13        | 2.09± 0.05        | 1.72± 0.08         | 1.22± 0.04            | 45.03               | -    | m   | 6.24         | 5.13        | 11.38    |
| 6               | 3.74± 0.09        | 1.96± 0.06        | 1.78± 0.04         | 1.10± 0.02            | 47.69               | -    | m   | 5.84         | 5.32        | 11.16    |
| 7               | 3.60± 0.11        | 1.88± 0.06        | 1.71± 0.06         | 1.10± 0.03            | 47.64               | -    | m   | 5.62         | 5.12        | 10.73    |
| 8               | 3.42± 0.11        | 1.80± 0.06        | 1.62± 0.07         | 1.11± 0.03            | 47.35               | -    | m   | 5.37         | 4.84        | 10.21    |
| <b>Ortalama</b> | <b>4.19± 0.13</b> | <b>2.19± 0.06</b> | <b>1.67± 0.05</b>  | <b>1.41± 0.09</b>     |                     |      |     |              |             |          |
| <b>Toplam</b>   | <b>33.51</b>      |                   |                    |                       |                     |      |     | <b>51.34</b> | <b>48.6</b> | <b>9</b> |

Kromozom formülü:  $2n = 2x = 16 = 13m + 1sm + 2sm^{sat}$  ; SC= 2B ;  $A_1 = 0.13$ ,  $A_2 = 0.21$

**L**: Kromozom uzun kol uzunluğu ( µm ), **S**: Kromozomun kısa kol uzunluğu ( µm ), **CI**: Sentromer indeksi, ( **m**: Metasentrik, **sm**: Submetasentrik ); Levan et al. (1964)'a [15] göre sentromer tipi, **sat**: Satelit, **SC**= Simetri sınıflaması [33] **1A**, Asimetri indeksi:  $A_1 = 0.24$  ve  $A_2 = 0.12$ , Romero-Zarco (1986)'ya [27] göre, **N**: Karyotip belirlemede kullanılan mitotik metafaz sayısı, **L%** ve **S%**: Her bir kromozom için her kolun hangi oranda olduğunu gösteren indeksler, **RL%**: Kromozom boyları 10.21- 18.93 arasında değişmekte.

## SONUÇ

Karyotiplerini incelediğimiz (*T. alexandrinum* L) Iskenderiye ve (*T. resupinatum* L.) İran üçgülü bitkileri için yürütülebilecek ıslah çalışmalarında bu bitki türlerinin kromozom boyut ve morfolojilerinden kaynaklanan, birbirleriyle klasik melezlenme imkanları ve bu melezlenmelerin performansı bakımından çeşitli güçlükler öngörülebilir. Gerek satelitlerdeki farklılıklar gerekse İran üçgülünde saptadığımız heteromorfizm, üçgüller cinsinin gen havuzunda kromozom morfolojisi bakımından varyasyonunun yüksek olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu varyasyon üçgüller cinsinin birbirinden çok farklı

koşullara adaptasyon kapasitesini ve bu cinsin dünya üzerinde geniş yayılışını da açıklamaktadır. Nitekim karyotipini incelediğimiz Iskenderiye ve İran üçgülleri birbirinden farklı coğrafi ve iklimsel adaptasyonu olan iki üçgül türü olup kromozom sayıları aynı olmakla birlikte karyotiplerindeki morfolojik farklılıklar adaptasyon farklılıklarını açıklamakta rol oynayabilir. Bu türlerin istenilen özelliklerinin birbirlerine aktarılabilmesi tarımsal açıdan adaptasyon avantajı olan yeni çeşitlerin geliştirilmesine imkan sağlayabilir. Klasik melezleme yöntemleri için belli güçlükler öngördüğümüz Iskenderiye üçgülü ve İran üçgülü bitkileri için moleküler yöntemlerin denenmesinin yeni çeşitler geliştirmede daha etkili sonuçlar verebileceğini önermekteyiz.

## KAYNAKLAR

- [1] Agayev, Y. M. 2002. New features in karyotype structure and origin of saffron *Crocus sativus* L. *Cytol* **67**:245–252
- [2] Agayev, Y., Zarifi, E. & Fernandez, J. A. 2009. A Study of Karyotypes in the *Crocus sativus* L. Aggregate and Origin of Cultivated Saffron. 3rd International Symposium on Saffron (20-23 May). Village Krokos Kozani, Greece.
- [3] Anderson, M.K., Taylor .N.L. & Collins, G. B. 1972. Somatic Chromosome Numbers In Certain *Trifolium* Species. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, **14**(1): 139-145
- [4] Badr, A. 1995. Electrophoretic studies of seed proteins in relation to chromosomal criteria and the relationships of some taxa of *Trifolium* Taxon **44**: 183–191
- [5] Bir, S.S. & Kumari, S. 1979. Cytological evolution of the leguminous flora of the Punjab plain. *Recent Res. Pl. Sci. (New Delhi)* **7**: 252-260.
- [6] Britten, E.J. 1963. Chromosome numbers in the genus *Trifolium*. *Cytologia (Tokyo)* **28**: 428- 449.
- [7] Elçi, Ş. 2005. Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. s. 192.
- [8] Ellison, N. W., Liston, A., Steiner, J. J., Williams, W. M., & Taylor, N. L. 2006. Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*--Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**(3), 688–705. doi:10.1016/j.ympev.2006.01.004
- [9] Fernandes, A. & Queiros, M. 1978. Contribution à la connaissance cytotoxonomique des Spermatophyta du Portugal. IV. Leguminosae (Suppl. 3). *Bol. Soc. Brot., sér. 2*, **52**: 79–164
- [10] Kaushal, P., Malaviya, D.R., Roy, A.K., Kumar, B., Tiwari, A. 2005. *Trifolium alexandrinum* × *T. resupinatum*—Interspecific hybrids developed through embryo rescue. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **83**: 137–144.
- [11] Knight, W.E. 1985. Miscellaneous annual clovers. In *Clover science and technology*, ed. N. L. Taylor, 547– 562. Madison, WI: ASA, CSSA, and SSSA.
- [12] Kumar, B. 2001. Studies on inter and intra-genetic distance among *Trifolium* species based on morphological, biochemical and cytogenetical attributes. Ph.D. thesis, Bundelkhand University, Jhansi, India.
- [13] Kumari, S. & Bir, S.S. 1990. Karyomorphological evolution in Papilionaceae. *J. Cytol. & Genet.* **25**: 173-219
- [14] Lamont, E.J., Zoghiami, A., Sackville-Hamilton, R. & Bennett, S.J. 2001. Clovers (*Trifolium* L.). In: Maxted N. and Bennett S.J. (eds), *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 79–98.
- [15] Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature For Centromeric Position On Chromosomes. *Hereditas*, **52**(2), 201–220.
- [16] Mohamed, M.K. 1997. Chromosome counts in some flowering plants from Egypt. *Egypt. J. Bot.* **37**(2): 129–156.
- [17] Morris, J.B. & Greene, S.L. 2001. Defining a Multiple-Use Germplasm Collection for the Genus *Trifolium*. *Crop Science*, **41**:893-901.
- [18] Morris, J.B., Pederson, G., Quesenberry, K. & Wang, M.L. 2009. Clover Chapter 7. Genetic Resources, in *Chromosome Engineering and Crop Improvement*, Taylor & Francis Group pp.207-228.
- [19] Mousset, C. 1995. Les dactyle ou le genre *Dactylis*. In *Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon*, BRG-INRA, France. 29-52.
- [20] Muñoz Rodríguez, A. 1993. *Trifolium* sect. *Trifolium*. II. Estudio cariológico *Acta Botanica Malacitana* **18**: 89-118.
- [21] Najafi, S., Zarifi, E. 2009. Karyotype feature of reputed variety of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) in West Azerbaijan-Iran. VIII. Tarla Bitkileri Kongresi (19-22 Ekim), Hatay Türkiye.
- [22] Petrova, A.V. & Kozuharov, S.I. 1982. Cytotaxonomic study of *Trifolium* L. in Bulgaria: I. *Fitologija* **19**: 3–23. (In Bulgarian).
- [23] Pogan, E., Czapiak, R. & Jankun, A. 1985. Further studies in chromosome numbers of Polish angiosperms. Part XVIII. *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.* **27**: 57–74.
- [24] Pritchard, A.J. 1969. Chromosome numbers in some species of *Trifolium*. *Australian Journal of Agricultural Research* **20**(5) 883 – 887.
- [25] Putievsky, E. & Katznelson, J. 1970. Chromosome Number and Genetic System in Several *Trifolium* Species Related to *T. alexandrinum*. *Chromosoma (Berl.)* **30**: 476-482.
- [26] Reeves, A. 2001. MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*, **44**: 439 – 443.
- [27] Romero- Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* **35**: 526-530.
- [28] Runemark, H. 2006. Mediterranean chromosome number reports 16 (1473--1571). *Fl. Medit.* **16**: 408–425.
- [29] Sabancı, C.O. & Ürem, A. 1994. Anadolu üçgülünde (*Trifolium resupinatum* L.) farklı sıra arası ve tohum miktarlarının yeşil ot ve kuru madde verimine etkisi. *Anadolu, Ege Tar. Ara. Ens. Dergisi* **4** (1): 19-25.
- [30] Salimpour, F., Sharifnia, F., Mostafavi, G., Hajrasoliha, S. & Ukhneh, E. 2008. Chromosome counts and determination of ploidy levels in Iranian species of *Trifolium*. *Chromosome Botany* **3**:53-63.
- [31] Selim, A.K., Abdel-Tawab, F.M. Fahmy, E.M. 1977. Phylogenetic relationships in genus *Trifolium* L. *Egypt. J. Genet. Cytol.*, **6**, 274–283.
- [32] Sheidaei, M., Hamta, A. 2008. Cytogenetic analysis of somaclonal variation in regenerated plants of Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.). *CARYOLOGIA* Vol. 61, no. 4: 392-396
- [33] Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, London, UK.
- [34] Taylor, N.L. 1985. *Clover science and technology*. Taylor, editor. Madison, Wis.: American Science Society of America. N. 25.
- [35] Ürem, A. 1985. Türkiye’de Önemli Yem Bitkilerinin Üretimi, Yetiştirilmesi ve Bazı Tescilli Çeşitlerin Özellikleri ile Tohumluk Sorunları. *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yayınları*, **55** (1):8-11.
- [36] Zarifi, E., Agayev, Y.M. & Aminizadeh, Z. 2001. Karyotype study of some species of *Artemisia* in East Azerbaijan. The First North and North West Biotechnology Congress Islamic Republic of Iran (Aug.15-16). Uremia, Iran.
- [37] Zarifi, E., Agayev, Y.M., Ganavati, F. & Aminizadeh, Z. 2005. Cytogenetics and evolution of Karyotype in wormwood, *Artemisia vulgaris* L. Seed and Plant, *Journal of Agricultural Research* .vol.22.No.1.
- [38] Zohary, M. & Heller, D. 1984. The Genus *Trifolium*. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, Israel.