

Karyotip analizlerinin yapılışı

Karyotip analizleri ve kromozom ölçümlerini yapmak için, preparatlarda iyi bir dağılma gösteren, fazla büzülmemiş, kromozom morfolojileri iyi görülebilen ve kromozomları bir düzlem üzerinde bulunan her bir tür için en iyi on tane somatik hücrenin mikroskoptan fotoğrafları digital kamera ile çekilmiştir. Fotoğraflar USB bağlantısı ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Kromozoma ilişkin tüm karakterleri ölçmek için kullanılan bilgisayar programı (Micro Measure)'dan yararlanarak materyalimizin kromozom karakterleri belirlenmiştir. Veriler toplandıktan sonra SPSS 16 sürümü ile istatistik analizleri ve özetlemeleri yapılmıştır. Yapılan hesaplamayla bir mikrometrenin ne kadar büyütüldüğü bulunmuştur. Kağıt üzerine çıktıları alınan kromozomların uzun ve kısa kolları, satelitleri kumpasla milimetrik olarak ölçülmüş ve hesaplama yoluyla mikrona çevrilmiştir.

Karyotip analizlerinin yapılışı

Sentromerlerin yeri ve satelitle kromozom kolu arasındaki mesafe bu ölçüme dahil edilmemiştir. Ancak, satelitli kromozomlarda satelitin boyu ölçülerek kromozomun toplam boyuna ilave edilmiştir. Kromozomların kol oranları uzun kol boyunun kısakol boyuna bölünmesiyle ($r = L/S$), nisbi boyları ise, bir kromozomun toplam boyunun hücredeki kromozomların toplam boyuna bölünüp 100 kat sayısı ile çarpılmak suretiyle bulunmuştur. Sentromer indeksi $I=100 S/C$ formülü ile hesaplanmıştır. Bu şekilde her bir kromozomun ayrı ayrı nispi boyları, sentromer indeksleri hesaplanmıştır. Kol indeksleri ve nispi boyları birbirine yakın olan kromozomlar homolog kromozomlar olarak tespit edilmiştir. Böylece ayrı bir cetvel hazırlanarak bu cetvelde homolog kromozomlar birbirlerinin yanına getirilmiştir.

Karyotip analizlerinin yapılışı

Bu şekilde 10 hücrenin en uzun olan ikişer kromozomuna I numarası verilmiştir. Sıra ile diğer homolog kromozomlar da numaralandırılmıştır. Sonra aynı numarayı alan 20 homolog kromozomun kısa kolların boyları toplanıp ortalaması alınarak her bir materyalin I numaralı kromozomun kısa kol boyu bulunmuştur. Aynı yoldan gidilerek kromozomun uzun kol boyu da hesaplanmıştır. Ortalama kısa ve uzun kol boylarının toplamı bu kromozomun toplam ortalama boyu olarak kabul edilmiştir. Aynı şekilde kromozomların nispi boyları ve kol indeksleri de hesaplanmıştır (Elçi, 1964). Sentromerin yerinin tespitinde Levan ve arkadaşlarının adlandırma sistemi kullanılmıştır (Levan vd. 1964).

Sentromer indeksinin hesaplanması

Her ne kadar araştırmalar sırasında kök ucundan örnek alma işleminden başlayarak boyama, preparatların yapılışı ve kromozomların morfolojilerinin belirlenmesine kadar olan bütün işlemlerde eşitliğin sağlanması için gereken bütün çabalar gösterilse de hücredeki kromozomların yapılarında farklılıklar görülebilmektedir. Bu farklılığı da en aza indirmek için mümkün olduğunca birbirine en yakın morfolojik yapı gösteren kromozomlarla araştırmanın yapılması sağlanmıőtır. Aynı hücre içinde bulunan kromozomların boylarını birbirleri ile karşılaőtırmak için kromozomların sentromer indeksinden yararlanılmıőtır.

Sentromer İndeksi=(Kromozomun kısa kol boyu/ Kromozomun toplam boyu)X100

Kromozom kollarının indeksleri

Levan vd. (1964).kol indekslerini hesaplariken kromozomun uzun kolunu, kısa kola bölmüşlerdir. Bu sayede, kromozomların tanımında sentromerin yeri ve hangi kolun uzun kol olduğu kolayca bulunur. Araştırmamızda da kromozomun uzun kol boyu kısa kol boyuna bölünerek kol indeksleri hesaplanmıştır. Sentromerin yerine göre kromozomların adlandırılması:

Sentromerin yeri	Kol oranı	Kromozom sembolü	Kromozom adı
Median Bölgesi	1	M	Metasentrik
Submedian	1.7	Sm	Submetasentrik
Subterminal	3,0	St	Subtelosentrik
Terminal Bölgesi	7,0	t	Akrosentrik

Kromozom kollarının indeksleri

Kromozomların nisbi boyu ve kol indeksleri, bir karyotipteki homolog kromozomların belirlenmesinde kullanılmıştır. Çeşitlerin her birinde beş somatik hücrede kromozom ölçümleri yapılmıştır. Her kromozomun boyu, kısa kol ve uzun kol boyları, daha önce anlatılan yöntem ile kâğıtlar üzerinde mm olarak ve mm'nin 0,1'ine kadar ölçülmüştür. Bir kromozomun boyu, iki kol boyunun ayrı ayrı nisbi boyu ve kol indeksleri hesaplanmıştır. Kol indeksleri ve nisbi boyları birbirine yakın olanlar homolog kromozomlar olarak belirlenmiştir. Ayrı bir cetvel hazırlanarak, homolog kromozomlar birbirinin yanına getirilmiştir. Bu durumda beş hücrenin her birinde en uzun olan ikişer kromozoma (homolog kromozomlar) I numarası verilmiştir. Sıra ile diğer homolog kromozomlar da numaralandırılmıştır. Aynı numarayı alan beş ayrı hücredeki on homolog kromozomun kısa kollarının boyu toplanıp, ortalaması alınarak, I numaralı kromozomun uzun kol boyu hesaplanmıştır. Aynı yöntem ile kısa kol boyu da hesaplanmıştır. Kısa kol ve uzun kol boylarının toplamının ortalaması bu kromozomun ortalama boyu olarak alınmıştır.

Karyogramların yapılışı

Kromozomları yukarıda belirtilen şekilde ölçümleri yapıldıktan sonra hücre içindeki homolog kromozomlar bulunmuştur. En uzun kromozoma I numara verildi. Sonrasirası ile diğerleride (II, III, IV. gibi) numaralandırılmıştır. Fotoğraftan I numaralı iki homolog kromozomun fotoğrafı kesilmiştir (burada fotoğrafın fotokopisini kullanmak karyogram hazırlanmasında hem daha ekonomik olmakta ve hem de dahaiyi sonuç vermektedir). Bir eksen üzerine gelecek şekilde sentromerlerinden kağıt üzerine yapıştırılmıştır. Sonra II numaralı bir çift homolog kromozom fotoğrafları dakesilerek yan yana yapıştırılmıştır. Bu işlem diğer homolog kromozomları için de tekrarlanarak sonuçta karyogramlar hazırlanmıştır (Elçi, 1982).

İdiogramların yapılışı

Kromozomların ölçümleri (büyükten başlayarak kısa ve uzun kol boylarının ortalama değerleri) yapıp sıraya konulduktan sonra kağıda çizilen yatay eksen üzerine belli bir oranda kromozomların ortalama kol boylarını 5 mm lik kalın dik çizgiler halinde kromozomların önce uzun kolları çizilmek suretiyle belirlenmiştir. Sonra 1 mm kadar sentromerin yerini belirleyen bir aralık bırakılmıştır. Aynı kalınlıktaki çizgiyle devam edilerek kromozomun kısa kolu da çizilmiştir. Sonra iki kromozom arasında 5mm lik aralık bırakılarak aynı şekilde ikinci kromozom da çizilmiştir. Böylece, bütün kromozomlar çizilerek idiogramları hazırlanmıştır (Elçi, 1982).
