

PAPER DETAILS

TITLE: Karyotype Analyses of Some Pea (*Pisum Sativum* L.) Lines

AUTHORS: Nilgün KIVRAK,Ahmet TAMKOÇ

PAGES: 105-113

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/3074977>



BAZI BEZELYE (*Pisum sativum* L.) HATLARINDA KARYOTİP ANALİZİ¹

Nilgün KIVRAK²

Ahmet TAMKOÇ³

² Selçuk Üniversitesi, Çumra MYO, Çumra/Konya/Türkiye

³ Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Konya/Türkiye

ÖZET

Bu araştırma 6 adet bezelye (*Pisum sativum* L.) hattının karyotipini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bezelyelerin kromozom sayısı, kromozom boyları, kol indeksleri, oransal boyları ve kromozom tipleri belirlenmiştir. Bezelye hatlarının tamamında kromozom sayısı $2n=14$ olarak tespit edilmiştir. Kromozom boyları $3.05-5.00\mu m$, kol indeksleri $0.38-0.98$, oransal boyları $5.72-9.08$ arasında bulunmuştur. Kromozom tipleri metasentrik ve submetasentrik olarak belirlenmiştir. İncelenen tüm hatlarda satelit bulunmakla birlikte 2 hatta birer çift satelitli kromozom ve diğer hatlarda 2'şer çift satelitli kromozom gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bezelye (*Pisum sativum* L.), kromozom, karyotip analizi.

ABSTRACT

KARYOTYPE ANALYSES OF SOME PEA (*Pisum sativum* L.) LINES

This research was carried out to determine karyotypes of six pea lines. Chromosome numbers, lengths, branch indices, relative lengths and chromosome types of the peas were studied. In all lines chromosome number was $2n= (2x) = 14$. Chromosome lengths were between $3.05 - 5.00 \mu m$, while branch indices and relative lengths were between $0.38-0.98$ and $5.72-9.08$ respectively. Types of chromosomes have been found to be metacentric and submetacentric. One satellite was observed in 2 lines while the rest of the lines contained 2 satellites on two chromosomes.

Keywords: Pea (*Pisum sativum* L.), chromosome, karyotype analyses.

GİRİŞ

Bezelye (*Pisum sativum* L.) insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan önemli bir protein kaynağıdır. Son yıllarda elde edilen bilgilere göre insan beslenmesinde, özellikle kalite bakımından üstün bir besin maddesi olduğu anlaşılmış bezelye ıslah ve üretimine hız verilmiş, konserve ve dondurulmuş gıda sanayisinde kullanımı hızla artmıştır. Diğer ülkelerle beraber ülkemizde de birçok konserve fabrikasında işlenen çeşitli sebzeler arasında bezelye ön sıralarda yer almaktadır. Türkiye'de bezelye, küçük ölçüde bahçelerde taze meyve ve taze dane olarak tüketilmek için yetiştirilir. Pazar ve konservecilik için bezelye kültürü daha çok geniş, bakımlı tarlalarda yapılmaktadır (Akçin, 1988). Yemeklik bezelye konserve sanayiinde kullanılması yanında yeşil sebze olarak da tüketilir. Yemlik bezelye ise, iyi bir hayvan yemi olması yanında, iyi bir yeşil gübre bitkisidir. Yem bezelyesinin kışa dayanıklılığı yemeklikten daha fazladır.

Bezelye Türkiye'nin doğal florasında mevcut bir bitki türüdür. Tarman (1954), bezelyenin başka ülkelere bizim ülkemizden götürülmüş, ıslah edilmiş ve çoğaltılmış olduğunu bildirmektedir. Türkiye'nin yerli bitkisi olan bezelyeden üreticilerimizin daha fazla faydalanabilmesi için çok çeşitli ekolojik şartlara sahip ülkemizin bölge şartlarına uygun bezelye hatlarına ihtiyaç duyulmaktadır. İstenilen özelliklere sahip bezelyelerin elde edilmesi ise ıslah ile mümkündür.

¹ Bu makale Nilgün KIVRAK'ın Yüksek Lisans tezinden hazırlanmıştır.

İslahta daha emin bir yol takip edebilmek için bezelyenin kromozom sayısı, kromozom morfolojisi hakkındaki bilgilere sahip olmak ve bunlardan yararlanmak gerekir. Çünkü ıslahın ana kaynağı olan kromozomlar en büyük yardımcıdır (Darlington ve La Cour, 1976). Kromozomlar, özellikle anaçların ileri döllerdeki etkisini ortaya koyma bakımından çok büyük kolaylıklar ve aydınlatıcı bilgiler verir (Elçi, 1966). Dünyada kromozomlar üzerine birçok çalışmalar yapılmasına rağmen, hala kromozom tipleri ve kromozomlara bağlı olarak hareket eden genler hakkında belirsizlikler bulunmaktadır (Fuchs ve ark. 1998).

Bu çalışmada, araştırma materyali olarak kullanılan üç yemeklik ve üç yemlik bezelye hattında karyotip analizi yapılmıştır. Bu çalışma ile bezelye hatlarının kromozom sayıları ve morfolojileri hakkında önemli veriler elde edilmiştir. Bu verilerin bezelyelerin melezlenmesinde ve döllerin kromozomal yapısında meydana gelecek değişikliklerin takibinde önemli kolaylıklar sağlayacağı düşünülmektedir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Araştırmada materyal olarak 6 adet bezelye hattı kullanılmıştır. Bu hatlardan B₁, B₆, B₁₂, yemlik; B₈, B₁₁ ve B₁₃ hattı yemekliktir. Bu yemlik ve yemeklik bezelyelerin tohumları çimlendirilerek kök uçları araştırmada materyal olarak kullanılmıştır.

Kök uçlarının elde edilişi

Bir litrelik cam konserve kavanozları 1/3'ne kadar tarım perlit ile dolduruldu. Çeşme suyu ile perlit doyuruldu. Sonra kavanozun dip kısmından itibaren 1 cm yüksekliğe erişene kadar su ilave edildi. Tohumlar muhtemel hastalık etmenlerine karşı sabunlu su ile yıkandı ve ayrı ayrı kavanozlara eşit aralıklarla 5'er adet konuldu. Kavanozların ağzı kapatılarak çimlendirme dolabına yerleştirildi. Çimlendirme dolabının sıcaklığı 20 ± 1 °C'ye ayarlandı. Kökler yaklaşık 2-3 cm olduktan sonra uçlarından 1-1.5 cm'lik kısım ilk işlem sıvısına konmak üzere kesildi. Kök uçları kesilen bitkiler tekrar kavanoza bırakılarak ağzları kapatıldı. Bitkiler yeni kök vermeye devam etti. Böylece bu bitkilerden 2-3 hafta süre ile kök örnekleri almak mümkün oldu. Elçi'nin (1994) belirttiği gibi baklagil bitkisi olan bezelyenin karyotip analizi, kromozomlarının çok küçük olması nedeniyle oldukça güçtür. Bu nedenle, çok sayıda kök ucuna ihtiyaç duyulmaktadır. Daha önce uygulanan petri kaplarında çimlendirme yöntemi ile az sayıda kök ucuna sahip olunmaktadır. Buna karşılık daha fazla tohumluk kullanılır. Bu çalışmada kullanılan yöntem bilhassa az sayıda bulunan tohumluklarda gereken miktarda kök ucu elde etme olanağı sağlamıştır. Yine deneme süresince bitkileri sulamaya ihtiyaç duyulmamıştır.

İlk işlem

Bezelyelerin 2-3 cm uzunluğuna ulaşmış olan köklerinden 1-1.5 cm boyunda kesilen uçları, içerisinde α -monobromonaftalinin sudaki doymuş eriyiği bulunan beyaz film kutularına konuldu. İlk işlem sıvısı, 250 cm^3 saf suya 4-5 damla α -monobromonaftalin ilave edilip, çalkalamak suretiyle elde edilmiştir (Elçi 1965, Cauderon 1958). Kök uçlarının α -monobromonaftalin eriyiği içinde yaklaşık 4°C'ye ayarlanmış buzdolabında 16-17 saat bekletilmesi önerilmektedir (Elçi 1965). Bu çalışmada ise, aynı sıcaklıkta 24 saat bekletilmek suretiyle başarılı sonuç alınmıştır.

Tespit

24 saat ilk işlem sıvısında bekletilen kök uçları tespit için Gagnieu (1949) ve Elçi (1966)'nin uyguladığı gibi glasiyal asetik asitte yarım saat oda sıcaklığında tutuldu.

Materyalin muhafazası

Glasiyal asetik asitten çıkarılan kök uçlarından muhafaza edilmek üzere ayrılanlar Elçi'nin (1966;1982) önerdiği gibi %70'lik alkol ile iki defa yıkandıktan sonra %70'lik alkol içine konularak buzdolabında muhafaza edildi. Aynı gün preparat yapılacak olanlar glasiyal asetik asitten çıkarıldıktan sonra her biri 5'er dakika olmak üzere saf su ile yıkanarak hidrolize edilmek üzere ayrıldı.

Hidroliz

Tesbitin yapıldığı aynı gün veya %70'lik alkol içinde buzdolabında muhafaza edilen kök uçlarının her biri 5'er dakika olmak üzere 2-3 defa saf suda yıkandı. Elçi (1965;1978), Lang ve Maurer (1965) bezelyenin kök uçlarının alkolü giderildikten sonra 1 N HCl asitte 60°C'de 12 dakika bekletilmesini önermektedirler. Ancak, çalışmada bu önerilere göre yıkanarak alkolü giderilen kök uçlarının 1 N hidroklorik asitte 60°C'de 12 dakika yerine 13 dakika su banyosunda bekletildiğinde iyi sonuç alınmıştır.

Boyama tekniği

Hidrolizden sonra en iyi boyama yöntemini belirlemek için önce, Elçi (1966)'nin bezelye üzerine yaptığı karyotip çalışmasında belirttiği yöntem uygun olarak asetokarminle boyama yapıldı. Ancak, boyamanın çok iyi olmadığı, sentromerlerin yerlerinin tespitinin çok güç olduğu bazen de hiç görülmediği ve satelitli kromozomlara rastlanılmadığı gözlemlendi. Aynı konu üzerinde çalışan Özkaynak ve Tokluoğlu'da (1981) asetokarminle boyama yapmışlar, satelite rastlayamamışlardır. Bunun üzerine hidrolizden çıkarılan kök uçları bir kere saf su ile çalkalanarak Feulgen içerisine konuldu. Kök uçları Feulgen içerisinde koyu menekşe rengine iyice boyanmaya kadar bekletildi. En uygun boyama süresini belirlemek için kök uçları Feulgen içerisinde 30-45-60 dakika süre ile bekletildi. Her üç bekletilme süresinde de istenilen derecede boyandığı görüldü. Bundan sonraki çalışmalarda 30 dakikalık süre kullanıldı. Feulgenden çıkarılan kökler saf su içerisine konuldu. Gagnieu (1949), Darlington ve La Cour (1964) tarafından önerildiği gibi, hidrolizden sonra iki defa yıkanan kök uçlarını Feulgende 1 saat bekletilmiştir. Feulgenin hazırlanmasında Elçi (1978), Darlington ve La Cour'dan (1976) faydalanılmıştır.

Preparatların hazırlanması ve fotoğraf çekimi

Preparat yapımında Elçi (1965;1982) yararlanılmıştır. Önce temiz bir lamin ortasına yakın bir yere %45'lik asetikasitten bir damla damlatıldı. En iyi boyanmış kök ucu saf sudan çıkartılıp lamin ortasına konuldu. Sonra uç kısmından 1 mm kadar kesildi. Diğer kısım atıldı. Kesilen kısım daha önce lam üzerine damlatılan %45'lik asetik asitten alınan küçük bir damla içerisinde bir bisturi ile çok küçük parçalanıp, sıvının tamamı içerisine iyice dağıtıldı. Üzeri lamelle düzgün bir şekilde kapatıldı. Temiz bir kurutma kağıdı ikiye katlandı. Henüz ezme işlemine geçmeden önce hazırlanmış preparat, katlanmış olan kurutma kağıdının arasına yerleştirildi. Kurutma kağıdının üzerinden tutularak kurutma kağıdı ve lamel oynatılmadan diğer elle lamelin üzerine kurşun kalemin düz tarafı vurularak ezme işlemi yapıldı. Birkaç preparat yapıldıktan sonra mikroskopta incelenerek vurma şiddeti tespit edildi. Elçi (1966) tarafından preparatların hazırlan-

masında ve kromozomların morfolojilerinin tespitinde lamele vurma işleminin önemi belirtilerek, bilhassa fiğ ve bezelye gibi kromozomları çok küçük ve birbirinden ayrılması çok zor olan bitkilerde daha dikkatli çalışmak gerektiği vurgulanmaktadır.

Kurutma kâğıdından çıkarılan preparat hafifçe ateş üzerinde ısıtıldı. Hava kabarcıklarını gidermek için lamelin kenarından çok az %45'lik asetik asit ilave edildi. Daha sonra preparat hızlı bir şekilde tarandı. Eğer uygun hücre var ise, lamelin kenarı saydam bir tırnak cilası ile çevrilerek, lama yapıştırıldı. Böylece yarı devamlı preparat yapıldı. Tırnak cilasını sürmeden önce hava kabarcığı var ise giderildi. Yarı devamlı preparatlardan düzgün olan hücrelerin fotoğrafları mikroskoba monte edilen fotoğraf sistemiyle çekildi. Ayrıca, fotoğrafları çekilmiş kromozomların gerçek ölçülerini belirlemede kullanılmak üzere objektif mikrometrenin de fotoğrafı çekildi. Düzgün olan hücrelerin fotoğraflarından gerekli ölçümler yapılarak bitkilerin karyotiplerinin belirlenmesinde kullanıldı. (Elçi 1982; Aslım 1994).

Kromozom ölçümleri

Bezelye hatlarının kromozom boyu, kol indeksi, oransal boyları hesaplanıp, kromozom tipleri ve satelitlerin hangi kromozomlarda bulunduğu belirlenmiştir. Bu veriler aşağıda belirtildiği şekilde tespit edilmiştir.

Bezelyelerde kromozom ölçümleri için kök ucu somatik hücrelerinde mitoz bölünmenin metafazdaki kromozomlarından faydalanıldı. Çünkü mitoz bölünmenin metafaz safhası kromozomların boyu açısından en stabil safhadır (Hartung 1946; Elçi 1994; Das ve Kalloo 1993).

Bu safhada çekilmiş hücre fotoğraflarından, her bitkide kromozom morfolojisini incelemeye elverişli olan en iyi 5 adet hücre üzerinde çalışıldı (Heneen 1962 ; Elçi 1965). Önce kromozom sayıları belirlendi. Sonra kromozomlara rastgele birer numara verildi, 0.65 mm aralıkla bölünmüş olan cetvelle ölçümler yapıldı. Objektif mikrometrenin fotoğrafı üzerine cetvel konularak mikron cinsinden gerçek değerler tesbit edildi. Gottschalk (1968) gibi, özellikle sentromerlerin yerleri tam belli olmayan kromozomlarda anafaz başlangıcında ölçümler yapılarak metafazdaki ölçümlerle karşılaştırılıp, sentromerin yerinden emin olundu. Kısa kol ve uzun kol boyu ölçüldü. Varsa satelit boyu ilave edilerek kromozom boyu belirlendi. Satelit ise, metafaz başlangıcında daha belirgin bir şekilde gözlemlendi. Boyları ölçülen kromozomlar büyükten küçüğe doğru sıralanarak homolog özellikler bakımından eşleştirildi (Sharp 1934). Heneen'e (1962) göre, satelitleri bulunan kromozomların kol boyları ölçülürken satelit ile kromozom kolu arasındaki mesafe toplam kol boyuna katılmamıştır. Çünkü, bu araştırmacılar satelit ile kromozom kolu arasındaki mesafenin preparatın yapılış tekniğine göre farklılıklar gösterebildiğini, bundan başka aynı teknik ile yapılan preparatlarda da lamel üzerine çeşitli

şiddetlerde basınç yapıldığı için satelitin, kromozom kolundan bazen çok uzağa da gidebildiğini ve kromozom kol boyuna bu çeşitli mesafeleri katarak hesap yapmanın hatalı olacağını bildiriyorlar. Elçi'ye (1965) göre her ne kadar, kök ucu numuneleri alınırken, preparatlar yapılırken ve diğer bütün işlemlerde her preparata mümkün olduğu kadar aynı işlemler uygulansa da kromozom ölçümlerinde hataları tamamen ortadan kaldırmak mümkün değildir. Bu bakımdan kromozomların boyu hücre içindeki diğer kromozomların toplam boylarına oranlanırsa, bu oran hücreden hücreye oldukça az bir değişim gösterir demektir. Elçi (1965) böylece bir hücrenin kromozomlarının, diğer bir hücrenin kromozomları ile daha güvenilir bir şekilde karşılaştırılabileceği belirtmiştir. Buna göre, kromozomun boyu o kromozomun bulunduğu hücrenin bütün kromozomlarının toplam boyuna bölünüp her ploid düzeyi için 25 katsayısı ile çarpıldı. Böylece oransal boyları hesap ettikten sonra kromozomun kısa kol boyunu uzun kol boyuna bölerek kol indeksi hesaplandı (Heneen 1962). Sentromerlerin yerlerine göre de kromozomların tipleri belirlendi (Levan ve ark. 1965).

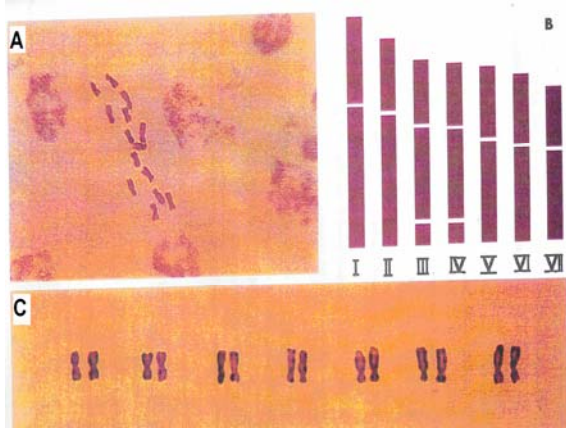
Sonra, eş kromozomlar küçükten büyüğe doğru dizilerek karyogramları oluşturuldu. Kromozomlardan en uzununu başta olmak üzere diğer kromozomlar boylarına göre sıralanarak idiogramları çizildi.

ARAŞTIRMA SONUÇLARI

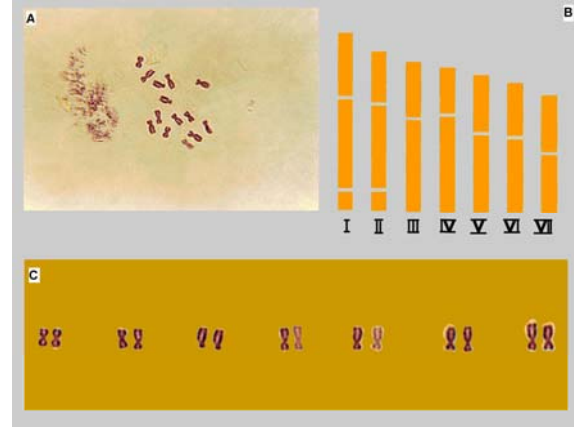
Karyotip analizi yapılan bezelye formlarına ait 6 adet hattın (*Pisum sativum* L.) kromozom boyu, kol indeksi, oransal boyu, kromozom sayıları ve satelit durumuna ilişkin veriler alınmıştır. Bu veriler tablo, fotoğraf, idiogram ve karyogram şeklinde ortaya konulmuştur. Bezelye hatlarının hepsinde kromozom sayısı $2n=14$ olarak tespit edilmiştir.

B₁ hattı

Bu hatta kromozomların boyu, kol indeksleri, oransal boy ortalamaları ile minimum ve maksimum değerleri Tablo 1'de görüntüleri de Şekil 1'de verilmiştir. Bu bezelyenin kromozomlarının boy ortalamaları 3.35 µm ile 5.00 µm, kol indeksi ortalamaları 0.53-0.75 ve oransal boy ortalamaları 5.92-8.84 arasında bulunmuştur. B₁ hattında 3 tanesi submetasentrik ve 4 tanesinde metasentrik durumda sentromere sahip kromozom tespit edilmiştir. Submetasentrik durumda sentromeri olan kromozomlarda kol indeksleri 0.53-0.56 arasındadır. Metasentrik durumda sentromere sahip kromozomların kol indeksleri 0.64-0.75 arasındadır.



Şekil 1. Yem bezelyesi hattı B₁'e ait; A: Somatik metafaz, B: İdiogram, C: Karyogram.



Şekil 2. Yem bezelyesi hattı B₆'ya ait; A: Somatik metafaz, B: İdiogram, C: Karyogram.

Tablo 1. Yem bezelyesi hattı B₁'e ait özellikler

Kromozom Numarası	Kromozon Boyu (µm)			Kol İndeksi		
	Ort.	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.
I	5.00	4.00	6.00	0.64	0.50	0.80
II	4.45	3.50	5.50	0.56	0.38	0.75
III*	4.05	3.50	5.00	0.53	0.40	0.75
IV*	3.95	3.50	4.50	0.53	0.29	0.75
V	3.85	3.50	4.50	0.69	0.33	1.00
VI	3.65	3.00	4.00	0.75	0.33	1.00
VII	3.35	2.50	4.00	0.68	0.50	1.00

Kromozom Numarası	Oransal Boy			Kromozom Tipi
	Ort.	Min.	Max.	
I	8.84	7.84	9.80	Metasentrik
II	7.88	7.20	8.60	Submetasentrik
III*	7.16	6.86	7.82	Submetasentrik
IV*	6.98	6.26	7.22	Submetasentrik
V	6.82	6.26	7.22	Metasentrik
VI	6.46	6.18	6.86	Metasentrik
VII	5.92	5.14	6.40	Metasentrik

*Satelitli kromozom

B₆ hattı

B₆ hattının kromozomlarının boy, kol indeksleri oransal boy ve ortalamaları ile minimum ve maksimum değerleri Tablo 2'de görüntüleri de Şekil 2'de verilmiştir. B₆ bitkisinin kromozomlarının boy ortalamaları 3.05-4.63 µm, kol indeksi ortalamaları 0.48-0.98 ve oransal boy ortalamaları 5.78-8.78 arasında tesbit edilmiştir. B₆ hattında 3 tane submetasentrik 4 tane metasentrik durumda sentromere sahip kromozomlar görülmüştür. Submetasentrik durumda sentromeri olan kromozomların kol indeksleri 0.48-0.54 arasında bulunmuştur. Metasentrik durumda sentromeri olan kromozomların kol indeksleri 0.60-0.98 arasındadır.

Tablo 2. Yem bezelyesi hattı B₆'ya ait özellikler

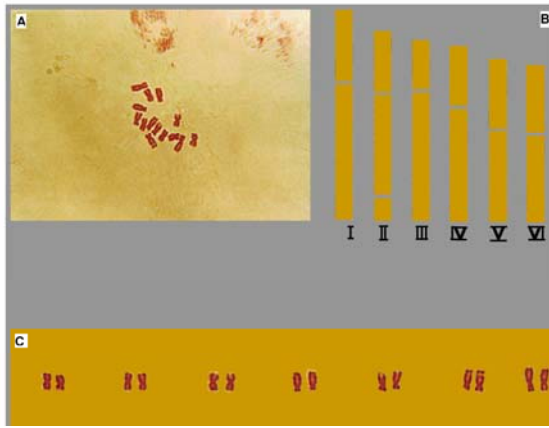
Kromozom Numarası	Kromozon Boyu (µm)			Kol İndeksi		
	Ort.	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.
I*	4.63	4.00	5.50	0.54	0.45	0.66
II*	4.15	4.00	4.50	0.49	0.33	0.80
III	3.90	3.50	4.00	0.60	0.36	0.75
IV	3.75	3.50	4.00	0.48	0.33	0.75
V	3.55	3.25	4.00	0.72	0.44	1.00
VI	3.35	3.00	3.75	0.70	0.40	1.00
VII	3.05	3.00	3.50	0.98	0.75	1.00

Kromozom Numarası	Oransal Boy			Kromozom Tipi
	Ort.	Min.	Max.	
I	8.78	7.84	10.00	Submetasentrik
II	7.88	7.84	8.18	Submetasentrik
III*	7.40	6.90	7.88	Metasentrik
IV*	7.12	6.86	7.38	Submetasentrik
V	6.72	6.36	7.10	Metasentrik
VI	6.36	5.90	6.86	Metasentrik
VII	5.78	5.44	6.22	Metasentrik

*Satelitli kromozom

B₈ hattı

B₈ hattının kromozomlarının boy, kol indeksleri, oransal boy ve ortalamaları ile minimum ve maksimum değerleri Tablo 3'de görüntüleri de Şekil 3'de verilmiştir. B₈ bitkisinin kromozomlarının boy ortalamaları 3.28-4.70 µm arasındadır. Kol indeksi ortalamaları 0.39-0.89'dur. Oransal boy ortalamaları 5.88-8.44 arasında bulunmuştur. B₈ bitkisinde 4 tane submetasentrik, 3 tane metasentrik durumda sentromere sahip kromozomlar tespit edilmiştir. Submetasentrik sentromeri olan kromozomlarda kol indeksleri 0.39-0.54 arasındadır. Metasentrik sentromeri olan kromozomlarda kol indeksleri 0.76-0.89 arasındadır.



Şekil 3. Yem bezelyesi hattı B₈'e ait; A: Somatik metafaz, B: İdiogram, C: Karyogram.

Tablo 3. Yemeklik bezelye hattı B₈'e ait özellikler

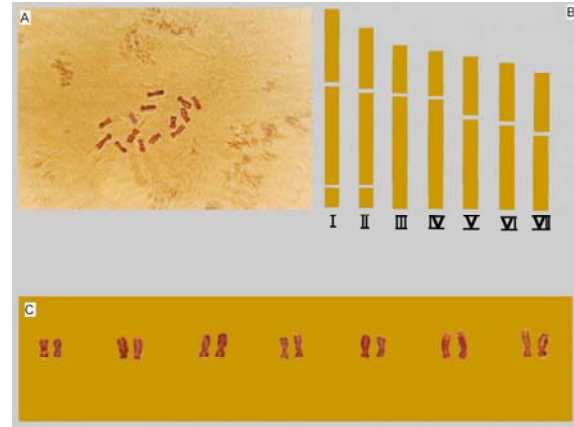
Kromozom Numarası	Kromozon Boyu (µm)			Kol İndeksi		
	Ort.	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.
I	4.70	4.25	5.25	0.54	0.50	0.67
II	4.35	4.00	4.50	0.49	0.33	0.60
III*	4.15	4.00	4.50	0.39	0.29	0.60
IV*	4.03	4.00	4.25	0.54	0.33	1.00
V	3.75	3.50	4.00	0.76	0.50	1.00
VI	3.60	3.50	4.00	0.78	0.66	1.00
VII	3.28	3.00	3.50	0.89	0.50	1.00

Kromozom Numarası	Oransal Boy			Kromozom Tipi
	Ort.	Min.	Max.	
I	8.44	8.00	9.18	Submetasentrik
II	7.80	7.18	8.26	Submetasentrik
III*	7.46	7.10	8.00	Submetasentrik
IV*	7.24	6.78	7.54	Submetasentrik
V	6.74	6.42	7.18	Metasentrik
VI	6.46	5.94	6.78	Metasentrik
VII	5.88	5.50	6.28	Metasentrik

*Satelitli kromozom

B₁₁ hattı

B₁₁ hattının kromozomlarının ortalama boyu, kol indeksleri, oransal boylarına ait değerler ile minimum ve maksimum değerleri Tablo 4'te görüntüleri de Şekil 4'te verilmiştir. B₁₁ bitkisinin kromozomlarının boy ortalamaları 3.48-4.93 µm arasındadır. Kol indeksi ortalamaları 0.42-0.79'dur. Oransal boy ortalamaları 6.08-8.60 arasında tespit edilmiştir. 4 adet metasentrik, 3 adet submetasentrik sentromeri bulunmaktadır. Metasentrik sentromeri olan kromozomlarda kol indeksleri 0.62-0.79 arasındadır. Submetasentrik durumlu sentromere sahip kromozomlarda kol indeksleri 0.42-0.55 arasındadır.



Şekil 4. Yemeklik bezelye hattı B₁₁'e ait; A: Somatik metafaz, B: İdiogram, C: Karyogram.

Tablo 4. Yemeklik bezelye hattı B₁₁'e ait özellikler

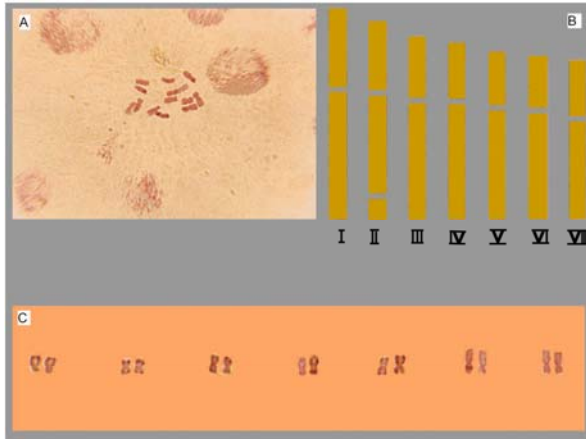
Kromozom Numarası	Kromozon Boyu (µm)			Kol İndeksi		
	Ort.	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.
I	4.93	4.25	5.75	0.62	0.47	0.83
II	4.45	3.75	5.00	0.55	0.43	0.80
III*	4.15	3.50	4.25	0.44	0.29	0.56
IV*	4.00	3.50	4.50	0.42	0.33	0.60
V	3.90	3.50	4.50	0.65	0.33	1.00
VI	3.73	3.50	4.00	0.71	0.25	1.00
VII	3.48	3.25	3.50	0.79	0.75	1.00

Kromozom Numarası	Oransal Boy			Kromozom Tipi
	Ort.	Min.	Max.	
I	8.60	7.72	9.88	Metasentrik
II	7.78	7.30	8.16	Submetasentrik
III*	7.24	6.86	8.04	Submetasentrik
IV*	6.98	6.86	7.22	Submetasentrik
V	6.82	6.42	7.22	Metasentrik
VI	6.52	6.02	6.86	Metasentrik
VII	6.08	5.62	6.86	Metasentrik

*Satelitli kromozom

B₁₂ hattı

B₁₂ hattına ait olan kromozomların boy, kol indeksleri ve oransal boylarına ait ortalama, minimum ve maksimum değerler Tablo 5'te görüntüleri de Şekil 5'te verilmiştir. Bu yemeklik bezelyesinin kromozomlarının boylarının ortalaması 3.48-4.70 µm arasındadır. Kol indeksi ortalamaları 0.53-0.84, oransal boy ortalamaları 6.26-8.50 arasındadır. 3 adet submetasentrik, 4 adet metasentrik durumda sentromeri tespit edilmiştir. Submetasentrik durumda sentromeri olan kromozomların kol indeksleri 0.53-0.58 arasında değişmektedir. Metasentrik durumda sentromeri olan kromozomların kol indeksleri 0.63-0.84 arasındadır.



Şekil 5. Yem bezelyesi hattı B₁₂'ye ait; A: Somatik metafaz, B: İdiogram, C: Karyogram.

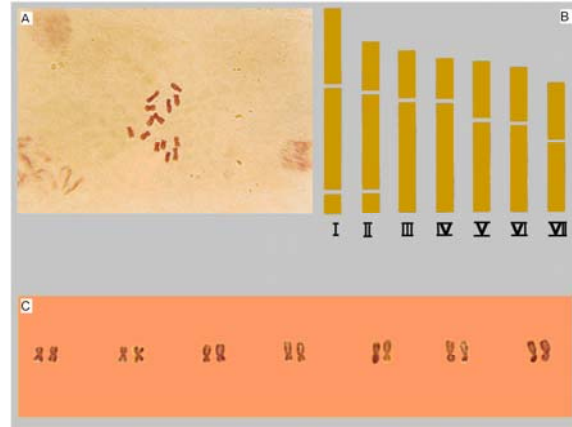
Tablo 5. Yem bezelyesi hattı B₁₂'ye ait özellikler

Kromozom Numarası	Kromozon Boyu (µm)			Kol İndeksi		
	Ort.	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.
I	4.70	4.02	4.59	0.63	0.54	0.73
II	4.30	3.67	4.04	0.58	0.33	0.88
III*	4.03	3.48	3.82	0.53	0.33	0.60
IV*	3.90	3.21	3.67	0.84	0.50	1.00
V	3.70	3.21	3.59	0.80	0.50	1.00
VI	3.60	3.19	3.36	0.70	0.50	1.00
VII	3.48	2.91	3.26	0.58	0.33	0.86
Kromozom Numarası	Kromozom Boyu (µm)			Kromozom Tipi		
	Ort.	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.
I	8.50	8.04	9.18	Metasentrik		
II	7.76	7.34	8.08	Submetasentrik		
III*	7.28	6.96	7.64	Submetasentrik		
IV*	7.04	6.42	7.34	Metasentrik		
V	6.68	6.38	7.18	Metasentrik		
VI	6.50	6.38	6.52	Metasentrik		
VII	6.26	5.82	6.52	Submetasentrik		

*Satelitli kromozom

B₁₃ hattı

B₁₃ hattına ait olan kromozomların boy, kol indeksleri oransal boylarına ait ortalama, minimum ve maksimum değerleri Tablo 6'da görüntüleride Şekil 6'da verilmiştir. Buna göre yemlik bezelyenin kromozomlarının boylarının ortalaması 3.05-4.85µm arasındadır. Kol indeksi ortalamaları 0.38-0.84 arasındadır. Oransal boy ortalamaları 5.72-9.08 arasındadır. 3 adet submetasentrik, 4 adet metasentrik durumda sentromeri vardır. Metasentrik durumda sentromeri olan kromozomların kol indeksleri 0.62-0.84 arasındadır. Submetasentrik durumda sentromeri olan kromozomların kol indeksleri ortalamaları 0,38-0,44 arasındadır.



Şekil 6. Yemeklik Bezelye hattı B₁₃'e ait; A: Somatik metafaz, B: İdiogram, C: Karyogram.

Tablo 6. Yemeklik bezelye B₁₃ hattına ait özellikler.

Kromozom Numarası	Kromozon Boyu (µm)			Kol İndeksi		
	Ort.	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.
I	4.85	4.25	5.50	0.62	0.42	0.83
II	4.15	3.75	4.50	0.42	0.25	0.67
III*	3.90	3.50	4.00	0.44	0.25	0.78
IV*	3.70	3.50	4.00	0.38	0.33	0.74
V	3.60	3.50	4.00	0.63	0.40	1.00
VI	3.45	3.25	3.50	0.63	0.40	0.86
VII	3.05	2.50	3.50	0.84	0.44	1.00
Kromozom Numarası	Oransal Boy			Kromozom Tipi		
	Ort.	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.
I	9.08	8.46	10.00	Metasentrik		
II	7.78	7.38	8.18	Submetasentrik		
III*	7.30	6.90	7.54	Submetasentrik		
IV*	6.94	6.36	7.46	Submetasentrik		
V	6.74	6.36	6.96	Metasentrik		
VI	6.46	6.04	6.96	Metasentrik		
VII	5.72	4.98	6.14	Metasentrik		

*Satelitli kromozom

TARTIŞMA

Bu araştırmada üç yemlik ve üç yemeklik bezelye hattı kullanılmıştır. Bu hatların kromozom sayıları 2n=14 olarak bulunmuştur. Aynı konu üzerinde daha önce çalışan araştırmacılar tarafından da (Levitskii 1934; Blixt 1959; Errico ve ark. 1996) kromozom sayıları 2n=14 olarak tespit edilmiştir.

Araştırmada kullanılan 6 bezelye hattından; B₁ yemlik bezelyenin kromozom boyu ortalaması 3.35 µm-5.00 µm arasında, B₆ yemlik bezelyenin kromozom boyu ortalaması 3.05- 4.63 µm arasında, B₈ yemeklik bezelyenin kromozom boyu ortalaması 3.28-4.70 µm arasında, B₁₁ yemeklik bezelyenin kromozom boyu ortalaması 3.48-4.93 µm arasında, B₁₂ yemlik

bezelyenin kromozom boyu ortalaması 3.48-4.70 µm arasında, B₁₃ yemeklik bezelyenin kromozom boyu ortalaması ise 3.05-4.85 µm arasında tespit edilmiştir. Elçi (1966)'nin yemlik bezelyenin karyotipi üzerinde yaptığı çalışmada ortalama kromozom boyu 4.69-6.26 µm olarak belirtilmiştir. Özkaynak ve Tokluoğlu (1981)'nin aynı konu üzerinde yaptığı çalışmada ise yemlik bezelyenin 3 formu kullanılmış ve bunlarda kromozom ortalama boyları form 1'de 3.86-5.92 µm, form 2'de 4.28-5.61 µm, form 3'de 4.12-5.74 µm arasında bulunduğu belirtilmiştir.

Bu çalışma sonunda elde edilen kromozom boyu ortalamaları ile daha önce yapılan çalışmalarda ortaya çıkan kromozom boyu ortalamaları arasında fazla farklılık olmadığı gözlenmiştir. Fakat Elçi (1966), Özkaynak ve Tokluoğlu (1981) tarafından yapılan çalışmalarda satelite rastlanılmamıştır. Bu çalışmada ise, bütün hatlarda satelit tesbit edilmiştir. Bu satelitler, B₁'de III., IV. kromozomda, B₆'da I., II. kromozomda, B₈'de II. kromozomda, B₁₁'de I., II. kromozomda, B₁₂'de II. Kromozomda, B₁₃'de de I., II. kromozomda olmak üzere kromozomların uzun koluna bağlı olarak bulunmuştur. Blixt ve Gottschalk (1975), Simpson ve ark. (1990), Weeden ve ark. (1998), Grant ve Owens (2001)'in aynı konu üzerindeki araştırmalarında, II. ve III. kromozomların uzun kollarında satelit görüldüğü belirtilmiştir.

Bu çalışmada B₁ yemlik bezelye hattının oransal boyları 5.92-8.84, B₆ yemeklik bezelye hattının oransal boyları 5.78-8.78, B₈ yemeklik bezelye hattının oransal boyları 5.88-8.44, B₁₁ yemeklik bezelye hattının oransal boyları 6.08-8.60, B₁₂ yemeklik bezelye hattının oransal boyları 6.26-8.50, B₁₃ yemeklik bezelye hattının oransal boyları 5.72-9.08 olduğu hesaplanmıştır. Benzer araştırmada Conicella ve Errico (1990)'da *Pisum sativum* L. 110'da 5.86-8.45, *Pisum sativum* ect. *abyssinicum* L. 1'de 5.94-8.44, *Pisum sativum* ect. *abyssinicum* L.2 5.94-8.24 değerleri belirtilmiştir. Yine Errico ve ark. (1991) *Pisum sativum* L'da 5.88-8.45 arasında, *Pisum pulvum* L.'da 5.87-9.39 arasında oransal boy tespit etmişlerdir.

Araştırmada ayrıca, sentromerlerin yerinin tespiti açısından yapılan araştırmada bitkilerin kol indekslerine göre kromozom tipleri belirlenmiştir. buna göre; B₁ hattında I., V., VI. ve VII. kromozomlar metasentrik, II., III. ve IV. kromozomlar submetasentrik, B₆ hattında I., II. ve IV. Kromozomlar submetasentrik, III., V., VI ve VII. kromozomlar metasentriktir. B₈ hattında I., II., III ve IV. kromozomlar submetasentrik, V., VI. ve VII. kromozomlar metasentrik, B₁₁ hattında I., V., VI. ve VII. kromozomlar metasentrik, II., III. ve IV. kromozomlar submetasentrik, B₁₂ hattında I., IV., V. ve VI. kromozomlar metasentrik, II., III. ve VII. kromozomlar submetasentriktir. B₁₃ hattında I., V., VI. ve VII. kromozomlar metasentrik, II., III. ve IV. kromozomlar submetasentrik olarak tespit edilmiştir. Buna göre Kalloo ve Bergh (1993)'nin aynı konudaki tespitleri şöyledir. I ve II. kromozomlar

submetasentrik ve V. ve VII. kromozomlar metasentriktir. Bu araştırmaya bakacak olursak B₆ ve B₈ hattında aynı I. ve II. kromozomlar submetasentrik, V. ve VII. kromozomlar metasentriktir. Yine B₁₂ hattı hariç tutulursa diğer 5 hatta da V. ve VII. kromozomlar metasentrik olarak tespit edilmiştir. Elçi'nin (1966) bu konuda yaptığı bir çalışmada ise yem bezelyesi (*Pisum sativum* L.)'nde I., II., III., IV. ve VII. kromozomlar submetasentrik, V. ve VI. kromozomlar metasentriktir.

Bu araştırmada elde edilen verilerle, diğer araştırmacıların verileri karşılaştırıldığında bazı benzerlikler ve farklılıklar görülmektedir. Bunun en önemli nedeninin, araştırmada kullanılan bezelyelerin genotiplerinin farklılığından kaynaklandığı söylenebilir. Bunun yanında, kök uçlarını elde etmede kullanılan yöntem, preparat yapma tekniğinin uygulanış biçimi, yada kök uçlarını elde etme şekli gibi farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yemlik ve yemeklik bezelye hatlarının karyotip analizinde kök ucu somatik hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasındaki kromozomlardan faydalanılarak kromozom sayıları ve morfolojilerinin tespitine çalışılmıştır. Daha önce kullanılan metotlardan farklı olarak bu çalışmada içlerine belirli miktarda perlit konulmuş kavanozlarda bezelye tohumlarının çimlenmesi sağlanmıştır. Bu tip çalışmalarda kök ucu temininde uygulanan metotlardan farklı olarak kullanılan bu yöntem ile yeterli miktarda ve sayıda kök ucu elde edilmiştir.

Karyotip çalışmalarında özellikle boyama yönteminin belirlenmesi için ön çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu araştırma için yapılan ön çalışmada boyamada kullanılan asetokarminin kromozomları aşırı büzmesinden dolayı sentromer ve satelitin yeri belirlenememiştir. Daha sonra Feulgen ile yapılan boyamada başarılı sonuç elde edilmiştir. Yine de denilebilir ki kromozomların morfolojilerinin tespitindeki çalışmalarda bilhassa küçük kromozomlarda metafazda sentromerin yerinin tespiti güç olmaktadır. Bu nedenle sentromerin yeri belli olmayan kromozomlarda anafaz başlangıcının takip edilmesi, metafazdaki boylarıyla karşılaştırılıp sentromerin yerinden emin olunması gerekebilir. Bu araştırmada, satelitler daha net metafaz başlangıcında görülmüştür.

Boyama işleminden sonra diğer önemli bir konu preparatların hazırlanmasıdır. Başta dikkat edilmesi gereken husus boyanan köklerin yalnız en koyu kırmızı-menekşe olan 1-2 mm'lik uç kısmının kullanılmasıdır. Preparat yapımında kök ucunun kurutulmadan dikkatli bir şekilde keskin bir bistüri ile çok küçük parçalara bölünmesi gereklidir (Elçi 1966). Benzeri çalışmalarda önemli olan hücrelerin iyi dağılması ve kromozomların bir düzlem üzerine gelmesi gerekli olduğundan, preparata vurma işlemi çok daha dikkatli yapılmalıdır. Vuruş şiddeti her bitki için ayrı olabilir.

Bu araştırmada üzerinde çalışılan materyaller oldukça küçük kromozomlara sahip olduklarından kuvvetli kurşun kalem darbeleri ile kromozomları bir düzlem üzerine getirmek mümkün olmuştur. İşte bu çalışmalarda vuruşun şiddetini birkaç preparat yapmak ve preparatları mikroskopta incelemek suretiyle her materyale göre tespit etmek yerinde olacaktır. Çünkü lamele vurulurken çok şiddetli darbelerin hücreleri tamamen parçalaması ve kromozomların hepsinin dağılması ihtimali vardır.

Böylece dikkatli bir şekilde hazırlanan preparatlardan elde edilen en düzgün hücrelerin fotoğraflarından kromozom sayımı ve kromozom morfolojilerinin tespiti yapılmıştır. Tespit sonunda bezelyelerin standart karyotip çalışmalarında elde edilen $2n=14$ kromozoma sahip oldukları görülmüştür. Hatların kromozom boy ortalamaları (μm); 3.35-5.00 (B_1), 3.05-4.63 (B_6), 3.28-4.70 (B_8), 3.48-4.93 (B_{11}), 3.48-4.70 (B_{12}), 3.05-4.85 (B_{13}) arasında bulunmuştur. Kol indeksi ortalamaları 0.53-0.75 (B_1), 0.48-0.98 (B_6), 0.39-0.89 (B_8), 0.42-0.79 (B_{11}), 0.53-0.84 (B_{12}), 0.38-0.84 (B_{13}) arasındadır. Oransal boy ortalamaları 5.92-8.84 (B_1), 5.78-8.78 (B_6), 5.88-8.44 (B_8), 6.08-8.60 (B_{11}), 6.26-8.50 (B_{12}), 5.72-9.08 (B_{13}) arasındadır. Böylece sentromerlerinin yerleri bilinen bitkilerin kromozom tipleri de belirlendi. B_1 'de I., V., VI. ve VII. kromozom metasentrik II., III. ve IV. kromozomlar submetasentrik B_6 'da I., II ve IV. kromozomlar submetasentrik III., V., VI. ve VII. kromozomlar metasentriktir. B_8 'de I., II., III. ve IV. kromozomlar submetasentrik V., VI. ve VII. kromozomlar metaentriktir. B_{11} 'de I., V., VI. ve VII. kromozomlar metasentrik II., III. ve IV. kromozomlar submetasentrik, B_{12} 'de I., IV., V. ve VII. kromozomlar metasentrik II., III. ve VII. kromozomlar submetasentrik, B_{13} 'de I., V., VI. ve VII. kromozomlar metasentrik II., III ve IV. kromozomlar submetasentrik bulunmuştur.

Karyotip analizi ile tür tanımlaması yapılabildiği gibi, melezler ile ortaya çıkan farklılıklar ve ploid seviyesindeki değişiklikler de izlenebilmektedir (Gupta ve Tsuchiya 1991). Materyal olarak kullanılan yemlik ve yemeklik bezelye hatlarında yapılan karyotip analizi sonucunda ortaya çıkan benzerlik ve ayrılıkların, hatların melezlenmelerinde ve ileriki döllerin kromozom özelliklerini belirlemede çok önemli faydalar sağlayacağı umulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Anonim, 1989. Biology. 1P-Plant Sciences And Microbiology A Laboratory Manual. PP. 67. University of Nottingham.
- Akçin, A.,1988. Yemeklik Dane Baklagiller. S.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları. Konya.
- Aslım, M. B., 1994. Diploid Çok Yıllık Çavdardan (*Secale montanum* Guus.) Tetraploid Çok Yıllık Çavdar Elde Edilmesi İmkanları Ve Bu Bitkilerin Mitoz, Mayoz Kromozomları İle Bazı Morfolojik Karakterleri Mukayesesi. Tübitak Bot. Der. Cilt 18 No: 3 P.P: 143-152.
- Blixt, S.,1959. Cytology of *Pisum*. 3. Inventigation of Five Interchange Lines And Coordination of Linkage Groups With Chromosomes. Agric. Hortic. Geret. 17-47.
- Blixt, S., Gottschalk, W., 1975. Mutation in the Leguminosae. Agric. Hortc. Genet. 33, 33-85.
- Cauderon, Y., 1958. Etude Cytogénétique Des Agropyron Français Et De Levr's Hybrides Aves Les Ble's, Amales De L'institut National De La Recherche Agronomique, Série B, Annales De L'améliordion Des Plantes, Génétique Selection-Eccologie Techniques Culturelles. 8'e Année, 4.
- Conicella, C. ve Errico, A., 1990. Karyotipe Variations In *Pisum sativum* Ect. *Abyssinicum*. Caryologia 43:87-97.
- Darlington, C. D. ve La Cour L. F., 1976. The Handling of Choromosomes. Sixth edition. George Allen and Unwin Ltd. S.248. London.
- Das, K. ve Kalloo, G., 1993. A Tecnique of Squashing Stipule Tips On Pea, Curr. Sci. 494.
- Elçi, Ş., 1965. Memleketimizin Önemli Fiğ Türlerinde Kromozom Sayılarının Tesbiti. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları no:254. Ankara.
- Elçi, Ş., 1966. Yem Bezelyesinde (*Pisum Sativum* L.) Kromozom Sayısının Tesbiti Ve Karyotip Analizi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 259. Çalışmalar: 162. Ankara.
- Elçi, Ş., 1978. Kromozomların Gözlemleri ve Öğretimde Uygulamalı Ödevler (A. Gognieu ve G. Loise'nden Fransızca'dan Tercüme). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yem Bitkileri Çayır ve Mera Kürsüsü. 27-28 Ankara.
- Elçi, Ş., 1982. Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. Fırat Üniversitesi. Fen Edebiyat Fakültesi Yay. Biy. 3. Elazığ.
- Elçi, Ş., 1994. Sitogenetikte Araştırma Yöntemleri ve Gözlemler. 100. Yıl Üniversitesi Yayınları. No: 18 Fen Edebiyat Fak. Yayın No: 16. Van.
- Errico, A., Conicella, C. ve Venora, G., 1991. Koryotype Studies On *Pisum fulvum* And *Pisum sativum*, Using A Chromosome İmage An Alysis Sistem, Ed, Genome 34.105-108.
- Errico, A., Conicella, C. ve Venora, G., 1996 Cytological And Morphological Characterization Of *Pisum sativum* And *Pisum fulvum* Tetraploids. Plant Breeding 106,141-148. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin Ve Hamburg 155, No: 179-9541
- Fuchs, J., Kühne, M., Schubert, I.,1998. Assignment of Linkage Groups to Pea Chromosomes After Karyotyping and Gene Mapping by Fluorescent in Situ Hybridization. Chromosoma 107, 272-276.

- Gagnieu, A., 1949. L'observation des Chromosomes et Exercices Pratiques d'enseignement. Paris, Société d'éditions d'enseignement Supérieur.
- Gottschalk, W., 1968. Investigation On The Genetic Control Of Meiosis, Nucleus (Calcutta) 11,346.
- Grant, W.F., Owens, E.T., 2001. Chromosome Abberation Assays in *Pisum* for the Study of Environmental Mutagens. Mutation Research 488, 93-118.
- Gupta, PK., Tsuchiya, T., 1991. Chromosome Manipulations in Higher Plants: Chromosome Engineering in Plants. Genetics, Breeding, Evolution. Part A. Elsevier Publishers B.V., Netherlands, S: 1-14.
- Hartung, M. E., 1946 Chromosome Numbers İn *Pea Agropyron* Ve *Elymus*. Amer. Jour. Bot. 33,516-531.
- Heneen, W. K., 1962. Chromosome Morphology İn İnbreediye Hereditas, 48:182-200
- Kalloo, G., Bergh, B.D., 1993. Pea (*P. sativum*) Genetic Improvement of Vegetable Crops. Ed. Kalloo, G. and Bergh, B., O. 409-425. Mid Country Press. London.
- Lang, W. ve Maurer, W., 1965. Zurverwand Barkeid Van Feulgen, Gefarbtten Schnitten Für Quantitative Autoradiographie Mit Markiertem Thynidin. Expeimental Cell Research 39: 1-9.
- Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A. A. 1965. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. Hereditas 52, 201-220.
- Levitskii, G. A., 1934. Chrosome morphology. Trudy prikl. Bot. Genet. Sel. 27,19,
- Özkaynak, İ. ve Tokluoğlu, M., 1981. Yem Bezelyesi (*Pisum sativum* L.) Yerel Çeşitlerinden Seleksiyon İle Islah Edilen Formların Kromozom Sayıları Ve Morfolojileri Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 754, Bilimsel Araştırma Ve İncelemeler: 442. Ankara.
- Sharp, L.W., 1934. Intraduction toctology. Mc. Graw-Hill Book Company S. 657. London.
- Simpson, P.R., Newman, M.A., Davies, D.R., Ellis, T.H.N., Matthews, P.M., Lee, D., 1990. Identification of Translocation in Pea by in Situ Hybridization with Chromosome-Specific DNA Probes. Genome 33,745-749.
- Tarman, Ö., 1954. Baklagillerden Yem Bitkileri Yetiştirilmesi. Ziraat Vekaleti Neşriyatı. İstanbul Matbaası. Ankara.
- Weeden, N.F., Ellis, T.H.N., Timmerman-Vaughan, G.M., Swiecicki, W.K. Rozov, S.M. Berdnikov, V.A., 1998. A Consensus Linkage Map for *P. sativum*. Pisum Genet. 30,1-4.

