



**BAZI KORUNGA (*Onobrychis viciifolia* SCOP.)
ÇEŞİT VE POPULASYONLARINDA
MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ
KULLANILARAK GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN
BELİRLENMESİ**

SELMAN ÖZKAN

Yüksek Lisans Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. B. Banu BİLGİN

2017

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI KORUNGA (*Onobrychis viciifolia* SCOP.) ÇEŞİT VE POPULASYONLARINDA
MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ KULLANILARAK GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN
BELİRLENMESİ**

SELMAN ÖZKAN

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN

TEKİRDAĞ-2017

Her hakkı saklıdır.

Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN danışmanlığında, Selman ÖZKAN tarafından hazırlanan “Bazı Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Çeşit ve Populasyonlarında Mikrosatellit Belirteçleri Kullanılarak Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Metin TUNA

İmza:

Üye: Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN (Danışman)

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI KORUNGA (*Onobrychis viciifolia* SCOP.) ÇEŞİT VE POPULASYONLARINDA MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ KULLANILARAK GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

SELMAN ÖZKAN

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN

Baklagiller içerdikleri vitamin, mineral ve proteinlerce zengin olmalarıyla hayvan beslenmesinde dünyada ve ülkemizde yaygın bir şekilde yem bitkisi olarak kullanılmaktadır. Ülkemizin özellikle İç ve Doğu Anadolu bölgelerinde yaygın bir şekilde yetiştiriciliği yapılan korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.), hayvan beslenmesinde, toprağın yapısını iyileştirmede ve arılar için nektar kaynağı olarak kullanılmaktadır. Korunganın genetik yapısı hakkında literatürde çok az bilgi bulunmakta ve bununla beraber genetik yapıyı belirlemede ve ıslah çalışmalarında kullanılabilecek belirteç sayısı da azdır. Bu çalışmada ülkemizin tescilli çeşitleri Özerbey ve Lütfübey’de, Kırşehir bölgesinden elde edilmiş yerel populasyonlarda (Kırşehir-1, Kırşehir-2) ve Bulgaristan’dan elde edilmiş olan Pleven populasyonunda 10 SSR lokusu (OVK036, OVK094, OVK125, OVM033, OVK161, OVM125, OVK046, OVM061, OVK174, OVK101) kullanılarak çeşit ve populasyonların genetik yapısı incelenmiştir. Çalışmada kullanılan SSR lokuslarının tamamı polimorfik olarak saptanmıştır. Analiz edilen 91 örnekte 10 lokus için toplam 68 allel saptanmıştır. Genetik çeşitlilik parametrelerinden, lokus başına düşen ortalama allel sayısı ($N_a = 1,365$), etkili allel sayısı ($N_e = 1,348$), Shannon Sabiti ($I = 0,322$), Nei’nin genetik çeşitlilik değeri ($h = 0,210$) ve Nei’nin tarafsız çeşitlilik değeri ($u_h = 0,222$) hesaplanmıştır. Populasyonların genetik çeşitliliğinin büyük oranda (%92) populasyon içerisinde olduğu, populasyonlar arası çeşitliliğin ise çok düşük olduğu (%8) gözlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen UPGMA dendrogramına göre birbirine yakın bulunan Özerbey ve Lütfübey bir grup, Pleven ve Kırşehir-2 ayrı bir grup olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, çalışılan populasyonların genetik yapıları hakkında önemli bilgiler vermiştir. Ayrıca korungada yapılacak olan moleküler genetik çalışmalarına ışık tutacak, bundan sonraki araştırmalarda kaynak niteliğinde rol oynayacak niteliktedir.

Anahtar kelimeler: baklagiller, genetik çeşitlilik, moleküler belirteçler, *Onobrychis viciifolia*,

SSR

2017, 63 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY IN SAINFOIN (*Onobrychis viciifolia* SCOP.) VARIATIES AND POPULATIONS USING MICROSATELLITE MARKERS

SELMAN ÖZKAN

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Behiye Banu BİLGEN

Species of *Leguminosae* (*Fabaceae*) family, which are rich in the vitamins, minerals and proteins, are widely used as animal feed in the world and also in our country. The sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.), which is widely grown in our country especially in the Central and Eastern Anatolian regions, is used for animal feed, improving the structure of soil and nectar source for bees. There were little information in the literature about genetics of the species and also only few genetic markers are available for genetic structure analysis and breeding studies. In this study, genetic structure of two cultivars (Özerbey and Lütfübey) and three populations (Pleven, Kırşehir-1 and Kırşehir-2) were investigated using 10 SSR loci (OVK036, OVK094, OVK125, OVM033, OVK161, OVM125, OVK046, OVM061, OVK174, OVK101). All of the SSR loci used in the study were polymorphic. A total of 68 alleles were identified for 10 loci in 91 samples analyzed. Genetic diversity parameters such as; mean number of alleles per locus ($N_a = 1.365$), effective allele number ($N_e = 1,348$), Shannon information index ($I = 0.322$), Nei's genetic diversity level ($h = 0.210$), and Nei's unbiased genetic diversity level ($u_h = 0,222$) were calculated. It was observed that the genetic diversity of the populations was mainly due to within population variation (92%) and the remaining portion was due to variation between populations (8%). According to the UPGMA dendrogram obtained from the study, Özerbey and Lütfübey occurred in one cluster, Pleven and Kırşehir-2 populations occurred in the second cluster. The results obtained from this study provided important information on the genetic structure of the studied sainfoin populations. It will also provide significant contribution to the molecular genetic studies in sainfoin and related species.

Keywords: *Fabaceae*, genetic diversity, molecular markers, *Onobrychis viciifolia*, SSR

2017, 63 pages

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Baklagiller (<i>Fabaceae</i>) Familyasına Genel Bakış.....	3
2.1.1 Baklagiller Familyasına Ait Yem Bitkilerinin Özellikleri	3
2.2 Korunga Bitkisine Genel Bakış	4
2.2.1 Korunganın Antiparazit (Antihelminetik) Etkisi	7
2.2.2 Şişkinlik (Rumen Timpanisi) ve Korunga İlişkisi.....	8
2.3 Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları) ve Kullanım Alanları	9
2.4 Korunga Bitkisinde Yapılmış Çalışmalar.....	11
2.4.1 Genetik Çeşitlilik Çalışmaları	11
2.4.2 Korunga Islah Çalışmaları	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1 Bitki Materyali.....	16
3.2 DNA İzolasyonu	16
3.3 İzole Edilen DNA Örneklerinde Miktar ve Kalite Tayini	19
3.4 Mikrosatellit (SSR) Primerlerinin Belirlenmesi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri ve Elektroforez	20
3.5 Verilerin İstatistiksel Analizi.....	37
4. BULGULAR	38
4.1 Mikrosatellit (SSR) Primerlerine ait Allellerin Belirlenmesi	38
4.2 Genetik Çeşitlilik Parametreleri	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	47
6. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ	63

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Korunganın (<i>O. viciifolia</i> Scop.) sistematikteki yeri.....	5
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan korunga çeşit ve populasyonları	16
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılmak üzere belirlenen SSR primerlerine ait bilgiler	21
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilmiş PCR koşulları....	22
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri	22
Çizelge 4.1. Çalışmada analiz edilen 10 SSR lokusuna ait allellerin korunga çeşit ve populasyonlarındaki frekansları.....	39
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan 10 SSR primerine ait genetik parametreler	43
Çizelge 4.3. Korunga çeşit ve populasyonlarına ait genetik çeşitlilik parametreleri	44
Çizelge 4.4. Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları	45
Çizelge 4.5. <i>O. viciifolia</i> çeşit ve populasyonları arasında Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri	46
Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan 10 SSR primerine ait PIC değerlerinin Kempf ve ark. (2016a) tarafından yapılan çalışmadaki PIC değerleri ile karşılaştırılması	50

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Korunganın genel görünümü.....	4
Şekil 3.1. Korunga örneklerinin Retsch® MM400 model vibrasyonlu homojenizatör ile ezilmesi	17
Şekil 3.2. Homojenizasyon sonrası örneklere Choloroform: Isoamylalcohol eklenerek santrifüj sonrası faz ayrımı.....	18
Şekil 3.3. Thermo Scientific Nanodrop® 1000 Spektrofotometre cihazı kullanılarak DNA miktar ve kalite tayini.....	19
Şekil 3.4. Nanodrop® 1000 spektrofotometre ile miktar ve kalitesi ölçülmüş DNA Örnekleri	19
Şekil 3.5. Korunga çeşit ve populasyonlarına ait izole edilen bazı DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri	20
Şekil 3.6. Thermal Cycler cihazlarında DNA amplifikasyonları ve Elektroforez	23
Şekil 3.7. <i>O. viciifolia</i> çeşit ve populasyonlarına ait bazı örneklerin PCR ürünlerinin UV ışık altındaki jel görüntüsü (OVK036, OVK094, OVK125, OVK161, OVM033, OVM125).....	23
Şekil 3.8. <i>O. viciifolia</i> çeşit ve populasyonlarına ait bazı örneklerin PCR ürünlerinin UV ışık altındaki jel görüntüsü (OVK046, OVK101, OVK174, OVM061).....	24
Şekil 3.9. OVK036 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	25
Şekil 3.10. OVK094 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	27
Şekil 3.11. OVK125 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	28
Şekil 3.12. OVM033 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	29
Şekil 3.13. OVK161 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	30
Şekil 3.14. OVM125 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	32
Şekil 3.15. OVK046 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	33
Şekil 3.16. OVM061 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	34
Şekil 3.17. OVK174 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	35

Şekil 3.18. OVK101 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü	36
Şekil 4.1. Korunga çeşit ve populasyonlarındaki allel sayısı ve heterozigotluk arasındaki ilişkinin grafik şeklinde gösterilmesi	44
Şekil 4.2. AMOVA sonuçlarına göre elde edilen moleküler varyans yüzdeleri	45
Şekil 4.3. <i>O. viciifolia</i> çeşit ve populasyonlarının SSR analizleri sonucunda genetik mesafe değerlerine göre oluşturdukları dendrogram	46



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	: Santimetre
da	: Dekar
dk	: Dakika
f	: Frekans
g	: Gram
G	: Guanin nükleotidi
kg	: Kilogram
m	: Metre
M	: Molarite
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
n	: Tekrar sayısı
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
pmol	: Picomol
rpm	: Rounds per minute (Dakikadaki devir sayısı)
T	: Timin nükleotidi
U	: Ünite (Enzim birimi)
Volt	: Voltaj
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
±	: Standart hata

Kısaltmalar

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Artırılmış Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)
AMOVA	: Analysis of Molecular Variance (Moleküler Varyans Analizi)
ark.	: arkadaşları
bç	: Base pair (Baz çifti)
CTAB	: Cetyl trimethylammonium bromide
C:I	: Chloroform Isoamylalcohol
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FAM	: 6-carboxyfluorescein
F _{ST}	: Fiksasyon indeksi
HCl	: Hidroklorik asit
h	: Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik değeri
uh	: Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri
I	: Shannon sabiti
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarları Arası)
<i>L. persicum</i>	: <i>Lolium persicum</i> (İran Çimi)
<i>M. truncatula</i>	: <i>Medicago truncatula</i>
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
N	: Örnek sayısı
N _a	: Gözlenen allel sayısı
N _e	: Etkili allel sayısı
NaCl	: Sodyum klorür
NKÜ	: Namık Kemal Üniversitesi
<i>O. altissima</i>	: <i>Onobrychis altissima</i>
<i>O. transcaucasica</i>	: <i>Onobrychis transcaucasica</i>
<i>O. viciifolia</i>	: <i>Onobrychis viciifolia</i>
PCR	: Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIC	: Polymorphic Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)
<i>P. vulgaris</i>	: <i>Phaseolus vulgaris</i>
PVP	: Polyvinylpyrrolidone

RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA (Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA)
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi)
SNP	: Single Nükleotid Polimorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
SRAP	: Sequence-Related Amplified Polimorphism
SSR	: Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
T.C.	: Türkiye Cumhuriyeti
TBE	: Tris-Borat-EDTA tamponu
TE Tamponu	: Tris-EDTA tamponu
UV	: Ultraviyole ışığı
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
vb.	: Ve benzeri

ÖNSÖZ

Artan dünya nüfusuna paralel olarak insanların besin ihtiyacı da artmıştır. Çoğu ülkelerde insanlar yeterince beslenememekte ve yetersiz beslenmeden dolayı birçok hastalık meydana gelmekte hatta ölümler yaşanmaktadır. Bitkisel kaynaklı besinlerin hayatımızda önemli bir yeri olduğu kadar hayvansal kaynaklı gıdalarda protein kaynağı olarak insan beslenmesinde son derece önemli bir yer tutmaktadır. Hayvansal kaynaklı protein, mineral vb. maddeler insan yaşamında ve sağlıklı bir birey olarak yaşama devam etme hususunda önemli gıda maddeleridir. Fakat hayvanların yeterince beslenememesi, hem işletmeler açısından verim kayıplarına neden olmakta, hem de kaliteli hayvansal gıdaların üretimini sınırlamaktadır.

Karlı bir hayvancılık için girdi maliyetlerinin düşük, elde edilen ürünlerin karlılık oranları yüksek olmalıdır. Yem fiyatlarının yüksek olması, birim alandan elde edilen kaliteli kaba yem miktarlarının çok düşük olması ve kaliteli kaba yem üretimi ile tedarik etmedeki sorunlar hayvancılık işletmelerini zorlamakta ve zarar etmelerine yol açmaktadır. Anadolu coğrafyasına baktığımızda çayır ve mera varlığımızla, hayvan varlığımızla karlı bir hayvancılık yapılmasına son derecede elverişli olduğu görülmektedir. Çayır ve meralarımızın ıslahı, çayır, mera bitkilerinde ve yem bitkilerinde verimi artırma, besleyiciliği yüksek çeşitlerin ıslahıyla kaliteli kaba yem üretimini artırmak, hayvancılık sektörüne katkı sağlayarak bu sektörün kanayan yarası kaliteli kaba yem sorununa çare olacaktır. Gerek devlet desteğiyle gerekse kaliteli kaba yem üretmekle üreticilerimizin girdi maliyetleri azaltılacak ve daha kaliteli bir hayvancılıkla dışa bağımlılık en aza indirilecektir. Ülkemiz coğrafi yapısına ve çayır mera alanlarına baktığımızda hayvancılık sektörünü güçlendirecek yeterli alanlara sahip olduğumuz açıkça görülmektedir.

Ülkemizde ve dünyada yetiştiriciliği yapılan korunga bitkisi diğer yem bitkilerine nazaran kurak, kırılgan koşullarda yetiştirilebilmektedir. Çok yıllık bir bitki olması, özellikle bal üreticileri için arıların nektar kaynağı olması ve bir baklagil yem bitkisi olarak toprak ıslahında ve münavebe de önemli bir yer tutması bu bitkiyi diğerlerinden ayrıcalıklı kılmaktadır. Fakat bu bitki üzerinde özellikle moleküler düzeyde yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Yaptığımız bu tez kapsamında genetik karakterizasyonunu belirlemede en etkili ve kullanışlı metotlardan biri olan mikrosatellit (SSR) belirteçleri kullanılarak 2 yerli çeşit (Özerbey ve Lütfübey) ve 3 korunga popülasyonundan (Pleven, Kırşehir-1 ve Kırşehir-2) 91 birey alınarak çeşit ve popülasyonların genetik çeşitliliği incelenmiştir. Elde edilen bu veriler, hem çalışılan korunga popülasyonlarının genotipleri hakkında bize bilgi sağlamış hem de bundan sonra korunga ve diğer yem bitkilerinde yapılacak olarak genetik karakterizasyon

alışmalarında yapılacak olan araştırmalara ışık tutarak, bir kaynak materyal olarak rol oynayacak niteliktedir.

Üniversite hayatıma başladığım andan itibaren mesleki bilgi ve tecrübelerini aktararak bu ülkenin ihtiyacı olan genç dinamik kalifiyeli bir mühendis olarak yetişmemi sağlayan Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi öğretim üyelerine minnetle şükranlarımı sunarım. Bitki Moleküler Genetiği alanında pratik ve teorik bilgilerle yetişmemi sağlayan, öğrettiği her bir harf, her bir bilgi altın değerinde olan değerli hocam, tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü)’e sonsuz hürmetlerimle şükranlarımı sunarım. Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca projelerinde, saha denemelerinde bir fiil aktif olarak rol aldığım, kıymetli bilgilerini benden esirgemeyerek yetişmemi sağlayan, değerli hocalarım, Prof. Dr. Metin TUNA (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü) ve Doç. Dr. İlker NİZAM (NKÜ, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri)’a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca tezin son şeklini almasında değerli katkılarını esirgemeyen Tez Savunma Sınavı Jüri Üyesi Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ (Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü) hocama teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler genetik laboratuvarında edindikleri tecrübeleri benimle paylaşmaktan çekinmeyen, çalışmalarımda yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Ceren ELİBOL (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) ve Ahmet Kubilay BARUT’a, desteğiyle ve çalışmalarım sırasında motivasyon kaynağım olan ve beni hırslandıran değerli meslektaşım, çalışma arkadaşım, dostum Selen YATKIN’a teşekkürü bir borç bilirim.

Varlıklarıyla her zaman arkamda ulu bir çınar gibi güçlerini hissettiğim, destekleriyle var olduğum noktadan daha da ileriye gitmemi sağlayan bu dünyadaki en büyük hazinelerim Kıymetli Annem, Babam ve Kardeşime, bana inançlarını yitirmeyerek destekleyen tüm aile fertlerime en kalbi duygularıyla şükranlarımı, hürmetlerimle saygılarımı sunarım.

Kasım 2017

Selman ÖZKAN

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun dengeli, yeterli ve sağlıklı beslenebilmesi açısından hayvansal kökenli ürünler büyük rol oynamaktadır. Hayvansal ürünler denilince ruminantlar olarak adlandırılan sığır, koyun ve keçiden elde edilen ürünler (et, süt vb.) akla gelmektedir. Yem ve besleme masrafları, hayvansal ürünlerin üretim aşamasında yapılan masrafların yaklaşık %70'lik kısmını oluşturmakta ve işletmenin karlılığını önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Bu nedenle hem nispi olarak daha ucuz olan, hem de ruminantların sindirim faaliyetlerini olumlu yönde etkileyen kaba yemler, bu yemlerin kaynakları ve alternatif kaba yem kaynakları ön plana çıkmaktadır. Kaba yem; doğal halde %14 oranından daha fazla su içeriği veya kuru madde halinde %16-18'den daha fazla ham selüloz içeriği bulunan, tüketildiğinde hayvan sağlığı ve ürünü üzerinde olumsuz etkisi olmayan her tür bitki materyalidir (Özkan ve Demirbağ 2016).

Karlı bir hayvancılık için en önemli ve en ucuz yem kaynağı olan kaba yemler otçul hayvanların rasyonlarının temelini oluşturmanın yanı sıra doğal koşullarda yetişen düşük enerjili yemlerdir. Bunun yanında kaba yemler; ruminant hayvanların beslenme fizyolojilerine uygun olup hayvanlarda mekanik tokluk sağlaması tarafıyla büyük öneme sahiptir. Son yıllardaki hızlı nüfus artışı, iklim değişikliği, su kaynaklarının azalması, kuraklık, toprakların verim kabiliyetinin azalması, erozyon, tarıma elverişli toprakların imara açılması ve kentleşme gibi olumsuz etkenler kaba yem üretiminin azalmasına ve buna paralel olarak da ürünlerde birim fiyat artışına sebebiyet vermektedir. Çayır ve meralar hayvan beslenmesinde yer tutan çok önemli kaba yem kaynaklarıdır. Aynı zamanda flora ve fauna çeşitliliğinin ve gen kaynaklarımızın gelecek nesiller için korunması, tarımsal uygulamaların ve hayvancılığın etkili bir şekilde sürdürülmesi için, korunması ve geliştirilmesi son derece önemli ve gerekli olan alanlardır (Boval ve Dixon 2012, Özkan ve Demirbağ 2016).

Yem bitkileri tarımı, çayır ve meraların üzerindeki aşırı otlatma baskısını hafifleterek, tahıl-nadas sistemlerinin münavebe kısmında büyük rol oynamaktadır. Nadasa bırakılan alanların daralmasıyla ülkemizdeki erozyonla toprak kayıpları en aza indirilmesi öngörülmektedir. Yem bitkisi yetiştiriciliğinin artmasıyla bozulan çayır ve meralar kendilerini yenileyerek daha verimli ve kullanılabılır hale gelecektir. Bunların yanında yem bitkilerinin ekim nöbetindeki diğer faydaları;

1. Toprağın fiziksel ve kimyasal yapısını geliştirerek organik maddece zenginleştirmek,
2. Doğayı koruyarak, yağış rejimine uymayı kolaylaştırmak ve erozyonu önlemek,
3. Topraktan en üst düzeyde faydalanmayı sağlayarak verime olumlu yönde etki etmek,

4. Yabancı ot ve zararlılarla mücadele de faydalı olmakla birlikte toprak yorgunluğunu gidererek topraktan faydalanmayı sürekli kılar (Soya ve ark. 2004, Tan ve Yolcu 2008)

Kıraç ve kireçli alanlarda yetiştirilebilecek en uygun baklagil yem bitkisinden birisi korungadır. Ot kalitesi ve hayvan performansı açısından yonca ile karşılaştırdığımızda aynıdır. Hatta kıraç alanlarda yoncadan daha verimli olduğu bildirilmiştir. En önemli özelliklerinden biride hayvanlarda şişme yapmamasıdır. Bu nedenle yapay meralarda ve ıslah çalışması yapılan meralarda geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Korunga bitkisi en başta kıraç alanlara dayanıklı olmasından dolayı mera ıslah çalışmalarında kullanılabilecek en iyi bitkilerden bir tanesidir. Farklı meralarda çeşitli korunga türlerine rastlamak mümkündür. Örneğin, Çanakkale meralarında *Onobrychis viciifolia* türüne rastlanmazken en fazla *Onobrychis caput-gali* (pıtrak korunga), *Onobrychis gracilis* (zarif korunga), *Onobrychis oxyodonta* (kır korungası) türlerine rastlanmaktadır (Parlak ve ark. 2014). Korunga içerdiği tanenler ve ikincil bileşikler nedeniyle de antihelmintik (Solucan Düşürücü) etki göstermektedir. Yapılan çalışmalarda enfekteli ruminantlarda korunga solucan düşürücü olarak iyi bir etki göstermiştir (Anonim 2017a). Bu özelliklerinin yanında korunga içerdiği yüksek miktardaki nektar ve polen nedeniyle iyi bir arı merası olarak işlev görmektedir. Korunga ekili olan arazilerin olduğu yerlerdeki arı kovanlarından yüksek verim ve bal kalitesi alındığı görülmektedir. Kıraç alanlarda yetişmesi, kuraklığa toleranslı olması, şişkinlik yapmaması gibi faydalara sahip olan korunga ülkemizde ve Dünya da üzerinde çalışılması gereken bir baklagil yem bitkisidir.

Literatür taramaları sonucunda korungada moleküler çalışmaların 2000’li yıllardan sonra ivme kazandığı görülmüştür. Korunga üzerine yapılan moleküler çalışmaların sınırlı sayıda olması ve ülkemizde kültürü yapılan korunga çeşit ve lokal populasyonlarının genetik yapısı ve çeşitliliği daha önce analiz edilmemiş olmasından dolayı bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında 2 korunga çeşidi ve 3 populasyonun mikrosatellit belirteçleri (SSR) kullanılarak genetik yapıları ve içerdiği çeşitliliğin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma kapsamında; farklı korunga çeşit ve populasyonlarının SSR lokusları açısından genetik yapıları ortaya konulmuş, çalışılan çeşit ve populasyonların genetik parametrelerinin tahmin edilmesi ile genetik çeşitlilik düzeyleri belirlenmiş ve SSR belirteçleriyle belirlenen genetik çeşitlilik düzeyleri literatürde mevcut olan diğer çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçların yüksek adaptasyon kabiliyeti ve performansla sahip yeni korunga çeşitlerinin geliştirilmesinde kullanılacak en uygun ıslah stratejilerinin belirlenmesinde ıslahçılara yardımcı olacağı düşünülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Baklagiller (*Fabaceae*) Familyasına Genel Bakış

Baklagiller olarak adlandırılan *Leguminosae* (*Fabaceae*) familyası, Dünya üzerinde en geniş familyalardan biridir. Varlığı kabul edilen 250000 çiçekli bitki türünün 12000'i baklagiller familyasına ait olup yaklaşık 600 cins içerisine dağılmışlardır (Nelson ve Moser 1995). Eski çağlardan beri insan beslenmesinde önemli bir besin kaynağı olan baklagillerin mısır piramitlerinde ve mezar kazılarında örneklerine rastlanmıştır. Günümüzde de baklagillerden fasulye, nohut, mercimek, bezelye, börülce gibi yemeklik tane baklagiller önemli besin ve gıda kaynaklarımızı oluşturmaktadır (Tan ve Serin 2009).

Baklagiller sahip oldukları azot (N) bağlayabilme yeteneklerinden dolayı doğada diğer bitki türleri arasında önemli bir yere sahiptirler. Baklagiller *rhizobium* cinsi bakteriler yardımı ile gerçekleştirdikleri ortak yaşam (simbiyosis) sayesinde havadaki elementer azotu yüksek yapılı bitkilerin kullanabileceği forma dönüştürmektedir. Baklagillerin toprağa bağladıkları azot azımsanmayacak düzeydedir. Normal gelişmiş bir yonca tarlasında dekara bağlanan N miktarı, tarla da ekili kaldığı süre gibi bazı faktörlere göre değişmekle birlikte 14,8-29,0 kg/da'dır. Bu miktar ak üçgülde 26,8, çayır üçgülünde 15,4, tüylü fiğde 18,4 kg/da'a kadar çıkmaktadır (Larue ve Patterson 1981). Çeşitli faktörlere bağlı olarak belirlenen azotun %33'ü buğdaygillere transfer edilmektedir (Halitgil ve ark. 2007). Bu gibi avantajlarından dolayı baklagiller, kendilerinden sonra tarlaya ekilecek olan buğdaygiller için çok iyi bir ön bitki konumundadırlar.

Baklagiller toprağı besin elementi ve organik maddece zenginleştirdiklerinden toprak ıslahı ve muhafazası için de önem taşırlar. Kazık kökleriyle toprağı derinlere kadar işler, kabartır ve havalandırırlar. Bu nedenle tarıma yeni açılacak alanların öncü bitkileri baklagillerdir. Bu amaçla kullanılacak türlerin başında korunga ve taş yoncası gelmektedir. Baklagiller toprakta kolayca parçalandıklarından toprak ıslahı içinde yeşil gübre olarak en fazla tercih edilen bitkilerdir. Ayrıca korunga gibi bazı türler kurağı dayanıklılık gösterdiklerinden kuru tarım alanlarında ekim nöbeti sisteminin başlıca bitkilerindendir (Tan ve Serin 2009).

2.1.1 Baklagiller Familyasına Ait Yem Bitkilerinin Özellikleri

Yeryüzünde hayvan besleme amacıyla kullanılan bitkilerin büyük bir kısmını baklagiller oluşturmaktadır. Çayır ve meralarda doğal olarak yetişmekte ve hayvanların kaba yem ihtiyacını karşılamada önem rol oynamaktadırlar. Baklagillerin besin değerleri ve

yarayışlılıkları da yüksektir. Genel olarak baklagil otu kolay kartlaşmayan, bol yapraklı ve yumuşak gövdeli özellik gösterir. Baklagiller protein vitamin ve mineralce de zengindirler (Tan ve Serin 2009). Dünyada hayvan beslenmesinde kullanılan proteinlerin %38'i ve karbonhidratların %5'i baklagillerden karşılanmaktadır. Yemelik tane baklagiller (nohut, mercimek, fasulye vb.) olarak da insan beslenmesinde yer alan ürünlerin artıkları hayvan beslenmesinde de rol oynamaktadır. Hayvan beslenmesinde özellikle mercimek samanı önemli bir yere sahiptir. Mercimek samanının tane/sap oranı 1/1,5 olup sapta %13,74 oranında protein olduğu bilinmektedir (Oğuz ve Direk 2014).

Tarım arazilerinde yetiştirilen ürünlerin büyük çoğunluğunu baklagiller oluşturmaktadır. Bakla, burçak ve yonca gibi türler hayvan besleme amacıyla insanoğlunun eski çağlardan beri kullandığı bitkilerdir. Anadolu coğrafyasında baklagil yem bitkilerinin Hititler Dönemi'nden beri yetiştirildiği ve hayvan beslemek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Nitekim ülkemizde yem bitkisi denilince ilk akla gelen türler yonca, korunga ve fiğ gibi baklagillerdir. Kaba yem için kullanılan baklagil yem bitkileri tane yem olarak da kullanılabilir. Başlıca tane yem olarak kullanılan bitkiler, yem bezelyesi, fiğ, koca fiğ, burçak ve mürdümük gibi iri taneli ürünler tane yem olarak da yedirilmekte, hayvan yem rasyonlarına protein katkısı olarak da eklenmektedir. (Tan ve Serin 2009).

2.2 Korunga Bitkisine Genel Bakış

Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.), Baklagiller (*Fabaceae*) familyasına ait, farklı ekolojik koşullarda yetişebilen, yabancı döllenilen faydalı çok yıllık bir yem bitkisi türüdür (Elçi 2005) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Korunganın genel görünümü

Dünyada korunga cinsine bağlı 162 tür bulunmakta ve korunga türleri Akdeniz Bölgesi'nden başlayıp Kafkasya ve Zagros Dağları hattı boyunca Orta Asya'ya kadar yayılış göstermektedir (Aktoklu 1995). Korunga tür adı olarak *Onobrychis viciifolia* olarak tanımlanmaktadır. Yunanca “eşek yemi” anlamına gelen *Onobrychis*, ülkemizde korunga ismiyle anılmakta ve sinonim olarak da “Evliya Otu” adıyla da bilinmektedir. Dünya da ‘Sainfoin’ adıyla bilinen korunga, Fransızcada kutsal saman, sağlıklı saman (healty hay), aziz yonca gibi isimlerle de adlandırılmaktadır. Bu ve bunun gibi isimlerle anılmasının temel sebebi, sağlıklı bir yem olması ve bu yemi tüketen hasta hayvanları iyileştirme özelliğidir (Sottie 2014).

Korunganın yayılma alanı içerisinde yer alan ülkemizde 70 kadar korunga türü doğal olarak yetişmektedir ve tespit edilen bu türlerden 27 tanesinin endemik tür olduğu bildirilmiştir (Aktoklu 1995, Açıkgöz 2001). Korunga bitkisinin sistematik hiyerarşisini gösteren bilgiler, Çizelge 2.1’de verilmiştir. Ülkemizde en fazla korunga yetiştiriciliği Doğu Anadolu ve İç Anadolu bölgelerimizde yapılmaktadır. Kıraç ve kireçli toprak yapısındaki alanlarda yetiştirilebilecek en uygun yem bitkisi olan korunga, verimsiz inşaat toprağı dediğimiz alanlarda bile yetiştirilmesi mümkün olmaktadır. Köklerindeki yüksek katyon değişme kapasitesi sayesinde birçok kültür bitkisinin topraktan alamadığı besin maddelerini rahatlıkla almaktadır. Korunga köklerinin katyon değiştirme kapasitesi yonca, yulaf ve mısır gibi bitkilerden yüksek olduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Tosun 1992).

Çizelge 2.1. Korunganın (*O. viciifolia* Scop.) sistematikteki yeri (Anonim 2017b)

Alem	Bitkiler
Alt Alem	Damarlı Bitkiler
Bölüm	Kapalı Tohumlu (Magnoliophyta)
Sınıf	Çift Çenekli (Magnoliopsida)
Alt Sınıf	<i>Rosidae</i>
Takım	<i>Fabales</i>
Familya	<i>Fabaceae</i> (Baklagiller)
Cins	<i>Onobrychis</i>
Tür	<i>Onobrychis viciifolia</i> SCOP.

Korunganın yaşam döngüsüne baktığımızda, kışları sert geçen yerlerde erken ilkbaharda, kışları ılıman geçen bölgelerde ise sonbaharda ekilebilir. Ekim için iyi hazırlanmış bir tohum yatağı, yabancı ot tohumlarından temizlenmiş, tezekleri kırılmış bir tarla hazırlanmalıdır. Ekim derinliği 2,5-5,0 cm sıra arası mesafe ortalama 50 cm olmakta ve amaca göre değişmektedir. Korunga derin kök yapısıyla baharın erken dönemlerinde toprağın derinlerine nüfuz ederek büyür ve kök tacından dallanarak gelişim gösterir. Yoncadan 1 ile 2 hafta önce çiçeklenme dönemine girer. Sapların içi boştur ve kırmızımsı, kahverengimsi veya yeşil yapıdadır. Korunga yaklaşık 120 cm ve daha fazla boylanabilmektedir. Fakat boyu fazla uzarsa yatmalar meydana gelmektedir. Korunga yaprakları, 5-14 çift yaprakçığın meydana getirdiği ve ucunda 1 yaprak bulundurarak 10-25 cm arasında uzunluğu değişken bir yapıdadır. Korunganın çiçekleri pembe veya gülkurusu renklerinde, bitki sapına bağlı bir salkım şeklindedir. Kendine has bir çiçek yapısına sahip olan korunganın kayıkçık adı verilen çiçek kısmının içerisinde bir dişiçik organı (stigma) ve erkek organlar (anter) yer alır. Korunga çiçeğine konan arı veya diğer polinatör böceklerin ağırlıklarıyla kayıkçık kısımdaki üreme organları açığa çıkmakta ve tozlaşma bu şekilde meydana gelmektedir. Korungada dişiçik organının erkek organlardan uzun olması kendine döllemeyi olumsuz etkilemekte ve yabancı tozlaşmayı zorunlu kılmaktadır. (Tan ve Sancak 2009, Özbek 2011, Hybner 2013, Anonim 2015).

Korunga kuru tarım alanlarında ekim nöbetine alınacak çok yıllık baklagil yem bitkilerinin başında gelir. Sulanmayan veya kıraç alanlarda yonca bitkisinden daha verimli olması ekim nöbetinde kullanılmasının sebeplerinden biridir. Ülkemizde kuru tarım alanlarında buğday-nadas şeklinde uygulanan ekim sisteminde nadas alanlarını azaltmak için korunganın kullanıldığı (4-5 yıl korunga-nadas-buğday) sistemler kullanılabilir. Ancak, sulu veya taban alanlarında yonca ile boy ölçüşemez. Korunga en elverişli topraklar da bile 2-3 biçim verebilmektedir. Sulu koşullarda yetiştirilse bile yonca kadar verimli olamamaktadır. Sulu koşullarda yetiştirildiğinde çok kardeşlenme ve boylanma yapmakta ve gövde içi boş olduğundan yatma meydana gelmektedir. Yoncada görülen yonca hortumlu böceği (*Hypera postica*) gibi bitkinin toprak üstü kısımlarına önemli kayıplara neden olan zararlılar korungada zarar yapmamaktadır (Tan ve Sancak 2009).

Korunga iyi bir mera bitkisidir. Ülkemizde birçok yüksek rakımlı doğal meralarda korungayı görmek mümkündür. Artvin'in Şavşat ilçesinde yapılan bir çalışmada, 3 farklı yükseltide (850 m, 1010 m, 1475 m) korunga bitkisinin verim unsurları incelenmiş, 1475 m rakım da bile yetiştigi görülmüştür (Özalp ve Temel 2016). Besleme değeri ve kıraç koşullara dayanımı neticesinde yapay mera tesislerinde baklagil olarak çoğunlukla korunga tercih edilir.

Korunga otu hayvanlarda şişme yapmamaktadır. Bu özelliği ile yapay ve doğal meralarda hayvanlar doğrudan otlatılabilmektedir. Özellikle koyunlar korunga otunu otlamayı diğer yem bitkilerine tercih etmektedirler. Smoliak ve Hanna (1975) yaptıkları bir çalışmada; yonca, korunga ve nohut giveninin koyunlar için lezzetliliğinde bir fark görülmediğini, ancak koyunların ilk önce korungayı otladığını bildirmişlerdir. Parker ve Moss (1981) yaptıkları lezzetlilik testinde 6 aylık düvelerin korungayı yoncaya tercih ettiklerini bildirmişlerdir.

Korunga yeminin kuzularda zarar yapan mide nematodlarına karşı iyileştirici özelliği bulunmaktadır. Yapılan bir araştırmada korunga otu ve silajı ile beslenen kuzularda kontrol yem grubuna göre sırasıyla %64 ve %48 oranında daha fazla nematod kontrolü sağlanmıştır (Heckendorn ve ark. 2007a, 2007b). Eğimin fazla olduğu ve erozyon riskinin olduğu bölgelerde korunga en ideal bitkilerdendir. Yatık formda gelişmesi ve yayılışı olması sebebiyle rüzgâr ve su erozyonunu önleyerek toprak yapısının korunmasını sağlamaktadır.

Korunga iyi bir bal özü kaynağıdır (Özbek 2011). Bal arıları, yan yana ekili olan korunga ve yonca tarlalarından genellikle korunganın bulunduğu tarlayı tercih etmektedirler. Bal özü kaynağı olarak korungayı tercih eden arıların balı verimlidir ve kendine hoş bir aroması vardır. Amerika Birleşik Devletleri'nin Montana Eyaletine ülkemizden götürülen ve kökeni "Eskişehir" olan "Eski" adlı korunga popülasyonu ile yapılan çalışmada 19 dekarlık bir tarlaya çiçeklenme döneminde konulan 2 ayrı arı kovanından 30 ve 65 kg bal elde edilmiştir. Korunga tohumları gerekli durumlarda karma yem olarak da kullanılabilir ve tohumlarda %36-38 protein bulunduğundan doğrudan hayvan yemi olarak da hayvanlara verilmektedir (Dubbs 1968).

2.2.1 Korunganın Antiparazit (Antihelmintik) Etkisi

İkincil bitki metabolitlerinden olan tanenler, bitkilerde böceklere karşı bir savunma mekanizması sağlayan (Schultz 1989) ve memeli hayvanlarda (Hagerman ve Butler 1991) nematodlara karşı bir savunma sistemleriyle ilgili olan ikincil bileşiklerdir. Kimyasal yapısına baktığımızda tanenler iki grup da incelenmektedir; hidrolize tanenler ve kondense (yoğunlaştırılmış) tanenler. Kondense tanenler doğada en yaygın bulunan tanenlerdir. Ruminant (Hagerman ve Butler 1991) ve monogastrik hayvanlarda (Vernon 1999) bir takım zararlı etkileri olduğu düşünülmektedir. Fakat kondense tanenleri içeren yemlerin rasyonlarda bulunmasıyla hayvanlara süt artışı, kilo artışı, yün-yapağı verimi ve gastrointestinal nematodların atılması gibi faydaları da olmaktadır (Barry ve McNabb 1999). Yapılan araştırmalar sonucunda tanen içeren besinleri tüketen geyiklerin dışkılarında daha düşük oranda

nematod yumurta varlığı tespit edilmiştir (Hoskin ve ark. 1999, Niezen ve ark. 1995). Bu ve buna benzer özelliklerinden dolayı kondense tanenler üzerinde çalışma stratejileri oluşturulmaktadır (McKellar 1997, Sangster 1999). Kondense tanenlerin etkileri, doğrudan veya dolaylı olarak ortaya çıkmaktadır. Kondense tanenler proteinlere bağlanma kabiliyetine sahiptir, böylece yemleri rumende aşırı sindirime uğramadan ince bağırsakta emilimini artırarak proteinden yararlanmayı artırır (Mueller-Harvey ve McAllan 1992). Dolaylı yoldan etkisi ise, artış sağlanan proteinlerin kullanımı, parazitlere karşı geliştirilmiş immuno yanıtlar sağladığı kabul edilmektedir (Coop ve Kyriazakis 1999). Evcil hayvanların hemen hemen hepsinde antihelmintik ilaçlara olan direnç tüm türlerde bildirilmiştir (Jabbar ve ark. 2006). Nematodlarla mücadele etmek için bu ilaçlara alternatif çözümlerin bulunması gerekmektedir (Carbonero 2011). Nematodlara karşı mücadele de tanence zengin bitkilerin hayvanlara yedirilmesi önerilmektedir. Bu durumu göstermek için küçükbaş hayvan olan koyun model olarak gösterilmiştir. Özellikle koyunlarda sıkça rastlanan *Haemonchus contortus* nematodu üzerinde korunganın olumlu etkileri tespit edilmiştir. *Onobrychis viciifolia*'yı diğer yem bitkileriyle karıştırarak koyunlara yedirilmiş ve *Haemonchus contortus* nematoduna karşı bütünleşmiş bir mücadele yöntemi geliştirilmiştir (Heckendorn ve ark. 2006, Heckendorn ve ark. 2007a, 2007b).

Korunga tüketen ruminantlar üzerindeki bir diğer olumlu etkisi, hayvanlarda yaş tüketimine bağlı şişkinliğe (Rumen timpanisi) neden olmamasıdır. Bu faydalı etki, kondense tanenlerin varlığı ile yakından ilişkilidir. Fransızca “Sainfoin” sözcüğü gerçek bağlamda anlamına baktığımızda “Sağlıklı Saman” anlamına gelmesi korunganın ne denli faydalı olduğunu açıklamaktadır (Hoste ve ark. 2014).

2.2.2 Şişkinlik (Rumen Timpanisi) ve Korunga İlişkisi

Rumende gaz birikimi, rumen şişkinliği olarak tanımlanır. Rumen Timpanisi olarak da bilinen şişkinlik, bazı koşullarda aniden ortaya çıktığı gibi (akut rumen şişkinliği) bazen de şişkinlik uzun bir periyotta seyredebilir (kronik rumen şişkinliği). Akut rumen şişkinliği, sığır koyun ve keçi gibi ruminant hayvanların merada otlama aşamalarında görülür. Genç ve taze baklagil yem bitkileri (özellikle yonca) genç yeşil ot ya da ara ürünler, pancar, pancar yaprakları, donmuş yemler şişkinliğe neden olan yemlerdir. Meralarda meydana gelen şişkinlikler, genelde taze, genç ve sulu baklagillerdir. Bu şişkinlik taze yonca gibi baklagil yem bitkilerinin bünyelerinde barındırdığı pektin metilesteraz enzimleri nedeniyle ortaya çıkar. Pektinler rumende köpükleşmeyi artırarak şişkinliğe neden olurlar. Bu enzim pektinin

yapısından metil alkolü ayırarak polifgalaktronik asidin açığa çıkmasına neden olur. Bu asit ön mide gözlerinin özellikle rumen sıvısının viskozitesini yükseltir ve şişkinlik meydana gelir. Hayvanda şişkinlik belirtileri görülür görülmez müdahale edilmezse hayvan oksijensiz kalarak hayatını kaybeder (Özdüven 2017). Korunga bitkisi içerdiği tanenler sayesinde ve yonca da bulunan pektin metilesteraz enzimini barındırmadığı için yaş tüketilmiş olsa bile hayvanlarda şişkinliğe yol açmamaktadır. Yapılan araştırmalarda hayvanlara verilen yemlerde tanen içerikli yemlerin olması (1-5 mg tanen/g kuru madde) hayvan sağlığı açısından yararlı olduğunu bildirmişlerdir (Özdüven 2017, Li ve ark. 1996)

2.3 Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları) ve Kullanım Alanları

Bilginin her alanında devam eden teknolojik gelişmeler, hangi teknolojilerin yenilikçiliğin etkisinden kurtulacağından ve ne kadar süreceğinden emin olamayacağımız anlamına gelmektedir. Yıllar geçtikçe, moleküler genetik yöntemlerindeki ilerlemeler, özellikle SSR (Basit dizi tekrarları) ve son zamanlarda SNP (Tek nükleotitik polimorfizm) gibi moleküler belirteçlerin yaygın bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır. Çeşitli çalışmalarda özellikle kültürü yapılan ve/veya yabani bitkilerle ilgili olarak, bu belirteçler kullanılarak araştırılacak birçok konu olduğu ortaya konulmuştur (Carneiro-Vieira ve ark. 2016).

Basit dizi tekrarları (SSR) olarak da bilinen mikrosatellitler, hem ökaryotik hem de prokaryotik genomlarında yaygın olarak 1-6 nükleotidli küçük motiflerden oluşan, genellikle kodlama yapmayan, genomda tekrar eden DNA bölgeleridir (Field ve Wills 1998, Toth ve ark. 2000). Genom üzerinde rastgele dağılmış biçimde olan tek baz çifti ile binlerce baz çifti arasında yer alan mikrosatellitlerin tiplerine baktığımızda -mono -di, -tri ve tetranükleotidler mikrosatellitlerin ana tiplerini oluşturmaktadır. Ancak -penta ve -hekza tekrar çiftleri de genellikle mikrosatellit olarak anılmakta, daha uzun tekrar dizilerine “minisatellit” adı verilmektedir (Ellegren 2004). İlk defa mikrosatellit terimi Litt ve Luty tarafından kullanılmıştır (Litt ve Luty 1989). Mikrosatellitlerin bitki genetik çalışmalarında belirteç olarak kullanılmasına baktığımızda dinükleotid ve trinükleotid tekrarların genomda bolca bulunması, araştırmalarda kullanımını yaygınlaştırmıştır (Morgante ve Olivieri 1993). Populasyon düzeyinde, mikrosatellitlerin yüksek polimorfizmi, yeni mutasyonların oluşması, genetik sürüklenme ve tekrarlayan bölgelere sahip genlerde seleksiyon sonucu meydana geldiği kabul edilmektedir (Schlötterer ve Wiehe 1999, Schlötterer 2003). Yapılan araştırmalar belirli tekrar tiplerinin bolluğunun genomik bölgeye göre değiştiğini ve dağılımı incelenen taksonomik gruba özgü olduğunu göstermektedir (Toth ve ark. 2000). Mikrosatellitler, PCR teknolojisinin

yardımla genetik çalışmalarda en çok tercih edilen belirteç grubunu oluşturmaktadır (Weber ve May 1989, Liu 1998). Mikrosatellitlerde tekrar bölgelerini kuşatan DNA dizileri genellikle türün bireylerinde aynı olmasına rağmen (korunmuş diziler) tekrar dizilim sayıları bireyler hatta bireyin homolog kromozomları arasında dahi farklılık gösterebilmektedir (Yang ve ark. 2015). Son yıllarda mikrosatellit belirteçler araştırmacıların dikkatini çekerek genetik haritaların oluşturulmasında yaygın kullanımları ve çeşitli organizmalarda uygulanabilirliği gibi avantajlarıyla araştırmacıları cez p etmiştir (Knapik ve ark. 1998, Cregan ve ark. 1999). Mikrosatellitler hem protein kodlayıcı hem de kodlamayan bölgelerde genomun herhangi bir yerinde bulunabilir. Mikrosatellitlerin yüksek değişkenlikleri nedeniyle nicel genetik varyasyon meydana getirerek ve muhafaza ederek genom evriminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Tautz ve ark. 1986, Kashi ve ark. 1997, Kashi ve Solter 1999)

Mikrosatellitler, kodominant, seçici olarak nötr, polimorfizm oranı yüksek kabul edilen ve mendel kalıtımını gösteren moleküler belirteç olması nedeniyle (Strassmann ve ark. 1996), gen haritalama çalışmalarında, genetik ilişki çalışmalarında, ebeveyn tayininde, türler içi varyasyonların tespitinde, türler arası hibritleşme çalışmalarında, populusyon dinamiği ve filocoğrafya alanlarında sıkça kullanılmaktadır. (Moritz ve Hillis 1996, Chakraborty ve Kimmel 1999). Ayrıca nesli tükenmekte olan populusyonlarda üreme davranışlarının, populusyon yapılarının ve dağılımının etkisini değerlendirmek için de kullanılmaktadır (Beaumont ve Bruford 1999). Bunlarla birlikte, tekniğin maliyetli olması, zengin bir bilgi kütüphanesine ihtiyaç duyması ve çalışılan türlere özgü primerlerin oluşturulması gibi teknik zorluk ve maliyetlerde dahil olmak üzere mikrosatellit temelli moleküler çalışmaların araştırmalarda kullanımı ile ilgili dezavantajları da bulunmaktadır (Miah ve ark. 2013). Özellikle yüksek mutasyon hızları göz önüne alındığında mikrosatellit belirteçler, genetik mutasyonların çevresel etmenlerden nasıl etkilendiğini, çevrenin mutasyonlara olan etkisini belirlemede de imkn sağlamaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda iyonik radyasyona maruz bırakılan bitki ve hayvan örneklerinin mikrosatellit bölgelerindeki mutasyon oranları gözlemlenmiştir (Schloterer ve ark. 2003, Kovalchuk ve ark. 2003). Bu çalışmaların bilim dünyasına farklı dozda radyasyon ve toksik bileşiklerle muamele edilen örneklerin kontrol gruplarıyla mukayese edildiğinde risk değerlendirilmelerinin yapılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir (Ellegren 2004).

2.4 Korunga Bitkisinde Yapılmış Çalışmalar

Literatürde, farklı araştırmacılar tarafından yapılmış korunga dahil olmak üzere birçok farklı baklagil bitki türü üzerine yapılmış biyoteknolojik çalışmalar mevcuttur. Bu araştırmaların başında ruminantlarda metan emisyonu araştırmaları, korunganın antihelmintik etkisinin tespiti, kaba yem değerlerinin analizleri gibi hem morfolojik hem de fiziksel özellikleri üzerine çalışmalar gelmektedir. Korungada moleküler tekniklerin kullanımı ağırlıklı olarak 2000’li yıllardan sonra ivme kazanmıştır. Gelişen teknoloji ve korunganın öneminin keşfedilmesi araştırmacıları korunga bitkisine yönlendirmiştir. Çalışmaları incelediğimizde genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik haritaların oluşturulması, klasik ıslah çalışmaları, transkriptom analizleri ve türlerin tespiti üzerine yapılmış araştırmalar mevcuttur.

2.4.1 Genetik Çeşitlilik Çalışmaları

Birçok araştırmacı tarafından farklı ülkelerde korunga ile farklı amaçlı çalışmalar yapılmıştır. Elçi (1954) tarafından Anadolu’nun önemli yem bitkilerinden biri olan korunga bitkisinin bazı türleri üzerinde (*O.cana* Boiss., *O. arenia* (Kit.) Dc., *O. arenaria* (Kit.) (yabani form) ve *O. armena* Bois.) morfolojik ve biyolojik çalışmalar yapılmıştır. Negri ve ark. (1987) tarafından 1982-1984 yılları arasında İtalya’da korunga bitkisine (*Onobrychis viciifolia* Scop.) ait 20 populasyonda 10 morfolojik karakter üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Negri ve ark. (1987)’nin çalışmasında korunganın tarımsal özellikleri belirlenerek gen kaynaklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aygün ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada Doğu Anadolu Bölgesindeki meralardan toplanan 16 korunga (*Onobrychis sativa* Lam.) populasyonunda yeni çeşit ıslahına kaynak oluşturması amacı ile morfolojik, fenolojik ve bazı tarımsal özellikleri üzerinde araştırma yapılmıştır. Balabanlı ve ark. (2007) tarafından Isparta ilinde yapılan çalışmada korunganın bazı morfolojik ve tarımsal özelliklerini belirlenmiştir. Avcı (2010) tarafından 64 farklı lokasyondan toplanmış *Onobrychis* cinsi içerisinde yer alan 5 seksiyona ait 40 adet korunga türünün tohumları üzerinde ve toplanan tohumlar deneme tarlasına aktarıldıktan sonra morfolojik ve fenolojik gözlemler yapılmış, türler arasında yüksek oranda varyasyon tespit edilmiştir. Ayrıca, bazı türlere ait populasyonlarda tür içi çeşitlilik yüksek oranda farklılık gösterirken, bazı türlerdeki populasyonların benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Cebeci (2011) tarafından Türkiye’de doğal olarak yetişen 40 korunga türünün morfolojik ve fenolojik özellikleri araştırılmış ve akrabalık ilişkileri tespit edilmiştir. Burada örnek verdiğimiz çalışmalardan görüleceği gibi yapılan çalışmalar morfolojik, fenolojik ve tarımsal özellikler üzerinde yapılmıştır.

Korungada genetik çeşitlilik, filogenetik çalışmalar, bireyler ve aksesyonlar arası farklılıkların tespiti, sitogenetik araştırmalar ve gen aktarım çalışmalarına da literatür taramalarında rastlanmıştır. Birsin ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada partikül bombardımanı sistemi kullanılarak korunga bitkisine gen aktarımında uygun parametrelerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, eksplant olarak korunga kotiledonları, mikro taşıyıcı olarak 1,0 µm çapındaki altın parçacıkları ve belirteç gen olarak ise 'pB1221.23' plazmidinde bulunan GUS (*β glucuronidase*) geni kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, korunga kotiledonlarına parçacık bombardımanı ile gen aktarımında, doğrudan gliserol ile hazırlanan mikro taşıyıcıların 1350 psi'lik basınçta fırlatılması ile en iyi sonuca ulaşıldığı bildirilmiştir. Massoud ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada İran'da yayılış gösteren yabani korunga populasyonlarının sitogenetik analizi yapılmıştır. Çalışmada korungaya ait 3 tür (*O. viciifolia*, *O. transcaucasica* ve *O. altissima*) kullanılmıştır. Bu türlerden *O. viciifolia* ve *O. altissima* tetraploid ($2n=4x=28$), *O. transcaucasica*'nın ise diploid ($2n=2x=14$) olduğu tespit edilmiştir.

Onobrychis türü için spesifik olarak dizayn edilmiş mikrosatellit belirteçleri yeterli sayıda bulunmamasına rağmen diğer baklagil türlerinde dizayn edilmiş belirteçlerin korunga türlerinde denenmesine yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur. Carbonero (2011) tarafından yapılan tez çalışmasında, 291 farklı korunga aksesyonu hem morfolojik hem de moleküler tabanlı olarak araştırılmıştır. Aksesyonlar arası çeşitliliğin belirlenmesi için AFLP ve SSR belirteçleri kullanılmıştır. Carbonero ve ark. (2012) tarafından yapılan bir diğer çalışmada *Onobrychis* cinsine ait toplam 291 aksesyonda nüklear (ITS bölgesi) ve kloroplast (*trnL-trnF*) belirteçlerini kullanarak filogenetik karakterizasyon yapılmıştır. Demdoum ve ark. (2012) tarafından yapılan araştırmada *Medicago truncatula*'dan seçilen 24 SSR primeri ve *Glycine max*'dan seçilen 3 SSR primeri kullanılarak 23 korunga aksesyonunda genetik benzerlik oranı belirlenmiştir. Seçilen 27 SSR primerinden 22 tanesinde PCR çoğaltımı başarılı olmuş ve %52 oranında polimorfizm tespit edilmiştir.

Nosrati ve ark. (2012) korunga bitkisinde yaptıkları çalışmada, 5 RAPD primerleri ile farklı bölgelerden ve farklı stres koşulları altında olarak toplanan 5 korunga populasyonunda, populasyonlar içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliği araştırmışlardır. Çalışmalarında aynı stres koşulları altında olan populasyonların benzer olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bandara ve ark. (2013), 41 *Onobrychis* türüne ait 78 aksesyonda nüklear (ITS bölgesi) ve kloroplast (*matK*) belirteçlerini kullanarak moleküler filogenetik analizler yapmıştır. Toluei ve ark. (2013a), İran bölgesinden örneklenen 14 *Onobrychis altissima* populasyonunda ISSR primerleri kullanarak moleküler karakterizasyon çalışması yapmıştır. Yine Toluei ve ark. (2013b) tarafından yapılan bir diğer çalışmada *O. carduchorum*'un İran populasyonlarında nüklear ribosomal DNA (ITS

bölgesi) ve ISSR primerleri kullanılarak genetik varyasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada hem ITS hem de ISSR verilerinin *O. carduchorum*'un populasyonun filogenetik olarak farklılaşma zamanına bakıldığında en genç tür olduğunu desteklediği bildirilmiştir.

Okcu ve ark. (2013) tarafından 5 *Onobrychis* seksiyonuna ait Doğu Anadolu bölgesinden toplanan türlerde 15 RAPD belirteci kullanılarak ve SDS-PAGE ile protein analizi ile genetik karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Rasouli ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada 36 korunga populasyonunda genetik çeşitliliğe bakmışlardır. 5 RAPD primerinin kullanıldığı bu çalışmada Divandara (%80) populasyonunun yüksek polimorfizm gösterdiği, Aligodarz (%49) populasyonunun ise düşük polimorfizm gösterdiği tespit edilmiştir.

Zarrabian ve ark. (2013)'nın çalışmasında, Dünya çapından örneklenen 80 korunga aksesyonunda anatomik, morfolojik ve moleküler (ISSR analizi ile) belirteçler kullanılarak genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Çalışmada 45 ISSR primeri kullanılmış, değerlendirmeye alınan 22 ISSR primerinden toplam 275 bant elde edilmiştir. Çalışmada genetik çeşitliliğin büyük çoğunluğunun aksesyonlar arasında olduğu, coğrafik gruplar arasındaki çeşitliliğin daha az olduğu ve Asya ile Doğu Avrupa'nın türün ana çeşitlilik merkezinin olabileceği bildirilmiştir. Hejrankesh ve ark. (2014) Azerbaycan 10 yerel korunga çeşitlerinde RAPD moleküler belirteçleriyle yaptıkları genetik çeşitliliğin belirlenmesi çalışmalarında, 20 RAPD primeri kullanılmış, bu primerlerden 10 tanesi polimorfizm göstermiştir.

Avcı ve ark. (2014) tarafından Türkiye'den örneklenen 58 *Onobrychis* taksonu üzerinde yapılan çalışmada yakın akraba türlerine ait 95 SSR lokusu denenmiş, bu lokuslardan 14 tanesi genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. Bu çalışmada belirlenen genetik çeşitlilik ve PIC değerleri, *P. vulgaris* primerlerinin *Onobrychis* genomu için en bilgi verici lokuslar olduğunu göstermiştir. Ayrıca, en yüksek genetik çeşitlilik *Onobrychis argyrea* Boiss. subsp *argyrea* Boiss. türünde, en düşük genetik çeşitlilik *Onobrychis cornuta* (L.) Desv. türünde bulunmuştur. Kar ve ark. (2014), nüklear ribosomal DNA (ITS bölgesi) ve plastid *trnL-trnF* DNA dizi bilgisini kullanarak 73 *Onobrychis* türünde moleküler filogenetik çalışmalar yapmıştır.

Kempf ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, 3 korunga populasyonunda kendine döllenmenin sonuçlarını ve bitki morfolojisine etkisi araştırılmıştır. Yapay ve doğal döllenme yapılarak bireyler elde edilmiş, ilk defa moleküler tabanlı belirteçler (4 SRAP primeri ve 2 SSR primeri) kullanılarak analiz yapılmıştır. Çalışma sonucunda SRAP markörleriyle kendine döllenmiş veya yabancı döllenmiş bireyleri ayırt edilebileceği görülmüş, SSR markörleriyle bu sonuç desteklenmiştir.

Zarrabian ve Majidi (2015) İran'da yaptıkları bir araştırmada, 33 korunga türü 102 aksesyonda 22 ISSR primeri kullanarak türler içi ve türler arası genetik çeşitlilik incelenmiştir. Çalışılan 22 ISSR primerinden 243 bant elde edilmiş, 235 bant polimorfik olarak (%96,7) saptanmıştır. Polimorfik bilgi içeriği (PIC) ortalama 0,41 olarak belirlenmiştir. Irani ve ark. (2015) yaptıkları diğer bir çalışmada, 22 farklı korunga aksesyonunu SSR belirteçleri kullanarak incelemiştir. Elde edilen verilere göre PIC değerinin 0,20-0,43 arasında değiştiği (ortalama 0,33) tespit edilmiştir. AMOVA'ya göre genetik çeşitliliğin %69,5 oranında populasyon içinde olduğu belirlenmiştir.

Nosrati ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, Doğu Azerbaycan ve İran yabani korunga populasyonları arasındaki ekocoğrafik varyasyon dört ISSR belirteçleriyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar populasyonlar arasında polimorfik ISSR lokuslarının %38,75 ile % 61,25 arasında değiştiğini göstermiştir. Kempf ve ark. (2016a) tarafından yapılan çalışmada, SSR belirteçleri ile 32 korunga germplazmalarının polimorfizm oranları saptanmıştır. 32 bireyde 400 primer denenmiş 101 primer polimorfizm göstermiştir. Bireyler arasında 1154 allel tespit edilmiş ve 250 allel bireylere özgü (private) allel olarak bulunmuştur. Ortalama PIC değeri 0,14-0,36 arasında belirlenmiştir. Bu çalışma gelecekte yapılacak olan korunga ıslah ve moleküler çalışmalarına katkı sağlamak ve korunga orijinlerinin belirlenmesinde faydalı olmak amacıyla yapılmıştır. Kempf ve ark. (2016b)'nın yaptıkları diğer bir çalışmada, 3 korunga populasyonunda kendileme oranlarının tespiti için SRAP ve SSR belirteçlerini kullanmıştır. Yapay ve doğal tozlaşma ortamları sağlanarak tozlaşma sağlanmış, yapay tozlaşma ortamında %64,8 oranında ve doğal tozlaşma ortamında %3,9 oranında kendileme olduğu tespit edilmiştir.

2.4.2 Korunga Islah Çalışmaları

Çoğu yem bitkileri ıslah programlarının amacı, kuru madde verimini artırmak, bitkide sürekliliği sağlamak ve otlatmaya toleransı geliştirmektir (Sottie 2014). Korunganın sahip olduğu üstün özelliklerden dolayı Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'nın birçok yerinde uzun yıllar önemli bir yem bitkisi olarak yetiştirilmesine rağmen 1960lı yıllarda ekim nöbeti sistemlerinde kışlık tahılların yaygınlaşması ile genelde tüm baklagillerin ekim alanlarında daralmalar meydana gelmiştir (Rochon ve ark. 2004). Bunun sonucunda nispeten veriminin daha düşük olması, ömür uzunluğunun daha kısa olması ve ilk biçimden sonraki gelişmesinin yavaş olması gibi sebeplerden dolayı dünyanın bir çok yerinde korunga bitkisinin yetiştiriciliği hemen hemen terk edilerek diğer yem bitkilerine yönelme olmuş ve sadece Doğu Avrupa, İspanya, İtalya, İran ve ülkemizin belirli alanlarında tarımı yapılır hale gelmiştir (Eken ve ark.,

2004). Ancak günümüzde tüm dünyada şartlar değişmeye başlamıştır ve baklagil bitkilerine özelliklede korungaya olan ilgi tekrar artmaya başlamıştır. Buna paralel olarak ortaya çıkan Avrupa Birliği (AB) Baklagil Yem Bitkileri Araştırma Projesi olan Healthy Hay, 2012 yılında AB finansörlüğünde 12 araştırmacı Kurum ve Kuruluşun dâhil olduğu, Avrupa genelinde faaliyet gösteren bir araştırma projesidir. 3.5 Milyon € bütçeli olan bu projede; 362 farklı korunga türü tespit edilmiştir. Healthy Hay Projesi'nin bilimsel ve teknik hedeflerini bir bütün olarak baktığımızda, hayvanlarda sağlıklı beslenme, çevre ve veteriner yararlarını koruyarak AB'de yeni korunga ıslah programlarının temellerini atmaktır. Proje doğrultusunda tespit edilen türlerden ümit var olanlar kullanılarak çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar;

- Genetik Analizler
- Tarımsal Değerlendirmeler
- Biyolojik ve Kimyasal Analizler
- Hayvan Beslenme İçerikleri
- Çevresel Değerlendirmeler
- Anti parazit Yararları
- Korunga Literatür Taramaları için Metodolojilerin Geliştirilmesi başlıkları altında toplanmaktadır (Anonim 2017c).

Günümüzde korunga ıslah çalışmaları belirli yerlerde yapılmakta ve sadece geliştirilen birkaç çeşit dünya çapında kullanılmaktadır. Avrupa Komisyonu Bitki Çeşitliliği Kataloğu ve Veritabanında kayıtlı 23 korunga çeşidi yer almaktadır (Anonim 2017d). Bu çeşitlerin menşelerine baktığımızda yalnızca birkaç ülkeden gelmekte bu ülkelerin başında İtalya, İsviçre ve Doğu-Güney Avrupa gelmektedir. Islah çalışmalarının geçmişine baktığımızda 1940 ve 1960'lara kadar uzanmaktadır, 20 yıllık bir aradan sonra 1990'larda tekrar ivme kazanmıştır (Carbonero 2011). Korunga çeşitleri ve geliştiren ülkeler arasında Melrose ve Nova (Kanada), Fakir (Fransa), Eski, Remont ve Renumex (Amerika Birleşik Devletleri), Emry (Macaristan), Zeus ve Vala (İtalya) ve Othello (Avustralya) yer almaktadır. Melrose, 1963 yılında Kanada'da geliştirilen ilk çeşittir ve onu 1980'de piyasaya sürülen Nova takip etmektedir (Goplen ve ark. 1991). Ülkemizde korunga bitkisinde ıslah edilen sadece 2 çeşit mevcuttur. Bunlardan ilki Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından 2003 yılında ilk ıslah edilen korunga çeşidi Özerbey, ikincisi ise Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Tarafından 2005 yılında ıslah edilen Lütfübey çeşididir (Anonim 2017e, Anonim 2017f).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında; bitki materyali olarak ülkemizin tescilli 2 korunga çeşidi ve biri yurt dışı kaynaklı diğer ikisi yurt içi kaynaklı 3 populasyon kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Korunga populasyonları Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Çayır Mera Yem Bitkileri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Metin TUNA'dan temin edilmiştir. Elde edilen tohumlar serada çimlendirilmiş 8 Haziran 2016'da tarlaya dikilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan korunga çeşit ve populasyonları

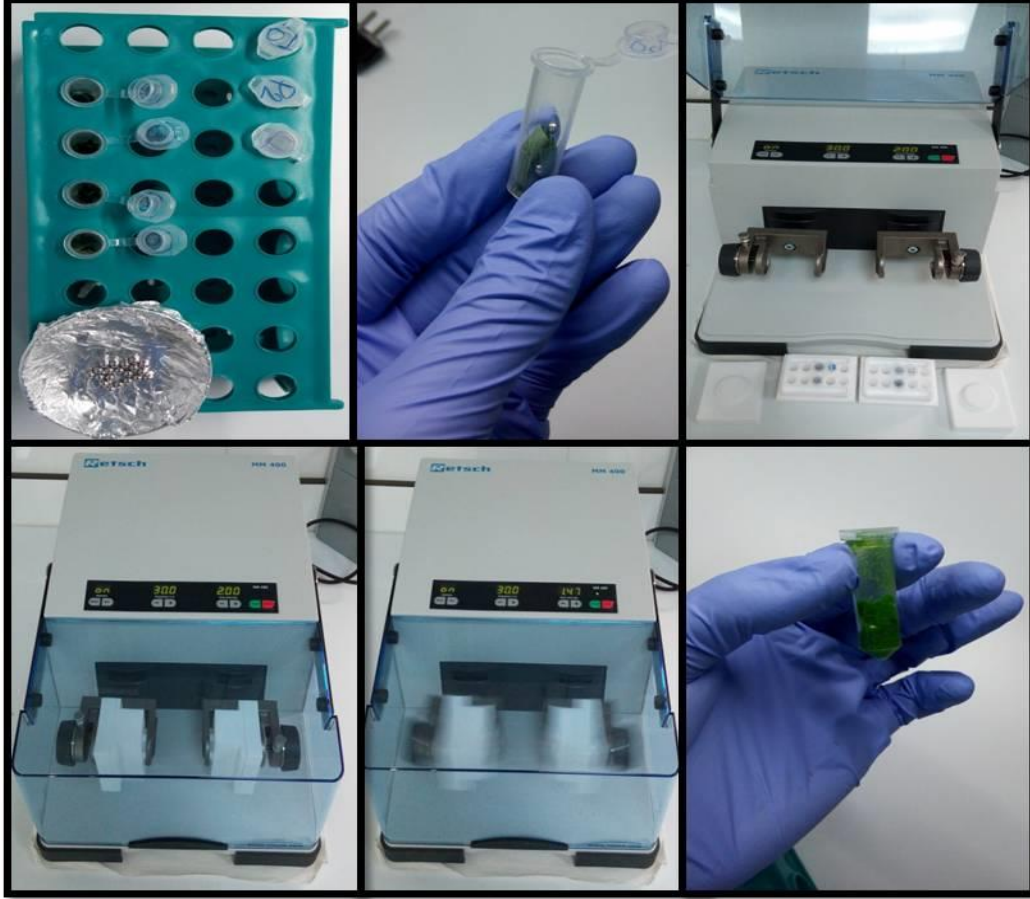
Çeşit/Populasyon Kodu	Çeşit/Populasyon Adı	Orijin
Ö	Özerbey	Tescilli çeşit
L	Lütfübey	Tescilli çeşit
P	Pleven	Bulgaristan populasyonu
K1	Kırşehir-1	Kırşehir bölgesinde yetiştirilen yerel populasyonlar
K2	Kırşehir-2	

3.2 DNA İzolasyonu

Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) bitkisinden saf DNA elde etmek içerdiği yüksek tanen ve ikincil bileşikler nedeniyle güçleşmektedir. Araştırmacılar korunga ve tıbbi aromatik bitkiler gibi polisakkarit ve polifenolce zengin bitkilerde yüksek molekül ağırlıklı DNA izolasyon problemlerini şu şekilde tanımlamışlardır; DNA'nın endonükleazlara bağlı olarak parçalanması, yüksek derecede yapışkan olan polisakkaritlerin ortak izolasyonu, polifenoller ve diğer ikincil bileşiklerin saf DNA eldesini önlemesi ve doğrudan veya dolaylı olarak enzimatik reaksiyonlara müdahale ederek saf DNA izolasyonunu etkilemesidir (Weishing ve ark. 1995).

Kaliteli ve iyi miktarda DNA izolasyonu yapabilmek için bu tez çalışma kapsamında birden çok izolasyon metodu ve modifikasyonları denenmiştir (Thompson ve Murray 1980, Dellaporta ve ark. 1983, Doyle Doyle 1990, Souza ve ark. 2012, Healey ve ark. 2014). Bu metotların haricinde Vivantis GF-1 DNA izolasyon kiti de denenmiştir. DNA izolasyonu optimizasyonları sonucunda kalite ve miktar açısından en iyi olan ve PCR analizlerinde istenilen kalitede sonuç veren DNA örneği Doyle Doyle (1990) metodu kullanılarak elde edildiğinden Doyle Doyle (1990) tarafından bildirilen metot kullanılmıştır. Yapılan bu tez çalışması kapsamında her bir korunga populasyonuna ait 20 bireyden taze ve genç yaprak

örnekleri alınmış, Retsch® MM4000 modeli bir homojenizatör yardımıyla 2 ml'lik santrifüj tüpleri içinde ezilmiştir. Homejenizasyon işlemi için için her bir tüpe 3'er adet 3 mm'lik bilye eklenmiştir. Homejenizasyon süresi 4 dk ve titreşim frekansı 30 olarak ayarlanmıştır. İyice ezildiklerinden emin olduktan sonra homejenizasyon işlemi tamamlanarak ve bilyeler mıknatıs yardımıyla tüplerden çekilerek örnekler DNA izolasyonuna hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.1).

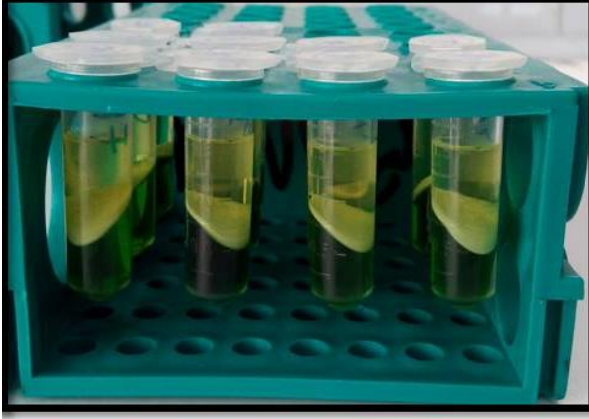


Şekil 3.1. Korunga örneklerinin Retsch® MM4000 model vibrasyonlu homojenizatör ile ezilmesi

DNA izolasyonunda yararlanılan protokolün basamakları şöyledir;

1. İyice ezilen taze yaprak örneklerinin üzerine 600 µl önceden 65°C ısıtılmış özütleme tamponu (200 mM TRIS-HCl, 50 mM EDTA, 2M NaCl, 10mM β-Mercaptoethanol, %2 CTAB, pH:8) eklenmiştir.
2. Her bir tüpe bir miktar PVP eklenerek iyice vortekslenmiş, çalkalayıcılı ısıtıcı blokta 65°C de 1 saat 1000 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir.
3. Her bir örneğe 350 µl 5M potasyum asetat eklenmiş, nazikçe çalkalanmış buzlu kaptan +4°C'de buzdolabında 20 dk bekletilmiştir.
4. 13000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 20 dk santrifüj edilmiştir.

5. Üstteki sıvı kısım (supernatant) steril 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
6. Her bir tüpe eşit hacimde Choloroform:Isoamylalcohol (24:1) eklenmiş ve 15 dk vortekslenmiştir.
7. 10000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir.
8. Üstteki sıvı kısım steril 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
9. Her bir tüpe eşit hacimde Choloroform: Isoamylalcohol (24:1) eklenmiş ve 15 dk vortekslenmiştir (Şekil 3.2).

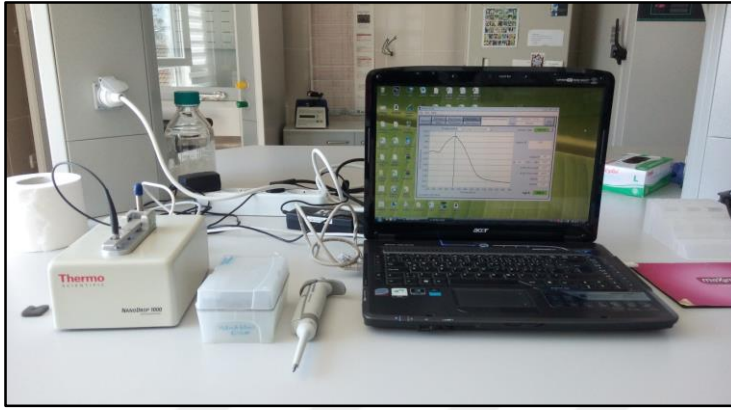


Şekil 3.2. Homojenizasyon sonrası örneklere Choloroform: Isoamylalcohol eklenerek santrifüj sonrası faz ayrımı

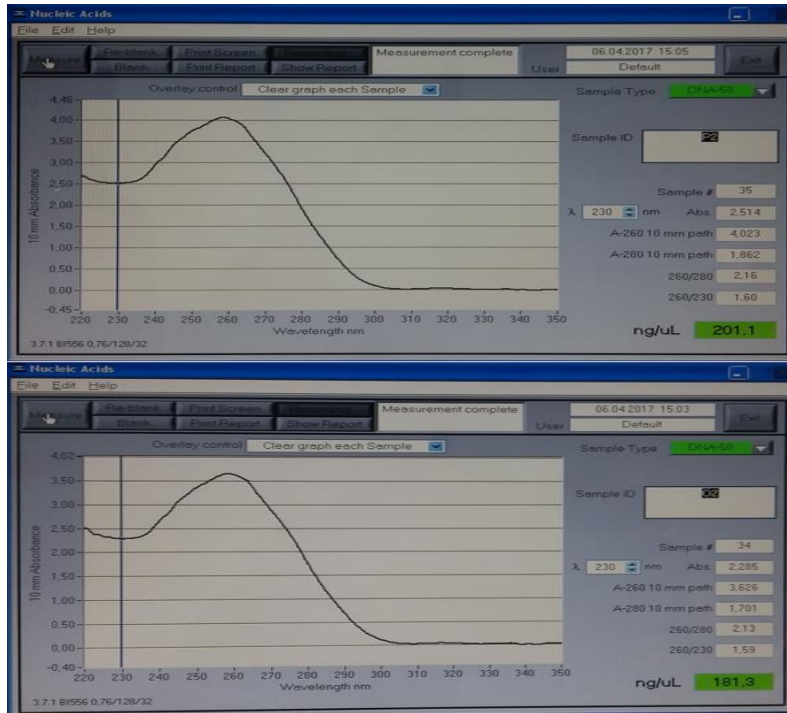
10. 10000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir.
11. Üstteki sıvı kısım steril 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
12. Her bir örneğe 800 µl soğuk İzopropanol eklenmiş, -20°C'de gece boyu bekletilmiştir.
13. 13000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 15 dk santrifüj edilmiştir.
14. Üst kısım dökülerek pellet bir miktar kurumaya bırakılmıştır.
15. Yavaşça yerinden hareket ettirilen pellet üzerine 1000 µl soğuk %70 lik ethanol eklenmiş, 13000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir.
16. Üst kısım yavaşça dökülerek pellet bir miktar kurumaya bırakılmıştır.
17. Yavaşça yerinden hareket ettirilen pellet üzerine 1000 µl soğuk %70 lik ethanol eklenmiş, 13000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir.
18. Üst kısım yavaşça dökülerek alkolün iyice uçması için tüpler ters çevrilmiş şekilde kurumaya bırakılmıştır.
19. Her bir örneğe 100 µl TE tamponu (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH:8) eklenmiş, 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
20. Elde edilen DNA örnekleri PCR işlemleri gerçekleşinceye kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3 İzole Edilen DNA Örneklerinde Kalite ve Miktar Tayini

İzole edilen DNA örneklerinin kalite ve miktar tayinleri (UV ışığı altında 260nm/280nm ve 260nm/230nm) Nanodrop® 1000 spektrofotometre cihazı yardımıyla ölçülmüştür (Şekil 3.3). DNA örneklerinin ölçümleri, Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında ve Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Moleküler Genetik Laboratuvarında yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucu, ölçülen DNA miktarı, 24,82 ng/μl ile 396,34 ng/μl arasında değişmekte, 260/280 nm değeri ise 1,65 ile 2,24 arasında belirlenmiştir (Şekil 3.4).

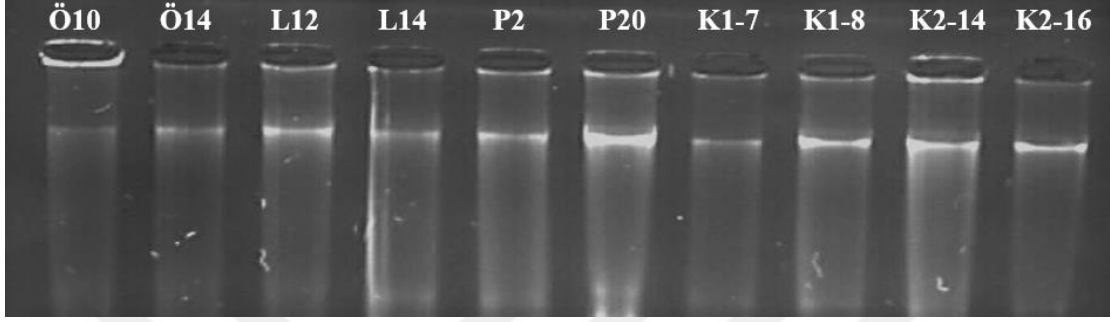


Şekil 3.3. Thermo Scientific Nanodrop® 1000 Spektrofotometre cihazı kullanılarak DNA miktar ve kalite tayini



Şekil 3.4. Nanodrop® 1000 spektrofotometre ile miktar ve kalitesi ölçülmüş DNA örnekleri

İzole edilen DNA'ların kalitesini ve kırıkların olup olmadığını kontrol etmek için izole edilen örneklerden 10 µl DNA ve 2 µl yükleme boyasıyla karıştırılmıştır, RedSafe Nucleic Acid Staining Solution içeren %1'lik agaroz jel içinde 1X TBE tamponunda 90 Voltta 45 dk yürütülerek UV ışık altında Gel Imaging System Vilber Lourmat Quantum ST5 ile görüntü alınmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Korunga çeşit ve populasyonlarına ait izole edilen bazı DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri

3.4 Mikrosatellit (SSR) Primerlerinin Belirlenmesi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri ve Elektroforez

Elde edilen DNA'lar genomik DNA'ya spesifik SSR primerleri kullanılarak SSR lokuslarının çoğaltılmasında kullanılmıştır. Çeşitli literatür taramaları sonucunda korunga moleküler çalışmalarında korunganın yakın akraba türlerinden geliştirilen SSR primerlerinin kullanıldığı belirlenmiştir. Bu araştırmalar sonucunda (Peakall ve ark. 1998, Gaitan-solis ve ark. 2002, Julier ve ark. 2003, Gutierrez ve ark. 2005, Zhang ve ark. 2007, Carbonero 2011, Demdoun ve ark. 2012, Avcı ve ark. 2014) korunga genotiplerinin genetik çeşitliliğini belirlemek için kullanabileceğimiz SSR lokusları taranmış ve bu araştırmacıların kullandığı korungaya yakın akrabalarından geliştirilen primerler çalışmamız için denenmiştir. Kempf ve ark. (2016a) tarafından yapılan çalışmada 32 korunga aksesyonu üzerinde 400 SSR primeri geliştirilerek denendiği ve bu primerlerden 101 SSR primerinin polimorfizm gösterdiği bildirilmiştir, bu nedenle bu tez çalışmasında korungaya özgü olan 101 SSR primerinden seçilmiş 10 SSR primer çifti çalışılmak üzere belirlenmiştir. Belirlenen primerlerin; polimorfizm oranlarının yüksek olması, polimorfizm sağlanması için allel sayılarının yeterli düzeyde olması, aynı işaretleyicilerle işaretli olan primerlerin multipleks PCR analizi yapabilmek için PCR ürünlerinin farklı uzunluklarda olması ve PIC (polimorfizm bilgi içeriği)

değerinin de artıkça polimorfizm oranının artacağı için, PIC değerinin yüksek olması gibi özellikler göz önünde bulundurulmuştur.

Bu çalışmada, ekonomik olması sebebiyle Schuelke (2000) tarafından geliştirilen M13 işaretleme yöntemi kullanılmış, kullanılan primerler Çizelge 3.2’de verilmiştir. M13 kuyruklu primer yöntemi, sıklıkla SSR’ların analizi için floresan primer etiketleme maliyeti, etiketlenmemiş bir primer sentezinden genellikle beş ile on kat daha pahalı olması sebebiyle çalışmaların daha ekonomik olması için geliştirilmiştir. Bu üçlü primer stratejisinde PCR, bir M13 sekanslama primerinin sekansı ile aynı olan, 5’-ucunda bir nükleotid uzantısı olan bir ileri primer, standart bir uzunluktaki geri primer ve floresan etiketli bir M13 primer kullanılarak gerçekleştirilmektedir. PCR sırasında SSR ürünü, ilk birkaç döngüden sonra M13 primerlerinin katılımını takiben floresan olarak etiketlenmiş olmaktadır. Bu nedenle, her bir SSR lokusu için floresanla etiketlenmiş bir primer sentezlemek yerine yalnızca M13 primer etiketli bir primer yeterli olmaktadır (Schuelke 2000).

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılmak üzere belirlenen SSR primerlerine ait bilgiler

Primer Adı	Primer Dizisi (Sekansı) 5' → 3'	Tekrar Motifi
M13-FAM OVK036-F OVK036-R	5'-FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTGTGTTAAAGGGGTGAAAACAT-3' 5' CATTTTGACAAACAGTATCC 3'	(AGGT) ₆
M13-VIC OVK094-F OVK094-R	5'-VIC- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTACCGATCTTAGGATAGATGGA 3' 5' ACTTTTGGTTGCTTAGTCGAT 3'	(TTGCG) ₅
M13-NED OVK125-F OVK125-R	5'-NED- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTAAATTTAAGCACCGGAATAAC-3' 5' AAAGCAAAAGGGCTACTAAAG 3'	(CATTT) ₅
M13-FAM OVM033-F OVM033R	5'-FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTCAAGGCTTATTTGGTTAACAG-3' 5' ATACTATTTCCCATGCCTACC 3'	(CTC) ₆
M13-FAM OVK161-F OVK161-R	5'-FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTAAAGCTTTCTACACGTTGGTA-3' 5' TGGGTTTTTACACTCTGTGAT 3'	(TTCC) ₆
M13-PET OVM125-F OVM125-R	5'-PET- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTATTCTTTCAACAAGCAAGTGA-3' 5' CTGCAATTCCATCCTATTTTA 3'	(AAATT) ₅
M13-VIC OVK046-F OVK046-R	5'-VIC- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTTCAACCACATTATAAACCTCA-3' 5' CGCGAAATCATAGTTCACTT 3'	(AGTG) ₆
M13-NED OVK061-F OVM061-R	5'-NED- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTTTAACACACGTACGTACCACA-3' 5' TTTGTCGTTGATCGTTAAGTT 3'	(GTA) ₆
M13-PET OVK174-F OVK174-R	5'-PET- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTACATGATCGTGAATATGAAGC-3' 5' CAGCAGCAATCAATATATCATC 3'	(GGCCC) ₅
M13-PET OVK101-F OVK101-R	5'-PET- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAACGACGGCCAGTGTGAGTTTCAGACACAGAGC-3' 5' AATAGCTCCACAATAACTCC 3'	(CTAA) ₆

Bu tez çalışma kapsamında, SSR primerleri için PCR analizleri Kempf ve ark. (2016a)'nın çalışmasındaki reaksiyon koşullarında ve PCR döngülerinde denenmiş, ayrıca laboratuvar şartlarımıza uygun gerekli optimizasyonları yapılmıştır. PCR optimizasyonu için farklı DNA miktarı (10, 20, 50 ng), primer (1, 2, 3 ve 5 pmol), dNTP (0,2, 0,3 ve 0,5 mM), MgCl₂ (1,5, 2 ve 2,5 mM) ve *Taq* DNA polimeraz (1, 1,5 ve 2 U) konsantrasyonları denenmiştir. Optimize edilen reaksiyon şartları Çizelge 3.3'de verilmiştir. Ayrıca optimize edilen PCR döngüleri Çizelge 3.4'de verilmiştir. PCR işlemine başlarken, önce her bir DNA örneğinden 2 µl (yaklaşık 100 ng) 0,2 ml PCR tüplerine konulmuş ve daha sonra ise PCR karışımı (mastermix) hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımı vorteks karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra her bir tüpe 8 µl dağıtılıp toplam son hacim 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. DNA amplifikasyonları Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4 de gösterilen koşullarda Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler ve Applied Biosystems® Proflex™ PCR System Thermal Cycler kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.6).

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilmiş PCR koşulları

PCR Karışımı	Son Konsantrasyon
10X PCR Tamponu	1X
MgCl₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
M13 Primer	3 pmol
İleri (F) Primer	1 pmol
Geri (R) Primer	3 pmol
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	1,5 U
DNA	100 ng

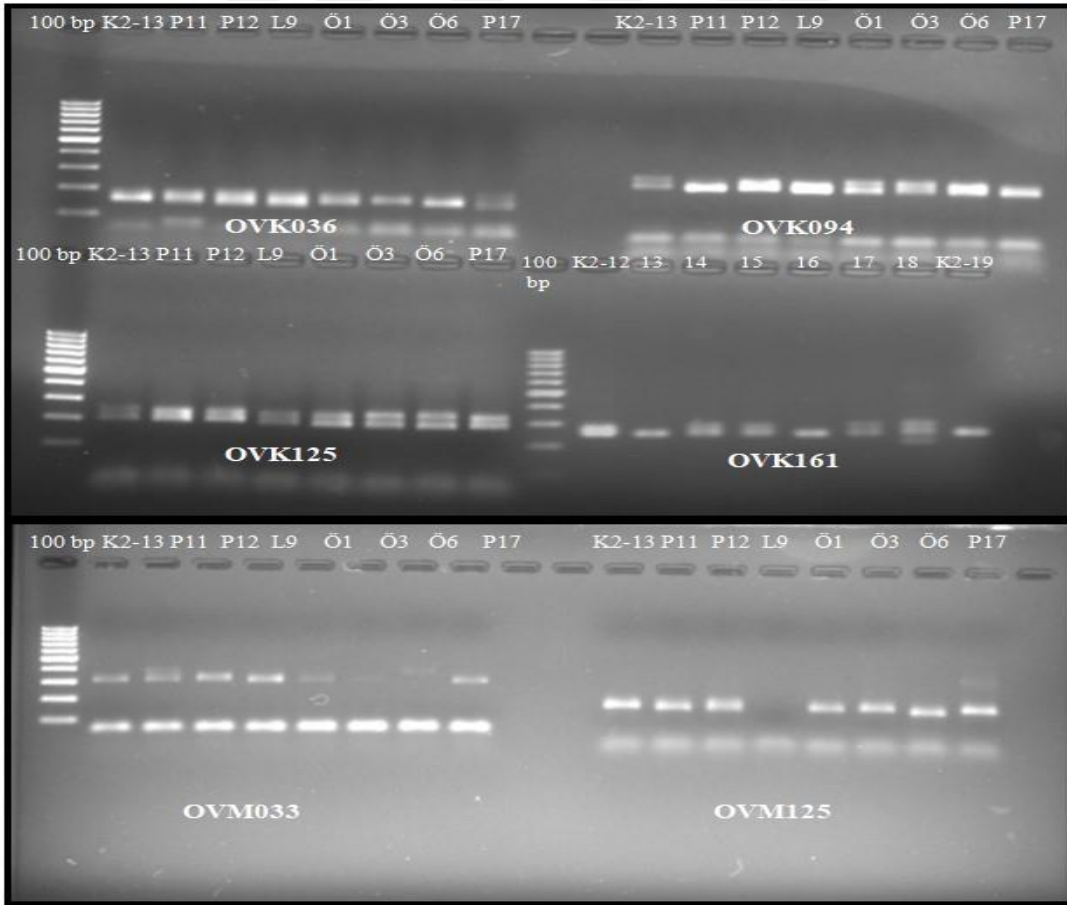
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	94°C	5 dk	1
2	94°C	30 sn	30
	56°C	45 sn	
	72°C	45 sn	
3	94°C	30 sn	10
	53°C	45 sn	
	72°C	45 sn	
4	72°C	10 dk	1

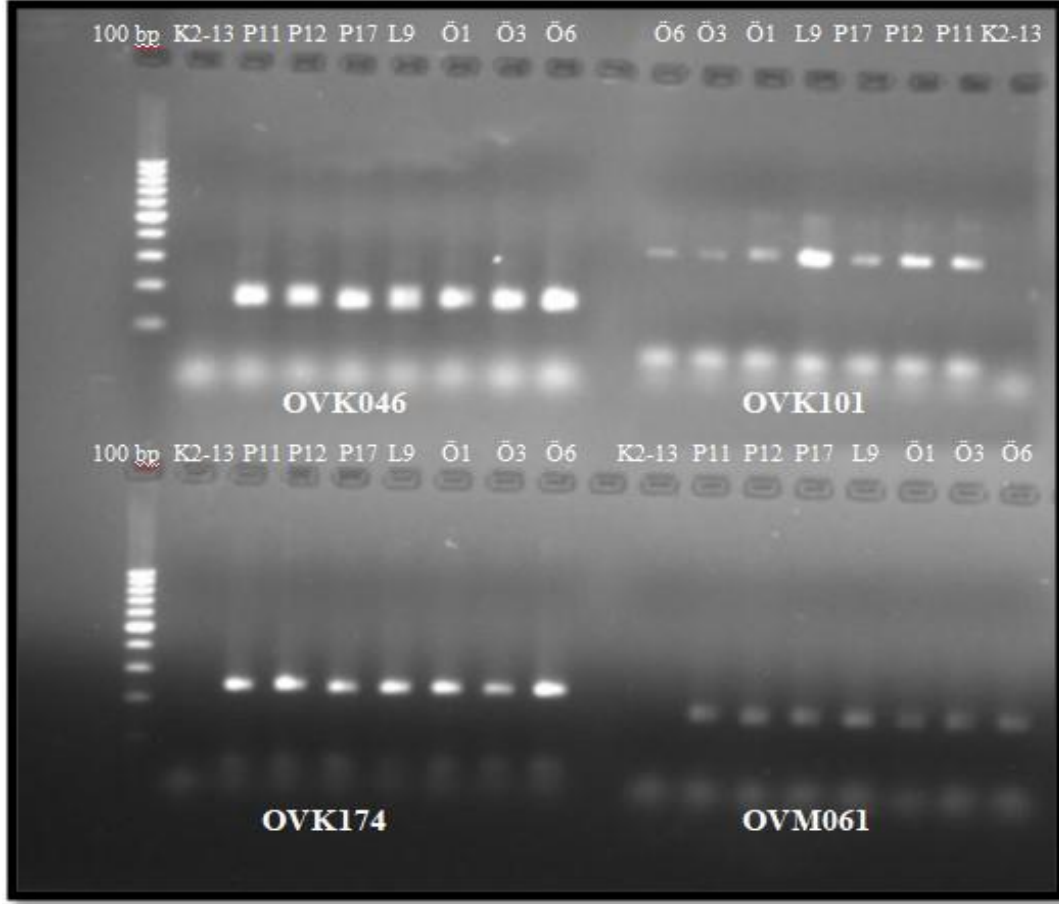


Şekil 3.6. Thermal Cycler cihazlarında DNA amplifikasyonları ve Elektroforez

PCR ürünleri elektroforez de görüntüleme yapılana kadar, alüminyum folyoya sarılmış bir şekilde +4°C’de tutulmuştur. Bantların istenilen bölgede olup olmadığını ve spesifik bağlanmaların olup olmadığını kontrol etmek için RedSafe Nucleic Acid Staining Solution içeren %2’lik agaroz jelde 1X TBE tamponunda 110 Voltta yaklaşık 120 dk yürütülmüştür (Şekil 3.7, Şekil 3.8). Bantlar UV ışık altında Gel Imaning System Vilber Lourmat Quantum ST5 ile görüntülenmiştir.

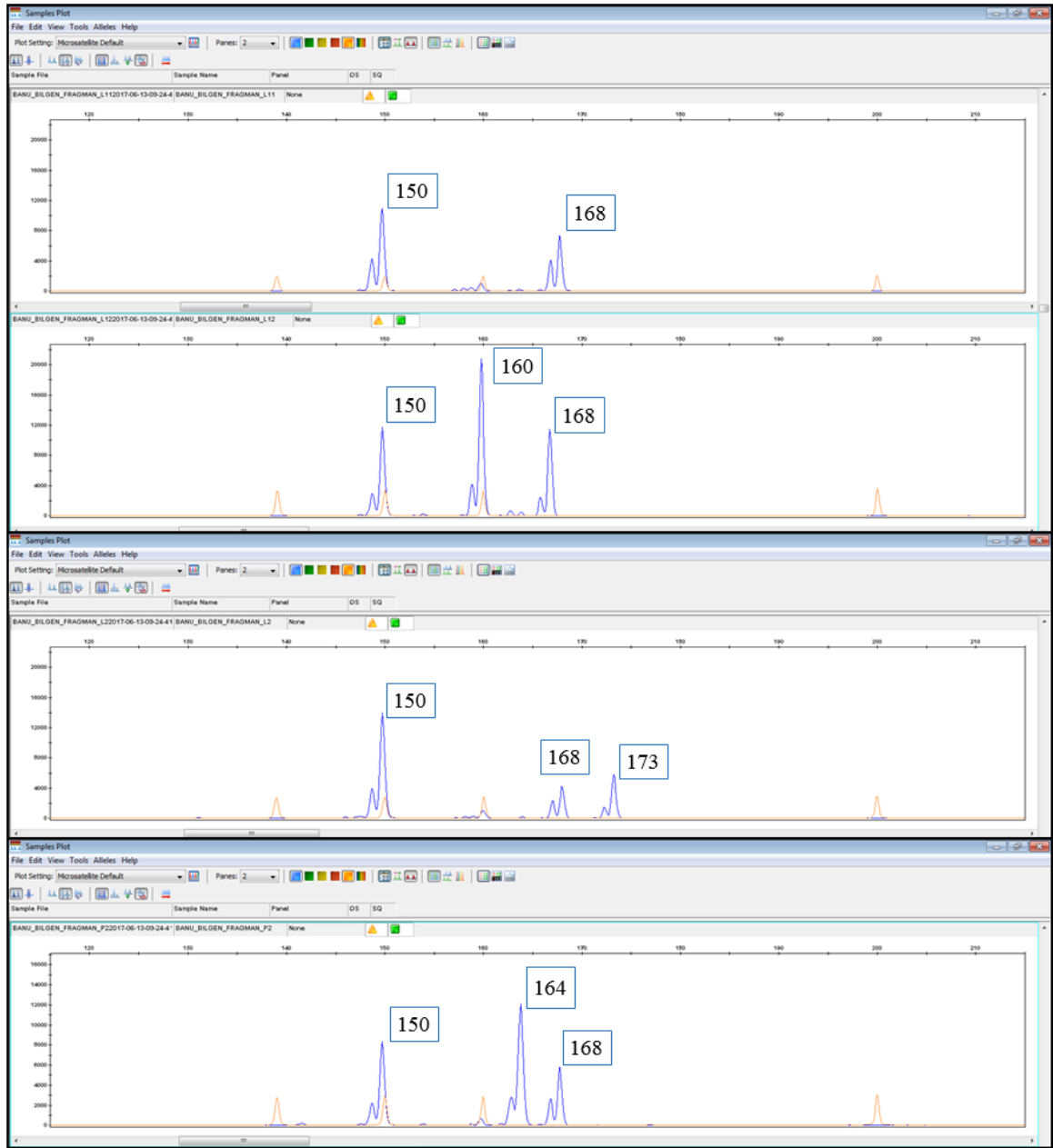


Şekil 3.7. *O. viciifolia* çeşit ve populasyonlarına ait bazı örneklerin PCR ürünlerinin UV ışık altındaki jel görüntüsü (OVK036, OVK094, OVK125, OVK161, OVM033, OVM125)



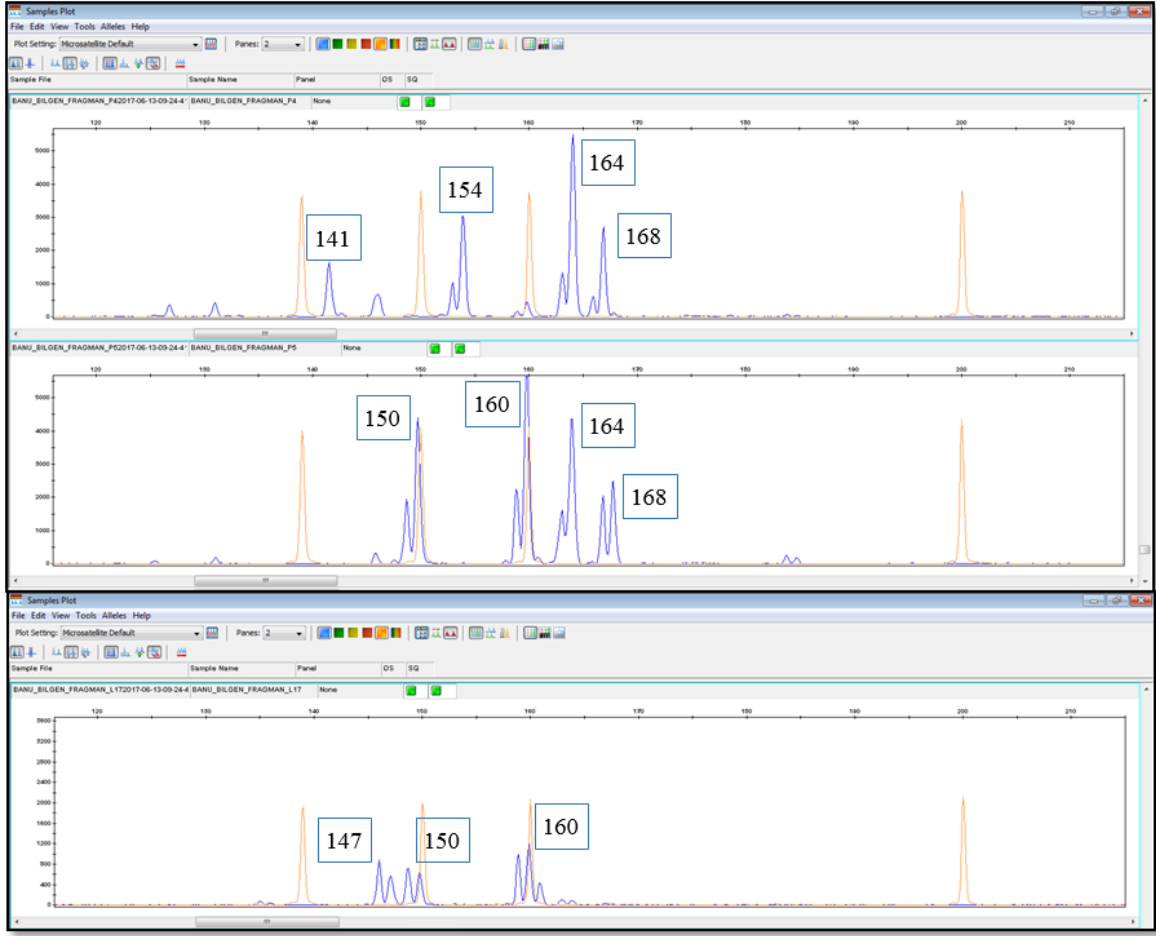
Şekil 3.8. *O. viciifolia* çeşit ve populasyonlarına ait bazı örneklerin PCR ürünlerinin UV ışık altındaki jel görüntüsü (OVK046, OVK101, OVK174, OVM061)

Elde edilen PCR ürünlerinin DNA parça (fragment) büyüklüklerini belirlemek için hizmet alımı yapılmıştır. Çalışılan çeşit ve populasyonlardaki örneklerden DNA parça (fragment) analizlerinin sonuçları laboratuvarımızda GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) yazılımı ile değerlendirilmiş ve primerlerin sahip olduğu allellerin büyüklükleri tespit edilmiştir. GeneMapper Software 5.0 programı yardımıyla incelenen primerlere ait allellerin büyüklüklerini gösteren örnekler aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18).

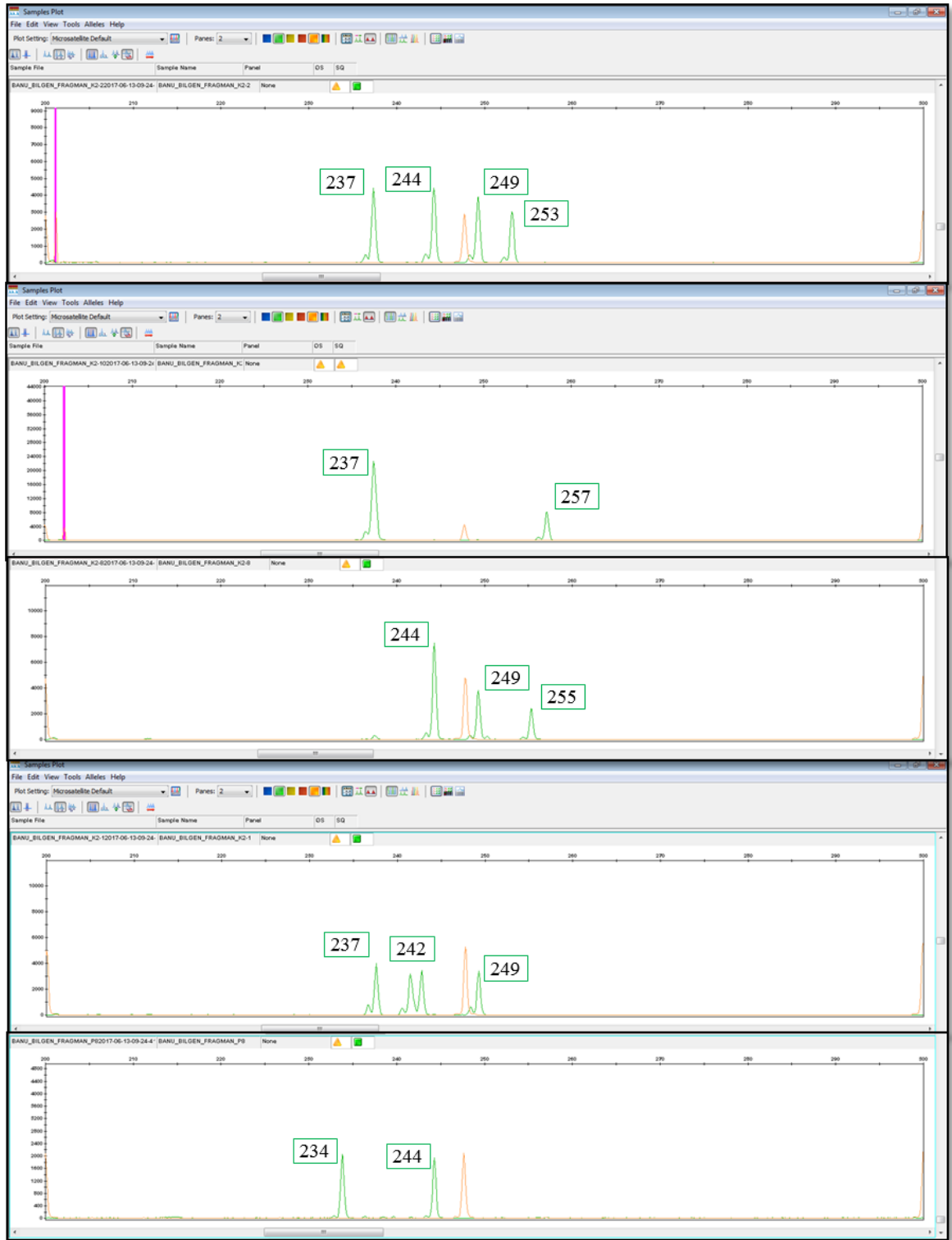


Şekil 3.9. OVK036 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü

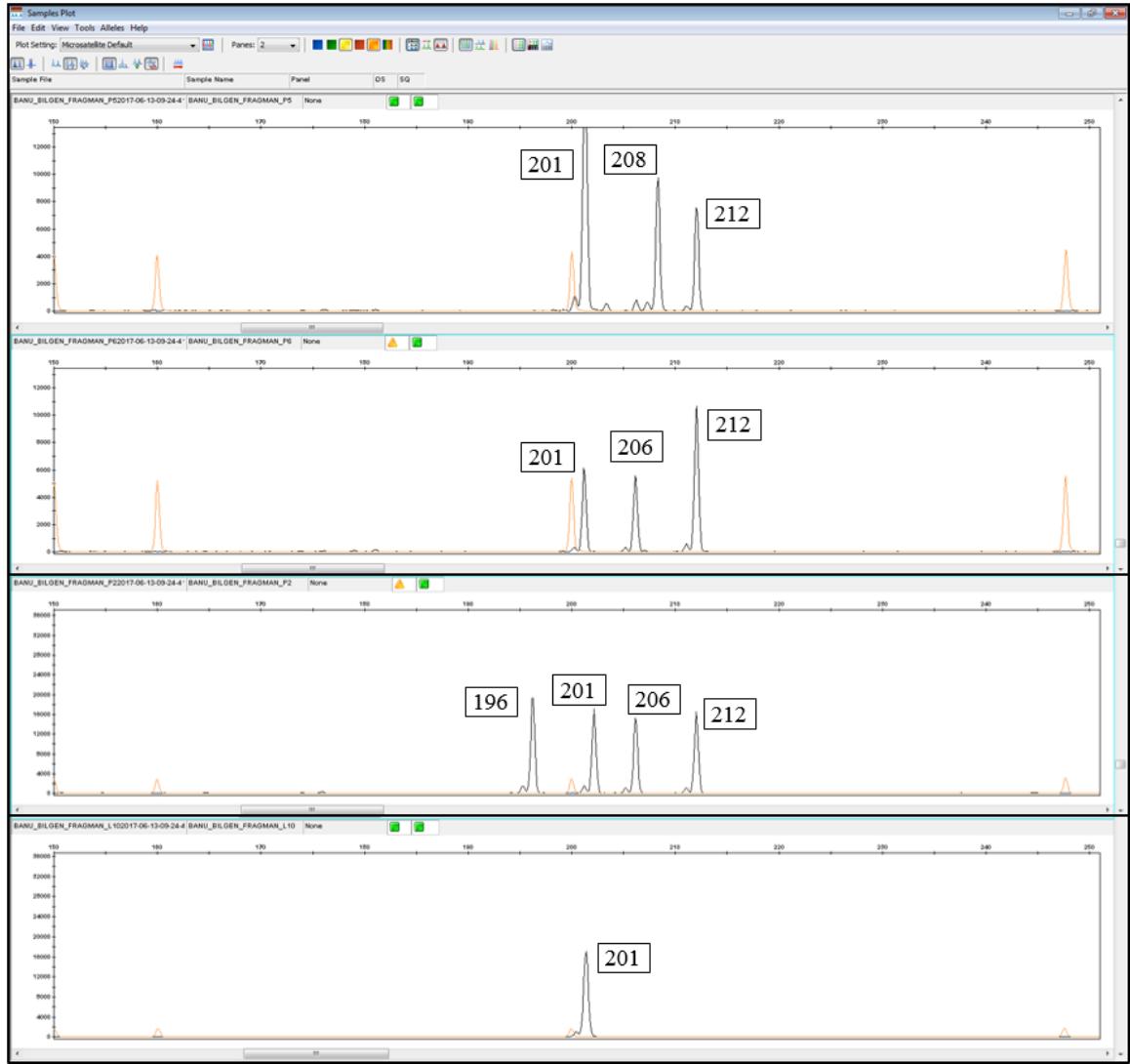
Şekil 3.9. devam



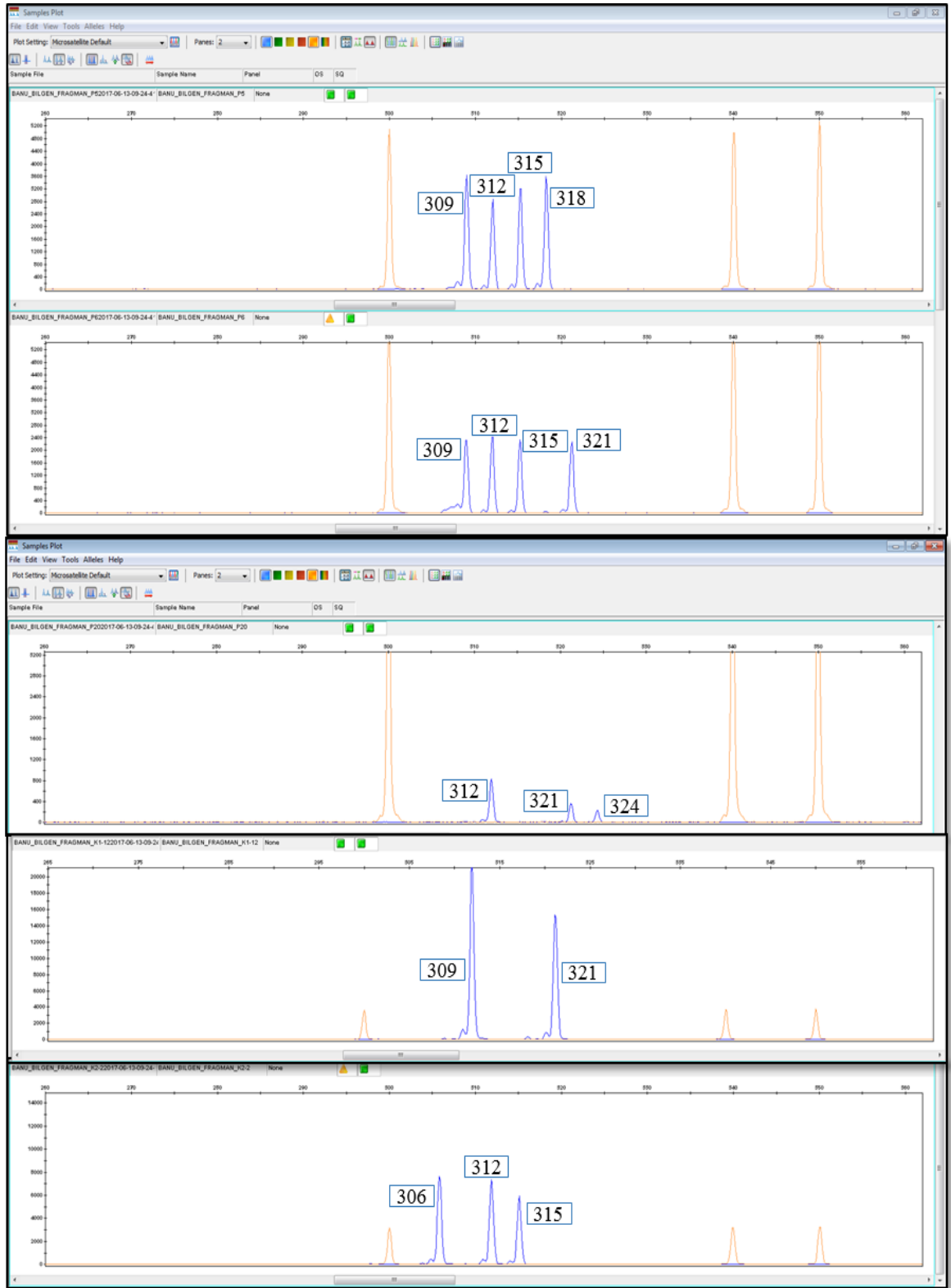
Şekil 3.9. OVK036 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



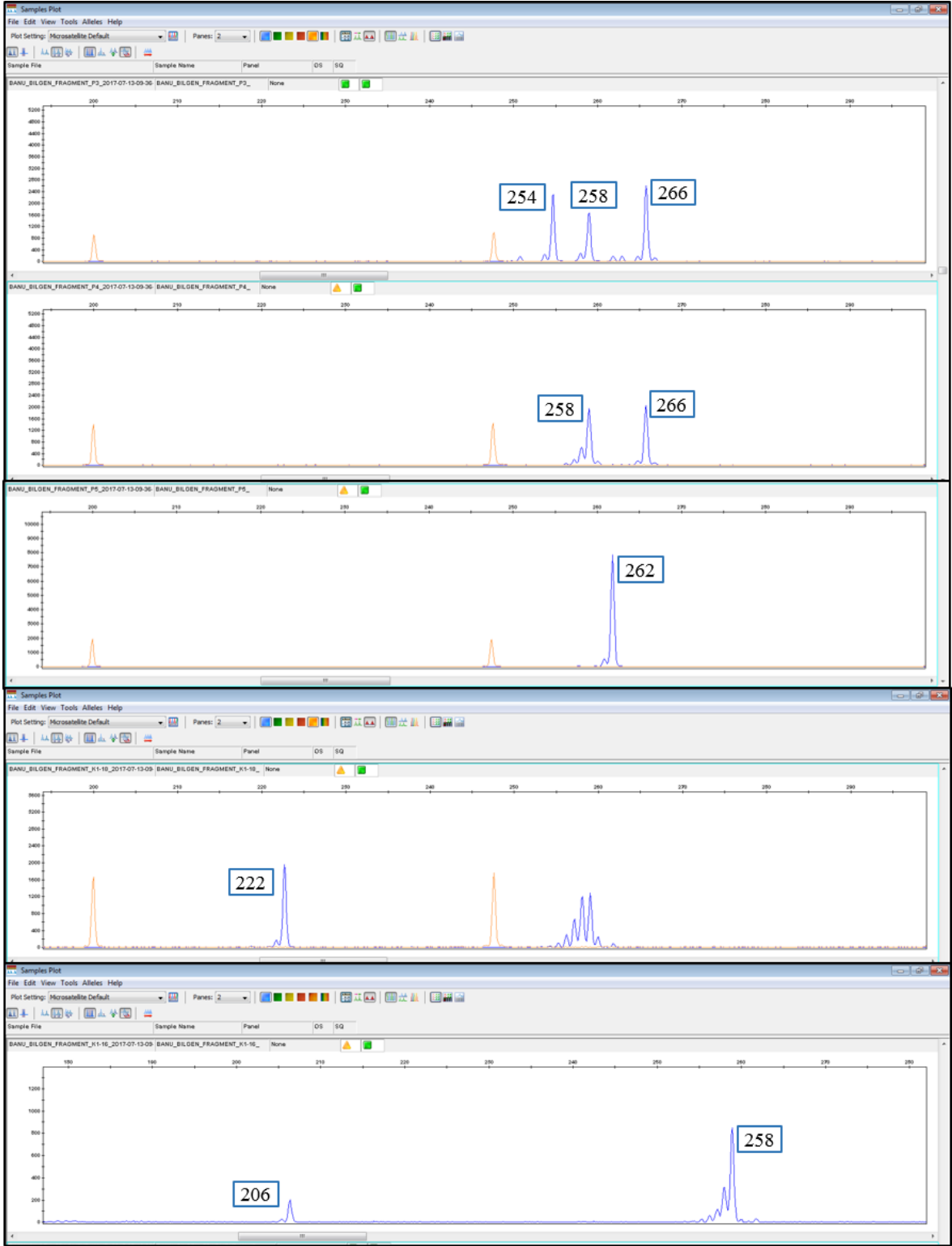
Şekil 3.10. OVK094 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.11. OVK125 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü

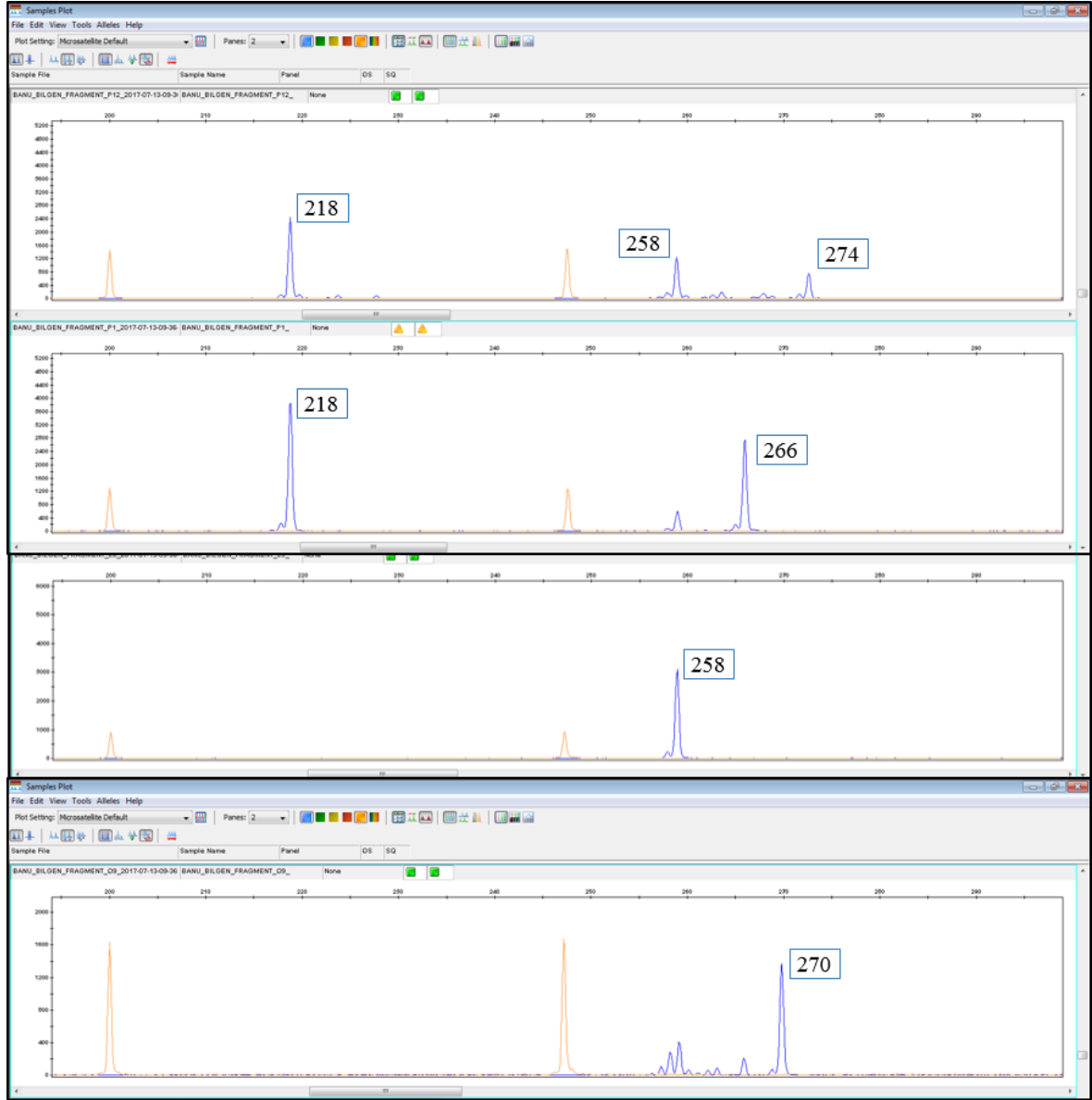


Şekil 3.12. OVM033 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü

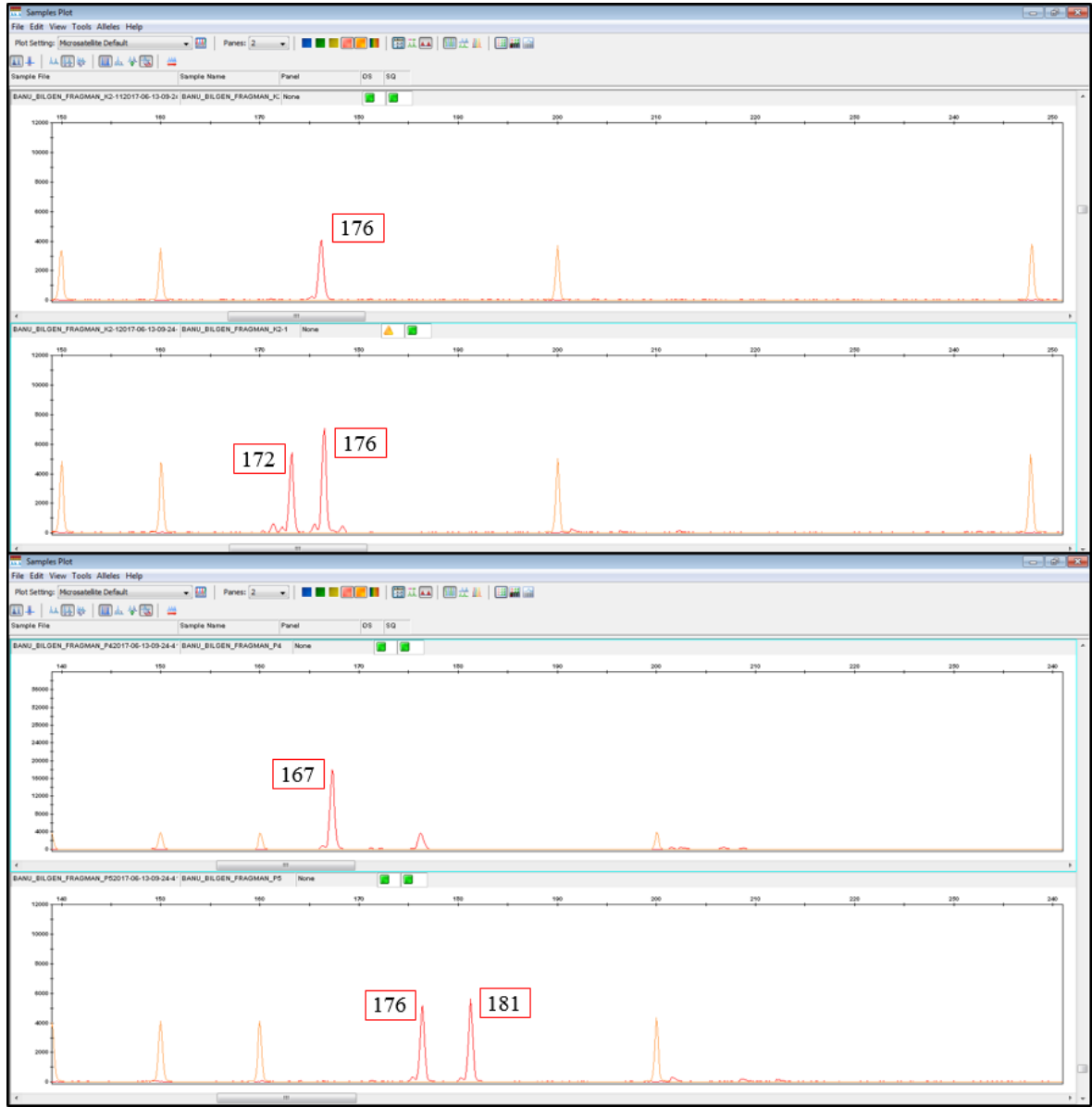


Şekil 3.13. OVK161 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü

Şekil 3.13. devam



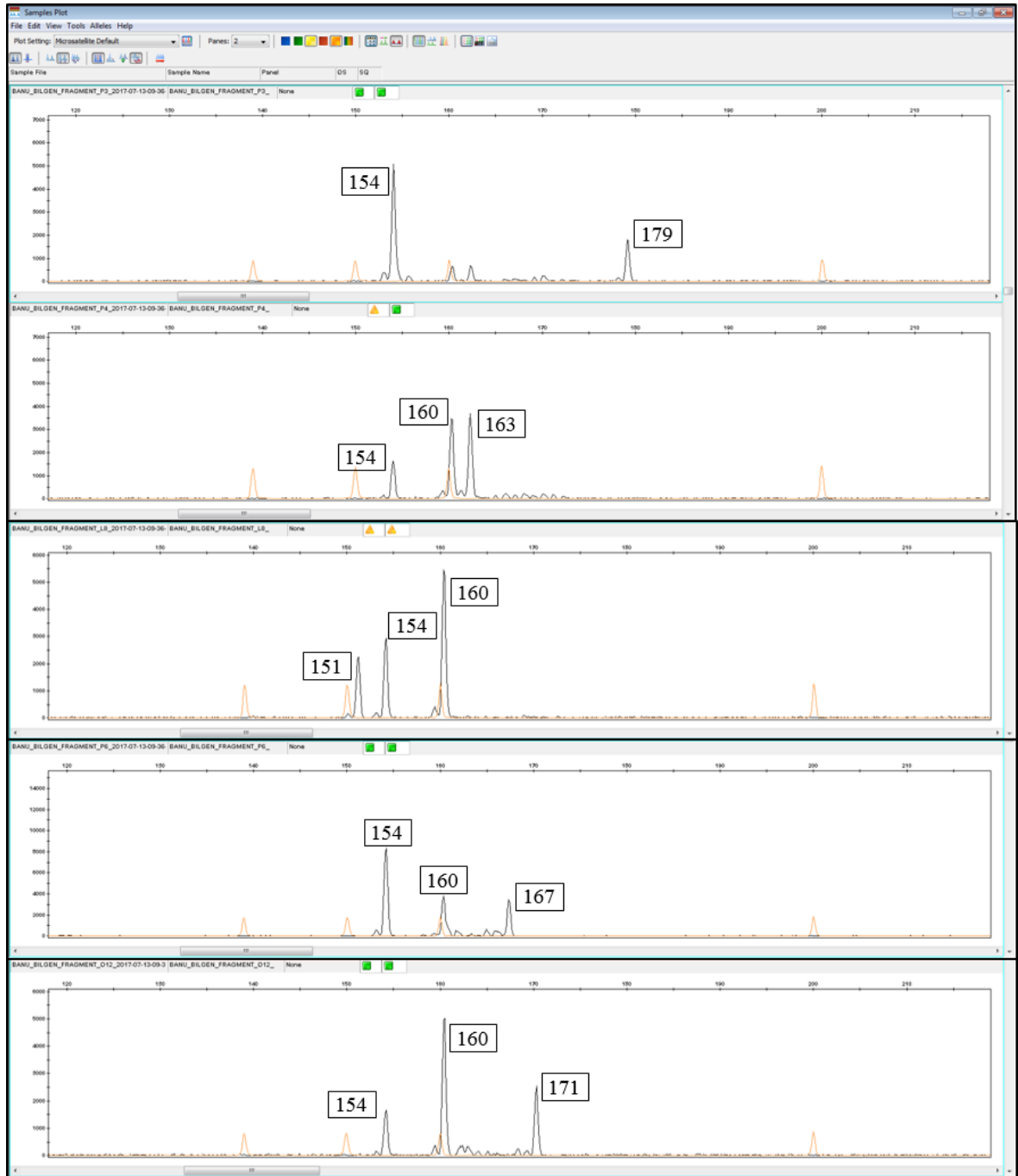
Şekil 3.13. OVK161 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.14. OVM125 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



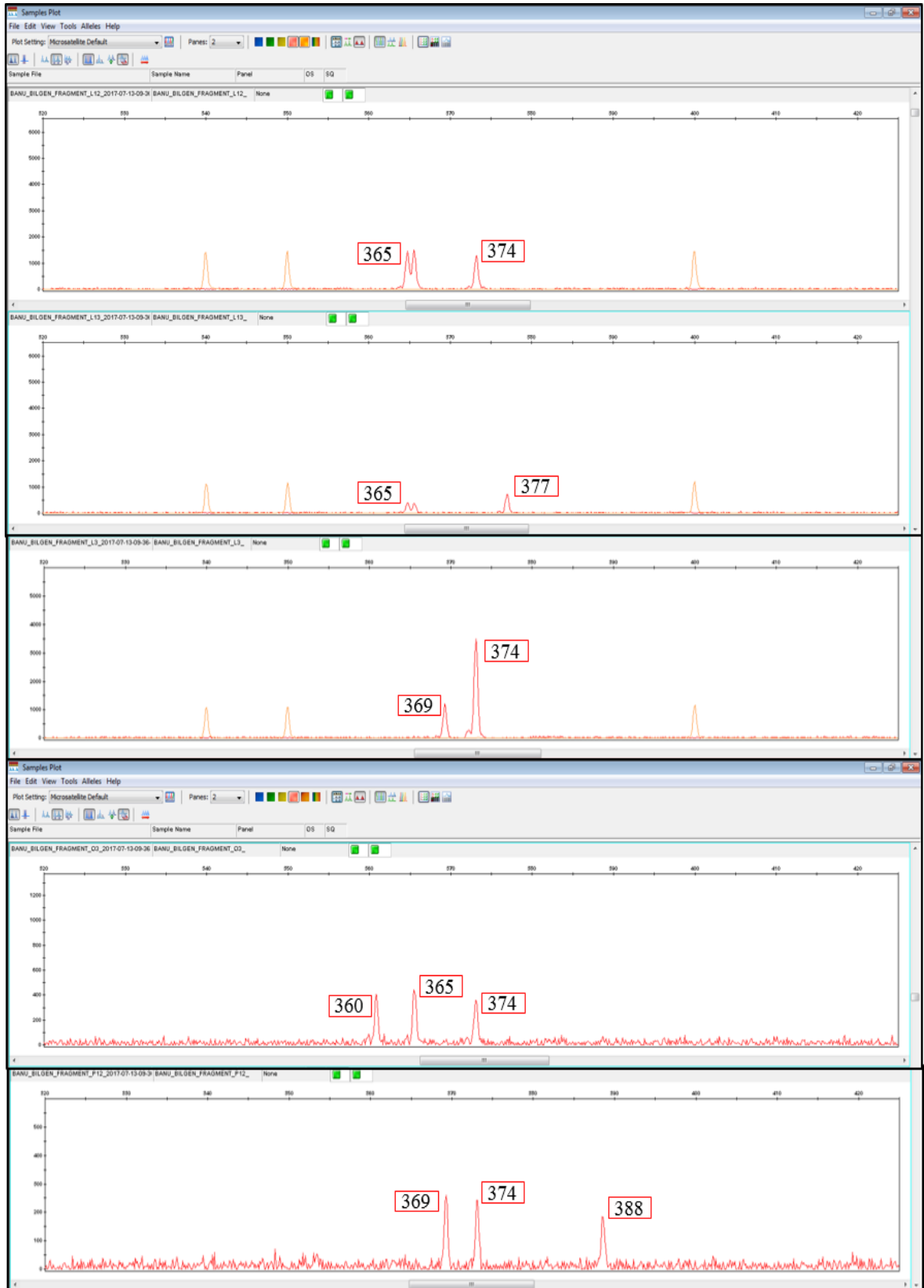
Şekil 3.15. OVK046 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.16. OVM061 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.17. OVK174 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.18. OVK101 no'lu primere ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü

3.5 Verilerin İstatistiksel Analizi

Bütün populasyonları değerlendirdiğimizde iki ve ikiden daha fazla allele sahip olan mikrosatellit bölgesi polimorfik lokus olarak değerlendirmeye alınmaktadır. Bu sebeple polimorfizm ölçütü olarak, bir lokustaki allel sayısı baz alınmıştır. Çeşit ve populasyonların genetik yapısını belirleyebilmek ve çeşitliliğini saptamak için her birinde, polimorfik lokuslar ve yüzdeleri, polimorfik lokuslarda gözlenen allel sayısı (N_a), etkili allel sayısı (N_e), Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik değeri (h), Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri (u_h), Shanon sabiti (I) ve standart hataları hesaplanmıştır. Polimorfizm yüzdesini belirlemek için, polimorfik lokusların sayısı, toplam lokus sayısına bölünmesi formülü kullanılmıştır. Ortalama allel sayısı, çalışılan her bir populasyondaki her bir lokusun sahip olduğu allel sayısının aritmetik ortalaması alınarak bulunur. Polimorfik bilgi içeriği (PIC), bir belirtecin populasyondaki polimorfizmini belirlemek için kullanılan önemli bir değerdir. PIC değeri, bir lokusa ait allel sayısına ve allelerin populasyon içindeki dağılımlarına göre değişiklik gösterebilir. Bu tez kapsamında kullanılan bireylerdeki her bir mikrosatellit lokusu için polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri Roldan-Ruiz ve ark. (2000)'nin dominant belirteçler için her bir allelin PIC değeri hesaplanması için geliştirdikleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$PIC_i = 2f_i(1-f_i)$$

Formüldeki 'PIC_i', i allelinin polimorfik bilgi içeriğini, f_i ise i allelinin bireylerde varlığının frekansını ifade etmektedir (Roldan-Ruiz ve ark. 2000). Çalışılan korunga bireyleri tetraploid yapıda olduğu için, her bir örnekte SSR primerine ait allelin gözlenmesi durumunda 1 rakamı, gözlenmemesi durumunda ise 0 rakamı kullanılarak istatistiki analizler yapılmıştır.

İstatistiki analizler için elde edilen veriler GenAlEx [(Version 6.5) (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>)] (Peakall ve Smouse 2006) istatistik yazılım programı kullanılarak yapılmıştır. Basamaklı mutasyon modeline göre moleküler varyans analizinde (AMOVA) GenAlEx [(Version 6.5) istatistik programından yararlanılmıştır. Nei'nin populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma düzeyini tespit etmek ve yakın bağlantı ağaçlarını oluşturmak için Nei'nin tarafsız genetik mesafe ve benzerlik katsayıları hesaplanmıştır (Nei 1987). Sonuçların daha anlaşılır bir şekilde sergilenebilmesi için Nei'nin tarafsız genetik mesafe katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) kümelendirme yöntemi kullanarak bir dendrogram oluşturulmuştur (Sneath ve Sokal 1973, Işık ve ark. 2005). Bu dendrogramın oluşturulmasında MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 programından yararlanılmıştır (Tamura ve ark. 2013).

4. BULGULAR

4.1 Mikrosatellit (SSR) Primerlerine ait Allellerin Belirlenmesi

Mikrosatellit (SSR) primerlerine ait allelleri belirleyebilmek için; analiz edilen her bir primer bir lokus ve her bir primerin çoğalttığı farklı nükleotid uzunluğundaki DNA parçaları tek bir allel olarak değerlendirilmiştir. Bu ilkeyi baz alarak, analiz ettiğimiz 10 SSR primeri için, 5 korunga çeşit ve populasyonuna ait toplam 91 örneğin her birinin sahip olduğu alleller belirlenmiş olup ve bu allellerin frekansları ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1’de çalışılan 2 çeşit (Özerbey ve Lütfübey) ve 3 populasyon (Pleven, Kırşehir-1 ve Kırşehir-2) ve 10 SSR lokusuna (OVK036, OVK094, OVK125, OVM033, OVK161, OVM125, OVK046, OVM061, OVK174, OVK101) ait primerler ve baz çifti (bç) olarak büyüklükleri gösterilmiştir. Bütün populasyonları bir bütün olarak değerlendirdiğimizde on SSR primerinin tamamı polimorfik olarak saptanmıştır. Populasyonları ayrı ayrı ele aldığımızda Özerbey, Lütfübey, Pleven, K1 ve K2 populasyonlarında polimorfizm yüzdesi %100 olarak hesaplanmıştır. Çalışılan *Onobrychis viciifolia* Scop. populasyonlarında kullanılan 10 SSR lokusu için toplam 68 allel tespit edilmiştir. Kullanılan SSR lokuslarından en çok allel (11) OVK046 primerinde gözlenmiştir. OVK161 primerinde 9 allel, OVK036 ve OVK094 primerlerinde 8’er allel, OVM033 ve OVM061 primerlerinde 7’şer allel, OVK101 primerinde 6 allel, OVK125 primerinde 5 allel, OVM125 primerinde 4 allel ve OVK174 primerinde ise 3 allel saptanmıştır.

OVK036 primeri için hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 150 bç, 160 bç ve 164 bç’lik alleller tüm populasyonlarda gözlenmiştir. OVK036 primerinde 150 bç’lik allel en yüksek frekansı Pleven populasyonunda ($f=0,875$) verdiği görülmüştür. 141 bç’lik allel sadece K1 populasyonunda ($f=0,050$), 147 bç’lik allel sadece Lütfübey populasyonunda ($f=0,111$) ve 154 bç’lik allel sadece Pleven populasyonunda ($f=0,063$) gözlenmiştir. Bu alleller populusyona özgü (private) allel olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). 168 bç K1 populusyonu hariç diğer populusyonlarda ve 173 bç allel ise Pleven, K1 ve K2 populusyonları hariç diğer populusyonlarda gözlenmiştir.

OVK094 primeri için hesaplanan allel frekanslarına göre 237 bç, 244 bç ve 257 bç’lik alleller tüm populusyonlarda gözlenmiştir. 234 bç’lik (Pleven, $f=0,063$) ve 255 bç’lik allel (K2, $f=0,056$) tek bir populusyonda gözlenmiştir. Bu alleller populusyona özgü (private) allel olarak değerlendirilmiştir. 242 bç’lik allel Özerbey ve K1 populusyonu hariç diğer populusyonlarda, 249 bç ile 253 bç’lik alleller ise K1 populusyonu hariç diğer populusyonlarda gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Çalışmada analiz edilen 10 SSR lokusuna ait allellerin korunga çeşit ve popülasyonlarındaki frekansları

Primer	Allel	Allel Frekansları (f)				
		Ö	L	P	K1	K2
OVK036	141	0,000	0,000	0,000	0,050*	0,000
	147	0,000	0,111*	0,000	0,000	0,000
	150	0,579	0,833	0,875	0,350	0,667
	154	0,000	0,000	0,063*	0,000	0,000
	160	0,737	0,667	0,688	0,850	0,778
	164	0,105	0,056	0,563	0,050	0,278
	168	0,684	0,667	0,438	0,000	0,333
	173	0,158	0,111	0,000	0,000	0,000
OVK094	234	0,000	0,000	0,063*	0,000	0,000
	237	0,421	0,278	0,250	0,050	0,278
	242	0,000	0,111	0,063	0,000	0,222
	244	0,316	0,167	0,250	0,050	0,222
	249	0,316	0,222	0,125	0,000	0,333
	253	0,263	0,222	0,063	0,000	0,056
	255	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056*
	257	0,158	0,222	0,125	0,050	0,167
OVK125	196	0,053	0,000	0,125	0,000	0,111
	201	1,000	0,722	0,750	0,600	0,778
	206	0,421	0,389	0,750	0,350	0,389
	208	0,053	0,111	0,125	0,000	0,056
	212	0,684	0,444	0,563	0,400	0,556
OVM033	306	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056*
	309	0,053	0,111	0,188	0,000	0,000
	312	0,526	0,389	0,500	0,300	0,722
	315	0,211	0,167	0,438	0,150	0,667
	318	0,316	0,111	0,375	0,250	0,444
	321	0,105	0,056	0,438	0,050	0,444
	324	0,000	0,000	0,188*	0,000	0,000
OVK161	206	0,000	0,056*	0,000	0,000	0,000
	218	0,158	0,000	0,125	0,000	0,167
	222	0,211	0,167	0,000	0,050	0,111
	254	0,000	0,000	0,125	0,050	0,000
	258	0,632	0,444	0,625	0,750	0,667
	262	0,053	0,000	0,063	0,000	0,056
	266	0,000	0,222	0,500	0,100	0,222
	270	0,053	0,000	0,188	0,000	0,056
	274	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056*

* Populasyona Özgü (Private) Alleller

Çizelge 4.1 devam

Primer	Allel	Bant Frekansları (f)				
		Ö	L	P	K1	K2
OVM125	167	0,000	0,000	0,188	0,050	0,000
	172	0,105	0,000	0,250	0,100	0,111
	176	0,579	0,500	0,500	0,800	0,667
	181	0,632	0,556	0,438	0,750	0,667
OVK046	128	0,000	0,000	0,000	0,550	0,056
	152	0,000	0,000	0,000	0,050*	0,000
	154	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056*
	158	0,000	0,111	0,125	0,150	0,056
	160	0,000	0,000	0,188*	0,000	0,000
	162	0,211	0,444	0,438	0,200	0,278
	164	0,579	0,333	0,563	0,650	0,833
	166	0,526	0,722	0,500	0,500	0,389
	168	0,368	0,444	0,688	0,900	0,778
	170	0,316	0,056	0,063	0,000	0,000
	172	0,105	0,056	0,313	0,000	0,056
OVM061	151	0,000	0,056	0,063	0,050	0,000
	154	0,684	0,833	0,750	0,600	0,722
	160	0,947	0,833	0,813	0,750	0,833
	163	0,263	0,056	0,125	0,250	0,444
	167	0,105	0,000	0,063	0,350	0,056
	171	0,158	0,167	0,000	0,250	0,111
	179	0,000	0,000	0,063*	0,000	0,000
OVK174	247	0,842	0,889	1,000	0,550	0,833
	250	0,526	0,444	0,625	0,250	0,556
	252	0,000	0,000	0,063*	0,000	0,000
OVK101	360	0,105	0,000	0,125	0,000	0,000
	365	0,421	0,222	0,125	0,000	0,056
	369	0,211	0,222	0,250	0,050	0,056
	374	0,632	0,389	0,250	0,050	0,111
	377	0,053*	0,000	0,000	0,000	0,000
	388	0,000	0,000	0,063*	0,000	0,000

* Populasyona Özgü (Private) Alleller

OVK125 primeri için hesaplanan allel frekansları göz önüne alındığında 201 bç, 206 bç ve 212 bç'lik alleller tüm populasyonlarda belirlenmiştir. 196 bç'lik allel Lütfübey ve K1 populasyonları hariç, 208 bç'lik allel K1 populasyonu hariç diğer populasyonlarda gözlemlenmiştir. OVK125 primerine ait belirlenen allellerin hiç biri populasyona özgü değildir.

OVM033 primeri için hesaplanan allel frekansları değerlendirildiğinde 312 bç, 315 bç, 318 bç ve 321 bç'lik alleller tüm populasyonlarda belirlenmiştir. 306 bç'lik ve 324 bç'lik alleller sırasıyla K2 ($f=0,056$) ve Pleven ($f=0,188$) populasyonlarında gözlemlendiği için populusyona özgü (private) allel olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). 309 bç'lik allel K1 ve K2 populasyonlarında gözlenmemiştir.

OVK161 primeri için hesaplanan allel frekansları göz önüne alındığında 258 bç'lik allel tüm populasyonlarda gözlenmiştir. 206 bç'lik allel ile 274 bç'lik allel sırasıyla Lütüfubey ($f=0,056$) ve K2 ($f=0,056$) populasyonlarında belirlenmiş ve populusyona özgü (private) allel olarak değerlendirilmiştir. 218 bç, 262 bç ve 270 bç'lik alleller Lütüfubey ve K1 populasyonları hariç, 222 bç'lik allel Pleven populusyonu hariç, 254 bç'lik allel Özerbey, Lütüfubey ve K2 populasyonları hariç, 266 bç'lik allel ise Özerbey populusyonu hariç diğer populasyonlarda belirlenmiştir (Çizelge 4.1)..

OVM125 primeri için hesaplanan allel frekanslarına göre 176 bç ve 181 bç'lik alleller tüm populasyonlarda gözlenmiştir. 167 bç'lik allel sadece Pleven ve K1 populasyonlarında tespit edilmiş, diğer populasyonlarda gözlenmemiştir. 172 bç'lik allel ise yalnızca Lütüfubey populusyonunda görülmemiştir (Çizelge 4.1)..

OVK046 primeri, 11 allel ile populasyonlar üzerinde çalışılan on SSR primeri içinde en fazla allele sahip primerdir. Bu primer için hesaplanan allel frekansları değerlendirildiğinde 162 bç, 164 bç, 166 bç ve 168 bç'lik alleller tüm populasyonlarda gözlenmiştir. 152 bç'lik allel K1 populusyonu ($f=0,050$) için, 154 bç'lik allel K2 populusyonu ($f=0,056$) için ve 160 bç'lik allel Pleven populusyonu ($f=0,188$) için, sadece bu populasyonlarda gözlendiklerinden populusyona özgü (private) allel olarak değerlendirilmiştir. 128 bç'lik allel sadece K1 ve K2 populasyonlarında belirlenmiştir. 158 bç'lik allel Özerbey populusyonu hariç diğer populasyonlarda gözlenmiştir. 170 bç'lik allel K1 ve K2 populasyonlarında, 172 bç'lik allel ise K1 populusyonunda gözlenmemiştir (Çizelge 4.1)..

OVM061 primeri için hesaplanan allel frekansları incelendiğinde 154 bç, 160 bç ve 163 bç'lik alleller tüm populasyonlarda belirlenmiştir. 151 bç'lik allel Özerbey ve K2 populasyonlarında gözlenmemiştir. 167 bç allel Lütüfubey populusyonu hariç, 171 bç'lik allel Pleven populusyonu hariç diğer populasyonlarda gözlenmiştir. 179 bç'lik allel sadece Pleven populusyonunda gözlemlendiği için populusyonu özgü (private) allel olarak değerlendirilmiştir ($f=0,063$) (Çizelge 4.1)..

OVK174 primerinin analiz edilen on SSR primeri arasında en az allele (247 bç, 250 bç ve 252 bç) sahip primer olduğu tespit edilmiştir. Bu allellerden iki tanesi (247 bç ve 250 bç) tüm populasyonlarda yüksek frekansta gözlenmiştir. 252 bç'lik allel ise sadece Pleven

populasyonunda gözlenerek bu populasyona özgü (private) allel olduğu belirlenmiştir ($f=0,063$) (Çizelge 4.1)..

OVK101 primeri için hesaplanan allel frekanslarını değerlendirdiğimizde 369 bç ve 374 bç'lik alleller tüm populasyonlarda tespit edilmiştir. 360 bç'lik allel yalnızca Özerbey ve Pleven populasyonlarında gözlenmiş, 365 bç'lik allel ise K1 populasyonu hariç tüm populasyonlarda belirlenmiştir. 377 bç ve 388 bç'lik alleller sırasıyla Özerbey ($f=0,053$) ve Pleven ($f=0,063$) populasyonlarında belirlenerek populasyona özgü (private) allel olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1).

Tez çalışma kapsamında kullanılan her bir lokustaki allellerin, araştırılan tüm populasyonlara göre dağılımlarına bakıldığında bazı allellerin yalnızca bir populasyona özgü allel olduğu (private allel) gözlenmiştir. Populasyona özgü alleller (private allel) Özerbey populasyonunda 1 allel, Lütüfey populasyonunda 2 allel, Pleven populasyonunda 7 allel, K1 populasyonunda 2 allel ve K2 populasyonunda 4 allel olarak tespit edilmiştir. Populasyonları genel olarak baktığımızda en fazla populasyona özgü allel Pleven populasyonunda (7 allel), en az populasyona özgü allel ise Özerbey populasyonunda (1 allel) belirlenmiştir.

4.2 Genetik Çeşitlilik Parametreleri

Çalışma kapsamında kullanılan on SSR primerine ait genetik parametreler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'ye göre, hesaplanan PIC değerleri 0,095 ile 0,5 arasında değişmektedir. Ortalama PIC değeri en fazla OVK125 primerinde (0,296), en düşük OVK161 primerinde (0,147) hesaplanmıştır. Primer başına toplam allel sayısı 3 ile 11 allel arasında değişmektedir. En fazla allel, OVK046 (11 allel) primerinde, en az allel OVK174 (3 allel) primerinde tespit edilmiştir. Populasyona özgü allel veren primerler, en fazla 3 allel ile OVK036 ve OVK046 primerleri olmuştur. OVK125 ve OVM125 primerlerinde populasyona özgü allel görülmemiştir.

Primerlere ait allellerin frekanslarını incelediğimizde 0,050 ile 1,000 arasında değiştiği görülmektedir. Ortalama allel frekansı en fazla OVK174 primerinde (0,439), en az ise OVK101 (0,113) primerinde hesaplanmıştır. Çalışma için seçilen primerlerine ait allellerin uzunluğu bütün SSR primerleri bir bütün olarak değerlendirildiğinde 128 bç ile 388 bç arasında değişmektedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan 10 SSR primerine ait genetik parametreler (PIC=Polimorfik bilgi içeriği, Ort.= Ortalama, Min.=Minimum, Maks.=Maksimum, NoA=Gözlenen allel sayısı, NoA Priv.=Populasyona özgü allel sayısı, AF=Allel frekansı)

Primer	Ort. PIC	Min. PIC	Maks. PIC	NoA	NoA Priv.	Ort. AF	Min. AF	Maks. AF	Bant Aralığı
OVK036	0,193	0,095	0,492	8	3	0,267	0,050	0,875	141-173
OVK094	0,194	0,095	0,487	8	2	0,128	0,050	0,421	234-257
OVK125	0,296	0,100	0,494	5	0	0,377	0,053	1,000	196-212
OVM033	0,241	0,095	0,5	7	2	0,207	0,050	0,722	306-324
OVK161	0,147	0,095	0,5	9	2	0,131	0,050	0,750	206-274
OVM125	0,293	0,095	0,5	4	0	0,345	0,050	0,800	167-181
OVK046	0,215	0,095	0,5	11	3	0,230	0,050	0,900	128-172
OVM061	0,208	0,095	0,494	7	1	0,297	0,050	0,947	151-179
OVK174	0,245	0,117	0,499	3	1	0,439	0,063	1,000	247-252
OVK101	0,154	0,095	0,488	6	2	0,113	0,050	0,632	360-388

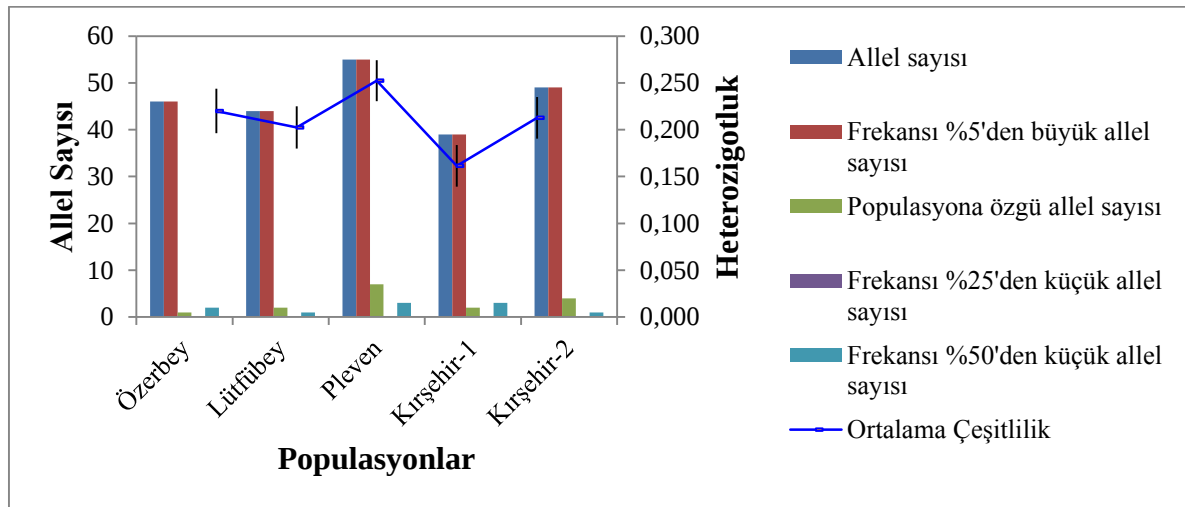
Bu tez çalışma kapsamında örneklenen Özerbey, Lütfübey, Pleven, Kırşehir-1 ve Kırşehir-2 korunga çeşit ve populasyonlarının genetik çeşitliliğine ait bilgiler ve polimorfik bilgi içeriği Çizelge 4.3’de ve Şekil 4.1’de sunulmuştur. Gözlenen allel sayısı 1,147 ile 1,603 arasında (ortalama $1,365 \pm 0,050$), etkili allel sayısı ise 1,264 ile 1,421 arasında (ortalama $1,348 \pm 0,019$) değişmektedir. Çalışmada belirlenen allellerin frekansları incelendiğinde bütün allellerin frekansının %5’den büyük olduğu görülmüştür (Şekil 4.1). En fazla allel (55 allel) Pleven populasyonunda, en az allel (39 allel) Kırşehir-1 populasyonunda görülmüştür. Özerbey populasyonunda 46 allel, Lütfübey populasyonu 44 allel ve Kırşehir-2 populasyonunda 49 allel belirlenmiştir. Analiz edilen bütün örnekler ele alındığında ortalama Shannon sabiti (I) $0,322 \pm 0,014$ olarak tespit edilmiştir. Shannon sabiti (I), 0,385 değeri ile en yüksek Pleven populasyonunda, 0,251 değeri ile en düşük Kırşehir-1 populasyonunda hesaplanmıştır. Yüksek I değeri populasyon içinde önemli oranda varyasyon olduğunu göstermektedir. Nei (1987)’nin genetik çeşitlilik (h) ve tarafsız genetik çeşitlilik değeri (uh) her populasyon için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1). Nei (1987)’nin genetik çeşitlilik değeri (h) ortalama $0,210 \pm 0,010$ olarak hesaplanmış, en yüksek değer Pleven populasyonunda (0,252), en düşük değer ise Kırşehir-1 populasyonunda (0,161) gözlenmiştir. Nei (1987)’nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri (h) ortalama $0,212 \pm 0,011$ olarak hesaplanmış, en yüksek değer Pleven populasyonunda (0,269), en düşük değer ise Kırşehir-1 populasyonunda (0,170) belirlenmiştir. Çalışmada kullandığımız 10 SSR belirtecine ait ortalama polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri, populasyon bazında değerlendirdiğimizde, Özerbey populasyonunda 0,220, Lütfübey

populasyonunda 0,202, Pleven populasyonunda 0,252, Kırşehir-1 populasyonunda 0,161 ve Kırşehir-2 populasyonunda ise 0,213 olarak hesaplanmıştır. Analiz edilen tüm örnekleri bir bütün olarak ele aldığımızda ortalama PIC değeri 0,210 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Korunga çeşit ve populasyonlarına ait genetik çeşitlilik parametreleri

Populasyonlar	N	Toplam Allel Sayısı	N _a	N _e	I	h	uh	PIC
Özerbey	19	46	1,338 (±0,114)	1,373 (±0,045)	0,332 (±0,034)	0,220 (±0,024)	0,232 (±0,025)	0,220
Lütfübey	18	44	1,294 (±0,117)	1,333 (±0,042)	0,311 (±0,032)	0,202 (±0,023)	0,214 (±0,024)	0,202
Pleven	16	55	1,603 (±0,096)	1,421 (±0,043)	0,385 (±0,030)	0,252 (±0,022)	0,269 (±0,023)	0,252
Kırşehir-1	20	39	1,147 (±0,121)	1,264 (±0,041)	0,251 (±0,032)	0,161 (±0,022)	0,170 (±0,023)	0,161
Kırşehir 2	18	49	1,441 (±0,110)	1,347 (±0,041)	0,329 (±0,031)	0,213 (±0,022)	0,225 (±0,023)	0,213
Ortalama	18,200 (±0,072)	46,6	1,365 (±0,050)	1,348 (±0,019)	0,322 (±0,014)	0,210 (±0,010)	0,222 (±0,011)	0,210

*N = örnek sayısı, N_a = gözlenen allel sayısı, N_e = etkili allel sayısı, I = Shannon sabiti, h = Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik değeri uh = Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik, PIC = Polimorfik bilgi içeriği, ± standart hata.

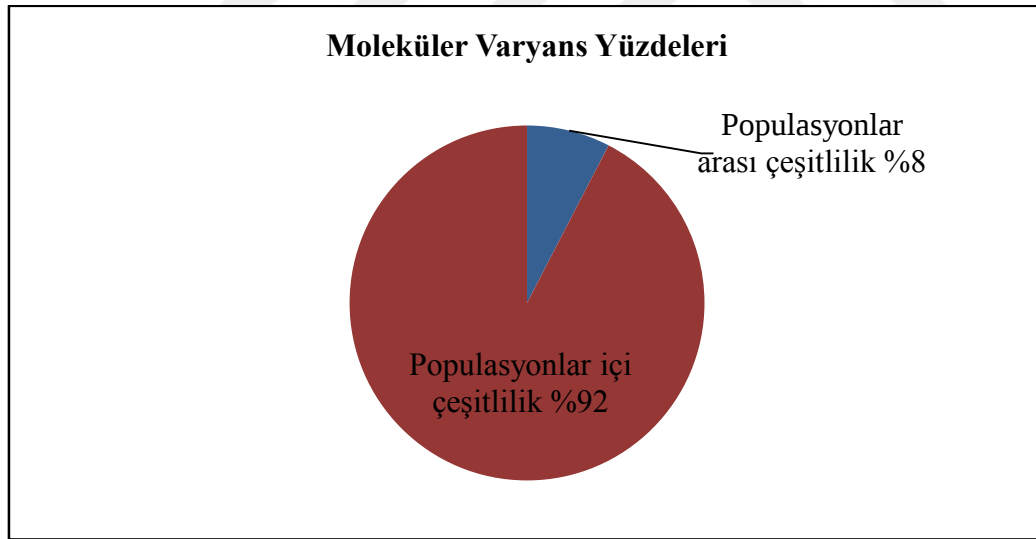


Şekil 4.1. Korunga çeşit ve populasyonlarındaki allel sayısı ve heterozigotluk arasındaki ilişkinin grafik şeklinde gösterilmesi

Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan varyans analizi (AMOVA) sonuçları Çizelge 4.4’de gösterilmiştir. AMOVA sonuçlarına göre çalışılan beş korunga çeşit ve popülasyonu arasındaki varyasyonun büyük oranda (%92) popülasyonlar içerisinde olduğu, popülasyonlar arası çeşitliliğin düşük olduğu (%8) gözlenmiştir ($F_{ST} = 0,076$) (Şekil 4.2). Elde edilen sonuç korunga popülasyonları içerisinde geniş bir genetik çeşitliliğin olduğunu göstermektedir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.4. Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Varyans Bileşenleri	Varyans (%)
Popülasyonlar-arası	4	74,621	0,615	8%
Popülasyonlar-içi	86	643,050	7,477	92%
Toplam	90	717,670	8,092	100%



Şekil 4.2. AMOVA sonuçlarına göre elde edilen moleküler varyans yüzdeleri

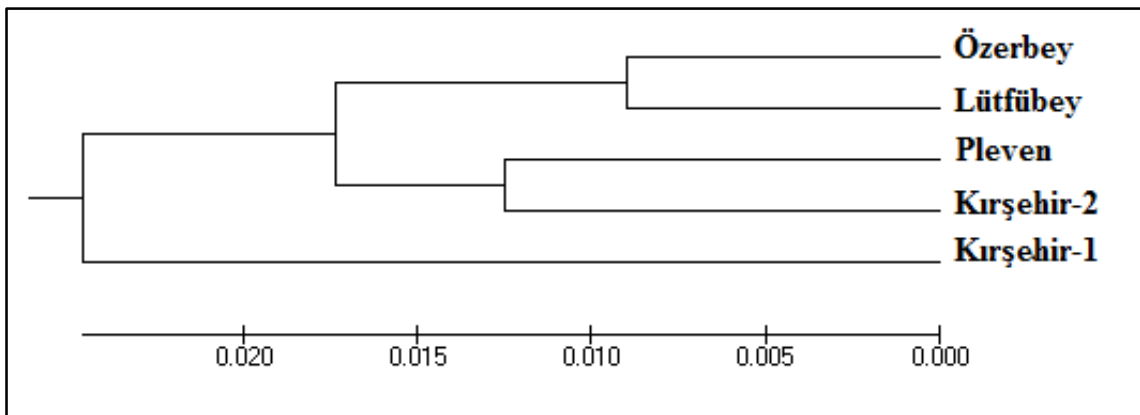
Nei’nin tarafsız genetik benzerlik ve genetik farklılık katsayısı kullanılarak popülasyonlar arası genetik farklılaşmanın düzeyi belirlenmiştir (Nei 1987). Tez kapsamında kullanılan 10 SSR lokusuna ait bilgilere dayanarak elde edilen genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri Çizelge 4.5’de gösterilmiştir. Genetik benzerlik değerleri 0,943 ile 0,982 arasında değişim göstermektedir. En yüksek genetik benzerlik değeri Özerbey ve Lütfübey çeşitleri arasında, en düşük genetik benzerlik değeri ise Pleven ve Kırşehir-1 popülasyonları

arasında hesaplanmıştır. Çizelge 4.5’de görüldüğü üzere genetik mesafe değeri en düşük (0,018) Özerbey - Lütfübey çeşitleri arasında, en yüksek (0,058) Pleven ve Kırşehir-1 populasyonları arasında görülmüştür. Tüm populasyon çiftleri göz önüne alındığında ortalama genetik mesafe değeri 0,038 ve ortalama genetik benzerlik değeri 0,963 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.5. *O. viciifolia* çeşit ve populasyonları arasında Nei (1987)’ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri (sol alt diyagonal: genetik benzerlik, sağ üst diyagonal: genetik mesafe değerleri)

Populasyonlar	Özerbey	Lütfübey	Pleven	Kırşehir-1	Kırşehir-2
Özerbey	***	0,018	0,039	0,055	0,032
Lütfübey	0,982	***	0,031	0,047	0,037
Pleven	0,961	0,969	***	0,058	0,025
Kırşehir-1	0,947	0,954	0,943	***	0,037
Kırşehir-2	0,968	0,964	0,976	0,964	***

Tez çalışmasında kullanılan korunga çeşit ve populasyonlarındaki genetik farklılaşmanın görsel bir grafik üzerinde görülmesi için Nei (1987)’nin genetik mesafe değerleri UPGMA kümelendirme yöntemi ile sınıflandırıldı ve dendrogram oluşturuldu (Şekil 4.3). Genetik mesafe değerine göre oluşturulan dendrograma göre, Özerbey ve Lütfübey çeşitleri birbirine yakın olan bir grubu, Pleven ve Kırşehir-2 populasyonları ise diğer bir grubu oluşturmuştur. Kırşehir-1 populasyonu ayrı bir grup olarak yer almıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında Kırşehir-1 populasyonunun diğer populasyonlara genetik olarak biraz daha uzak olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3. *O. viciifolia* çeşit ve populasyonlarının SSR analizleri sonucunda genetik mesafe değerlerine göre oluşturdukları dendrogram

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, bir yem bitkisi olan korunganın beş farklı çeşit ve populasyonundan (Özerbey, Lütübey, Plevén, Kırşehir-1 ve Kırşehir-2) toplanan taze yaprak örnekleri kullanılarak genetik analizler yapılmıştır. Toplanan yaprak örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak elde edilen DNA'lar ile on SSR lokusu (OVK036, OVK094, OVK125, OVM033, OVK161, OVM125, OVK046, OVM061, OVK174, OVK101) PCR ile çoğaltılmış ve genetik yapı belirlenmiştir. DNA parça (fragment) analizi ile çalışılan SSR lokuslarına ait 68 allel tespit edilmiştir. Çalışılan SSR primerlere ait maksimum, minimum ve ortalama PIC değerleri, toplam allel sayıları, allellerin bç olarak büyüklükleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çalışma kapsamında, her populasyon için örnek sayısı (N), gözlenen allel sayısı (N_a), etkili allel sayısı (N_e), Shannon Sabiti (I), Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik değeri (h) ve Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri (u_h) gibi genetik parametreler hesaplanmış ve Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda korunga populasyonlarında genetik çeşitlilik ve türün genetik yapısı hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir.

Korunga ile ilgili daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında; korunga bitkisinin antihelmintik etkisinin araştırılması, besleyici ve fitokimyasal içeriklerinin belirlenmesi, polen ve nektar varlığıyla arılar üzerindeki etkisi, filogenetik sınıflandırma, genetik karakterizasyon ve genetik çeşitlilik gibi moleküler çalışmalara literatürde rastlanmıştır. Türün moleküler genetiği ile ilgili çalışmalar nadirdir. Ancak gelişen teknoloji ve bilimdeki yeniliklerle birlikte 2000'li yıllardan sonra moleküler çalışmaların ivme kazandığı lakin yinede sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmüştür. Korunga ile ilgili olarak Dünya'nın farklı ülkelerinde araştırmacılar tarafından parçacık bombardımanı ile gen aktarımı (Birsin ve ark. 2005), AFLP (Carbonero 2011, Bhattarai 2017), RAPD (Nosrati ve ark 2012, Okcu ve ark. 2013, Rasouli ve ark. 2013, Hejrankesh ve ark. 2014) ve SSR (Carbonero 2011, Demdoun ve ark. 2012, Avcı ve ark. 2014, Irani ve ark. 2015, Kempf ve ark. 2016a), ISSR (Shen ve ark. 2010, Zarrabian ve ark. 2013, Toluei ve ark. 2013a, Toluei ve ark. 2013b, Zarrabian ve Majidi 2015, Nosrati ve ark. 2016), SRAP (Kempf 2016b) gibi belirteçler kullanılarak korunga bitkisinde moleküler genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik araştırmalar ve genetik yapının incelenmesi gibi çalışmalar yapılmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan 10 SSR lokusu, çalışılan beş korunga populasyonu bir bütün olarak ele alındığında hepsi polimorfik olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.3'deki verilen çalışılan korunga populasyonlarına ait bireylerin genetik çeşitliliğine ait

bilgileri göstermektedir. Çalışmamızda 10 SSR lokusundan toplam 68 allel belirlenmiş, primer başına ortalama allel sayısı 6,8 olarak hesaplanmıştır. Her bir populasyonda bütün lokuslar bir bütün olarak değerlendirildiğinde toplam allel sayısı 39 ile 55 arasında, populasyon başına düşen ortalama allel sayısı 46,6 olarak belirlenmiştir. Benzer genetik çalışmalarla karşılaştırıldığında; Kempf ve ark. (2016a)'nın 29 farklı aksesyondan 32 farklı bireyde 400 primer ile yaptıkları çalışmada, polimorfik 101 primer belirlenmiş, 1159 allel tespit edilmiş, 1154'ü polimorfizm göstermiştir. Kempf ve ark. (2016a)'nın çalışmasında primer başına ortalama allel sayısı 11,4 olarak ve lokus başına düşen allel sayısı 2 ile 21 arasında bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan SSR primerleri Kempf ve ark. (2016a)'nın çalışmasından seçilmiş ve elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Avcı ve ark. (2014)'nin 58 *Onobrychis* taksonundan örneklenen bireylerde yapılan çalışmada bezelye ve yoncadan geliştirilen belirteçler kullanılarak analizler yapılmış ve 18 SSR belirteciye ait 79 lokus ve 725 allel bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada lokus başına düşen allel sayısı 9,18 olarak belirtilmiştir. Avcı ve ark. (2014)'nin çalışmasında yüksek allel bulunmasının nedeni olarak farklı alttürlerden kullanılan germplazmlar ve kullanılan belirteç sayısının yüksek olması söylenebilir. Demdoun ve ark. (2012)'nin çalışmasında Türkiye ve Avrupa'dan 27 korunga aksesyonunun genetik karşılaştırılması *M. truncatula* ve *G. max* türlerine ait 27 EST-SSR primeri kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 27 EST-SSR primerinin 22 tanesinin (%81) korungada PCR çoğaltımının yapılabildiği ve 14 tanesinin polimorfik olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada genetik yapının belirlenmesi için seçilen 6 SSR belirtecinde toplam 35 allel, lokus başına düşen allel sayısı 5,83 olarak tespit edilmiştir. Hejrankesh ve ark. (2014) tarafından yerel korunga çeşitlerinde 10 RAPD belirteci kullanılarak yapılan çalışmada, 90 polimorfik bant tespit edilmiştir. Rasouli ve ark. (2013)'nin İran'da yayılış gösteren 36 korunga populasyonunda 5 RAPD belirteci kullanarak İran populasyonlarında genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi amacı ile yaptıkları çalışmada 79 polimorfik bant belirlenmiştir. Zarrabian ve ark. (2013) tarafından İran'da yapılan çalışmada, Dünya çapındaki korunga populasyonlarında morfolojik, anatomik ve moleküler belirteçler ile genetik çeşitlilik analizi yapılmış ve 80 aksesyonda 45 ISSR belirteci denenmiş, polimorfizmi yüksek ISSR belirteçlerinden 22 tanesi seçilmiştir. Seçilen 22 ISSR lokusunda 275 bant belirlenmiş 243'ünün (%88) polimorfik olduğu görülmüştür. Hejrankesh ve ark. (2016), 5 farklı ekolojik bölgeden (Doğu Azerbaycan ve İran) 5 farklı yabani korunga türünde 4 ISSR belirteci ile yaptıkları populasyonlar arası eko-coğrafik varyasyonları saptama çalışmasında, 80 tekrarlanabilir polimorfik bant bildirmiştir.

Tetraploid türlerde SSR allellerinin hangi oranlarda bulunduğunun (dozaj) belirlenmesi zordur. Kapiller elektroforez kullanılarak elde edilen SSR allellerinin dozajlarını belirlemek eğer birey belirli bir SSR lokusunda 4 farklı allelden daha az allel taşıyorsa genellikle imkansızdır. Geleneksel olarak hesaplanan PIC değeri formülü (Botstein ve ark. 1980) diploid türler için geliştirilmiştir. Tetraploid türler için farklı allel (1-4 allel) dozlarından dolayı allellerin varlığından veya yokluğundan yola çıkarak allel frekansı hesaplanması güçtür. Bu nedenle diploid türler için geliştirilen formüller korunga gibi tetraploid türlerde kullanılamamaktadır. Bu nedenle, tetraploid türler için PIC değeri, her bir allelin var/yok sayımı göz önüne alınarak oluşturulmuş Roldan-Ruiz ve ark. (2000)'in geliştirdiği formül ile hesaplanmaktadır. Bu formüle göre ulaşılan maksimum PIC değeri 0,5'dir, buda popülasyonun %50'sinde bulunan allellere karşılık gelir. Küçük PIC değeri, ya bol bolunan allel ya da nadir allellere karşılık gelir (Kempf ve ark. 2016a). Bu formüle göre hesaplanan PIC değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan SSR belirteçleri, Kempf ve ark. (2016a) tarafından geliştirilen 101 SSR lokusundan PIC değerleri dikkate alınarak seçilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 10 SSR belirteci ait polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerleri ile Kempf ve ark. (2016a)'nın çalışmasında bildirilen PIC değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 5.1'de verilmiştir. PIC değerleri; yüksek derecede ($PIC > 0,5$), orta derecede ($0,25 < PIC < 0,5$) ve çok az derecede ($PIC < 0,25$) bilgi verici (informative) olarak gruplandırılabilir. Kempf ve ark. (2016a) 101 SSR lokusunda ortalama PIC değerini 0,14 (OVK141) ile 0,36 (OVK101) arasında saptamıştır. Çalışmada en düşük PIC değerinin 0 (OVK042, OVK172, OVM031, OVM072 ve OVM100) ile 0,17 (OVK131) arasında, en yüksek PIC değerinin ise 0,3 (OVK172) ile 0,5 (16 farklı lokus) arasında olduğu hesaplanmıştır. Tez çalışmamız ile Kempf ve ark. (2016a)'nın çalışmasındaki PIC değerleri birbiri ile uyumludur. Demdoun ve ark. (2012) tarafından yapılan araştırmada *Medicago truncatula* ve *Glycine max*'dan seçilen toplam 27 SSR primeri analiz edilmiş, 6 tanesi 23 korunga popülasyonunda genetik yapının belirlenmesi için kullanılmıştır, bu 6 primere ait PIC değerleri 0,45 ile 0,85 (ortalama 0,72) arasında bulunmuştur. Zarrabian ve Majidi 2015 tarafından 33 *Onobrychis* türüne ait 102 aksesyon üzerinde yapılan çalışmada 22 ISSR primerine ait PIC değerleri 0,34 ile 0,47 (ortalama 0,41) arasında hesaplanmıştır. Bhattarai (2017) yaptığı tez çalışmasında farklı ülkelerden 38 korunga aksesyonunda 5 AFLP primeriyle yaptığı çalışmada PIC değerini 0,126 ile 0,196 arasında hesaplamıştır. Çalışmada AFLP belirteçlerinin dominant bir belirteç olması ve bu nedenle homozigot ve heterozigot alelleri ayırt edememesine rağmen, genetik çeşitlilik ve genotipler arasındaki ilişkileri bilinen türlerde yeterli genomik bilgi yokluğunda kullanılabileceği bildirilmiştir. Tehrani ve ark. (2008) tarafından poliploid *L. persicum* Boiss.'da yapılan çalışmada PIC değeri 0,16 ile 0,44

arasında hesaplanmıştır. Çalıştığımız 10 SSR primerlerinden hesaplanan ortalama PIC değerleri, gelecekte yapılacak olan korunga moleküler çalışmalarında çoğu bireyde çalışılabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar ve bizim tezimiz kapsamında elde edilen sonuçlar, korunga ıslah programları için genetik olarak farklı ebeveynlerin seçilmesi için önem taşımaktadır.

Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan 10 SSR primerine ait PIC değerlerinin Kempf ve ark. (2016a) tarafından yapılan çalışmadaki PIC değerleri ile karşılaştırılması

Tez Çalışması				Kempf ve ark.(2016a)			
Primer	Ort. PIC	Min. PIC	Maks. PIC	Primer	Ort. PIC	Min. PIC	Maks. PIC
OVK036	0,193	0,095	0,492	OVK036	0,350	0,170	0,500
OVK094	0,194	0,095	0,487	OVK094	0,240	0,060	0,480
OVK125	0,296	0,100	0,494	OVK125	0,290	0,060	0,500
OVM033	0,241	0,095	0,500	OVM033	0,290	0,060	0,500
OVK161	0,147	0,095	0,500	OVK161	0,250	0,060	0,400
OVM125	0,293	0,095	0,500	OVM125	0,260	0,060	0,500
OVK046	0,215	0,095	0,500	OVK046	0,310	0,060	0,490
OVM061	0,208	0,095	0,494	OVM061	0,190	0,060	0,500
OVK174	0,245	0,117	0,499	OVK174	0,230	0,060	0,480
OVK101	0,154	0,095	0,488	OVK101	0,360	0,060	0,500

Çalışılan lokuslardaki genetik çeşitliliğin en temel ölçülerinden biri allellik zenginliğin ve popülasyona özgü allellerin belirlenmesidir. Popülasyonlarda belirlenen çok sayıda popülasyona özgü allel, bireylerin genetik farklılığının açıkça bir ifadesi olarak kabul görebilir. Çalışmamızda tüm primerlerde popülasyonlara özgü (private) allel tespit edilmiştir. Bu doğrultuda, çalışmada Özerbey popülasyonunda OVK101 primerine ait 1 allel (377 bç allel), Lütüfey popülasyonunda OVK036 (147 bç allel) ve OVK161 (206 bç allel) primerlerine ait 2 allel, Pleven popülasyonunda OVK036 (154 bç allel), OVK094 (234 bç allel), OVM033 (324 bç allel), OVK046 (160 bç allel), OVM061 (179 bç allel), OVK174 (252 bç allel) ve OVK101 (388 bç allel) primerlerine ait 7 allel, Kırşehir-1 popülasyonunda OVK036 (141 bç allel), OVK046 (152 bç allel) primerlerine ait 2 allel, Kırşehir-2 popülasyonunda OVK094 (255 bç allel), OVM033 (306 bç allel), OVK161 (274 bç allel) ve OVK046 (154 bç allel) primerlerine

ait 4 allel populusyona özgü (private) allel olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Kempf ve ark. (2016a)'nın çalışmasında 101 SSR primerine ait 250 adet bireye özgü (private) allel tespit edilmiştir. Kempf ve ark. (2016a)'nın çalışmasında (tez çalışmasında ortak olarak kullanılan) 10 SSR primeri için toplam 18 bireye özgü allel belirlenmiştir. Çalışmada OVK036 primerinde populusyona özgü allel gözlenmezken, tez çalışmamızda toplam 3 adet populusyona özgü (private) allel tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması doğrultusunda genetik çeşitlilik parametrelerinden bir tanesi olan Shannon sabiti (I) hesaplanmıştır. En yüksek I değeri Pleven populusyonunda ($0,385 \pm 0,030$), en düşük ise Kırşehir-1 ($0,251 \pm 0,032$) populusyonunda hesaplanmıştır. Populusyonlardaki hesaplanan I değeri (ortalama $I = 0,322$) populusyonlardaki genetik çeşitliliği göstermektedir. Nosrati ve ark. (2012)'nin, farklı bölgelerden topladıkları 5 yabancı korunga populusyonunda 5 RAPD primerleriyle yaptığı çalışmada, Shannon sabiti (I) 0,364 ile 0,461 arasında hesaplanmıştır. Nosrati ve ark. (2016)'nın ISSR primerleri ile yaptıkları çalışmada, Shannon sabiti 0,1816 ile 0,2779 arasında hesaplanmıştır. Zarrabian ve ark. (2013)'nin 46 İran ve 34 egzotik olmak üzere toplam 80 korunga aksesyonunda yaptığı çalışmada, Shannon sabiti (I) 0,33 ile 0,57 arasında hesaplanmış, en fazla çeşitliliğin İran grubu Zagros Dağlarında (0,44), ekzotik bölge aksesyonlarından Asya ve Doğu Avrupa aksesyonlarında (0,45) olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında Avrupadaki korunga aksesyonlarının Asya ve Doğu Avrupa arasındaki bir bölgeden geldiği hipotezinin desteklendiği görülmüştür.

Bu tez çalışması kapsamında hesaplanan Nei'nin genetik çeşitlilik değeri (h) 0,161 (Kırşehir-1) ile 0,252 (Pleven) arasında hesaplanmıştır. Nei'nin ortalama genetik çeşitlilik değeri (h) 0,210 olarak belirlenmiştir. Hejrankesh ve ark. (2014)'nin 10 İran yerel korunga çeşitlerinde 90 RAPD belirteci ile yaptıkları çalışmada, h değeri 0,300 ile 0,343 arasında hesaplanmıştır. Nosrati ve ark. (2016)'nın ISSR belirteçleriyle 5 İran populusyonunda yaptıkları çalışmada, h değerinin 0,118 ile 0,179 arasında olduğu bildirilmiştir. Nosrati ve ark. (2012)'nin RAPD primerleriyle 5 korunga populusyonunda yaptıkları çalışmada h değeri 0,246 ile 0,318 arasında bulunmuştur. Avcı ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada Nei'nin genetik çeşitlilik değeri 0,140 ile 0,307 arasında hesaplanmıştır. Tez çalışmasından elde edilen sonuçları benzer çalışmalarla mukayese ettiğimizde çalışılan populusyon sayılarının ve belirteç tipinin farklı olması h değerinin bazı çalışmalardan yüksek/düşük veya yakın olarak hesaplanmasını sağlamıştır.

Basamaklı mutasyon modeline göre elde edilen verilerin incelenmesiyle yapmış olduğumuz moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre, çalışılan beş korunga çeşit ve populusyonu arasındaki genetik çeşitlilik %92 oranında populusyonlar içeresindedir.

Populasyonlar arası genetik çeşitlilik ise %8 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre bireylerin kendi içlerindeki genetik çeşitliliğin yüksek olduğu görülmektedir. Hejrankesh ve ark. (2014)'nın İran yerel çeşitlerinde yaptıkları çalışmada moleküler varyans analizi sonuçlarına göre genetik çeşitliliğin büyük oranda populasyon içinde olduğu (% 83,87), populasyonlar arası çeşitliliğin az olduğu görülmüştür (%16,13). Buradaki yerel çeşitler içi çeşitliliğin yüksek olması korunganın yabancı döllenenmesi ve tozlayıcı böceklerin korungaları tozlamasıyla bu çeşitliliğin meydana geldiği bildirilmiştir. Zarrabian ve ark. (2013)'nın Dünya koleksiyonlarında ISSR belirteçleri kullanarak yaptıkları çalışmadan elde edilen AMOVA sonuçlarına göre, 2 gruba ayrılan aksesyonlara bakıldığında, İran gruplarında çeşitliliğin aksesyonlar içinde (%80,21) olduğu aksesyonlar arası çeşitliliğin (%19,79) olduğu, egzotik gruplarda ise çeşitliliğin aksesyonlar içinde (%80,42) olduğu ve aksesyonlar arası çeşitliliğin %19,58 olduğu belirlenmiştir. Rasouli ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada populasyonlar arası çeşitliliğin düşük (%22) ve populasyonlar içi çeşitliliğin yüksek (%78) olduğu bildirilmiş ve populasyon içi varyasyonun yüksek olmasının yüksek gen akışı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda populasyonları arası genetik farklılaşma düzeyi, Nei'nin tarafsız genetik benzerlik veya farklılık katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır (Nei 1987). Çalışmada kullandığımız SSR lokuslarına dayanarak hesaplanan genetik benzerlik değerleri 0,943 ile 0,982 arasında değişim göstermektedir. Genetik farklılık değerlerine baktığımızda Özerbey ve Lütfubey populasyonları arasında en düşük (0,018), Pleven ve Kırşehir-1 populasyonları arasında da en yüksek (0,058) bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, Pleven ve Kırşehir-1 populasyonları genetik yapılarına göre birbirine en uzak populasyonlardır. Ülkemizde tescilli ilk iki çeşidi olan Özerbey ve Lütfubey birbirlerine en yakın çeşitler olarak belirlenmiştir. Burada aynı bölgeden olan Kırşehir-1 ve Kırşehir-2 populasyonlarının birbirinden uzak olmaları, Kırşehir ilinin farklı bölgelerinden toplanan populasyonlar olduğunu düşündürmektedir. Avcı ve ark. (2014)'nın 58 korunga taksonunda yaptıkları çalışmada, Nei'nin genetik benzerlik değeri 0,013 ile 0,399 arasında hesaplanmıştır. *Onobrychis* genomlarına benzerlik gösteren *P. vulgaris* ve *M. truncatula* genomları arasındaki %10'luk farkın korunga çalışmalarında yakın akrabalarından kullanılacak primerlerin sınırlı olduğunu göstermiştir. Nosrati ve ark. (2012)'nin çalışmasında en yüksek genetik mesafe değeri 0,1654 olarak hesaplanmıştır. Benzer stres koşullarında yetişen populasyonların genetik olarak daha fazla benzer oldukları belirlenmiştir. Nosrati ve ark. (2012) farklı bölgelerden 5 yabancı korunga populasyonda genetik mesafe değerini 0,635 (Sarab-Heris) ile 0,1654 (Bonab-Heris) arasında hesaplamıştır. Burada coğrafi mesafelerden çok ekolojik etkinin genetik varyasyona etki ettiği

ve genetik varyasyonun çevresel koşullarla ilişkisinin ya doğal seleksiyon yada lokal gen ayrımı nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmada ve bizim çalışmamızda benzer sayıda populasyon (5 populasyon) kullanılmıştır. Az sayıdaki populasyonlarda istatistiksel ilişki ve değerlendirme yapmanın bize sınırlı bilgi vereceği düşünülmektedir.

Korunga kıraç, fakir, kireçli topraklarda yetişebilen çok yıllık kuraklığa dayanıklı bir yem bitkisidir. Suyun olmadığı kurak alanlarda yoncaya alternatif olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Hayvancılıkta en büyük gider, yem giderleridir. Ülkemizde de kaba yem ihtiyacı açıkça görülmektedir. Karlı bir hayvancılık için kaba yem ihtiyacı giderilmeli, işletmelerin hayvanları sap saman gibi besleme değeri düşük yada hiç olmayan yemlerle beslemeleri yerine kaba yem gibi sağlıklı proteini yüksek yemlerle beslemeleri sağlanmalıdır. Bununla birlikte kaba yem ihtiyacını karşılayacak çeşitlerin ıslahı, çayır mera alanlarının ıslahı ve birim alandan alınan verimin artırılması hem üreticimize hemde hayvansal üretim yapan işletmelere katkı sağlayacak, işletmenin karlı bir hale geçerek hem ülke ekonomisine hem de üreticisine destek sağlayacaktır. Yapılan literatür taramalarında türün moleküler anlamda genetik yapısının bilinmesi, yapısının çıkartılması bundan sonra yapılacak olan türün ve/veya yakın akraba türlerinin ıslahı, genetik ve çeşitli araştırmalarına ışık tutacaktır. Korunga gibi üzerinde çalışılması gereken yem bitkilerinin özellikle marjinal alanlarda yetişebilen bu tür bitkilerin genomlarında gizli kalmış bilgiler açığa çıkartılarak, ıslah çalışmalarıyla yeni çeşitler geliştirilecek ve tarıma kazandırılacaktır. Çalışmamızda kullandığımız belirteçler Kempf ve ark. (2016a) tarafından bu türe spesifik geliştirilen ilk primerlerdir. Korungaya özgü geliştirilen primerleri kullanarak yaptığımız bu tez çalışması türün genetik çeşitliliği, populasyon arası ve populasyonlar içi varyasyonu belirleyerek bundan sonra yapılacak olan çalışmalara kaynak sağlayacaktır, ayrıca türün genetik yapısını ortaya çıkararak sahip olduğumuz biyoçeşitlilikten faydalanmayı sağlayacaktır. Yem bitkileri alanında yapılacak bu tür çalışmaların, genomlarda gizli kalan karanlıkları aydınlığa kavuşturarak bilim dünyasına önemli katkılar sağlayacağını umut ederiz.

6. KAYNAKLAR

- Açıkgöz E (2001). Yem Bitkileri, Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 83-94 s., Bursa.
- Aktoklu M (1995). Türkiye’de Yetişen *Onobrychis* Miller (Fabaceae) Türlerinin Revizyonu. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Biyoloji Anabilim Dalı, 134 s.
- Anonim (2015). Korunga Yetiştiriciliği. T.C. Ankara Valiliği, Ankara İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Çiftçi Eğitim Broşürü.
- Anonim (2017a). Anti-Parazit Benefits.
<http://legumeplus.eu/anti-parasitic-benefits> (Erişim Tarihi: 20.07.2017).
- Anonim (2017b). TÜBİVES Türkiye Bitkileri Veri Servisi.
http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=3485.(Erişim Tarihi: 01.08.2017).
- Anonim (2017c). Healty Hay Project.
legumeplus.eu/healthyhay-project. (Erişim Tarihi: 19.09.2017).
- Anonim (2017d). European Commission Agricultural Species – Varieties.
http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm?event=SearchVariety&ctl_type=A&species_id=217&variety_name=&listed_in=0&show_current=on&show_deleted= (Erişim Tarihi: 13.09.2017)
- Anonim (2017e). Özerbey 03 Korunga Çeşidi.
<http://arastirma.tarim.gov.tr/tarlabitkileri/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=47>. (Erişim Tarihi: 01.10.2017).
- Anonim (2017f). Lütfübey Korungası.
<http://arastirma.tarim.gov.tr/datae/Menu/20/Cayir-Mera-Ve-Yem-Bitkileri-Bolumu>. (Erişim Tarihi: 01.10.2017).
- Avcı S (2010). Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Yabani Korunga (*Onobrychis* sp.) Türlerinin Toplanması ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Tarla bitkileri anabilim dalı, 313 s, Ankara.
- Avcı S, İlhan E, Erayman M, Sancak C (2014). Analysis of *Onobrychis* Genetic Diversity Using SSR Markers from Related Legume Species. The Journal of Animal & Plant Sciences, 24(2): 556-566.
- Aygün C, Kara E, Çakal Ş (2007). Yem Bitkileri Türlerinin Kültüre Alınma Olanakları. Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran 2007, Erzurum (Poster Bildiri).
- Balabanlı C, Yüksel O, Karadoğan T (2007). Korungada (*Onobrychis sativa* Lam.) Gelişim Seyrinin Belirlenmesi. Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran 2007, Erzurum (Poster Bildiri).
- Bandara NL, Papini A, Mosti S, Brown T, Smith LMJ (2013). A Phylogenetic Analysis of Genus *Onobrychis* and Its Relationships Within the Tribe *Hedysareae* (Fabaceae). Turk J Bot. 37: 981-992.

- Barry TN, McNabb WC (1999). The Implications of Condensed Tannins on the Nutritive Value of Temperate Forages Fed to Ruminants. *Br. J. Nutr.* 81: 263-272.
- Beaumont MA, Bruford MW (1999). Microsatellites in Conservation Genetics. *Microsatellites: Evolution and Applications*. In D.B. Goldstein & C. Schlötterer, Oxford University Press, New York, 165-182.
- Birsin MA, Önde S, Özgen M (2005). Korungaya (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Partikül Bombardmanı ile Gen Aktarımında Fiziksel ve Kimyasal Parametrelerin Etkisi. *Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2): 241-244.
- Bhattarai S (2017). Characterization of Diverse Germplasm of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Using Agro-Morphological Traits and AFLP Molecular Markers. Thesis Degree of Master of Science, Department of Plant Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.
- Botstein D, White RL, Skolnick K, Davis RW (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Boval M, Dixon R (2012). The Importance of Grasslands for Animal Production and Other Functions: A Review on Management and Methodological Progress in the Tropics. *Animal*, 6(5): 748-762.
- Carbonero CH (2011). Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), A Forage Legume With Great Potential for Sustainable Agriculture, an Insight on Its Morphological, Agronomical, Cytological and Genetic Characterisation. Doctor of Philosophy Thesis, Faculty of Life Sciences, Manchester, United Kingdom.
- Carbonero CH, Carbonero F, Smith LMJ, Brown TA (2012). Phylogenetic Characterisation of *Onobrychis* Species with Special Focus on The Forage Crop *Onobrychis viciifolia*. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59: 1777-1788.
- Carneiro Vieira ML, Santini L, Diniz AL, Munhoz CDF (2016). Microsatellite Markers: What They Mean and Why They are So Useful. *Genetic and Molecular Biology*, 39(3): 312-328.
- Cebeci H (2011). Farklı Kökenli Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop. ve *Onobrychis altissima* Grossh) Populasyonlarının Tarımsal Özelliklerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 79 s, Ankara.
- Chakraborty R, Kimmel M (1999). Statistics of Microsatellite loci: Estimation of Mutation Rate and Pattern of Population Expansion. *Microsatellites: Evolution and Applications*, In D.B. Goldstein & C. Schlötterer, Oxford University Press, New York, 139-150.
- Coop RL, Kyriazakis I (1999). Nutrition–Parasite Interaction. *Vet. Parasitol*, 84: 187-204.
- Cregan B, Mudge J, Fickus EW, Marek LF, Danesh D, Denny R, Shoemaker RC, Matthews BF, Jarvik T, Young ND (1999). Targeted Isolation of Simple Sequence Repeat Markers Through the Use of Bacterial Artificial Chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 919-928.

- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A Plant DNA Miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 19-21.
- Demdoum S, Munoz F, Delgado I, Valderrabano J, Wunsch A (2012). EST-SSR Cross Amplification and Genetic Similarity in *Onobrychis* Genus. Genet. Resour. Crop Evol., 59: 253-260.
- Doyle JJ, Doyle JI (1990). Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. Focus 12: 13-15.
- Dubbs AL (1968). Sainfoin as a Honey Crop. Sainfoin Symposium, Montana State University, December 12-13 Bojeman, Montana
- Eken C, Demirci E, Dane E (2004). Species of *Fusarium* on Sainfoin in Erzurum, Turkey. New Zealand Journal of Agricultural Research, 47: 261-262.
- Elçi Ş (1954). Anadolu'nun Önemli Yem Bitkilerinden Birkaç Korunga (*Onobrychis* sp.) Türü Üzerinde Bazı Morfolojik ve Biyolojik Araştırmalar. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Doktora Tezi. Ankara.
- Elçi Ş (2005). Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, s. 223-257, Ankara.
- Ellegren H (2004). Microsatellites: Simple Sequences With Complex Evolution. Nature Reviews Genetics, 5: 435-445.
- Field D, Wills C (1998). Long Polymorphic Microsatellites in Simple Organisms. Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences, 263: 209-215.
- Gaitan-Solis E, Duque MC, Edwards KJ, Tohme J (2002). Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. Crop Sci., 42: 2128-2136.
- Goplen, BP, Richards KW, Moyer, JR (1991). Sainfoin for Western Canada. Agriculture Canada Publi. 1470/E, Ottawa, Ont. 23.
- Gutierrez MV, Patto MCV, Huguet T, Cubero JI, Moreno MT, Torres AM (2005). Cross-Species Amplification of *Medicago truncatula* Microsatellites Across Three Major Pulse Crops. Theor Appl Genet, 110: 1210-1217.
- Hagerman, AE, Butler LG (1991). Tannins and lignins. Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites, 2nd Edition. Ed: Rosental, GA, Berenbaum, MR, Academic Press, San Diego, 355-376.
- Halitgil MB, Erkovan Hİ, Serin Y, Tan M, Kışlal H (2007) Bazı Baklagil-Buğdaygil Yem Bitkileri Karışımlarında Azot Transferi, Azot Kullanım Etkinliği ve Gübrenin Paylaşımı. Türkiye 7. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran 2007, Erzurum.
- Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ (2014). Protocol: A Simple Method for Extracting Next-Generation Sequencing Quality Genomic DNA from Recalcitrant Plant Species. Plant Methods. 10: 21.

- Heckendorn F, Haring DA, Maurer V, Zinsstag J, Langhans W, Hertzberg H (2006). Effect of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) Silage and Hay on Established Populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in Lambs. *Veterinary Parasitology*, 142: 293-300.
- Heckendorn F, Haring DA, Maurer V, Senn M, Hertzberg H (2007a). Individual Administration of Three Tanniferous Forage Plants to Lambs Artificially Infected With *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology*, 146: 123-134.
- Heckendorn F, Haaring DA, Maurer V, Langhans W, Hertzberg H (2007b). Effect of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) Silage and Hay Against Gastrointestinal Nematodes in Lambs. Paper Presented at Zwiasschn Traditionund Globalisierung- 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland.
- Hejrankesh N, Haghighi AR, Mousavizadeh SA, Rashidi V (2014). Evaluation of Genetic Diversity of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) Landraces Using RAPD Markers. *Journal of Current Research in Science*, 2: 739-748.
- Hoskin SO, Barry TN, Wilson PR, Charleston WAG, Hodgson J (1999). Effects of Reducing Anthelmintic input Upon Growth and Faecal Egg and Larval Counts in Young Farmed Deer Grazing Chicory (*Chicorium intybus*) and Perennial Ryegrass (*Lolium perenne*)/White Clover (*Trifolium repens*) Pasture. *J. Agric. Sci.* 132: 335-345.
- Hoste H, Heckendorn F, Werne S, Sotiraki S (2014). Sainfoin, a Natural Anthelmintic for Small Ruminants? LowInputBreeds Technical Note, 1-4.
- Hybner RM (2013). Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, Plant Materials Technical Note No. MT-91 September. Page:1-6.
- Irani S, Mirlohi A, Majidi MM, Talebi M (2015). Exploitation of Medicago SSR Markers in Assessment of Genetic Diversity in Cultivated Sainfoin populations. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 23: 151-162.
- Işık K, Semiz G, Kurt Y (2005). Farklı Doğal Alanların, İçerdikleri Türler Açısından UPGMA Kümelendirme Yöntemine Göre Karşılaştırılması. *Korunan Doğal Alanlar Sempozyumu*, SDÜ, Isparta.
- Jabbar A, Iqbal Z, Kerboeuf D, Muhammad G, Khan MN, Afaq M (2006). Anthelmintic Resistance: The State of Play Revisited. *Life Sciences*, 79: 2413-2431.
- Julier B, Flajoulot S, Barre P, Cardinet G, Santoni S, Huguet T, Huyghe C (2003). Construction of Two Genetic Linkage Maps in Cultivated Tetraploid Alfalfa (*Medicago Sativa*) Using Microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biol.*, 3: 9.
- Kar SSC, Ghanavati F, Naghavi MR, Amirabadi-zade H, Rabiee R (2014). Molecular Phylogenetics of the *Onobrychis* genus (Fabaceae: Papilionoideae) Using ITS and *trnL-trnF* DNA Sequence Data. *Australian Journal of Botany*, 62(3): 235-250.
- Kashi Y, Soller M (1999) Functional Roles of Microsatellites and Minisatellites. *Microsatellites: Evolution and Applications*. In: Goldstein DB and Schlötterer C, Oxford University Press, New York, 10-23.

- Kashi Y, King D, Soller M (1997). Simple Sequence Repeats as a Source of Quantitative Genetic Variation. *Trends Genet.*, 13: 74-78.
- Kempf K, Grieder C, Walter A, Widmer F, Reinhard S, Kölliker R (2015). Evidence and Consequences of Self-fertilization in the Predominantly Outbreeding Forage Legume *Onobrychis viciifolia*. *BMC Genetics*, 16: 117.
- Kempf K, Mora-Ortiz M, Smith MJ, Kölliker R, Skot L (2016a). Characterization of Novel SSR Markers in Diverse Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) Germplasm. *BMC Genetics*, 17: 124.
- Kempf K (2016b). Self-Fertilization and Marker-Trait Associations in Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Doctor of Philosophy. Thesis, Agr. Biol., University of Hohenheim, Germany.
- Knapik EW, Goodman A, Ekker M, Chevrette M, Delgado J, Neuhauss S, Shimoda N, Driever W, Fishman MC and Jacob HJ (1998). A Microsatellite Genetic Linkage Map for Zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics* 18: 338-343.
- Kovalchuk O, Kovalchuk I, Arkhipov A, Hohn B, Dubrova YE (2003). Extremely Complex Pattern of Microsatellite Mutation in the Germline of Wheat Exposed to the Post-Chernobyl Radioactive Contamination. *Mutat. Res.*, 525: 93-101.
- Larue TA, Patterson TG (1981). How Much Nitrogen Do Legume Fix? *Advances in Agron.* 34: 15-36.
- Litt M, Luty JA (1989). A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Li YG, Tanner G, Larkin P (1996). The DMACA-HCl Protocol and The Threshold Proanthocyanidin Content for Bloat Safety in Forage Legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70: 89-101.
- Liu BH (1998). *Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis*. CRC Press LLC, Boca Raton New York.
- Massoud R, Karamian R, Hadadi A (2010). Cytosystematics of Three *Onobrychis* Species (*Fabaceae*) in Iran. *Caryologia*, 63(3): 237-249.
- McKellar QA (1997). Ecotoxicology and Residues of Anthelmintic Compounds. *Vet. Parasitol.* 72: 413-435.
- Miah G, Rafii MY, Ismail MR, Puteh AB, Rahim HA, Islam KhN, Latif MA (2013). A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 22499-22528.
- Morgante M, Olivieri AM (1993). PCR-Amplified Microsatellites as Markers in Plant Genetics. *The Plant Journal*, 3(1): 175-182.

- Moritz C, Hillis DM (1996). Molecular Systematics: Context and Controversies. Molecular Systematics, 2nd edition. In D.M. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable, Sinauer Associates, Massachusetts, 1-13.
- Mueller-Harvey I, McAllan AB (1992). Tannins: Their Biochemistry and Nutritional Properties. Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol, 1: 151-217.
- Nei M (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 512 p.
- Negri V, Veronesi F, Felcinelli M (1987). Agraria Genetica. Perugia, Borgo XX Guignon. 74, 41: 1, 25-41 06100 Perugia, İtalya
- Nelson CJ and Moser LE (1995) Morphology and Systematics. In: Forages Vol.I: An Introduction to Grassland Agriculture, (R.F. Barnes, D.A. Miller and C.J. Nelson Eds.) Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa USA, p:15-30.
- Niezen JH, Waghorn TS, Charleston WAG, Waghorn GC (1995). Growth and Gastrointestinal Nematode Parasitism in Lambs Grazing Either Lucerne (*Medicago Sativa*) or Sulla (*Hedysarum Coronarium*) Which Contains Condensed Tannins. J. Agric. Sci., 125: 281-289.
- Nosrati H, Feizi MAH, Tarrah SS, Haghighi AR (2012). Population Genetic Variation in Sainfoin (*Fabaceae*) Revealed by RAPD Markers. Analele Universităţii din Oradea - Fascicula Biologie, 1: 11-16.
- Nosrati H, Feizi MAH, Latifian F, Haghighi AR (2016). Eco-Geographical Variations of ISSRS Among Populations of *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin, Fabaceae). Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie, 2: 62-66.
- Oğuz C, Direk M (2014). Yemeliklik Baklagil Çalıştayı. Sayfa:28, 05-06 Mart 2014 Konya.
- Okcu M, Sengul S, Sunar S, Agar G (2013). Molecular Characterization of Some *Onobrychis* Species Growing in The Eastern Anatolia Region of Turkey. Journal of Food, Agriculture & Environment, 11(1): 445-418.
- Özalp T, Temel O (2016). Artvin'in Şavşat İlçesinde Yetiştirilen Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Yem Bitkisinin Kalitesi ve Verimi Üzerine Yükseltinin ve Bazı Toprak Özelliklerinin Etkisi, Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi 31: 106-116.
- Özbek H (2011). Korunga (*Onobrychis viciifolia* SCOP.): Önemli Bir Arı Bitkisi. Uludağ Arıcılık Dergisi, 11(2): 51-62.
- Özdüven L (2017). Rumen Şişkinliği ve Köpürme (Rumen Timpanisi). Zootečni Bölümü Ders Notları, NKÜ Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Tekirdağ.
- Özkan U, Demirbağ S (2016). Türkiye'de Kaliteli Kaba Yem Kaynaklarını Mevcut Durumu, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 9 (1): 23-27.
- Parker RJ, Moss BR (1981). Nutritional Value of Sainfoin Hay Compared with Alfalfa Hay. J. Dairy Sci. 64: 206-210.

- Parlak AÖ, Gökkuş A, Samıkıran E, Şenol Y M (2014). Bazı Yabancı Korunga Türlerinin Morfolojik ve Agronomik Özelliklerinin İncelenmesi, COMU Journal of Agriculture Faculty, 2 (2): 111-117.
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A (1998). Cross-species Amplification of Soybean (*Glycine max*) Simple Sequence Repeats (SSRs) Within the Genus and Other Legume Genera: Implications for the Transferability of SSRs in Plants. Mol Biol Evol, 15: 1275-1287.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. Molecular Ecology Notes, 6: 288-295.
- Rasouli M, Jaferi AA, Tabaei-Aghdaei SR, Shanjani PS, Darvish F (2013). Assesment of Genetic Variability of 36 Populations of Sainfoin (*Onobrychis sativa*) Based on RAPD Markers. International Journal of Biosciences, 3(10): 15-26.
- Rochon JJ, Doyle CJ, Greef JM, Hopkins A, Molle G, Sitzia M, Scholefield D, Smith CJ (2004). Grazing Legumes in Europe: A Review of Their Status, Management, Benefits, Research Needs and Future Prospects. Grass and Forage Science, 59: 197-214.
- Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Van Bockstaele E, Depicker A, De loose M (2000). AFLP Markers Reveal High Polymorphic Rates in Rygrasses (*Lolium* spp.). Molecular Breeding, 6: 125-134.
- Sangster NC (1999). Anthelmintic Resistance: Past, Present and Future. Int. J. Parasitol, 29: 115-124.
- Schlötterer C (2003). Hitchhiking Mapping-Functional Genomics From The Population Genetics Perspective. Trends Genet. 19: 32-38.
- Schlötterer C, Wiehe T (1999). Microsatellites, A Neutral Marker to Infer Selective Sweeps. Microsatellites: Evolution and Applications, In D.B. Goldstein & C. Schlötterer, Oxford University Press New York, 238-248.
- Schuelke M (2000). An Economic Method for the Fluorescent Labeling of PCR Fragments. Nature Biotechnology, 18: 233-234.
- Schultz JC (1989). Tannin–insect interactions. Chemistry and Significance of Condensed Tannins. Ed: Hemingway RW, Karchesy JJ, Plenum Press, New York, 417-433.
- Shen Z, Chen B, Kang J, Wei X, Zhang Y (2010). Optimization of ISSR-PCR System and Its Application in the Identification of Sainfoin Germplasm of Space Irradiation. Pratacultural Science, 27(12): 65-72.
- Smoliak S, Hanna MR (1975) Productivity af Alfalfa, Sainfoin and Cicer Milk Vetch in Sub Irrigated Land When Grazed Sheep. Can. J. PlantSci. 55: 415-420.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973). Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 573 pp.

- Sottie ET (2014). Characterization of New Sainfoin Populations for Mixed Alfalfa Pastures in Western Canada. Doctor of Philosophy. Thesis, School of Graduate Studies, Lethbridge, Alberta, Canada.
- Souza HAV, Muller LAC, Brandão RL, Lovato MB (2012). Isolation of High Quality and Polysaccharide-Free DNA From Leaves of *Dimorphandra Mollis* (Leguminosae), A Tree From The Brazilian Cerrado. Genet. Mol. Res. 11(1): 756-764.
- Soya H, Avcıoğlu R, Geren H (2004). Yem Bitkileri. Hasat Yayıncılık, ss:223.
- Strassmann JE, Solis CR, Peters JM, Queller DC (1996). Strategies for Finding and Using Highly Polymorphic DNA Microsatellite Loci for Studies of Genetic Relatedness and Pedigrees. Molecular Methods in Zoology and Evolution, Ed: Ferraris JD, Palumbi SR, New York, 163-180.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol., 30(12): 2725-2729.
- Tan M, Sancak C (2009). Korunga(*Onobrychis viciifolia* Scop.) Cilt: 2, Yem Bitkileri (Baklagil Yem Bitkileri), Ed: Avcıoğlu R, Hatipoğlu R, Karadağ Y. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, İzmir, 337-352.
- Tan M, Serin Y (2009). Baklagil Yem Bitkilerinin Tarımsal Özellikleri, Ekonomik Önemleri, Taksonomileri ve Genel Yapısal Özellikleri, Cilt: 2, Yem Bitkileri (Baklagil Yem Bitkileri), Ed: Avcıoğlu R, Hatipoğlu R, Karadağ Y. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, İzmir, 277-289.
- Tan M, Yolcu H (2008). Ülkemiz Yem Bitkilerine Genel Bir Bakış. Tarım Bilimleri Dergisi, 14(3): 303-312.
- Tautz, D Trick M, Dover G (1986). Cryptic Simplicity in DNA is a Major Source of Genetic Variation. Nature, 322: 652-656.
- Tehrani MS, Mardi M, Saeidi H, Gharehyazi B, Assadi M 2008. Transferability of Genomic and EST-Microsatellites from *Festuca arundinacea* Schreb. to *Lolium persicum* Boiss. and Hohen. ex Boiss. Int J Bot., 4:476-80.
- Thompson WF, Murray Mg (1980). Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA. Nukleic Acid Research, 8(19): 4321-4325.
- Toluei Z, Ranjbar M, Wink M, Atri M (2013a). Molecular Characterization of *Onobrychis altissima* (Fabaceae) Populations from Iran, with the Description of *O. chaldoranensis* sp. Nova. Annales Botanici Fennici, 50(4): 249-257.
- Toluei Z, Atri M, Ranjbar M, Wink M (2013b). Iranian *Onobrychis carduchorum* (Fabaceae) populations: morphology, ecology and phylogeography. Plant Ecology and Evolution, 146(1): 53-67.
- Tosun F (1992). Bitki Yetiştiriciliğinin Fizyolojik Esasları. OMÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Ders Notları No:5, 244 s, Samsun.

- Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000). Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- Vernon BG (1999). Tannins: Implications for Non Ruminants. *Secondary Plant Products. Antinutritional and Beneficial Actions in Animal Feeding*. Ed: Caygill JC, Mueller-Harvey I, Nottingham University Press, Nottingham, 41-49.
- Weber JL, May PE (1989). Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which can be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Weishing K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1995). DNA Isolation and Purification. In: *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 44-59.
- Yang HB, Kang WH, Nahm SH, Kang BC (2015). Methods for Developing Molecular Markers. In: Koh HJ., Kwon SY., Thomson M. (eds) *Current Technologies in Plant Molecular Breeding*. Springer, Dordrecht, 15-50.
- Zarrabian M, Majidi MM (2015). Genetic Diversity and Relationships Within and Among *Onobrychis* Species Using Molecular Markers. *Turkish Journal of Botany*, 39: 681-692.
- Zarrabian M, Majidi MM, Ehtemam MH (2013). Genetic Diversity in a Worldwide Collection of Sainfoin Using Morphological, Anatomical, and Molecular Markers. *Crop Science*, 53: 2483-2496.
- Zhang Y, Sledge MK, Bouton JH (2007). Genome Mapping of White Clover (*Trifolium repens* L.) and Comparative Analysis Within The Trifolieae Using Cross-Species SSR Markers. *Theor Appl Genet*, 114: 1367-1378.

ÖZGEÇMİŞ

Selman Özkan 1992 yılında Pamukova’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sakarya’nın Pamukova ilçesi Pınarlıbacı İlköğretim Okulu’nda tamamladı. Lise öğrenimini ise Pamukova Endüstri Meslek Lisesi’nde tamamladı. Lisans eğitimi için 2011 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü’ne girdi. Bu bölümden 2015 yılında mezun oldu. Eylül 2015’de Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda, Bitki Moleküler Genetiği üzerine yüksek lisans eğitimine başladı.

