



**FARKLI KORUNGA (*Onobrychis* Mill.) TÜRLERİNE
AİT AKSESYONLARIN FLOW SİTOMETRİ VE DNA
MARKÖR (SSR) YÖNTEMLERİYLE
KARAKTERİZASYONU**

Elbi Cansu YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

**Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Metin TUNA**

2020

T. C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI KORUNGA (*Onobrychis* Mill.) TÜRLERİNE AİT
AKSESİYONLARIN FLOW SİTOMETRİ VE DNA MARKÖR (SSR)
YÖNTEMLERİYLE KARAKTERİZASYONU**

ELBİ CANSU YILMAZ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. METİN TUNA

TEKİRDAĞ-2020

Her hakkı saklıdır.



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Elbi Cansu YILMAZ



Bu tez TÜBİTAK tarafından 215O526 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Metin TUNA danışmanlığında, Elbi Cansu YILMAZ tarafından hazırlanan “Farklı Korunga (*Onobrychis* Mill.) türlerine ait aksesyonların flow sitometri ve DNA markör (SSR) yöntemleriyle karakterizasyonu” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Prof. Dr. Metin TUNA

İmza:

Üye: Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KORUNGA (*Onobrychis* Mill.) TÜRLERİNE AİT AKSESİYONLARIN FLOW SİTOMETRİ VE DNA MARKÖR (SSR) YÖNTEMLERİYLE KARAKTERİZASYONU

ELBİ CANSU YILMAZ

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Metin TUNA

Bu yüksek lisans tezinin amacı 18 farklı korunga türüne (*O. arenaria* subsp. *arenaria*, *O. inermis*, *O. petraea*, *O. cyri*, *O. iberica*, *O. altissima*, *O. vassilczenkoi*, *O. conferta* subsp. *argentea*, *O. alba* subs. *laconica*, *O. biebersteinii*, *O. grandis*, *O. kachetica*, *O. kamularie*, *O. oxyodonta*, *O. megataphros*, *O. pallasii*, *Onobrychis* spp., *O. viciifolia*) ait 44 aksesyonu temsilen seçilen 100 genotipin flow sitometri yöntemi ile çekirdek DNA içerikleri ile ploidi seviyelerini belirlemek ve mikrosatellit yöntemi ile korunga cinsi içerisindeki genetik çeşitlilik ve ilişkileri incelemektir. Yapılmış olan flow sitometri analizlerinde aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içeriklerinin 2,73 pg ile 1,03 pg arasında değiştiği belirlenmiştir. Aksesyonların çekirdek DNA içerikleri ile kromozom sayıları ilişkilendirildiğinde 9 aksesyonun diploid ($2n=14, 16$), 35 aksesyonun ise tetraploid ($2n=28$) olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada 8 SSR lokusu kullanılarak (OVK036, OVK094, OVK125, OVM033, OVK161, OVK046, OVM061, OVK174) korunga cinsi içerisindeki genetik çeşitlilik ve türlerin genetik ilişkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılmış olan tüm SSR primerleri polimorfik olarak belirlenmiştir. Çalışmada ortalama allel sayısı ($N_A=11,625$), Shannon sabiti ($H=0,301$), Nei'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri ($u_h=0,187$) gibi genetik çeşitlilik parametreleri hesaplanmış, UPGMA esasına dayalı bir dendrogram elde edilmiştir. Dendrogramda *Hymenobrychis* seksiyonu içerisinde yer alan türlere ait genotiplerin bir arada kümelendiği ve *Eubrychis* seksiyonunun aynı ploidy düzeyine sahip genotipleri ile bir alt grup içerisinde bulunduğu görülmüştür. Bununla birlikte poliploidlerin ise belirgin bir küme oluşturmayıp dendrogram içerisinde nispeten homojen bir dağılışı gösterdiği gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar poliploid korunga türlerinin aralarında kolayca melezlenebildikleri ve genetik materyal alışverişinde bulunduklarını ve bu yüzden de kompleks bir yapıya sahip olduklarını işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Korunga, Flow sitometri, SSR, *Onobrychis* spp., Filogenetik, Ploidi, Çekirdek DNA içeriği

ABSTRACT

MSc. Thesis

CHARACTERIZATION OF ACCESSIONS OF SOME ONOBRYCHIS SPECIES BY FLOW CYTOMETER AND DNA MARKERS (SSR)

Elbi Cansu YILMAZ

Tekirdağ Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops
Supervisor: Prof. Dr. Metin TUNA

The objectives of this master thesis are to determine nuclear DNA contents, and ploidy levels of 100 genotypes representing 44 accession from 18 different species (*O. arenaria* subsp. *arenaria*, *O. inermis*, *O. petraea*, *O. cyri*, *O. iberica*, *O. altissima*, *O. vassilczenkoi*, *O. conferta* subsp. *argentea*, *O. alba* subsp. *laconica*, *O. biebersteinii*, *O. grandis*, *O. kachetica*, *O. kamularie*, *O. oxydonta*, *O. megataphros*, *O. pallasii*, *Onobrychis* spp., *O. viciifolia*) by the flow cytometry method and determine genetic diversity and relations within genus *Onobrychis* using microsatellite method. Based on the results of flow cytometric analysis carried out in the study, the mean 2C nuclear DNA contents of the accessions ranged between 2,73 pg and 1,03 pg. When chromosome number and nuclear DNA content of the accessions were correlated, it was determined that 9 accessions were diploid as 35 accessions were tetraploid ($2n = 28$). All the 8 SSR primers (OVK036, OVK094, OVK125, OVM033, OVK161, OVK046, OVM061, OVK174) used in the study were polymorphic. In the study, genetic diversity parameters such as the average number of alleles observed ($N_A = 11,625$), Shannon constant ($I = 0,301$), Nei's unbiased genetic diversity value ($u_h = 0,187$) were calculated and a dendrogram was constructed based on UPGMA. Based on the dendrogram, genotypes of the species included in the section *Hymenobrychis* generated a group together with the genotypes of the section *Eubrychis* which have the same ploidy level (diploid). However, polyploid genotypes tended to show generally a homogen distribution through out the dendrogram. These results may indicate that poliploid species cross with each other in nature easily and therefore, they have a complex structure.

Keywords: Sainfoin, Flow cytometry, SSR, *Onobrychis* spp., Ploidy, Nuclear DNA content, Phylogenetic

2020, 82 pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TEŞEKKÜR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Baklagiller (Fabaceae) Familyası	3
2.2. Korunga	4
2.2.1. Korunganın Genel Özellikleri	4
2.2.2. Korunganın Bitkisel Özellikleri	6
2.2.3. Korunganın Yetiştiriciliği.....	8
2.3. Flow Sitometri	10
2.3.1. Flow Sitometrinin Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı	11
2.4. Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları)	14
2.5. Korunga’da Yapılmış Moleküler Belirteç Çalışmaları.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Bitki Materyali.....	18
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	23
3.2.2. Flow Sitometri ile Çekirdek DNA Analizi (pg).....	23
3.2.3. Flow Sitometri ile Korunga Çekirdek DNA İçeriğinin Ölçülmesi ve Mutlak Değerin Hesaplanması	25
3.2.4. DNA İzolasyonu	27
3.2.5. Elde Edilen DNA Örneklerinin Miktar ve Kalite Tayini	30
3.2.6. Mikrosatellit (SSR) Primerlerinin Belirlenmesi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Elektroforez	30
3.2.7. SSR Lokuslarına Ait Verilerin İstatistikî Analizi.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Çekirdek DNA Analizleri.....	33

4.2. Aksesyonların Çekirdek DNA İçerikleri ile Kromozom Sayılarının İlişkilendirilmesi ve Ploidy Düzeylerinin Belirlenmesi.....	36
4.3. PCR Ürünlerinin Baz Büyüklüklerinin Jel ve Kapiler Elektroforez Yöntemleriyle Belirlenmesi	37
4.4. SSR Lokuslarına Ait Bulgular	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
5.1. Çekirdek DNA Analizleri.....	54
5.2. Aksesyonların Çekirdek DNA İçerikleri ile Kromozom Sayılarının İlişkilendirilmesi ve Ploidy Düzeylerinin Belirlenmesi	55
5.3. SSR Analizleri	56
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ	72

Çizelge 2.1. Sirjaev (1925)' e göre korunga cinsinin sınıflandırılması.....	7
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan aksesyonların ait oldukları türler, aksesyon numaraları ve verilen kodları.....	18
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan SSR primerleri	31
Çizelge 4.1. Çalışmada incelenen korunga genotiplerinin 2C çekirdek DNA içerikleri, aksesyonlara ait ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri standart sapmaları, güven aralıkları ve aksesyonların ploidy seviyeleri	34
Çizelge 4.2. Aksesyonların güven aralıklarına göre gruplandırılması	35
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan 8 SSR lokusuna ait allellerin frekansları	50
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan 8 SSR lokusuna ait genetik parametreler	51

Şekil 2.1. Deneme alanımızda aralıklı olarak yetiştirilmekte olankorunga bitkilerinin genel görünüşü.....	6
Şekil 3.1. <i>Onobrychis inermis</i> [81 numara(84-2)] (solda) ve standart olarak kullanılan <i>Vicia sativa</i> (sağda) bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre pozisyonlarını gösteren flow histogramının görüntüsü.....	25
Şekil 3.2. Flow Histogramının flow max programı ile analizinden sonraki görünüşü.....	26
Şekil 3.3. Korunga yapraklarının Retsch® MM400 model homojenizatör ile ezilmesi.....	28
Şekil 3.4. Santrifüj sonrasında gözlenen faz ayrımı.....	29
Şekil 3.5. Thermo Scientific Nanodrop® 1000 Spektrofotometre ve Thermo Scientific Nanodrop® LITE cihazları kullanılarak DNA miktar ve kalite tayini.....	30
Şekil 3.6. Agaroz Jel Elektroforezi	32
Şekil 4.1. <i>O. cyri</i> mitotik kromozomları, $2n = 4x = 28$	36
Şekil 4.2. <i>O. megataphros</i> mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$	36
Şekil 4.3. OVK036, OVK094 lokuslarına ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri.....	37
Şekil 4.4. OVK125, OVM033, OVK161 lokuslarına ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri	38
Şekil 4.5. OVK046, OVM061 ve OVK174 lokusuna ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri	39
Şekil 4.6. 23-3 ve 23-4 bireylerinin OVK-094 lokusunda sahip olduğu allelleri elektroferogram görüntüsü.....	40
Şekil 4.7. 11-4 ve 12-2 bireylerinin OVK-094 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	40
Şekil 4.8. 12-3 ve 54-3 bireylerinin OVK-125 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	41
Şekil 4.9. 43-3 ve 63-4 bireylerinin OVK-125 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	41
Şekil 4.10. 44-3ve 90-2 bireylerinin OVM-033 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	42

Şekil 4.11. 43-2 ve 43-3 bireylerinin OVM-033 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	42
Şekil 4.12. 82-2 ve 86-2 bireylerinin OVK-174 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	43
Şekil 4.13. 85-1 ve 97-1 bireylerinin OVK-174 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	43
Şekil 4.14. 11-3 ve 54-3 bireylerinin OVK-036 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	44
Şekil 4.15. 42-1 ve 8-1 bireylerinin OVK-036 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	44
Şekil 4.16. 63-1 ve 69-1 bireylerinin OVK-161 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	45
Şekil 4.17. 17-1 ve 17-2 bireylerinin OVK-161 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	45
Şekil 4.18. 90-1 ve 93-1 bireylerinin OVK-046 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	46
Şekil 4.19. 70-1 ve 84-1 bireylerinin OVK-046 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	46
Şekil 4.20. 12-2 ve 43-3 bireylerinin OVM-061 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	47
Şekil 4.21. 17-2 ve 30-1 bireylerinin OVM-061 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü.....	47
Şekil 4.22. Korunga aksesyonlarına ait bireylerin SSR analizleri sonucunda oluşturulan dendrogram.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
m	: Metre
cm	: Santimetre
da	: Dekar
dk	: Dakika
g	: Gram
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
ng	: Nanogram
pg	: Pikogram
nm	: Nanometre
pmol	: Picomol
rpm	: Rounds per minute (Dakikadaki devir sayısı)
sn	: Saniye
volt	: Voltaj
Bç	: Base pair (Baz çifti)
C:I	: Chloroform:Isoamylalcohol
CTAB	: Cetyl trimethylammonium bromide
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FAM	: 6-carboxyfluorescein
h	: Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik değeri
HCl	: Hidroklorik asit
I	: Shannon sabiti
MgCl ₂	: Magnezyum klorür

NaCl	: Sodyum klorür
<i>O. altissima</i>	: <i>Onobrychis altissima</i>
<i>O. biebersteinii</i>	: <i>Onobrychis biebersteinii</i>
<i>O. inermis</i>	: <i>Onobrychis inermis</i>
<i>O. grandis</i>	: <i>Onobrychis grandis</i>
<i>O. vassilczenkoi</i>	: <i>Onobrychis vassilczenkoi</i>
<i>O. megataphros</i>	: <i>Onobrychis megataphros</i>
<i>O. kamularie</i>	: <i>Onobrychis kamularie</i>
<i>O. oxyodonta</i>	: <i>Onobrychis oxyodonta</i>
<i>O. petraea</i>	: <i>Onobrychis petraea</i>
<i>O. cyri</i>	: <i>Onobrychis cyri</i>
<i>O. kachetica</i>	: <i>Onobrychis kachetica</i>
<i>O. iberica</i>	: <i>Onobrychis iberica</i>
<i>O. pallasii</i>	: <i>Onobrychis pallasii</i>
<i>O. viciifolia</i>	: <i>Onobrychis viciifolia</i>
<i>O. alba</i> subsp. <i>laconica</i>	: <i>Onobrychis alba</i> subspecies <i>laconica</i>
<i>O. arenaria</i> subsp. <i>arenaria</i>	: <i>Onobrychis arenaria</i> subspecies <i>arenaria</i>
<i>O. conferta</i> subsp. <i>argentea</i>	: <i>Onobrychis conferta</i> subspecies <i>argentea</i>
<i>V. sativa</i>	: <i>Vicia sativa</i>
PI	: Propidium iodide
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIC	: Polymorphic Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)
PVP	: Polyvinylpyrrolidone
SSR	: Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
T.C.	: Türkiye Cumhuriyeti
TBE	: Tris-Borat-EDTA tamponu
TE Tamponu	: Tris-EDTA tamponu
uh	: Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri
UV	: Ultraviyole ışığı
vd.	: ve diğerleri

TEŞEKKÜR

Yürütücüsü olduğu Tübitak-215O526 nolu ve ‘Geniş doğal varyasyona sahip korunga (*Onobrychis* Miller) genetik kaynak koleksiyonunun yeni sitogenetik yöntemler ile karakterizasyonu ve Trakya bölgesine uygun çeşitlerin geliştirilmesinde kullanımı’ başlıklı araştırma projesine burslu öğrenci statüsünde katılma imkanı tanıyarak ‘Farklı Korunga (*Onobrychis* Mill.) türlerine ait aksesyonların flow sitometri ve DNA markör (SSR) yöntemleriyle karakterizasyonu’ adlı tez çalışmamı başarıyla tamamlama olanağı sağlayan, tezimin her aşamasında yardımcı olan, engin bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım, çok değerli hocam Prof. Dr. Metin TUNA’ya tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Proje ekibinde araştırmacı olarak görev alan, aynı zamanda mikrosatellit analizlerinde son derece yardımcı olan, çok saygıdeğer hocam Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN’e, tezim süresince göstermiş olduğu destek ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tüm çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen Dr. Gülsemin SAVAŞ TUNA’ya ayrıca teşekkürlerimi belirtmek isterim.

Tezim süresince yanımda olan çalışma arkadaşlarım, Zir. Müh. Sude DEVECİ, Zir. Müh. Nazlı ULUTAŞ, Zir. Yük. Müh. Buket ŞAHİN, Dr. Gülru YÜCEL, Zir. Müh. Şerifcan İNANÇLI, Zir. Müh. Seyfettin DİREK, Zir. Müh. Beyazıt ÖZCAN, Zir. Yük. Müh. Tuğba SÜTÇÜ ve Zir. Yük. Müh. Büşra YÜRÜK’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatımda olduğu gibi eğitim hayatımda da her zaman yanımda olan, hayattaki en büyük şansım, annem ve babam başta olmak üzere tüm aileme de teşekkür ve minnetimi özellikle belirtmek istiyorum.

Haziran, 2020

Elbi Cansu YILMAZ

Ziraat Mühendisi

1. GİRİŞ

Ülkemiz gerek doğal kaynaklar gerekse ekolojik koşullar bakımından hayvancılığa oldukça elverişli bir konumdadır. Türkiye'de hayvancılık genel ekonomi ve tarım sektörü içinde önemli bir yere ve potansiyele sahip bulunmaktadır. Tarımsal faaliyetler içerisinde çok önemli bir yere sahip olan yem bitkileri tarımı, bitkisel ve hayvansal üretimin sigortası konumundadır. Tarım arazilerinde üretilen yem bitkileri öncelikle hayvanlar tarafından tüketilmekte et, süt vb. ürünlere dönüştürülerek insan beslenmesine katkı sağlamaktadır.

Genel olarak hayvanların ihtiyacı olan kaba yem, başlıca iki ana kaynaktan sağlanmaktadır. Bunlardan birincisi çayır ve meralar, diğeri ise tarım alanlarında yetiştirilen yem bitkileridir. Ülkemizde hayvancılık sektörünün en büyük sorunlarından biri yeterli miktarda kaliteli kaba yem üretilmemesidir. Bu sorunu çözmenin iki yolu bulunmaktadır. Bunlar; çayır ve meraların durumunu iyileştirerek verimlerini arttırmak ve işlenen tarım arazilerinde yem bitkilerine daha fazla yer vermektir.

Yem bitkileri, en ucuz kaba yem kaynağı olmaları, hayvanların mide mikroflorası için gerekli besin maddelerini içermeleri, mineral ve vitaminlerce zengin olmaları, hayvanların üreme gücünü artırmaları ve yüksek kalitede hayvansal ürün sağlamaları nedenleriyle hayvan beslemede önemli bir yere sahiptir. Yem bitkileri tarımının artması sonucunda, çayır ve meraların üzerindeki aşırı otlatma baskısı hafifleyecek ve böylece bozulmuş olan çayır ve mera vejetasyonları kendilerini yenileme fırsatını yakalamış olacaklardır. Bunun yanında yem bitkileri ekim nöbetine girerek kendisinden sonraki ürünlere önemli katkılar sağlamış olacaktır.

Korunga (*Onobrychis* spp.) kireçli topraklar ve kıraç koşullarda başarıyla yetiştirilebilen, gerek otlatılarak gerekse biçilerek değerlendirilebilen çok yıllık, yabancı döllenen, bir baklagil yem bitkisi. Aynı zamanda iyi bir mera bitkisi olan korungayı yüksek rakımlı doğal meralarda da görmek mümkündür. Oldukça derinlere inen kök sistemiyle kurağa dayanıklı olmasının yanı sıra toprağı iyileştirme özelliğine de sahiptir. Korunga genellikle ot kalitelerinin birbirlerine benzemeleri nedeniyle yonca ile karşılaştırılmaktadır. Yeterli yağışa ve sulama imkanına sahip olmayan bölgelerde genellikle yoncaya tercih edilmektedir. Yonca ve diğeri bazı baklagil yem bitkilerinin hayvanlarda sebep oldukları şişme sorunu korungada gözlenmemektedir. Korunga hayvanlarda şişmeye sebep olmaması, hayvanlar tarafından sevilerek yenmesi ve yeminin besleme değeri ile kalitesinin yüksek

olması nedenleriyle yapay meraların tesisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Korunga aynı zamanda hayvanların sindirim sisteminde bulunan parazitlerin dökülmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda arılar için çok kaliteli bir bal özü kaynağıdır.

Literatüre bakıldığında korunga üretiminin, ikinci dünya savaşından sonra azaldığı görülmektedir. Savaş sonrasında hızlı nüfus artışıyla birlikte gıdaya olan talep artmış, bitkisel üretimi arttırmak amacıyla kimyevi gübrelerin kullanımı teşvik edilmiştir. Bu uygulama sonucunda kimyevi gübrelere tepkisi iyi olan tahılların ekiliş alanları baklagillerin aleyhine genişlemiştir. Bu dönemde korunga ile birlikte birçok baklagil bitkisinin tarımı azalmış hatta bazı bölgelerde tamamen terkedilmiştir. Bu nedenle baklagiller uzun bir süre ihmal edilmişlerdir. Ancak son yıllarda kimyasal gübrelerin sebep olduğu çevre sorunlarında artışların gözlenmesi ve gübre fiyatlarındaki aşırı yükselişler nedenleriyle kimyasal gübre kullanımını azaltmak amacıyla sürdürülebilir alternatif tarım sistemlerine yönelme başlamıştır. Proteince zengin olmaları, toprağın fiziksel yapısını iyileştirmeleri, toprağın organik madde ve verimliliğini arttırmaları ve havadaki azotu toprağa bağlamaları nedenleriyle baklagiller sürdürülebilir tarımın her zaman merkezinde olmuştur. Korunga sahip olduğu özellikler nedeniyle sürdürülebilir tarıma en uygun bitki türlerinden biridir. Küresel iklim değişikliğinin bir sonucu olarak dünyada yağışların azalması, sıcaklıkların artması, kimyevi gübrelerin yol açtığı çevre kirliliği ve artan enerji maliyetleri nedenleriyle korunga bilim insanlarının tekrar ilgisini çekmeye başlamıştır. Bununla birlikte son 50 yıldır ihmal edilmiş türler arasında yer alması nedeniyle korunga bitkisi üzerinde yapılmış olan araştırmalar oldukça sınırlıdır.

Özellikle de yeni moleküler yöntemler ile korunga üzerinde yapılmış olan çalışmalar son derece az sayıdadır. Bu nedenle korunga türlerinin ploidy, genom yapıları ve genom ilişkileri gibi korunga ıslah projelerinde ihtiyaç duyulan çok temel bilgiler dahi mevcut değildir. Hazırlamış olduğumuz bu tez çalışmasının amacı flow sitometri ve mikrosatellit belirteçleri kullanılarak Amerika Birleşik Devletleri, Tarım Bakanlığı gen bankalarından elde edilmiş olan bazı korunga türlerinin çekirdek DNA, ploidy ve filogenetik ilişkilerinin analiz edilmesidir.

Çalışmadan elde edilen sonuçların, uzun yıllardır üzerinde yeterli ıslah çalışması yapılmamış olan korunga bitkisinin özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla yürütülecek ıslah projelerinde yararlanılacak yöntem ve stratejilerin belirlenmesinde yararlı olacağını düşünüyoruz.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Baklagiller (Fabaceae) Familyası

Dünya üzerinde Leguminosea familyası olarakta bilinen baklagiller familyası, en geniş familyalardan biridir. Baklagiller familyası içerisinde 12.000 tür olduğu bilinirken, buğdaygiller (Poaceae) familyasında ise bu sayı 10.000 civarındadır (Nelson ve Moser, 1995). Korunga, yonca, burçak ve adi fiğ gibi eski çağlardan beri insan ve hayvan beslenmesinde oldukça önemli yere sahip olan baklagillerin yetiştiriciliğinin Hitit dönemlerine kadar dayandığı bilinmektedir (Tarman, 1972).

Baklagiller köklerinde bulunan *rhizobium* bakterileri ile yapmış oldukları simbiyotik ilişki sayesinde havada bulunan serbest azotu toprağa bağlayarak diğer bitkilerin kullanabileceği forma dönüştürmektedir. Bu sayede baklagiller familyası diğer familyalar içerisinde çok daha önemli bir yere sahip olmaktadır. Baklagiller ile *rhizobium* bakterileri arasındaki simbiyotik ilişki sonucunda toprağa bağlanan azot miktarının yılda yaklaşık olarak 110 milyon ton civarında olduğu bilinmektedir (Gökkuş ve Koç, 1993). Toprağa bağlanan bu azotun %33'lük kısmı buğdaygiller tarafından kullanılmaktadır (Halitgil, Erkovan, Serin, Tan ve Kışlal, 2007).

Baklagiller familyası sahip oldukları kazık kök sistemi sayesinde toprağın derinlerine kadar inebilmekte, burada bulunan besin elementlerini üst katmanlara taşıyabilmektedir. Böylece birlikte ekildikleri yüzlek köklü bitkilerin besin maddesi ihtiyaçlarını da karşılamaktadır. Ayrıca kazık kökleri sayesinde toprağın havalanmasında ve kabartılmasında oldukça önemli bir yere sahiptir (Tan ve Serin, 2009). Yine çok yıllık baklagiller erozyon tehlikesinin çok olduğu bölgelerde kökleri yardımıyla besin elementi ve toprak kayıplarını azaltmada önemli rol oynamaktadırlar (Zemenchik, Albrecht ve Shaver, 2002).

Baklagiller, hayvanların ihtiyaç duyduğu enerji, protein ve mineralleri sağlayan en önemli familya olmalarının yanı sıra toprağı hem organik madde hem de besin elementleri açısından zenginleştirmektedir (Conrad ve Klopfenstein, 1988). Baklagiller, çayır ve meralarda doğal olarak yetişmekte, aynı zamanda hayvanların kaba yem ihtiyaçlarını da büyük oranda karşılamaktadır.

Buğdaygil yem bitkilerinden yeterli verimi alabilmek için azotlu gübrelere ihtiyaç duyulurken, baklagil yem bitkileri azotlu gübreleme yapılmaksızın yüksek kalitede bol ürün verebilmektedir. Gübrelenerek yetiştirilen 8 buğdaygil yem bitkisinin, kuru ot verimi ortalama 683 kg/da iken, gübrelenmeden yetiştirilen çayır üçgülü ve yoncanın verimi yaklaşık olarak 1.200 kg/da olarak belirlenmiştir (Serin, Gökkuş, Tan, Koç ve Çomaklı, 1998).

2.2. Korunga

2.2.1. Korunganın Genel Özellikleri

Korunga (*Onobrychis* spp.), baklagiller (Fabaceae) familyasının bir üyesi olup, kıraç ve kireçli topraklarda kolaylıkla yetiştirilebilen, özellikle Akdeniz bölgesinden başlayıp Kafkasya'yı da içine alarak, Orta Asya'ya kadar uzanan bölgede yayılış gösteren bir yem bitkisidir (Aktoklu, 1995).

Korunga, birçok kültür bitkisinin topraktan alamadığı besin maddelerini köklerindeki yüksek katyon değişim kapasitesi sayesinde kolaylıkla alabilmektedir. Korunga köklerinin katyon değiştirme kapasitesi yonca, yulaf ve mısırdan daha fazladır (Tosun, 1992).

Korunga ot kalitesinin kendisine benzemesi nedeniyle çoğunlukla yonca ile karşılaştırılmaktadır (Carlton, Cooper, Delaney, Dubbs ve Eslick, 1968). Jensen ve Sharp (1968) yapmış oldukları bir çalışmada süt sığırlarına yedirilen korunga ve yonca otlarının yem etkinliği ve hazmolabilirlik bakımından benzer sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir.

Korunga kıraç ve sulanmayan alanlarda yoncaya göre daha verimlidir. Kuru tarım alanlarında ekim nöbetine alınacak çok yıllık baklagil yem bitkilerinin başında gelmektedir. Fakat sulanan ve taban arazilerde yonca ile boy ölçüşemez. Korunga en elverişli topraklarda bile 2-3 biçim vermektedir. Sulu koşullarda yetiştirildiğinde, kardeşlenme ve boylanma fazla olmakta ve gövdenin içi boş olduğundan yatma meydana gelmektedir. Ayrıca yoncada görülen yonca hortumlu böceği (*Hypera postica*) korungada zarar yapmamaktadır (Tan ve Sancak, 2009).

Korunga iyi bir mera bitkisidir. Ülkemizde birçok doğal merada korungayı görmek mümkündür. Kıraç koşullara dayanımının ve besleme değerinin yüksek olması nedeniyle yapay meraların tesisinde çoğunlukla korunga tercih edilmektedir. Korunga otu hayvanlarda şişme yapmamaktadır. Bu özelliği ile hayvanlar gerek yapay gerekse doğal meralarda

korkusuzca otlatılabilmektedir. Özellikle koyunlar korunga otunu otlamayı diğer yem bitkilerine tercih etmektedir. Yapılmış olan bir çalışmada yonca, korunga ve nohut geveninin koyunlar için lezzetliliğinde bir fark olmadığı, ancak koyunların ilk olarak korungayı otladıkları bildirilmiştir (Hanna, Kozub ve Smoliak, 1977).

Korunga yeminin kuzularda zarar yapan mide nematodlarına karşı iyileştirici bir özelliği bulunmaktadır. Yapılmış olan bir çalışmada korunga otu ve silajı ile beslenen kuzularda kontrol yem grubuna göre sırasıyla, %64 ve %48 oranında daha fazla nematod kontrolü sağlanmıştır (Heckendorn, Haring, Maurer, Senn ve Hertzberg, 2007).

Korunga, eğimli alanlarda erozyon kontrolü için en ideal bitkilerden biridir (Yüksek ve Yüksek, 2007). Özellikle kıraç alanlarda su ve rüzgar erozyonunun kontrolünde yatık gelişen korunga bitkileri etkin rol oynamaktadır.

Korunga iyi bir bal özü kaynağıdır (Özbek, 2011). Bal arıları, yan yana ekili olan korunga ve yonca parsellerinden genellikle korunga parselini tercih etmektedir. Korungayı tercih eden bal arılarının balları verimlidir ve kendilerine has hoş bir aromaları vardır.

Tohumlarında yaklaşık olarak %40 oranında protein bulundurduğundan dolayı doğrudan hayvan yemi olarak kullanıldığı gibi gerekli hallerde karma yem olarak da kullanılabilmektedir (Carlton vd., 1968). Korunga otunda ham protein, ham yağ ve mineral madde oranı yoncaya göre daha fazla iken, ham selüloz ve kül oranı daha azdır. Lignin maddesinin sindirimi olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir ve bu lignin maddesinin oranı korungada yoncaya göre daha az miktardadır (Tosun, 1974).

2.2.2. Korunganın Bitkisel Özellikleri



Şekil 2.1. Deneme alanımızda aralıklı olarak yetiştirilmekte olan korunga bitkilerinin genel görünüşü

Korunga cinsi içerisinde tek ve çok yıllık türler yer almaktadır. Carl Linnaeus, *Onobrychis* türlerini ‘Species Plantarum’ adlı eserinde *Hedysarum* cinsi içerisinde göstermiştir (Aktoklu, 1995). İlk olarak 1754 yılında *Onobrychis* olarak adlandırılmış ve günümüze kadar bu isimle anılmaya devam etmiştir.

Boissier (1872) kaleme aldığı ‘Flora Orientalis’ adlı eserinde *Onobrychis* cinsini 2 alt bölüme, bu 2 alt bölümü de alt bölümlere ayırmıştır. Bu eser korunga hakkındaki ilk yazılı belge olarak bilinmektedir (Boissier, 1872). Daha sonraları yazılmış olduğu ‘Türkiye Florası’ adlı eser *Onobrychis* türleri hakkındaki en kapsamlı kaynak haline gelmiştir (Hedge, 1970).

Sirjaev (1925), yapmış olduğu sınıflandırmada *Onobrychis* cinsini 2 alt cinse (Euonobrychis-Onobrychis ve Sisyrosemæ). Bu 2 alt cinsi de 4’er seksiyona ayırmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Sirjaev (1925)' e göre korunga cinsinin sınıflandırılması

Alt cinsler	Euonobrychis-Onobrychis	Sisyrosemæ
Seksiyonlar	Dendrobrychis	Anthyllium
	Lophobrychis	Afghanicæ
	Hemicyelobrychis	Heliobrychis
	Eubrychis=Onobrychis	Hymenobrychis

Dünyada, korunga (*Onobrychis* spp.) cinsi içerisinde 162 tür olduğu bilinmektedir. Tür çeşitliliğinin bu kadar fazla olmasına rağmen sadece 3 tür tarımsal açıdan önem arz etmektedir (Avcıoğlu, Hatipoğlu ve Karadağ, 2009). Bunlar;

- (1)Yaygın Korunga (*Onobrychis sativa* Lam. Syn. : *O. viciifolia* Scop.)
- (2) Anadolu Korungası (*Onobrychis arenaria* Kit. Ex. Wild. D.C.)
- (3) Kafkas Korungası (*Onobrychis transcaucasica* Gross H.)'dır.

Dünya üzerinde günümüzde *Onobrychis viciifolia* Scop., en fazla tarımı yapılan korunga türü olarak bilinmektedir. Çok yıllık ve derinlere kadar inen bir kazık köke sahiptir. Bu kazık köke ek olarak yanlara doğru çıkan kalın ve çok sayıda ince köklere sahiptir. Derin köklü bir bitki olmasına rağmen kökün boyu, toprak ve iklim koşullarına bağlı olarak 1-10 m arasında değişkenlik gösterir. İlerleyen dönemlerde, köklerde azot yumrucukları oluşmaktadır ve bu azot yumrucukları, ince yan köklerde, ana köke oranla daha fazla gözlenmektedir (Altın ve Tuna, 1996).

Korunga gelişimini dik, yatık veya yarı yatık olarak yapabilmektedir. Dallar, gövdenin taç kısmından çıkarak çok sayıda yan dal meydana getirir. Bu dal sayısı normal koşullarda 10-30 adet arasında iken, bazı koşullarda 60'a kadar çıkabilmektedir. Korunga gövdesinin üst kısımlarının içi dolu iken alt kısımlarının içi boştur. Saplarının alt kısımlarının içi boş olmasından dolayı 150 cm ve daha fazla boylanan bitkilerde yatma gözlenebilmektedir. Dik gelişim gösteren bu bitkiler kurak koşullar altında yaklaşık olarak 110-130 cm kadar boylanmaktadır. Gövdenin yüzeyi hafif tüylü olmakla beraber enine kesiti yuvarlaktır. Erken ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde gövde rozet şeklinde gelişim göstermektedir (Açıkgöz, 1991).

Korunga yaprağı; yaprak ekseni boyunca karşılıklı dizilmiş 5-14 adet oval şekilli yaprakçıktan oluşmuştur ve bu yaprak ekseni 1 adet yaprakçıkla son bulmaktadır. Bu yaprakçıklar 0,5-1 cm genişliğinde, 2-3 cm uzunluğunda olmakla beraber kenarları düzdür.

Yaprakçıkların üst kısmında tüy olmamasına veya yok denecek kadar az olmasına rağmen yaprakçıkların alt kısmı tüylüdür. Yaprakların uzunluğu yaklaşık olarak 15-25 cm arasında değişim göstermektedir (Fortune, 1985).

Korunga çiçekleri, konik şekilde sapın ucunda yer almaktadır ve hoş bir kokuya sahiptir. Genel olarak çiçekleri koyu pembe renktedir fakat beyaz çiçeklere de rastlanmaktadır ve bu beyaz çiçekler genetik belirteç olarak tozlama çalışmalarında kullanılmıştır (Knipe ve Carlton, 1972). Salkımda çiçeklenme alttan yukarıya doğru olmaktadır. Korunga büyük oranda yabancı döllen bir bitkidir. Tozlanmada genellikle bal arıları ve böcekler rol oynamaktadır. Kendine döllenme oranı yaklaşık %0-35 arasındadır (Carlton vd., 1968).

Korunganın meyvesi, içinde bir adet tohum bulunduran, yarım daire ve kenarları horoz ibiği şeklinde olan dişli, küçük bir bakla görünümündedir. Meyvelerinin üzerinde ağ biçiminde damarlar mevcuttur. Meyvelerin uzunluğu 5-8 mm ve eni 4-6 mm arasında değişmektedir. Tohumlar yüzeyleri düzgün olmakla beraber böbrek şeklindedirler. Renkleri koyu yeşil, kahverengi ve siyah olabilmektedir (Spedding ve Diekmahns, 1972).

2.2.3. Korunganın Yetiştiriciliği

Korunga yetiştiriciliği için en uygun yerler, ılıman iklim kuşağı ve orta derecede nemli bölgelerdir. Fide döneminde soğuğa duyarlı fakat fide dönemini tamamladıktan sonra soğuğa oldukça dayanıklıdır. Kuraklığa dayanıklılığı oldukça yüksektir ve 300 mm yağış alan bölgelerde sulanmadan yetiştirilebilir. Kuru tarım alanlarında ekim nöbetine alınabilecek en uygun baklagil yem bitkileri arasında yer almaktadır. Ditterline ve Cooper (1975) minimum 330 mm yağış alan bölgeler için korungayı önermektedir.

Korunga toprak isteği bakımından fazla seçici değildir. Kıraç, kalkerli ve fakir topraklarda kolaylıkla yetiştirilebilmektedir. Hafif ve kireçli toprakları sever, taban suyu seviyesi derinlerde ve kireci bol olan toprakları iyi değerlendirir. Tuzluluğa dayanımı iyidir, ancak asitli ve yaş toprakları sevmez. Spedding ve Diekmahns (1972)'a göre korunga gelişimini alkali pH' ya sahip kireçli topraklarda yapmaktadır. Kalkerli topraklar korunga için daha uygundur. Bunun sebebi diğer topraklara oranla daha iyi fiziksel koşullara sahip olmasıdır (Stebler ve Schroter, 1889).

Korunganın ekimi, birçok baklagil bitkisinde olduğu gibi iklim koşullarına bağlı olarak yapılmaktadır. Soğuk iklimlerde ilkbaharda yapılan ekim genellikle başarılı olmaktadır.

Bitki, sıcaklıkların artmasıyla yavaş yavaş büyürken, yabancı ot sorunlarının bir kısmı da çözülmüş olmaktadır (Ditterline ve Cooper, 1975). Ancak, bölgede yazlar Akdeniz bölgesi gibi çok sıcak geçmekteyse sonbahar ekimi daha avantajlı olmaktadır.

Korunga yetiştiriciliğinde ekim derinliği önemli olup, tohumun iriliği çıkış oranını belirlemektedir (Cooper, 1977). Tosun (1971) 2,5 cm ekim derinliğinin iyi sonuçlar verdiğini fakat toprak tipine göre bu derinliğin değişebileceğini belirtmiştir. Yapılmış bir çalışmada korunganın iri bir tohuma sahip olmasına rağmen derin ekimde iyi çıkış yapamadığı, bu nedenle ekim derinliğinin yaklaşık 1-2 cm olması gerektiği belirtilmiştir (Hanna, Cooke, Smoliak ve Goplen, 1972).

Korunga yalın olarak ekilebildiği gibi buğdaygillerle karışım halinde de ekilebilmektedir. Kıraç şartlarda kolaylıkla yetişebilen otlak ayrığı (*Agropyron cristatum* Gaertn L.), kılçıksız brom (*Bromus inermis* Leyss.) ve mavi ayrık (*Agropyron intermedium* Host Beauv.) gibi buğdaygiller korunga ile karışıma girebilecek uygun türlerden bazılarıdır. (Altın, 1982).

Ekimde kullanılan tohumluk aslında korunganın baklasıdır. Korunga baklası olgunlaştığında meyve kabuğu açılmadığı için baklanın tohumdan ayrılması çok zordur. Her meyvede bir tohum bulunmasından dolayı kabuklu ekimin pek bir zararı yoktur. Korunganın 1.000 tane ağırlığı yaygın olarak kullanılan birçok baklagil yem bitkisinden daha yüksek olup, yaklaşık olarak 14-17 g'dır. Ekimde dekara atılacak tohumluk miktarı, tesisin amacına göre değişmektedir. Ot üretiminde m²'de 10 bitki bulunması için dekara 2,5 kg kabuklu tohumluk yeterlidir (Sheehy, Minchin ve McNeil, 1984). Spedding ve Diekmahns (1972)'a göre korungada meyve kabuğu çıkartılmış tohumluk kullanılacaksa ekim oranı 55-60 kg/ha, meyve kabuğu çıkartılmamış tohumluk kullanılacaksa ekim oranı 90-100 kg/ha olmalıdır.

Korunga, fakir topraklarda yetişebilmesine rağmen bitkinin ihtiyaç duyduğu besin maddelerinin gübre olarak verilmesi gerekmektedir. Sheehy ve ark. (1984)'a göre korunga 1 dekar arazide topraktan yaklaşık 7.0 kg fosfor, 43.0 kg potasyum, 36.0 kg kalsiyum, 8.0 kg magnezyum, 1.0 kg sodyum, 8.0 kg klor kaldırmaktadır. Baklagil bitkisi olan korungaya sadece ilk yıl, köklerdeki bakteriler faaliyete geçene kadar azotlu gübre verilmelidir. Yapılan çalışmalar korungada fosforlu gübrelemenin ot ve tohum verimini yükselttiğini belirlemiştir. Tosun (1989) 6-12 kg P₂O₅/da uygulamalarının yüksek ot verimini sağladığını bulmuştur.

Andiç ve Günel (1996) ise Van'da 8 kg/da, Tan, Serin ve Yolcu (1997) Erzurum'da 5 kg P₂O₅/da uygulamasını önermişlerdir.

Lance (1980)'e göre korunga, yoncaya ve diğer türlere saldırabilen birçok zararlıya karşı dirençlidir. Son yıllarda korunganın en önemli sorunlarından biri kök kurtlarıdır. Korunganın ana zararlısı durumunda olan *Bembecia scopigera* (Scopoli)'nın zararı özellikle kıraç alanlarda daha fazla kendisini göstermekte, bitkide seyrekleşme sonucu oluşan verim azalması yanında, erken söküme de neden olması, önemini daha da artırmaktadır (Büyükburç, Açıkgoz, Ekiz ve Karagüllü, 1991; Özbek, 1989; Özer ve Duran, 1968). Büyükburç vd., (1991) 19 ülkeden temin ettikleri 3 korunga türüne ait (*O. sativa*, *O. arenaria*, *O. trancaucasica*) 29 kültür çeşidi ve hattı ile 23 yabancı türün bu böceklerle dayanıklılığını incelemişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda kültür formları içerisinde bu zararlılara dayanıklı hat veya çeşit bulunamamıştır. Ancak yabancı türlerde biraz dayanıklılık belirlenmiştir.

2.3. Flow Sitometri

Flow sitometri süspansiyon halindeki hücre ve partiküllerin sıvı bir akış sistemi içerisinde tek tek geçerken optik özelliklerine göre analiz edildiği bir metottur. Kısaca, akmakta olan bir sıvı içerisindeki partiküllerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir (Yurtsever, 2016). İncelencek yapı önce özel bir floresan boya kullanılarak işaretlenmektedir. Puite ve Ten Broeke (1983) yapmış oldukları çalışmada nükleer DNA'nın bitki protoplastlarında boyanabileceğini göstermiştir.

İlk olarak flow sitometri, insan da kan hücrelerinin analizi işleminde kullanılmıştır (Kamensky, Melamed ve Derman, 1965). Kamensky ve Melamed (1967) farklı hücreleri ayırt eden ışık sinyallerini tespit edebilmek için mikroskop bazlı bir flow sitometri tasarımı uygulamışlardır. Daha sonraları yapılan çalışmalar sonucunda genel tasarımda önemli değişiklikler meydana gelmiş ve günümüz sitometrilerine oldukça benzeyen bir tasarım ortaya çıkmıştır (Fulwyler, 1965).

Flow sitometri yönteminin bitkilerde daha sonraları kullanılmaya başlamasının nedeni tek hücre süspansiyonu gerektirmesinden dolayıdır. Bitki hücrelerinin uygun süspansiyonlarının hazırlanmasındaki zorluklar nedeniyle flow sitometrinin bitki analizlerinde kullanımı zaman almıştır (Shapiro, 1985).

2.3.1. Flow Sitometrinin Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı

Galbraith (1983) flow sitometri yöntemini bitki hücrelerinin analizinde ilk defa başarılı bir şekilde kullanmıştır. Bu çalışmayı takip eden yıllarda, özellikle de son 25 yıl içerisinde yöntem yaygınlaşmıştır. Bu gün artık flow sitometri bitkilerde rutin olarak kullanılan bir analiz yöntemi haline gelmiştir. Flow sitometri yöntemi bitkilerde geniş bir kullanım potansiyeline sahip olmasına rağmen, en çok çekirdek DNA ve ploidi analizlerinin yapılmasında kullanılmaktadır.

Bir bitki hücresindeki DNA miktarı “C” harfi ile pikogram cinsinden belirtilir. C değeri haploid genom; 2C değeri ise diploid somatik genomun DNA miktarını ifade etmektedir. Bitkilerin çekirdek DNA’larına ait C değerleri 0.1 pg ile 125 pg arasında değişmektedir. Pikogram cinsinden belirlenen DNA miktarları nükleotid baz çiftine (1pg = 980 Mbp) dönüştürülebilmektedir (Bennett ve Leitch, 1995).

Çekirdek DNA miktarı, hem bir bitkinin hücreleri arasında hem de aynı türün farklı bireyleri arasında değişmeyerek sabit kalmakta ve bu yüzden de türlere özgü olmaktadır. Çekirdek DNA miktarlarının türlere özgü olması, çekirdek DNA’ sı değerlerini sitotaksonomi ve evrim çalışmaları için vazgeçilmez bir temel bilgi yapmaktadır (Bennett ve Leitch, 1995). Rees ve Walters (1965) feulgen metodu ile belirlenmiş çekirdek DNA miktarlarından yola çıkarak hekzaploid olan ekmeklik buğdayın orjinlendiği yabani buğday türlerini belirlemiş ve evrimini incelemiştir. Bir cins içerisinde aynı kromozom sayısına sahip çok sayıda türün bulunduğu durumlar varsa türler arasındaki çekirdek DNA içeriği farklılıklarının, türlerin teşhisi ve sınıflandırılmalarında çok etkili olduğu belirlenmiştir (Ohri, 1998).

Islah çalışmalarında genotipler arasındaki ploidi farklılıkları üreme engelleri oluşturur ve gen akışını olumsuz etkiler. Bu nedenle ıslah çalışmalarına geçilmeden önce bireyler arasındaki ploidi seviyesindeki farklılıkların ve bu farklılıkların derecesinin tespiti önem taşımaktadır. Bitkilerde ploidi analizi geleneksel olarak feulgen veya asetokarmin ile boyanmış kök ucu meristem dokularından hazırlanmış preparatlarda mitoz kromozomlarını ışık mikroskobu ile sayarak yapılmaktadır (Karp, 1991). Yöntem bol miktarda bölünen hücreye gereksinim duymakta, uzun zaman almakta, tecrübe ve yoğun emek gerektirmektedir. Bu nedenle yöntem çok sayıda bitki örneğinin analiz edilmesinin gerektiği durumlarda pratik ve kullanışlı olmamaktadır. Buna ilave olarak, kromozomları küçük ve ploidi düzeyi yüksek

olan türlerde bu yöntem ile ploidi analizi oldukça zahmetlidir ve çoğunlukla da genetik kaynakların yanlış sınıflandırılmasına neden olmaktadır (Brummer, Cazcarro ve Luth, 1999).

Ploidi analizlerinde yaprak stoma büyüklüğü (Van Duren, Morpurgo, Dolezel ve Afra, 1996), polen tanelerinin büyüklüğü (Zonneveld ve Van Iren, 2001), hücre büyüklüğü (Hao, You ve Deng, 2002), gibi aktif olarak bölünen hücreleri gerektirmeyen alternatif teknikler sıkça kullanılmalarına rağmen yeterince güvenilir değildir.

Ramulu ve Dijkhuis (1986) yapmış olduğu çalışmalardan sonra flow sitometri yönteminin literatürde en sık bildirilen kullanımı haplodiploidizasyon deneyimlerinden sonra elde edilen bireylerin ploidy seviyesini tespit etmek olduğunu belirtmişlerdir.

Çok sayıda bitkinin çekirdek DNA içeriği flow sitometri yöntemi ile kısa sürede ölçülebildiğinden, anöploidi (Kawara, Takata ve Takehara, 1999), apoptotis (Vermes, Haanen ve Reutelingsperger, 2000) ve hücre döngüsü analizi ve tür ve ploidy karışıklıklarını incelemek için araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kolaylığı, hızı ve hassasiyetinden dolayı flow sitometri, ploidi analizlerinde tercih edilen metot olmuş ve başarıyla kullanılmaktadır (Heslop-Harrison 1995; Rayburn, Auger, Benzinger ve Hepburn, 1989; Tuna, Vogel, Arumuganathan ve Gill, 2001; Tuna, Vogel ve Arumuganathan, 2005, 2006; Adan, Alizada, Kiraz, Baran ve Nalbant, 2017).

Yapılmış olan bir çalışmada flow sitometri yöntemi ile kasava bitkisi üzerinde çekirdek DNA analizi yapılmış ve bitkinin çekirdek DNA içeriği 1,67 pg/2C olarak belirlenmiştir (Awolaye, Van Duren, Dolezel ve Novak, 1994).

Flow sitometri yöntemiyle 4 tef bitkisi çeşidinin çekirdek DNA içerikleri belirlenmiştir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada tef çeşitlerinin 2C çekirdek DNA içeriklerinin birbirine oldukça benzer olduğunu ve 1.48 ila 1.52 pg arasında değiştiğini saptamışlardır (Ayele, Dolezel, Van Duren, Brunner ve Zapata-Arias, 1996).

Serin ve sıcak mevsim çim bitkilerinin genom boyutlarını kıyaslamak için yapılmış olan çalışmada flow sitometri ile 12 çim türünün çekirdek DNA içerikleri belirlenmiştir. Araştırmacılar yapmış oldukları bu çalışmada yedi sıcak mevsim çim türünün çekirdek DNA içeriklerinin 0,86 ile 1,95 pg arasında değiştiğini, serin mevsim çim türlerinin ise çekirdek

DNA içeriklerinin 5,65 ile 15,59 pg arasında değiştiğini saptamışlardır (Arumuganathan, Tallury, Fraser, Bruneau ve Qu, 1999).

Tuna vd. (2001) yaptıkları çalışmalarında flow sitometri yöntemi ile 4 *Bromus* türüne (*B. biebersteinii*, *B. inermis*, *B. inermis* spp. *pumpellionus* ve *B. riparius*) ait toplam 322 aksesyonun çekirdek DNA içeriği ve ploidi düzeyini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada araştırmacılar ortalama 2C çekirdek DNA içeriğinin bromlarda 6.14 ile 26.64 pg arasında değişirken, aynı ploidi düzeyine sahip farklı brom türlerinin çekirdek DNA içeriklerinin birbirine çok benzer olduğunu saptamışlardır. Türlerin çekirdek DNA içerikleri ile ploidi düzeyleri ilişkilendirildiğinde ise bu türlerin ploidi düzeylerinin diploid ile dekaploid arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada türlerin çekirdek DNA içeriklerine ait sonuçlar kullanılarak türlerin genom yapıları ile ilişkileri analiz edilmiş ve elde edilen sonuçların hibritlerde yapılan moyotik kromozom eşleşmeleri esasına dayalı olan literatür bilgileri ile paralellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Özet olarak bu komplekste yer alan tetraploid (AABB) ve octaploid (AAAABBBB) *Brom* türlerinin birbirine oldukça benzer olan A ve B genomlarının farklı kopya sayılarına sahip iken, dekaploid türlerin ise bu iki genoma ek olarak üçüncü bir genoma (AAAABBBB??) daha sahip oldukları ve çalışmada kullanılan diploid *Brom* türünün (A) genomunun atası olabileceğine dair literatür bilgileri teyit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada 101 *Festuca* taksonu ve 14 yakın akrabasının çekirdek DNA içeriklerini flow sitometri yöntemi ile belirlenmiş ve cinsin içerisinde 2C çekirdek DNA içeriğinin 3,88 pg (*F. arvensis*) ile 24,08 pg (*F. gamisansii*) arasında değiştiği belirlenmiştir (Smarda, Bures, Horova, Foggi ve Grazino, 2008).

Tuna vd., (2018), yapmış oldukları çalışmada flow sitometri ile Doğu Anadolu bölgesinin doğal florasından toplanmış olan 130'dan fazla *Festuca* (yumak) popülasyonunun çekirdek DNA içeriklerini belirlemiş ve popülasyonların ortalama 2C çekirdek DNA içeriklerinin 4,63 pg ile 15,03 pg arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlara göre popülasyonların ploidi düzeylerinin diploid ile dekaploid arasında değiştiği saptanmıştır.

Kula vd. (2006) yaptıkları çalışmada flow sitometri kullanarak tetraploid *P. commutatum* ile diploid akrabaları olan *P. commutatum* ve *P. rhaeticum* türlerinin 2C çekirdek DNA içeriklerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmada tetraploid *P.*

commutatum türünün ortalama 2C çekirdek DNA içeriğini 6,2 pg olarak belirlerken, değerin diploidler arasında 2,4 pg ile 2,9 pg arasında değiştiğini saptamışlardır.

Koeleria taksonları üzerinde yapılmış olan bir çalışmada diploid taksonlar arasında 2C çekirdek DNA içeriğinin 4,85 pg ile 5,20 pg arasında değiştiği saptanmıştır. Tetraploid ve decaploid taksonların ise 2C çekirdek DNA içeriklerinin sırasıyla 9,31 pg, 22,89 pg olduğu belirtilmiştir (Pecinka, Suchankova, Lysak, Travnicek ve Dolezel, 2006).

Korunga üzerinde yapılan sitogenetik çalışmalar çok sınırlı olmakla birlikte yapılan çalışmalarda kromozom sayımları klasik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir (Yücel, 2019). Yapılmış olan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda korunga cinsinin iki farklı temel kromozom sayısına ($x=7$ ve $x=8$) sahip olduğu görülmektedir. Ploidy düzeylerinin ise diploid ($2n=14$ ve $2n=16$) ve tetraploid ($2n=28$ ve $2n=32$) arasında değiştiği bilinmektedir (Hejazi ve Nasab, 2010; Yücel, 2019). Bununla birlikte cins içerisinde $2n=22$, 27, 28 ve 29 kromozomlu bitkilerin varlığı da literatürde yer almaktadır (Abou –El-Enain, 2002).

2.4. Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları)

Yüksek organizmalarda henüz görevleri bilinmeyen, ancak düzenleyici rollere sahip olduğu düşünülen, rastgele tekrarlanan DNA bölgeleri vardır (Rafalski ve Tingey, 1993). Genomda bir lokusta arka arkaya gelen rastgele tekrar dizilerine kısa ardışık tekrarlar (STR- “Short Tandem Repeat”) denilmektedir. Mikrosatellitler, maya dışında incelenen tüm ökaryotlarda gözlenmiş (Hamada, Petrino ve Kakunaga, 1982; Stallings vd., 1991) ve genom boyunca geniş ölçüde dağıldığı bildirilmiştir (Stallings vd., 1991). Mikrosatellitler, ökaryotik genomlar boyunca hiper değişken ve her yerde dağınık olan sıralı dizili di-, tri- ve tetranükleotit tekrarlarından oluşmaktadır. Doğrudan PCR ile çoğaltılabilen mikrosatellit DNA belirteçleri, mikrosatellitleri çevreleyen yan diziler kullanılarak geliştirilmiştir (Litt ve Luty, 1989; Tautz 1989; Weber ve May, 1989). Kısa ardışık tekrarların 1–6 bç’lik tekrarlarından oluşmuş belirteçler, mikrosatellit belirteçleri veya basit dizi tekrarları (SSR- “Simple Sequence Repeat”) olarak isimlendirilmektedir (Weber and May, 1989). Genomda rastgele dağılmış olan mikrosatellitlerin çeşitlerine bakıldığında, –mono, -di, -tri ve tetranükleotidler, mikrosatellitlerin ana çeşitlerini oluşturmaktadır. Fakat –penta ve –hekza tekrar çiftleride mikrosatellit olarak adlandırılmakta, daha uzun dizilere ise minisatellit denilmektedir (Ellegren, 2004).

Mikrosatellitler yüksek organizmalara ait kromozomlar üzerinde daha bol ve gelişigüzel bir dağılım göstermektedir (Tautz, 1989). Bu nedenle, bu tür tekrarlarla dayalı bilgiler bütün genomu daha doğru temsil etmektedir. Mikrosatellitlerin perisentromerik DNA'da bol olduğu ve ökromatin kollarında nadir olduğu varsayılmaktadır (Areshchenkova ve Ganai, 1999). Mikrosatellit dizilerinin şans eseri üretildiği ve bu nedenle genom boyunca rastgele meydana geldiği öne sürülmüştür (Levinson ve Gutman, 1987). Daha yakın zamanda, mikrosatellitlerin kopyalanan bölgelerde daha bol olduğu bildirilmiştir (Morgante, Hanafey ve Powell, 2002). Belli tekrar tiplerinin sayısının genomik bölgeye bağlı olarak değiştiği ve dağılımının üzerinde çalışılan taksonomik gruba özgü olduğu belirtilmiştir (Toth, Gaspari ve Jurka, 2000). Tekrarlanan DNA'ların sağındaki ve solundaki zincirler o diziye özgüdür, yani spesifiklerdir. Bu diziler kullanılarak SSR primerleri dizayn edilmekte ve bu sayede belli bir lokus PCR ile çoğaltılabilmektedir. Mikrosatellitler, genetik çalışmalarda diğer belirteç yöntemlerine göre daha fazla tercih edilmektedir (Weber and May, 1989). Özellikle mikrosatellitler bitki ıslahında en faydalı moleküler belirteç sistemlerinden biri haline gelmiştir (Demdoum, Muroz, Delgado, Valderrabano ve Wünsch, 2012). Mikrosatellitler, genomda yaygın olarak bulunmaları, polimorfizm oranlarının yüksek olması ve kullanımlarının kolay olması nedenleriyle birçok moleküler biyoloji çalışmasında tercih edilmektedir. Mikrosatellitlerin orman bitkileri genetiğinde (White, Sahota ve Edes, 2002), babalık analizinde (Ziegenhagen, Scholz, Madaghiele ve Vendramin, 1998), melezlerin tanımlanmasında (Khasa, Newton, Rahman, Jaquish ve Dancik, 2000), adli tıpta (White vd., 2002), ıslahta (McCouch vd., 1997), genetik bağlantı haritalamasında (Devey, Bell, Smith, Neale ve Morgan, 1996), gen akışının belirlenmesinde (Chase, Kesseli ve Bawa, 1996; Innan, Terauchi ve Miyashita, 1997), moleküler ekoloji, nüfus yapısı ve çeşitliliği çalışmalarında (Echt, May-Marquardt, Hsieh ve Zahorchak, 1996) kullanıldığı belirtilmiştir.

Bununla birlikte her bir mikrosatellit tabanlı belirtecin, kalıtım, bilgilendirme, tekrarlanabilirlik veya prosedürel karmaşıklık tarzına, maliyet ve işçilik süresi gibi ekonomik kaygılara dayanan kendi avantaj ve dezavantajlarına sahip olduğuda bilinmelidir. Bu nedenle, hangisinin kullanılacağına ilişkin karar, araştırma projesinin niteliğine göre dikkatle değerlendirilmelidir (Miah vd., 2013).

2.5. Korunga'da Yapılmış Moleküler Belirteç Çalışmaları

Literatürlere bakıldığında *Onobrychis* cinsinde yapılmış gerek morfolojik, gerekse genetik çalışmalar bulunmaktadır. Başlangıçta yapılan genetik çalışmalarda korungaya özgü moleküler belirteçlerin mevcut olmamasından dolayı diğer baklagil türleri için geliştirilmiş belirteçler kullanılmıştır. Bu gün ise sınırlı sayıda da olsa korungaya özel belirteç mevcuttur.

O. viciifolia türünde yapılmış olan çalışmada 29 farklı aksesiyona ait 32 birey üzerinde çalışılmıştır. Çalışmada dizayn edilen 400 adet SSR primeri kullanılmıştır. Bu 400 adet SSR primerinden 101 tanesinin yüksek oranda polimorfik olduğu, bu primerler ile toplamda elde edilen 1159 allelden 1154 tanesinin polimorfik olduğu belirtilmiştir (Kempf, Mora-ortiz, Smith, Kölliker ve Skot, 2016).

Özkan ve Bilgen (2019)'in çalışmasında *Onobrychis viciifolia* türüne ait 2 çeşit (Özerbey ve Lütfübey) ve 3 popülasyonun (Plevne, Kırşehir-1, Kırşehir-2) genetik yapısını belirlemek amacıyla 10 SSR lokusunu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan SSR lokuslarının tamamının polimorfik olduğu, analiz edilen 91 numunede toplam 68 allel tanımlandığı belirtilmiştir. Popülasyonlar arası çeşitliliğin çok düşük (%8), popülasyonlar içerisinde ise genetik çeşitliliğin yüksek (%92) olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen dendrograma göre Özerbey ve Lütfübey bir grup oluştururken, Plevne ve Kırşehir-2 ayrı bir grup oluşturmuştur.

Carbonero (2011) AFLP ve SSR belirteçleri kullanarak *O. viciifolia* türünün sahip olduğu genetik çeşitliliği incelemiştir. Araştırmacı, yaptığı çalışmada *O. viciifolia* aksesyonları arasında belirli bir oranda polimorfizm saptamış ancak daha kapsamlı analizler yapılmasını önermiştir.

Demdoum vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada 23 korunga aksesyonu üzerinde çalışılmıştır. Araştırmacılar yapılan bu çalışmada *Medicago truncatula*'dan (24 SSR) ve *Glycine max*'dan (3 SSR) seçtikleri SSR primerlerini kullanmış ve toplam 27 SSR primerinin %52 oranında polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanmış olan *Onobrychis* taksonları arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla yapılmış olan çalışmada, 95 SSR primeri çiftinden 18'i başarılı bir şekilde amplifiye edilerek kullanılmıştır (Avcı, İlhan, Erayman ve Sancak, 2014)

80 korunga aksesyonunun morfolojik, anatomik ve genetik çeşitliliklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 45 adet ISSR primeri kullanılmıştır. Seçilmiş olan 22 ISSR primerinden 275 adet bant elde edilmiştir. Genetik çeşitliliğin çoğunun aksesyonlar arasında olduğunu belirtilmiştir (Zarrabian, Majidi ve Ehtemam, 2013). Zarrabian ve Majidi (2015) tarafından *Onobrychis* cinsinde 33 türe ait 102 aksesyon üzerinde yapılan çalışmada 47 ISSR primerinden seçilen 22 ISSR primeri kullanılmıştır. Çalışmada 22 primer 235'i polimorfik olan toplam 243 bant üretmiş (%96,7) ve hemen hemen tüm türler birlikte kümelenmiştir.

Stresli ortamda büyüyen bitkilerin normal şartlarda büyüyen bitkilere oranla daha yüksek genetik çeşitlilik gösterip göstermediğini incelemek için 5 RAPD primeri kullanılarak yapılan çalışmada, benzer çevresel baskılar altında yetiştirilen bitkilerin daha yüksek genetik benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Nosrati, Feizi, Tarrah ve Haghigi, 2012). ISSR belirteçleri kullanılarak Azerbaycan ve İran korunga populasyonlarının analiz edildiği çalışmada polimorfik ISSR lokuslarının oranının populasyonlar arasında %38,75 ile %61,25 arasında değiştiği belirlenmiştir (Nosrati, Feizi, Latifian ve Haghghi, 2016).

Onobrychis cinsinin ana çeşitlilik merkezlerinden biri olan İran kaynaklı *Onobrychis carduchorum* türünde 11 yabani popülasyona ait toplam 55 örnek üzerinde detaylı taksonomik, morfolojik, genetik ve ekocoğrafik karakterizasyon yapılmıştır. Çalışmada genetik varyasyonu değerlendirmek için nükleer ribozomal DNA ve ISSR primerleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *O. carduchorum*'un filogenetik olarak en genç tür olduğu saptanmıştır (Toluei, Atri, Ranjbar ve Wink, 2013).

Gen bankasından temin edilmiş olan İran kaynaklı 36 *O. sativa* popülasyonunun RAPD belirteçleri ile genetik çeşitlilikleri incelenmiştir. Çalışmada test edilen 20 adet RAPD primerinden 5 tanesi toplam 79 bant üreterek polimorfik bulunmuştur. Yapılan filogenetik analiz sonucunda popülasyonların 3 gruba ayrıldığı saptanmıştır. Çalışmanın sonuç kısmında RAPD belirteçlerinin korunga popülasyonları arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmede kullanılabileceği belirtilmiştir (Rasouli, Jaferi, Tabaei-Aghdaei, Shanjani ve Darvish, 2013).

Bhattacharai (2017) tarafından dünyanın farklı bölgelerinden toplanmış olan 38 *Onobrychis* aksesyonu üzerinde genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla 5 AFLP primer çifti kullanarak yapılan çalışmada 1042 polimorfik AFLP bandı elde edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre aksesyonlar 3 gruba ayrılırken, genetik çeşitliliğin büyük kısmının aksesyon içerisinde (% 84,3) olduğu belirlenmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarı ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Bitki Materyali

Bu yüksek lisans tezinde, ıslah programlarında kullanmak amacıyla oluşturulmuş korunga genetik kaynak koleksiyonu içerisinde bulunan 17 farklı türü (1 tür *Euonobrychis*, 4 tür *Hymenobrychis*, 12 tür *Onobrychis* seksiyonuna ait) temsilen seçilmiş toplam 38 aksesyona ait 94 (1 aksesyon *Euonobrychis*, 6 aksesyon *Hymenobrychis*, 31 aksesyon *Onobrychis* seksiyonuna ait) genotipe ek olarak olarak 6 farklı *O. viciifolia* aksesyonundan seçilmiş 6 genotip bitki materyali olarak kullanılmıştır. Çalışmada toplam olarak 100 korunga genotipi kullanılmıştır. Aksesyonların PI numaraları, örnek kodları ve tür isimleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan aksesyonların ait oldukları türler, aksesyon numaraları ve verilen kodları

ÖRNEK NO	BİREY NO	AKSESYON NO	TÜR ADI	ORIJIN	ALT CİNS	SEKSİYON
1	1-1	PI 312954	<i>Onobrychis arenaria</i> subsp. <i>arenaria</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>
2	1-2	PI 312954	<i>Onobrychis arenaria</i> subsp. <i>arenaria</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>
3	1-3	PI 312954	<i>Onobrychis arenaria</i> subsp. <i>arenaria</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>
4	1-4	PI 312954	<i>Onobrychis arenaria</i> subsp. <i>arenaria</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>
5	6-1	PI 312943	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>
6	6-2	PI 312943	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>
7	6-3	PI 312943	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>

8	8-1	PI 312935	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
9	8-2	PI 312935	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
10	8-3	PI 312935	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
11	8-4	PI 312935	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
12	10-1	PI 312942	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
13	11-1	PI 312946	<i>Onobrychis petraea</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
14	11-2	PI 312946	<i>Onobrychis petraea</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
15	11-3	PI 312946	<i>Onobrychis petraea</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
16	11-4	PI 312946	<i>Onobrychis petraea</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
17	12-1	PI 316295	<i>Onobrychis petraea</i>	Almanya	Onobrychis	Onobrychis
18	12-2	PI 316295	<i>Onobrychis petraea</i>	Almanya	Onobrychis	Onobrychis
19	12-3	PI 316295	<i>Onobrychis petraea</i>	Almanya	Onobrychis	Onobrychis
20	13-1	W6 17878	<i>Onobrychis cyri</i>	Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
21	13-2	W6 17878	<i>Onobrychis cyri</i>	Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
22	13-3	W6 17878	<i>Onobrychis cyri</i>	Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
23	17-1	PI 315085	<i>Onobrychis iberica</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
24	17-2	PI 315085	<i>Onobrychis iberica</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
25	17-3	PI 315085	<i>Onobrychis iberica</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
26	23-1	PI 312909	<i>Onobrychis altissima</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
27	23-2	PI 312909	<i>Onobrychis altissima</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
28	23-3	PI 312909	<i>Onobrychis altissima</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis

29	23-4	PI 312909	<i>Onobrychis altissima</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
30	26-1	PI 300580	<i>Onobrychis vassilczenkoi</i>	Eski Sovyetler Birliği	Sisyrosema	Hymenobrychis
31	26-2	PI 300580	<i>Onobrychis vassilczenkoi</i>	Eski Sovyetler Birliği	Sisyrosema	Hymenobrychis
32	26-3	PI 300580	<i>Onobrychis vassilczenkoi</i>	Eski Sovyetler Birliği	Sisyrosema	Hymenobrychis
33	30-1	PI 280259	<i>Onobrychis conferta</i> subsp. <i>argentea</i>	İspanya	Onobrychis	Onobrychis
34	42-1	PI 325448	<i>Onobrychis altissima</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
35	43-1	PI 642147	<i>Onobrychis alba</i> subsp. <i>laconica</i>	Bulgaristan	Onobrychis	Onobrychis
36	43-2	PI 642147	<i>Onobrychis alba</i> subsp. <i>laconica</i>	Bulgaristan	Onobrychis	Onobrychis
37	43-3	PI 642147	<i>Onobrychis alba</i> subsp. <i>laconica</i>	Bulgaristan	Onobrychis	Onobrychis
38	44-1	PI 227377	<i>Onobrychis biebersteinii</i>	İran	Onobrychis	Onobrychis
39	44-2	PI 227377	<i>Onobrychis biebersteinii</i>	İran	Onobrychis	Onobrychis
40	44-3	PI 227377	<i>Onobrychis biebersteinii</i>	İran	Onobrychis	Onobrychis
41	44-4	PI 227377	<i>Onobrychis biebersteinii</i>	İran	Onobrychis	Onobrychis
42	47-1	PI 297923	<i>Onobrychis grandis</i>	Avustralya	Onobrychis	Onobrychis
43	47-2	PI 297923	<i>Onobrychis grandis</i>	Avustralya	Onobrychis	Onobrychis
44	47-3	PI 297923	<i>Onobrychis grandis</i>	Avustralya	Onobrychis	Onobrychis
45	48-1	PI 325438	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
46	49-1	PI 314931	<i>Onobrychis iberica</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
47	50-1	PI 314469	<i>Onobrychis kachetica</i>	Eski Sovyetler Birliği	Sisyrosema	Hymenobrychis
48	50-2	PI 314469	<i>Onobrychis kachetica</i>	Eski Sovyetler Birliği	Sisyrosema	Hymenobrychis
49	51-1	PI 312464	<i>Onobrychis kamularie</i>	Eski Sovyetler Birliği	Sisyrosema	Hymenobrychis

50	52-1	PI 301107	<i>Onobrychis megataphros</i>	Türkiye	Onobrychis	Onobrychis
51	52-2	PI 301107	<i>Onobrychis megataphros</i>	Türkiye	Onobrychis	Onobrychis
52	52-3	PI 301107	<i>Onobrychis megataphros</i>	Türkiye	Onobrychis	Onobrychis
53	54-1	PI 312945	<i>Onobrychis oxyodonta</i>	Eski Sovyetler Birliği	Eubrychideae	Euonobrychis
54	54-2	PI 312945	<i>Onobrychis oxyodonta</i>	Eski Sovyetler Birliği	Eubrychideae	Euonobrychis
55	54-3	PI 312945	<i>Onobrychis oxyodonta</i>	Eski Sovyetler Birliği	Eubrychideae	Euonobrychis
56	55-1	W6 21877	<i>Onobrychis pallasii</i>	Ukrayna	Sisyrosema	Hymenobrychis
57	57-1	PI 312947	<i>Onobrychis petraea</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
58	57-2	PI 312947	<i>Onobrychis petraea</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
59	57-3	PI 312947	<i>Onobrychis petraea</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Sisyrosema	Hymenobrychis
60	60-1	PI 440574	<i>Onobrychis vassilczenkoi</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Sisyrosema	Hymenobrychis
61	63-1	PI 314468	<i>Onobrychis cyri</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
62	63-2	PI 314468	<i>Onobrychis cyri</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
63	63-3	PI 314468	<i>Onobrychis cyri</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
64	63-4	PI 314468	<i>Onobrychis cyri</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
65	69-1	PI 372809	<i>Onobrychis inermis</i>	Çekya	Onobrychis	Onobrychis
66	70-1	PI 440572	<i>Onobrychis inermis</i>	Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
67	78-1	PI 464819	<i>Onobrychis spp.</i>	Türkiye		
68	78-2	PI 464819	<i>Onobrychis spp.</i>	Türkiye		
69	81-1	PI 312940	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
70	81-2	PI 312940	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
71	81-3	PI 312940	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis

72	81-4	PI 312940	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
73	82-1	PI 312936	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
74	82-2	PI 312936	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
75	82-3	PI 312936	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
76	82-4	PI 312936	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
77	83-1	PI 312937	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
78	83-2	PI 312937	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
79	83-3	PI 312937	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
80	84-1	PI 312938	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
81	84-2	PI 312938	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
82	84-3	PI 312938	<i>Onobrychis inermis</i>	Eski Sovyetler Birliği	Onobrychis	Onobrychis
83	85-1	PI 312939	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
84	85-2	PI 312939	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
85	85-3	PI 312939	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
86	86-1	PI 312941	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
87	86-2	PI 312941	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
88	86-3	PI 312941	<i>Onobrychis inermis</i>	Stavropol, Rusya Federasyonu	Onobrychis	Onobrychis
89	90-1	PI 225729	<i>Onobrychis</i> spp.	Türkiye		
90	90-2	PI 225729	<i>Onobrychis</i> spp.	Türkiye		
91	90-3	PI 225729	<i>Onobrychis</i> spp.	Türkiye		
92	93-1	PI 325445	<i>Onobrychis</i> spp.	Eski Sovyetler Birliği		

93	94-1	PI 567875	<i>Onobrychis</i> spp.	Diyarbakır, Türkiye		
94	97-1	PI 225730	<i>Onobrychis</i> spp.	Türkiye		
95	95	PI 205200-2	<i>Onobrychis</i> . <i>viciifolia</i>	Türkiye	Onobrychis	Onobrychis
96	96	PI 236486-1	<i>Onobrychis</i> <i>viciifolia</i>	Türkiye	Onobrychis	Onobrychis
97	97	PI 250024	<i>Onobrychis</i> <i>viciifolia</i>	İran	Onobrychis	Onobrychis
98	98	PI 273784	<i>Onobrychis</i> <i>viciifolia</i>	Litvanya	Onobrychis	Onobrychis
99	99	PI 192994	<i>Onobrychis</i> <i>viciifolia</i>	-	Onobrychis	Onobrychis
100	100	PI 639688	<i>Onobrychis</i> <i>viciifolia</i>	Wyoming, ABD	Onobrychis	Onobrychis

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Aksesyonlara ait tohumlar 2017 yılının mart ayı başlarında içerisinde 3:1 oranlarında steril torf ve perlit bulunan viyollere ekilmiştir. Bitkiler tarlaya şaşırtılınca kadar bölümümüze ait iklim odasında 16 saat ışık ve 20 °C sıcaklık şartlarında yetiştirilmiştir. Bitkiler yeterince geliştikten (6 hafta) sonra gün ışığına alıştırılarak mayıs ayının ilk haftası tarlaya (50 cm x 1 m) şaşırtılmıştır. Gerekli oldukça bakım ve sulama işlemleri yapılmıştır.

3.2.2. Flow Sitometri ile Çekirdek DNA Analizi (pg)

Çekirdek DNA analizleri, Tarla Bitkileri Bölümü, Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında, Flow sitometri (PARTEC) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çekirdek DNA analizleri, tarlada yetişmekte olan bitkilerden alınan taze yaprak dokuları kullanılarak, 2017-2018 bahar aylarında gerçekleştirilmiştir. Analizler, her bir aksesyon için, 3 farklı bitki üzerinde yapılmıştır. Analizlerde standart olarak yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) bitkisi kullanılmıştır. Fiğ bitkisinin 2C çekirdek DNA içeriği standart olarak Arpa (slodoran) bitkisinin kullanılmasıyla 3,65 pg olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda örnekler Partec firmasının ticari kiti (CyStain PI absolute P) kullanılarak firmanın aşağıda sunulmuş olan protokolü takip edilerek hazırlanmıştır.

1) Tarlada bulunan korunga bitkilerinden alınmış taze yaprak dokusu (yaklaşık 40 mg) ve standart (*Vicia sativa* L.) olarak kullanılan bitkinin taze yaprak dokusu (yaklaşık 20 mg) petri kabına yerleştirilmiş ve üzerine 500 µl izolasyon buffer ilave edilmiştir.

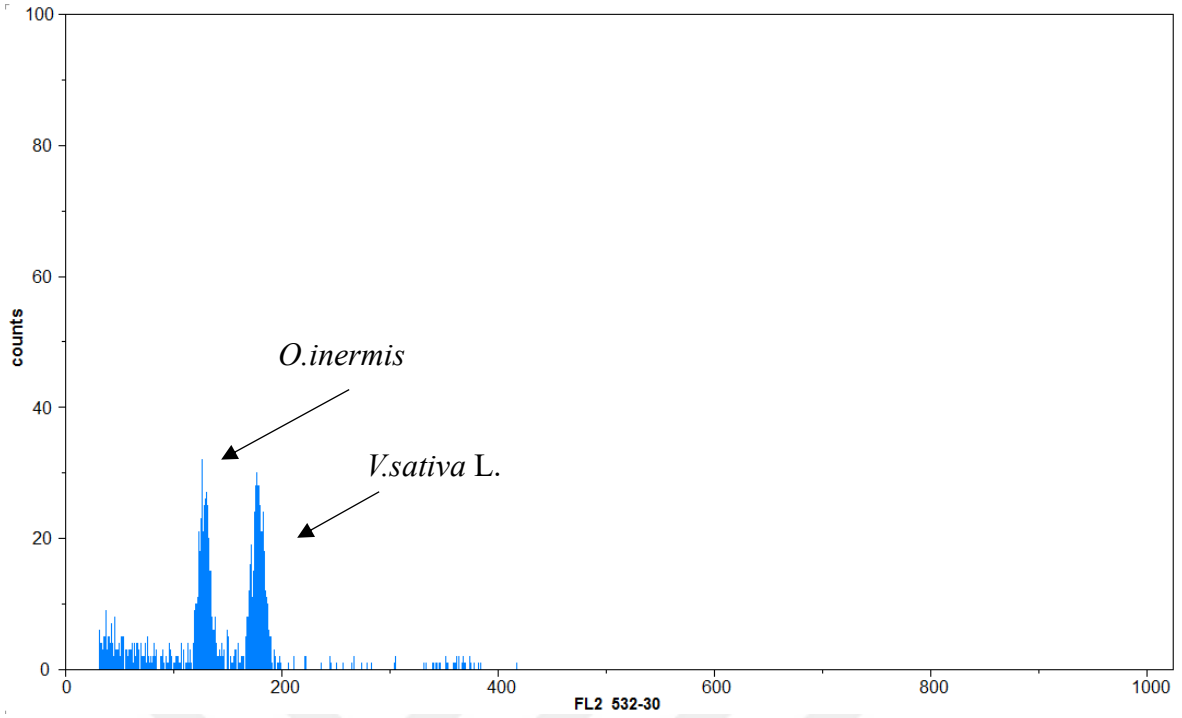
2) Dokular petri kabı içerisinde keskin bir jilet yardımıyla küçük parçalara ayrılana kadar (30-60 saniye) parçalanmıştır. Parçalama işlemi yeterli olduğunda hazırlanan örnek petri kabı içinde 15-20 saniye kadar çalkalanmıştır.

3) Çalkalama sonrasında petri içerisindeki solüsyon 30 µm süzme aralıklarına sahip filtreden geçirilerek tüp içerisine transfer edilmiştir. Bu şekilde çekirdeklerin bitki dokularından ayrılması sağlanmıştır.

4) Tüp içerisine önceden hazırlanmış olan 2 ml staining solüsyon eklenerek karanlık ortamda yaklaşık 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler flow sitometri cihazında analiz edilmiştir.

Takip edilen protokolde dokuların jilet ile parçalanmasıyla dokuyu oluşturan hücreler mekanik olarak birbirlerinden ayrılır, hücre zarı parçalanır ve hücre çekirdekleri serbest kalarak petri kabı içerisinde bulunan solüsyona karışır. Solüsyonun içerisinde bulunan deterjanlar çekirdek zarı üzerinde yaptıkları tahribat ile zar üzerinde küçük delikler meydana getirir. Örneğin üzerine sonradan ilave edilen staining solüsyon içerisinde bulunan ve nükleik asitlere bağlanma özelliğine sahip olan florasan boya çekirdek zarı üzerinde bulunan bu küçük deliklerden geçerek çekirdek içerisindeki nükleik asitlere bağlanır. Çekirdek içerisinde bulunan DNA miktarı ile açıklıklardan giren staining solüsyon miktarı birbiri ile doğru orantılıdır. Çekirdek DNA miktarı arttıkça çekirdek içerisine giren florasan boya miktarı da artmaktadır.

Protokol izlenerek hazırlanmış örnekler analiz için flow sitometri cihazına yüklendiklerinde örnek içerisinde bulunan hücre çekirdekleri, cihazın akış sistemi aracılığı ile lazer ışığı önünden teker teker olacak şekilde geçerler. Geçiş sırasında hücre çekirdeğinin içerdiği PI miktarı ile doğru orantılı olarak florasan ışık yayarlar. Bu yayılan florasan ışık cihazın optik kısmın içerisinde bir dizi işleminden geçtikten sonra bilgisayar monitörüne histogram olarak yansır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Onobrychis inermis* [81 numara- (84-2)] (solda) ve standart olarak kullanılan *Vicia sativa* L. (sağda) bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre pozisyonlarını gösteren flow histogramının görünüşü

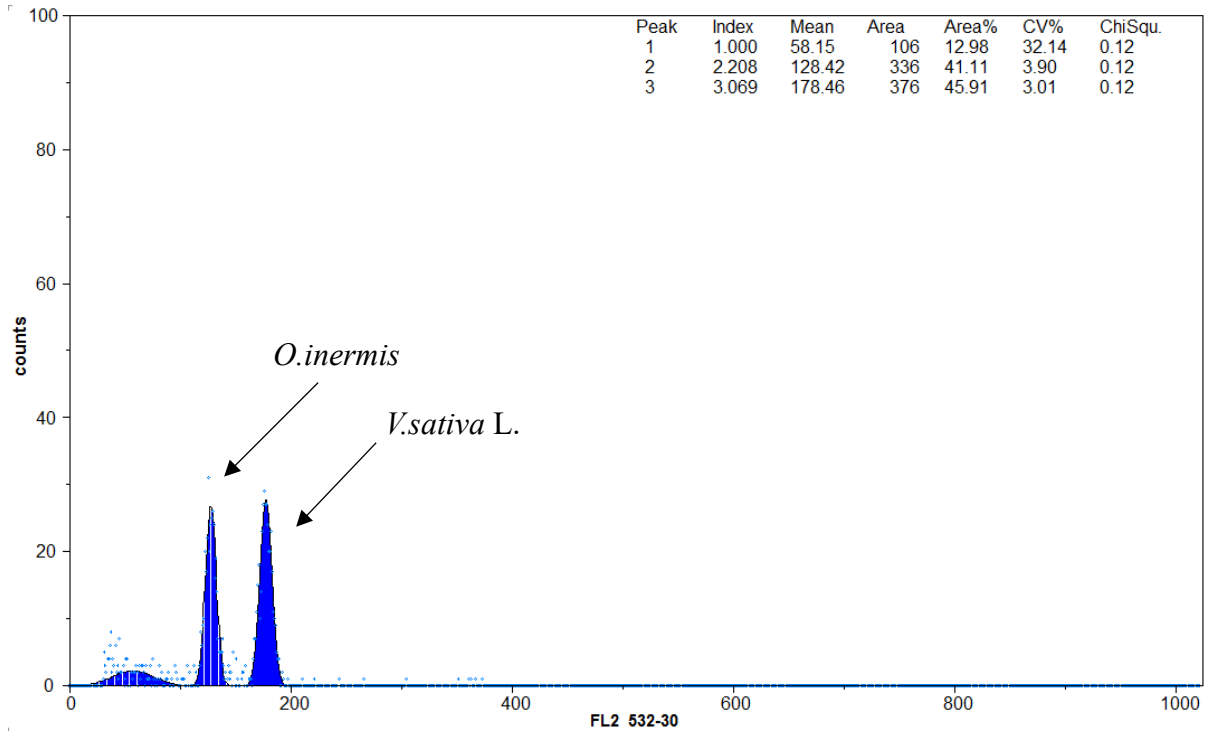
Histogramın yatay ekseni analiz edilmiş olan örneklerin florasan yoğunluğunu gösterirken dikey eksen ise analiz edilen hücrelerin sayısını göstermektedir. Florasan yoğunluğu yatay ekseninde sağa doğru gidildikçe artmaktadır. Burada florasan yoğunluğu dolaylı olarak çekirdek DNA içeriğini gösterdiğinden DNA miktarında arttığı söylenebilir.

Yapılmış olan çekirdek DNA analizlerinde sağlıklı sonuçlar elde edebilmek için histogram üzerinde gözlenen piklerin yeterince uzun ve ince olması gerekmektedir. Sonuçların kalitesi bitkilerin gelişme dönemi, yetiştirme şartlarının uygunluğu örneklerin özenli bir şekilde hazırlanması ve flow sitometri cihazının kalibrasyonuna bağlı olarak değişmektedir.

3.2.3. Flow Sitometri ile Korunga Çekirdek DNA İçeriğinin Ölçülmesi ve Mutlak Değerin Hesaplanması

Analiz edilen bitkilerin çekirdek DNA içerikleri mutlak olarak belirlenmek istendiğinde örneğin DNA içeriği, DNA içeriği bilinen standart bir bitki ile kıyaslanır. Örnekler, analiz edilecek bitki dokusu ile standart bitkinin dokusu aynı anda, birlikte muamele edilerek hazırlanır.

Hazırlanmış olan örnek analiz edildiğinde elde edilen orjinal histogram (Şekil 3.1) cihazın sahip olduğu Flow Max programı ile analiz edilerek bazı diğer değerler ile birlikte piklerin florasan yoğunlukları ve cv değerlerini içeren bir tablo elde edilir (Şekil 3.2). Histogramda 2 adet pik gözlenmektedir. Bu piklerden biri analiz edilen örneğin G1 piki, diğer pik ise standart olarak kullanılan bitkiye ait olan G1 pikidir. Piklerin hangisinin örneğe hangisinin standarda ait olduğunu saptayabilmek için örnek ile standardın dokularından ayrı ayrı örnek hazırlanır, ayrı olarak analiz edilir ve piklerin yerleri belirlenir. Örneğin mutlak çekirdek DNA içeriği, örnek ile standardın G1 piklerinin florasan yoğunluklarına ait değerler (sağ üst köşede belirtilmiş olan ‘mean’ değerleri) kullanılarak aşağıda sunulmuş olan formül aracılığı ile hesaplanmaktadır.



Şekil 3.2. Flowe histogramının flow max programı ile analizinden sonraki görünüşü

$$\text{Çekirdek DNA İçeriği} = \frac{\text{DNA miktarı bilinmeyen bitkinin florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}}{\text{Standart olarak kullanılan bitkinin florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}} \times \text{Standartın bilinen DNA içeriği}$$

Histogramdaki değerler formülde yerine koyularak hesaplama işlemi yapıldığında örneğin çekirdek DNA içeriği pikogram (pg) cinsinden hesaplanmış olur.

Her bir aksesyona ait bitkilerin çekirdek DNA içeriklerinin ortalamaları basit bir istatistiksel yöntem olan güven aralıkları (confidence interval) kullanarak kendi aralarında kıyaslanmıştır. Her ortalama için güven aralıkları aşığıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. $P(\bar{X} - t_{0.05} S_{\bar{x}} < \mu < \bar{X} + t_{0.05} S_{\bar{x}}) = 0.95$

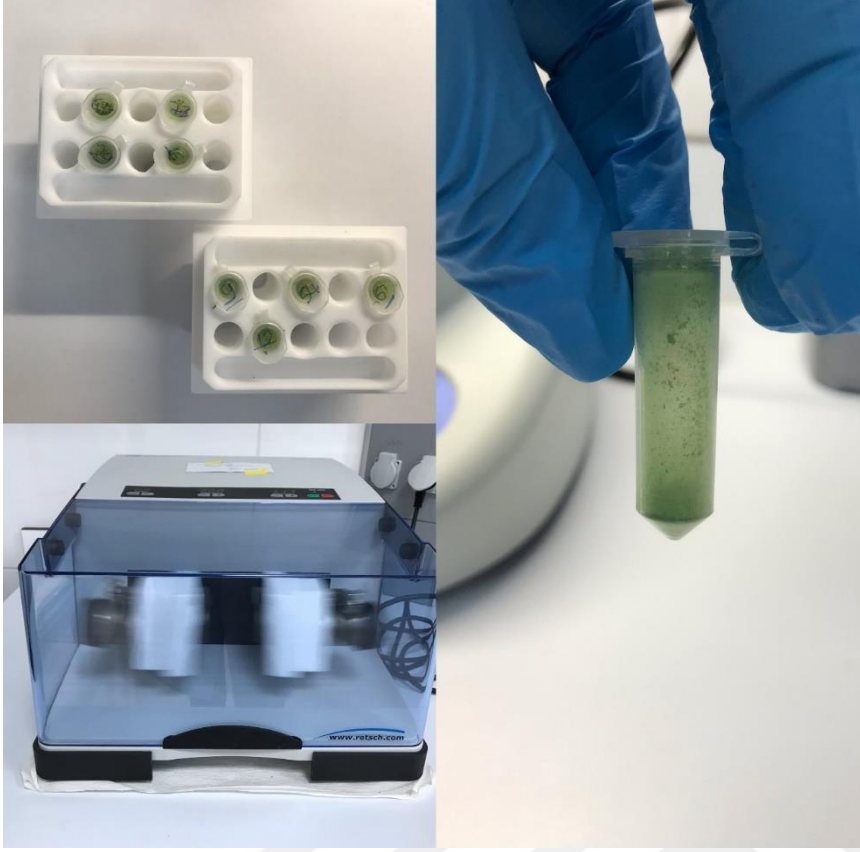
Formülde $t_{0.05}$ “t” statistiği ve $S_{\bar{x}} = s/n^{1/2}$.

Eşitlikte n her bir aksesyon için analiz edilen bitki sayısını gösterirken “S” onların standart sapmasını ifade etmektedir. Güven aralıkları örtüşen ortalamaların birbirinden farklı olmadığı kabul edilir. Bu bakımdan yapılan analiz ortalamaları kıyaslamak için yapılan 't' testi ile aynıdır.

3.2.4. DNA izolasyonu

Yeterli miktarda ve kaliteli DNA izolasyonu yapabilmek için bu tez çalışmasında farklı izolasyon metodları denenmiştir. Yapılan uygulamalar sonucunda Doyle ve Doyle (1990) metodu modifiye edilerek uygun DNA izolasyon yöntemi elde edilmiştir.

Yapılan bu çalışmada 38 korunga aksesyonunun 94 bireyine ek olarak 6 farklı *O. viciifolia* aksesyonundan seçilmiş 6 genotip eklenerek toplamda 100 birey kullanılmıştır. DNA izolasyonu için her bir genotipten yeterli miktarda genç ve taze yaprak örnekleri alınmış ve 2 ml’lik santrifüj tüpleri içine yerleştirilmiştir. Parçalanma işlemini kolaylaştırmak amacıyla tüplerin içerisine 100 µl dH₂O ilave edilmiştir. Her bir tüp içerisine homojenizasyon işlemi için 2’şer adet 3 mm’lik bilyeler eklenmiştir. Homojenizasyon süresi 2 dakika olup frekansı 30 olarak ayarlanmıştır. Homojenizasyon işlemi Retsch®MM4000 model bir homojenizatör yardımıyla yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Korunga yapraklarının Retsch® MM400 model homojenizatör ile ezilmesi

DNA izolasyonunda yararlanılan protokolün basamakları aşağıdaki gibidir;

1. İyice ezildiklerinden emin olunan yaprak örneklerinin üzerine önceden 65 °C’de ısıtılmış özütleme tamponundan 800 µl (200 mM TRIS-HCl, 50 mM EDTA, 2M NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, %2 CTAB, pH:8) eklenmiştir.
2. Her bir tüp içerisine bir miktar PVP eklenerek vortekslenmiştir ve sonrasında 65°C de 1 saat boyunca çalkalayıcılı ısıtıcı blokta inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon süresi sonunda her bir tüp üzerine 700 µl Choloroform: Isoamylalcohol (24:1) eklenmiş ve 10 dk vortekslenmiştir.
4. 10.000 rpm’de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Santrifüj sonrasında gözlenen faz ayrımı

5. Üstteki sıvı kısım steril 2 ml’lik tüplere aktarılmıştır.
6. Üzerlerine eşit hacimde Choloroform: Isoamylalcohol (24:1) eklenmiş ve 10 dk vortekslenmiştir.
7. 10.000 rpm’de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir.
8. Üstteki sıvı kısım steril 1,5 ml’lik tüplere aktarılmıştır.
9. Üzerlerine eşit hacimde 60 µl 3M Sodyum asetat, 50 µl 5M Potasyum asetat, 500 µl soğuk Isopropanol eklenmiştir ve -20°C de 1 saat inkübe edilmiştir.
10. Soğutmalı santrifüjde 13.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
11. Üst kısım dökülerek üzerine 1000 µl %70’lik ethanol eklenmiştir.
12. Soğutmalı santrifüjde 13.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir
13. Üst kısım dökülerek üzerine 1000 µl %70’lik ethanol eklenmiştir.
14. Soğutmalı santrifüjde 13.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
15. Üst kısım dikkatli bir şekilde dökülerek pellet kurumaya bırakılmıştır.
16. Pellet iyice kuruduktan sonra üzerine 100 µl TE tamponu (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH:8) eklenmiş ve 37°C de 30 dk inkübe edilmiştir.

17. Elde edilen DNA örnekleri PCR işlemleri gerçekleştirilene kadar buzdolabında +4°C de saklanmıştır.

3.2.5. Elde Edilen DNA Örneklerinin Miktar ve Kalite Tayini

İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve kalite tayinleri Nanodrop® 1000 ve Nanodrop® LITE spektrofotometre cihazları yardımıyla ölçülmüştür. DNA örneklerinin ölçümleri Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Moleküler Genetik Laboratuvarı ve Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü Biyometri ve Genetik Laboratuvarında yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Thermo Scientific Nanodrop® 1000 Spektrofotometre ve Thermo Scientific Nanodrop® LITE cihazları kullanılarak DNA miktar ve kalite tayini

3.2.6. Mikrosatellit (SSR) Primerlerinin Belirlenmesi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Elektroforez

Bu tez çalışmasında, daha önce yapılmış olan çalışmadan seçilen ve yüksek oranda polimorfik davranış gösteren 8 SSR primeri kullanılmıştır (Kempf vd., 2016).

Çalışmada M13 işaretleme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem çalışmaların daha ekonomik hale getirilmesi amacıyla Schuelke (2000) tarafından geliştirilmiştir. M13 kuyruklu primer işaretleme yönteminde kullanılmış olan primerler Çizelge 3.2’de verilmiştir. Bu üçlü

primer stratejisinde ileri primer, geri primer ve florasan etiketli bir M13 primer kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

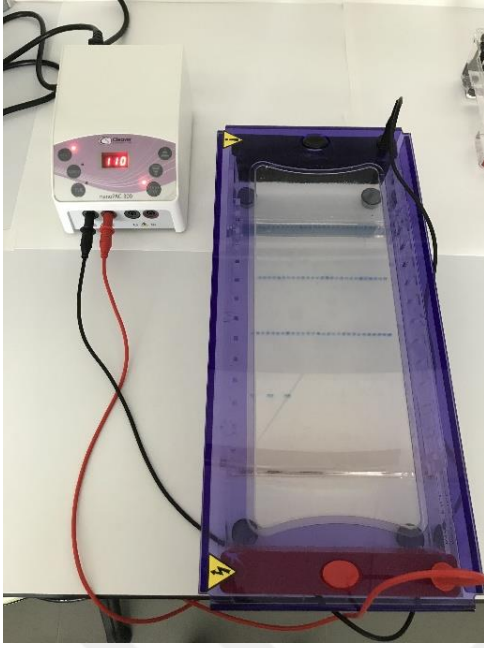
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan SSR primerleri

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'TGTAAAACGACGGCCAGTGTGTTAAAGGGGTGAAAACAT-3' 5' CATTGACAAACCAGTATCC 3'	(AGGT)6
M13-VIC OVK094-F OVK094-R	5'-VIC- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAAAACGACGGCCAGTACCGATCTTAGGATAGATGGA 3' 5' ACTTTTGTTGCTTAGTCGAT 3'	(TTGCG)5
M13-NED OVK125-F OVK125-R	5'-NED- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAAAACGACGGCCAGTAAATTTAAGCACCGGAATAAC-3' 5' AAAGCAAAAGGGCTACTAAAG 3'	(CATTT)5
M13-FAM OVM033-F OVM033R	5'-FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAAAACGACGGCCAGTCAAGGCTTATTTGGTTAACAG-3' 5' ATACTATTTCCCATGCCTACC 3'	(CTC)6
M13-FAM OVK161-F OVK161-R	5'-FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAAAACGACGGCCAGTAAAGCTTTCTACACGTTGGTA-3' 5' TGGGTTTTTACACTCTGTGAT 3'	(TTCC)6
M13-VIC OVK046-F OVK046-R	5'-VIC- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAAAACGACGGCCAGTTCAACCACATTATAAAACCTCA-3' 5' CGCGAAATCATAGTTCACTT 3'	(AGTG)6
M13-NED OVK061-F OVM061-R	5'-NED- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAAAACGACGGCCAGTTTAAACACACGTACGTACCACA-3' 5' TTTGTCGTTGATCGTTAAGTT 3'	(GTA)6
M13-PET OVK174-F OVK174-R	5'-PET- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTAAAACGACGGCCAGTACATGATCGTGAATATGAAGC-3' 5' CAGCAGCAATCAATATATCATC 3'	(GGCCC)5

Yürütülen bu tez çalışmasında SSR analizleri için daha önceki çalışmalarda bildirilmiş olan PCR reaksiyon koşulları ve döngüleri kullanılmıştır (Kempf vd., 2016; Özkan, 2017).

PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri elektroforezde görüntüleme yapılana kadar folyoya sarılmış bir şekilde +4°C'de muhafaza edilmiştir. PCR ürünleri 1X TBE tamponunda 110 Voltta yaklaşık 1 saat %1,5'luk agaroz jelde (RedSafe Nucleic Acid Staining Solution içeren) yürütülerek bağlanmalar kontrol edilmiştir (Şekil 3.6). Daha sonrasında bantlar UV ışık altında incelenmiştir.

PCR ürünlerinin elde edilmesinden sonra hizmet alımı yapılarak kapiller elektroforez ile DNA parça büyüklükleri belirlenmiştir. Moleküler genetik laboratuvarında bulunan GeneMapper Software 5.0 yazılımı kullanılarak aksesyonların DNA parça analizleri değerlendirilerek SSR lokuslarına ait allellerin baz çifti olarak büyüklükleri bulunmuştur.



Şekil 3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

3.2.7. SSR Lokuslarına Ait Verilerin İstatistiksel Analizi

Bu tez çalışmasında SSR lokuslarının polimorfizm oranlarının belirlenmesinde kullanılan tüm genotipler birlikte değerlendirilmiştir, iki ve daha fazla allel bulunduran mikrosatellit lokusları polimorfik olarak belirlenmiştir. Yapılmış olan istatistiksel analizlerde, polimorfik lokuslar, bu lokuslara ait allel sayıları (NA) ve polimorfizm yüzdeleri, tarafsız genetik çeşitlilik değeri (uh) ile Shannon sabiti (I) de hesaplanmıştır. PIC (polimorfizm bilgi içeriği) lokusların allel farklılıklarını, primerlerin polimorfizmini ve etkinliklerini belirten bir değişkendir. 8 SSR primerinin PIC değeri Roldan-Ruiz, Dendauw, Van Bockstaele, Depicker ve De Loose (2000) formülü yardımıyla hesaplanmıştır.

Bütün bireyler için SSR lokuslarında allellerin gözlenmesi durumunda allel var (1), gözlenmemesi durumunda ise allel yok (0) şeklinde skorlama yapılmıştır.

İstatistiki hesaplamaların ve analizlerin yapılmasında GenAlEx [(Version 6.5) (<http://biologyassets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>)] (Peakall ve Smouse 2006) programını kullanılmıştır. Yapılan hesaplamaların sonucunda elde edilen değerlerin daha açık bir şekilde belirtilebilmesi için UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) sınıflandırma yöntemi kullanılarak dendrogram oluşturulmuştur. POPULATIONS 1.2.32 (Population Genetic Software) (Langella, 1999) ve TreeView 1.6.6 (Page, 1996) programı dendrogramın oluşturulmasında kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çekirdek DNA Analizleri

Çalışmada analiz edilen korunga genotiplerinin 2C çekirdek DNA içerikleri, aksesyon ortalamaları, aksesyonlara ait standart sapma ve güven aralıklarına ait değerler Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1’ den görüleceği üzere çalışmada kullanılan korunga bitkilerinin 2C çekirdek DNA içerikleri 2,80 pg (PI 312941, *O. inermis*) ile 0,99 pg (PI 464819, *Onobrychis* spp.) arasında değişim göstermiştir. Aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri ise 2,73 pg (PI 312954, *O. arenaria* subsp. *arenaria*) ile 1,03 pg (PI 464819, *Onobrychis* spp.) arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1’de sunulmuş olan aksesyonlara ait ortalama 2C çekirdek DNA içeriği sonuçları incelendiğinde, aksesyonların çekirdek DNA içeriklerine göre çok belirgin bir şekilde, 2 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Birinci grupta yer alan aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 1,03 pg ile 1,56 pg arasında değişirken, ikinci grupta ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 2.73 pg ile 2.50 pg arasında değişmektedir. Buradan görüleceği üzere birinci grubun en yüksek değeri ile ikinci grubun en düşük değeri arasında yaklaşık 1 pg civarında bir fark bulunmaktadır. Gruplar arasında bu kadar büyük bir boş alanın bulunması daha ilk bakışta iki grubun hemen fark edilmesini sağlamaktadır. Buna ek olarak ikinci grubun 2C çekirdek DNA ortalaması birinci grubun yaklaşık 2 katı olduğu dikkati çekmektedir.

Korunga genotiplerinin 2C çekirdek DNA içeriklerine ait sonuçlar üzerinde istatistiksel analiz yapılması sonucu ise aksesyon ortalamaları arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiş ve analiz sonuçlarına göre aksesyonlar toplam 8 gruba ayrılmıştır. Bu sonuçlara göre birinci grup içerisinde yer alan aksesyonların 5 alt gruba, ikinci grup içerisinde yer alan aksesyonların ise 3 alt gruba ayrıldığı belirlenmiştir. Buna ek olarak alt gruplar arasındaki farklılıkların birinci grup içerisinde ikinci gruba göre daha belirgin olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çalışmamızın sadece filogenetik (SSR) kısmında kullanılan altı farklı aksesyona ait altı *O. viciifolia* genotipinin çekirdek DNA içerikleri ise daha önce aynı standart bitki ve yöntem kullanılarak Şahin (2019) tarafından laboratuvarımızda hazırlanmış olan yüksek lisans tezinden alınmıştır. Genotiplerin ait olduğu aksesyonlar 2,64 pg/2C ile 2,73 pg/2C arasında

değişen ortalama çekirdek DNA içerikleri ile çalışmamızda çekirdek DNA içeriği en yüksek olan grup ile benzer DNA değerlerine sahiptir.

Çizelge 4.1. Çalışmada incelenen korunga genotiplerinin 2C çekirdek DNA içerikleri, aksesyonlara ait ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri standart sapmaları, güven aralıkları ve aksesyonların ploidy seviyeleri

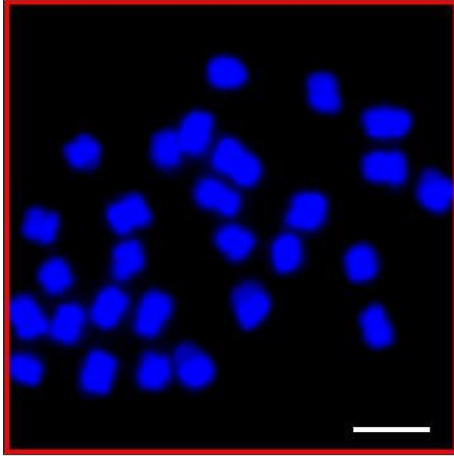
Örnek Kodu	Aksesyon No	Tür adı	Çekirdek DNA İçerikleri			Ort.	SD	T*S _x	Güven aralıkları		Ploidi
									Alt	Üst	
8	PI 312935	<i>O. inermis</i>	2,62	2,59	2,71	2,64	0,062	0,051	2,589	2,691	2n=28
82	PI 312936	<i>O. inermis</i>	2,56	2,65	2,66	2,62	0,055	0,045	2,578	2,668	2n=28
83	PI 312937	<i>O. inermis</i>	2,58	2,7	2,51	2,6	0,096	0,079	2,518	2,675	2n=28
84	PI 312938	<i>O. inermis</i>	2,72	2,62	2,63	2,66	0,055	0,045	2,612	2,702	2n=28
85	PI 312939	<i>O. inermis</i>	2,63	2,66	2,57	2,62	0,046	0,037	2,583	2,657	2n=28
81	PI 312940	<i>O. inermis</i>	2,62	2,68	2,63	2,64	0,032	0,026	2,617	2,67	2n=28
86	PI 312941	<i>O. inermis</i>	2,56	2,58	2,8	2,65	0,133	0,109	2,538	2,756	2n=28
10	PI 312942	<i>O. inermis</i>	2,65	2,73	2,67	2,68	0,042	0,034	2,649	2,717	2n=28
6	PI 312943	<i>O. inermis</i>	2,62	2,65	2,63	2,63	0,015	0,012	2,621	2,646	2n=28
48	PI 325438	<i>O. inermis</i>	2,62	2,67	2,68	2,66	0,032	0,026	2,63	2,683	2n=28
69	PI 372809	<i>O. inermis</i>	2,71	2,64	2,67	2,67	0,035	0,029	2,645	2,702	2n=28
70	PI 440572	<i>O. inermis</i>	2,51	2,59	2,55	2,55	0,04	0,033	2,517	2,583	2n=28
23	PI 312909	<i>O. altissima</i>	2,64	2,63	2,53	2,6	0,061	0,05	2,55	2,65	2n=28
42	PI 325448	<i>O. altissima</i>	2,59	2,54	2,62	2,58	0,04	0,033	2,55	2,616	2n=28
51	PI 312464	<i>O. kamularie</i>	2,56	2,53	2,5	2,53	0,03	0,025	2,505	2,555	2n=28
50	PI 314469	<i>O. kachetica</i>	1,36	1,34	1,32	1,34	0,02	0,016	1,324	1,356	2n=16
52	PI 301107	<i>O. megataphros</i>	1,26	1,24	1,21	1,24	0,025	0,021	1,216	1,257	2n=14
47	PI 297923	<i>O. grandis</i>	2,52	2,7	2,62	2,61	0,09	0,074	2,54	2,687	2n=28
44	PI 227377	<i>O. biebersteinii</i>	2,73	2,6	2,69	2,67	0,067	0,054	2,619	2,728	2n=28
26	PI 300580	<i>O. vassilczenkoi</i>	1,33	1,35	1,3	1,33	0,025	0,021	1,306	1,347	2n=16
60	PI 440574	<i>O. vassilczenkoi</i>	1,39	1,37	1,34	1,37	0,025	0,021	1,346	1,387	Diploid
30	PI 280259	<i>O. conferta</i> subsp. <i>argentea</i>	2,59	2,62	2,61	2,61	0,015	0,012	2,594	2,619	2n=28
54	PI 312945	<i>O. oxyodonta</i>	2,59	2,45	2,55	2,53	0,072	0,059	2,471	2,589	2n=28
49	PI 314931	<i>O. iberica</i>	2,7	2,68	2,72	2,7	0,02	0,016	2,684	2,716	Tetraploid
17	PI 315085	<i>O. iberica</i>	2,61	2,64	2,61	2,62	0,017	0,014	2,606	2,634	2n=28
1	PI 312954	<i>O. arenaria</i> subsp. <i>arenaria</i>	2,63	2,79	2,78	2,73	0,09	0,073	2,66	2,807	Tetraploid
63	PI 314468	<i>O. cyri</i>	2,6	2,6	2,64	2,61	0,023	0,019	2,594	2,632	2n=28
13	W6 17878	<i>O. cyri</i>	2,63	2,47	2,55	2,55	0,08	0,065	2,485	2,615	2n=28
55	W6 21877	<i>O. pallasii</i>	1,57	1,57	1,55	1,56	0,012	0,009	1,554	1,573	Diploid
11	PI 312946	<i>O. petraea</i>	2,63	2,61	2,7	2,65	0,047	0,039	2,608	2,685	2n=28
57	PI 312947	<i>O. petraea</i>	1	1,1	1,2	1,1	0,1	0,082	1,018	1,182	Diploid
12	PI 316295	<i>O. petraea</i>	2,67	2,62	2,6	2,63	0,036	0,029	2,601	2,659	2n=28
90	PI 225729	<i>Onobrychis</i> spp	2,47	2,5	2,52	2,5	0,025	0,021	2,476	2,517	2n=28
97	PI 225730	<i>Onobrychis</i> spp	2,55	2,53	2,42	2,5	0,07	0,057	2,443	2,557	2n=28
93	PI 325445	<i>Onobrychis</i> spp	2,55	2,76	2,73	2,68	0,114	0,093	2,587	2,773	2n=28
78	PI 464819	<i>Onobrychis</i> spp	1,05	1,04	0,99	1,03	0,032	0,026	1	1,053	Diploid
94	PI 567875	<i>Onobrychis</i> spp	1,25	1,23	1,24	1,24	0,01	0,008	1,232	1,248	Diploid
43	PI 642147	<i>O. alba</i> subsp. <i>laconica</i>	1,17	1,18	1,21	1,19	0,021	0,017	1,17	1,204	2n=14

Çizelge 4.2. Aksesyonların güven aralıklarına göre gruplandırılması

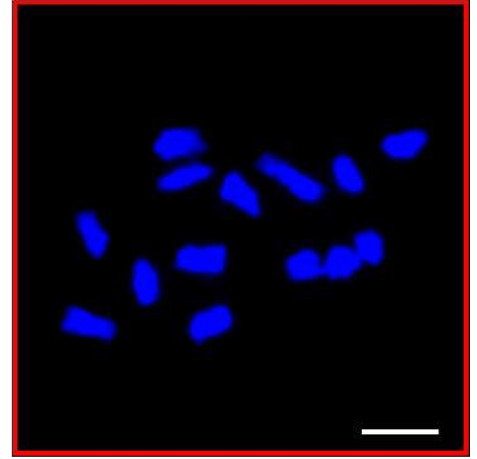
Örnek Kodu	Aksesyon No		Çekirdek DNA İçerikleri			Ort.	Güven Aralıkları		
							Alt	Üst	
1	PI 312954	<i>O. arenaria</i> subsp. <i>arenaria</i>	2,63	2,79	2,78	2,73	2,660	2,807	A
49	PI 314931	<i>O. iberica</i>	2,70	2,68	2,72	2,70	2,684	2,716	
10	PI 312942	<i>O. inermis</i>	2,65	2,73	2,67	2,68	2,649	2,717	
93	PI 325445	<i>Onobrychis</i> spp	2,55	2,76	2,73	2,68	2,587	2,773	B
69	PI 372809	<i>O. inermis</i>	2,71	2,64	2,67	2,67	2,645	2,702	
44	PI 227377	<i>O. biebersteinii</i>	2,73	2,60	2,69	2,67	2,619	2,728	
84	PI 312938	<i>O. inermis</i>	2,72	2,62	2,63	2,66	2,612	2,702	
48	PI 325438	<i>O. inermis</i>	2,62	2,67	2,68	2,66	2,630	2,683	
86	PI 312941	<i>O. inermis</i>	2,56	2,58	2,80	2,65	2,538	2,756	
11	PI 312946	<i>O. petraea</i>	2,63	2,61	2,70	2,65	2,608	2,685	
8	PI 312935	<i>O. inermis</i>	2,62	2,59	2,71	2,64	2,589	2,691	
81	PI 312940	<i>O. inermis</i>	2,62	2,68	2,63	2,64	2,617	2,670	
6	PI 312943	<i>O. inermis</i>	2,62	2,65	2,63	2,63	2,621	2,646	
12	PI 316295	<i>O. petraea</i>	2,67	2,62	2,60	2,63	2,601	2,659	
82	PI 312936	<i>O. inermis</i>	2,56	2,65	2,66	2,62	2,578	2,668	
85	PI 312939	<i>O. inermis</i>	2,63	2,66	2,57	2,62	2,583	2,657	
17	PI 315085	<i>O. iberica</i>	2,61	2,64	2,61	2,62	2,606	2,634	
47	PI 297923	<i>O. grandis</i>	2,52	2,70	2,62	2,61	2,540	2,687	
30	PI 280259	<i>O. conferta</i> subsp. <i>argentea</i>	2,59	2,62	2,61	2,61	2,594	2,619	
63	PI 314468	<i>O. cyri</i>	2,60	2,60	2,64	2,61	2,594	2,632	C
83	PI 312937	<i>O. inermis</i>	2,58	2,70	2,51	2,60	2,518	2,675	
23	PI 312909	<i>O. altissima</i>	2,64	2,63	2,53	2,60	2,550	2,650	
42	PI 325448	<i>O. altissima</i>	2,59	2,54	2,62	2,58	2,550	2,616	
70	PI 440572	<i>O. inermis</i>	2,51	2,59	2,55	2,55	2,517	2,583	
13	W6 17878	<i>O. cyri</i>	2,63	2,47	2,55	2,55	2,485	2,615	
51	PI 312464	<i>O. kamularie</i>	2,56	2,53	2,5	2,53	2,505	2,555	
54	PI 312945	<i>O. oxyodonta</i>	2,59	2,45	2,55	2,53	2,471	2,589	
90	PI 225729	<i>Onobrychis</i> spp	2,47	2,50	2,52	2,50	2,476	2,517	D
97	PI 225730	<i>Onobrychis</i> spp	2,55	2,53	2,42	2,50	2,443	2,557	
55	W6 21877	<i>O. pallasii</i>	1,57	1,57	1,55	1,56	1,554	1,573	E
60	PI 440574	<i>O. vassilczenkoi</i>	1,39	1,37	1,34	1,37	1,346	1,387	
50	PI 314469	<i>O. kachetica</i>	1,36	1,34	1,32	1,34	1,324	1,356	F
26	PI 300580	<i>O. vassilczenkoi</i>	1,33	1,35	1,30	1,33	1,306	1,347	
52	PI 301107	<i>O. megataphros</i>	1,26	1,24	1,21	1,24	1,216	1,257	G
94	PI 567875	<i>Onobrychis</i> spp	1,25	1,23	1,24	1,24	1,232	1,248	
43	PI 642147	<i>O. alba</i> subsp. <i>laconica</i>	1,17	1,18	1,21	1,19	1,170	1,204	H
57	PI 312947	<i>O. petraea</i>	1,00	1,10	1,20	1,10	1,018	1,182	
78	PI 464819	<i>Onobrychis</i> spp	1,05	1,04	0,99	1,03	1,000	1,053	

4.2. Aksesyonların Çekirdek DNA İçerikleri ile Kromozom Sayılarının İlişkilendirilmesi ve Ploidy Düzeylerinin Belirlenmesi

Üzerinde çalışmış olduğumuz korunga türlerinin ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri ile ploidy düzeyleri yapılmış olan bir çalışmadan yararlanılarak ilişkilendirilmiştir (Yücel, 2019). Kültürü yapılan korunga (*Onobrychis* Mill, baklagiller) taksonları ve bazı yabani akrabalarının moleküler sitogenetik yöntemler ile karakterizasyonu başlıklı bu çalışma bir doktora tezi olup, aynı türler kullanılarak laboratuvarımızda yürütülmüştür. Yapılan bu çalışmada yaklaşık 35 farklı korunga türünün mitoz kromozomları sayılmış ve türlerin genomları farklı moleküler sitogenetik yöntemler ile karakterize edilmiştir. Yücel (2019) tarafından yapılan çalışmadan yararlanılarak çalışmamızda kullanılan korunga aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri ile ploidy düzeyleri ilişkilendirildiğinde ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 1,03 pg ile 1,56 pg arasında olan (1. ana grup içerisinde yer alan) aksesyonların diploid ($2n=14$ ve 16), 2,56 pg ve daha yüksek ortalama 2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan aksesyonların (2. ana grup içerisinde yer alan) ise tetraploid ($2n=28$) olduğu belirlenmiştir. Tetraploid (*O. cyri*) ve diploid (*O. megataphros*) korunga türlerine ait mitoz kromozomlarının görünüşleri Şekil 4.1 ve Şekil.4.2’ de sunulmuştur (Yücel, 2019).



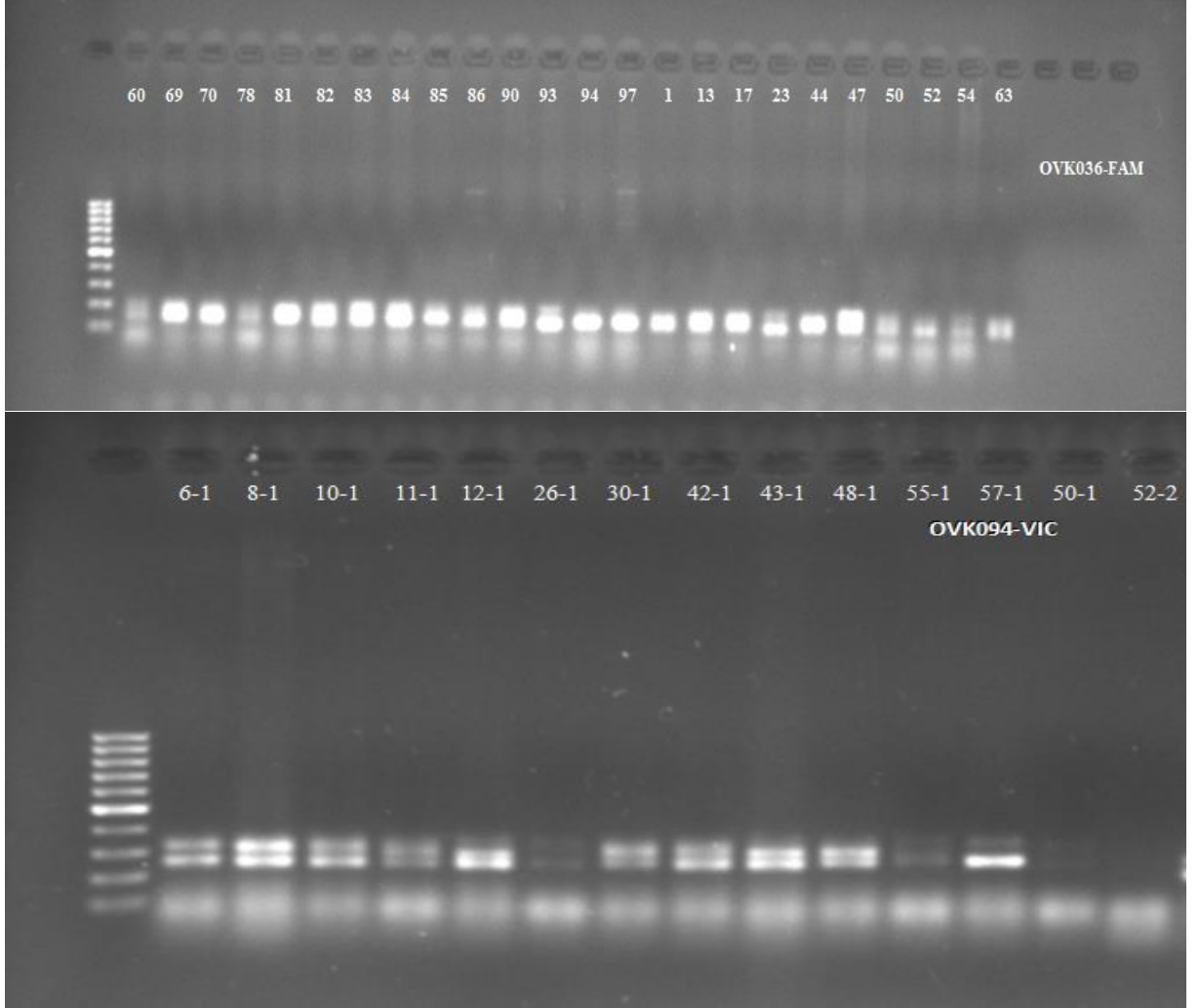
Şekil 4.1. *O. cyri* mitotik kromozomlarının görünüşü, $2n=4x=28$. (Ölçek 5 μ m)



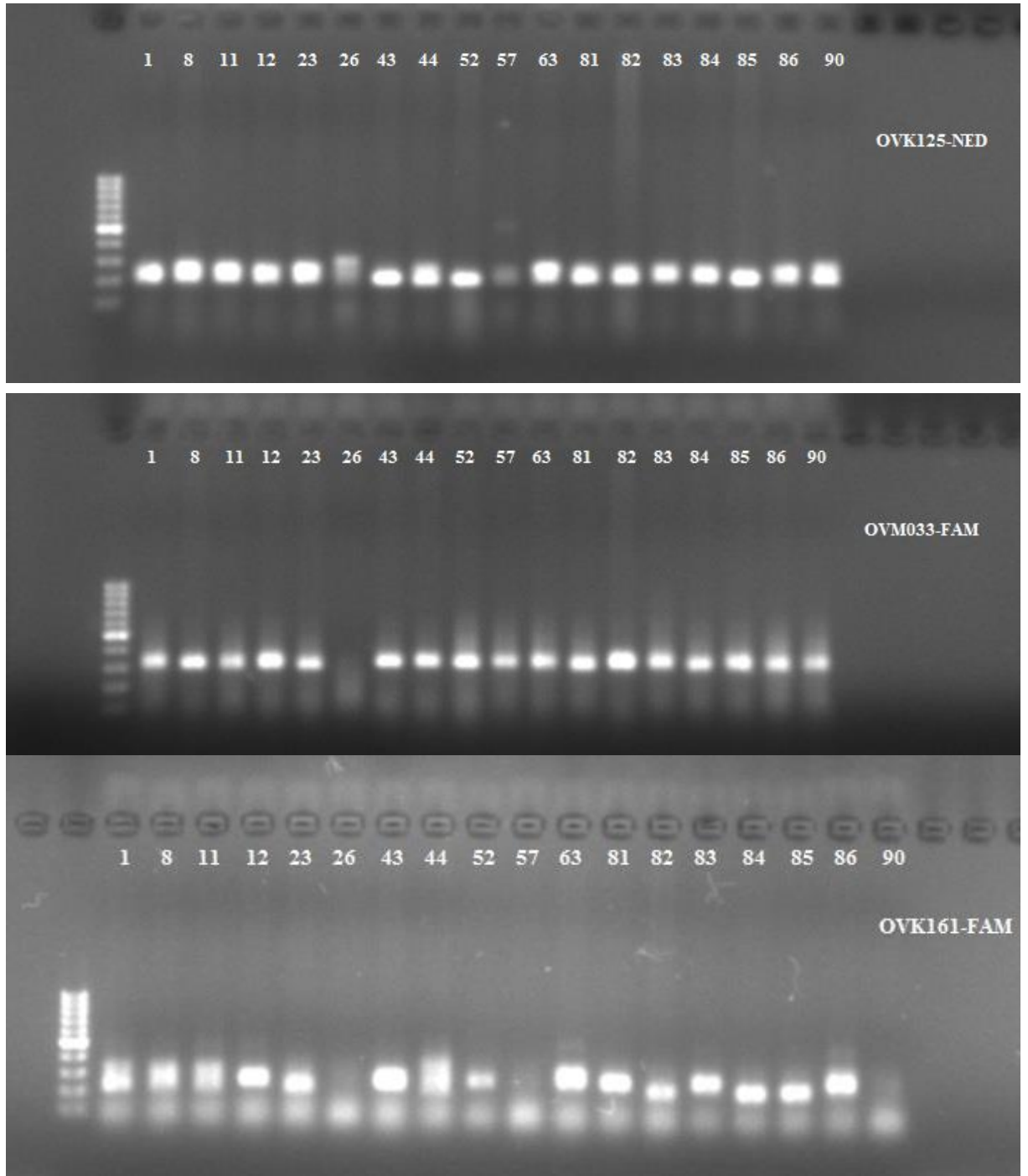
Şekil 4.2. *O. megataphros* mitotik kromozomlarının görünüşü, $2n=2x=14$. (Ölçek 5 μ m)

4.3. PCR Ürünlerinin Baz Büyüklüklerinin, Jel ve Kapiler Elektroforez Yöntemleriyle Belirlenmesi

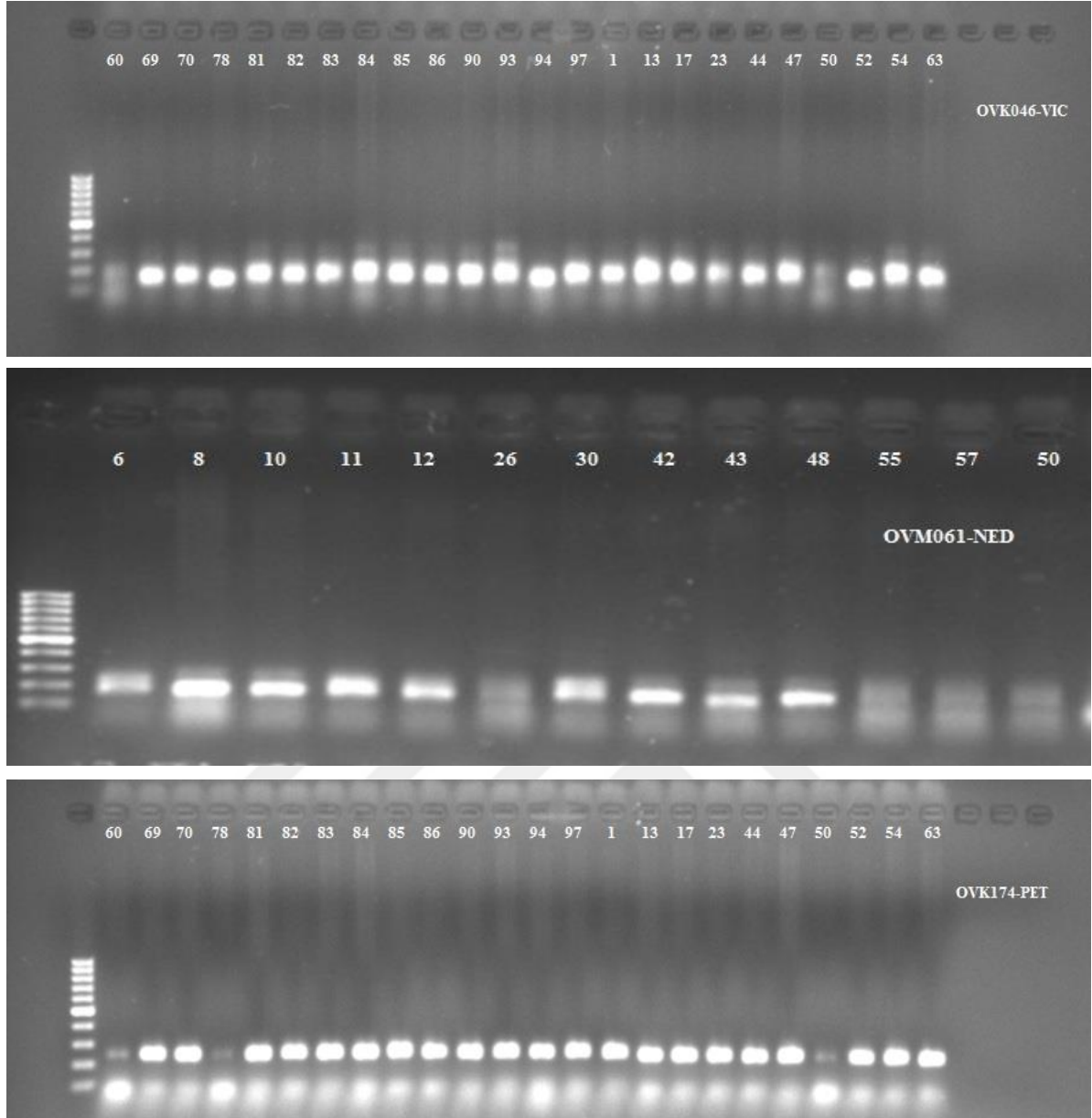
PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek bantların istenilen bölgede olup olmadığı ve spesifik bağlanmaların olup olmadığı kontrol edilmiştir. Daha sonrasında bantlar UV ışık altında incelenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.3. OVK036, OVK094 lokuslarına ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri

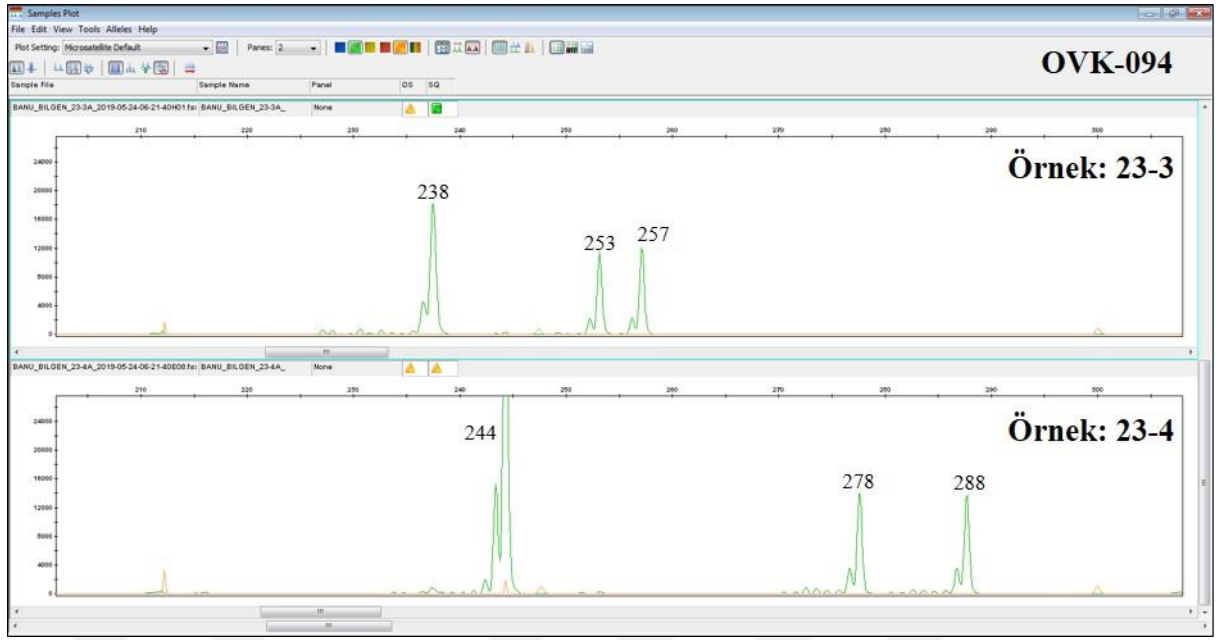


Şekil 4.4. OVK125, OVM033, OVK161 lokuslarına ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri

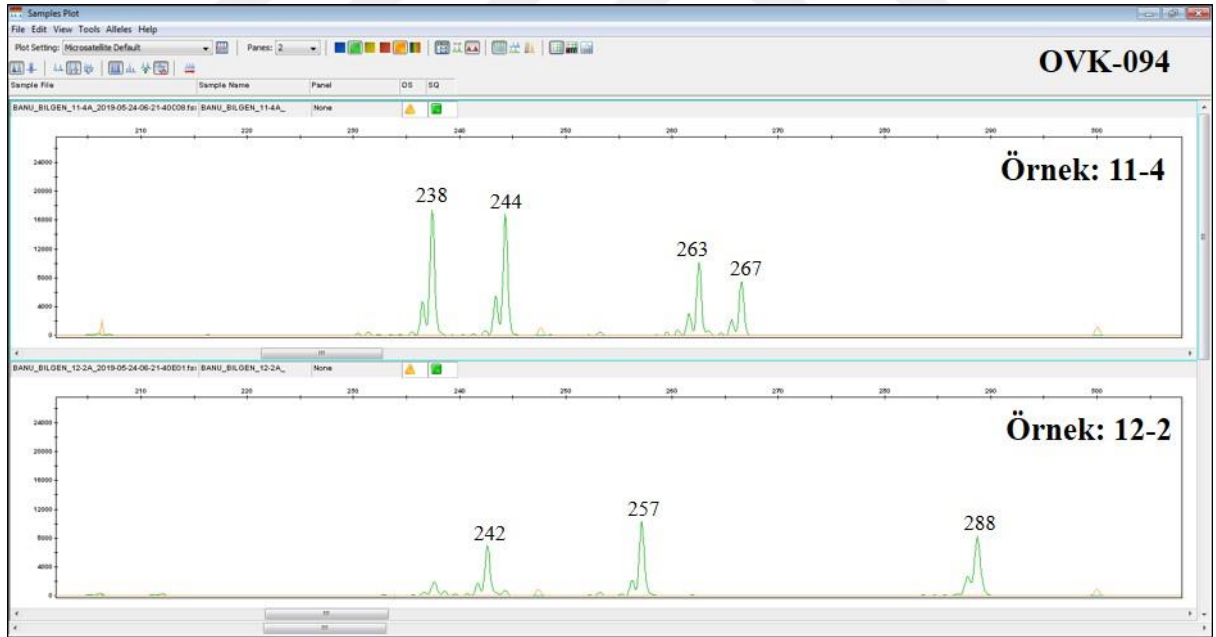


Şekil 4.5. OVK046, OVM061 ve OVK174 lokusuna ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri

PCR ürünlerinin elde edilmesinden sonra hizmet alımı yapılarak kapiller elektroforez ile DNA parça büyüklükleri belirlenmiştir. Moleküler genetik laboratuvarında bulunan GeneMapper Software 5.0 yazılımı kullanılarak aksesyonların DNA parça analizleri değerlendirilerek SSR lokuslarına ait allellerin baz çifti olarak büyüklükleri bulunmuştur. Primerlere ait allellerin büyüklüklerini gösteren örnekler aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21).



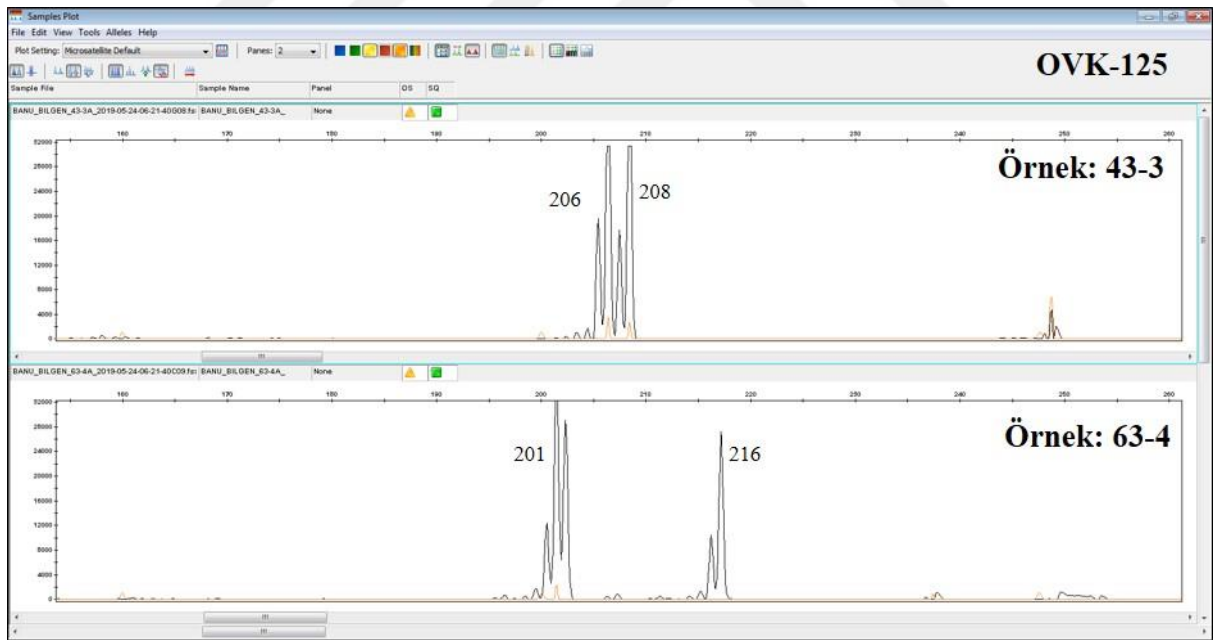
Şekil 4.6. 23-3 ve 23-4 bireylerinin OVK-094 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



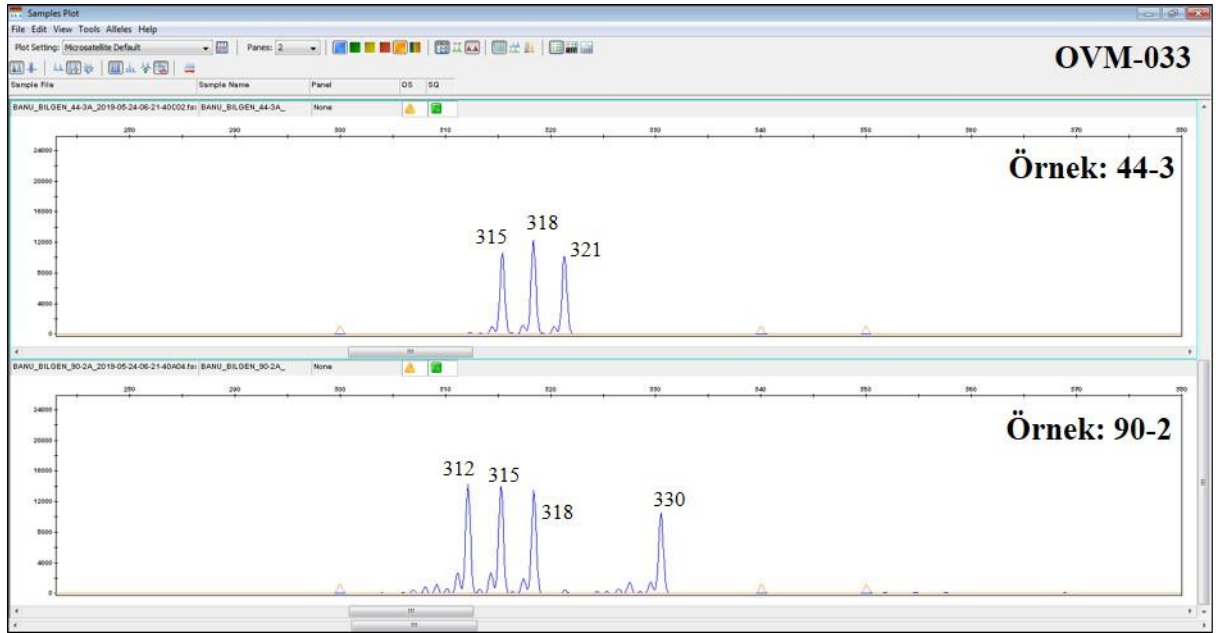
Şekil 4.7. 11-4 ve 12-2 bireylerinin OVK-094 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



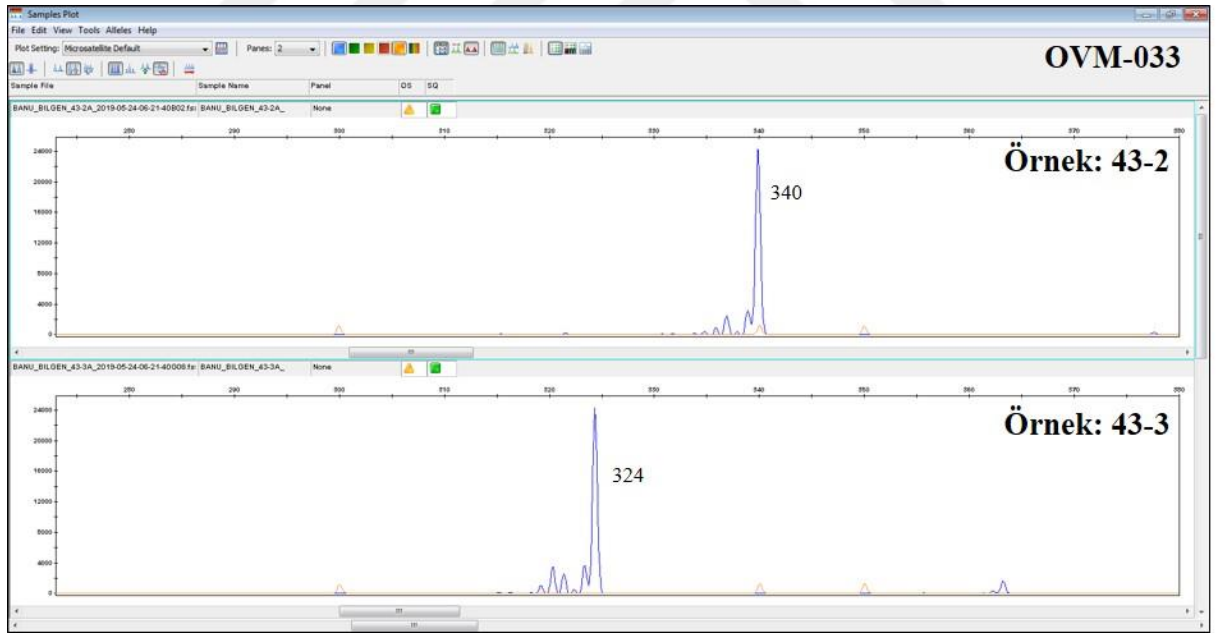
Şekil 4.8. 12-3 ve 54-3 bireylerinin OVK-125 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



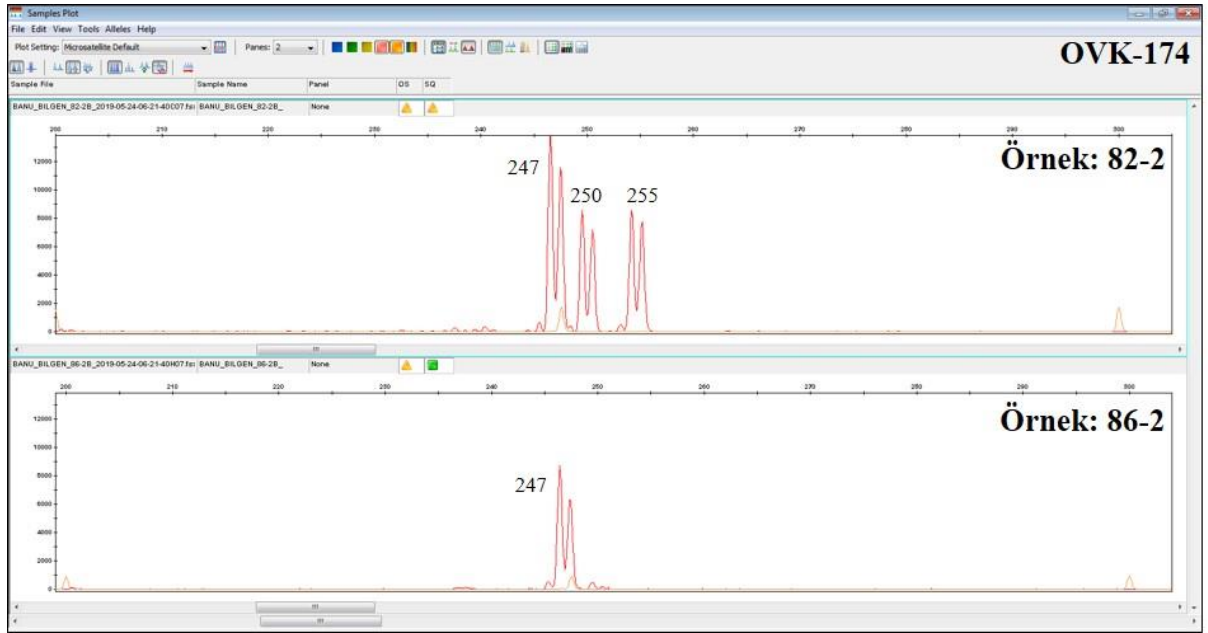
Şekil 4.9. 43-3 ve 63-4 bireylerinin OVK-125 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



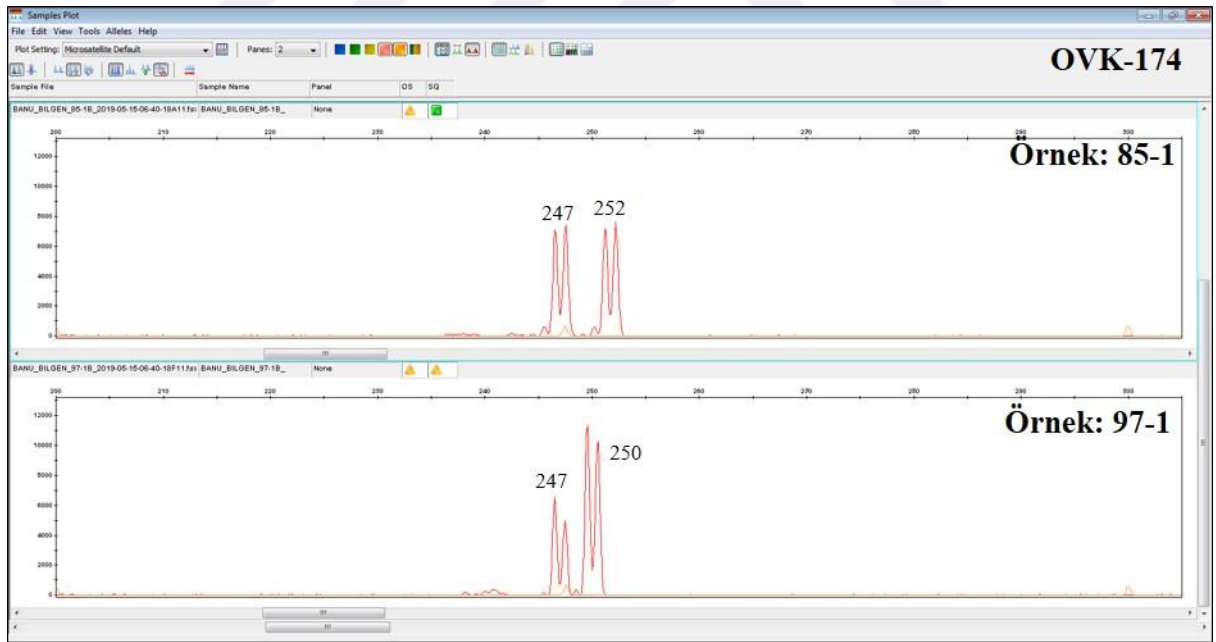
Şekil 4.10. 44-3 ve 90-2 bireylerinin OVM-033 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



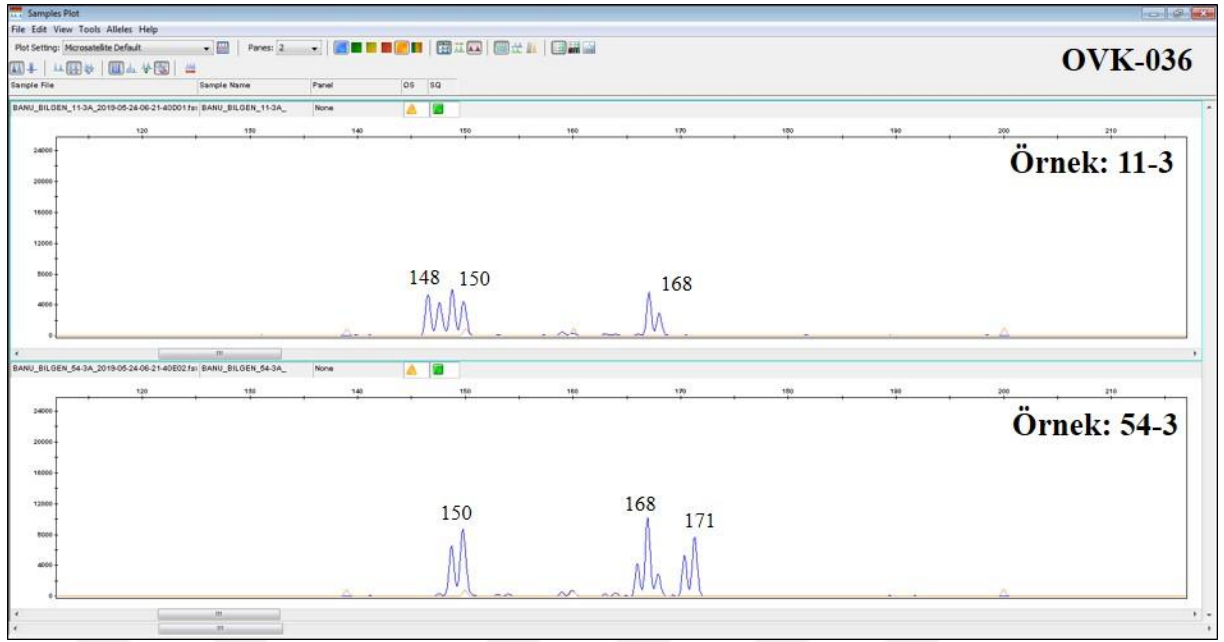
Şekil 4.11. 43-2 ve 43-3 bireylerinin OVM-033 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.12. 82-2 ve 86-2 bireylerinin OVK-174 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



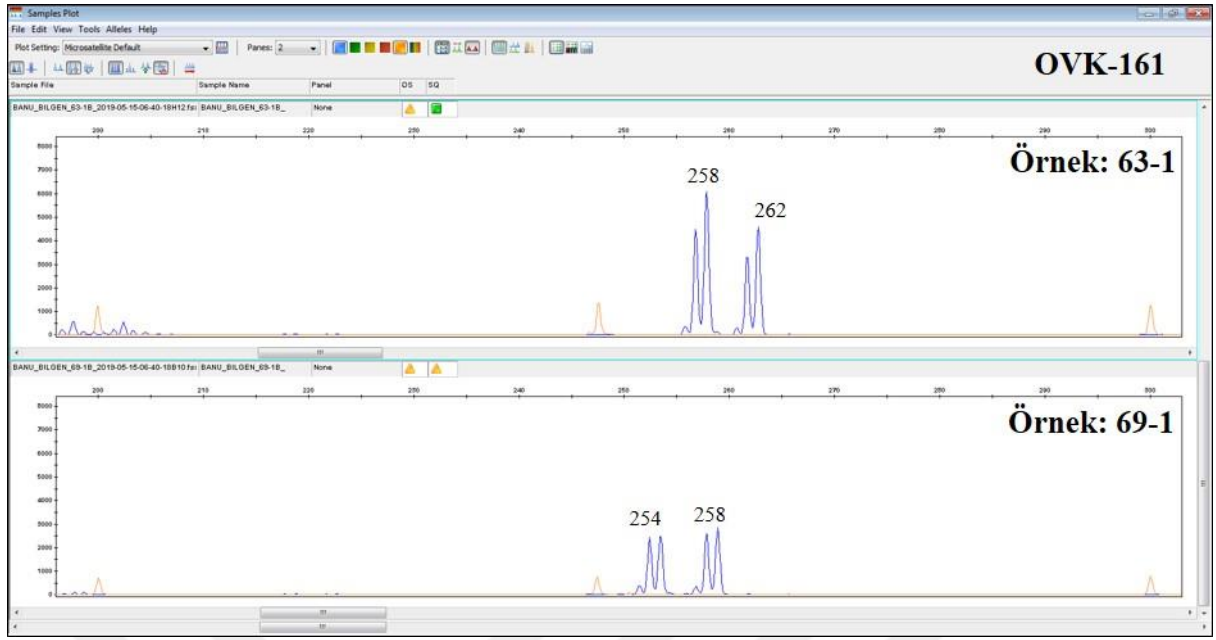
Şekil 4.13. 85-1 ve 97-1 bireylerinin OVK-174 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.14. 11-3 ve 54-3 bireylerinin OVK-036 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



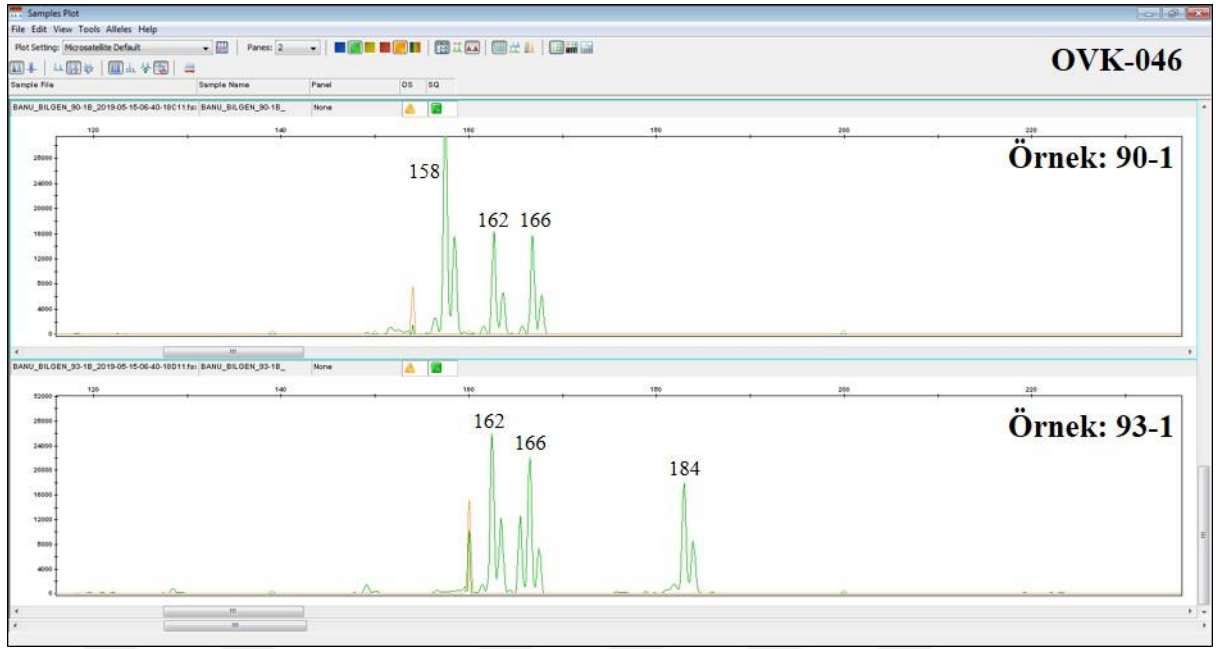
Şekil 4.15. 42-1 ve 8-1 bireylerinin OVK-036 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



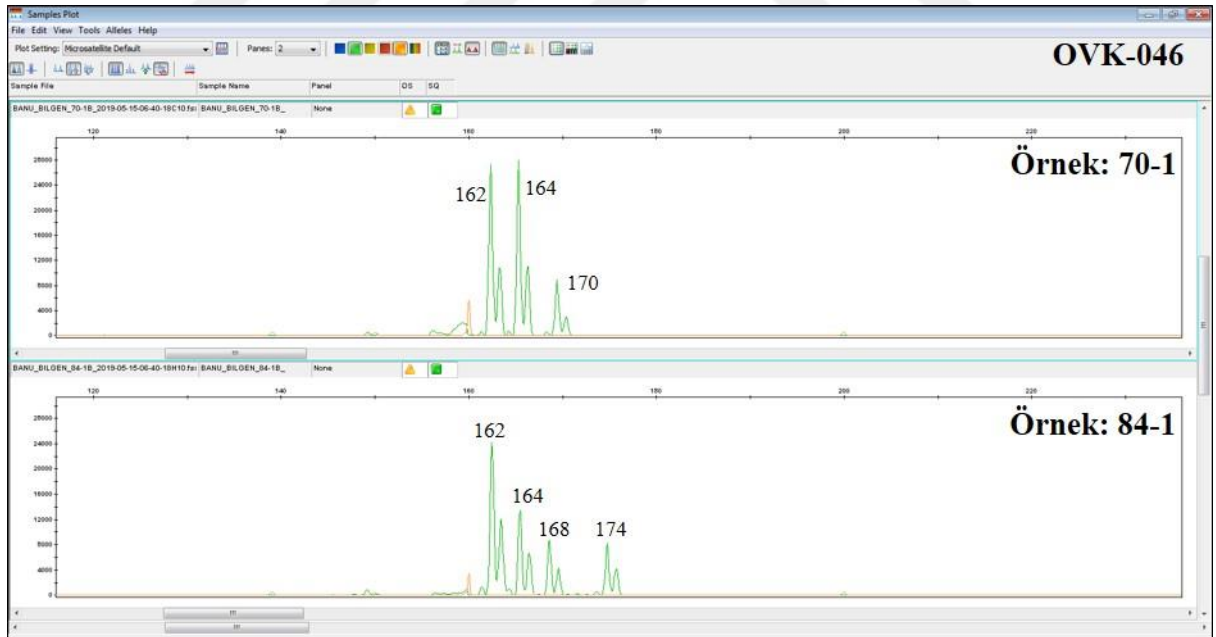
Şekil 4.16. 63-1 ve 69-1 bireylerinin OVK-161 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



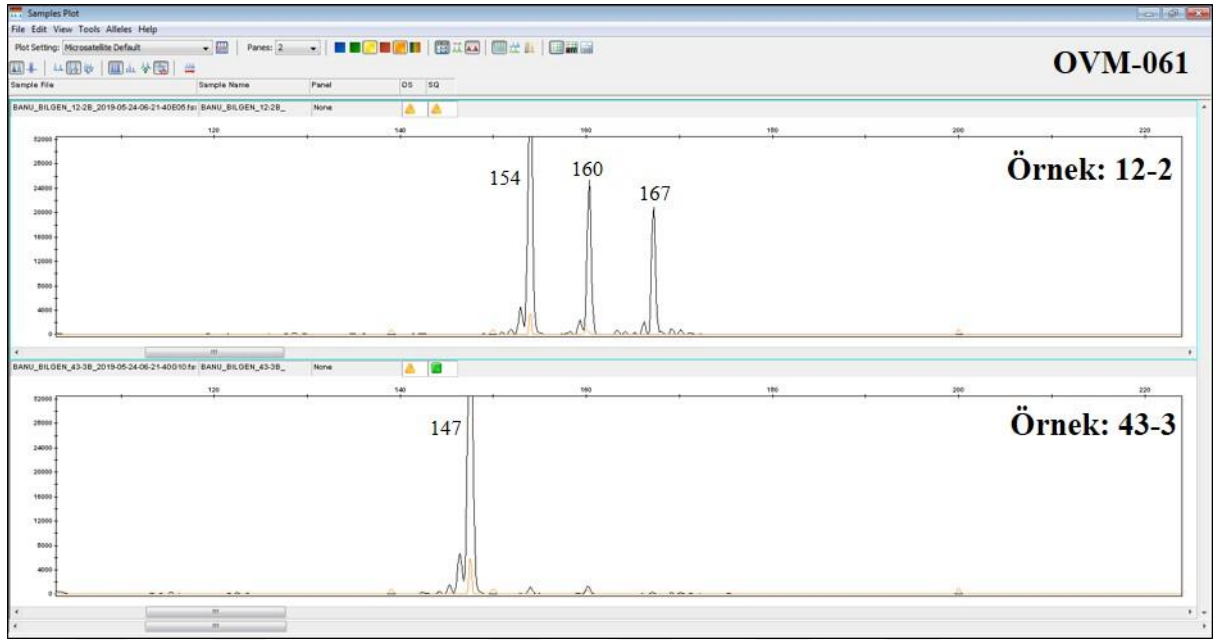
Şekil 4.17. 17-1 ve 17-2 bireylerinin OVK-161 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



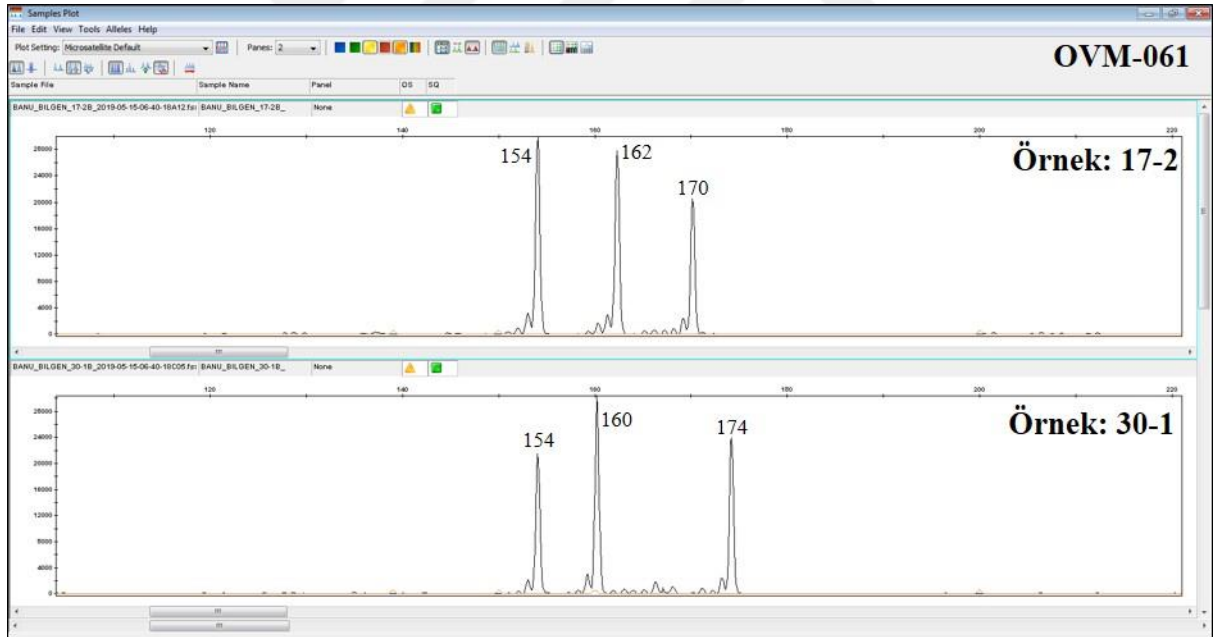
Şekil 4.18. 90-1 ve 93-1 bireylerinin OVK-046 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.19. 70-1 ve 84-1 bireylerinin OVK-046 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.20. 12-2 ve 43-3 bireylerinin OVM-061 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.21. 17-2 ve 30-1 bireylerinin OVM-061 lokusunda sahip olduğu allellerin elektroferogram görüntüsü

4.4. SSR Lokuslarına Ait Bulgular

Çalışmamızın bu kısmında 18 türe ait toplam 100 genotip kullanılmış ve 8 SSR primeri kullanılarak yapılan analizlerde toplam 93 allel saptanmıştır (Çizelge 4.3). Kullanılmış olan SSR lokuslarından en yüksek sayıda allel (21) OVK94 primerinde belirlenmiştir. OVK161 primerinde 15 allel, OVK046 primerinde 13 allel, OVM061 primerinde 10 allel, OVM033 primerinde 10 allel, OVK125 primerinde 9 allel, OVK036 primerinde 9 allel belirlenirken en düşük sayıda allel OVK174 primerinde (6) gözlenmiştir. Çalışmada kullanılmış olan tüm SSR primerleri göz önüne alındığında baz çifti (bç) uzunluğu 142 ile 340 bç arasında olduğu görülmektedir.

OVK094 primeri için hesaplanmış olan allel frekanslarına bakıldığında en yüksek frekansa sahip allel 238 bç'lik alleldir ($f = 0,60$). 244 bç'lik allel frekansı 0,42 olarak belirlenirken 257 bç'lik allelin frekansı 0,32 olarak belirlenmiştir. OVK094 primerinin allellerinden 14'ünün frekansı 0,1'den küçük olarak bulunmuştur.

OVK125 primeri için hesaplanan allel frekansları göz önüne alındığında 201 bç ve 206 bç'lik alleller yüksek frekansa sahip olan alleller olarak belirlenmiştir ($f > 0,5$). 194 bç, 204 bç ve 221 bç'lik allellerin frekansları 0,05'den küçük olarak belirlenmiş ve alleller arasında en düşük frekansa sahip oldukları görülmüştür.

OVM033 primeri için allel frekansları hesaplandığında en yüksek frekansa sahip olan allel, 315 bç'lik allel olarak belirlenmiştir ($f = 0,51$). 318 bç ve 321 bç'lik allellerin frekansları sırasıyla 0,45 ve 0,48 olarak bulunurken, 2 allelin frekansları ise (306 bç, 340 bç) 0,01 olarak bulunmuştur.

OVK174 primeri için hesaplanmış olan allel frekanslarına bakıldığında ise 6 adet allel belirlenmiş olup en yüksek frekansa sahip allelin 247 bç'lik allel olduğu gözlenmiştir ($f = 0,93$). Belirlenen diğer bir allel olan 250 bç'lik allelin frekansı ise 0,64 olarak hesaplanmıştır.

OVK036 primeri için hesaplanan allel frekansları incelendiğinde 150 bç'lik allelin frekansının 0,87 olduğu, 160 bç'lik allelin ise frekansının 0,67 olduğu gözlenmiştir. Belirlenen diğer 7 allelin frekanslarının düşük olduğu belirlenmiştir ($f < 0,5$).

OVK161 primeri için hesaplanmış olan allel frekanslarına bakıldığında ise en yüksek frekansa sahip olan allel 254 bç'lik allel olarak belirlenmiştir ($f = 0,65$). Daha sonrasında frekansı 0,30 olarak bulunan 218 bç'lik allel, ikinci en yüksek frekansa sahip olan allel olarak

bulunmuştur. Ayrıca OVK161 primerinin allellerinden 6'sının frekansının düşük olup 0,01 olduğu gözlenmiştir.

OVK046 için hesaplanmış olan allel frekanslarına bakıldığında 162 bç'lik allelin frekansı 0,55 olarak belirlenirken, 166 bç'lik allelin frekansı 0,52 olarak belirlenmiştir. 168 bç'lik allelin frekansı 0,39 olarak belirlenirken, 164 bç'lik allelin frekansı 0,37 olarak belirlenmiştir.

OVM061 için hesaplanan allel frekansları incelendiğinde ise en yüksek 3 allel frekansının 0,93, 0,59 ve 0,17 olduğu görülmüştür. Bu frekanslar sırasıyla 160 bç, 154 bç ve 167 bç'lik allellere aittir. En düşük frekansa sahip olan allel ise 195 bç'lik allel olarak belirlenmiştir ($f = 0.01$).

Çalışmada kullanılmış olan SSR primerlerinin genetik çeşitlilik parametreleri Çizelge 4.4' te verilmiştir. Çizelge 4.4.' e göre hesaplanmış olan ortalama PIC değerlerinin 0,124 ile 0,244 arasında değiştiği görülmektedir. Ortalama PIC değeri ise 0,188 olarak bulunmuştur.

Tez çalışmasında kullanılan korunga aksesyonlara ait 100 genotipin ortalama Shannon sabiti (I) 0,301 olarak bulunmuştur. Shannon sabiti (I) en yüksek OVK046 primerinde 0,380 olarak belirlenirken, en düşük OVK174 primerinde 0,212 olarak belirlenmiştir. Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri (u_h) en düşük OVK174 primerinde 0,125 olarak gözlenirken, en yüksek OVK046 primerinde 0,246 olarak gözlenmiştir. Ortalama tarafsız genetik çeşitlilik değeri ise 0,187 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan 8 SSR lokusuna ait allellerin frekansları

SSR Lokusu	Alleller (bç)	Allel Frekansları (f)	SSR Lokusu	Alleller (bç)	Allel Frekansları (f)
OVK094	229	0,020	OVK036	148	0,020
	234	0,070		150	0,870
	238	0,600		154	0,140
	240	0,020		158	0,010
	242	0,140		160	0,670
	244	0,420		162	0,050
	247	0,010		164	0,350
	249	0,210		168	0,360
	253	0,280		171	0,070
	255	0,030	OVK161	215	0,010
	257	0,320		218	0,300
	260	0,080		222	0,230
	263	0,100		225	0,020
	267	0,020		242	0,010
	269	0,010		246	0,010
	271	0,020		250	0,010
	273	0,060		252	0,030
	278	0,030		254	0,650
	283	0,010		258	0,150
	285	0,050		262	0,070
	288	0,010		266	0,020
OVK125	194	0,040		270	0,050
	196	0,150		272	0,010
	201	0,770		282	0,010
	204	0,020	OVK046	150	0,060
	206	0,640		154	0,020
	208	0,090		158	0,190
	212	0,460		160	0,050
	216	0,070		162	0,550
	221	0,030		164	0,370
	306	0,010		166	0,520
	309	0,080		168	0,390
OVM033	312	0,470		170	0,110
	315	0,510		172	0,180
	318	0,450		174	0,070
	321	0,480		178	0,010
	324	0,070		184	0,020
	327	0,030	OVM061	142	0,040
	330	0,020		147	0,030
	340	0,010		151	0,060
OVK174	247	0,930		154	0,590
	250	0,640		160	0,930
	252	0,050		162	0,070
	255	0,010		167	0,170
	259	0,010		170	0,040
	265	0,010		174	0,030
				195	0,010

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan 8 SSR lokusuna ait genetik parametreler

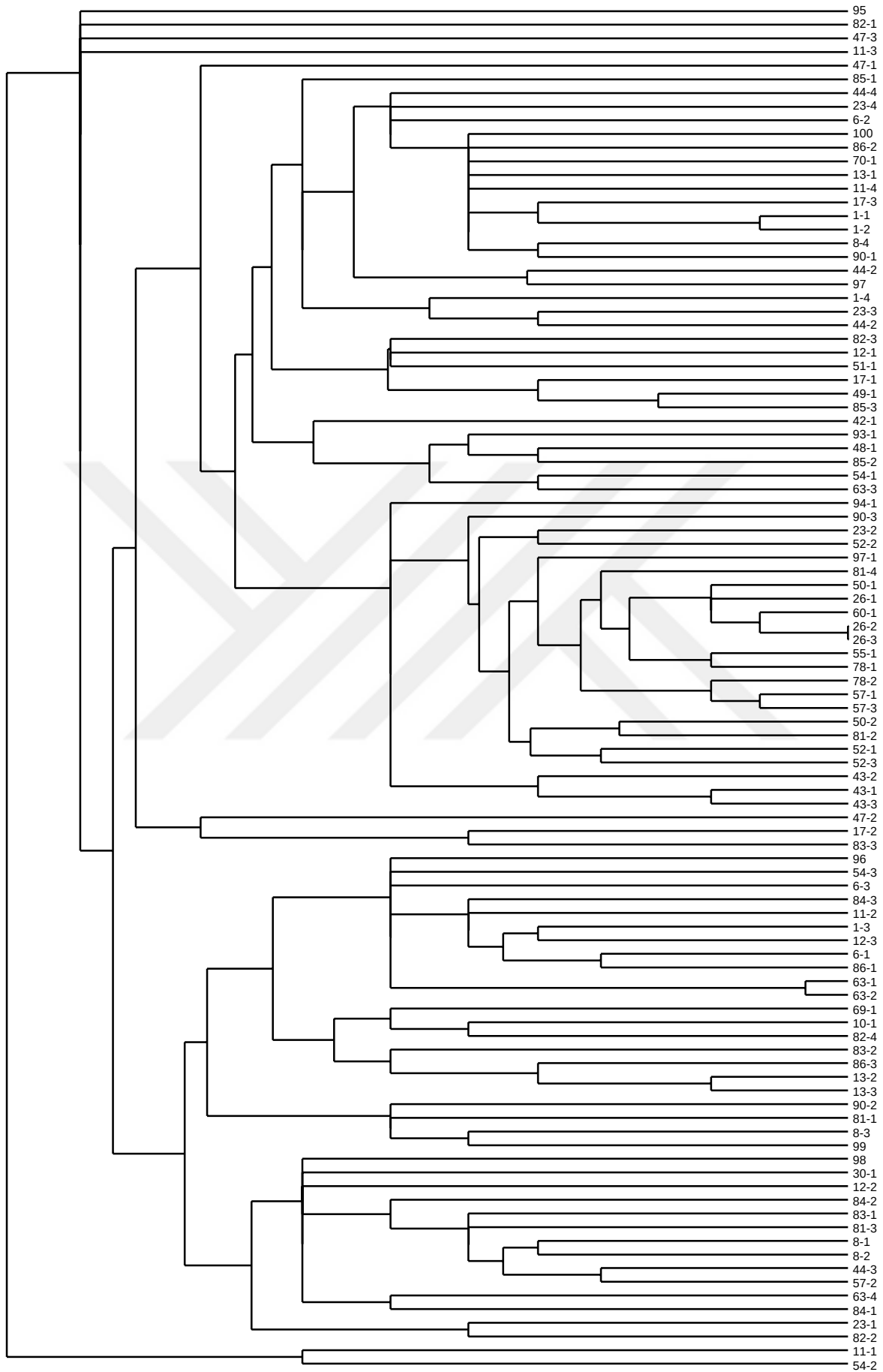
SSR Lokusları	N _A *	Bant Aralığı (bç)	Min. AF	Maks. AF	PIC*	I*	uh*
OVK036	9	148-171	0,02	0,87	0,234	0,370	0,237
OVK094	21	229-288	0,01	0,60	0,162	0,270	0,163
OVK125	9	194-221	0,02	0,77	0,226	0,362	0,228
OVM033	10	306-340	0,01	0,51	0,241	0,364	0,243
OVK161	15	215-282	0,01	0,65	0,131	0,223	0,132
OVK046	13	150-184	0,01	0,55	0,244	0,380	0,246
OVM061	10	142-195	0,01	0,93	0,143	0,253	0,144
OVK174	6	247-265	0,01	0,93	0,124	0,212	0,125
Ortalama	11,625	-	-		0,188	0,301	0,187

*N_A =Gözlenen allel sayısı, Min.= Minimum, Maks.= Maksimum, PIC = Polimorfik bilgi içeriği, I = Shannon sabiti, uh = Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri.

Tez çalışmasında kullanılmış olan korunga aksesyonlarına ait 100 bireyin tarafsız genetik çeşitlilik değerleri (uh) kullanılmış, UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) yöntemi ile dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 4.22). Oluşturulan dendrograma bakıldığında, üzerinde çalışılmış olan 38 aksesyona ait 94 birey ve 6 *O. viciifolia* aksesyonu (toplam 100 birey) 2 ana gruba ayrılmıştır. 1.grup 98 bireyden oluşurken, 2.grup 2 bireyden oluşmaktadır. 1.grupta 98 bireyde, 31 adet *O. inermis*, 9 adet *O. petraea*, 8 adet *Onobrychis* spp., 7 adet *O. cyri*, 6 adet *O. viciifolia*, 5 adet *O. altissima*, 4 adet *O. biebersteinii*, 4 adet *O. iberica*, 4 adet *O. vassilczenkoi*, 4 adet *O. arenaria* subsp. *arenaria*, 3 adet *O. grandis*, 3 adet *O. megataphros*, 3 adet *O. alba* subsp. *laconica*, 2 adet *O. oxyodonta*, 2 adet *O. kachetica*, 1 adet *O. kamularie*, 1 adet *O. pallasii*, 1 adet *O. conferta* subsp. *argentea* bireyi belirlenmiştir. 2. grupta, 2 ayrı sınıf oluşturan *O. petraea* ile *O. oxyodonta* aksesyonlarına ait bireyler belirlenmiştir ve genetik olarak diğer bireylerden uzak olduğu görülmektedir. 1. grup detaylı olarak incelendiğinde 5 alt gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu grupta yer alan 95, 82-1, 47-3ve 11-3 numaralı genotipler ayrı birer grup oluştururken geri kalan 94 genotip ayrı bir alt grup oluşturmaktadır. Bu büyük grup biri 58 genotipten oluşan diğeri ise 36 genotipten oluşan iki alt gruba ayrılmaktadır. Bu gruplarda kendi içlerinde alt gruplara ayrılmaktadır. Bir genotip hariç çalışmada kullanılan tüm diploid genotipler (18) 58 genotip içeren bu büyük grup içerisinde ayrı bir grup oluşturmuştur. Diploid genotiplerin oluşturduğu bu grup içerisinde tetraploidlerden sadece 2 *O. inermis*, 1 *O. altissima* ve 2 tür

adı belli olmayan genotip yer almaktadır. Bu grup içerisinde yer almayan tek diploid genotip (*O. petrae*) ise birkaç tetraploid *O. biebersteini* ve *O. inermis* genotipi ile birlikte 36 genotipten oluşan diğer büyük grubun içerisinde bir alt grup oluşturmuştur.





0.1 Şekil 4.22. Korunga aksesyonlarına ait bireylerin SSR analizleri sonucunda oluşturulan dendrogram

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Çekirdek DNA analizleri

Çalışmamızda, flow sitometri ile 17 korunga türünü temsilen seçilmiş olan 38 korunga aksesyonuna ait toplam 94 korunga genotipinin çekirdek DNA analizleri başarı ile tamamlanmıştır. Yüksek oranda tanen içerdikleri bilinen korunga bitkilerinin çekirdek DNA analizlerinde, başlangıçta bazı zorluklar ile karşılaşılmış olmakla birlikte, oldukça yüksek kalitede sonuçlar elde edilmiştir. Karşılaşılan bu zorluklar kullanılan yöntemler üzerinde değişiklikler yapılarak, daha fazla tekrarlar ve daha fazla özen gösterilerek aşılmıştır. Aksesyonların Çizelge 4.1’ de sunulmuş olan standart sapma değerlerinin genelde düşük olması çalışmada yapılan çekirdek DNA analizlerinin hassasiyetini göstermektedir. Bununla birlikte tekrarlamalara rağmen bazı aksesyonlarda standart sapma nispeten yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni (1) yabancı döllenmiş korunga popülasyonlarının (aksesyon) yüksek düzeyde heterojen yapıya sahip olması ve (2) fenolik bileşik içeriğinin genotipler arasında yüksek oranda değişim göstermesi sayılabilir. Tuna vd. (2019) yapmış olduğu çalışmada ağırlıklı olarak *O. viciifolia* türüne ait yaklaşık 80 genotipin bazı kalite özelliklerini incelemişler ve yapılan bu çalışmada genotiplerin tanen içeriklerinin yaklaşık 9 misline kadar değişim gösterebildiği belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ayçiçeği bitkisinde bulunan bazı bileşiklerin çekirdek florasan yoğunluğunu azalttığı belirtilmiştir. Araştırmacılar bu tür bileşiklerin 10 angiosperm türünün 4’ünde değişik oranlarda bulunduğunu bildirmişlerdir (Price, Hodnet ve Johnston, 2000).

Çalışmamızda analiz edilen korunga aksesyonlarının ortalama 2C çekirdek DNA içeriğinin 0,99 pg ile 2,80 pg arasında değiştiği gözlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında, şu ana kadar korunga türlerinde çekirdek DNA analiz ile ilgili olarak sadece 2 çalışma bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile büyük bir paralellik göstermektedir. Yapılan bu iki çalışmadan birinde çalışmamızda kullandığımız aynı standart bitki ve yöntem kullanılarak, aynı laboratuvarında Şahin (2019) tarafından 3 farklı korunga türüne (*O.viciifolia*, *O.arenaria* ve *O.transcaucasica*) ait 210 aksesyonun çekirdek DNA içerikleri analiz edilmiş ve türlerin ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri sırasıyla 2,64 pg, 2,63 pg, 2,65 pg olarak bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmada ise Carbonero (2011) DAPI boyası kullanarak flow sitometri ile sadece *Onobrychis viciifolia* türüne ait bir aksesyonun bireyleri üzerinde çekirdek DNA analizi yapmış ve aksesyonun ortalama 2C çekirdek DNA içeriğini 2,50 pg olarak belirlemiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile daha önce yapılmış olan çalışmalar arasında gözlenen küçük farklılıkların başlıca nedeni analiz edilen korunga tür, aksesyon ve genotiplerin farklı olmasıdır. Buna ek olarak Carbonero (2011) çalışmasında florasan boya olarak DAPI boyası kullanmıştır. Çalışmamızda ise florasan boya olarak PI kullanılmıştır. PI (propidium iodide) DNA'yı oluşturan tüm nükleotitlere eşit şekilde bağlandığından DNA'yı homojen bir şekilde boyamaktadır. Bununla birlikte DAPI sadece Adenin ve Timin nükleotitlerini boyamaktadır. Bu yüzden DAPI ile elde edilmiş olan çekirdek DNA analizi sonuçları türün AT/GC oranına göre normalden bir miktar yüksek ya da düşük olabilmektedir. Bu nedenle Dapi ile elde edilen sonuçlar gerçek değerden yaklaşık %15 kadar farklılık gösterebilmektedir.

5.2. Aksesyonların Çekirdek DNA İçerikleri ile Kromozom Sayılarının İlişkilendirilmesi ve Ploidy Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılan korunga türlerinin flow sitometri ile belirlenmiş çekirdek DNA içerikleri aynı türlerin daha önce Yücel (2019) tarafından belirlenmiş olan kromozom sayıları ile ilişkilendirildiğinde bazı aksesyonların ploidy düzeylerinin diploid iken diğer bazılarının ise tetraploid olduğu belirlenmiştir. Bazı türlerin ise hem diploid hemde tetraploid formlarının bulunduğu saptanmıştır. Korunga türlerinin ploidy düzeyleri ile ilgili olarak çalışmamızda elde etmiş olduğumuz sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçları teyit etmektedir. Yücel (2019) hazırlamış olduğu doktora tezinde 35 korunga türünün flow sitometri ile ploidi düzeyini belirlemiş ve türlerin ploidi düzeylerinin diploid ile tetraploid arasında değişim gösterirken, bazı türlerin her iki ploidy düzeyine sahip formlarının bulunduğunu saptamıştır. Çalışmada aynı zamanda korunga cinsinde iki farklı temel kromozom sayısının ($n=7$ ve $n=8$) bulunduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bir tür hariç tüm tetraploidlerin $2n=28$ kromozoma sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmada sadece *O. subacaulis* türünün $2n=32$ kromozoma sahip olduğu belirlenmiştir. İranda yapılan bir çalışmada da korunga cinsinin diploid ve tetraploid türleri içerdiği belirlenmiştir (Hejazi ve Nasab, 2010). Bununla birlikte korunga cinsi içerisinde $2n=22$, 27, 28 ve 29 kromozomlu bitkilerin varlığı da literatürde yer almaktadır (Abou–El–Enain, 2002). Bu bitkilerin bazıları aneuploid iken, diğer bazılarının ise kromozomlarının yanlış sayılmış olabileceği yüksek bir ihtimaldir.

Ploidy analizi klasik olarak oldukça yavaş ve çok fazla iş gücü gerektiren feulgen veya asetokarmin ile boyanmış kök ucu dokularından hazırlanmış preparatlarda mitoz kromozomlarının ışık mikroskobu ile sayılmasıyla yapılmaktadır (Karp, 1991). Çok sayıda

bitkinin kromozomlarının sayılması ve ploidy düzeylerinin belirlenmesi gerektiği durumlarda bu yöntem pratik olmamaktadır. Çalışmamızda incelenen türlerin ploidy düzeyleri türlerin çalışmamızda belirlenen 2C çekirdek DNA içeriklerinin aynı türlerin Yücel (2019) tarafından belirlenmiş kromozom sayıları ile ilişkilendirilerek kolayca belirlenmiştir. Bu gün flow sitometri ploidy analizlerinde kullanılan en hızlı, kolay ve güvenilir metot olup, şu ana kadar *Medicago* (Brummer vd., 1999), *Brom* (Tuna vd., 2001), kasava (Awolaye vd., 1994), tef (Ayele vd.,1996), *Dactylis* (Tuna, Khandka, Golan Goldrish, Arumuganathan ve Shresta, 2004), *Festuca* (Smarda vd., 2008), *Phleum* (Kula vd., 2006), *Koeleria* (Pecinka vd., 2006), *Cynodon* (Gülşen vd., 2009) ve bazı çok yıllık çayır mera bitkileri (Savaş Tuna vd., 2016) gibi bir çok türde kullanılmıştır.

5.3. SSR Analizleri

Çalışmanın bu kısmında çekirdek DNA içeriği ve ploidy düzeyi belirlenen 17 korunga türünü temsilen seçilmiş 38 farklı aksesyona ait 94 genotipe ek olarak 6 farklı *O. viciifolia* aksesyonundan seçilmiş 6 genotip daha eklenmiştir. Korunga bitkisinin içerdiği fenolik bileşikler özellikle de tanenler nedeniyle çalışmamızın bu kısmında da zorluklar ile karşılaşmıştır. Karşılaşılan bu zorluklar kullanılan yöntemler değiştirilerek, yöntemler üzerinde değişiklikler yapılarak, daha fazla tekrarlama ve daha fazla özen gösterilerek aşılmıştır. Fenolik bileşiklerin bu tip sorunlara yol açtıkları bilinmektedir. *Onobrychis* türlerinin filogenetik ilişkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada korunga yapraklarının yüksek oranda tanen ve polifenol içermesinin, DNA ekstraksiyonu sırasında problemlere yol açtığı, DNA miktar ve kalitesini olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Carbonero, Carbonero, Smith ve Brown, 2012).

Mikrosatellit (SSR) belirteçleri kullanılarak yapmış olduğumuz analizlerde 8 adet SSR primeri (OVK036, OVK094, OVK125, OVM033, OVK161, OVK046, OVM061, OVK174) kullanılmıştır. Mikrosatellitlerin önemli bir özelliği yüksek oranda polimorfizm göstermeleridir. Mikrosatellitler temel olarak tüm populasyon içerisinde benzer özellikler göstermesine rağmen bireyden bireye küçük farklılıklar göstermektedirler (Hearne, Ghosh ve Todd, 1992). Yapmış olduğumuz çalışmada da primerlerin hepsi polimorfik olarak belirlenmiş olup, toplamda 93 adet allel tespit edilmiştir. Primer başına ortalama allel sayısı ise 11,625 olarak belirlenmiştir. Literatürde yapılmış olan çalışmalara bakıldığında Kempf vd. (2016) tarafından *Onobrychis* cinsi üzerinde yapılan çalışmada geliştirilen 400 adet SSR primerini kullanarak 29 aksesyona ait olan 32 bitki üzerinde çalışılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada

101 adet SSR primerinin yüksek oranda polimorfik olduğu, toplamda 1154 allel olduğu ve farklı kaynaklı bitkilerde farklılıklar gözlemlendiği belirtilmiştir. Locus başına ortalama allel sayısı ise 11,4 olarak hesaplanmıştır. Yine farklı bir çalışmada Avcı vd. (2014) tarafından Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanmış olan *Onobrychis* taksonların da genetik çeşitliliği incelemek amacıyla yürütülen çalışmada *M. truncatula* ve *P. vulgaris* türleri için geliştirilmiş olan 95 SSR primer çifti test edilmiş ve 18 adet SSR primeri başarılı bir şekilde amplifiye edilerek analizlerde kullanılmıştır. Kullanılan SSR primerlerinin hepsi polimorfik olarak belirlenmiş olup, 58 adet *Onobrychis* taksonunda 79 lokus toplam 725 allel tespit edilmiştir. Locus başına ortalama allel sayısı ise 9,18 olarak hesaplanmıştır. Özkan ve Bilgen (2019) tarafından ülkemizin tescilli korunga çeşitlerinden olan Özerbey ve Lütfübey'in, iki yerel popülasyon olan Kırşehir-1 ve Kırşehir-2'nin ve Pleven popülasyonlarının mikrosatellit yöntemini kullanarak genetik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan 10 SSR lokusunun tamamının polimorfik olduğu ve toplam 91 örnekte 68 allel belirlendiği belirtilmiştir. Locus başına düşen ortalama allel sayısı ise 6,8 olarak hesaplanmıştır. Sütçü (2019) tarafından yapılan çalışmada ise 83 *Onobrychis* hattının 10 SSR primeri kullanılarak genetik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bütün primerlerin polimorfik ve 10 SSR lokusuna ait toplam 92 allel olduğu saptanmıştır. Locus başına ortalama allel sayısı ise 9,2 olarak bildirilmiştir.

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında Shannon sabiti (I) en yüksek 0,380 ile OVK046 primerinde belirlenirken, en düşük 0,212 ile OVK174 primerinde belirlenmiştir. Ortalaması ise 0,301 olarak bulunmuştur. Avcı vd. (2014)'nin çalışmasında SSR analizleri sonucunda Shannon sabiti (I) değerlerinin 0,201 ile 0,536 arasında değiştiği belirtilmiştir. Nosrati vd. (2016), gerçekleştirdikleri ISSR analizleri sonucunda Shannon sabiti değerinin 0,185 ile 0,278 arasında olduğu bildirilmiştir. Yine yaptıkları başka bir çalışmada ise RAPD analizleri sonucunda Shannon sabiti değerinin 0,364 ile 0,462 arasında değiştiği belirtilmiştir (Nosrati vd., 2012). Özkan ve Bilgen (2019), SSR analizleri sonucunda Shannon sabiti (I) değerinin 0,251 ile 0,385 arasında değiştiği belirtilmiştir. Sütçü (2019) tarafından yapılan çalışmada Shannon sabiti değeri 0,210 ile 0,540 arasında değiştiği ve ortalamasının 0,375 olduğu bildirilmiştir.

Yapmış olduğumuz SSR analizleri sonucunda Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değerinin (uh) 0,125 ile 0,246 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Ortalaması ise 0,187 olarak bulunmuştur. Avcı vd. (2014), Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değerinin 0,096 ile

0,352 arasında değiştiğini belirtmiştir. Nosrati vd. (2016)' nin yaptığı ISSR analizleri sonucunda Nei'nin tarafsız genetik çeşitlilik değerinin 0,118 ile 1,179 arasında değiştiği belirtilmiştir. Yine yaptıkları farklı bir çalışmada ise RAPD analizleri sonucunda Nei'nin tarafsız genetik çeşitlilik değerinin 0,246 ile 0,318 arasında değiştiği belirtilmiştir (Nosrati vd., 2012). Rasouli vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada RAPD analizleri sonucunda 36 popülasyonun genetik çeşitlilik değerinin (uh) 0,08 ile 0,43 arasında değiştiği ve ortalama uh değerinin 0,25 olduğu belirtilmiştir. Özkan ve Bilgen (2019)'nin çalışmasında Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değerinin 0,17 ile 0,269 arasında değiştiği belirtilmiştir. Sütçü (2019)'nün gerçekleştirdiği çalışmada ise Nei'nin tarafsız genetik çeşitlilik değerinin 0,121 ile 0,367 arasında değiştiği, ortalamanın ise 0,243 olduğu bildirilmiştir.

UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) yöntemi ile sınıflandırılarak oluşturulmuş dendrograma bakıldığında çalışmada kullanılan genotiplerin 2 ana gruba ayrıldığı görölmektedir. Birinci ana grup 2 genotip (54-2 ve 11-1) hariç geri kalan tüm genotipleri kapsamaktadır. Bu iki genotipin ait olduğu aksesyonların diğer bireyleri ise birinci ana grup içerisinde dağılmışlardır. Birinci ana grup daha sonra 2 alt gruba ayrılmıştır. Dendrogram dikkatli bir şekilde incelendiğinde Sirjaev (1925)' e göre Hymenobrychis (Sisyrosemae alt cinsi) seksiyonu içerisinde yer alan türlere ait tüm genotiplerin (50-1, 50-2, 26-1, 26-2, 26-3, 60-1 ve 55-1) alt grupların birinde bir arada kümelendiği ve Eubrychis (Onobrychis) seksiyonu içerisinde yer alan diğer tüm genotiplerin ise dendrogram içerisinde her iki alt grup içerisinde dağılış gösterdiği görölmektedir. Buna ek olarak tümü diploid olan Hymenobrychis genotiplerinin aynı alt grup içerisinde Eubrychis seksiyonunun diploid genotipleri ile bir arada kümelendiği görölmektedir. Poliploidlerin ise bir grup oluşturmadığı ve karışık dağılım gösterdiği görölmektedir. On sekiz diploid genotipin oluşturduğu küme içerisinde aynı türe ait genotipler genel olarak bir arada bulunurken, küme içerisinde tetraploid ploidy seviyesine sahip olan 5 genotipte yer almaktadır. Ancak bu genotiplerden sadece bir tanesi 81-2 (PI 312940, *O. inermis*) kümenin içerisinde yer alırken, diğer 4 tetraploid genotip (90-3, 23-2, 97-1, 81-4), iki diploid genotip (94-1, 52-2) ile kümenin nispeten dış kenarında yer almaktadır.

Bu dört genotip *O.inermis* (PI 312940 (81-4)), *O.altissima* (PI 312909 (23-2)) türleri ve teşhisi yapılmamış *Onobrychis* (PI 225729 (90-3) ve PI 225730 (97-1)) taxonlarına aittir. Diploid genotiplerin oluşturduğu küme içerisinde yer almayan 57-2 kodlu (*O. petraea*, PI

312947) tek genotip ise bir kaç *O. inermis* ve *O. biebersteini* genotipi ile birlikte bir alt grup içerisinde yer almaktadır.

Dendrograma göre poliploid aksesyonlara ait genotipler genellikle bir arada olmayıp dendrogram içerisinde dağılışı göstermişlerdir. Farklı ploidi düzeyine sahip genotipler arasında genetik olarak bir birine en benzer genotipler tetraploid *O. inermis* türünün PI 312940 nolu aksesyonuna ait olan 81-2 kod nolu genotip ile diploid *O. kachetica* türünün PI 314469 nolu aksesyonuna ait olan 50-2 kod nolu genotiptir. İkinci en benzer genotipler ise *O. biebersteinii* türüne ait olan tetraploid aksesyonun (PI 227377) 44-3 numaralı genotipi ile *O. petraea* türüne ait olan diploid aksesyonun (PI 312947) 57-2 numaralı genotipidir. Daha sonrasında bu türleri takiben *O. altissima* türüne ait tetraploid olan aksesyonun (PI 312909) 23-2 numaralı bireyi ile *O. megataphros* türüne ait diploid olan aksesyonun (PI 301107) 52-2 numaralı bireyinin de birbirlerine yakın konumda oldukları dikkati çekmektedir.

Bunun sonucunda diploid olan *O. megataphros*, *O. kachetica* ve *O. petraea* türlerinin, tetraploid olan *O. altissima*, *O. inermis* ve *O. biebersteinii* türleri ile genetik olarak nispeten daha yakın oldukları söylenebilir.

Genetik olarak birbirine en yakın olan genotipler ise 31(26-2) ve 32 (26-3), 61(63-1) ve 62(63-2), 1(1-1) ve 2(1-2), 57(57-1) ve 59 (57-3) numaralı genotiplerdir. 61 ve 62 (*O. cyri* – PI 314468), 1 ve 2 (*O. arenaria* subsp. *arenaria* – PI 312954), 57 ve 59 (*O. petraea* – PI 312947) numaralı genotipler aynı türün aynı aksesyonuna ait olan bireylerdir. Genetik olarak birbirine yakın olan diğer genotipler 56(55-1) ve 67(78-1), 60(60-1) ve 31(26-2) ile 21(13-2) ve 22(13-3) numaralı genotiplerdir. 56 ve 67 (*O. pallasii*-W6 21877 ve *Onobrychis* spp-PI 464819) numaralı genotipler farklı türleri temsil eden aksesyonlara ait olan bireylerdir. 60 ve 31 (*O. vassilczenkoi*-PI 440574 ve *O. vassilczenkoi*-PI 300580) numaralı genotiplerin ise aynı türü temsil eden farklı aksesyonlara ait bireyler olduğu görülmektedir. 21 ve 22 (*O. cyri*-W6 17878) numaralı genotipler ise aynı türü temsil eden aynı aksesyona ait olan bireylerdir. Genetik olarak diğer genotiplere en uzak olan 2 birey ise 13(11-1) ve 54(54-2) numaralı genotiplerdir.

Korunganın kültür türü olan *O. viciifolia*'yı temsilen seçilen 6 aksesyona ait 6 farklı genotip'in dendrogramdaki dağılımına bakıldığında *O. viciifolia* genotiplerinin (95, 96, 97, 98, 99, 100) dendrogramın 1. ana grubunun altında oluşan iki alt gruba eşit olarak (3'er adet) ve birbirinden uzak olacak şekilde dağıldığı dikkati çekmektedir. *O. viciifolia* genotiplerin

diğer türlerle olan ilişkilerini değerlendirmek amacıyla dendogram incelendiğinde 97 numaralı (250024-*O. viciifolia*) genotipin 44-2 numaralı (PI 227377-*O. biebersteinii*) genotipe genetik olarak en yakın konumda olduğu gözlenmektedir. Daha sonrasında yine 99 numaralı (192994-*O. viciifolia*) genotipin 8-3 numaralı (PI 312945-*O. inermis*) genotipe genetik olarak yakın olduğu görülmektedir.

O. viciifolia türünün diğer türlerle olan ilişkilerine bakıldığında 100 numaralı (639688-*O. viciifolia*) genotipe genetik olarak en yakın olan genotipler, 86-2 (PI 312941-*O. inermis*), 70-1 (PI 440572-*O. inermis*), 13-1 (W6 17878-*O. cyri*) ve 11-4 (PI 312946-*O. petraea*) numaralı genotipler olurken aynı zamanda birbirlerine genetik olarak eşit uzaklıktadırlar. Yine aynı şekilde 96 numaralı genotipe en yakın olan genotipler (236486-1-*O. viciifolia*), 54-3 (PI 312945-*O. oxyodonta*) ve 6-3 (PI 31293-*O. inermis*) numaralı bireyler olmakla beraber birbirlerine uzaklıklarının aynı olduğu belirlenmiştir.

O. viciifolia türüne ait olan 98 numaralı genotipe en yakın olan bireyler (273784-*O. viciifolia*), 30-1 (PI 280259-*O. conferta* subsp. *argentea*) ve 12-2 (PI 316295-*O. petraea*) numaralı genotiplerdir ve birbirlerine genetik olarak uzaklıkları eşittir. Yine 95 numaralı (205200-2-*O. viciifolia*) genotip, 82-1 (PI 312936-*O. inermis*), 47-3 (PI 297923-*O. grandis*) ve 11-3 (PI 312946-*O. petraea*) numaralı genotipler ile genetik olarak birbirine yakındır. Genel olarak bakıldığında kültür türü olan *O. viciifolia* türüne yakın olan türlerin, (*O. biebersteinii*, *O. inermis*, *O. cyri*, *O. petraea*, *O. oxyodonta*, *O. conferta* subsp. *argentea* ve *O. grandis* olduğu görülmektedir.

Korunga, kıraç şarlarda yetiştirmeye uygun olması, yüksek yem verim ve kalitesine sahip olması, toprağı besin maddelerince zenginleştirmesi ve ıslah etmesi, ve arılar için bal özü kaynağı olmasıyla ülkemiz için son derece önemli fakat bu güne kadar yeteri kadar ilgi görmemiş bir yem bitkisidir. Bu nedenle korunga üzerinde yapılan genetik ve ıslah çalışmalarına hız verilerek tarımsal özellikleri iyileştirilmeli ve daha geniş alanlarda yetiştirilmesi sağlanmalıdır.

Yapmış olduğumuz çalışmada *Onobrychis* cinsine ait bazı gen bankası aksesyonlarının flow sitometri yöntemini kullanarak 2C çekirdek DNA içerikleri ve ploidy seviyeleri belirlenmiş ve flow sitometri yönteminin bu analizlerde pratik ve güvenilir bir şekilde kullanılabileceği saptanmıştır.

Buna ek olarak çalışmamızda korunga için özel olarak tasarlanmış SSR belirteçleri kullanarak cins içerisindeki genetik çeşitlilik ve filogenetik ilişkiler incelenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçların korunga üzerinde yapılacak olan çalışmalara katkı sağlamasını diliyoruz.



KAYNAKLAR

- Abou-El-Enain, M. M., (2002). Chromosomal criteria and their phylogenetic implications in the genus *Onobrychis* Mill. sect. *Lophobrychis* (Leguminosae), with special reference to Egyptian species. *Botanical Journal of The Linnean Society. Cytologia*, 63, 1– 8.
- Açıkgöz, E., (1991). Yem bitkileri. *Uludağ Üniversitesi Basımevi*, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. Yayın No: 7/025, Bursa.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A., (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017; 37(2): 163-176.
- Akins, P.O., Jarret, R.L., (1994). Nuclear DNA Content and Ploidy Levels in the Genus *Ipomoea*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119(1), 110-115.
- Aktoklu, E., (1995). *Türkiye’de yetişen Onobrychis miller. (Fabaceae) Türlerinin Revizyonu* (Doktora Tezi), İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Altın, M., (1982). Bazı yem bitkileri ile bunların karışımlarının değişik ekim şekillerindeki kuru ot ve ham protein verimleri, türlerin ham protein oranları ve karışımlarının botanik kompozisyonları, 1. kuru ot ve ham protein verileri. *Doğa Dergisi*, 6(2), 93-107.
- Altın, M., Tuna, C., (1996, Haziran 17-19). *Tekirdağ koşullarında farklı sıra aralığı ve ocağa ekilen korunganın kuru ot ve tohum verimleri ile otunun ham protein ve ham kül oranları*. Türkiye 3. Çayır Mera ve Yem Bitkileri Kongresi, Erzurum.
- Andiç, N., Günel, E., (1996, Haziran 17-19). *A study on the effects of different row space and phosphor fertilization on the hay, seed, and crude protein yield of sanfain (Onobrychis sativa L.) growing in unirrigated conditions in Van*. Türkiye 3. Çayır Mera ve Yem Bitkileri Kongresi, Erzurum.
- Areshchenkova, T., Ganai, M. W., (1999). Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions. *Genome*, 42(3), 536-544.
- Arumuganathan, K., Tallury, S. P., Fraser, M. L., Bruneau, A. H., Qu, R., (1999). Nuclear dna content of thirteen turfgrass species by flow cytometry. *Crop Science*, 39(5), 1518-1521.
- Avcı, S., İlhan, E., Erayman, M. ve 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.
- Avcıoğlu, R., Hatipoğlu, R., Karadağ, Y., (2009). *Yem Bitkileri* (2.Cilt). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, İzmir.

- Awoleye, F., Van Duren, M., Dolezel, J., Novak, F. J., (1994). Nuclear dna content and in vitro induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* crantz) breeding. *Euphytica*, 76, 195-202.
- Ayele, M., Dolezel, J., Van Duren, M., Brunner, H., Zapata-Arias, F. J., (1996). Flow cytometric analysis of nuclear genome of the Ethiopian cereal tef [*Eragrostis tef* (zucc.) trotter]. *Genetica*, 98, 211-215.
- Bennett, M. D., Leitch, I. J., (1995). Nuclear dna amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, 76, 113-176.
- Bhattarai, S., (2017). *Characterization of diverse germplasm of sainfoin (onobrychis viciifolia scop.) using agro-morphological traits and aflp molecular markers* (Master's Thesis), University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.
- Boissier, P. E., (1872). *Flora Orientalis*. Rue de Lyon; France.
- Brummer, E. C., Cazcarro, P. M., Luth, D. (1999). Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. *Crop Science*, 39(4), 1202-1207.
- Büyükburç, U., Açıkgöz, E., Ekiz, H. ve Karagüllü, N. (1991). Değişik kökenli kültür ve yabani korunga türlerinin tarımsal özellikleri üzerinde araştırmalar. *Türk Tarım ve Orman Bilimleri Dergisi*, 15, 35-45.
- Carbonero, C. H., (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 Kindom.
- Carbonero, C. H., Harvey, I. M., Brown, T. A. ve Smith, L., (2011). Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): a beneficial forage legume. *Plant Genetic Resources*, 9(1), 70-85.
- Carbonero, C. H., Carbonero, F., Smith, L. M. J., Brown, T. A., (2012). Phylogenetic characterisation of *Onobrychis* species with special focus on the forage crop *Onobrychis viciifolia* scop. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 1777-1788.
- Carlton, A. E., Cooper, C. S., Delaney, R. H., Dubbs, A. L. and Eslick, R. F., (1968). Growth and forage quality comparisons of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* scop.) and alfalfa (*Medicago sativa* l.). *Agronomy Journal*, 60(6), 630-32.
- Chase, M., Kesseli, R., Bawa, K., (1996). Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *Botany*, 83(1), 51-57.
- Conrad, H. R., Klopfenstein, T. J., (1988). Role in livestock feeding – greenchop, silage, hay and dehy. *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, 29. doi.org/10.2134/agronmonogr29.c17

- Cooper, C. S., (1977). Growth of The Legume Seedling. *Advances in Agronomy*, 29, 119-139.
- Demdoun, S., Muñoz, F., Delgado, I., Valderrábano, J. ve Wünsch, A. (2012). EST-SSR cross-amplification and genetic similarity in *Onobrychis* genus. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(2), 253-260.
- Devey, M. E., Bell, J. C., Smith, D. N., Neale, D. B., Morgan, G. F. (1996). A genetic linkage map of *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 673-679.
- Ditterline, R. L. and Cooper, C. S. (1975). Fifteen years with sainfoin. *Montana Agricultural Experiment Station Publications*, 681. Montana State University, Bozeman, Montana.
- Doyle, J. J. ve Doyle, J. I. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 13-15.
- Echt, C. S., May-Marquardt, P., Hsieh, M., Zahorchak, R. (1996). Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, 39(6), 1102-1108.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: Simple Sequences With Complex Evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, 435-445.
- Fortune, J. A. (1985). *A Study of Growth and Management of Sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.)* (Doctor of Philosophy Thesis), Massey University, New Zealand.
- Fulwyler, M. J., (1965). Electronic Separation of Biological Cells by Volume. *Science*, 150 (3698), 910-911.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., Firoozabady, E., (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220, (4601), 1049-1051.
- Gökkuş, A., Koç, A. (1993). Mera ekosistemlerinde azot döngüsü. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 6, 3-9.
- Gülşen, O., Sever Mutlu, S., Mutlu, N., Tuna, M., Karagüzel, O., Shearman, R. C., Riordan, T. P., Heng Moss, T. M., (2009). Polyploidy creates higher diversity among *Cynodon* accessions as assessed by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 1309-1319.
- Halitgil, M. B., Erkovan, H. İ., Serin, Y., Tan, M., Kışlal, H. (2007, Haziran 25-27). *Bazı baklagil-buğdaygil yem bitkileri karışımlarında azot transferi, azot kullanım etkinliği ve gübrenin paylaşımı*. Türkiye 7. Tarla Bitkileri Kongresi, Erzurum.

- Hamada, H., Petrino, M. G. and Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 19, 6465-6469.
- Hanna, M. R., Cooke, D.A., Smoliak, S., and Goplen, B. P. (1972). Sainfoin for western Canada. *Canada Department of Agriculture Publication*, 1470.
- Hanna, M. R., Kozub, G. C. and Smoliak, S. (1977). Forage production of sainfoin and alfalfa on dryland in mixed and alternaterow seedings with three grasses. *Canadian Journal of Plant Science*, 57(1), 61-70.
- Hao, Y. J., You, C. X., Deng, X. X., (2002). Cell size as a morfological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus. *Plant Cell Reports*, 20, 1123-1127.
- Hearne, C. M., Ghosh, S., and Todd, J. A. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Review*, 8(8), 288-294.
- Heckendorn, F., Haring, D. A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H. (2007). Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology*, 146(1-2), 123-134.
- Hedge, I. C., (1970). *Onobrychis* in Davis PH (ed). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 3, 560-589.
- Hesamzadeh Hejazi, S. M., Nasab, M. Z., (2010). Cytotaxonomy of some *Onobrychis* (Fabaceca) species and populations in Iran. *Caryologia*, 63, 18-31.
- Heslop-Harrison, J. S., (1995). Flow cytometry and genome analysis. *Probe*, 5, 14-17.
- Innan, H., Terauchi, R., Miyashita, N. T., (1997). Microsatellite polymorphism in natural populations of the wild plant *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 146(4), 1441-1452.
- Jensen, E. H., Sharp, M. E., (1968, December 12-13). *Agronomic evaluation of sainfoin in Nevada*. Sainfoin Symposium at Montana State University, ABD.
- Karp, A., (1991). Cytological techniques. *Plant Tissue Culture Manual*, C4, 1-13.
- Kamensky, L. A., Melamed, M. R. and Derman, H. (1965). New instrument for ultrarapid cell analysis. *Science*, 150, 630.
- Kamensky, L. A. and Melamed, M. R. (1967). Spectrophotometric cell sorter. *Science*, 156, 1364-1365. (doi:10.1126/ science.156.3780.1364).

- Kawara, S., Takata, M., Takehara, K., (1999). High frequency of DNA aneuploidy detected by dna flow cytometry in Bowen's disease. *Journal of Dermatological Science*, 21(1), 23-26
- Kempf, K., Mora-Ortiz, M., Smith, M. J., Kölliker, R. ve Skot, L. (2016). Characterization of novel SSR markers in diverse sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) germplasm. *BMC Genetics*, 17(1), 124.
- Khasa, P. D., Newton, C. H., Rahman, M. H., Jaquish, B., and Dancik, B. P., (2000). Isolation, characterizaton, and inheritance of microsatellite loci in alpine larch and western larch. *Genome*, 43(3), 439-448.
- Knipe, W. J. and Carlton, A. E., (1972). Estimates of the percentage of self and cross-pollination in sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.). *Crop Science*, 12, 520-522.
- Kula, A. B., Dudizak, E., Sliwinska, E., Grabowska-Joachimik, A., Stewart, H., Golczyk, and Joachimik, A. J., (2006). Cytomorphological studies on American and European *Phleum commutatum* Gaud. (Poaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48(1), 99-108.
- Lance, R. (1980). Breeding lucernes that resist aphids. *Rural Research*, 106, 22-27.
- Langella, O. (2000). Populations 1.2.23: Population genetic software. *Department of populations, genetics and evolution*, CNRS, France
- Levinson, G., Gutman, G. A., (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4(3), 203–221.
- Litt, M., Luty, J. A., (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal Human Genetics*, 44(3), 397-401,
- 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., Hanafey, M., Powell, W., (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature genetics*, 30, 194-200.
- Nei, M. (1987). Molecular evalutionary genetics. Columbia University Press, New York. 512 pp.
- Nelson, C. J. and Moser, L. E. (1995). Morphology and systematics. In An introduction to grassland agriculture. Edited by Barns RF, Miller DA, Nelson CJ. Ames, IA, USA: Iowa State University Press, 15–30.

- Nosrati, H., Feizi, M. A. H., Tarrah, S. S., Haghighi, A. R. (2012). Population genetic variation in sainfoin (*Fabaceae*) revealed by RAPD markers. *1*, 11-16.
- Nosrati, H., Feizi, M. A. H., Latifian, F., Haghighi, A. R. (2016). Eco-geographical variations of ISSRs among populations of *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin, *Fabaceae*). *Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie*, *2*, 62-66.
- Ohri, D. (1998). Genome size variation and plant systematics. *Annals of Botany*, *82*, 750-812.
- Özbek, H., (1989). Tahıl, sebze, yem ve endüstri bitki zararlıları. Fen Edebiyat Fakültesi Ofset Tesisleri., Erzurum.
- Özbek, H. (2011). Korunga (*Onobrychis viciifolia* scop.): Önemli bir arı bitkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, *11(2)*, 51-62.
- Özer, M., Duran, M., (1968). Orta Anadolu'da yonca ve korungalara zarar yapan bazı böcek türleri üzerinde ilk çalışmalar. *A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları*, *316*, 35-38.
- Özkan, S. (2017). *Bazı Korunga (Onobrychis Viciifolia scop.) çeşit ve genetik popülasyonlarında mikrosatellit belirteçleri kullanılarak genetik çeşitliliğin belirlenmesi* (Yüksek Lisans tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Özkan, S. ve Bilgen, B. B. (2019). Bazı korunga (*Onobrychis viciifolia*) çeşit ve popülasyonlarının mikrosatellit belirteçleri kullanılarak genetik karakterizasyonu. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, *16(1)*, 45-54.
- Page, R. D. (1996). Tree View: An application to display phylogenetics trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, *12*, 357-358.
- Peakall, R., Smouse, P. E. (2006). GenAlex 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. *Molecular Ecology Notes*, *6*, 288-295.
- Pecinka, A. P., Suchankova, M. A., Lysak, B., Travnicek, B. and Dolezel, J. (2006). Nuclear DNA content variation among Central European *Koeleria* Taxa. *Annals of Botany*, *98*, 117-122.
- Price, H. J., Hodnet, G., Johnston, J. S., (2000). Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Annals of Botany*, *86*, 929-934.
- Puite, K. J., Ten Broeke, W. R. R., (1983). DNA staining of fixed and non-fixed plant protoplast for flow cytometry with hoechst 33342. *Plant Science Letters*, *32(1-2)*, 79-88.

- Rafalski, J. A., Tingey, S. V., (1993). Genetic diagnostics in plant breeding; RAPDs, microsatellites and machines. *Reviews*, 9(8), 275-280.
- Ramulu, K. S., Dijkhuis, P., (1986). Flow cytometric analysis of polysomaty and in vitro genetic instability in potato. *Plant Cell Reports* , 5, 234–237.
- Rasouli, M., Jaferi, A. A., Tabaei-Aghdaei, S. R., Shanjani, P. S., 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.
- Rayburn, A. L., Auger, J. A., Benzinger, E. A., Hepburn, A. G. (1989). Detection of intraspecific variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. *Journal of Experimental Botany*, 40, 1179-1183.
- Rees, H., Walters, M. R., (1965). Nuclear DNA and the evolution of wheat. *Heredity*, 20, 73-82.
- 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.
- Savaş Tuna, G., Keleş, H., Göçmen, D., Güteryüz, V., Nizam, İ., Cabi, E., Yazıcı, A., Çakal, Ş., Tuna, M. (2016). Flow sitometri ile çok yıllık buğdaygil yem bitkisi genetik kaynaklarının karakterizasyonu. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25, (Özel sayı-2), 7-12.
- Schuelke, M. (2000). An economic method fort he fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 233-234.
- Serin, Y., Gökkuş, A., Tan, M., Koç, A., Çomaklı, B., (1998). Sun’i çayır tesisinde kullanılabilecek uygun yembitkileri ve karışımlarının belirlenmesi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22, 13-20.
- Serin, Y., Tan, M., (2009). Buğdaygil yem bitkilerinin tarımsal özellikleri, ekonomik önemleri, taksonimleri ve genel yapısal özellikleri. *Yem Bitkileri (Cilt 3) Tarım ve Köyişleri Bakanlığı*, Emre Basımevi, 546-549.
- Shapiro, H. M., (1985). Practical flow cytometry. Alan R. Liss, New York.
- Sheehy, JE., Minchin, FR. and McNeil, A. (1984, February 21-23). *Physiological principles governing the growth and development of lucerne, sainfoin and red clover*. In Forage Legumes. Proceedings of a Symposium, British Grassland Society, pp. 113–125.
- Şirjaev, G. (1925). *Onobrychis* generis revisio criteria. *Publications of the Faculty of Science, University of Masaryk*, 56, 96–97.

- Smarda, P. P., Bures, L., Horova, B., Foggi, B. and Graziano, R. (2008). Genome size and GC content evolution of festuca: ancestral expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany*, 101, 421–433.
- Spedding, C. R. W. and Diekmahns, E. C. (1972). Grasses and legumes in British agriculture. *Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham*, 49, 404-413.
- Stallings, R. L., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E., and Moyzis, R. K. (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 10, 807- 815.
- Stebler, F. G. and Schroter, C. (1889). The best forage plants. English translation: McAlpine, A. N. David Nutt, London, 20-30.
- Sütçü, T., (2019). *Bazı korunga hatlarının mikrosatellit (SSR) belirteçleri ile genetik karakterizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Şahin, B. (2019). *Flow sitometri ile korunga gen bankası aksesyonlarının çekirdek dna içeriği ve ploidi düzeylerinin belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Tan, M., Serin, Y., Yolcu, H. (1997). Erzurum şartlarında yoncadan ot ve tohum alma imkanları üzerine bir araştırma. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(5), 729-739.
- 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.
- Tarman, Ö. (1972). Yem bitkileri, çayır ve mera kültürü. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 464, Ders Kitabı: 157, Cilt 1 (Genel Esaslar), Ankara.
- Tautz, D., (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17(16), 6463-6471.
- Toluei, Z., Atri, M., Ranjbar, M., Wink, M. (2013). Iranian *Onobrychis carduchorum* (Fabaceae) populations: morphology, ecology and phylogeography. *Plant Ecology and Evolution*, 146(1), 53-67.

- Tosun, F. (1971). The effects of time, depth and rate of seeding upon number of seedlings, plant height and forage yield of sainfoin. *Atatürk Üniversitesi Yayınları* No. 115, Ziraat Fakültesi Yayınları No.53, Araştırma Serisi No. 29, A. Ü.Basımevi. Erzurum, 47 pp.
- Tosun, F., (1974). Baklagil ve Buğdaygil Yembitkileri Kültürü, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 242, Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 123, Ders Kitapları Seri No: 8, Erzurum, 300.
- Tosun, M., (1989). Değişik fosfor dozları ve biçim uygulamalarının korunga (*Onobrychis viciaefolia* scop.)’da tohum verimi ve bazı karakterlere etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26 (2), İzmir.
- 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.
- Tuna, M., Vogel, K. P., Arumuganathan, K., Gill, K. S. (2001). DNA content and ploidy determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry. *Crop Science*, 41, 1629-1634.
- Tuna, M., Khandka, D. K., Golan Goldhirsh, A., Arumuganathan, A., Shresta, M., (2004). Characterization of *Dactylis* populations collected from natural ranges of Thrace Region of Turkey based on ploidy and RAPD analysis. *Euphytica*, 135, 39-46.
- Tuna, M., Vogel, K. P., Arumuganathan, K. (2005). Genome size and Giemsa C-banded karyotype of tetraploid *Bromus ciliatus* L. *Euphytica*, 146, 177-182.
- Tuna, M., Vogel, K. P., Arumuganathan, K. (2006). Cytogenetic and nuclear DNA content characterization of diploid *Bromus erectus* and *Bromus variegatus*. *Crop Breeding, Genetics & Cytology*, 46(2), 637-641.
- Tuna, M. (2014). Flow sitometri ve tarımsal araştırmalarda kullanımı. *II. Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda kullanımı Eğitim Programı*. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Tuna, M., Yılmaz, E. C., Ulutaş, N., Şahin, B., Nizam, İ., Yücel, G., Cabi, E., Savaş Tuna, G., Çakal, S., Sever Mutlu, S. (2018, August 12-16). *Identification of fine leaved fescues collected from Eastern Anatolia of Turkey using flow cytometer*. XXX. International Horticulture Congress, Istanbul, Turkey.

- Van Duren, M., Morpurgo, R., Dolezel, J., Afra, R., (1996). Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. *Euphytica*, 88, 25–34.
- Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C., (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), 167-190.
- Weber, J. L., May, P. E. (1989). Abundant class of human dna polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics*, 44, 388-396.
- White, E., Sahota, R., Edes, S., (2002). Rapid microsatellite analysis using discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis. *Genome*, 45(6), 1107-1109.
- Yurtsever, Z. (2016). *Kanser Hücresi Oluşumu Üzerine Hidrojen Sülfid Açığa Çıkaran Ajanların Etkisinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi), Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Yücel, G. (2019). *Kültürü yapılan korunga (Onobrychis Mill, Baklagiller) taksonları ve bazı yabancı akrabaların moleküler sitogenetik yöntemler ile karakterizasyonu* (Doktora Tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ, Türkiye.
- Yüksek, T., Yüksek, F., (2007, Haziran 25-27). *Artvin Yusufeli Yöresinde Korunganın Toprak Koruma Yeteneğinin Belirlenmesi*. Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, Erzurum, Bildiriler 2 Çayır Mera Yem Bitkileri ve Endüstri Bitkileri, 143-147.
- Zarrabian, M., Majidi, M. M., Ehtemam, M. H. (2013). Genetic diversity in a worldwide collection of sainfoin using morphological, anatomical, and molecular markers. *Crop Science*, 53, 2483-2496.
- Zarrabian, M., Majidi, M. M. (2015). Genetic diversity and relationships within and among *onobrychis* species using molecular markers. *Turkish Journal of Botany*, 39, 681-692.
- Zemenchik, R. A., Albrecht, K. A., Shaver, R. D., (2002). Improved nutritive value of kura clover-and birdsfoot trefoil-grass mixtures compared with grass monocultures. *Agronomy Journal*, 94, 1131-1138.
- Ziegenhagen, B., Scholz, F., Madaghiele, A. and Vendramin, G. G. (1998). Chloroplast microsatellites as markers for paternity analysis in *Abies alba*. *Canadian Journal of Forest Research*, 28(2), 317-321.
- Zonneveld, B. J. M., Van Iren, F., (2001). genome size and pollen viability as taxonomic criteria; application to the genus *hosta*. *Plant Biology*, 3(2), 176-185.

ÖZGEÇMİŞ

Bu tezi hazırlayan Elbi Cansu YILMAZ, 10/03/1993 yılında İzmir’de doğdu. Lise eğitimini 2007-2011 yılları arasında Balçova Nevvar ve Salih İşgören Lisesi’nde aldı. Önlisans eğitimini 2011-2013 yılları arasında Ege Üniversitesi Ege MYO Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi Bölümü’nde tamamladı. Lisans eğitimini 2013-2017 yılları arasında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü’nde tamamladı. Aynı sene, yine Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı.

