



**FLOW SİTOMETRİ İLE
KORUNGA GEN BANKASI AKSESYONLARININ
ÇEKİRDEK DNA İÇERİĞİ VE
PLOİDİ DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

Buket ŞAHİN

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

2019

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FLOW SİTOMETRİ İLE KORUNGA GEN BANKASI AKSESYONLARININ
ÇEKİRDEK DNA İÇERİĞİ VE PLOİDİ DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Buket ŞAHİN

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Metin TUNA

TEKİRDAĞ-2019

Her hakkı saklıdır.

Prof. Dr. Metin TUNA danışmanlığında, Buket ŞAHİN tarafından hazırlanan “Flow Sitometri İle Korunga Gen Bankası Aksesyonlarının Çekirdek DNA İçeriği Ve Ploidi Düzeylerinin Belirlenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Metin TUNA

İmza :

Üye

Prof. Dr. Yalçın KAYA

İmza :

Üye

Doç. Dr. Ertan ATEŞ

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FLOW SİTOMETRİ İLE KORUNGA GEN BANKASI AKSESİYONLARININ ÇEKİRDEK DNA İÇERİĞİ VE PLOİDİ DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Buket ŞAHİN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Metin TUNA

Bu yüksek lisans tezinde amaç, Western Regional Plant Introduction Station, Washington, ABD' den temin edilmiş olan toplam 210 korunga (88 *Onobrychis viciifolia*, 97 *Onobrychis transcaucasica* ve 23 *Onobrychis arenaria*) aksesyonunun çekirdek DNA içeriklerini flow sitometri ile ilk defa belirlemek ve elde edilen çekirdek DNA bilgisinden yararlanarak aksesyonların ploidi düzeyleri ile varsa aksesyonlarda tür ve varyete karışıklıklarını saptamaktır. Çalışmada örnekler genç ve sağlıklı bitkilerden alınan taze yaprak dokuları, floresan boya olarak propidium iodide ve internal standard olarak *Vicia sativa* (cv. nülifer) kullanılarak hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre araştırmada kullanılan *Onobrychis viciifolia* aksesyonlarının ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 2.64 pg (2.49pg-2.78 pg); *Onobrychis transcaucasica* aksesyonlarının ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 2.65 pg (2.53pg- 2.77pg); *Onobrychis arenaria* aksesyonlarının ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 2.63 pg (2.52 pg-2.75 pg) olarak belirlenmiştir. Türlerin ortalama 2C DNA içerikleri birbirine benzer bulunmuştur. Tür içerisinde yer alan aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri arasındaki farklılıklar ise istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Aksesyonların çekirdek DNA içerikleri ile ploidi düzeylerini ilişkilendirmek amacıyla kromozomları sayılan tüm genotiplerin $2n=4x=28$ kromozom sayısına sahip oldukları belirlenmiştir. Bundan dolayı çalışmada incelenen korunga koleksiyonu içerisinde yer alan tüm aksesyonların tetraploid oldukları kabul edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Korunga *Onobrychis spp.* , Çekirdek DNA İçeriği, Flow Sitometri

2019, 72 sayfa

ABSTRACT

DETERMINATION OF NUCLEAR DNA CONTENT AND PLOIDY OF SAINFOIN ACCESSIONS BY FLOW CYTOMETER

MSc. Thesis

Buket SAHİN

Tekirdag Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Metin TUNA

The objective of this study is to determine nuclear DNA content of 210 sainfoin (88 *Onobrychis viciifolia*, 97 *Onobrychis transcaucasica* and 23 *Onobrychis arenaria*) accessions obtained from Western Regional Plant Introduction Station, Washington, USA by flow cytometer and use the information to determine ploidy and purity of the accessions. Based on the results of the study, it is determined that the mean 2C nuclear DNA content of the *O. viciifolia* accessions is 2.64 pg (2.49 pg -2.78 pg), the mean 2C nuclear DNA content of the *O. transcaucasica* accessions is 2.65 pg (2.53 pg -2.77 pg), the mean 2C nuclear DNA content of the *O. arenaria* accessions is 2.63 pg (2.52 pg -2.75 pg). The mean 2C DNA contents of species were very similar. However, the mean 2C nuclear DNA content of accessions within the species were statistically different. Chromosomes of the some plants were counted by microscope in order to correlate 2C DNA contents of the accessions with their ploidy levels and it was found out that all the plants used in cytological investigations had $2n = 4x = 28$ chromosomes. Therefore, it was accepted that all the accessions in the sainfoin collection screened in this study by flow cytometer had $2n = 4x = 28$ chromosomes indicating they were tetraploid.

Keywords: Sainfoin, *Onobrychis spp.*, Nuclear DNA Content, Flow Cytometer, Ploidy

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
ÖNSÖZ	vi
1.GİRİŞ.....	1
2.KURAMSAL TEMELLER	3
2.1.Korunga	3
2.1.1.Terminoloji	4
2.1.2. Morfoloji.....	4
2.1.2.1. Yaygın Korunga (<i>Onobrychis sativa</i> Lam. Syn.: <i>O. viciifolia</i> Scop.).....	7
2.1.2.2. Anadolu Korungası (<i>Onobrychis arenaria</i> Kit. Ex. Wild. D.C.).....	8
2.1.2.3. Kafkas Korungası (<i>Onobrychis transcaucasica</i> Gross H.)	9
2.1.3. Yetiştiricilik	10
2.1.4. Vejetatif Üretim	11
2.1.5. Çiçek ve Tohum Gelişimi	12
2.1.6. Kültürel Özellikler.....	14
2.1.6.1. Adaptasyon	14
2.1.6.2. Korunganın Tesisi.....	15
2.1.6.3. Yabancı Ot Kontrolü.....	16
2.1.6.4. Gübreleme	17
2.1.6.5. Hastalıklar ve Zararlılar.....	17
2.1.6.6. Karışımlar	18
2.1.7. Korunganın Genetiği ve Islahı.....	19
2. 2. Flow Sitometri	21
2.2.1. Tanımı	21
2.2.2. Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı	22
3. MATERYAL VE METOD	26
3. 1. Bitki Materyal.....	26
3.2. Yöntem	35

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	35
3.2.2. Flow Sitometri ile Çekirdek DNA Analizi (pg).....	35
3.2.3. Flow Sitometri ile Korunga Çekirdek DNA İçeriğinin Ölçülmesi ve Mutlak Değerin Hesaplanması.....	39
3.2.4. İstatistiksel Analiz	41
3.2.5. Çekirdek DNA içeriği ile ploidi düzeyinin ilişkilendirilmesi.....	41
3.2.4.1. Bitki kök uçlarının eldesi.....	41
3.2.4.2. İlk işlem	41
3.2.4.3. Materyalin tespiti.....	41
3.2.4.4. Kök uçlarının selülaz enzimleri ile muamele edilmesi ve preparatların hazırlanması	41
3.2.4.5. DAPI ile mitoz kromozomların boyanması.....	42
3.2.4.6. Fotoğraf çekimi	42
4. BULGULAR	43
4.1. Çekirdek DNA Analizi.....	43
4.1.1. <i>Onobrychis viciifolia</i>	43
4.1.2. <i>Onobrychis transcaucasica</i>	49
4.1.3. <i>Onobrychis arenaria</i>	55
4.2. Çekirdek DNA İçeriği ile Ploidi Düzeyinin İlişkilendirilmesi	59
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ	63
7. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	72

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1: Araştırmada Kullanılan <i>Onobrychis viciifolia</i> , <i>Onobrychis transcaucasica</i> ve <i>Onobrychis arenaria</i> Aksesyonlarının Aksesyon Numaraları ve Orijinleri.....	26
Çizelge 4.1: <i>Onobrychis viciifolia</i> Aksesyonlarının Piko Gram Olarak Ortalama 2C Çekirdek DNA İçerikleri.....	43
Çizelge 4.2: <i>Onobrychis transcaucasica</i> Aksesyonlarının Piko Gram Olarak Ortalama 2C Çekirdek DNA İçerikleri	49
Çizelge 4.3: <i>Onobrychis arenaria</i> Aksesyonlarının Piko Gram Olarak Ortalama 2C Çekirdek DNA İçerikleri.....	56

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Türkiye’deki Korunga Cinsine Ait Alt Cinsler ve Taksonları (Aktoklu 1995)	5
Şekil 2.2: <i>Onobrychis viciifolia</i>	7
Şekil 2.3: <i>Onobrychis transcaucasica</i>	8
Şekil 2.4: <i>Onobrychis arenaria</i>	9
Şekil 2.5: Yalın Ekilmiş Bir Korunga Tarlasının Görünümü.....	11
Şekil 2.6: Korunga Çiçeği (solda) ve Çiçeğin Tohum Bağlamış Hali (sağda)	13
Şekil 3.1: Bitkilerin Deneme Alanındaki Görünüşleri.....	35
Şekil 3.2: Korunga ve Standart Olarak Kullanılan Fiğ Bitkilerine Ait Yaprak Dokularının Petri Kabı İçerisindeki Görünüşü	36
Şekil 3.3: Yaprak Dokuları Kullanılarak Örneğin Flow Sitometrik Analiz İçin Hazırlanması	37
Şekil 3.4: Örneklerin Boyanması ve Karanlıkta İnkübe Edilmesi	38
Şekil 3.5: Flow Sitometri Cihazındaki Histogram Görüntüsü	39
Şekil 3.6: Flow Histogramın Flow Max Programı İle Analiz Edilmesi Sonrasındaki Görünüşü .	40
Şekil 4.1: Şekil 14. Scatterplot Matrix Dağılımına Göre <i>Onobrychis viciifolia</i> Aksesyonlarının Ortalama Çekirdek DNA İçeriği Dağılımı	47
Şekil 4.2: <i>Onobrychis viciifolia</i> (solda) ve Standart Olarak Kullanılan <i>Vicia sativa</i> (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Bir Birine Göre Pozisyonları	48
Şekil 4.3: <i>Onobrychis viciifolia</i> (solda) ve Standart Olarak Kullanılan <i>Vicia sativa</i> (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Flow Sitometri Paket Programı Tanımlanmış Hali	48
Şekil 4.4: Scatterplot Matrix Dağılımına Göre <i>Onobrychis transcaucasica</i> Aksesyonlarının Ortalama Çekirdek DNA İçeriği Dağılımı	54
Şekil 4.5: <i>Onobrychis transcaucasica</i> (solda) ve Standart Olarak Kullanılan <i>Vicia sativa</i> (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Bir Birine Göre Pozisyonları	55
Şekil 4.6: <i>Onobrychis transcaucasica</i> (solda) ve Standart Olarak Kullanılan <i>Vicia sativa</i> (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Flow Sitometri Paket Programı Tanımlanmış Hali	55
Şekil 4.7: Scatterplot Matrix Dağılımına Göre <i>Onobrychis arenaria</i> Aksesyonlarının Ortalama Çekirdek DNA içeriği Dağılımı	57
Şekil 4.8: <i>Onobrychis arenaria</i> ve Standart Olarak Kullanılan <i>Vicia sativa</i> Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Bir Birine Göre Pozisyonları.....	58
Şekil 4.9: <i>Onobrychis arenaria</i> (solda) ve Standart Olarak Kullanılan <i>Vicia sativa</i> (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Flow Sitometri Paket Programı Tanımlanmış Hali	58
Şekil 4.10: Tetraploid Korunga (<i>O.viciifolia</i>) Mitotik Kromozomlarının Görünüşü	59

ÖNSÖZ

Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bölümümüzde TÜBİTAK desteği ile yürütülen ve tez danışmanım Prof. Dr. Metin Tuna' nın yürütücüsü olduğu 2150526 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 projesinin bir iş paketi olan 'Flow Sitometri İle Korunga Gen Bankası Aksesyonlarının Çekirdek DNA İçeriği ve Ploidi Düzeylerini Belirlenmesi' tarafıma tez konusu olarak verilmiştir. Çalışmada flow sitometri ile cinsin değişik ülkelerde tarımı yapılan 3 türüne ait toplam 210 aksesyonun DNA içerikleri ve ploidi düzeyleri ilk defa belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçların korunga genetiği ve ıslahında çalışan araştırmacılara yararlı olacağını umuyoruz.

Çalışmalarım sırasında büyük ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve görüşlerinden yararlandığım tez danışmanım, çok değerli hocam Prof. Dr. Metin TUNA'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında bütün imkân ve bilgilerini benden esirgemeyen hocam Dr. Gülsemin SAVAŞ TUNA'ya, çalışmalarım sırasında bilgilerini benimle paylaşan, önerileri ile beni yönlendiren, büyük yardımı olan Öğr. Gör. Alp DEMİRKAN'a teşekkür ederim. Çalışmamın özellikle sitolojik kısmındaki yardımlarından dolayı arkadaşım Dr. Gülru YÜCEL'e teşekkür ederim. İstatistik analizlerinin yapılması ve değerlendirilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Yahya TUNA' ya ve Feyyaz AVCI' ya; laboratuvar çalışmalarında ve tezimin her aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Cansu YILMAZ ve Nazlı ULUTAŞ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Projemize sağladıkları destekten dolayı TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her konuda yardımı olan, manevi desteğini hiç eksik etmeyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2019

Buket ŞAHİN

1.GİRİŞ

Ülkemiz farklı coğrafi bölgeleri ve iklimiyle her türlü bitkinin başarıyla yetiştirilebileceği büyük bir tarım ülkesidir. Büyük baş hayvancılık için olmaz ise olmaz derecede önemli olan kaba yem üretimi ihtiyacı karşılamaktan çok uzak olup, ülkemiz hayvancılığının en ciddi sorunlarından birisi konumundadır. Ülkemizdeki kaba yem sorununun kalıcı bir şekilde çözüme kavuşturulabilmesi için üretimimizin bugünkünün en az iki katına çıkartılması gereklidir. Bunun başlıca 2 yolu vardır:

İşlenebilen tarım alanları içerisinde yem bitkilerine daha fazla yer vermek.

Çayır meraların mevcut durumlarını iyileştirerek verimlerini artırmak

Her iki durumda da ülkemizin farklı ekolojik koşullarına uygun alternatif yem bitkisi türlerinin tespit edilerek, lokal şartlara adapte olmuş verimi ve besleme değeri yüksek çeşitlerinin geliştirilmesine büyük bir gereksinim vardır.

Korunga (*Onobrychis sativa* Lam, *Onobrychis viciifolia* Scop, *Hedysarum onobrychis* L) hem işlenebilen tarım alanlarında biçerek kuru ot üretimi için hem de meralarda otlatılarak değerlendirmek amacıyla yetiştirmeye uygun yabancı döllenmiş çok yıllık bir baklagil yem bitkisidir. Bitki 10 metre derinliğe kadar inebilen kök sistemiyle toprağı ıslah etme özelliğine sahip ve kurağa dayanıklıdır. Bu özelliği nedeniyle yoncanın yetişmediği kıraç bölgelerin vazgeçilmez bitkisidir. Yonca ve diğer bazı baklagillerin hayvanlarda sebep olduğu şişme sorunu korungada gözlenmez. Bu özelliği nedeniyle mera karışımlarda rahatlıkla kullanılabilir. Korunga hayvanlar tarafından yoncaya göre daha fazla tercih edilir ve besleme değeri yüksektir. Tüm bu iyi özelliklerine ilave olarak korunganın arılar için çok değerli bir polen ve nektar kaynağı olduğu ve hayvanlarda gözlenen bazı sindirim sistemi problemlerine iyi geldiği de bilinmektedir. Korunga sahip olduğu bu üstün özelliklerinden dolayı çok eskilerden beri bilinen ve 1960 yılına kadar dünyanın her yerinde tarımı yapılmakta olan eski bir bitkidir. Ancak bu tarihten itibaren ikinci dünya savaşından sonra dünyada baş göstermeye başlayan açlık sorununu çözüme kavuşturmak adına devletler kimyevi gübre kullanımını sübvansiyonlarla desteklemeye başlamış ve bunun sonucu ekim sistemlerinde kimyevi gübrelerle tepkisi iyi olan tahıllar dominant duruma gelmiştir. Bu uygulama korunga ekim alanlarında diğer tüm baklagil bitkilerinde olduğu üzere ciddi daralmalara sebep olmuş ve bugün korunga tarımı sadece Doğu Avrupa, İspanya, İtalya, İran ve ülkemizin belirli bölgelerinde sınırlı alanlarda yapılmaktadır.

Ancak bugün sürekli yükselmekte olan enerji fiyatlarından dolayı gübre kullanmak ekonomik olmaktan çoktan çıkmıştır. Bundan dolayı da tüm dünyada ekim sistemine tekrar baklagilleri dahil etmek suretiyle daha düşük maliyetler ile daha çevreci ve sürdürülebilir tarım sistemlerine doğru bir yönelme başlamıştır. Bu nedenle baklagil bitkilerine özellikle de bir dönem ihmal edilmiş olan korungaya olan ilgi artmaya başlamıştır. Bunun bir sonucu olarak çok yakın bir geçmişte Avrupa Birliği çok sayıda ülkeden araştırmacıların katıldığı konsorsiyumlar tarafından hazırlanan ve korunganın her yönüyle incelendiği *Healthy Hay*, FP6-2005 (www.niab.com/pages/id/172/Healthy_Hay) ve *Legume Plus*, FP6 2012-2016, PITN-GA-2011-289377 (www.niab.com/pages/id/385/Legume_Plus) adlı 2 araştırma projesini desteklemiştir. Tüm bunlar dünyada korunganın öneminin yeniden artmaya başladığının bir göstergesidir. Değişen iklim şartları ve dünyanın daha kurak bir hale dönüşme olasılığı da göz önüne alındığında özellikle ülkemiz için korunganın çok daha önemli bir tür olacağı çok açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle vakit kaybetmeden korunga bitkisinin zayıf yönlerini iyileştirmeye yönelik ıslah programları başlatılarak ülkemizdeki tarımın geliştirilmesi için zorunlu olan yüksek performans ve kaliteye sahip yeni korunga çeşitlerinin geliştirilmesi çalışmalarına başlanmalıdır.

Sunulmuş olan bu tez çalışmasının amacı Trakya bölgesi koşullarında yüksek verim ve kalite performansına sahip yeni korunga çeşitlerinin geliştirilmesinde kullanmak amacıyla halihazırda yurt dışı kaynaklardan elde edilerek oluşturulmuş olan korunga koleksiyonu içerisindeki bazı gen bankası aksesyonlarının bu çalışma öncesine kadar bilinmeyen çekirdek DNA içeriği ve ploidi düzeylerini ilk defa flow sitometri ile belirlemektir.

2.KURAMSAL TEMELLER

2.1.Korunga

Yakın Doğu Merkezindeki kökeninden, örneğin Türkiye, İran ve Transkafkasya (Vavilov 1951) korunga, doğuya doğru Akdeniz ve Orta Avrupa'ya yayılmış ve muhtemelen çoğu Avrupa ülkesinde yetiştirilmiştir. Yerel meraların bir parçası olarak, *Onobrychis* spp. yetiştiriciliği birkaç bin yıl öncesine (Hely ve Offer 1972) dayanmaktadır, ancak Avrupa ekimi yaklaşık 400 yıldır kaydedilmiştir (Chorley 1981).

Mevcut korunga bölgesi İtalya'da (Orsi 1978), Romanya'da (Varga 1968), Sovyetler Birliği'nde (Andreev 1963), Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri (Ditterline ve Cooper 1975)'nde çok aktif durumdadır (Hanna ve ark. 1972). Yapılan eski araştırmalar (C.A.B. 1982), yalnızca Doğu Avrupa ve Sovyetler Birliği'nin otlatma temelli tarım politikalarını koruduğunu göstermektedir.

Korungaya görünüşte olan ilgisizliğin nedenleri tam anlamıyla belli değildir. Tarımın değişen ihtiyaçlarına uyumunun zayıf olması (Hutchinson 1965), bitki büyümesi için temel gereksinimlerin yetersiz değerlendirilmesi gibi olasılıklar (Eslick 1968) önerilmiştir. Ayrıca, yoncanın yaz aylarında yetişen bir yemlik baklagil olarak başarısı muhtemelen bazı alternatiflerin de ihmal edilmesine yol açmıştır.

Baklagillerin incelenmesi sırasında kafa karıştırıcı bir etken, Hutchinson (1965) tarafından ithaf edilmektedir. Birçok alanda, özellikle Avrupa için, tüm baklagillerin toplam alanının, yirminci yüzyıl boyunca belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Rogers 1975). Bunun nedeni, tarımsal sistemin genel olarak yoğunlaştırılması, ucuz yapay azot için hazır erişim ve baklagil verimliliğini sürdürmek için gereken daha yüksek düzey yönetim becerileridir. Rogers (1975), 1970'lerin enerji krizinin, baklagillerin öneminin, hayvanların değerinin ve otlakların azot ekonomisine katkısının önemini hatırlattığını belirtmiştir. Açıkça, ekilen baklagillerin alanının azalması ekonomiyi önemli derecede etkilediğine dikkat çekmiştir.

Bazı tarımsal sistemlerde iyi bir ekonomi için alternatiflerin daha yakından incelenmesi gerekmektedir. ABD ve Kanada'da korunga araştırma programlarının geliştirilmesi bir örnek teşkil etmektedir. İlgili alanlar, geleneksel olarak, temel yazlık baklagil yem bitkisi olan yoncaya dayanıyor ve ılık kuru yazlar ve aşırı soğuk kışlar geçiriyorlar. Korungaya ilgi, kurak bölgelerdeki baklagillere duyulan ihtiyaçtan ve ayrıca yabancı otların ve *Hypera postica* istilasının bir sorun olduğu sulanan alanlardaki yonca yerine geçmesi

nedeniyle ortaya çıkmıştır (Hanna ve ark. 1972, Ditterline ve Cooper 1975). Son 20 yılda, bu programlar bitkinin biyolojisi, yönetim sorunları ve çeşit gelişimi hakkında bilgi sağlamıştır. Korunganın sorunları olduğu oldukça açık olsa da, bitki yetiştirme ve geliştirme programlarından çok sayıda iyileştirme görmek için tarihini incelemek gerekir (Hanson 1972).

2.1.1. Terminoloji

Korunga üzerinde yapılan herhangi bir çalışmada, isimlendirme problemiyle karşılaşmaktadır. Bu problem, çeşitli nedenlerle ortaya çıkar:

Çok sayıda *Onobrychis* türü ve türlerin içinde, çoğu zaman zayıf tanımlamaları olan çeşitler vardır (Chapman ve Yuan 1968, Darlington ve Wylie 1955).

Hem çok yıllık hem de tek yıllık *Onobrychis* türleri vardır (Simmonds 1976).

Çok sayıda türü kapsayan bir dizi ortak ad vardır (Kernick 1978).

Kültürü yapılan *Onobrychis viciifolia*'da, erken ve geç veya yaygın türler tespit edilmiştir (Stebler ve Schroter 1889). Bu ayırım, büyüme davranışına bağlıdır (Thomson 1938). Yaygın türler genellikle büyüme mevsiminde en az iki kez çiçeklenme kabiliyetine sahipken, erken veya geç türler bir kez çiçeklendikten sonra bir rozet şeklini almaktadırlar (Spedding ve Diekmahns 1972).

Sinskaya (1955), türlerin kendine özgü morfolojik karakterlerden ziyade biyolojik ve ekolojik farklılıklar temelinde kurulduğu şeklinde bir tanımlama yapmıştır. Bu farklılıklar belirli bir bölgede açıkça görünse de, belirgin bir şekilde farklı ortamlarda kalmalarını beklemek için hiçbir neden yoktur ve ayrı türlerin statüsünün geçerliliği ile ilgili sorular ortaya çıkar.

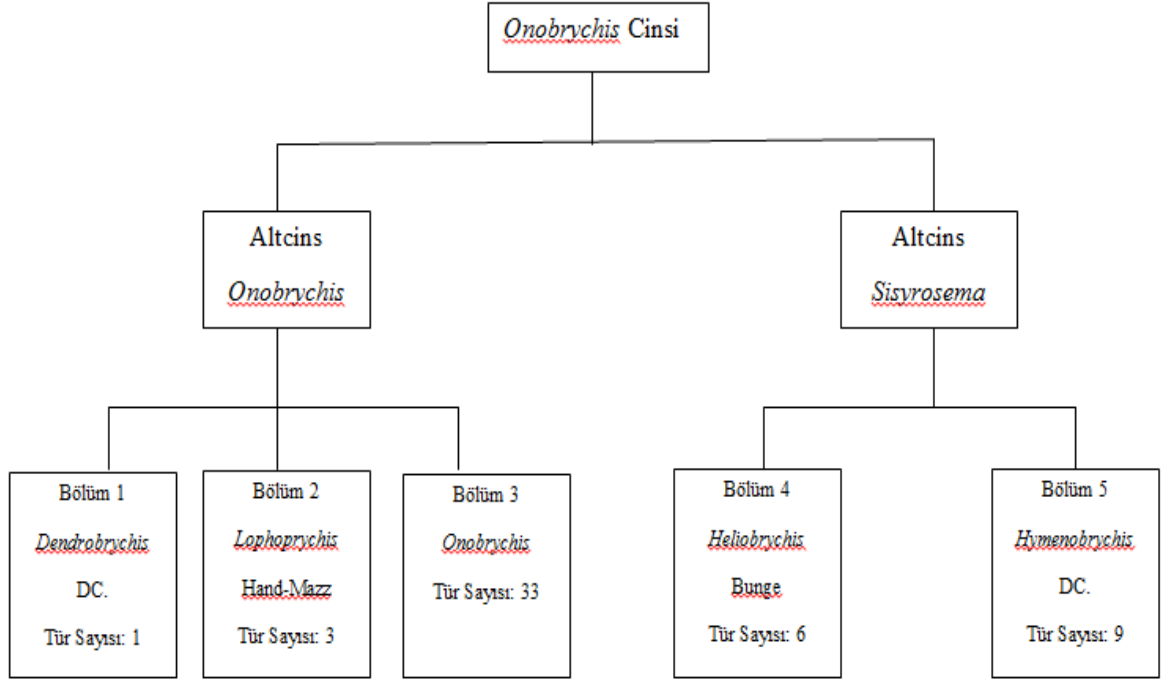
Bazen, bazı literatürlerde belirtilen cinsin doğru olup olmadığı sorusu karşımıza çıkabilmektedir (Chorley 1981).

Onobrychis cinsinin, özellikle de kültürü yapılan formları, kültüre alınan yonca (*Medicago-sativa-falcata-glutinosa* kompleksi) için belgelendiği gibi karmaşık bir dizidir. Sadece daha ayrıntılı taksonomik çalışmalar bunu doğrular ve belki de değerli olabilecek ıslah materyalleri elde edilir (Lessins ve Gillies 1972) .

2.1.2. Morfoloji

Korunga cinsi tek ve çok yıllık türlere sahiptir. 1995 yılında, Türkiye’de yetişen korunga türlerinin son yenileme çalışmasını yürüten Aktoklu (1995)’nin bildirdiğine göre; Linne, ‘Species Plantarum’ adlı eserinde *Onobrychis* cinsine ait türleri *Hedysarum* cinsi

içerisinde vermiştir. Daha sonra ilk kez Miller tarafından 1754 yılında *Onobrychis* cinsi olarak kullanılmaya başlanmıştır.



Şekil 2.1. Türkiye’deki Korunga Cinsine Ait Alt Cinsler ve Taksonları (Aktoklu 1995)

Korunga ile ilgili ilk ve toplu bilgi Boisser (1843 ve 1872) tarafından verilmiştir. Boisser ‘Flora Orientalis’ adlı eserinde *Onobrychis* cinsini 2 bölüme ve bu bölümleri de alt bölümlere ayırmıştır. Boisser’in bu eserinin dışında Türkiye’nin *Onobrychis* türleri ile ilgili en geniş kaynak Hedge (1970)’in ‘Türkiye Florası’ adlı eseridir. Dünyada korunga (*Onobrychis*) cinsine bağlı 162 tür bilinmektedir. Korunganın bu kadar geniş tür çeşitliliğine karşılık yalnızca 3 türü tarımsal açıdan önemlidir.

Yaygın Korunga (*Onobrychis sativa* Lam. Syn.: *O. viciifolia* Scop.)

Anadolu Korungası (*Onobrychis arenaria* Kit. Ex. Wild. D.C.)

Kafkas Korungası (*Onobrychis transcaucasica* Gross H.)

Aktoklu (1995)'ya göre, *Onobrychis* cinsi Türkiye'de 2 alt cins ile temsil edilmektedir. Araştırmacı yaptığı en son yenileme çalışmasıyla korunga tür sayısını 52 (60 takson) olarak tespit etmiştir.

Onobrychis viciifolia Scop. dünyada en yaygın olarak yetiştirilen korungadır. Bu bitki çok yıllık olup derin köklüdür. Kök sistemi, ana kazık kök ile bu kökten yanlara doğru çıkan kalın ve çok sayıda ince köklerden oluşmaktadır. Kök sistemi uzunluğu iklim koşullarına ve toprak yapısına bağlı olarak 1-10 m arasında değişmektedir. Daha sonraki dönemlerde kazık kök kalınlığı 5 cm'yi bulan korunganın, özellikle ince yan köklerinde çok fazla sayıda azot yumrucukları bulunmaktadır (Altın ve Tuna 1996).

Korunga dik, yatık veya yarı yatık olarak gelişebilmektedir. Gövde taç kısmından itibaren çok sayıda sapsız dallanır. Normal koşullarda bir taçtan 10-30, bazen de 60 adet kadar sap çıkabilir. Gövdesi dik olarak gelişen bitkiler sulu koşullarda 140 cm kadar boylanmakta ve yer yer yatma görülmektedir. Kurak koşullarda dik olarak gelişen bitkiler 100-200 cm kadar boylanabilmektedir. Korunga gövdesinin taban kısmının içi boş üst kısımları ise doludur. Gövdenin enine kesiti yuvarlak ve yüzeyler hafif tüylüdür. Gövde erken ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde rozet şeklinde gelişir (Açıkgöz 1991).

Korunga yaprağı; bir yaprak eksenine karşılıklı olarak dizilmiş oval şekilli (yumurta şeklinde) 5-14 çift yaprakçık ile bu eksenin ucundaki 1 adet yaprakçıktan oluşmaktadır. Yaprak uzunluğu 10-25 cm arasında değişmektedir. Yaprakçıklar kenarları düz, 2-3 cm uzunluğunda ve 0,5-1 cm genişliğindedir. Yaprakçıkların üst kısmı çıplak veya az tüylü, alt kısmı ise tüylüdür. Yaprığın gövdeyle birleştiği yerde oluşan kulakçıklar üçgen şeklinde olup zarımsı yapıdadır. Genç bitki döneminde kulakçıklar yeşilimsi kırmızı renkte olgunlaşma döneminde ise kahverengidir (Fortune 1985).

Korunga çiçekleri, bitkinin uzun sapının ucunda konik şekilde ve hoş kokuludur. Çiçekler genellikle koyu pembe renktedir, ancak beyaz çiçekler gözlemlenmiş ve tozlama çalışmalarında genetik belirteçler olarak kullanılmıştır (Knipe ve Carleton 1972). Tozlanma, başta bal arıları olmak üzere, böcekler yoluyla meydana gelir. Korunga çiçekleri, bal üretimi bakımından yüksek tutulan arılar için çok çekicidir. Çiçekler gün boyunca özellikle sabahları açmakta ve salkımda çiçeklenme alttan yukarıya doğru gerçekleşmektedir. Çiçeklenme dönemi yaklaşık 2-3 hafta devam eder. Her çiçekten, içerisinde bir tohum bulunan meyve meydana gelir. Korungada büyük oranda yabancı dölleme olmaktadır. Kendine dölleme oranı % 0-37 arasındadır (Dubbs 1968).

Korunga meyvesi, içinde yalnızca bir tohum bulunan, yarım daire şeklinde ve kenarları horoz ibiği görünümünde dişli küçük bir bakladır. Meyvenin üzeri ağ şeklinde belirgin damarlıdır. Meyvenin uzunluğu 5-8 mm ve eni 4-6 mm arasındadır. Yabani korunga türleri arasında bir meyve içerisinde 2 tane tohum bulunanlara da rastlamak mümkündür. Tohumlar böbrek şeklinde olup yüzeyi düzgündür. Renkleri koyu yeşil zeytin, kahverengi ve siyaha yakın olabilir. (Spedding ve Diekmahns 1972).

2.1.2.1. Yaygın Korunga (*Onobrychis sativa* Lam. Syn.: *O. viciifolia* Scop.)



Şekil 2.2. *Onobrychis viciifolia*

117 farklı bölgede yetiştirilen *Onobrychis viciifolia*, 14. yüzyılın ortalarında kültüre alınmaya başlanmıştır. İslah edilmiş 26 çeşidinin kullanımı için devlet iznine sahip olduğu bilinmektedir (Golovkin 1988).

Onobrychis viciifolia türüne ait bitkilerin çok yıllık olup, dik veya yarı dik gelişen, 15-90 cm uzunluğunda içi boş tüylü bir gövdeye sahip olduğu bilinmektedir. Yapraklar 15-80 mm uzunluğunda olan karşılıklı dizilmiş 5-14 çift yaprakçıktan oluşmaktadır. Kulakçıklar ince ve sivridir. Konik şeklinde çiçek salkımı bulunmaktadır ve çiçekler pembemsi kırmızı renge sahiptir. Çiçekler, çoğunlukla bal arıları tarafından tozlanmaktadır. Mayıs-Haziran

aylarında çiçek açmaktadır ve tohumlar Temmuz-Ağustos aylarında olgunlaşmaktadır. Tohum rengi koyu zeytin ile kahverengi veya siyah renge sahiptir. Kök sistemi, birkaç ana dalı olan derin kazık köklerinden ve rizobiyal nodüllerin çoğunu taşıyan çok sayıda ince yanal kökten oluşmaktadır (Kashtanov 1983).

Onobrychis viciifolia kuraklığa dayanıklıdır ve çeşitli topraklarda yetiştirilebilmektedir. Özellikle yüksek verimli, yüksek kireçli, iyi drene edilmiş, kalkerli topraklarda iyi gelişmektedir. Mükemmel kuraklık direncine sahip olmakla birlikte ıslak veya taban suyu yüksek arazilerden hoşlanmamaktadır. Sığ topraklarda sulamaya cevap vermektedir. Uzun süreli sel baskınlarına karşı toleransı olmadığı bilinmektedir. Soğuk kışlar bitkinin kalıcılığını azaltmakta, sıcak ve ılıman iklime daha iyi adapte olmaktadır. Kış aylarında baklagil köklerinde yüksek azot rezervinin sert soğukları atlatmaya yardımcı olduğuna inanılmaktadır. Ek olarak, asitlik ve tuzluluğa karşı toleransı bulunmamaktadır (Medvedev ve Smetannikova 1981).

2.1.2.2. Anadolu Korungası (*Onobrychis arenaria* Kit. Ex. Wild. D.C.)



Şekil 2.3. *Onobrychis arenaria*

Onobrychis arenaria, çok yıllık bir bitkidir. 30-90 cm kadar boylanabilmektedir. Gövde nadiren tüylerle kaplıdır veya tüsüzdür. Yapraklar, 10-30 mm uzunluğunda, 2-5 mm genişliğinde 6-15 çift eliptik veya doğrusal mızrak şeklinde yaprakçıktan oluşmaktadır. 8-10 mm uzunluğunda mor-pembe çiçeklere sahiptir. Tohum kabuğu, yarı dikenli, oval, 5 mm uzunluğundadır ve her bir kapsül, 4-6 mm tek bir böbrek biçimli tohum içermektedir. Mayıs-Haziran aylarında çiçek açmaktadır ve tohumlar Ağustos-Eylül aylarında olgunlaşmaktadır. Çiçekler, çoğunlukla bal arıları tarafından döllenmektedir (Brezhnev ve Korovina 1980).

Anadolu korungası, çayırlarda, odun kenarlarında, çalılıklarda veya bozkırlarda görülmektedir. Kumlu toprakları tercih eder ve mükemmel kuraklık direncine sahiptir. Derin köklenme, büyüme alışkanlığı ve buna bağlı kuraklık direnci nedeniyle kireçli, kuru topraklara uygun, üretken, protein ve mineral bakımından zengin bitkiler olduğu bilinmektedir. Çok çeşitli toprak ve çevre koşullarına uyum sağlayabilseler bile yoğun otlatma için uygun olmadıkları belirtilmiştir (Hulten ve Fries 1986).

2.1.2.3. Kafkas Korungası (*Onobrychis transcaucasica* Gross H.)



Şekil 2. 4. *Onobrychis transcaucasica*

Onobrychis transcaucasica çok yıllık otsu bir bitkidir. 40-80 cm boylanabilmekte olup gövde dikdörtgenimsi ve kısa tüylüdür. Taç yapraklar, sarı çizgili parlak pembe bir renge sahiptir. Haziran ayında çiçeklenmekte ve Temmuz-Ağustos aylarında meyve bağlamaktadır (Brezhnev ve Korovina 1981).

Kafkas korungasına 1500-1800 metredeki orta dağ bölgesinde, kuru yamaçlarda, enkaz alanlarında ve bazen de çalılıklarda rastlanmaktadır. Kafkasya'da yetişen en eski yem bitkilerinden biri olduğu bilinmektedir. Yaklaşık 1000 yıl kültürü yapılmış, çok verimli ve kuraklığa dayanıklı bitkilerdir (Galusko 1980).

2.1.3. Yetiştiricilik

Canlı korunga tohumu 5 ila 25 °C arasındaki sıcaklıklarda hızlı bir şekilde çimlenir ve kuvvetli fideler üretir (Hanna ve ark. 1977). Townsend ve McGinnies (1972) korunganın toplam çimlenme için nispeten sıcaklığa duyarlı olduğunu belirlemiştir. Diğer çalışmalar, düşük sıcaklıkların çimlenme oranını azaltabildiğini gösterse de (McElgunn 1973), korunganın donma sıcaklıklarında çimlenme yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir (Young ve ark. 1970).

Korunga fidelerinin ilk ortaya çıkışı ve en hızlı gelişme, iri olan tohumların çizgileri ile ilişkilidir (Fransen ve Cooper 1976). Kotiledonlar bu çizgilerde ortaya çıktığında, fideler depolanmış rezervlerden faydalanırken fotosentezden enerji alabilir (Cooper 1977). Bu aşamada, fide toplam ağırlığı, solunum kaybı nedeniyle azalır. Cooper ve Fransen (1974), korunganın ilk dokuz günü boyunca bunun % 38 civarında bir kayıp olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, belirli bir süre sonra herhangi bir ağırlık veya kalan rezerv tahmini, temel olarak ekim derinliğinden etkilenir (Siyah 1959).



Şekil 2.5. Yalın Ekilmiş Bir Korunga Tarlasının Görünümü

Fransen ve Cooper (1976) aynı zamanda ilk yaprakların yaprak alanı ile tohum ağırlığının, tohumların ağır tohumdan hızlı bir şekilde gelişmesinin bir yansıması olduğunu öne sürdüğünü de göstermiştir. Üretilen ilk yaprak ile belirgin olan bir başka faktör değişken sayıda yaprakçıktır. Genellikle basit olmasına rağmen, iki, üç veya dört yaprakçık da görülmektedir (Thompson 1938, Cooper 1974). Bu farklı yaprak türlerinin yaprak alanındaki değişikliklere rağmen, Cooper (1974) verilen bir türün seçilmesinde geliştirilmiş bitki performansı önerdiğine dair bir kanıt bulamamıştır.

2.1.4. Vejetatif Üretim

Korunga fideleri, herhangi bir kök gelişimi fark edilmeden önce genellikle yaklaşık altı yaprak üretir. Bu aşamada yanal tomurcuklar gelişir, her biri boğum aralarından sayısız yaprak üretir. Tek veya çift biçimli tiplerde, bu aşamada bazı tomurcukların üst iç kısımları uzar, bu da göreceli olarak seyrek üst yaprakları ve tabanda yaprak tutamları olan bir bitkiye neden olur (Thompson 1955). Yaygın veya (bir kaç biçimli) biçimli tipler aynı zamanda bir dizi yanal tomurcuk üretir, ancak uzama gecikir. Bu, bu türlerin erken dönem büyümesini karakterize eden yere yatık görünümüyle sonuçlanır (Thompson 1955). Bazı durumlarda, kuzey enlemlerinden olan bitkiler ilk yılda uzayamayabilir (Shelly 1977).

Tek ve çift biçimli tiplerin karşılaştırmalı bir çalışmada, Cooper (1972), tek biçimli tipin yaprak olarak bitki kütlesinin daha büyük bir bölümünü koruduğunu ve ayrıca daha yüksek bir yaprak alanı indeksi elde ettiğini göstermiştir. Cooper (1972), bunun tek biçimli tiplerin artan miktarda enerji miktarını etkin bir şekilde yakalayabilmelerini sağladığını ileri sürmektedir. Yaprak alanı gelişiminde ve korunga çeşitlerinin toplam yaprak alanında meydana gelen bu farklılığa rağmen, yonca ile karşılaştırıldığında korunganın çok daha düşük bir yaprak alanı indeksine sahip olduğunu belirtmek gerekir (Sheehy ve Popple 1981). Bu, korunga zayıf bir yaprak üreticisi olmaktan çok, yonca için çok daha yüksek spesifik yaprak alanı (cm²/g) ile ilişkilidir. Gerçekten, Sheehy ve Popple (1981), belirli bir hasatta, yoncanın verim avantajının neredeyse tamamen daha büyük bir kök kütlesinden kaynaklandığını göstermiştir. Bu nedenle, daha geniş bir yaprak alanına sahip korunga seçilmesini önerirler. Geliştirilmiş fotosentetik verim için spesifik yaprak alanını değiştirme girişimleri, yonca için özel bir başarı olmadan yapılmıştır (Delaney ve Dobrenz 1974). Bu kısmen, belirli yaprak alanını etkileyen güçlü çevresel etkileşimler nedeniyle olabilir (Cooper ve Qualls 1967, Christian 1977) ve bu nedenle, eğer deneylerde etkileşimler en aza indirilebiliyorsa değişiklik yaklaşımı önemli olabilir.

Monteith (1965) teorisi doğrultusunda, Sheehy ve Popple (1981), korunganın düşük yapraklı alanı için, yere yatık mahsulün fotosentez için verimli bir şekilde ışık verdiğini göstermiştir. Bu, Cooper'ın (1972) daha yatık tek biçimli tiplerin ışığı yakalamada daha dik çift biçimli tiplerden daha verimli olabileceği önerisine destek verir. Seçimlerin erteleme temelinde yapıldığı takdirde bu fikirlerin dikkate alınması gerekebilir (Rumball 1982).

2.1.5. Çiçek ve Tohum Gelişimi

Birçok yazar, korunga çiçeklenme kalıpları hakkında, özellikle de ekim türlerinin çiçeklenme yılında çiçek açamayacağı gerçeği hakkında genel yorumlar yapmıştır (Thomson 1938). Çiçek açma ve geliştirme konusundaki tek ayrıntılı çalışma Sheely (1977) tarafından yapılmıştır.



Şekil 2.6. Korunga Çiçeği (solda) ve Çiçeğin Tohum Bağlamış Hali (sağda)

Sheely (1977), incelenen korunga çeşidi için dört ayrı üreme aşamasına dikkat çekmiştir. Bu aşamalar a) tomurcuk şişmesiyle birleştiğinde yaprakların yatay açısındaki bir artış, b) sap uzaması, c) çiçeklenme başlangıcı ve d) çiçeklenmenin olgunluğa gelişimi. Başlamadan önce herhangi bir aşamada üreme aşamaları olup olmadığı konusunda bazı sorular (Lang 1965) vardır. Bu, çeşitlerin ortaklarının yaprak açısında bir artış gösterdiği, ancak daha fazla ilerlemediği ve Melrose ve Krasnodar çeşitlerinin kök uzaması gösteren ancak çiçeklenme başlangıcı olmayan bazı bitkilere sahip olduğu korunga için kısmen doğrudur (Sheely 1977). Bununla birlikte, önceki iki aşamadaki ölçümler ile çiçeklenme arasında güçlü bir korelasyon bulunduğundan, Sheely (1977) onları üreme aşamaları olarak sürdürdü.

Sheely'nin (1977) diğer verilerinden, bitkiler kısa günlere ve düşük sıcaklıklara maruz kaldıklarında, çiçek açmanın, değişen yaprak açısından ve gövde uzamasından önce geldiği anlaşılmaktadır. Bunun, ekim sonbaharda veya özellikle ilkbaharın başlarında olması durumunda, ilk yılda gerçekleşmesi beklenebilir ve ilk sezonda çiçek açan bazı yaygın türlerin raporlarını açıklayabilir (Fagan ve Rees 1930). Aksi takdirde, korunga için normal üreme gelişimi, özellikle yaygın türler ve aşırı kuzey enlemlerinde ortaya çıkan, ardından yaklaşık 14 saat veya daha uzun olan günler için düşük sıcaklıkta ön işlem gerektiriyor gibi görünmektedir.

Çiçekçik olgunlaşması, her çiçeğin sivri ucundan meydana gelir ve çiçekçik, başak eksenine dik durduğunda belirgindir. İyi nektar üretiminin yanı sıra, yoncada oluşan staminal borunun açması korunga özelliği değildir ve bu nedenle bitki bal arıları için çok çekicidir. Tozlaşma meydana geldiğinde, tohum gelişimi hızlıdır. Gerçek çiçeklenme süresi nispeten sınırlıdır (St John-Sweeting 1980). Yeni bazal sürgünler bu aşamaya kadar biçilmemiş bitkilerde gelişmeye başlamadığından, korunga için tohum olgunluğunun önemli bir fizyolojik durum olduğu görünmektedir (Cooper ve Watson 1968).

2.1.6. Kültürel Özellikler

2.1.6.1. Adaptasyon

Korunganın adaptasyonunun incelenmesinde karşılaşılan ilk sorun, ekotiplerin çeşitliliği ve çoğu durumda tarif edilen türlerin tropik bölgeler hariç çoğu bölgeye uyum göstermesidir. Diğer bir komplikasyon, daha detaylı çalışmaların bazılarının sınırlı çeşitleri (Koch ve ark. 1972) veya sınırlı bir ortam aralığını kullanmış olmasıdır (Evans 1961).

Korunga, sıcak ve kurak yazları olan Akdeniz bölgelerinden kuzey kışları ile şiddetli kışları olan kuzey enlemlerine kadar değişen yerlerde meydana geldiğinden, iklim şartlarının türün veya çeşitlerin kaynağına bağlı olarak önemli ölçüde değişeceğini varsaymak mantıklıdır. Bu değişim çiçeklenme zamanı (Sheely 1977) ve kış dayanımı (Hanna ve Smoliak 1968, Eslick et al. 1967), her ikisi de orijinin enlemine ve yüksekliğine bağlı olarak, iyi bir şekilde gösterilebilir.

Bununla birlikte korunga, morfolojik özellikler ve maksimum büyüme zamanı açısından kuraklığa iyi adapte olmuş görünmektedir (Koch ve ark. 1972). Kısa büyüme mevsimlerine uyum, korunganın düşük sıcaklıklarda çimlenme ve üreme ve dolayısıyla sıcak ve kuru bir iklimde erken bir değişikliğe dayanma kabiliyeti ile de gösterilmiştir (Young ve ark. 1972). Bu özelliklerden dolayı, ABD'li araştırmacılar (Ditterline ve Cooper 1975) minimum yağış yaklaşık 330 mm olan bölgeler için korunga önermektedir. Üst sınır, iklimin ılıman hale gelmesinden dolayı diğer baklagillerin nispi değerlerine ve ayrıca korungayı oldukça hızlı bir şekilde olumsuz etkilediği kanıtlanan su basması olasılığına dayanmaktadır (Heinrichs 1970).

En iyi büyüme için korunga, alkali pH'ına sahip ve kireç oranı yüksek olan serbest akan toprakları gerektirdiği bilinmektedir (Spedding ve Diekmahns 1972). Stebler ve Schroter (1889), kalkerli toprakların korunga için en uygun olma nedeninin, diğer topraklardan daha iyi büyüme için fiziksel koşulları sağlamaları olduğunu öne sürmektedir. Bu fikir, korunganın

asit kumunda başarılı bir şekilde oluşturulduğu ve aynı zamanda herhangi bir görünür yan etki olmadan pH 6.2' nin bir besin çözeltisi kullanılarak vermikülitte büyütüldüğü çalışmalarda desteklenmektedir (Smoliak ve ark. 1972). Bununla birlikte, besin toksisitesi, düşük pH seviyelerinde görülebildiğinden, bu faktör göz ardı edilemez. Rorison (1965), korunganın, esas olarak alüminyumun toprak çözeltisindeki toksik etkisinden dolayı, İngiltere'deki bazı asitli çayirlardan çıkarıldığını belirtmiştir.

2.1.6.2. Korunganın Tesisi

Korunga için tavsiye edilen yüksek tohumlama oranları, işletme maliyetlerini tohum fiyatına bağlı yapabilir (Scott 1979, Doyle ve ark. 1984). Korungada ekim oranı meyve kabuğu çıkartılmış tohumluk kullanılması durumunda 55-60 kg/ha iken meyve kabuğu çıkartılmamış tohumluk kullanımında ise 90-100 kg/ha dır (Spedding ve Diekmahns 1972). Bununla birlikte, korunganın 1000 tane ağırlığı 13.2-16.8 g'dır ve yaygın olarak kullanılan pek çok baklagil yem bitkisinden daha yüksektir; örneğin yoncanın 1000 tane ağırlığı 2.15 g olarak belirtilmektedir (Gunn 1972).

Ekim derinliği önemlidir ve tohum büyüklüğü çıkma oranını belirler (Cooper 1977). Büyük tohum boyutuna rağmen korunga derin ekimlerden iyi çıkmaz ve bu nedenle ekim derinliği yaklaşık 1-2 cm olmalıdır (Hanna ve ark. 1972). Ekim derinliğinin kazara arttırıldığı durumlarda, örneğin gevşek, kumlu yelkenler, ortaya çıkması gözle görülür derecede daha zayıf ve gecikmiş, bu da ağır yabancı ot rekabetine neden olmuştur (Fortune).

Bir sonraki faktör, laboratuvarın çimlenme testlerinde çimlenme inhibitörleri içerdiği gösterildiğinden, tohum kabuğunun ekimden önce çıkarılması gerekip gerekmediğidir (Carleton ve ark. 1968, Smit 1979). Bununla birlikte, bunlar saha kurulumu üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir (Carleton ve ark. 1968). Kalıcı doğası nedeniyle, tohum kabuğu da gelişen köke zarar verebilir ve böylece hastalık enfeksiyonu için bir alan sağlayabilir (Sears 1974). Belki de kapsülün çıkarılması için en iyi argüman, öğütme sürtünmesinin sert tohum sayısını azalttığını gösteren Thomson (1952) 'dır. Ayrıca öğütme, daha fazla tohum hattının oluşmasına ve ayrıca taşıma için malzemenin ağırlığının azaltılmasına izin verir. Bu kapsülün çıkarılması için bu nedenler verilmiş olsa bile, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çoğu tohumlama, kapsül bozulmadan yapılır (Ditterline ve Cooper 1975) ve bu nedenle, kapsülün çıkarılması istenebilirken, gerekli olarak kabul edilemez.

Baklagiller için tohumlamada önemli bir husus, inokulum kullanımıdır. Korungada Rhizobium belirgin görüldüğü için (Burton ve Curley 1968), yeni ekim alanları ekimden önce canlı bakteri ile tohum aşılama gerektirmektedir. Bu kriter karşılandığında bile, hem nodül

oluşumu eksikliği hem de görünüşte iyi nodüle edilmiş bitkiler tarafından etkisiz azot tespiti ile ilgili sorunlar vardır. Bununla birlikte, eksiklik semptomları büyümenin herhangi bir aşamasında ortaya çıkabileceğinden, ancak her zaman ekili koşullar altında ortaya çıkmadığından durum karmaşıktır (Hanna ve ark. 1972). Doğal habitatlardaki nodül varlığının ve fonksiyonunun gözlemlenmesi, Rhizobium dışındaki faktörlerin nedensel olabileceğini düşündüren makul bir simbiyotik ilişkiyi gösterir (Hely ve Offer 1972). Bir diğer olasılık, diğer baklagiller için bir dizi büyüme kusuru ve yaprak belirtileri ile sonuçlanan simbiyotik ilişki üzerinde bilinen etkileri olan mineral beslenmesidir (Epstein 1973).

Son olarak, yerel koşullara bağlı olacak ekim zamanı meselesi karşımıza çıkmaktadır. Soğuk iklimlerde, ilkbahar ekimi muhtemelen en başarılı olacaktır ve bitki sıcaklık arttıkça hızla büyüyebildiğinden erken yabancı ot kontrolü sorunlarının bir kısmını da önleyecektir (Ditterline ve Cooper 1975). Ancak, yaz koşulları özellikle Akdeniz iklimlerinde olduğu gibi sertse, sonbahar ekiminin bir avantajı olacaktır (St John-Sweeting).

2.1.6.3. Yabancı Ot Kontrolü

Genç korunga bitkisinin kuvvetli büyümesine rağmen, genellikle yabancı otlara karşı zayıf rakipler olarak kabul edilir (Bland 1971, Ditterline ve Cooper 1975). Bunun sebebi, korunganın erken yabancı ot girişinde bu kadar ciddi bir sorunla karşılaşmamış olması gibi, yonca ile benzer bir erken büyüme oranına sahip olması net değildir (Smoliak ve ark. 1972). Bir diğer olasılık ekim oranlarının genellikle yaklaşık 35 kg/ha olmasıyla (Hanna ve ark. 1972, Ditterline ve Cooper 1975), bitki popülasyonlarının yabancı otları etkili bir şekilde boğması için yeterli olmamasıdır. Bununla birlikte, şu anda mevcut olan uzun boylu tiplerin bazıları, yüksek bitki popülasyonları mevcut olsa bile, ot fidelerinin gölgelenmesinde yetersiz yaprak alanı üretebilmektedir (Fortune ve Withers 1980).

Herbisit uygulaması yapılmalıdır, nispeten küçük bir mahsul olduğundan, yalnızca sınırlı sayıda kapsamlı bir şekilde test edilmiştir. Halen trifluralin, 2,4-DB, MCPB ve siyanazin gibi kimyasallar oldukça güvenli görünmektedir (James ve Atkinson 1978). Otlatmaya verilen yanıtların daha iyi anlaşılmasıyla bir miktar yabancı ot kontrolü sunması da mümkündür. Buna bir örnek, ağır otlatmanın, otun ot bileşenindeki güçlü rekabeti azalttığı ve korunganın hem verimini hem de kalıcılığını arttırdığı Kilcher (1982) tarafından verilmektedir.

2.1.6.4. Gübreleme

Gübre uygulama çalışmaları, korunganın potasyum (Spedding ve Diekmahns 1972) ve fosfat gibi ana elementlere yoncadan biraz daha düşük bir talebe sahip olduğunu göstermektedir. Düşük fosfat gereksinimi, korunga köklerinin yüksek katyon değişim kapasitesi ve topraktan fosfor çıkarma kabiliyetleriyle ilişkili olabilir (Fox ve Kacar 1964). Korunganın toprak fosfat mevcudiyeti üzerindeki etkisi, daha sonra aynı alana ekilen tahıl mahsullerinin fosfat tepkisi olmamasından da yansır (Fox ve Kacar 1964, Kernick 1978).

Daha önce bahsedilen zayıf azot fiksasyon eksikliğinden kaynaklanan problemler nedeniyle, az miktarda azot sıkça uygulanmıştır ancak cevaplar değişmiştir (Mayer 1975, Smoliak ve Hanna 1975). Uygulanan nitrojene verilen bu değişken tepkiler, kısmen azot fiksajında azot fiksasyon oranlarında bildirilen ve asetilen indirgeme teknikleriyle ölçülen önemli değişikliklerden dolayı olabilir (Major ve ark. 1979, Hume 1981, Krall ve Delaney 1982). Nitrojen gübre olarak tamamen tedarik edilmediği sürece, korunga veriminin değerlendirilmesine sınırlamalar getirdiği için bu sorunun çözülmemiş olması talihsiz bir durumdur.

Mikro besin gereksinimleri göz önünde bulundurulduğunda, özellikle pH değişimi için ağır kireç uygulamaları kullanıldığında, başka komplikasyonlar ortaya çıkar. Örneğin, yonca (Sherrell ve Toxopeus 1978) ve çemen (*Trigonella foenum-graceum*) (Molgaard ve Hardman 1980) gibi diğer baklagiller bu koşullar altında orta ila şiddetli bor eksikliği yaşayabilir. Bor eksikliği ile ilişkili semptomların çoğu (Epstein 1973) korungada gözlemlenmiş ve diğer faktörleri, örneğin kök ve sürgün büyümesini etkileyen besin alımını değiştirmiştir (Ross ve Delaney 1977).

Korunganın tanıtımı kalite yönlerine odaklandığından, son zamanlarda yüksek miktarda yoğunlaştırılmış tanen içeren başka bir baklagil olan *Lotus pedunculatus* ile yapılan çalışmaları göz önünde bulundurmak önemlidir (Barry ve Forss 1983). Barry ve diğerleri (Barry ve Duncan 1984, Barry ve Manley 1984), toprak verimliliğinin, otlardaki tanenlerin konsantrasyonunu belirgin şekilde etkileyebileceğini göstermiştir. Özellikle düşük organik madde içeren alanlardan gelen bitkiler, verimli alanlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda yoğunlaşmış tanen içermektedir ve bu nedenle ruminant hayvandaki sindirim sistemi farklılaşma eğilimindedir. Korungadaki tanenlerin yapısı *L. pedunculatus*'takilerden farklı olsa da, bitki dokusundaki konsantrasyonlarının benzer şekilde etkilenmesi ve kalite değişikliğine yol açması mümkün görünmektedir.

2.1.6.5. Hastalıklar ve Zararlılar

Korunganın bir avantajı, genel olarak diğer türlere ve özellikle de yoncaya saldırabilen bir dizi zararlıya dirençli görünmesidir (Lance 1980). Saha gözlemleri, birçok zararlı maddenin yeşillikten kaçınıyor gibi görünmesine rağmen, tohumun bir dizi böcek türünün (Fortune) hedefi olduğunu göstermektedir.

Taç ve kök çürüklüğü kompleksi, özellikle sulamada, duruş yoğunluğunda hızlı bir düşüşe neden olabileceği için ana hastalık problemi gibi görünmektedir (Sears ve ark. 1975). Bununla birlikte, bu kompleks başlangıçta *Fusarium solani*'nin rol oynadığı ana organizma olduğu düşünüldüğü açıkça anlaşılmamıştır (Sears ve ark. 1975), ancak daha yeni çalışmalar sıradan organizmanın bakteriler olduğunu göstermektedir (Gaudet ve ark. 1980). Epidemiyolojideki bu belirsizliklere rağmen, Auld ve ark. (1977), hastalığa dirençli tiplerin seçimi için potansiyel olduğunu göstermiştir.

2.1.6.6. Karışımlar

Karışımlar, ya maksimum verim ile daha iyi kalitede bir ot sağlayarak ya da otlatma veya muhafaza için otun mevcut olduğu süreyi aşarak alanı daha iyi kullanmaktadır. Korunga ve yoncayı şişkinliği azaltmak için bir araya getirme olasılığı yeni bir fikirdi, ancak korunganın yüksek lezzetliliği (Smoliak ve Hanna 1975) iki türün ayrılmasını gerektirebilir. Ayrıca, korunga verimi çok düşükse, yonca ile yapılan şişlik kontrolü için yine de daha uygun bir teklif olmuştur (Scott 1979). Çayır kelp kuyruğu (*Phleum pratense*), çayır yumağı (*Festuca pratensis*) ve domuz ayrığı (*Dactylis glomerata*) gibi bitkiler İngiltere'de ümit vaat etmişlerdir (Spedding ve Diekmahns 1972). Kilcher (1982), tohumun alternatif sıralarda olması durumunda bir miktar iyileşme olmasına rağmen, Rus yabani çimi (*Elymus junceus*) ile bir karışımda yetiştirildiğinde korunganın iki yıldan uzun bir süre devam etmediğini göstermiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde potansiyel gösteren bir karışım, karışımın tek başına yetişen türlerden daha fazla verim sağladığı korunga ve gazal boynuzu (*Lotus corniculatus*) olmuştur (Cooper 1973, 1979). Cooper (1973), bu kazanımın bir kısmını iki türün büyüme şekline bağlar; korunga, mevsimin başlarında en aktif olanıdır ve yaz ortasında ise gazal boynuzu öne çıkmaktadır. Bu ilgi noktalarının dışında, karışımlar yönetimi karmaşıklştırmaktadır ve bu nedenle şu anda tek kültürde korunganın değeri daha iyi anlaşılabilir.

2.1.7. Korunganın Genetiği ve Islahı

Korunganın genetiği ve ıslahı dikkate alındığında karşılaşılan ilk sorunlardan biri taksonomik kimliktir. Bu, sırasıyla 14 ve 28 kromozom sayısına sahip diploid ve tetraploid türlerinin oluşmasıyla daha da karmaşıktır (Chapman ve Yuan 1968, Simmonds 1976). Heyn (1962) tarafından yapılan ayrıntılı bir çalışma, bir çift ilişkili *Onobrychis* türü için ek kromozomlar (16 ve 32) göstermiştir ve ayrıca morfolojik gerekçelerle türlerin ayrılmasındaki bazı problemlere dikkat çekmiştir. Açıkça, eğer büyük ölçekli bir ıslah programı uygulanacaksa, belli melezlemeler denenirse uyumsuzluklar olabileceğinden bu faktörlerin dikkate alınması gerekecektir.

Korunga genellikle yabancı döllendiğinden (Thomson 1938), bir çeşit genotip koleksiyonundan oluşacaktır. Heterojenlik derecesi, temel bitkilerin sayısına ve oluşumuna, yabancı polenlerden izolasyon ve yabancı ot temizliğine bağlı olacaktır. Kendine döllenme oldukça kolay bir şekilde gerçekleşebilse de (Knipe ve Carleton 1972), hayvancılığın etkileri derhal ortaya çıkmaktadır. Thomson (1938) zayıf fide oluşumunu belirtmektedir.

Korunga ile bugüne kadarki ıslah çalışmalarının çoğu, seçilen bitkilerin polikrosunun takip ettiği elit bitkilerin fenotipik seçimi ile kuru madde verimini ve yeniden büyüme kabiliyetini arttırmayı amaçlamıştır (Carleton 1968, Hanna 1968, Varga 1968, Melton 1977, Rumball 1982). Üstün kışa dayanım, daha aşırı enlemlerde de özel bir öneme sahiptir (Hanna 1980). Seçime tabi olan karakterler için kalıtılabilirlik tahminleri hakkında sınırlı sayıda yayınlanmış kanıt vardır (Varga 1968). Şu ana kadar ıslah çabalarının küçük çapta olmasına rağmen, çeşitli ülkelerde kayıtlı ve kültürü yapılan birçok çeşit bulunmaktadır. Kısaca, normal olarak yabancı çiçek tozu ile döllenmiş korunga, $2n=28$ kromozoma sahiptir. Islah amaçlarından en önde gelenleri verim ve uzun ömürlülük olmaktadır. Memleketimizde korunga materyali zengin olduğundan seleksiyon ve melezleme ile bu bitkide çok başarılı sonuçlar alınması mümkündür. Korunga çiçeklerinin tozlaşma ve döllenmesinde arıların çok büyük rolü vardır. Çiçek rengi cazip olduğundan korunga arıların son derece ilgisini çeken ve çok ziyaret ettikleri bir bitkidir. Bu nedenle yabancı döllenme fazlalaşacağından yeni korunga tiplerinin oluşması ve genetik varyasyonun artması doğaldır. Orta Anadolu'da korunganın kök boğazlarında zarar yapan (*Dipsosphesia scopigera* Scop.) adlı bir böcek önem taşımaktadır. Bitkilerin kök boğazlarında 2. yıldan itibaren yerleşerek zarar yapar. 3. ve 4. yıllarında bitkilerin ölmesine yol açarak korunga parsellerini seyrekleştirdiği görülmüştür. Bunu önlemek için birinci yıldaki ekimden sonra ikinci yıl tekrar seyrek bir ekim yapılabilir.

Bitki ıslahındaki ilerlemeler, yonca (*Medicago sativa* L.) çeşitlerinin iyileşmesine yol açsa da, korunga üretimi eski çeşitlere dayanmaya devam etmektedir (Demdoum ve ark. 2012) ve korunga aksesyonlarının genetik çeşitliliği hakkında, anavatanı ve dünyanın diğer bölgeleri de dahil olmak üzere çok az bilgi mevcuttur.

Korungadaki evrim eğilimi kısaca kromozom sayısına göre açıklanmıştır. Goldblatt (1981), $x = 8$ 'in korunga atalarının kromozomu olduğunu ileri sürmüştür ve $x = 7$ olan türlerin anöplid kaybı olduğunu belirtmiştir. Ancak, Falistocco (1991) ve Gomurgen (1996), cins içindeki değerlendirmenin, temel kromozom sayısını artırarak yapıldığını iddia etmiştir. Abou-El-Enain (2002) cinsinin kromozom tipini metasentrik ve submetasentrik arasında değiştiğini ve 1,6 μm (küçük-orta) ile 2,6 μm (orta) arasında uzunluğa sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, cins içerisinde beş farklı kromozom sayısı tespit etmiştir [$(2n = 2x = 14)$, $(2n = 4x = 28)$, $(2n = 2x = 16)$, $(2n = 4x = 32)$ ve $(2n = 8x = 56)$]. Sepet ve arkadaşları (2011) çalıştıkları sekiz türdeki ortalama kromozom uzunluğunun 1.54 μm ile 4.21 μm olduğunu vurgulamışlardır. Temel olarak sitogenetik ile ilgili bir dizi çalışma ve tohum depolama proteinleri cins içindeki filogenetik ilişkileri değerlendirebilir (Abou-El-Enain 2002).

Onobrychis cinsi üzerinde yapılan önceki yıllara ait sitogenetik çalışmalar klasik yöntemlere dayanmakta, ve bir kaç kromozom sayımı ile karyotip analizinin yapıldığı çalışmadan ibarettir. Yapılan çalışmalara göre korunga iki farklı temel kromozom sayısına ($x=7$ ve $x=8$) sahip diploid ($2n=14$ ve $2n=16$) ve dolayısıyla $2n=28$ ve $2n=32$ kromozomlu tetraploid olarak iki farklı ploidi düzeyine sahiptir (Hejazi ve ark. 2010, Yücel 2019).

Cins üzerinde yeni sitogenetik teknikler henüz kullanılmamıştır. Korunga gen bankası aksesyonları nispeten yeni bir sitogenetik teknik olan flow sitometri ile ilk defa bu çalışmada karakterize edilmiş ve bu çalışma öncesine kadar aksesyonların bilinmeyen ploidi düzeyleri belirlenmiştir.

Flow sitometri son yıllarda hızı, kolaylığı, hassasiyeti ve ekonomik olması nedenleriyle ploidi analizlerinde tercih edilen yöntemdir (Johnson ve ark. 1998, Brummer ve ark. 1999, Arumuganathan ve ark. 1999, Tuna ve ark. 2001, Tuna ve ark. 2007). Flow sitometri metodu ile belirlenmiş olan çekirdek DNA içeriği bilgisi tür spesifik olduğu için ploidi analizinin yanısıra evrim ve taksonomik sınıflandırmalarda da son derece yararlıdır ve kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Ohri D. 1998, Naganowska ve ark. 2003, Smarda 2006, Zonneveld 2009, Meiners ve ark. 2011).

2. 2. Flow Sitometri

2.2.1. Tanımı

İlk flow sitometri, UV ışığının emilimine göre, insan hücrelerindeki DNA miktarını ölçmek için kullanılmıştır (Kamentsky ve ark. 1965). Bu yaklaşımın yerini floresans almıştır (Dittrich ve Göhde 1969, Van Dilla ve ark. 1969) ve günümüze kadar DNA içeriği floresans emisyonu ölçülerek dolaylı olarak belirlenmiştir. Çekirdek DNA içeriğini tahmin etmek için, çekirdeklerin ve/veya geçirgenleştirilmiş hücrelerin süspansiyonları, DNA'ya özgü bir florokrom ile boyanır ve her bir çekirdek tarafından yayılan ışık miktarı ölçülür. Analizin sonucu genellikle, nispi DNA içeriğini temsil eden, nispi floresan yoğunluğunun histogramı şeklinde gösterilir. Büyük hücre popülasyonları kısa sürede ölçülebildiğinden, flow sitometri, anöploidi (Kawara ve ark. 1999), apoptotik (Verma ve ark. 2000) ve hücre döngüsü kinetiğini izlemek için biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılmıştır (Rabinovitch 1994).

Yöntemi bitkilerde uygulama girişimleri, bozulmamış hücrelerin ve flow sitometri için uygun çekirdeklerin süspansiyonlarının hazırlanmasındaki zorluklarla engellenmiştir. İlk başarılı deneyde, Heller (1973), pektinaz ve pepsin ile yapılan enzimatik işlemlerden sonra bakla çekirdeklerinin alkol asetik asitle sabitlenmiş kök uçlarından süspansiyonları hazırlamıştır. Çekirdek DNA, etidyum bromür ile boyanmış ve nispi floresan yoğunluğunun analizi, hücre döngüsü kinetiğinin analizi için bir potansiyel göstermiştir. Neredeyse on yıl boyunca, diğerleri bu çalışmayı takip etmemiştir, çünkü o günlerde flow sitometri cihazları, büyük ölçüde biyomedikal araştırmalarla sınırlı uygulamalara sahip pahalı makinelerdi. Örnek hazırlama zahmetlidir ve makalenin Almanca olarak yazılmış olması muhtemelen geniş bir izleyici kitlesine ulaşmasına engel olmuştur.

Sonraki raporlar sadece 1980'lerin başında ortaya çıkmıştır. Daha az popüler olan bir strateji, sağlam hücrelerin içindeki çekirdeklerin DNA içeriğini tahmin etme olasılığını araştırmıştır. Otofloresan olan ve sıvı akışını bozan düzensiz bir hücre şekli veren sert bir hücre duvarının varlığı, izole edilmiş bitki hücrelerini, flow sitometri kullanarak DNA içeriğinin tahmini için uygun hale getirir. Hidrolitik enzimler (selülozlar, pektinazlar) kullanılarak hücre duvarının çıkarılması, hücreleri, flow sitometri içinde düzenli davranış gösteren protoplastlara dönüştürür. Puite ve Ten Broeke (1983) çekirdek DNA'nın bitki protoplastlarında boyalı olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, floresan yoğunluğunun histogramları hücre döngüsü dağılımı açısından yorumlanamamıştır. Bu muhtemelen sitoplazmik otofloresansın ve plazma membranının düşük geçirgenliğinin etkisidir. Etanol-asetik asit ile fiksasyon hücre zarını geçirir ve otofloresansı azaltır. Bununla birlikte, sonuçta

ortaya çıkan histogramların kalitesi oldukça düşüktür (Galbraith and Shields 1982, Puite ve Ten Broeke 1983), muhtemelen çekirdeğin 'merkez dışı' konumundan kaynaklanmaktadır (Galbraith 1990). Daha başarılı bir yaklaşım, protoplastlardan, bir deterjan varlığında veya hipotonik bir ortamda salınabilen bozulmamış çekirdeklerin analizine dayanır ve DNA içeriğinin çok iyi histogramlarına yol açar (Puite ve Ten Broeke 1983, Galbraith 1984, Ulrich ve ark. 1988).

2.2.2. Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı

İlk deneyler, bitkilerdeki DNA içeriğinin, yalnızca protoplastlardan izole edilmiş çekirdekler kullanılarak yeterli hassasiyetle tahmin edilebileceğini göstermiştir. Ancak, bu yaklaşım zor ve zaman alıcıdır. Galbraith ve arkadaşları (1983), uygun bir izolasyon tamponunda küçük bir taze yaprak dokusunun bir jilet ile küçük parçalara ayrılana kadar (60-90s) kesilmesiyle çekirdekleri bütün olarak süspansiyon halinde hücrenin geri kalan kısımlarından izole etmişlerdir. Bu şekilde elde edilmiş olan çekirdekler flow sitometri ile analizi başarılı bir şekilde analiz edilmiştir. Önceki yöntemlerin aksine, bu yöntem son derecede basit, kullanışlı ve hızlı bir yöntemdir. DNA içeriğini tahmin edebilme yeteneği, temel araştırmalardan üreme ve tohum üretimine kadar uzanan ve nükleer genom büyüklüğünün (Hülgenhof ve ark. 1988), ploidi taramasının dahil olduğu çok çeşitli uygulamaları teşvik etmiştir (De Laat ve ark. 1987). Örneğin mixoploidi (Roux ve diğerleri 2001) ve anöploidi saptama (Roux ve ark. 2003), polisomatinin derecesinin değerlendirilmesi (Barow ve Meister 2003), üreme yolları (Matzk ve ark. 2000) ve hücre döngü kinetiği (Sandoval ve ark. 2003) bunlardan bazılarıdır. Bu nedenle, bitkilerde flow sitometri analizlerinin Galbraith ve arkadaşları (1983)'nın başarılı çalışmalarından sonra başladığı ve yaygınlaştığı söylenebilir.

Flow sitometri, göreceli florasans yoğunluğunu analiz ettiğinden, bir örneğin çekirdek DNA içeriği, çekirdek DNA içeriği bilinen bir standard ile kıyaslanarak belirlenmektedir.

DNA içeriği önceden bilinen bitkilerin hücre çekirdekleri ve florasan boncuklar (beads) yaygın olarak kullanılan standartlar arasında yer almaktadır. Mümkünse standart ve analiz edilecek örnek, boyama koşullarının aynı olması için çekirdek izolasyonu başlangıcında karıştırılmalıdır. Florasan boncuklar flow sitometri imalatçıları tarafından sağlanmaktadır. Bunlar, ayrıca flow sitometrenin kalibrasyonu ve histogram piklerinin varyasyon katsayısını minimize etmek için de kullanılmaktadır. Çekirdek DNA analizleri için standart seçiminde, seçilecek bitkinin analizlerde sorun yaratan fenolik bileşikler ve florasan inhibitörlerini bünyelerinde bulundurmamasına dikkat edilmelidir. Ayrıca seçilecek olan bitki

sitolojik olarak homojen bir yapıda olmalı ve gerektiğinde daha sonraki yıllarda yapılacak olan çalışmalarda kullanmak amacıyla elde edilebilinmelidir (Tuna 2004).

Bir türün genom büyüklüğünün belirlenmesinde, rastgele seçilmiş birkaç bitki analiz edilir ve her biri birkaç kez analiz edilir. Aynı bitkinin yinelenen ölçümleri, prosedürdeki varyasyonun tespitini kolaylaştırırken birkaç bitkinin analizi, spesifik olmayan varyasyonun izlenmesine izin verir. Bitki sayısı ve tekrarlanan ölçümler, farklı çalışmalar arasında değişiklik gösterir. Spesifik olmayan genom büyüklüğü varyasyonu incelendiğinde, genom boyutunu güvenilir bir şekilde tahmin etmek için başka birkaç koşulun yerine getirilmesi gerekir: (a) Çekirdekler yeterli miktarda izole edilmeli, sağlam olmalı ve DNA'ları bozulmamalı veya değiştirilmemelidir; (b) DNA boyama, hem hedef hem de standart çekirdekler için spesifik ve stokiyometrik olmalıdır; (c) Referans standardın genom büyüklüğü bilinmelidir. Ne yazık ki, bu üç koşuldan her birinin karşılanması kolay değildir, bu da hatalı sonuçlara yol açabilmektedir.

Bitkilerde yapılan morfolojik ve genetik karakterizasyonun yanında sitolojik karakterizasyon da önemli bir yere sahiptir. Sitolojik çalışmalarda kullanılan tekniklerin, çevresel koşullardan etkilenmemesi, analizin bitkinin herhangi bir parçasında ya da büyüme döneminde yapılabilmesi, analiz sayısının zamanla ve materyalle sınırlı olmaması, analizin bitkinin çok küçük örneklerinde yapılabilmesi de sitolojik çalışmaların önemini arttırmıştır. Ayrıca ıslahta istenilen özelliklerin taranabilmesi için çeşitlerin sitolojik yapıları arasındaki ilişkinin bilinmesi önemli rol oynamaktadır (Özgen ve ark. 2000).

Ersoy ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir ıslah çalışmasında bulunan genotipler arasındaki ploidi seviyelerindeki farklılıkların üreme engeli oluşturduğu ve gen akışını olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bu sebeple herhangi bir ıslah çalışmasından önce bireyler arasında bulunan ploidi seviyesi farklılıkları ve bu farklılıkların derecesi önem arz etmektedir.

Geleneksel olarak ploidi bitki kök ucu hücrelerinde mitotik kromozomları sayarak belirlenmektedir. Yöntem çok fazla zaman, iş gücü ve yüksek oranda bölünen hücreye gereksinim duymaktadır. Bunlara ek olarak, kromozomları küçük veya çok fazla olan türlerde yanlış tespitlere neden olabilmektedir. Özellikle bitki genetik kaynaklarında olduğu gibi çok sayıda bitkinin ploidi düzeyinin belirlenmesi gerektiği durumlarda bu yöntem oldukça yetersiz kalmaktadır.

Tüm bitki kromozomları, hücre çekirdeğinde yer almaktadır ve bitkilerin çekirdek DNA içeriği ile ploidi düzeyleri arasında doğru orantılı bir ilişki bulunmaktadır. Bu ilişki göz

önünde bulundurularak çekirdek DNA içeriğinin ploidi düzeyi belirlemede kullanılabileceği düşünülmüştür. Çekirdek DNA içeriğini hızlı ve hassas bir şekilde belirleyen flow sitometri cihazının geliştirilmesini izleyen yıllarda, çekirdek DNA içeriği bir çok araştırmacı tarafından ploidi düzeyinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Lu ve ark. 1998, Johnson ve ark. 1998, Brummer ve ark. 1999, Tuna ve ark. 2004).

Daha önce açıklandığı gibi, DNA içeriği belirlenen bitkilerden bir kaç tanesinin kök ucu hücrelerinde mitoz kromozomları sayılır ve bu kromozom sayısı diğer bitkilere ait DNA içerikleri ile ilişkilendirilir. Böylece her bitki için kromozom saymaya gerek kalmadan bütün bitkilerin ploidi düzeyi belirlenmiş olur.

Flow sitometri ile ploidi analizinin geleneksel yöntem olan kromozom saymaya göre bazı avantajları vardır. Bunlar; örnek hazırlaması kolay, hızlı (bir günde birkaç yüz örnek analiz edilebilir), bölünen hücre olup olmamasına bağımlı değil (kök ucu meristem hücrelerine gereksinim duymaz), analiz için çok küçük bir yaprak dokusu yeterli ve bir popülasyonda ploidi karışıklıklarının belirlenmesinde kullanılabilir olması şeklinde sıralanabilir. Ploidi analizi, günümüzde flow sitometrenin bitki ıslahı ve tohum üretiminde en yoğun kullanıldığı uygulama alanıdır (Dolezel 1997).

Bazı kültür türlerinde, ticari çeşitler triploid ploidi (örneğin çekirdeksiz karpuz) düzeyine sahiptir. Arzu edilen ploidi düzeyine sahip bu tür çeşitlerin ıslahı, farklı melezleme stratejilerine dayanır. Bu ıslah programlarında flow sitometri hem anaç bitkilerin, hem de onların melezlerinin ploidi düzeyinin belirlenmesinde rutin olarak kullanılmaktadır (Dolezel 1997). Bazı türlerde ise tetraploid çeşitler, diploidlere oranla daha yüksek bir performansa sahiptir. Kasava ve muz bu tip türlere iyi bir örnek teşkil ederler. Kasava ve muz ıslah programlarında, flow sitometri tetraploid bitkilerin belirlenmesi amacıyla rutin bir şekilde kullanılmaktadır (Awolaye ve ark. 1994, Van Duren ve ark. 1996).

CIMMYT de klasik geri melezleme yolu ile tetraploid *Tripsacum dactyloides*’ ten mısıra apomiksis özelliği transfer edilmeye çalışılmıştır. Yürütülen bu projede seksüel kalıntı nedeniyle nadiren meydana gelen ve bir sonraki aşamada kullanılacak olan tip dışı bitkilerin teşhisinde de flow sitometri kullanılmıştır (Dolezel 1997).

Türler arası hibritlerin teşhisinde hızlı, ekonomikliği ve hassasiyeti sebebiyle özellikle fazla sayıda bitki analiz edilmesi gerektiğinde flow sitometri çok yararlıdır. Örneğin, Keller ve ark. (1996) soğanın *Allium* cinsi içerisinde yer alan 19 tür ile melezlenmesinden elde edilen melez bitkilerin teşhisinde flow sitometriyi kullanmışlardır.

Onobrychis cinsi içerisinde iki farklı temel kromozom sayısının ($n=7$ ve $n=8$) bulunması, ve cinsin içerisinde ploidi düzeyinin diploid ile tetraploid arasında değişim göstermesi nedeniyle *Onobrychis* genetik kaynakları bilimsel araştırmalarda kullanılmadan yada ıslah çalışmalarına dahil edilmeden önce doğru bir şekilde teşhis edilmeli ve ploidi düzeyleri belirlenmelidir. Aksi takdirde çeşitli uyumsuzluk sorunları ile karşılaşmak kaçınılmazdır. Bu sorunlarda araştırmacıların zaten kıt olan zaman, insan gücü ve bütçe gibi kaynaklarının heba olmasına neden olacaktır.



3. MATERİYAL VE METOD

Araştırma; Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği laboratuvarında yürütülmüştür.

3. 1. Bitki Materyal

Bu yüksek lisans tezinde, ıslah programlarında kullanmak amacıyla Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan USDA-GRIN (United States Department of Agriculture)'dan temin edilmiş olan ve korunga cinsinin 3 farklı türüne ait toplam 210 aksesyon (88 *Onobrychis viciifolia*, 98 *Onobrychis transcaucasica* ve 24 *Onobrychis arenaria*) bitki materyali olarak kullanılmıştır. Aksesyonların PI numaraları ve onlara ait coğrafi bilgiler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan *Onobrychis viciifolia*, *Onobrychis transcaucasica* ve *Onobrychis arenaria* Aksesyonlarının Aksesyon Numaraları ve Orijinleri

SIRA	AKSESYON NO	TÜR ADI	TOPLANDIĞI YER
1	PI 170582	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
2	PI 170583	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
3	PI 170585	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
4	PI 171725	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
5	PI 171726	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
6	PI 182247	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
7	PI 192993	<i>Onobrychis viciifolia</i>	
8	PI 192994	<i>Onobrychis viciifolia</i>	
9	PI 192995	<i>Onobrychis viciifolia</i>	
10	PI 200872	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
11	PI 201511	<i>Onobrychis viciifolia</i>	
12	PI 204595	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
13	PI 206458	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
14	PI 206459	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye

15	PI 212241	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Washington, ABD
16	PI 223389	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İran
17	PI 225728	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
18	PI 228156	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
19	PI 229612	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İran
20	PI 229613	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İran
21	PI 236486	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
22	PI 237089	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Türkiye
23	PI 239957	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İran
24	PI 239959	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İran
25	PI 250024	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İran
26	PI 258768	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
27	PI 258769	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
28	PI 258770	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
29	PI 258772	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
30	PI 258773	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
31	PI 258776	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
32	PI 259491	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İngiltere
33	PI 259492	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İngiltere
34	PI 259493	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İngiltere
35	PI 263159	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
36	PI 273784	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Litvanya
37	PI 273785	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Ukrayna
38	PI 273786	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Stavropol, Rusya
39	PI 273787	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Kabardino-Balkaria, Rusya

40	PI 273788	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Ukrayna
41	PI 273790	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Krasodar, Rusya
42	PI 273791	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Ukrayna
43	PI 302936	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
44	PI 302937	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
45	PI 302938	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
46	PI 302939	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
47	PI 306693	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İtalya
48	PI 311468	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
49	PI 311469	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
50	PI 313046	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
51	PI 313047	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Almanya
52	PI 313049	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Polonya
53	PI 313050	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
54	PI 313053	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
55	PI 313054	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
56	PI 313055	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
57	PI 313056	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Norveç
58	PI 313057	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
59	PI 313060	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
60	PI 313064	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İtalya
61	PI 313066	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Bulgaristan
62	PI 316296	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Eski Sovyetler Birliği
63	PI 318602	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İsviçre
64	PI 318603	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İsviçre
65	PI 313604	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İsviçre

66	PI 318605	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İsviçre
67	PI 318606	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İsviçre
68	PI 319059	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
69	PI 319060	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
70	PI 319061	<i>Onobrychis viciifolia</i>	İspanya
71	PI 319713	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Romanya
72	PI 338651	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Fas
73	PI 372829	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Çekya
74	PI 372831	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Çekya
75	PI 372833	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Çekya
76	PI 372834	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Çekya
77	PI 372835	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Çekya
78	PI 401467	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Romanya
79	PI 440577	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Kazakistan
80	PI 494668	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Romanya
81	PI 494669	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Romanya
82	PI 502554	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Rusya
83	PI 561106	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Hakkari, Türkiye
84	PI 561107	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Van, Türkiye
85	PI 568208	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Afyon, Türkiye
86	PI 600767	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Meksika
87	PI 639688	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Wyoming, ABD
88	W6 12992	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Çin
89	PI 228154	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
90	PI 251697	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
91	PI 251698	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği

92	PI 273753	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Azerbeycan
93	PI 273754	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
94	PI 273755	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Krasnodar, Rusya
95	PI 273756	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Tahran, İran
96	PI 273757	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
97	PI 273758	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Azerbeycan
98	PI 273760	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
99	PI 273761	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
100	PI 273762	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
101	PI 273763	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Gürcistan
102	PI 273764	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
103	PI 273765	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
104	PI 273766	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	
105	PI 273767	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ukrayna
106	PI 273768	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Özbekistan
107	PI 273769	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Voronezh, Rusya
108	PI 273770	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Krasnodar, Rusya
109	PI 273772	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Azerbeycan
110	PI 273774	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Kuzey Osetya, Rusya
111	PI 273775	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
112	PI 273776	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
113	PI 273777	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Gürcistan
114	PI 273779	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Gürcistan
115	PI 273780	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
116	PI 273781	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Ermenistan
117	PI 273783	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Stavropol, Rusya

118	PI 312974	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
119	PI 312975	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
120	PI 312976	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
121	PI 312977	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	İran
122	PI 312978	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
123	PI 312979	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
124	PI 312980	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Türkiye
125	PI 312981	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Türkiye
126	PI 312982	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
127	PI 312983	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
128	PI 312984	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
129	PI 312985	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
130	PI 312986	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
131	PI 312987	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
132	PI 312988	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
133	PI 312989	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
134	PI 312990	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
135	PI 312991	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
136	PI 312992	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
137	PI 312994	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
138	PI 312995	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
139	PI 312996	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
140	PI 312997	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
141	PI 312998	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
142	PI 312999	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
143	PI 313000	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği

144	PI 313002	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
145	PI 313003	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
146	PI 313005	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
147	PI 313007	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
148	PI 313008	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
149	PI 313009	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
150	PI 313010	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
151	PI 313011	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
152	PI 313012	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
153	PI 313013	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
154	PI 313014	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekoslovakya
155	PI 313015	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
156	PI 313016	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
157	PI 313018	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
158	PI 313019	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
159	PI 313020	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
160	PI 313029	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
161	PI 313032	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
162	PI 313033	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
163	PI 313034	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
164	PI 313035	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
165	PI 313037	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
166	PI 313038	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
167	PI 313039	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
168	PI 313042	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
169	PI 313043	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği

170	PI 313044	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
171	PI 314097	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
172	PI 314098	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
173	PI 316294	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çin
174	PI 318601	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	İsviçre
175	PI 372813	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
176	PI 372814	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
177	PI 372817	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
178	PI 372818	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
179	PI 372819	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
180	PI 372820	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
181	PI 372821	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
182	PI 372822	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
183	PI 372823	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
184	PI 372826	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
185	PI 372827	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Çekya
186	PI 403969	<i>Onobrychis transcaucasica</i>	Eski Sovyetler Birliği
187	PI 273744	<i>Onobrychis arenaria</i>	Kazakistan
188	PI 273749	<i>Onobrychis arenaria</i>	Ukrayna
189	PI 297921	<i>Onobrychis arenaria</i>	Avustralya
190	PI 312911	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
191	PI 312912	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
192	PI 312913	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
193	PI 312914	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
194	PI 312915	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
195	PI 312916	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği

196	PI 312917	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
197	PI 312918	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
198	PI 312919	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
199	PI 312920	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
200	PI 312921	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
201	PI 312923	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
202	PI 312924	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
203	PI 312926	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
204	PI 312927	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
205	PI 368032	<i>Onobrychis arenaria</i>	Ankara, Türkiye
206	PI 372798	<i>Onobrychis arenaria</i>	Çekya
207	PI 372799	<i>Onobrychis arenaria</i>	Çekya
208	PI 372800	<i>Onobrychis arenaria</i>	Çekya
209	PI 392387	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği
210	PI 505891	<i>Onobrychis arenaria</i>	Eski Sovyetler Birliği

Yürütülen bu tez çalışması ile; halihazırda bulunan korunga aksesyonlarının ekirdek DNA içeriği ve ploidi seviyesinin belirlenmesi amaçlanmıştır ve buna yönelik çalışmalarda her aksesyondan 5 adet bitki kullanılmıştır. Bitki dokusu olarak, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü iklim odasında yetiştirilmekte olan genç ve sağlıklı bitkilerden elde edilen taze yaprak dokuları kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Bitkilerin Deneme Alanındaki Görünüşleri

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Aksesyonlara ait tohumların az sayıda olması nedeniyle her aksesyon için yeterli sayıda fideyi elde edebilmek amacıyla tohumlar önce 2017 yılının Mart-Nisan aylarında 3:1 steril torf ve perlit kullanılarak viyollerde çimlendirilmiştir. Çimlenme sonrası elde edilen korunga fideleri, viyoldeki her gözenekte tek bitki kalacak şekilde seyreltilmiştir. Koleksiyonda yer alan 88 *Onobrychis viciifolia*, 24 *Onobrychis araneria* ve 98 *Onobrychis transcaucasia* aksesyonu bu şekilde çimlendirilmiş ve fideler yeterince geliştikten sonra 2017 bahar aylarında aralıklı (1 m x 1 m) olarak tarlaya şaşırtılmıştır (Şekil 3.1.). Gerekli oldukça bakım ve sulama işlemi yapılmıştır.

3.2.2. Flow Sitometri ile Çekirdek DNA Analizi (pg)

Çekirdek DNA analizleri Tarla Bitkileri Bölümü, Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında bulunan PARTEC marka Flow sitometri cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çekirdek DNA analizi 2017 bahar aylarında tarlada yetişmekte olan bitkilerden elde edilen taze yaprak dokuları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler her aksesyon için 5 tek bitki

üzerinde ayrı ayrı yapılmış ve bu değerler kullanılarak aksesyon ortalaması hesaplanmıştır. Analizlerde standart olarak 2C çekirdek DNA içeriği tarafımızdan 3,65 pg olarak hesaplanmış yaygın fiğ (*Vicia sativa*) bitkisi kullanılmıştır.

Çalışmamızda örnekler Partec firmasının nukleus izolasyon ve DNA boyama ticari kiti (CyStain PI absolute P) kullanılarak hazırlanmıştır. Çekirdek DNA analizi için öncelikle aşağıda sunulmuş olan protokol kullanılarak korunga yaprak dokularından nukleus izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 3.2. Korunga ve Standart Olarak Kullanılan Fiğ Bitkilerine Ait Yaprak Dokularının Petri Kabı İçerisindeki Görünüşü



Şekil 3.3. Yaprak Dokuları Kullanılarak Örneğin Flow Sitometrik Analiz İçin Hazırlanması

1) Korunga fidelerinin yapraklarından alınmış yaklaşık 40 mg bitki dokusu ve 20 mg standart olarak kullanılan bitki dokusu (*Vicia sativa*) petri kabına yerleştirilmiştir ve üzerine 500 µl izolasyon buffer ilave edilmiştir (Şekil 3.2.).

2) Dokular, keskin jilet ile küçük parçalara ayrılana kadar (30-60 saniye) parçalanmıştır (Şekil 10). Bu şekilde hazırlanan örnek petri kabı içinde 15-20 saniye çalkalanmıştır.

3) Çalkalama sonrasında bitki kalıntıları ile çekirdek ihtiva eden tampon 30 µm CellTrics süzme aralıklarına sahip filtreden geçirilerek tüp içine transfer edilen çekirdeklerin bitki doku kalıntılarından ayrılması sağlanmıştır.

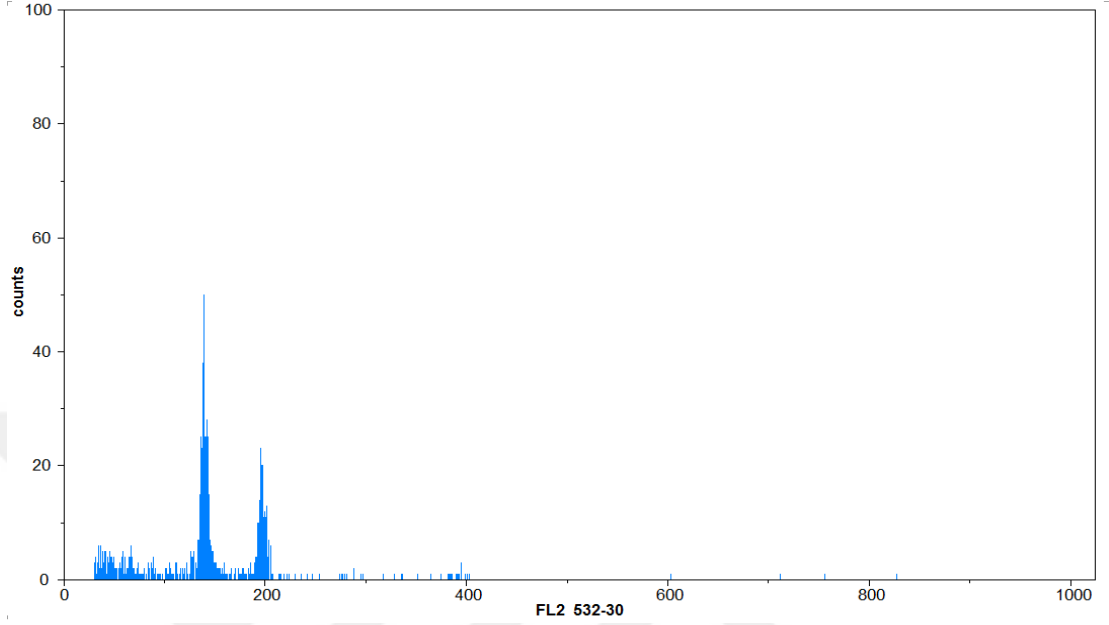
4) Tüp içerisine daha önce hazırlanmış olan 2 ml staining solüsyonu eklenerek karanlık ortamda yaklaşık 60 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler inkübe edildikten sonra flow sitometri cihazında analiz edilmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Örneklerin Boyanması ve Karanlıkta İnkübe Edilmesi

Yukarıda sunulmuş olan protokolü takip ederek muamele edilmiş bitki dokusu hücreleri mekanik olarak birbirinden ayrılmış, hücre çekirdekleri serbest kalmış, çekirdek zarı buffer tarafından içerilen bazı kimyasal maddeler ile tahriş edilmiş ve çekirdek zarı üzerinde açıklıklar (delik) oluşmuştur. Staining solusyonun içerdiği propidium iodide (nükleik asitlere bağlanma özelliğine sahip floresan boya) bu açıklıklardan yararlanarak çekirdek içerisine girmiş ve nükleik asitlere bağlanmıştır. Burada çekirdeğin içerisine giren PI (propidium iodide) miktarı çekirdek içerisinde bulunan DNA miktarı ile orantılıdır. Çekirdek DNA içeriği arttıkça çekirdek içerisine giren ve bağlanan PI miktarı da aynı oranda artmaktadır. Bu protokoller ile hazırlanmış örnekler içerisinde bulunan hücre çekirdekleri flow sitometri ile yapılan analiz sırasında lazer ışığı önünden geçerken içerdiği PI miktarı (dolaylı olarak DNA içeriği) ile doğru orantılı olarak floresan ışığı yayar. Yayılan floresanlar cihazın içerisinde

bulunan ilgili bölümlerde bir dizi işlemten geçtikten sonra dijital değerlere dönüşür ve bilgisayar monitörüne histogram olarak yansır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Flow Sitometri Cihazındaki Histogram Görüntüsü

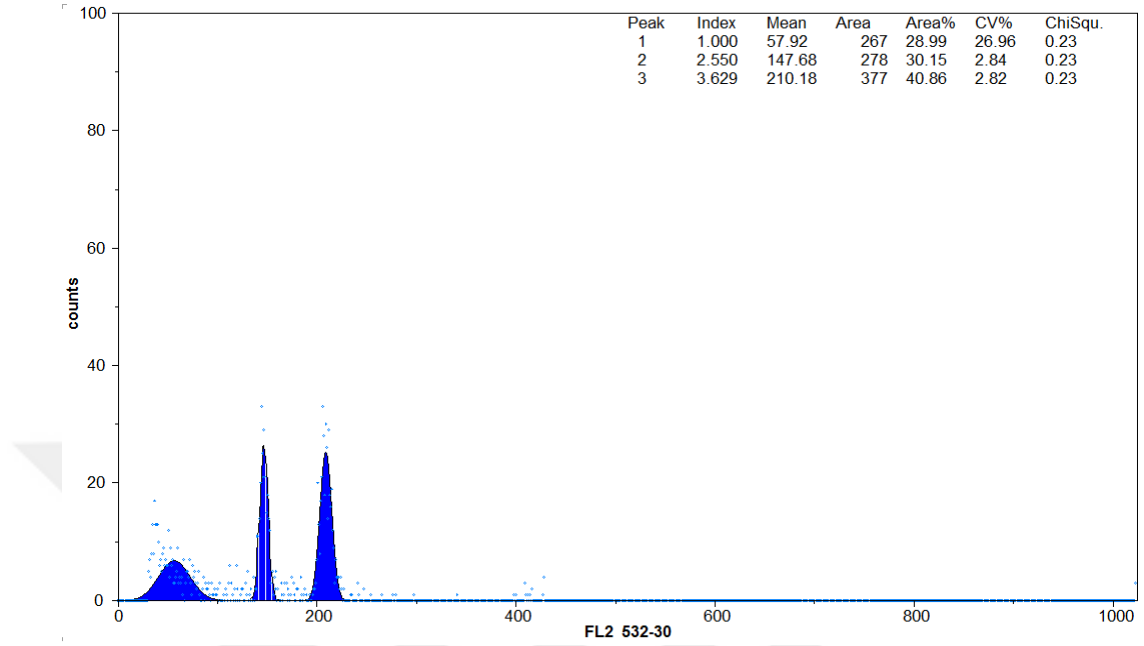
Histogramın dikey eksenini; analiz edilen hücre sayısını, yatay eksenini ise; analiz edilen örneklerin floresan yoğunluğunu göstermektedir. Yatay eksenin sağına doğru gittikçe floresan yoğunluğu dolayısıyla DNA içeriği artmaktadır.

Flow sitometri ile yapılan rutin çekirdek DNA analizlerinde her örnek için yaklaşık 10000 çekirdeğin DNA içeriği belirlenir ve ortalaması analiz edilen örneğin çekirdek DNA içeriği olarak sunulur. Hassas bir analiz için histogram üzerinde bulunan pikler mümkün olduğunca ince ve uzun olmalıdır. Piklerin şekli flow sitometri cihazını kalibre ederek ve örneği dikkatli hazırlayarak daha kaliteli bir hale getirilebilir.

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

Korunganın çekirdek DNA içeriği belirlenmesi, korunga ve standard olarak kullanılan fiğ bitkilerine ait G1 piklerinin floresan yoğunlukları kıyaslanarak yapılmıştır. Yukarıda açıklandığı gibi hazırlanmış bir örnek flow sitometri cihazı ile analiz edildiğinde yukarıdaki flow histogramı elde edilmiştir (Şekil 3.5.). Cihazın sahip olduğu flow max programı

kullanılarak histogram analiz edildiğinde histogram aşağıdaki histograma (Şekil 3.6.) dönüşmektedir.



Şekil 3.6. Flow Histogramın Flow Max Programı İle Analiz Edilmesi Sonrasındaki Görünüşü

Çalışma kapsamında analiz edilmiş olan her örnek bitkinin ve kullanılan standardın G1 piklerinin florosan yoğunluklarına ait değerler (Şekil 3.6.) sunulan histogramın sağ üst köşesinde yer alan mean değerleri) kullanılarak aşağıdaki formül aracılığıyla örneklerin çekirdek DNA içerikleri pikogram olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Çekirdek DNA miktarı} = \frac{\frac{\text{DNA miktarı bilinmeyen türe ait florasan yoğunluğu}}{\text{(G1 pikinin değeri)}}}{\frac{\text{Standarda ait örneğin florasan yoğunluğu}}{\text{(G1 pikinin değeri)}}} \times \text{standardın DNA içeriği}$$

Değerler denklemde yerlerine yazılarak her örnekteki çekirdek DNA içeriği pikogram cinsinden bulunmuştur.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Onobrychis viciifolia, *Onobrychis transcaucasica* ve *Onobrychis arenaria* aksesyonlarına ait çekirdek DNA içeriklerinin istatistiksel analizi 5 tekrarlamalı tesadüf parselleri deneme desenine göre SPSS istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılık ile önemliliğin belirlenmesinde Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

3.2.5. Çekirdek DNA içeriği ile ploidi düzeyinin ilişkilendirilmesi

Korunga aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri ile ploidi düzeyleri bir kaç bitkinin mitotik kromozomlarını mikroskop ile sayarak ilişkilendirilmiştir. Kromozom sayımları tarla ve serada saksılarda yetiştirilmekte olan bitkilerden elde edilen kök ucu meristem dokuları kullanılarak hazırlanan preparatlar üzerinde bulunan, ve iyi dağılmış ve düzgün morfolojiye sahip kromozomlar sayılarak yapılmıştır.

3.2.4.1. Bitki kök uçlarının eldesi

Kök ucu hasadı saksılarda yetiştirilmekte olan ergin bitkilerden bahar aylarında sabah erken saatlerde (9-10) yapılmış ve sadece saksıların dibinde bulunan beyaz görünümlü hızlı büyüyen kök uçları hasat edilmiştir.

3.2.4.2. İlk işlem

Korunga bitkisinin kök uçları 16-20 saat soğuk su (+4 °C) ile muamele edilmiştir.

3.2.4.3. Materyalin tespiti

24 saat soğuk su muamelesinden sonra kök uçları 3:1 alkol:asetik asit solusyonunda tespit edilmiştir ve kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Bu şekilde muamele edilmiş kök uçları 3-4 ay kadar muhafaza edilebilmektedir).

3.2.4.4. Kök uçlarının selüloz enzimleri ile muamele edilmesi ve preparatların hazırlanması

Farmer solusyonu içerisinde bulunan kök uçları enzim solusyonuna transfer etmeden önce 4 defa 5-6 dakika için 1x enzim solusyonu içerisinde bekletilerek farmer solusyonu kök ucu dokularından tamamen uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kök uçları enzim solusyonuna (Cellulose RS, Cellulase calbiocem ve Pectinase) transfer edilerek, 37 °C'de enzim ile tamamen parçalanana kadar inkube edilmiştir.

Preparat yapmada kullanılan kök uçları enzim solusyonundan çıkartılarak buz üzerine yerleştirilmiş bir kap içerisinde bulunan 1x enzim solusyonu içerisine transfer edilmiştir. Bu şekilde muamele edilmiş olan kök uçlarından preparatlar bir damla % 45'lik asetik asit kullanılarak ezme yöntemiyle hazırlanmıştır. Preparatlar faz kontrastı olan bir mikroskop ile hızlı bir şekilde kontrol edilerek çok sayıda iyi dağılmış mitoz kromozomlu hücreye sahip olan preparatlar seçilerek lamelin çıkartılabilmesi için, yaklaşık bir saat kadar kuru buz (ya da -80 °C'de) üzerine yerleştirilmiş ve lamel uzaklaştırıldıktan sonra slaytlar bir saat oda şartlarında kurutulmuştur.

3.2.4.5. DAPI ile mitoz kromozomların boyanması

Kurutulmuş olan preparatlar üzerine 10 µl Vectashield-Dapi solusyonu ilave edilerek 24x24 cam lamel yerleştirilmiştir. Preparatlar bir kaç saat soğuk (4 °C) ve karanlıkta bekletildikten sonra floresan mikroskop ile incelenerek kromozom sayımı yapılmıştır.

3.2.4.6. Fotoğraf çekimi

Hazırlanan slaytlar olympus marka BX 51 model mikroskobuna yerleştirildikten sonra, hücrelerin fotoğrafları 10 x 100 = 1000 kez büyütülerek spot marka Rt Slider model CCD dijital kamera ile çekilmiştir. Morfolojisi düzgün, sayılabilen ve kromozom sayısı tam olan hücrelerin kromozomları sayılmış ve fotoğrafları çekilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çekirdek DNA Analizi

Gen bankalarında muafaza edilmekte olan korunga aksesyonları üzerinde çekirdek DNA analizi ilk defa tarafımızdan yürütülmüş olan bu tez çalışmasında yapılmıştır. Korunga bitkilerinin sahip olduğu tanenler başlangıçta sorun oluşturmuş olsa da protokol üzerinde yapılmış olan bazı küçük değişiklikler ile protokol korunga bitkileri için optimize edilmiş ve örneklerin analizi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *O. transcaucasica*, *O. viciifolia*, ve *O. arenaria* türlerinin ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri sırasıyla 2.657, 2.640, 2.632 pg olarak hesaplanmıştır. Türlerin ortalama değerleri arasındaki farklılıklar yöntemin hassasiyet derecesi olan % 4'ün çok altında olması nedeniyle önemsiz olarak kabul edilmiştir. Aksesyonların çekirdek DNA içerikleri tür bazında ayrı ayrı olarak aşağıda sunulmuştur.

4.1.1. *Onobrychis viciifolia*

Çalışmada USDA gen bankasından temin edilmiş 88 *Onobrychis viciifolia* aksesyonu kullanılmış ve her aksesyondan 5 bitki analiz edilmiştir. Analiz edilmiş 5 bitkinin ortalaması alınarak aksesyon ortalamaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. *Onobrychis viciifolia* Aksesyonlarının Piko Gram Olarak Ortalama 2C Çekirdek DNA İçerikleri

Aksesyon Numarası	Çekirdek DNA Ortalaması	Grup
W6 12992	2.78	A
PI 319713	2.75	AB
PI 204595	2.74	ABC
PI 225728	2.74	ABC
PI 236486	2.73	ABC
PI 263159	2.72	ABC
PI 250024	2.72	ABC

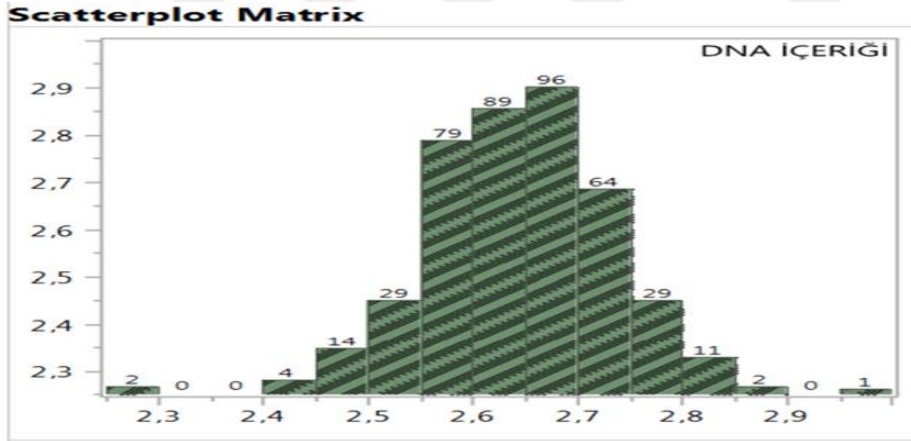
PI 313057	2.71	ABC
PI 273791	2.71	ABC
PI 494669	2.70	ABC
PI 239959	2.69	ABCD
PI 561106	2.69	ABCD
PI 239957	2.69	ABCD
PI 259493	2.68	ABCD
PI 192993	2.68	ABCD
PI 318603	2.68	ABCD
PI 258768	2.68	ABCD
PI 273784	2.67	ABCD
PI 273785	2.67	ABCD
PI 372829	2.67	ABCD
PI 561107	2.67	ABCD
PI 319060	2.67	ABCD
PI 259491	2.66	ABCD
PI 259492	2.66	ABCD
PI 306693	2.66	ABCD
PI 639688	2.66	ABCD
PI 311468	2.66	ABCD
PI 502554	2.66	ABCD
PI 318605	2.65	ABCD
PI 223389	2.65	ABCD
PI 313060	2.65	ABCD

PI 171726	2.65	ABCD
PI 302938	2.65	ABCD
PI 313055	2.65	ABCD
PI 494668	2.65	ABCD
PI 319059	2.65	ABCD
PI 313054	2.65	ABCD
PI 229612	2.65	ABCD
PI 258769	2.64	ABCD
PI 372835	2.64	ABCD
PI 204595	2.64	ABCD
PI 171725	2.64	ABCD
PI 401467	2.64	ABCD
PI 313056	2.64	ABCD
PI 302936	2.64	ABCD
PI 600767	2.63	ABCD
PI 372831	2.63	ABCD
PI 318606	2.63	ABCD
PI 182247	2.63	ABCD
PI 313050	2.63	ABCD
PI 316296	2.63	ABCD
PI 313046	2.63	ABCD
PI 273787	2.63	ABCD
PI 313049	2.63	ABCD
PI 372833	2.63	ABCD

PI 229613	2.63	ABCD
PI 319713	2.62	ABCD
PI 313064	2.62	ABCD
PI 258773	2.62	ABCD
PI 170582	2.62	ABCD
PI 258772	2.61	ABCD
PI 200872	2.61	ABCD
PI 318602	2.61	ABCD
PI 273790	2.61	ABCD
PI 313053	2.61	ABCD
PI 302939	2.61	ABCD
PI 258776	2.61	ABCD
PI 302937	2.61	ABCD
PI 212241	2.60	ABCD
PI 568202	2.60	ABCD
PI 311469	2.60	ABCD
PI 192994	2.59	ABCD
PI 273786	2.59	ABCD
PI 170583	2.59	ABCD
PI 170585	2.58	ABCD
PI 258770	2.58	ABCD
PI 313047	2.57	ABCD
PI 313604	2.57	ABCD
PI 273788	2.57	ABCD

PI 440577	2.57	ABCD
PI 237089	2.56	ABCD
PI 192995	2.56	ABCD
PI 206459	2.56	ABCD
PI 319061	2.56	ABCD
PI 201511	2.54	BCD
PI 228156	2.53	CD
PI 372834	2.52	CD
PI 313066	2.49	D

Yapılan analiz sonuçlarına göre *O. viciifolia* aksesyonlarının ortalama çekirdek DNA içeriklerinin 2.49 pg/2C ile 2.78 pg/2C arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.1.).

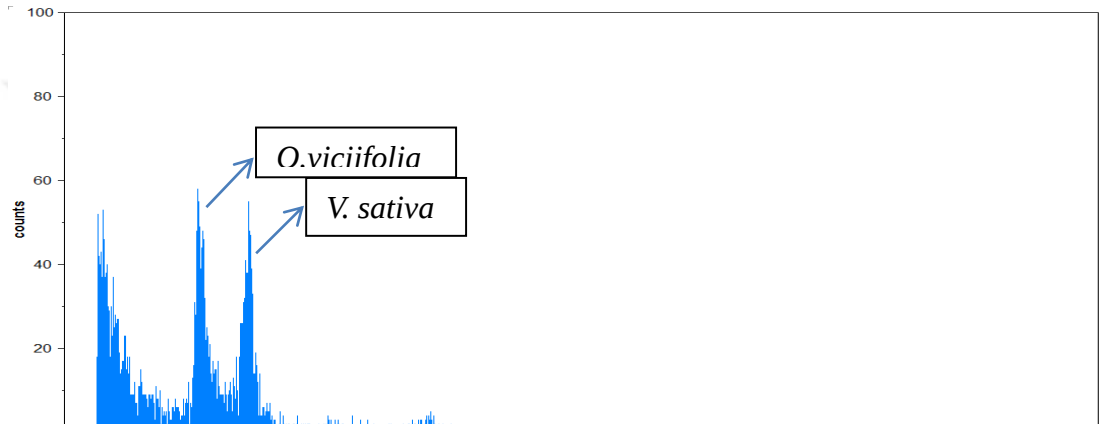


Şekil 4.1. Scatterplot Matrix Dağılımına Göre *Onobrychis viciifolia* Aksesyonlarının Ortalama Çekirdek DNA İçeriği Dağılımı

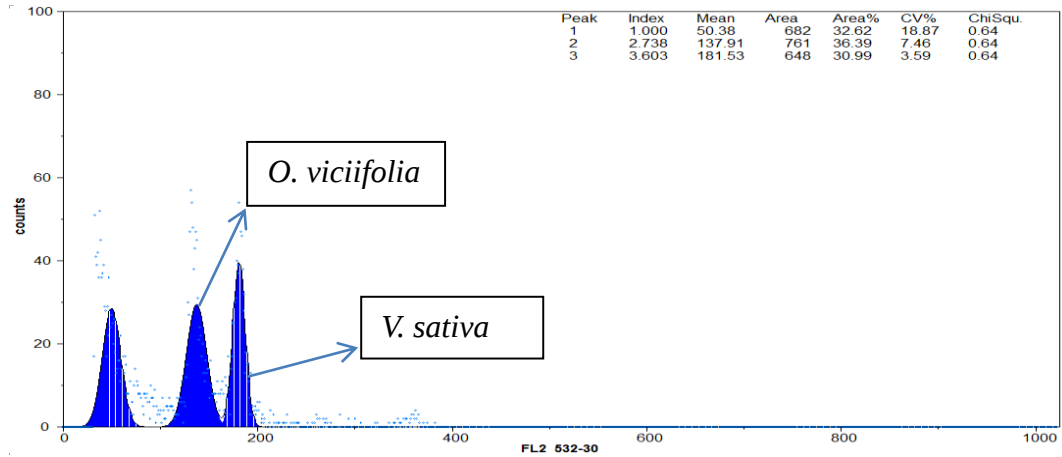
Yapılan istatistiksel analiz sonucu aksesyonların çekirdek DNA ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu saptanmış ve *O. viciifolia* aksesyonlarının 7 farklı gruba ayrıldığı gözlenmiştir. 1. grupta (grup A) ortalama çekirdek DNA içeriği 2.78 pg/2C olan tek bir aksesyon yer almaktadır. 2. grupta (grup AB) ortalama çekirdek DNA içeriği 2.75

pg/2C olan yine tek bir aksesyon yer almaktadır. 3. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.70 pg/2C ile 2.74 pg/2C olan 8 aksesyon yer almaktadır. 4. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.56 pg/2C ile 2.69 pg/2C olan 74 aksesyon yer almaktadır. 5. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.54 pg/2C olan tek bir aksesyon yer almaktadır. 6. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.52 pg/2C ile 2.53 pg/2C olan 2 aksesyon yer almaktadır. 7. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.49 pg/2C olan tek bir aksesyon yer almaktadır.

Şekil 4.2.'de *Onobrychis viciifolia* ve standart olarak kullanılan *Vicia sativa* bitkilerine ait G1 piklerinin bir birine göre pozisyonları görülmektedir.



Şekil 4.2. *Onobrychis viciifolia* (solda) ve Standart Olarak Kullanılan *Vicia sativa* (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Bir Birine Göre Pozisyonları



Şekil 4.3. *Onobrychis viciifolia* (solda) ve Standart Olarak Kullanılan *Vicia sativa* (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Flow Sitometri Paket Programı Tanımlanmış Hali

4.1.2. *Onobrychis transcaucasica*

Çalışmada USDA gen bankasından temin edilmiş 98 *Onobrychis transcaucasica* aksesyonu kullanılmış ve her aksesyondan 5 bitki analiz edilmiştir. Analiz edilmiş 5 bitkinin ortalaması alınarak aksesyon ortalamaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. *Onobrychis transcaucasica* Aksesyonlarının Piko Gram Olarak Ortalama 2C Çekirdek DNA İçerikleri

Aksesyon Numarası	Çekirdek DNA Ortalaması	Grup
PI 312990	2.77	A
PI 313016	2.75	AB
PI 313005	2.75	AB
PI 312989	2.75	AB
PI 312985	2.75	AB
PI 313032	2.74	AB
PI 312983	2.74	AB
PI 313034	2.74	ABC
PI 273775	2.73	ABCD
PI 273783	2.73	ABCD
PI 403969	2.73	ABCD
PI 312995	2.73	ABCD
PI 313020	2.72	ABCD
PI 312976	2.72	ABCD
PI 313009	2.71	ABCD
PI 273767	2.71	ABCD
PI 273753	2.71	ABCD
PI 313029	2.71	ABCD

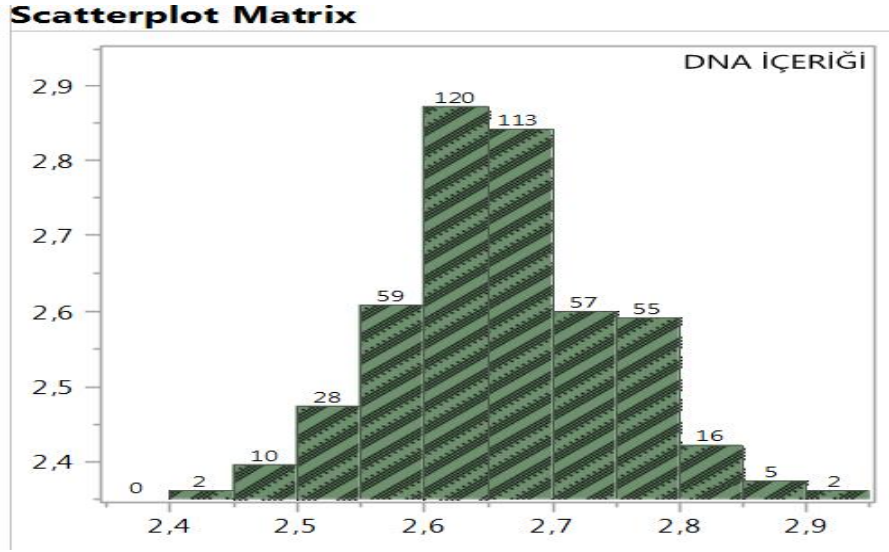
PI 312997	2.70	ABCD
PI 313011	2.70	ABCD
PI 273769	2.70	ABCD
PI 313019	2.70	ABCD
PI 312974	2.70	ABCD
PI 273780	2.69	ABCD
PI 273779	2.69	ABCD
PI 312982	2.69	ABCD
PI 312996	2.69	ABCD
PI 312979	2.67	ABCD
PI 372819	2.67	ABCD
PI 372821	2.67	ABCD
PI 312977	2.67	ABCD
PI 313037	2.67	ABCD
PI 318601	2.67	ABCD
PI 313044	2.67	ABCD
PI 312986	2.66	ABCD
PI 372822	2.66	ABCD
PI 312991	2.66	ABCD
PI 273781	2.66	ABCD
PI 313035	2.66	ABCD
PI 312998	2.66	ABCD
PI 316294	2.66	ABCD
PI 273772	2.65	ABCD

PI 313039	2.65	ABCD
PI 273768	2.65	ABCD
PI 313014	2.65	ABCD
PI 312992	2.65	ABCD
PI 273774	2.65	ABCD
PI 228154	2.65	ABCD
PI 313010	2.65	ABCD
PI 273754	2.65	ABCD
PI 313018	2.65	ABCD
PI 372817	2.65	ABCD
PI 273777	2.65	ABCD
PI 273755	2.64	ABCD
PI 313033	2.64	ABCD
PI 312984	2.64	ABCD
PI 273763	2.64	ABCD
PI 312988	2.64	ABCD
PI 312978	2.64	ABCD
PI 372813	2.64	ABCD
PI 273757	2.63	ABCD
PI 372818	2.63	ABCD
PI 372826	2.63	ABCD
PI 273776	2.63	ABCD
PI 372823	2.63	ABCD
PI 273758	2.63	ABCD

PI 273765	2.63	ABCD
PI 273756	2.62	ABCD
PI 372820	2.62	ABCD
PI 313008	2.62	ABCD
PI 131015	2.62	ABCD
PI 313002	2.62	ABCD
PI 372814	2.62	ABCD
PI 372827	2.62	ABCD
PI 273762	2.62	ABCD
PI 313012	2.62	ABCD
PI 251698	2.62	ABCD
PI 312975	2.62	ABCD
PI 313000	2.61	ABCD
PI 313043	2.61	ABCD
PI 313038	2.61	ABCD
PI 313007	2.60	ABCD
PI 312994	2.60	ABCD
PI 314098	2.60	ABCD
PI 313003	2.60	ABCD
PI 273770	2.60	ABCD
PI 312999	2.59	ABCD
PI 273760	2.59	ABCD
PI 273766	2.59	ABCD
PI 251697	2.59	ABCD

PI 313013	2.59	ABCD
PI 312981	2.58	ABCD
PI 273761	2.57	ABCD
PI 314097	2.57	ABCD
PI 312987	2.56	ABCD
PI 313042	2.55	BCD
PI 273764	2.54	CD
PI 312980	2.53	D

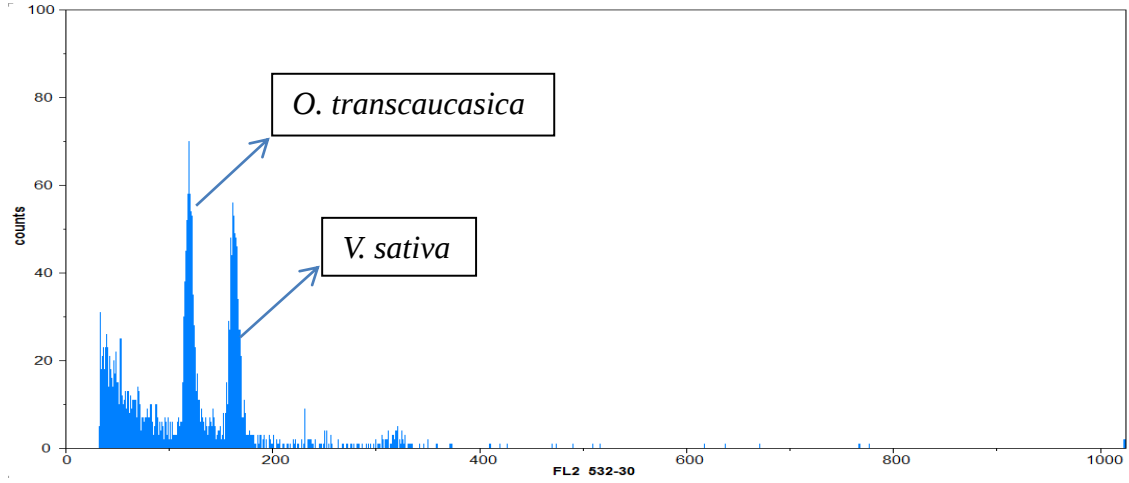
Yapılan analiz sonuçlarına göre *O. transcaucasica* aksesyonlarının ortalama çekirdek DNA içeriklerinin 2.53 pg/2C ile 2.77 pg/2C arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.4.).



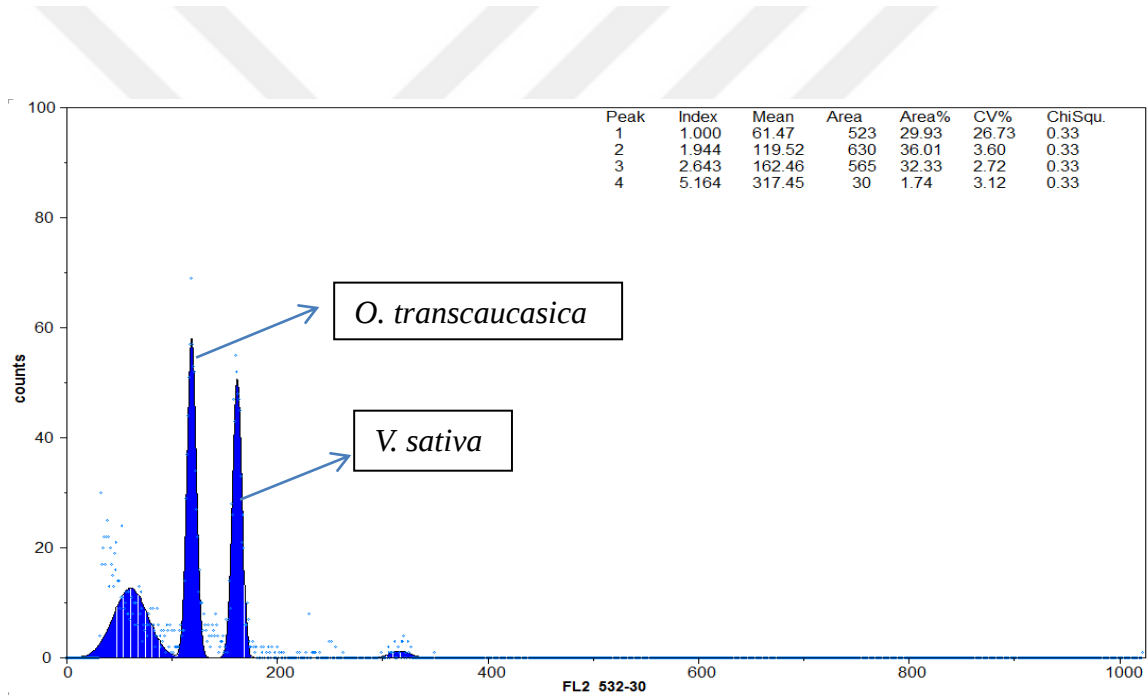
Şekil 4.4. Scatterplot Matrix Dağılımına Göre *Onobrychis transcaucasica* Aksesyonlarının Ortalama Çekirdek DNA İçeriği Dağılımı

Yapılan istatistiksel analiz sonucu aksesyonların çekirdek DNA ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu saptanmış ve *O. transcaucasica* aksesyonlarının 7 farklı gruba ayrıldığı gözlenmiştir. 1. grupta (grup A) ortalama çekirdek DNA içeriği 2.77 pg/2C olan tek bir aksesyon yer almaktadır. 2. grupta (grup AB) ortalama çekirdek DNA içeriği 2.74 pg/2C ile 2.75 pg/2C olan 6 aksesyon yer almaktadır. 3. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.74 pg/2C olan yine tek bir aksesyon yer almaktadır. 4. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.56 pg/2C ile 2.73 pg/2C olan 87 aksesyon yer almaktadır. 5. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.55 pg/2C olan tek bir aksesyon yer almaktadır. 6. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.54 pg/2C olan tek bir aksesyon yer almaktadır. 7. grupta ortalama çekirdek DNA içeriği 2.53 pg/2C olan tek bir aksesyon yer almaktadır.

Şekil 19'da *Onobrychis transcaucasica* ve standart olarak kullanılan *Vicia sativa* bitkilerine ait G1 piklerinin bir birine göre pozisyonları görülmektedir.



Şekil 4.5. *Onobrychis transcaucasica* (solda) ve Standart Olarak Kullanılan *Vicia sativa* (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Bir Birine Göre Pozisyonları



Şekil 4.6. *Onobrychis transcaucasica* (solda) ve Standart Olarak Kullanılan *Vicia sativa* (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Flow Sitometri Paket Programı Tanımlanmış Hali

4.1.3. *Onobrychis arenaria*

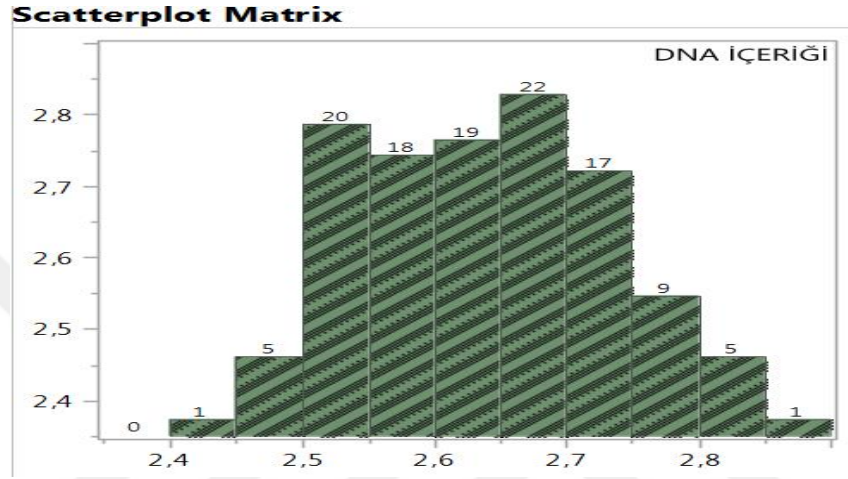
Çalışmada USDA gen bankasından temin edilmiş 24 *Onobrychis arenaria* aksesyonu kullanılmış ve her aksesyondan 5 bitki analiz edilmiştir. Analiz edilmiş 5 bitkinin ortalaması alınarak aksesyon ortalamaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. *Onobrychis arenaria* Aksesyonlarının Piko Gram Olarak Ortalama 2C Çekirdek DNA İçerikleri

Aksesyon Numarası	Çekirdek DNA Ortalaması	Grup
PI 312920	2.75	A
PI 372800	2.72	AB
PI 312916	2.72	AB
PI 372799	2.70	AB
PI 273744	2.69	AB
PI 312926	2.67	AB
PI 312914	2.67	AB
PI 372798	2.67	AB
PI 273749	2.67	AB
PI 312927	2.66	AB
PI 312919	2.65	AB
PI 312918	2.64	AB
PI 312923	2.62	AB
PI 312921	2.61	AB
PI 312924	2.61	AB
PI 312911	2.59	AB
PI 312913	2.58	AB
PI 312912	2.57	AB
PI 392387	2.56	B
PI 312915	2.56	B
PI 312917	2.55	B
PI 505891	2.54	B

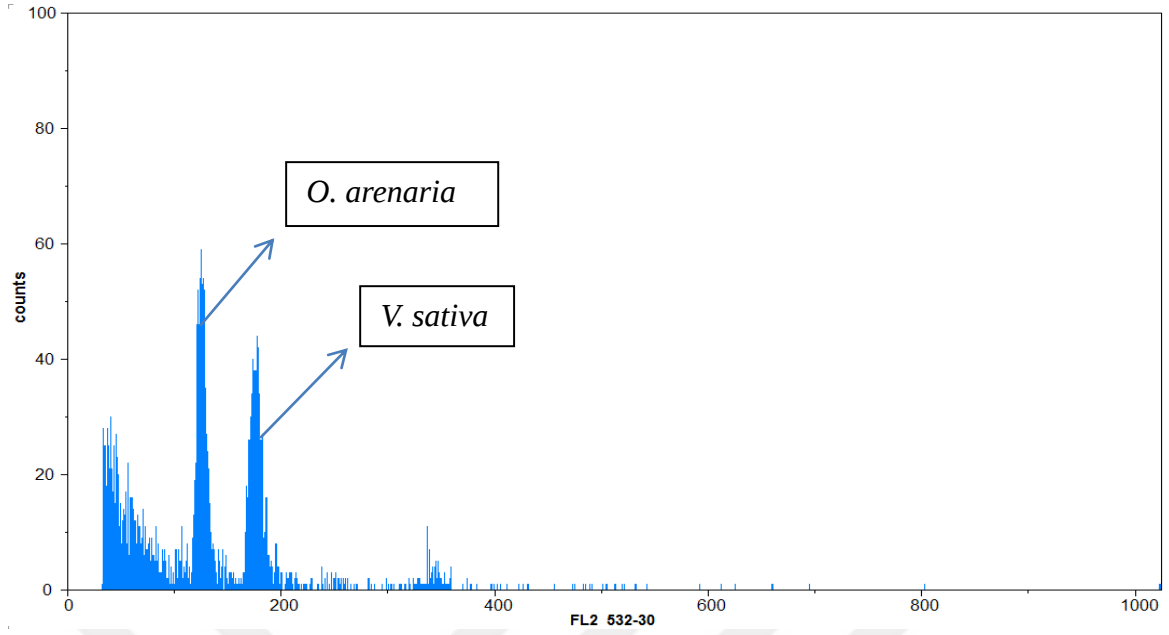
PI 297921	2.53	B
PI 368032	2.52	B

Yapılan analiz sonuçlarına göre *O. arenaria* aksesyonlarının ortalama çekirdek DNA içeriklerinin 2.52 pg/2C ile 2.75 pg/2C arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.7.).

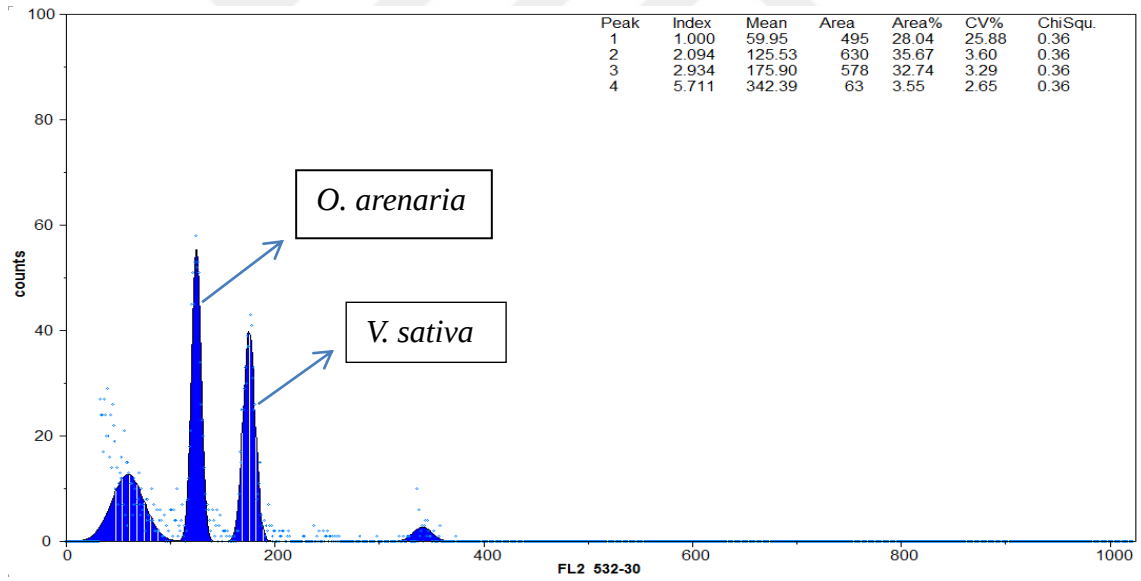


Şekil 4.7. Scatterplot Matrix Dağılımına Göre *Onobrychis arenaria* Aksesyonlarının Ortalama Çekirdek DNA içeriği Dağılımı

Yapılan istatistiksel analiz sonucu aksesyonların çekirdek DNA ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu saptanmış ve *O. arenaria* aksesyonlarının 3 farklı gruba ayrıldığı gözlenmiştir. 1. grupta (grup A) ortalama çekirdek DNA içeriği 2.75 pg/2C olan tek bir aksesyon yer almaktadır. 2. Grupta (grup AB) ortalama çekirdek DNA içeriği 2.57 pg/2C ile 2.72 pg/2C olan 17 aksesyon yer almaktadır. 3. Grupta (grup B) ortalama çekirdek DNA içeriği 2.52 pg/2C ile 2.56 pg/2C olan 6 aksesyon yer almaktadır.



Şekil 4.8. *Onobrychis arenaria* ve Standart Olarak Kullanılan *Vicia sativa* Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Bir Birine Göre Pozisyonları

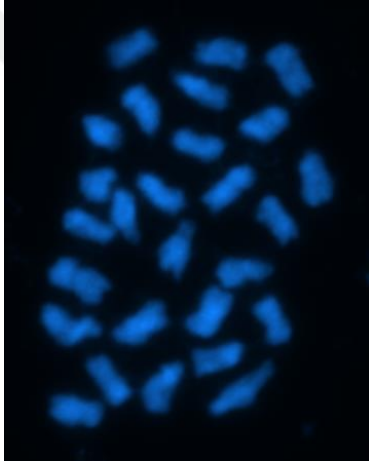


Şekil 4.9. *Onobrychis arenaria* (solda) ve Standart Olarak Kullanılan *Vicia sativa* (sağda) Bitkilerine Ait G1 Piklerinin Flow Sitometri Paket Programı Tanımlanmış Hali

24 *Onobrychis arenaria* aksesyonundan bazı bitkilerin kromozomları sayıldığında tüm bitkilerin 28 kromozoma ($2n=4x=28$) sahip olduğu ve dolayısıyla tetraploid oldukları belirlenmiştir.

4.2. Çekirdek DNA İçeriği ile Ploidi Düzeyinin İlişkilendirilmesi

Çalışmamızda analiz edilmiş korunga aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri ile ploidi düzeylerini ilişkilendirmek amacıyla koromozomları sayılan bitkilerin tamamının $2n=2x=28$ kromozom ile tetraploid oldukları belirlenmiştir. Bundan dolayı kromozomları sayılmayan ancak 2C çekirdek DNA içeriği 2.49 pg ve 2.78 pg değerleri arasında değişen tüm korunga bitkilerinin tetraploid oldukları kabul edilmiştir. Böylece sadece birkaç bitkinin kromozomlarını saymak suretiyle koleksiyondaki 1000'den fazla bitkinin ploidi düzeyi belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Tetraploid Korunga (*O. viciifolia*) Mitotik Kromozomlarının Görünüşü

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının amacı dünyanın değişik bölgelerinde kültürü yapılmakta olan 3 korunga türüne (*O. viciifolia*, *O. transcaucasica* ve *O. arenaria*) ait gen bankası aksesyonlarının bu çalışma öncesine kadar bilinmeyen ploidi düzeylerini ilk defa belirlemektir. Ploidi analizi geleneksel olarak kök ucu meristem dokuları kullanılarak hazırlanmış olan sitolojik preparatlar üzerindeki hücrelerin sahip olduğu mitotik kromozomların mikroskop ile sayılmasıyla gerçekleştirilmektedir (Karp 1991). Ancak yöntem zor, yavaş ve deneyim gerektirmektedir. Bunlara ek olarak çok sayıda bölünen hücreye gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle özellikle bu çalışmada olduğu gibi çok sayıda bitkinin ploidi düzeyinin belirlenmesi gerektiği gibi durumlarda bu yöntem yetersiz kalmaktadır (Brummer ve ark. 1999, Tuna 2014).

Tüm bitki kromozomları, hücre çekirdeği içerisinde yer almaktadır ve bitkilerin çekirdek DNA içeriği ile ploidi düzeyleri arasında sıkı ve doğru orantılı bir ilişki bulunmaktadır (Akins ve Jarret 1994). Bu ilişki göz önünde bulundurularak çekirdek DNA içeriğinin ploidi düzeyi belirlemede kullanılabileceği düşünülmüştür. Çekirdek DNA içeriğini hızlı ve hassas bir şekilde belirleyen flow sitometri cihazının geliştirilmesini izleyen yıllarda, çekirdek DNA içeriği bir çok araştırmacı tarafından ploidi düzeyinin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır (Lu ve ark. 1998, Johnson ve ark. 1998, Brummer ve ark. 1999, Tuna ve ark. 2001b, Tuna ve ark. 2004, Savaş Tuna ve ark. 2016) ve bugün en kolay, hızlı ve güvenilir metottur (Dolezel 1997).

Yürütülen bu çalışmada flow sitometri yöntemi ile 210 korunga aksesyonunun çekirdek DNA içeriği belirlenmiş ve aksesyonları oluşturan bitkilerin ploidi düzeylerinin belirlenmesinde yararlanılmıştır. Korunga bitkilerinin içerdiği bazı bileşikler (tanen) nedeniyle başlangıçta bazı sorunlar yaşanmış olsa da protokol üzerinde yapılan bazı küçük değişiklikler ile korunga bitkisi için uygun hale getirilmiş ve tüm bitkiler başarıyla analiz edilebilmiştir. Fenolik bileşiklerin benzer etkileri diğer bazı çalışmalarda da rapor edilmiştir (Noirot ve ark. 2000, Price ve ark. 2000).

Bildiğimiz kadarıyla şu ana kadar *Onobrychis* cinsi üzerinde çekirdek DNA içeriği analizi yapılmış olan tek çalışmada Carbonero (2011) *O. viciifolia* türünün tek bir aksesyonu üzerinde flow sitometri ile DAPI boyası kullanarak çekirdek DNA analizi yapmış ve türün ortalama 2C çekirdek DNA içeriğini 2.50 pg olarak belirlemiştir. Çalışmamızda ise *O. viciifolia* türüne ait 88 aksesyonun ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 2.49 ile 2.78 arasında

değişim gösterdiği belirlenmiştir. Yaklaşık 450 bitkinin (88 X 5) bitkinin ortalaması olarak türün ortalama 2C çekirdek DNA içeriği ise 2.64 pg olarak hesaplanmıştır. Buna ek olarak projemizde fluorochrome olarak DAPI boyası yerine DNA'ya homojen şekilde bağlanan Propidium İodide boyası kullanılmıştır. DAPI boyasının Adenin ve Timin nükleotitlerine bağlandığını ve Guanin ile Sitosine nükleotitlerine bağlanmadığını göz önünde bulundurduğumuzda DAPI boyası kullanılarak yapılan analizlerde kullanılan standard bitkinin AT/GC oranlarına göre, örneğin DNA içeriği bazan gerçek değerden düşük bazen de gerçek değerden yüksek olabileceği bilinmektedir (Dolezel 1997). Bu yüzden projemizde elde edilen sonuçlar çok daha güvenilirdir.

Çekirdek DNA içeriği hem bir bitkinin hücreleri arasında, hem de aynı türün farklı bireyleri arasında değişmeden sabit kalmakta ve bu nedenle türlere özel olmaktadır (Bennett ve Leitch 1995). Türler arasında ise çekirdek DNA içeriği bakımından önemli düzeyde farklılıklar gözlenmektedir. Bu nedenle, çekirdek DNA içeriği bilgisi taksonomik ve evrim çalışmaları için son derece yararlıdır (Rees ve Walters 1965, Southern 1967, Price ve Bachman 1975, Ohri 1998, Özkan ve ark. 2003). Öte yandan, bazı araştırma sonuçları çekirdek DNA içeriğinin tür düzeyinde sabit olmadığını ve bazı türlere ait farklı çeşit ve populasyonların DNA içerikleri arasında farklılıkların bulunduğunu göstermektedir (Cavallini ve ark. 1993, Graham ve ark. 1994, Singh ve ark. 1996). Ancak farklı laboratuarlarda aynı materyaller kullanılarak yapılan analizlerin sonuçları bu sonuçları doğrulamamıştır (Bennett ve Leitch 1995, Greilhuber ve Obermayer 1997, Greilhuber 1998, Temsch ve Greilhuber 2000, Bennett 2000, Greilhuber 2005). Bu nedenle Greilhuber (2005) aynı materyal kullanılarak başka laboratuvarlar tarafından doğrulanmadıkça bu tür farklılıkların kullanılan metot ve insan hatasından kaynaklanmış olabileceğine dikkat çekmiştir. Bununla birlikte deniz seviyesinden yükseklik ve türler arası çekirdek DNA içeriği arasında ilişki olduğu bazı araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Bennett 1976, Levin ve Funderburg 1979, Knight ve ark. 2005). Bu yüzden türler içerisinde de benzer ilişkilerin varlığı olasıdır (Reeves ve ark. 1998, Kalender ve ark. 2000, Murray 2005). Murray (2005), yeni türlerin oluşumunda çekirdek DNA içeriğinin bitki morfolojisinde daha önce farklılaştığını bu yüzden de, eğer bir tür içerisinde çekirdek DNA içeriği farklılığı belirlenmişse bunun tür içerisinde taksonomik çeşitliliğin ve yeni bir tür oluşum sürecinin varlığını gösteren bir belirti olabileceğini açıklamıştır.

Bu tez çalışmasında incelen 3 korunga türünün (*O. transcaucasica*, *O. viciifolia* ve *O.*

arenaria) ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri 2.65 (2.53 pg - 2.77 pg), 2.64 (2.49 pg - 2.78 pg) ve 2.63(2.52 pg - 2.75 pg) olarak belirlenmiştir. Türlerin ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri ve dağılımlarına dikkatli bir şekilde bakıldığında her üç türünde bir birine çok benzer DNA içeriğine sahip olduğu gözlenmektedir. Her ne kadar istatistik analiz yapıldığında türler arasında farklılık var gibi görünse de türlerin arasındaki farklılık metodun hassasiyet derecesi olan % 4' lük farktan çok daha düşüktür ve bu yüzden üç türün çekirdek DNA içerikleri arasında fark olmadığı söylenebilir. Bu da türleşmenin bu üç türün çekirdek DNA içeklerinde farklılaşmaya yol açmamış olduğu şeklinde yorumlanabilir. Benzer sonuçlar diğer bazı cinslerde de gözlenmiştir (Tuna ve ark. 2001). Bununla birlikte her üç tür içerisinde de aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içeriği arasında yaklaşık % 7 civarında bir farklılık olduğu dikkati çekmektedir. Gözlenen farklılık yöntemin hasasiyet derecesinin iki mislidir. Yapılan istatistiksel analizlerde de farklılık önemli çıkmıştır. Korunga aksesyonları arasında gözlenen çekirdek DNA içeriği farklılıklarının bir kısmı ekolojik faktör kaynaklı gerçek farklılık olabileceği gibi diğer bir kısmı da aksesyonların içerdiği farklı tanen miktarlarından kaynaklanıyor olması mümkündür. Nitekim laboratuvarımızda henüz tamamlanmış bir başka araştırmada korunga genotipleri arasındaki tanen konsantrasyonunun yaklaşık 8-10 misli kadar değişebildiği saptanmıştır (yayınlanmamış araştırma sonuçları). Ayçiçeği bitkisinin içerdiği bazı fenolik bileşikler bitkilerin çekirdek DNA içerikleri üzerine benzer etkiye yol açmıştır (Price ve ark. 2000).

Çalışmamızda korunga aksesyonlarının çekirdek DNA içerikleri ile ploidi düzeylerini ilişkilendirmek için mikroskopla yapılan kromozom sayımlarında her üç türünde $2n=4x=28$ kromozoma sahip oldukları ve dolayısıyla tetraploid oldukları belirlenmiştir. Bu bakımdan sonuçlarımız daha önceki sonuçları destekler niteliktedir (Ranjbar ve ark. 2012, Hejazi ve ark. 2010).

6. SONUÇ

Tamamlanmış olan bu tez çalışmasının amacı ıslah programlarında kullanmak amacıyla dünyanın farklı yerlerinden toplanmış ve gen bankalarında muhafaza edilmekte olan 210 korunga aksesyonunun çekirdek DNA içeriği ve ploidi düzeyini flow sitometri ile belirlemektir. Çalışmamızda kültürü yapılan korunga türlerine ait aksesyonların ortalama 2C çekirdek DNA içeriklerinin 2.49 pg ve 2.78 pg değerleri arasında değişmekle birlikte türlerin ortalama değer ve varyans bakımından birbirine oldukça benzer olduğu saptanmıştır. Aksesyonların çekirdek DNA içeriği ile kromozom sayıları ilişkilendirildiğinde çalışmamızda analiz edilen tüm aksesyonların $2n=4x=28$ kromozom sayısı ile tetraploid olduğu belirlenmiştir.

Buna ilave olarak flow sitometri yönteminin çekirdek DNA içeriği ve ploidi düzeyi belirlenmesinde son derece yararlı olduğu ve bu nedenle benzer çalışmalarda en güvenilir, hassas, kolay ve hızlı bir metot olarak kullanılabileceği bir kez daha ortaya konmuştur.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların korunga genetiği ve ıslahı üzerinde çalışan araştırmacılar için yararlı olacağını düşünüyoruz.

7. 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.
- Aktoklu E (1995). Türkiye’de Yetişen *Onobrychis* Miller. (Fabaceae) Türlerinin Revizyonu. Doktora Tezi. İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Andreev NG (1963). "Description of Sainfoin in Agronomy." Trans. R. P. Knowles . Cited in "A Compilation of Abstracts of Sainfoin Literature" 1968. AE Carleton and CS Cooper. Montana State University. Miscellaneous Publication.
- Arumuganathan K (1996). Procedure For Obtaining Nuclei By Slicing Plant Tissues For Flow Cytometric Determination of DNA Contents. Flow Cytometry Course Notes. Nebraska State University, U.S.A.
- Auld DL, Ditterline RL and Mathre DE (1977). Screening Sainfoin For Resistance to Root and crown Rot Caused By *Fusarium solani*. Appel and Wr. Science, 17: 69-73.
- Avcı S (2010). Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Yabani Korunga (*Onobrychis* sp.) Türlerinin Toplanması ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Awoleye F, Van Duren M, Dolezel J, Novak FJ (1994). Nuclear DNA Content and In Vitro Induced Somatic Polyploidization Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Breeding. *Euphytica*, 76: 195-202.
- Barry TN and Duncan SJ (1984). The Role of Condensed Tannins in The Nutritive Value of *Lotus* For Sheep 1. Voluntary Intake. *British Journal Nutrition*, 51.
- Barry TN and Forss DA (1983). The Condensed Tannin Content of Vegetative *Lotus* Its Regulation By Fertiliser Application and Effect Upon Protein Solubility. *The Science of Food*, 34: 1047-56. *Journal of The Science of Food*, 34: 1047-56.
- Barry TN and Manley TR (1984). The Role of Condensed Tannins in The Nutritive Value of *Lotus pedunculatus* For Sheep 2. Quantitative Digestion of Carbohydrates and Proteins. *British Journal Nutrition*, 51.
- Bland BF (1971). "Crop Production. Cereals and Legumes." Academic Press. London.
- Boissier PE (1872). *Flora Orientalis. Enumarito Plantarum in Orientale, A Graecia et Aegypto ad Indiae Fines Hucusque Observatorum*. Vol.2, Genevae et Basileae Apud H. Georg, Bipolipolam Lugduni Apud Eundem, 65, Rue de Lyon, p. 535- 553.
- Burton JC and Curley RL (1968). Nodulation and Nitrogen Fixation in Sainfoin (*Onobrychis sativa* Lam.) As Influenced By Strains of Rhizobia. In "Sainfoin Symposium" Cooper and AE Carleton. Montana Agricultural Experiment Station Bulletin, 627 .
- Brezhnev DD, Korovina ON (1980). Wild Relatives of the Cultivated Plants of Flora of the USSR. Kolos, 376 pp.
- Brummer EC, Cazcarro PM, Luth D (1999). Ploidy Determination of Alfalfa Germplasm Accessions Using Flow Cytometry. *Crop Sci.*, 39: 1202-1207.

- Carbonero, C. H. 2011. Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), A Forage Legume with Great Potential for Sustainable Agriculture, and Insight on Its Morphological, Agronomical, Cytological and Genetic Characterisation. Doctorate Thesis, Faculty of Life Sciences. Manchester.
- Carleton AE, Cooper CS, Delaney RH, Dubbs AL and Eslick RF (1968). Growth and Forage Quality Comparisons of Sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). Ibid 60: 630-32.
- Carleton AE and Wiesner LE (1968). Production of Sainfoin "Sainfoin Symposium" Eds. CS Cooper and AE. Montana Agricultural Experiment Station Bulletin, 627.
- Chapman SR and Yuan M (1968). Cytological and Morphological in Breeding Stocks of *Onobrychis*. In "Sainfoin Eds. CS Cooper and AE Carleton. Montana Agricultural Experiment Station Bulletin, 627 .
- Chorley P (1981). Early Evidence of Sainfoin Cultivation Around Paris. Agricultural History Review, 29: 118-24.
- Christian KR (1977). Effects of The Environment on The Growth of Alfalfa. Advances in Agronomy, 29: 183-227.
- Commonwealth Agricultural Bureaux Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Annotated Bibliography No. G552. Agricultural Bureaux. England.
- Cooper CS (1972). Growth Analysis of Two Sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) Growth Types. Agronomy Journal, 64: 611-13.
- Cooper CS (1973). Sainfoin, Birdsfoot Trefoil Mixtures For Pasture, Hay-Pasture and Hay Stockpile Regimes. Ibid 65: 752-754.
- Cooper CS (1974). Significance of The First Leaf Type to Growth of The Sainfoin Seedling. Crop Science, 14: 824-7.
- Cooper CS (1977). Growth of The Legume Seedling. Advances in Agronomy, 29: 119-39.
- Cooper CS (1979). Evaluation of Legume Mixtures For Hay Plant. Agronomy Journal 71 : 81-3.
- Cooper CS and Fransen SC (1974). Contribution of The Cotyledons to Growth of The Sainfoin Seedling. Crop Science, 14: 732-5.
- Cooper CS and Qualls M (1967). Morphology and Chlorophyll Content of Shade and Sun Leaves of Two Legumes. Ibid 7: 672-3.
- Cooper CS and Watson CA (1968). Total Available Carbohydrates in The Roots of Sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) When Grown Under Several Management Regimes. Ibid 8: 83-5.
- Darlington CD and Wylie AP (1955). "Chromosome Atlas of Flowering Plants." Allen and Unwin. London.
- Delaney RH and Dobrenz AK (1974). Morphological and Anatomical Features of Alfalfa Leaves as Related to CO² Exchange. Crop Science.
- De Laat AMM, Göhde W, Vogelzang MJDC (1997). Determination of Ploidy of Single Plants and Plant Populations By Flow Cytometry. Plant Breeding, 99: 303-307.

- Demdoun S., Munoz F., Delgado I., Valderrabano J., Wunsch A. (2012). EST-SSR cross amplification and genetic similarity in *Onobrychis* genus. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 59: 253-260.
- Ditterline RL and Cooper CS (1975). Fifteen Years With Agricultural Experiment Station Bulletin, 681.
- Dolezel J (1997). Flow Cytometry, Its Application and Potential For Plant Breeding. In *Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement* Edited By Tamas Lelley, 80-90.
- Dolezel J, Göhde W (1995). Sex Determination in Dioecious Plants *Melandrium album* and *M rubrum* Using High-Resolution Flow Cytometry. *Cytometry*, 19: 103-106.
- Doyle CJ, Thom Son DJ and Sheehy JE (1984). The Future of Sainfoin in British Agriculture: An Economic Assessment *Grass and Forage Science*, 39: 43-51.
- Dubbs AL (1968). Sainfoin As A Honey Crop. In "Sainfoin Symposium" Eds. C.S. Cooper and AE Carleton. *Montana Agricultural Experiment Station Bulletin*, 627 .
- Epstein, E.(1973). "Mineral Nutrition of Plants: Principals and Perspectives. " John Wiley and Sons Inc. New York.
- Eslick RF (1968). Sainfoin, Its Possible Role As A Forage Legume The West. In "Sainfoin Symposium" Eds. C.S. Cooper and AE Carleton. *Montana Agricultural Experiment Station Bulletin*, 627.
- Eslick RF, Carleton AE and Hartman GP (1967). Registration of Eski Sainfoin. *Crop Science* 7: 402-3.
- Evans AM (1961). The Yield of Eight Varieties of Sainfoin Cut at Different Growth Stages. *Empire Journal Experimental Agriculture*, 29: 232-9.
- Fagan TW and Rees J (1930). The Effect of Cutting Sainfoin at Different Stages on The Yield and Chemical Composition of Hay and Aftermath. *Welsh Agriculture Journal*, 6: 224-37.
- Fortune JA and Withers NJ (1980). Sainfoin - Curiosity or Crop. *Proceedings Agronomy Society New Zealand* 10: 67-71.
- Fox RL and Kacar B (1964). Phosphorus Mobilization in A Calcareous Soil in Relation to Surface Properties of Roots and Cation Uptake. *Plant and Soil*, 20: 319-30.
- Fransen SC and Cooper CS (1976). Seed Eeight Effects Upon Emergence, Leaf Development and Growth of The Sainfoin (*Onobrychis* spp.) Seedling. *Crop Science*, 16: 434-7.
- Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S (1991). Systematic Endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 96: 985.
- Galushko AI (1980). *Flora of the North Caucasus. Handbook*. V.2. 352 p.
- Gaudet DA, Sands DC, Mathre DL and Ditterline RL (1980). Complex of 70: 161-7. The Role of Bacteria in The Root and Crown Rot Irrigated Sainfoin in Montana *Phytopathology* 70: 161-7.
- Golovkin BN (1988). *Cultigenic Plant Area*. Moscow, Nauka. 184 pp.
- Greilhuber J, Obermayer R (1997). Genome Size and Maturity Group in *Glycine max*. *Heredity*, 78: 547-551.

- Gunn CR (1972). Seed Characteristics. In "Alfalfa : Science and Technology." Ed. C.H. Hanson. American Society Agronomy. Madison, U.S.A.
- Hanna HA, DA, Smoliak S and Goplen BP (1972). Sainfoin Western Canada. Canada Department of Agriculture Publication, 1470.
- Hanna MR (1980). Nova Sainfoin. Canadian Journal Plant Science, 60 :1481-3.
- Hanna MR, Cooke DA and Goplen BP (1970). Melrose Sainfoin. Ibid 50: 750-1.
- Hanna MR, Kozub GC and Smoliak S (1977). Forage Production of Sainfoin and Alfalfa on Dryland in Mixed and Alternaterow Seedings With Three Grasses. Ibid 57: 61-70.
- Hanson CH Ed (1972). "Alfalfa: Science and Technology." American Society Agronomy. Madison, U.S.A.
- Heinrichs DH (1970). Flooding Tolerance of Legumes. Canadian Journal Plant Science 50: 435-8.
- Hejazi, H., Mohsen, S. and Nasab, S. M. 2010. Cytotaxonomy of some *Onobrychis* (*Fabaceae*) species and populations in Iran. Caryologia. Vol. 63, no. 1: 18-31.
- Hely FW and Offer I (1972). Nodulation and Frequencies of Wild Leguminous Species in The Northern Negev Region of Israel. Australian Journal Agricultural Research 23: 267-84.
- Heyn CC (1962). On The Cytotaxonomy of *Onobrychis cristagalli* (L.) Lam and squarrosa Viv. Council Israel 11 D: 177-82 . Bulletincrista Research.
- Hulten E, Fries M (1986). Atlas of Northern European Vascular Plants North of the Tropic of Cancer. Vol. 1-3. Konigstein, 1172 p.
- Hume LJ (1981). An Investigation Into The Efficiency of Nitrogen Fixation in Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Unpublished M. Sc. Thesis. Massey University.
- Hutchinson J (1965). "Essays on Crop Plant Evolution." Cambridge University Press. Cambridge.
- James TK and Atkinson Herbicide Tolerance of Sainfoin. Proceedings New Zealand Weed And Pest Control Conference 31:121-3.
- Johnson PG, Riordan TP, Arumuganathan K (1998). Ploidy Level Determination in Buffalograss Clones and Populations. Crop Sci., 38:478-482.
- Kalender WA (2000). Dose in X-Ray Computed Tomography. Institute of Medical Physics, University of Erlangen-Nuernberg, Henkestr. 91, D-91052 Erlangen, Germany.
- Kashtanov AN, (1983). The Natural-Agricultural Regions and Utilization of Soil Resources of the USSR. Moscow, Kolos. 336 pp.
- Keller ERJ, Schubert I, Fuchs J, Meister A (1996) Interspecific Crosses of Onion With Distant *Allium* Species and Characterization of The Presumed Hybrids By Means of Flow Cytometry, Karyotype Analysis and Genomic Insitu Hybridization. Theor. Appl. Genet., 92:417-424.
- Kernick MD (1978). Technical Data Sheet No 20. Papilionaceae. In "Ecological Management of Arid and Semi-Arid Rangelands in Africa and the Near and Middle East. (Emsar-Phase II). Vol IV. Indigenous Arid and Semi-Arid Forage Plants of North Africa, The Near and Middle East." F.A.O. Rome.

- Kilcher MR (1982). Persistence of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) In The Semiarid Region of Southwestern Saskatchewan. Canadian Journal Plant Science, 62:1049-51.
- Knipe WJ and Carleton AE (1972). Estimates of The Percentage of Self and Cross-Pollination in Sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.). Crop Science, 12:520-2.
- Koch DW, Dotzenko AD and Hinze GO (1972). The Influence of Three Cutting Systems on The Yield, Water Use Efficiency and Forage Quality of Sainfoin. Agronomy Journal, 64:463-7.
- Krall JM and Delaney RH (1982). Assessment of Acetylene Reduction By Sainfoin and Alfalfa Over Three Growing Seasons. Crop Science, 22:762-6.
- Lance R (1980). Breeding Lucernes That Resist Aphids. Rural Research, 106:22-7.
- Lang A (1965). Physiology of Flower Initiation. In "Encyclopedia of Plant Physiology." XV. Part 1. Springer-Verlag. Berlin. Pp., 1380-1536.
- Lessins K and Gillies CB (1972). Taxonomy and Cytogenetics of Medicago In "Alfalfa: Science and Technology." Ed. C.H. Hanson. American Society Agronomy. Madison, U.S.A.
- Lysak MA, Dolezelova M, Horry JP, Swennen R, Dolezel J (1999). Flow Cytometric Analysis of Nuclear DNA Content in *Musa*. Theoretical and Applied Genetics, 98:1344-1350.
- Lu K, Kaepler SM, Vogel KP, Arumuganathan K, Lee DJ (1998). Nuclear DNA Content and Chromosome Numbers in Switchgrass. Great Plain Research, 8:269-80.
- Major DJ, Hanna MR, Smolia S and Grant R (1979). Estimating Nodule Activity of Sainfoin, Alfalfa and Cicer Milkvech Seedlings. Agricultural Journal, 71:983-5.
- Matzk FK, Prodanovic I Schubert (2005) Plant Cell, 17:13-24.
- McElgunn JD (1973). Germination Response of Forage Legumes To Constant and Alternating Temperatures. Canadian Journal Plant Science, 53:797-800.
- Medvedev PF, Smetannikova AI (1981). The Forage Crops of European Part of the USSR. Leningrad, Kolos. 336 pp.
- Meiners W, Hinke C, Bültmann J (2011). Design of an Optical System fort the In Situ Process Montoring of Selective Laser Melting (SLM). Physics Procedia 12 (2011) 683–690.
- Melton B (1977). Renumex Sainfoin-A New Variety. New Mexico State University Agricultural Experiment Station Bulletin, 658.
- Meye DW (1975). Yield, Regrowth and Persistence of Sainfoin Under Irrigation. Agronomy Journal, 67:439-41.
- Molgaard P and Hardman R (1980). Boron Requirement and Deficiency Symptoms of Fenugreek As Shown in A Water Culture Experiment With Inoculation of Rhizobium. Journal Agricultural Science, Cambridge, 94:455-60.
- Monteith JL (1965). Light Distribution and Photosynthesis in Field Crops. Annals Botany, 29:17-37.
- Naganowska B., Wojciech K., Dolezel J. (2003). Development of Molecular Cytogenetics and Physical Mapping of Ribosomal RNA Genes in Lupinus. Biologia Plantarum 46 (2): 211,215.
- Ohri D (1998) Genome Size Variation and Plant Systematics. Ann. Bot., 82: 750-812.

- Orsi S (1978). Present Situation Technical Orientation of Forage Production in Italy. *Fourrages* (suppl.), 72:49-57.
- Price HJ, Bachmann K (1975). DNA Content and Evolution in The *Microseridinae*. *Am. J. Bot.*, 62:262-267.
- Ranjbar, M., Hajmoradi, F., Karamian, R. 2012. An Overwiev on Cytogenetics of the Genus *Onobrychis* (Fabaceae) with Special Reference to O. sect. *Hymenobrychis* from Iran.
- Reeves, S., Lewin, S., Espin, S., & Zwarenstein, M. (2010). *Interprofessional teamwork for health and social care*. Oxford, UK: Blackwell-Wiley.
- Rogers HH (1975). Forage Legumes. Plant Breeding Institute, Cambridge. Annual Report pp., 22-57.
- Rorison IH (1965). The Effect of Aluminium on The Uptake and Incorporation of Phosphate By Excised Sainfoin Roots. *New Phytologist*, 69:23-7.
- Ross WD and Delaney RH (1977). Massive Accumulation of Calcium Carbonate and Its Relation To Nitrogen Fixation of Sainfoin. *Agronomy Journal*, 69:242-6.
- Rumball W (1982). Plant Introduction Trials. Performance of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) and Related Species at Palmerston North. *New Zealand Journal Experimental Agriculture*, 10:383-5.
- Sandoval A, Hoche V, Verdeil JL (2003). Flow Cytometric Analysis of The Cell Cycle in Different Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.) Tissues Cultured in Vitro. *Plant Cell Rep.*, 22: 25-31.
- Savaş Tuna (2016). Flow Sitometri İle Çok Yıllık Buğdaygil Yem Bitkisi Genetik Kaynaklarının Karakterizasyonu. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, Araştırma Makalesi (Research Article)*. 25 (Özel sayı-2): 7-12.
- Scott ME (1979). The Costs of Growing and Utilizing Sainfoin As A Method of Bloat Control. New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries. Economics Division Discussion Paper, 2:79.
- Sears RG, Ditterline RL and Mathre DE (1975). Crown and Rotting Organisms Affecting Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) in Montana. *Plant Disease Reporter*, 59:423-6.
- Sheath GW (1978). Growth Studies on 'Grasslands Maku'. Defoliated *Lotus pedunculatus*. Unpublished Ph.D. Thesis. Massey University.
- Sheehy JE and Popple SE (1981). Photosynthesis, Water Relations, Temperature and Canopy Structure As Factors Influencing The Growth of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Seep.) and Lucerne (*Medicago sativa* L.) *Annals Botany*, 48:113-28.
- Sheely PJ (1977). Influence of Environment on Growth and Development in the Forage Legume Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Seep.). Unpublished MSc. Thesis. Massey University.
- Sherrell CG and Toxopeus MRJ (1978). Effects of Boron Applications on Yield and Boron Concentration of Lucerne (*Medicago sativa* L.) Grown on Yellow-Brown Pumice Soils. *New Zealand Journal Experimental Agriculture*, 6:145-50.
- Simmonds NW (1979). "Principles of Crop Improvement." Longman. London.
- Sinskaya EN (1958). Investigations of the Composition of Ecotypical and Varietal Populations. Scottish Plant Breeding Station Annual Report pp. 31-4.

- Smarda P., P., Bures, L., Horova, B., Foggi and R. Graziano. 2008. Genome Size and GC Content Evolution of *Festuca*: Ancestral Expansion and Subsequent Reduction. *Annals of Botany* 101: 421–433, 2008
- Smith GS (1979). A Note Germination Inhibitors *Onobrychis viciifolia* on the Presence in the Seed. *New Zealand Experimental Agriculture Journal*, 7:365-7 .
- Smoliak S, Johnston A and Hanna MR (1972). Germination and Seedling Growth of Alfalfa, Sainfoin and Cicer Milkvetch. *Canadian Journal Plant Science*, 52:557-62.
- Smoliak S and Hanna MR (1975). Sainfoin and Cicer Milkvetch on Grazed With Sheep. *Ibid*, 55: 415-20. Productivity of Alfalfa, Sub-Irrigated Land When Grazed With Sheep. *Ibid*, 55 : 415-20.
- Smoliak S and Hanna MR (1977). Seedling Competition of Some Forage Legumes in Mono and Mixed-Culture Under Greenhouse Conditions. *Ibid*, 57:897-903.
- Spedding CRW and Diekmahns EC (1972). "Grasses and Legumes in British Agriculture. " *Commonwealth Agricultural Bureaux Bulletin*, 49:404-13 .
- Stebler FG and Schroter C (1889). "The Best Forage Plants." *Trans. A. N. McAlpine*. David Nutt. London.
- Suda J, Travnicek P (2006). *Cytometry* 69A, 273-280.
- Thomson DJ, Beever DE, Harrison DG, Hill IW and Osbourn DF (1971). The Digestion of Dried Lucerne (*Medicago sativa* L.) and Dried Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) 30:14A. By Sheep. *Proceeding Nutrition Society*, 30:14A.
- Thomson JR (1938). The Development of Sainfoin in Its Seeding Year. *Annals Applied Biology*, 25:457-71.
- Thomson JR (1951). Sainfoin in Its First Harvest Year. *Journal British Grasslands Society*, 6:107-17.
- Thomson JR (1952). Further Seed Studies in Sainfoin *Onobrychis sativa*. *Ibid*, 7:65-9.
- Townsend CE and McGinnies WJ (1972). Temperature Requirements for Seed Germination of Several Forage Legumes. *Agronomy Journal*, 64:809-12.
- Tuna M, Vogel KP, Arumuganathan K, Gill KS (2001) DNA content and ploidy determination of brome grass germplasm accessions by flow cytometry. *Crop Sci.*, 41: 1629-1634.
- Tuna M, Khadka DK, Shrestha MK, Arumuganathan K, Golan-Goldhirsh A (2004) Characterization of Natural Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Populations of Thrace Region of Turkey Based on Ploidy and DNA Polymorphisms. *Euphytica*, 135: 39-46.
- Van Duren M, Morpurgo R, Dolezel J, Afza R (1996). Induction and Verification of Autotetraploids in Diploid Banana (*Musa acuminata*) By In Vitro techniques. *Euphytica*, 88: 25-34.
- Varga P (1968). Aims of Sainfoin Breeding in Romania. In "Sainfoin Symposium" Eds. C.S. Cooper and A. E. Carleton. *Montana Agricultural Experiment Station Bulletin*, 627.
- Vavilov NI (1951). "The Breeding of Cultivated Chronica. Botanica. U.S.A. Origin, Plants. " Variation, Immunity and Trans. K. S. Chester.

- Wallace LE (1968). Current and potential insect problems of sainfoin in America. In "Sainfoin Symposium" Eds. C.S. Cooper and A.E. Carleton. Montana Agricultural Experiment Station Bulletin, 62.
- Young JA , Evans, RA and Kay BL (1970). Germination Characteristics of Range 23:98-103. Legumes. Journal Rangeland Management, 23 :98-103.
- Yücel G (2019). Kültürü Yapılan Korunga (*Onobrychis* Mill, Baklagiller) Taksonları ve Bazı Yabani Akrabaların Moleküler Sitogenetik Yöntemler İle Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ, Türkiye.
- Zonnoveld JM (2009). The Systematic Value of Nuclear Genome Size For “All” Species of *Tulipa* L. (*Liliaceae*). Institute for Molecular Plant Sciences. Clusius Laboratory, Leiden University, Leiden, The Netherlands.



ÖZGEÇMİŞ

Bu tezi hazırlayan Buket ŞAHİN, 16/07/1994 tarihinde Tekirdağ'da doğdu. Lise eğitimini, 2008-2012 yılları arasında Tekirdağ Anadolu Lisesi'nde aldı.

Lisans eğitimini 2016 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde tamamladı. Aynı yıl, yine Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.

