



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ADİ YONCA (*Medicago sativa* L.) EKOTİP VE ÇEŞİTLERİNDE DNA,
PROTEİN, ÇEKİRDEK ANALİZİ VE KROMOZOM SAYIMIYLA GENETİK
ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

Büşra YAZICILAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2018

Her hakkı saklıdır



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ADİ YONCA (*Medicago sativa* L.) EKOTİP VE ÇEŞİTLERİNDE DNA,
PROTEİN, ÇEKİRDEK ANALİZİ VE KROMOZOM SAYIMIYLA GENETİK
ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

Büşra YAZICILAR

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Erzurum

2018

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**ADİ YONCA (*Medicago sativa* L.) EKOTİP VE ÇEŞİTLERİNDE DNA,
PROTEİN, ÇEKİRDEK ANALİZİ VE KROMOZOM SAYIMIYLA GENETİK
ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU danışmanlığında, Büşra YAZICILAR tarafından hazırlanan bu çalışma 08/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. Özkan AKSAKAL	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Emre İLHAN	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

08 / 06 / 2108

İmzası

Adı-SOYADI

Büşra YAZICILAR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADİ YONCA (*Medicago sativa* L.) EKOTİP VE ÇEŞİTLERİNDE DNA, PROTEİN, ÇEKİRDEK ANALİZİ VE KROMOZOM SAYIMIYLA GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Büşra YAZICILAR

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Medicago sativa (yonca) çok yıllık, besin değeri yüksek, çevre şartlarına dayanıklı olması nedeniyle ekimi en çok tercih edilen baklagiller familyasına ait yem bitkisidir. Bu çalışmada, bazı yonca ekotip ve çeşitlerinin DNA, protein, çekirdek ve kromozom sayımıyla genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, 5 farklı yonca çeşidinin (*Medicago sativa* cv. Alsancak, Bilensoy, İside, Plato, Bilensoy82) ve 3 farklı ekotip (Erzurum, Muş ve Konya) ve arasındaki genetik uzaklık basit dizi tekrarları (SSR) tekniği ile araştırılmış, elde edilen veriler NTSYS-pc programı ile analize tabi tutulup genetik akrabalık dendrogramı oluşturulmuştur. Erzurum, Muş; Konya, Bilensoy82, Alsancak ve Plato; İside ve Bilensoy arasında akrabalık ilişkisinde monomorfik olarak bulunmuştur. *M.truncatula* olan model organizmamız diğer ekotip ve çeşitlerde akrabalık ilişkisi bulunamamıştır. Kromozom sayıları ise İside, Bilensoy çeşitleri ve Muş ekotipi diploid, Bilensoy82 çeşidi triploid, Konya ve Erzurum ekotipinde kromozom sayısı 30, Plato ve Alsancak çeşidi tetraploid olarak tespit edilmiştir. Toplam protein miktarı ise en yüksek *M.truncatula*, Konya ve Alsancak en düşük ise Plato, Bilensoy82 ve Muş’da tespit edilmiştir.

2018, 52 sayfa

Anahtar Kelime: Yonca, SSR, Flow Sitometri, Genetik Çeşitlilik

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY OF YONCA (*Medicago sativa* L.) ECOTYPE AND DIVERSITY BY DNA, PROTEIN, NUCLEUS ANALYSIS AND CHROMOSOME

Büşra YAZICILAR

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Medicago sativa (alfalfa) is perennial, high in nutritional value and resistant to environmental conditions, plant is the most preferred feed crop for the leguminous family. In this study, it was aimed to determine the genetic diversity of some alfalfa ecotypes and their varieties by DNA, protein, nucleus and chromosome counts. In the study, the genetic distance between the populations of 5 different alfalfa species (Alsancak, Bilensoy, İside, Plato, Bilensoy82) and 3 different ecotypes (Erzurum, Muş and Konya) were investigated by simple sequence repeats (SSR) technique. Genetic diversity dendrogram was created Erzurum, Muş; Konya, Bilensoy82, Alsancak and Plato; The similarity between İside and Bilensoy was found monomorphically in relation. Our model organism, *M. truncatula*, did not have a similarity relationship with other ecotypes and cultivars. Chromosome numbers were determined as diploid Muş ecotype, İside and Bilensoy cultivars, Bilensoy82 cultivar was triploid, Konya and Erzurum ecotype were determined as chromosome number 30, Plato and Alsancak cultivars were tetraploid. The total protein amount was highest in *M. truuncutula*, Konya and Alsancak in Plato, Bilensoy82 and Muş.

2018, 52 pages

Keywords: Yonca, SSR, Flow cytometry, Genetic Diversity

TEŞEKKÜR

Lisans ve Lisansüstü eğitimim süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde bana hem uygulama kısmı olsun hem de manevi olarak destek olan Dr. Öğr. Üyesi Emre İLHAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Doğan İLHAN 'a, Arş. Gör. Ayşenur Yazıcı'ya ve Gholam Reza Jannaty'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında tüm destekleriyle her zaman yanımda olan, aileme, ablam Fatma Gül YAZICILAR ve Ruhan ATAR' a en içten saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

Büşra YAZICILAR

Haziran 2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Genetik Çeşitlilik.....	1
1.1.1 Genetik çeşitliliğin kapsamı ve dağılımı	3
1.1.1 Ekocoğrafik faktörler	4
1.2 <i>Medicago sativa</i> L. (Yonca)	5
1.3 SSR.....	7
1.4 SDS-PAGE	8
1.5 Kromozom Sayımı	8
1.6 Flow Sitometri	9
1.6.1 Poliploidlerde genom evrimi.....	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1 Bitki Materyali	18
3.2 DNA İzolasyonu.....	18
3.3 SSR Analizi	19
3.3.1 Kullanılan Primerler	20
3.4 İstatistiksel Analiz	21
3.5 Protein İzolasyonu	21
3.6 SDS PAGE	21
3.7 Kromozom Sayımı	24
3.8 Flow Sitometri	25

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	27
4.1 SSR Analizi	27
4.2 SDS PAGE Analizi	34
4.3 Kromozom Sayımı	35
4.4 Flow Sitometri	39
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ.....	52



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

mL	Mili Litre
µL	Mikro Litre
mM	Mili Molar
M	Molar

Kısaltmalar

ISSR	Ara Basit Tekrar Dizisi
APS	Amonyum Persülfat
SSR	Basit Tekrar Dizisi
dNTP	Deoksi Nükleotit Tri Fosfat
EDTA	Etilendiaminetetraasetikasit
HCl	Hidrojen Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	SodyumDodesilSülfat
Tris-HCl	Tris Hidrojenklorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Medicago sativa cinsi kompleks üyeleri arasındaki taksonomik ilişki.....	7
Şekil 1.2 Flow sitometri tekniğinin uygulama prensibi	10
Şekil 1.3 Poliploidleşmenin başlıca yolları	11
Şekil 1.4 Poliploid sonrası evrim.	12
Şekil 3.1 Denemelerin ana materyali olan Yonca çeşidine ait bitkilerin genel görünümü.....	18
Şekil 3.2 Çekirdek analizinin yapılışı	26
Şekil 4.1 Mtic230.primerin genotiplerde oluşturdukları SSR band profilleri.....	28
Şekil 4.2 SDS PAGE jel bant görüntüsü	35
Şekil 4.3 İside çeşidinin metafaz görüntüsü.....	36
Şekil 4.4 Muş ekotipinin metafaz görüntüsü.....	36
Şekil 4.5 Bilensoy çeşidinin metafaz görüntüsü	37
Şekil 4.6 Bilensoy82 çeşidinin metafaz görüntüsü	37
Şekil 4.7 Erzurum ekotipinin metafaz görüntüsü.....	38
Şekil 4.8 Konya ekotipinin metafaz görüntüsü	38
Şekil 4.9 Alsancak çeşidinin metafaz görüntüsü.....	39
Şekil 4.10 Plato çeşidinin metafaz görüntüsü	39
Şekil 4.11 Alsancak ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları	41
Şekil 4.12 Bilensoy82 ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları	41
Şekil 4.13 Bilensoy ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları	42
Şekil 4.14 Erzurum ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları	42
Şekil 4.15 İside ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları	43
Şekil 4.16 Konya ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları	43
Şekil 4.17 Muş ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları	44

Şekil 4.18 Plato ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları	44
Şekil 5.1 Sonuçların genel tablosu	46



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 SSR'da kullanılan maddeler	19
Çizelge 3.2 SSR çalışmasında kullanılan primerler	20
Çizelge 3.3 Ayırma jeli için kullanılan maddeler	22
Çizelge 3.4 Ön ayırma jeli için gerekli olan maddeler.....	22
Çizelge 3.5 Loading buffer için gerekli maddeler	23
Çizelge 3.6 1x Running buffer için gerekli maddeler	23
Çizelge 3.7 Boyama solüsyonu için gerekli maddeler	24
Çizelge 3.8 Yıkama solüsyonu için gerekli maddeler.....	24
Çizelge 4.1 Kullanılan SSR primerler, toplam bant sayıları ve PIC değerleri.....	27
Çizelge 4.2 Mikrosatellit lokusuna dayanarak 3 ekotip ve 5 çeşit yonca çeşidi için genetik çeşitlilik tahminleri	29
Çizelge 4.3 Çalışmada kullanılan primerlere ait allel frekansları, gen çeşitlilik ve PIC değerleri	30
Çizelge 4.4 Nei (1972)'nin genetik benzerliği	31
Çizelge 4.5 SSR-Genetik benzerlik dendogramı	33
Çizelge 4.6 Yonca ekotip ve çeşitlerin DNA içerikleri.....	40

1. GİRİŞ

1.1 Genetik Çeşitlilik

Biyolojik çeşitlilik, bitki ve hayvanların genetik materyalleri ve oluştuğu ekosistemlerde bulunan varyasyon olarak tanımlanır. Biyolojik çeşitlilik üç düzeyde meydana gelir bunlar i) genetik çeşitlilik (genlerde ve genotiplerde değişim), ii) tür çeşitliliği (tür zenginliği) ve iii) ekosistem çeşitliliğidir (tür toplulukları ve çevreleri). Son yıllarda biyolojik çeşitliliğin insanoğlunun yaşamsal faaliyetlerinin devamlılığı için önemi çok iyi bilinmektedir. Biyolojik çeşitlilik, insanoğlunun giyecek, barınma ve beslenme ihtiyaçlarını karşılamalarına ve dünyanın dört bir yanındaki ülkelerin kültürel çeşitliliğini korunmasına imkân tanıyan sosyal ve ekonomik sistemlerin gelişmesini de sağlamaktadır (Rao, 2002). Her ülkenin biyolojik kaynakları önemli olup ülkeler arasındaki işbirliği, küresel biyolojik çeşitliliğin etkin bir şekilde korunması ve kullanılması için gereklidir. Son yıllarda tarımsal biyoçeşitlilik de dâhil olmak üzere gen kaynaklarının korunması hakkında bütünsel bir görüş benimseme, korumayı sürdürülebilir kullanım ve geliştirme ile ilişkilendirmenin önemi konusunda farkındalık oluşmuştur (Arora, 1997). Biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülmesi üzerine çalışmalar Haziran 1987'de Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) tarafından geçici bir 'Biyolojik Çeşitlilik Üzerine Uzman Çalışma Grubu' kurulmasıyla başlanmış olup, bu süreç, Haziran 1992'de Brezilya Rio de Janeiro'da Birleşmiş Milletler Çevre ve Kalkınma Konferansı'nın (UNCED) organizasyonuna yönlendirilmiştir. UNCED'de tartışma ve politika uygulama temelini oluşturan Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi (CBD) ve Gündem 21 eylem planı geliştirilmiştir. Bu gelişmeleri izleyen Uluslararası Teknik Konferans (ITC), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından Temmuz 1996'da Leipzig, Almanya'da biyolojik çeşitlilik üzerine yoğunlaşarak organize edilmiştir.

Öte yandan, bitki gen kaynakları dünya üzerinde var olan eşsiz bir hazine olup geçen 30 yılda bu genetik kaynakları korumada büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Frankel and Bennet, 1970; Frankel Hawkes, 1975; Sing and Williams, 1984; Plucknett et al. 1987; Watanabe et al. 1998; Ramanatha Rao et al. 1999). Son yıllarda, özellikle bitki popülasyonlarının muhafaza edilmesine imkân verecek *in situ* ve *ex situ* çeşitli

koruma yöntemleri geliştirilmeye başlanmış, çok sayıda bitki türü bu yöntemlerle koruma altına alınmıştır (Rajasekharan PE and Sahijram Leela 2015).

Yine *In situ* ve *ex situ* koruma yöntemlerinin birbirini tamamlayıcı nitelikte olması seçilen yöntemin dağılımı, ekolojisi gibi faktörlere ve alanlarında kaynakların bulunmasına bağlı olduğu bir tanıma eşlik etmiştir.

Son yıllarda bitki ıslahçılarının öncelikli konularından biri yeni bitki çeşit ve hatlarının geliştirilmesi ve ekocografik bölgelere yayılımının sağlanmasıdır. Yeni geliştirilen çeşitler istenilen agronomik ve stres faktörleri açısından uniform olma eğilimindedirler ve genellikle istenilen özellikteki yeni çeşit geliştirilmesinde kullanılan ebeveyn hatlar için giderek daha dar genetik temel oluştururlar. Genetik olarak uniform olan bitki çeşitlerinin kültüre alınıp geniş tarım arazilerinde yetiştirilmesi tarımsal ürünlerin genetik açıdan hassasiyetini arttırmıştır. Bu duruma 1840'lı yıllarda İrlanda da yaşanan patates kıtlığı örnek verilebilir; İrlanda'daki patates bitkisi, yetiştirilen patates çeşitlerinin yaprak döküntüsü hastalığına arzu edilen seviyede direnç gösteremediği için patates üretiminde ciddi düşüşler olmuştur. Benzer şekilde, 1943'te Bengal bölgesinde çeltikte kahverengi leke hastalığının ortaya çıkışıyla, halk ciddi bir açlık sorunuyla karşı karşıya kalmıştır. Yine, 1970'lerde, ABD'nin güney eyaletlerinde mısır yaprak külleme hastalığı nedeniyle, mısır üretimi yaklaşık % 25 azalmıştır (Rao and Hodgkin 2002). Bununla birlikte, bu vakaların çoğunda, kamu ve özel bitki yetiştiricileri, bu hastalığa dayanıklı çeşitleri kısa sürede üreterek bu hastalıkla mücadele etmeyi başarmışlardır.

Uniform çeşitlerin artması ile bitkilerin hastalık ve pestitislere karşı dayanıklılığı azalmakta ve bu durum ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır. Örneğin, Okyanusya'daki birkaç önemli geleneksel ürün, dar genetik taban nedeniyle nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıyadır (Lebot, 1992). Öte yandan, bazı önemli bitkilerin genetik tabanının yıllar içinde artmaya başladığı, buna karşın, çok sayıda önemli bitkinin yetiştirme programlarının mevcut genetik çeşitliliğin yalnızca küçük bir kısmını içermeye devam ettiği bildirilmiştir (Lebot, 1992). Yeni çeşitlerin piyasaya sürülmesi, potansiyel olarak yararlı gen kaynaklarını içeren yerli çeşitlerin yerini almaya devam etmektedir. Bununla birlikte, ekosistemlerde var olan genetik çeşitlilik, genetik hassasiyetliğe neden olan sorunlara karşı bir savunma olarak görülebilir. Çiftçiler, gen

kaynaklarının korunması için bu savunmayı, arzu edilen karaktere sahip bitkileri nesiller boyu yetiştirerek istenilen geni yerel populasyonlarda genetik yapıya yerleştirmişlerdir.

Ancak, bu savunma mekanizmalarını sürdürülebilir kılmak için modern teknikler kullanarak yeni çeşitlere geri melezleme yapmak gerekir (Martin et al. 1991; Chang, 1994; Kannenberg and Falk, 1995). Bilindiği gibi bitki genetik kaynaklarının etkin bir şekilde muhafaza edilmesi, sağlam bir bilimsel teknik ve temel gerektirir. Kullanılabilecek koruma yöntemleri ve bunların nasıl aktarılacağı konusunda bir anlayışa ihtiyaç vardır. Etkili bir koruma programının merkezinde, türlerdeki mevcut genetik çeşitliliğin, *in vitro* ya da *ex situ* korunmuş olan materyalde çoğaltılması ve dağıtılması konusunda açık bir anlayış olmalıdır (Allard,1988, Hamrick and Godt, 1992; Godt et al.1989; Hamrick et al. 1993).

1.1.1 Genetik çeşitliliğin kapsamı ve dağılımı

Genetik çeşitlilik, genellikle farklı türlerdeki bireyler veya bir populasyonda genetik değişkenlik miktarı olarak düşünülür (Brown, 1983). Genetik çeşitlilik bireyler arasındaki genetik farklılığın sonucunda oluşmakta olup DNA diziliminde, biyokimyasal (örn. protein yapısı veya izoenzim özellikleri) ve fizyolojik özelliklerde (örn. abiyotik stres direnci veya büyüme hızı) veya morfolojik karakterlerdeki (çiçek rengi veya bitki formu) farklılıklarla ortaya çıkabilir. Genetik çeşitlilik nihai olarak populasyonlar içerisinde bireylerin sahip olduğu bulunan farklı allellerin sayısı, dağılımı ve performansı üzerindeki etkiler ile ayırt edilebilir. Genetik çeşitlilik varyasyon, mutasyon ve rekombinasyonlardan kaynaklanır. Farklı populasyonlarda bulunan alleller üzerinde meydana gelen seleksiyon, genetik sürüklenme ve gen akışı genetik çeşitliliğe katkı yapar.

Genetik çeşitlilik var olan populasyon da yaşamı sürdürme adaptasyonun temelini oluşturur ve evrimsel başarının genetik istikrarını ve ilerletmeyi mümkün kılar. Nesli tükenmekte olma süreci, rekabet, adaptasyon kabiliyeti ve hastalık gibi faktörlerden kaynaklanan biyotik veya abiyotik streslere, jeolojik, iklim değişikliğinden kaynaklanan izolasyon ve habitat değişkenliğine, doğal felaketlere veya insan faktörüne bağlı olabilir. Bu tehditler göz önüne alındığında, bitki genetik kaynaklarındaki genetik

çeşitliliğin doğru bir şekilde anlaşılması, etkin bir şekilde korunması ve kullanılması önemlidir. Bir türün genetik çeşitliliğinin farklı yönlerinin kapsamı ve dağılımı türün nerede ve nasıl muhafaza edileceğini belirlemek için ön şarttır.

Bununla birlikte, *in situ* ya da *ex situ* olarak yapılan pek çok koruma çalışmasında, korunmakta olan genetik çeşitlilik hakkında çok az bilgi geliştirilmiştir.

1.1.1 Ekocoğrafik faktörler

Genetik çeşitliliğin dağılımında coğrafik farklılıklar son derece önemlidir. Özellikle farklı coğrafyalarda yaşayan bitki türleri endemik bitkilere göre daha fazla genetik çeşitliliğe sahiptir. Populasyonlar, çeşitliliğin tüm yönleri bakımından farklılık gösterebilir ve allel sayısındaki varyasyonu, bu allellerin tanımlanması ve onların populasyondaki karakterler üzerindeki etkisini gösterir Bitki türlerine göre ıslah yöntemleri, farklı coğrafik bölgelerdeki populasyonlar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde çok önemlidir. Yabancı tozlaşan bitkilerde populasyonlar arasında allel frekanslarındaki değişiklikler kademeli olarak gözlenirken (Lanner-Herrera et al.1996; Morden, Doebley et al. 1989), kendine tozlaşan türler, populasyonlar arasında, genellikle farklı populasyonlarda oldukça farklı alleller bulunan gruplar arasında çok daha fazla farklılık gösterirler (Tachida and Yoshimaru, 1996)

Aslında, dağılımdaki coğrafik varyasyonu ekolojik olarak belirlenmiş varyasyondan ayırmak neredeyse her zaman mümkün değildir. Farklı coğrafik bölgeler bazı potansiyel olarak önemli karakterler (enlem, rakım, sıcaklık ve nem mevcudiyeti gibi) bakımından farklıdır. Bu nedenle ekolojik karakterler ekocoğrafik faktörler gibi düşünülür.

Genel olarak, doğal koşullar altında, bitkilerin morfolojik ve fizyolojik karakterler ve karakterlerin ortaya çıktığı ve bu habitatlar arasında yakın bir ilişki vardır (Bennett, 1970). Bu ilişki o derece yakındır ki, habitatlar, onları doğal olarak kaplayan bitki populasyonlarının karakterleriyle isimlendirilebilir. Genellikle, küçük habitat farklılıklarına bile kantitatif ve duyarlı olan adaptif genetik varyasyon sıklıkla daha hassas davranır. Pek çok çalışma populasyon karakterleri ve bu karakterlerin ortaya

çıkıldığı çevre arasında açık bir ilişki olduğunu göstermiştir (Aston and Bradshaw, 1966; Nevo, 1978; Nevo, 1979; Nevo, 1990; Nevo et al.1991).

Nevo ve arkadaşlarının çalışmaları bitkinin yabani akrabalarında genetik çeşitliliğin dağılımı ve genişliğini belirlemede ekocoğrafik faktörlerin rolünü vurgulamıştır. Bu evrensel bir durum olmamakla birlikte plastisitenin geniş bir şekilde farklılaşan çevrelerde nadiren genetik olarak benzer popülasyonların ortaya çıkmasına müsaade ettiği durumlar da vardır (McNeilly, 1997).

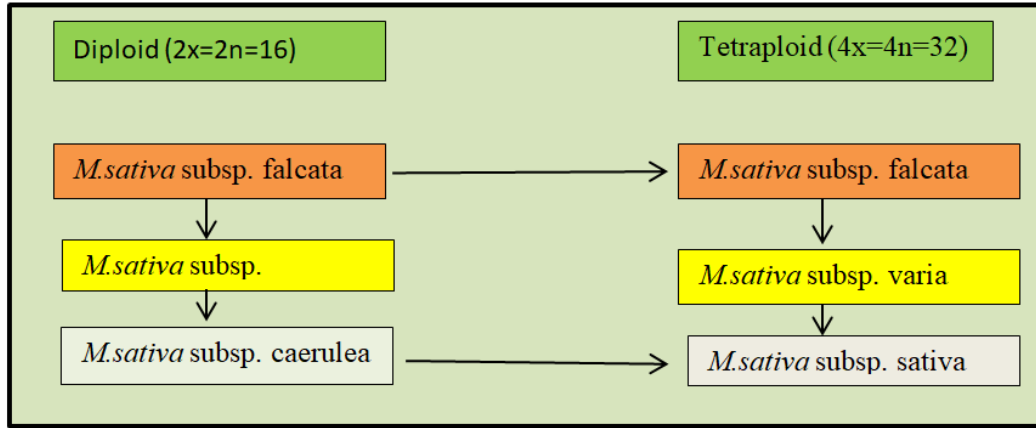
Pratik anlamda, kültür bitkilerindeki ekotipik farklılığı, kalite farklılıkları yanı sıra, gelişimin nispi oranları, biyotik ve abiyotik streslere dayanıklılık, edafik yanıtlar, gübreye tepki, yetiştirmeye uyum, sulama ve hasat metotları gibi pekçok karakter etkiler (Bennett, 1970). Daha da önemlisi, yerel bitki ırklarının çevre ve genetik sistemler arasındaki uzun süreli etkileşimlerinin sonuçlarının olması gerçeğidir (Rao et al.1999; Brush, 1995). Bitkilerde, sosyal ve politik farklılıkları yansıtan coğrafik faktörler genetik çeşitliliğin dağılımını belirlemede ekolojik faktörler kadar önemli olabilir (Baatout et al. 1990). Çoğu araştırmada gen bankası aksesyonlarını kullanma, orijin ülkesinin genetik çeşitliliği belirlemede çok önemli bir faktör olacağı görülmektedir (Allard et al.1972; Kahler and Allard, 1981; Maroof et al.1990).

1.2 *Medicago sativa* L. (Yonca)

Yonca ilk kültüre alınmış yem bitkilerinden biri olup oldukça uzun ve zengin bir tarihe sahiptir. Eski yazılı kaynaklar bu bitkinin anavatanının Türkiye olduğunu ifade etmektedir (Putnam et al. 2001). Yonca daha sonra Meksika, Peru ve Şili'ye kadar birçok ülkeye yayılmış, Amerika Birleşik Devletlerine ise 19 yüzyılın ilk yarısında girmiştir. Yonca, mercimek, nohut, fasulye ve bezelye gibi kültür bitkilerini de içine alan yaklaşık 350 cins ve 10.000 kadar türü olan baklagiller familyasına dâhildir. Yonca dünya üzerinde geniş alanlarda yetiştirilen en önemli yem bitkisi olup biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı, yüksek verim kapasitesine sahip olduğundan sürdürülebilir tarım için en önemli yem bitkisi olarak düşünülmektedir. Dünyada farklı coğrafik koşullara sahip yüksek dağ vadilerinden, sıcak çöllerine kadar geniş adaptasyon kabiliyetine sahiptir (Leach and Clements 1984; Peterson et al.1992; Prosperi et al.

2006). Yonca tarımı yağmur ormanlarında, az yağış alan bölgelerde bile yoğun olarak yapılmaktadır. Killi kumlu topraklardan ziyade kumlu topraklara daha iyi adapte olmuştur ve pH'sı 6 dan düşük olan topraklara toleransı oldukça azdır.

Çok yıllık baklagil yem bitkisi, yabancı tozlaşan *Medicago sativa* L. (Adi yonca), ototetraploid olan ve dünyada en çok yetiştirilen yem bitkisidir (McKersie and Brown,1997; Quan et al. 2016). Yonca yüksek verim, kalite, toprak erozyonunu önleme ve azot yoluyla toprağın iyileştirilmesinde önemli rol oynadığı için sürdürülebilir tarım sisteminin ana bileşeni olarak görülmektedir (Huggins et al. 2001). Baklagil olarak yonca, *Sinorhizobium meliloti* bakteri türleri ile bağlantılı olarak azot fiksasyonu yoluyla toprak verimliliğini artırır (Putnam et al. 2001). Yonca diğer yem bitkileriyle karşılaştırıldığında besin değeri oldukça yüksektir. Yonca bitkisi vitamin içeriği bakımından zengin olup en az 10 farklı vitamin çeşidi (A vitamini, D vitamini, E vitamini, K vitamini, C vitamini, B1 vitamini, B2 vitamini, B3 vitamini, B5 vitamini, B7 vitamini ve B9 vitaminleri) olduğu bilinmektedir. Özellikle karoten (provitamin A), tokoferol (E vitamini), K vitamini, piliç derileri ve yumurta sarısı rengini iyileştiren ksantofil (Xanthophyll) maddeleri yönünden zengindir. Yoncada hayvanlarda et, süt ve döl verimini artıran birçok besleyici içerik bulunmaktadır (Soya et al. 2004; Bauchan and Greene 2002). Ayrıca, bal arısı çiçeklenme sırasında yonca tarlalarının sık ziyaretçisi olduğu için yonca bal üretiminde de önemli rol oynamaktadır. Yonca (*Medicago sativa*) *Medicago* cinsine ait *Falcago* seksiyonunun *Falcatae* alt seksiyonuna dahil edilmektedir. *Medicago* cinsinin yarısından fazlası tek yıllık olup tek yıllık türler ise *M. constricta*, *M. praecox*, *M. polymorpha*, *M. rigidula* ve *M. murex* olup temel kromozom sayıları ise $x=7$ dir. Çok yıllık olan *Medicago* türünün temel kromozom sayısı ise $x=8$ dir. Diploid ($2n = 2x = 16$) ve tetraploid ($4n = 4x = 32$) alt birimlerdir.



Şekil 1.1.1 *Medicago sativa* cinsi kompleks üyeleri arasındaki taksonomik ilişki

Ülkemizde yem bitkileri ıslahı cumhuriyetin ilk yıllarında ele alınmış yoncada ilk çeşit 1964’ te Sazova-Kır yoncası (L-1576) ve Kayseri yoncası adıyla geliştirilip üretim izni almıştır. Daha sonra Bilensoy, Elçi ve Sünter çeşidi uzun süren klasik ıslah yöntemlerinin kullanılmasıyla geliştirilmiştir. Sonraki yıllarda birçok yeni yonca çeşidi (Plato, İside, Alsancak ve Bilensoy82 gibi çeşitler) piyasaya sürülmesine rağmen, ülkemizde ıslah edilen yonca çeşitleri sınırlı sayıdadır (Tosun vd 2003). Klasik ıslah yöntemiyle üstün verimli, farklı stres şartlarına dayanıklı yeni çeşit geliştirmek oldukça uzun süreye ve çok fazla iş gücüne ihtiyaç duymaktadır.

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada bitki tür ve çeşitlerinin genetik farklılıklarını belirlemede DNA ve protein markör teknikleri bitki ıslahında sık kullanılmaktadır. DNA temelli markör teknikleri bitkilerin verim kapasiteleri ve morfolojik özelliklerinden yararlanılarak klasik ıslah yönteminde iş gücünün azaltılması, ıslah sürelerinin kısaltılması ve çeşit seleksiyonunda genetik haritaların çıkarılmasında ve gen kaynaklarının korunmasında genotipler arası genetik benzerliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Korkut, 2005).

1.3 SSR

Birçok bitki türünde olduğu gibi yoncada da birçok araştırmacı farklı DNA temelli markör sistemi kullanarak ekotip ve çeşitler arasında genetik farklılıkları belirlemişlerdir. Bu teknikler arasında en güvenilir olarak tercih edilen ve mikrostellitler

olarak da adlandırılan SSR markörü, kromozomlarda yaygın bulunması ve çok allelli (multiallel) olmalarından dolayı yonca genotipleri veya çeşitleri arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi için en uygun markörlerden biridir (Röder et al. 1998). Genoma spesifik özellik gösteren SSR tekniği 2-6 baz uzunluğunda kısa dizi tekrarlarından oluşmaktadır (Litt and Luty 1989). SSR tekniği genotipler arasında polimorfizm oranı yüksek ve ko-dominant olduğundan genetik kaynakların moleküler teşhisinde diğer moleküler markör tekniklerine nazaran daha fazla avantaja sahiptir (Powell et al. 1996).

1.4 SDS-PAGE

DNA markörlerine ek olarak bitki türleri arasında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan diğer markörler ise protein markörlerdir. Bitki türlerinin protein bantlarının belirlenmesinde kullanılan en yaygın teknik SDS PAGE analiz yöntemidir. Bu tekniği kullanarak bitki türleri arasında toplam protein profilleri çıkarılarak türler arasındaki genetik farklılıklar saptanır. Bu yöntemin avantajı az miktarda bitki materyali kullanılması, fonksiyonel gen seviyesinde çeşitliliği belirlemek için bitkilerin basit bir kalıtıma sahip olmasıdır. Bununla birlikte bazı dezavantajlara sahip olup protein izolasyonu, spesifik bir boyamanın gerekliliği, uzun zaman ve işgücü gerektiğinden genetik çeşitliliğin belirlemede bazı sınırlamalar getirir (Govindaraj et al. 2015).

1.5 Kromozom Sayımı

Yüzyıllar boyunca, özellikle biyologlar ve botanikçiler, taksonomik çalışmaların yanı sıra nesli tükenmekte olan bitkilerin kromozom sayılarını belirlemektedirler (Laane and Hoiland, 1986; Masterson, 1994). Bu veriler, kromozom sayı değişiminin evrimsel örneğini değerlendirmek ve bitkilerin kromozom sayısını tahmin etmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Kromozom sayıları, sitotaksonomi bağlamında önemli bir filogenetik karakter olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Chatterjee and Kumar Sharma, 1969; Schlarbaum and Tsuchiya, 1984; Guerra, 2012).

Kromozom sayı verisinin en etkili kullanımı, tek kromozom sayılarındaki değişiklikler (örneğin, diploid) ve tüm genomdaki duplikasyonları ortaya çıkarmaktır. Kromozom sayısını belirlemek sistematik çalışmalarda çok önemli olup, bitki türlerinin ploidi seviyelerini bilmek filogenetik ve DNA dizisi çalışmalarında üstün özellikteki bitki hatlarının seçilmesinde kolaylık sağlamaktadır. Sitocoğrafik çalışmalar bitki türlerinin nasıl yayılış gösterdiği ve bazı morfolojik çalışmalar için kolaylık sağlar.

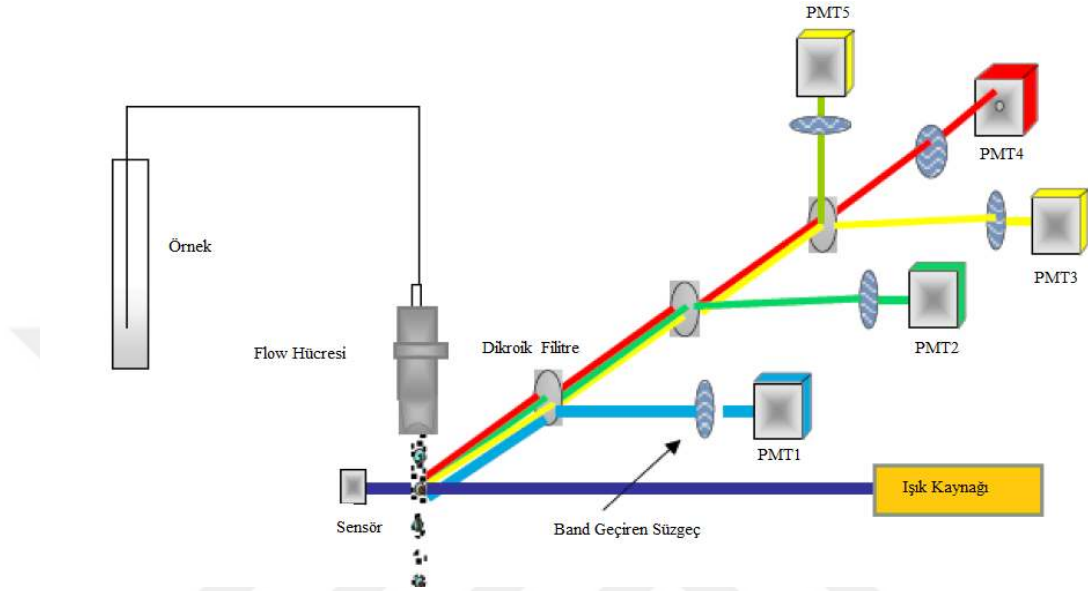
Önceki araştırmacılar kromozom sayılarının dağılımını analiz ettiler ve analiz edilen taksonda ploidi düzeylerini tahmin etmek için çeşitli teknikleri kullandılar (Stebbins, 1938; Grant, 1963; Goldblatt, 1980). Bitkilerde kromozom sayısını belirlemek için sitolojik olarak işe başlamak oldukça önemli olup kromozomal yeniden düzenlemeler, translokasyon ve kromozom kayıpları gibi kromozomal anormallikler bu yöntemle tespit edilir.

Flow sitometri tekniğini ile çok sayıda örneklerle hızlı bir şekilde sonuç alınmasına rağmen, yukarıdaki bahsedilen parametreler flow sitometri tekniğini ile belirlenemez.

1.6 Flow Sitometri

Flow sitometri, birçok türün (bitki ve hayvan) nispi çekirdek DNA içeriği ve ploidi seviyesini belirlemek için verimli, tekrarlanabilen ve hızlı sonuç veren bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Flow sitometri miksploid bitki populasyonlarının ploidi seviyelerini belirlemek için günümüzde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntemle bitki materyallerinin diploid, triploid veya tetraploid olup olmadıkları teyit edilir. Flow sitometrinin diğer kullanım alanları *in vitro* rejenerasyondan alınan bitki örnekleri somatik hibridizasyon üretimi için protoplast füzyon deneylerinde ebeveyn protoplastlarından heterokaryonları ve hücre çeperlerinin hemiselüloz içeriğini belirlemek içinde kullanılmaktadır. Ploidi seviyesi, çekirdek DNA içeriği ve hücre siklusu (hücre döngülerinin detaylı analizi yoluyla) açısından bitki, doku ve rejenerantların karakterizasyonu tayin edilmesinde flow sitometri büyük katkı sağlamaktadır.

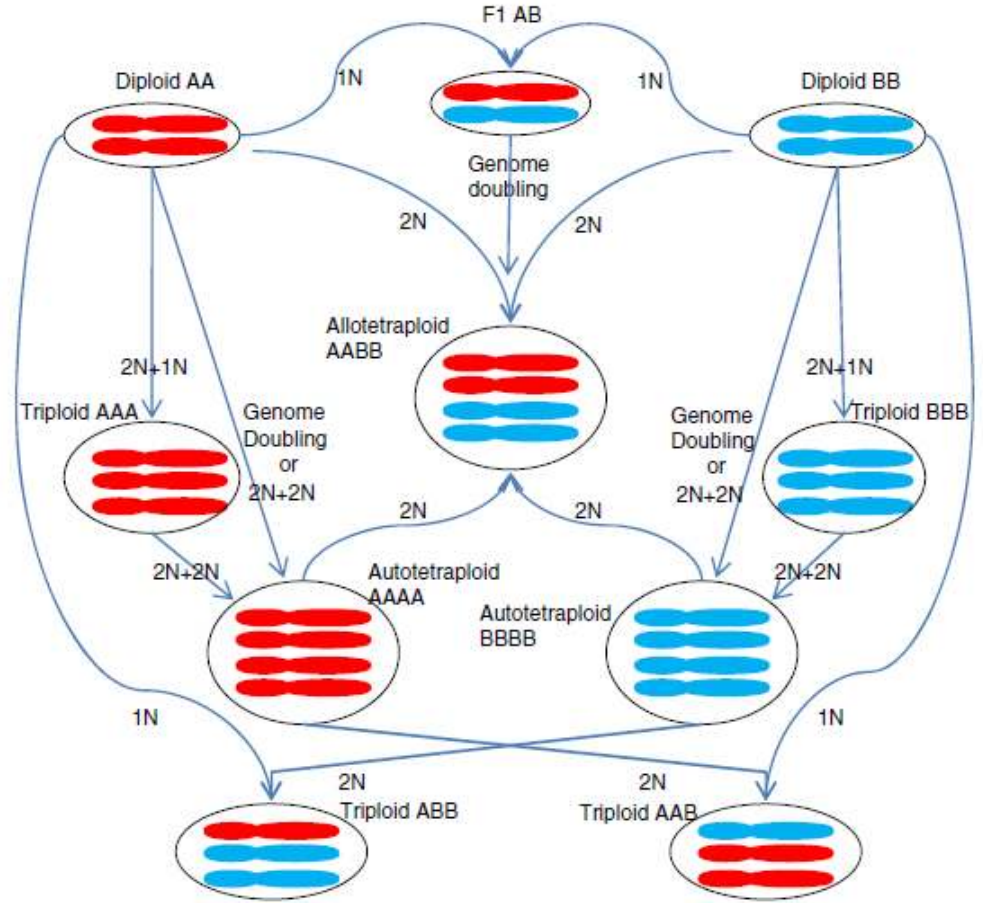
Flow sitometrenin çalışma prensibi bir süspansiyonda hareket eden parçacıkları analiz eden bir floresan mikroskobudur. Ekipmanın dahili programı, sinyalleri verilerek hücrelerin sayısına karşı yaydığı epifloresans yoğunluğunu gösteren bir grafik haline dönüştürür (Robinson, 2006).



Şekil 1.2 Flow sitometri tekniğinin uygulama prensibi (Ochatt, 2006)

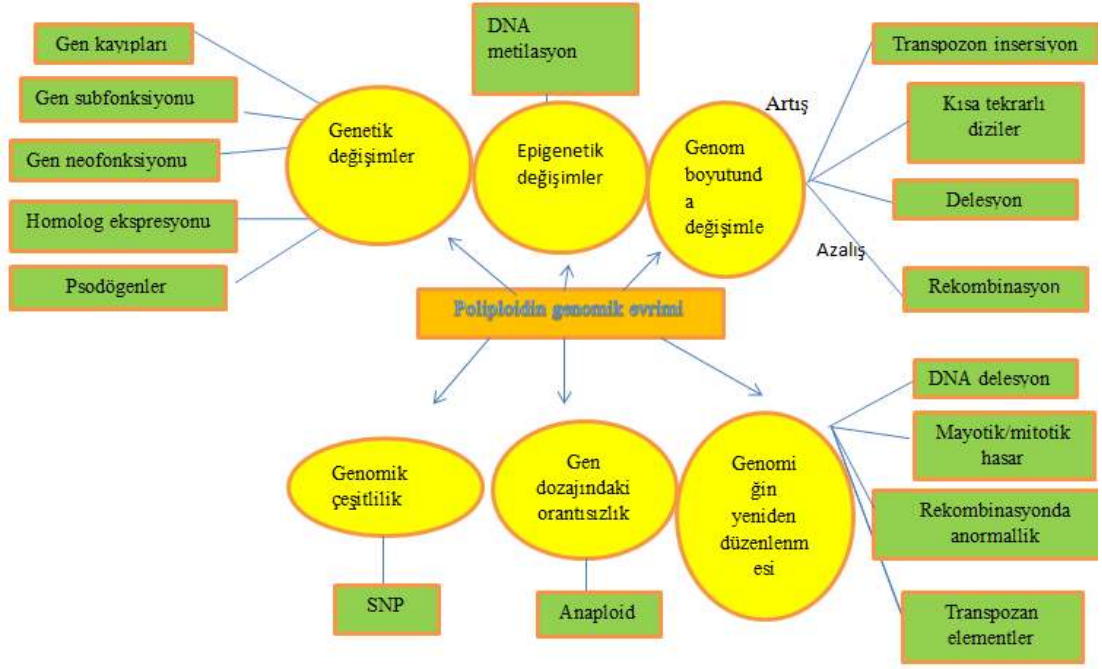
1.6.1 Poliploidlerde genom evrimi

Poliploidi, bitkilerde göze çarpan bir süreçtir. Poliploidi bitkilerde önemli bir türleşme süreci olarak bilinir. Bu üstünlüğü göz önüne alındığında, bu süreç hakkında moleküler evrimsel genetik bakış açısıyla sormaya değerdir. Poliploid evrim, bitkilerde devam eden dinamik bir süreç gibi gözüktüğü için, poliploidi üzerine yapılan birçok deneysel çalışmanın kapalı tohumlu bitkilere odaklanması şaşırtıcı değildir. Poliploidler doğal ve sentetik olarak sınıflandırılırlar. Doğal poliploid spontan olarak meydana gelen kromozom katlanması olarak bilinir. Buna karşın sentetik poliploid genom melezlemesi olmaksızın veya uyarılmış genom katlanması sonrasında meydana gelen poliploiddir (Pignatta et al.2010).



Şekil 1.3 Poliploitleşmenin başlıca yolları (Rao et al.2002)

Bitkilerde filogenetik ve moleküler genetik perspektifleri birleştiren disiplinler arası yaklaşımlar, poliploidi ile mümkün kılınan sayısız genetik etkileşim konusunda farkındalığımızı artırmıştır. Poliploidi ile katlanan genler, orijinal ya da benzer işlevlerini koruyabilir, protein işlevinde ve düzenlemede çeşitlilik gösterebilir; mutasyonel veya epigenetik yollarla duplike olan genler susturulabilir. Duplike olan genler ayrıca, lokuslar arası rekombinasyon, gen dönüşümü veya evrim yoluyla etkileşime girebilirler. Poliploid evrimin pek çok yönü hakkında şu ana kadar öğrenilecek pek çok şey var: yapısal ve düzenleyici gen gelişiminde transpoze elementlerin rolü, epigenetik susturmanın süreçleri ve önemi, kromozom eşleştirmesinin altında yatan kontrolleri, hızlı genom değişikliklerinin mekanizmaları ve işlevsel önemi düzenleyici faktörlerin koordinasyonudur.



Şekil 1.4 Poliploid sonrası evrim (Rao et al 2002)

Genomun daralması ve genişlemesi poliploid araştırmalarının en önemli konulardan biridir. Poliploid bitkiler 3 farklı parametre temeline dayanılarak sınıflandırılır. i) **genomik orjintemeli üzerine** Şekil 1.4 otopoliploid ve allopoliploidlerin oluşum yollarında gösterildiği gibi genom katlanmasını takiben aynı ebeveyn kromozomun tüm genomun katlanması ile oluşan otopoliploid ve farklı ebeveyn genomlarının melezlenmesi ile oluşan allopoliploid olarak iki kısma ayrılır. ii) **oluşum süreci** temeli üzerine poliplid oluşum sürecinde kromozom katlanması iki ana mekanizma ile meydana gelir. Birinci mekanizma somatik katlanma diğeri ise indirgenmemiş gamet oluşumudur. iii). **zaman temeli üzerine** eski, genç ve yeni oluşmuş poliploid olarak sınıflandırılır. Eski ve genç terimi bitki genetik çeşitliliği açısından keskin ayırım sağlamayıp yalnızca herbir bitki çeşidinin nisbi olarak karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Bitkilerde ploidi seviyesi flow sitometri tekniği kullanılarak C değerinin ölçülmesi ile belirlenir. Poliploidlerin diploidlerden C değerinin daha büyük olması beklenir.

Yine de genom boyutunun değerlendirilmesi, genom daralması ve genişlemesini sabitler. Ayrıca poliploidi oranı tahmin etmek için son zamanlarda en çok tercih edilen

yöntemlerden biri olan flow sitometriyle genom büyüklüğü ölçülmesidir (Leitch and Bennett 2004).

Diploid ve poliploid bitkiler arasında morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal açıdan hücreler farklılık gösterir. Poliploid bitkiler diploid bitkilere oranla daha büyük hücre ve stomalara kalın ve büyük yaprakları daha geniş çiçekler ve meyvelere sahiptirler. Genelde ototetraploid daha büyük vejetatif aksam ve tohum fakat daha düşük üreme organına sahiptirler. Poliploid genotiplerin sürgünleri daha kısa boğum aralığından daha kalındır ve daha geniş yaprak ayalara sahiptir.

Kromozom sayısı artıkça tek hücrenin çekirdek DNA içeriği, enzim aktivitesi ve hücre hacmi artar. Ayrıca poliploid bitkiler genetik çeşitlilik kaynağı olup ve bitki ıslahı için yeni genotiplerdir. Poliploid genotipler hastalık ve pestisit gibi biyotik, kuraklık ve soğuk gibi abiyotik faktörlere karşı dirençlidir. Bu direnç mekanizması ile daha geniş ekolojik bölgelere daha iyi adapte olurlar. Bunun sebebi ise savunma mekanizmasından sorumlu kimyasalların ve özel sekonder metabolitlerin miktarının artmasına neden olan genlerin ifadeleri daha fazla kromozom sayısına sahip olan hücrelerde bulunmasıdır.

Sonuç olarak poliploid bitkiler daha ekstrem iklim şartlarında yetiştirmeye daha kolay uyum sağlarlar. Yine de ploidi seviyesinin artması her zaman avantaj sağlanmaz. Poliploid bitkiler birçok açıdan diploidlere üstündür. Ancak bazı durumlarda poliploidlerin büyüme oranları düşüktür. Hücre döngüsünde sorunlara yol açarak hücre büyümesi yavaşlar bu da daha az hücre sayısı ve daha küçük organların oluşmasına neden olur.

Tüm canlılarda kromozomlar çekirdek içerisinde olduğundan kromozomal DNA ile ploidi seviyesi arasında doğrusal bir ilişki söz konusudur. Kromozomal DNA miktarının bitki türlerinde özgü olması nedeniyle çekirdek DNA içeriği, sitotaksonomi ve evrim çalışmalarında bize yardımcı olmaktadır.

Yerel ekotip, çeşit ve yabani türleri içine alan bitki gen kaynakları çeşit ıslahı için türlerarası ve tür içi genetik varyasyonun artırılması için önemli bir gen havuzu oluştururlar. Modern biyoteknolojinin gelişmesi ile ıslah çalışmaları ve gen

kaynaklarının korunması için bitki gen kaynaklarının etkili bir şekilde kullanımını artırmak gereklidir.

Bu çalışmanın amacı 3 adet yerel yonca ekotip (Muş, Erzurum, Konya) ve 5 adet tescilli yonca çeşidi kullanılarak (Bilensoy, Bilensoy82, Alsancak, İside, Plato) SSR markörüyle genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve protein, çekirdek DNA içeriği ve kromozom sayımıyla çeşitlerin kimlik tespiti yapılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Öten M ve Albayrak S (2016) Batı Akdeniz sahil kuşağında bulunan, Antalya ilinden toplanan üstün yonca genotipleri klonlamayla çoğaltmıştır. Elde edilen genotip ve standart çeşit arasındaki benzerlikler, SSR tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılan primerler oldukça polimorfik bantlar vermiştir. Çalışmada benzerlik katsayılarındaki değişimler gösterilmiştir. En yakın genetik benzerlik Kaş2 ve Çeşit1 arasında bulunurken, en uzak genetik benzerlik ise Gazipaşa1, Kumluca2 genotipleri arasında bulunmuştur. Elde edilen verilere göre Antalya'dan toplanan yonca genotipleri arasında genetik olarak önemli varyasyonlar olduğu tespit edilmiştir.

Tuna ve arkadaşları (2016) Islah programlarında kullanmak amacıyla Doğu Anadolu Bölgesinden toplanmış buğdaygil yem bitkisi populasyonlarının (*Festuca* sp., *Koeleria* sp. ve *Agropyron* sp.) çekirdek DNA içerikleri flow sitometri yöntemiyle belirlenmiş ve elde edilen veriler populasyonların ploidi seviyesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm populasyonlar çekirdek DNA analiz sonuçlarına göre taksonomik olarak isimlendirilmiştir.

Iva Viehmannova et al. (2016) *In-vitro* rejenerantların doğru tiplerini değerlendirmek için ISSR, flow sitometri ve karyotip analizi yapmışlardır. Çalışmada rastgele seçilen bitkiler ve kontrol bitkileri kullanılmıştır. Farklı ISSR primerleri, analiz edilen numune başına, farklı ve tekrarlanabilir bant üretmiştir. Tüm amplike ürünlerin monomorfik olduğu ve polimorfizmin görülmediği kaydedilmiştir. Benzer şekilde, flow sitometrik analiz, tüm bitkilerdeki ploidi seviyesinin dengeli olduğunu teyit etmiştir. Çalışma sonucunda kültürde somaklonal varyasyon bulunmadığından, bu mikro yayılım protokolünün *P. berteroniana* bitkilerinin seri üretimi için kullanılabileceği önerilmiştir.

Ertuş ve arkadaşları (2016) yonca ekotipleri ve tescilli yonca çeşitlerinin polimorfik düzeylerini ISSR markör tekniği kullanarak araştırmıştır. Çalışmada ISSR primerleri kullanılarak polimorfik bant sayıları elde etmiştir. Ekotipler ve çeşitler arasındaki genetik uzaklıklar öklid katsayısı yardımıyla belirlenmiştir. Yonca ekotiplerde ve tescilli çeşitlerde genetik varyasyon incelenmiş, en yüksek genetik çeşitlilik ve polimorfizm Gürpınar ekotiplerinde gözlenmiştir. Yabancı döllen

Medicago sativa'nın ekotip ve çeşitler arasında yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Fyad-Lameche et al. (2015) diploid ve tetraploid olan yonca türlerinin kromozom sayısını flow sitometriyle, tohumdaki proteinlerin seviyesini SDS-PAGE analizi yardımıyla belirlemiştir. Çalışmada *Medicago orbicularis* (L.) Bartal, *Medicago laciniata* (L.) Miller. genom büyüklükleri farklı bulunmuştur. Süspansiyon kültüründen alınan somatik embriyodaki genom büyüklükleri iset türlerde değişiklik göstermiştir. Sonuç olarak flow sitometri tekniğinin hem genç yaprak örneklerinden hem de doku kültüründen alınan örneklerden çekirdek DNA analizi için hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu rapor edilmiştir.

İlhan ve arkadaşları (2014) *P. vulgaris* ve *M. truncatula* için kullanılan farklı SSR primer çiftinin bazı primerleri başarıyla çoğaltılmıştır ve *Onobrychis* taksonları arasında polimorfizm göstermiştir. En yüksek sayıdaki lokus, BM175 ve MTIC84 primerlerinden elde edilmiştir. Gen çeşitliliği ve polimorfizm bilgi içeriği değerleri, *P.vulgaris* primerlerinin *Onobrychis* genomları üzerinde en bilgilendirici lokus ürettiğini gösterilmiştir. En yüksek genetik çeşitlilik değerleri *Onobrychis argyrea* Boiss alt spji Boiss için, en düşük ise *Onobrychis cornuta* (L) Desv'den (1) elde edilmiştir. Ortalama çeşitlilik değerleri *Hymenobrychis* bölümünde en yüksek olanıydı ve onu *Heliobrychis*, *Onobrychis*, *Laphobrychis* ve *Dendobrychis* bölümleri izlemiştir. Genetik varyasyonun büyüklüğü, *Onobrychis* bölümünde genetik benzerlik değerlerinin en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. SSR ve filogenetik analiz sonuçları bölümlerin morfolojik özelliklerine benzer şekilde ayrıldığını göstermiştir. Bununla birlikte, *Hymenobrychis* ve *Heliobrychis* diğer bölümlerden açıkça ayrılmıştır. Çalışmaları, *Onobrychis* genomlarının diğer baklagiller SSR işaretleyicileri kullanılarak başarılı bir şekilde çalışılabileceğini gösterilmiştir. Bu nedenle, *Onobrychis* türlerinin korunması için ve aynı zamanda yem kullanımı için yeni çeşitlerin geliştirilmesi için kullanılmıştır.

İlhan ve arkadaşları (2009) Farklı Arpa çeşitleri ve kontrol olarak da Bandırma ekmeklik buğdayı kullanmıştır Arpa yapraklarından izole edilen DNA 'lar PCR analiziyle incelenmiştir. Genetik çeşitliliği saptamak amacıyla akraba tür olan buğday genomuna ait farklı sayıda SSR markörünün arpa genomun transfer edilebilirliği

saptanmıştır. Transfer edilebilen markörlerle de arpa genotipleri arasında akrabalık dereceleri belirlenmiştir. Seçilen markörlerin istenilen band üretilmiş olup üretilen bandlar arpa çeşitleri arasındaki genetik farklılığı belirlemek için yeterli olmuştur.

Touil et al. (2008) Tunusun farklı bölgelerinden toplanan ve İtalya, Avusturya, Fransa ve Fasın farklı bölgelerinden toplanan farklı yonca populasyonlarının arasındaki genetik çeşitlilik SSR markör tekniğiyle belirlenmiştir. Her lokustaki allel sayısı farklılıklar gözlemlenmiştir. Sonuçta yonca populasyonları için SSR primerlerinin genetik çeşitlilik çalışmalarında güçlü bir yöntem olduğunu bildirmiştir.

Katzir et al. (1996) kavun ve hıyar türleri arasındaki genetik çeşitliliği SSR markörleri tekniğiyle araştırılmıştır. Kavun ve hıyar genomları kullanılarak primer dizayn etmiştir. Elde edilen SSR primerleri, kavun, hıyar, kabak, balkabağı ve karpuz genotiplerinde test edilmiştir. SSR primerlerinden kavunların, hıyarların, kabaklarda polimorfizm olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda yer alan karpuz genotipinde ise polimorfizm bulunamamıştır. Çalışmada kullanılan farklı türlerin herhangi birine özgü SSR primerlerinin diğer cinslerde de kullanılacağı ortaya çıkmıştır.

Blondon et al. (1994) iki tür tetraploid ve diploid *Medicago*'nun farklı ekotipinin genom boyutu flow sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Genom boyutu hem türler, hem de türler arasında değişiklik göstermiştir. Yıllık diploid *Medicago truncatula* Gaertn (*M. sativa* L. subsp. *sativa*, *M. sativa* L. subsp. *caerulea*.) Schmalh., *M. sativa* L. subsp. *quasifalcata* Sinsk'i, *M. sativa* L. subsp. *X varia* (Martyn) Arcangeli, kapsayan grubun en küçük genomuna sahiptir, bununla birlikte, ekotipleri intraspesifik varyasyon göstermiştir. En küçük *M. truncatula* genomunda bulunan ekotip 108-1 idi ve en büyüğü ise Jemalong idi. Bazı dokularda 4C çekirdekli hücrelerin sıklığı bu *Medicago*'daki polisomatinin derecesi düşük olduğu tespit edilmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Çalışma materyali olan yonca Erzurum, Muş ve Konya yerel ekotipler; Bilensoy, Bilensoy82, Alsancak, Plato ve İside çeşitleri kullanılmıştır. Tohumlar Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden temin edilmiştir.



Şekil 3.1 Denemelerin ana materyali olan Yonca çeşidine ait bitkilerin genel görünümü

3.2 DNA İzolasyonu

Her bir yonca ayrı ayrı saksılarda dört haftalık süreyle yetiştirilmiştir. Taze yonca yaprakları kullanılarak CTAB methoduna uygun DNA izolasyonu yapılmıştır (Doyle and Doyle 1990) .

1.Taze yonca yaprakları 0.03 gram tartılarak 2 ml santrifüj tüplerine alınıp 680 µl CTAB (2 gram CTAB, 10 ml 1M Tris pH 8, 1 gram PVP, 40 ml ddH₂O, 28 ml 5M NaCl, 4 ml 0.5 M EDTA pH 8) çözeltisi eklenip doku parçalayıcısında parçalanmıştır.

2.Tüpler su banyosunda 65 °C’de 1 saat bekletilmiştir.10 dakikada bir ters düz edilmiştir.

3. Daha sonra 680 µl kloroform koyup 15 dakika ters düz yapılmıştır.
4. 13.500 rpm'de 17 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı başka tüpe alınmıştır.
5. Üzerine 500 µl izopropanol eklenmiştir.
6. Pellet kısmı alınıp 1 ml amonyum asetat (%76' lık etil alkolle hazırlanmıştır) koyulup 15 dakika ters düz yapılmıştır.
7. Süpernatant kısmı dökülerek kurutmaya bırakılmıştır.
8. Kuruduktan sonra 100 µl ddH₂O ekleyip + 4 °C saklanmıştır
9. %1'lik agaroz jel (1gram agaroz, 100 ml 1x TAE, 3µL EtBr) hazırlanmıştır.
10. 2µl DNA Ladder ve 1:5 boya: DNA kuyucuklara yükleyip 90 Voltta 40 dakika yürütülmüştür.
11. DNA kalitesine bakılır ya da nanodropta ölçüm yapılarak 260/280 oranına bakılır.

3.3 SSR Analizi

Çizelge 3.1 SSR'da kullanılan maddeler

Kullanılan maddeler	Miktarları (µl)
PCR mix	12,5
DNA (10 ng)	2
Primer	1
DH ₂ O	8,5

Total 25 µl hazırlanmıştır. PCR Mix ve dH₂O 12,5 µl PCR tüplerine koyularak DNA ve Primerler koyulmuştur.

PCR koşulları 95 °C de 5 dk, ardından 38 döngü olacak şekilde 94 °C 1 dk, 58 °C de 1 dk, 72 °C de 1 dk ve son olarak 72 °C 10 dk şeklinde yapılmıştır (Julier et al. 2003; Sledge et al. 2005). PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülecek ve bant büyüklükleri 100 bp DNA markeri kullanılmıştır. Jel Ethidium bromür kullanılarak görüntülenmiştir.

3.3.1 Kullanılan Primerler

Çalışmada kullanılan primerler *M. truncatula*'dan elde edilen primerler tercih edilmiştir (Julier et al. 2003).

Çizelge 3.2 SSR çalışmasında kullanılan primerler

Primerler	İleri Primer	Geri Primer
Mtic48	TTTTTGTTAGTTTGATTTTAGGTG	GCTACAAAGTCTTCTCCACA
Mtic64	CCCGTCTTTTATGTTGTGG	AACAAACACAATGGCATGGA
Mtic77	TCTTCATCGCTTCTTCTATTCA	GCCGTATGGTGTTGTTGATG
Mtic93	AGCAGGATTTGGGACAGTTG	TACCGTAGCTCCCTTTTCCA
Mtic230	GTAAGCGCCTGCTTGGACT	GAGATTCTGCCAAAATGCAA
Mtic232	TAAGAAAGCAGGTCAGGATG	TCCACAAATGTCTAAAACCA
Mtic238	TTCTTCTTCTAGGAATTTGGAG	CCTTAGCCAAGCAAGTAAAA
Mtic248	TATCTCCCTTCTCCTTCTCC	GGATTGTGATGAAGAAATGG
Mtic441	CTTCCTTATCATCGCTTCC	CAGAGATTGAGAATCGAGAAG
Mtic451	GGACAAAATTGGAAGAAAAA	AATTACGTTTGTTTGGATGC
Mtic471	ATCAGGTGATGATTGGTTTT	CCAACCATCTTTGTTTCCTA

3.4 İstatistiksel Analiz

Jel görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilen görüntüler, bant varlığı durumunda (1), yokluğunda (0) değerleri verilerek skor edilmiştir. Genetik varyasyonu belirlemek için, gözlenen alel sayısı (Na), etkili allel sayısı (Ne), Nei gen çeşitliliği (He) ve Shannon bilgi indeksi (I) hesaplanmıştır. Hesaplamaların hepsi, POPGENE programı verileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Yeh et al.1999). Türler arasında benzerlik katsayısı Nei (1972) 'ye göre hesaplanmıştır. UPGMA ağacı, NTSYS v. 2.02 (Rohlf, 1998) kullanılarak oluşturulmuştur.

3.5 Protein İzolasyonu

1. Taze yonca yaprakların her birinden 0,0344 gram tartılmıştır.
2. 2ml santrifüj tüpüne konup 200 µl sample buffer (62,5 mM Tris-HCl Ph:6.8, %2'lık SDS, %10 Gliserol, %22lik β-merkaptetanol) eklenmiştir.
3. Homojenatörde 50 doku parçalayıcısında 3 dakika parçalanmıştır.
4. Santrifüj tüpleri raka konup su banyosunda 100 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Süpernatant kısmı alınarak -20 °C'de saklanır (Valentine et al. 2010).

3.6 SDS PAGE

Ayırma Jeli

Sistem ve camlar distile suyla temizlenmiştir sonra pipetle yavaş yavaş ayırma jel dökülmüştür. 2-propanol ile jel kapatılmıştır. Kasete 3 ml ayırma jeli pipet yardımıyla yüklenmiştir.

Çizelge 3.3 Ayırma jeli için kullanılan maddeler

Kullanılan maddeler	Miktar
4x Ayırma buffer tamponu	1,25 ml
%30 Akrilamid karışımı	1,65 ml
dH ₂ O	2,05 ml
%10 APS	75 µl
TEMED	5 µl

Ön Ayırma Jeli

Ayırma jel donduktan sonra 2-propanolla temizlenmiş ve üzerine 2 ml kadar yavaş yavaş dökülmüş ve tarak bastırılmıştır.

Çizelge 3.4 Ön ayırma jeli için gerekli olan maddeler

Kullanılan Maddeler	Miktar
4x Ön ayırma jel tamponu	25 ml
%30 Akrilamid karışımı	850µl
%10 APS	75 µl
TEMED	5 µl
dH ₂ O	2,85 ml

4x SDS PAGE Jeli Loading Buffer (Laemli Buffer)

Kullanmadan önce %10 β merkaptetanol eklenmiş 30 µl boya için 3.3 µl βmerkaptetanol eklenmiştir. Bu boya protein örnekleriyle karıştırılmış ve sonrasında jele yüklenmiştir. Totalde 20 µl olacak şekilde 15: 5 (protein: boya) oranında yükleme yapılmıştır (Laemmli 1970).

Çizelge 3.5 Loading buffer için gerekli maddeler

Kullanılan Maddeler	Miktar
40 Mm Tris-HCl	400 µl
EDTA	800 µl
%4 SDS	4 ml
%20 Gliserol	2,27 ml
Brom Fenol Mavisi	200 µl

SDS PAGE 1X Running Buffer

Protein ve boya 100 °C’de 5 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan jel tanka koyup üzerine 1x running buffer dökülerek 70 volta 5 saat yürütülmüştür.

Çizelge 3.6 1x Running buffer için gerekli maddeler

Kullanılan Maddeler	Miktar
Tris	3 gram
Glisin	14,4 gram
SDS	1 gram
dH ₂ O	1litre

Boyama Solüsyonu

Hazırlanan boyama solüsyonu filitreden geçirilmiştir. Jel bir kap içine alınıp üstüne boyama solüsyonu koyup üstü aliminyum folyoyla kapatılmıştır. 30-50 rpm’de sheaker 20 dakika bekletilmiştir.

Çizelge 3.7 Boyama solüsyonu için gerekli maddeler

Kullanılan Maddeler	Miktar
Commassie brillant blue	1 gram
Asetik asit	100 ml
EtOH	300 ml
dH ₂ O	600 ml

Yıkama Solüsyonu

Çizelge 3.8 Yıkama solüsyonu için gerekli maddeler

Kullanılan Maddeler	Miktar
EtOH	300 ml
Asetik asit	100 ml
dH ₂ O	600 ml

Jel yıkama solüsyonuyla bantlar gözükeneye kadar yıkanılmıştır. Jel görüntüleme cihazında fotoğrafı çekilmiştir.

3.7 Kromozom Sayımı

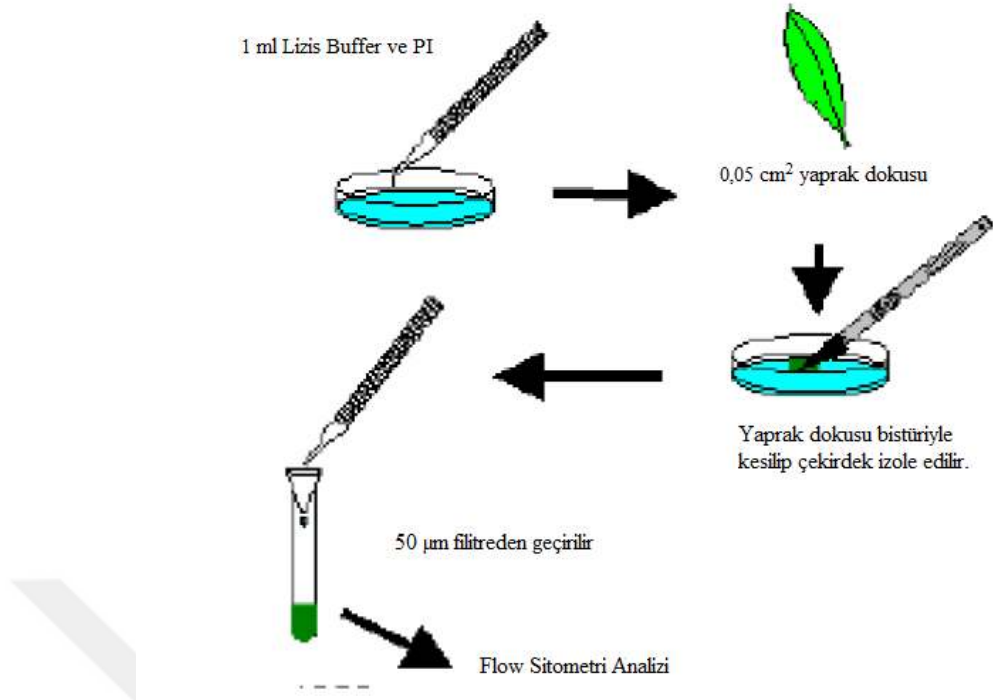
- 1.Petrinin altına bir tane flitre kağıdı koyup üstüne her bir yonca tohumdan 20 tane koyup distile suyla ıstatılmıştır.
- 2.Üç gün sonra her bir yonca tohumundan 1.5cm-2cm kökleri kesip falkon tüplere alınıp % 5'lik kolçisin ilave edilerek 3.5 saat 25⁰C 'de bekletilmiştir.
- 3.Daha sonra süzgeçten geçirip 2.5 saat musluk altında yıkanılmıştır.
- 4.Fiksatafif yapılmıştır. Fiksatafif için carnoy I (3: 1 etanol: asetik asit) en az 24 saat en çok 3 gün bekletildikten sonra 3 saat musluk altında yıkanılmıştır.
- 5.Hidroliz aşamasına geçilmiştir. Hidroliz için 1N NaOH ya da HCl de 60 ⁰C su banyosunda 7 dakika bekletilerek musluk altında 2 saat yıkanılmıştır.

6. Boyama aşamasına geçilmiştir. Boyama için %5'lik hemotoksinle 15 saat bekletilmiştir.
7. Daha sonra suyun rengi açılana kadar saf suyla yıkanılmıştır.
8. Yayma aşamasına geçilmiştir. Kök ucundan 1 mm kesip lam üzerine koyup parçalara ayrılmıştır. Üzerine 1 damla %45'lik asetik asit damlatılıp lamel kapatılmıştır.
9. Mikroskopta metafaz evresinde kromozom sayımı yapılmıştır (Aghayev 1998).

3.8 Flow Sitometri

Flow sitometri CyStain® PI Absolute P kitine göre yapılmıştır.

1. 0,5 cm² taze yonca yaprakları (Erzurum, Muş, Konya, Bilensoy, Bilensoy82, İside, Plato, Alsancak) ve kontrol grup olarak arpa kullanılmıştır.
2. 500 µl Nuclei Extraction Buffer konularak jiletle kesilmiştir.
3. 50µm cellTrics filitreden geçirilmiştir.
4. 2 ml staining solution (10 örnek için 20 ml staining buffer, 120 µl propidium iodide, 60 µl RNase A) konulmuştur.
5. 30-60 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir.
6. 488nm ya da 532 nm ölçüm yapılmıştır (Cyflow® Space Sysmex-Partec-GmbH; Görlitz, Almanya).



Şekil 3.2 Çekirdek analizinin yapılışı(Ochatt 2006)

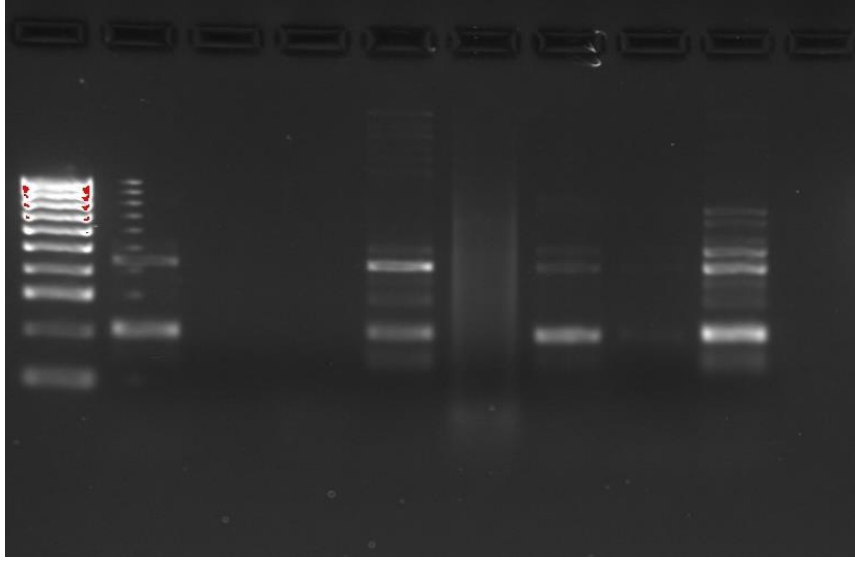
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 SSR Analizi

DNA analizleri sonucunda yonca ekotip ve çeşitlerinde 11 adet *Medicago truncatula* SSR primeri ile PCR yapılmıştır. Jel sonuçlarının skorlandırılıp istatistiksel analizi yapıldıktan sonra yorumlanmıştır. Tüm genotiplerden toplam olarak 50 adet bant elde edilmiş ve bütün çeşitlerde amplifikasyon görülmüştür. PIC değerlerine bakılarak yorumlanmıştır. PIC değeri 0,1800 ile sadece 1 bant üreten Mtic238 ve Mtic248 olurken, 0,3700 değeri ile Mtic441 ve Mtic471 primerlerinden elde edilmiştir.

Çizelge 4.1 Kullanılan SSR primerler, toplam bant sayıları ve PIC değerleri

Primer	Toplam Bant Sayıları	PIC
Mtic48	7	0,2500
Mtic64	3	0,2350
Mtic77	6	0,2433
Mtic93	5	0,2620
Mtic230	17	0,2771
Mtic232	6	0,3500
Mtic238	1	0,1800
Mtic248	1	0,1800
Mtic441	5	0,3700
Mtic451	5	0,2750
Mtic471	4	0,3700



Şekil 4.1 Mtic230.primerin genotiplerde oluşturdukları SSR band profilleri

(Marker- *M.truncatula* -Erzurum- Konya- Muş- Plato-Bilensoy- Bilensoy82- İside- Alsancak)

Çizelge 4.2 ‘de mikrosatellit lokusuna dayanarak oluşturulan 3 ekotip ve çeşidin genetik çeşitlilik tahminlerinde allellerin gözlem sayısı ortalama olarak 2 bulunmuştur. Yine allellerin etkinlik sayısı (n_e) ortalama olarak **1,5718** bulunup, en yüksek değer Mtic 441 ve Mtic 471’de **1,9756** ve en düşük değer Mtic238 ve Mtic 248 ‘de **1,2462** olmuştur.

Nei’nin gen çeşitliliğine bakılırsa ortalaması **0,3362** bulunmuş ve en düşük değer **0,19756** ile Mtic 238’de, en yüksek değer ise **0,4938** ’lik değer ile Mtic 441 ve Mtic 471 bulunmuştur. Shannon’un bilgi indeksi değeri ise **0,5092**’lük ortalama ile en düşük Mtic 238 ve Mtic 248 **0,3488’lık** ve en yüksek Mtic 441 ve Mtic471’de **0,6870** ile değişkenlik göstermiştir. Yonca ekotip ve çeşitleri arasındaki genetik çeşitlilik primerlerin genetik benzerlik katsayısı ile belirlenmektedir. Genetik benzerlik katsayı ise **0,1975** ile **0,4938** arasında değişmektedir.

Çizelge 4.2 Mikrosatellit lokusuna dayanarak 3 ekotip ve 5 çeşit yonca çeşidi için genetik çeşitlilik tahminleri

Lokus	Size	na*	ne*	h*	I*
Mtic48	9	2	1,4552	0,2963	0,4660
Mtic64	9	2	1,3872	0,2716	0,4393
Mtic77	9	2	1,4893	0,2963	0,4615
Mtic93	9	2	1,5049	0,3160	0,4888
Mtic230	9	2	1,5991	0,3455	0,5196
Mtic232	9	2	1,8000	0,4444	0,6365
Mtic238	9	2	1,2462	0,1975	0,3488
Mtic248	9	2	1,2462	0,3362	0,3488
Mtic441	9	2	1,9756	0,4938	0,6870
Mtic451	9	2	1,6109	0,3457	0,5179
Mtic471	9	2	1,9756	0,4938	0,6870
Mean	9	2	1,5718	0,3362	0,5092
Std. Dev	9	2	0,2552	0,1038	0,1185

*na = Allellerin gözlem sayısı

*h = Nei'nin gen çeşitliliği

*I = Shannon'un bilgi indeksi

*ne = Allellerin etkinlik sayısı

Çizelge.4.3'de polimorfik bilgi içeriğine bakıldığında ortalama PIC değerinin 0,2720 olduğu görülmektedir. PIC değerinin en yüksek olduğu primerler 0,3700 değerleri ile Mtic441 ve Mtic471 olmuştur. PIC değerinin en düşük olduğu primerler 0,1800 değeri ile Mtic238 ve Mtic248 olmuştur. PIC değeri 0,25'den küçükse genetik çeşitlilik düşük, 0,5'den büyükse genetik çeşitlilik yüksek olarak bulunmuştur. Mtic64, Mtic77, Mtic238, Mtic248 genetik çeşitlilik düşük olarak bulunmuştur. Mtic48, Mtic93, Mtic230, Mtic232, Mtic441, Mtic451, Mtic471 genetik çeşitlilik orta seviyede bulunmuştur.

Allel frekanslarına bakıldığında ortalama değeri 0,7482 bulunmuştur. Allel frekans değeri en yüksek olan primerler 0,8900 ile Mtic238 ve Mtic248 olarak tespit edilmiştir. Allel frekansı değeri en düşük olan primerler ise 0,5600 ile Mtic441 ve Mtic471 olarak tespit edilmiştir.

Gen çeşitliliğine bakıldığında ortalaması 0,3257 bulunmuştur. Gen çeşitlilik değeri en yüksek olan primerler 0,5000 olan Mtic441 ile Mtic471'dir. Gen çeşitlilik en düşük değeri en düşük olan primerler 0,200 olan Mtic238 ve Mtic248 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3 Çalışmada kullanılan primerlere ait allel frekansları, gen çeşitlilik ve PIC değerleri

Lokus	Allel Frekansı	Gen Çeşitliliği	PIC
Mtic48	0,8075	0,2975	0,2500
Mtic64	0,8350	0,2750	0,2350
Mtic77	0,7800	0,3000	0,2433
Mtic93	0,7800	0,3200	0,2620
Mtic230	0,7329	0,3500	0,2771
Mtic232	0,6700	0,4400	0,3500
Mtic238	0,8900	0,2000	0,1800
Mtic248	0,8900	0,2000	0,1800
Mtic441	0,5600	0,5000	0,3700
Mtic451	0,7250	0,3500	0,2750
Mtic471	0,5600	0,5000	0,3700
Mean	0,7482	0,3257	0,2720

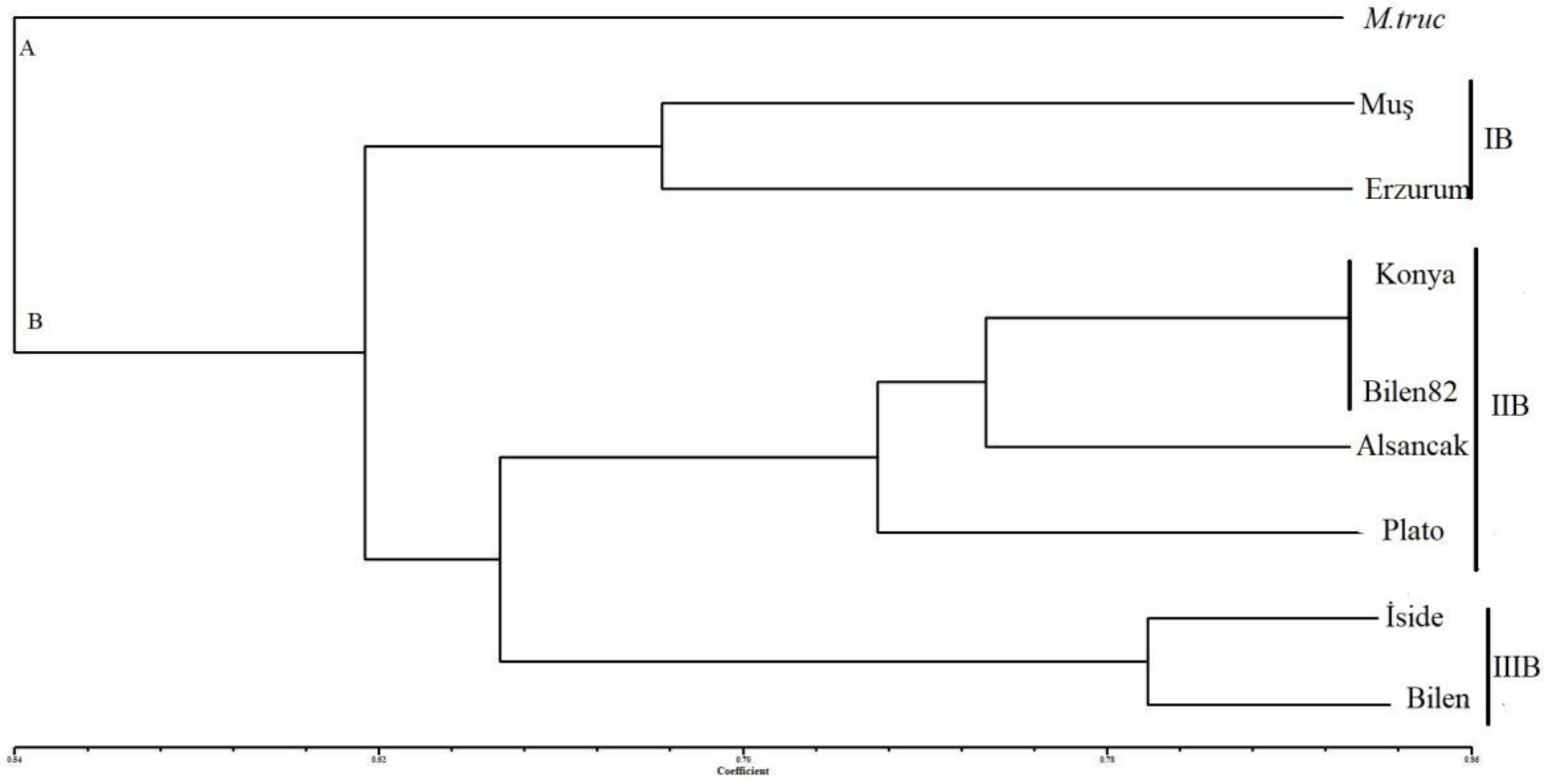
Çizelge 4.4 Nei (1972)'nin genetik benzerliği

	M.Truc	Muş	Konya	Erzurum	Plato	İside	Bilen	Bilen82	Alsancak
<i>M.Truc</i>	1.000.00								
Muş	0.32149	1.000.00							
Konya	0.60713	0.71426	1.000.00						
Erzurum	0.42851	0.67851	0.60713	1.000.00					
Plato	0.57149	0.60713	0.67851	0.50000	1.000.00				
İside	0.50000	0.46426	0.53574	0.64287	0.50000	1.000.00			
Bilen	0.64287	0.67851	0.67851	0.71426	0.71426	0.78574	1.000.00		
Bilen82	0.67851	0.57149	0.85713	0.67851	0.75000	0.67851	0.75000	1.000.00	
Alsancak	0.53574	0.57149	0.71426	0.60713	0.75000	0.60713	0.67851	0.78574	1.000.00

Ekotip ve çeşitler arasında SSR verileri kullanılarak Nei (1972)'ye göre değerlendirilen genetik benzerlik katsayısı 0,32 ile 0,85 değerleri arasında değişmektedir. Yonca ekotipi 0,32 ile en uzak Muş, 0,85 ile en yakın Bilensoy82 ekotipi olmaktadır. SSR verileri ile elde edilen bilgilere dayanarak NTSYS-PC paket programıyla oluşturulan ve Nei (1972)'ye göre yapılan UPGMA kümeleme analizi sonucu izelge 4.5'de verilmiştir. şekilde görüldüğü gibi model organizma *M.truncutula* ile 8 yonca ekotip ve eřidi A ve B grubu olarak iki ana gruba ayrılmıştır. A grubu yalnız *M.truncutula* eřidini oluşurken, B grubu kendi arasında 3 alt gruba ayrılmıştır. IB alt grubu; Muş ve Erzurum ekotipi IIB alt grubu; Konya, Bilensoy82, Alsancak ve Plato IIIB alt grubu; İside ve Bilensoy'dur.



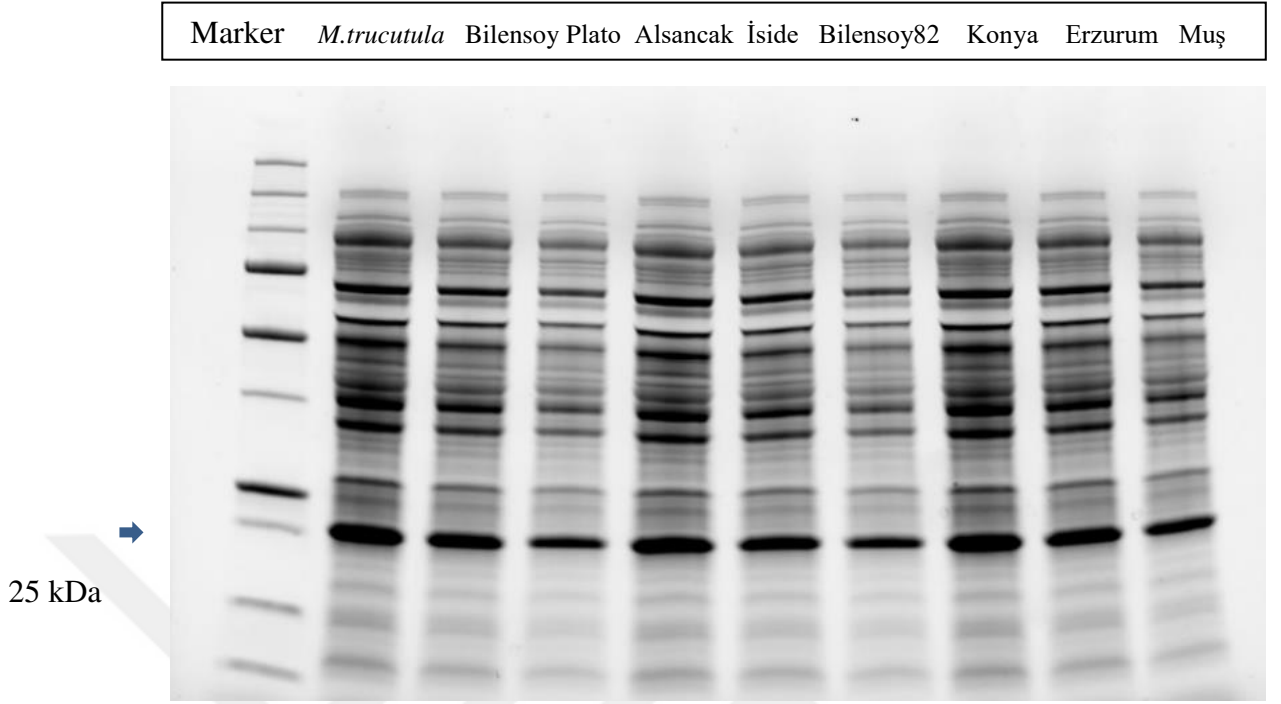
Çizelge 4.5 SSR-Genetik benzerlik dendogramı



Yonca ekotip ve çeşitlerinde SSR analizi yaparak gen çeşitlilik, allel frekansları ve PIC değerleri hesaplanmıştır. PIC ve gen çeşitlilik değeri en düşük değere sahip olan primerler Mtic238 ve Mtic248 iken en yüksek değere sahip olan primerler ise Mtic441 ve Mtic471 dir. Allel frekansında ise durum tam tersidir. Akralılık dereceleri kıyaslanmada bulunmuştur. Erzurum ve Muş; Konya, Bilensoy82, Alsancak ve Plato; İside ile Bilensoy monomorfik olarak tespit edilmiştir. *M.truncutula* olan model organizmamız diğer ekotip ve çeşitlerde ise polimorfik olarak bulunmuştur. İva Vievhmannova et al. (2014) bizim çalışmamıza benzer bir çalışmasında ISSR markör tekniği kullanılmıştır. Farklı bitki hatları kullanılmış ve bütün amplike ürünler bizim çalışmamızda olduğu gibi monomorfik olarak tespit edilmiştir.

4.2 SDS PAGE Analizi

Yonca ekotip ve çeşitlerin total protein analizi yapılmış ve aşağıdaki şekilde 4.2.1' de verilmiştir. Toplam protein bantları sayıları yonca ekotip ve çeşitlerinde aynı olmasına rağmen bant yoğunluğuna bakılarak kıyaslamada bulunmuştur. Total protein miktarı model organizma *M.truncutula*, Alsancak ve Konya ekotipinde en yüksekken, Plato ve Bilensoy82 çeşitlerinde en düşüktür. Total protein miktarı en düşükten en yükseğe doğru sıralaması şöyledir; *M.truncutula*, Konya, Alsancak; Erzurum, Bilensoy, İside; Muş, Plato ve Bilensoy82' dir. 25 kDa olan bantlar ise globüler protein olabilir. Fatıma et al. (2015) yılında *M. truncatula*'nın total protein miktarını, bizim çalışmamızda olduğu gibi bant profillerin büyüklüklerini tespit etmiştir.



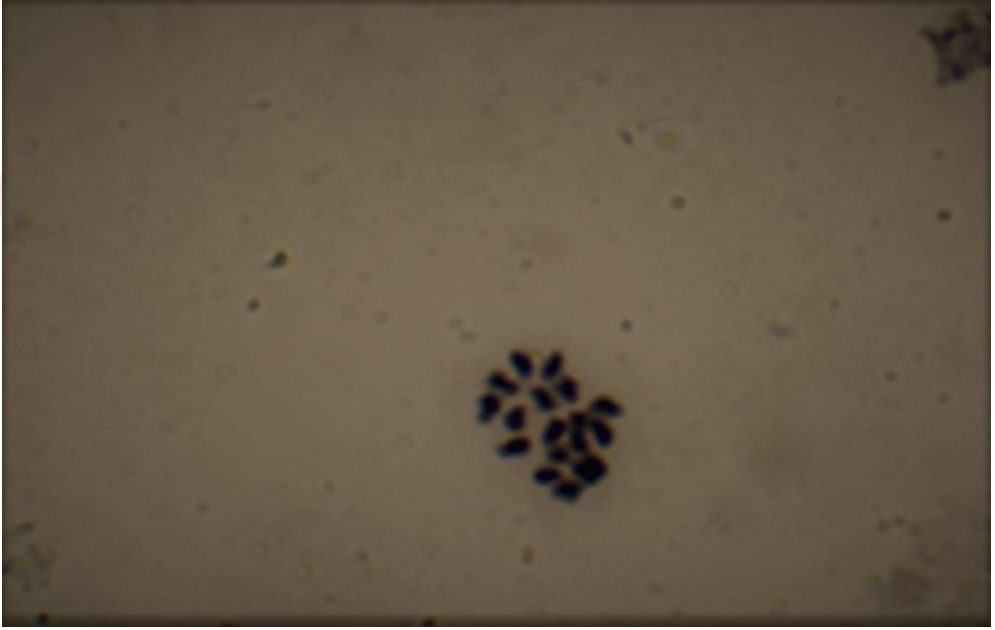
Şekil 4.2 SDS PAGE jel bant görüntüsü

4.3 Kromozom Sayımı

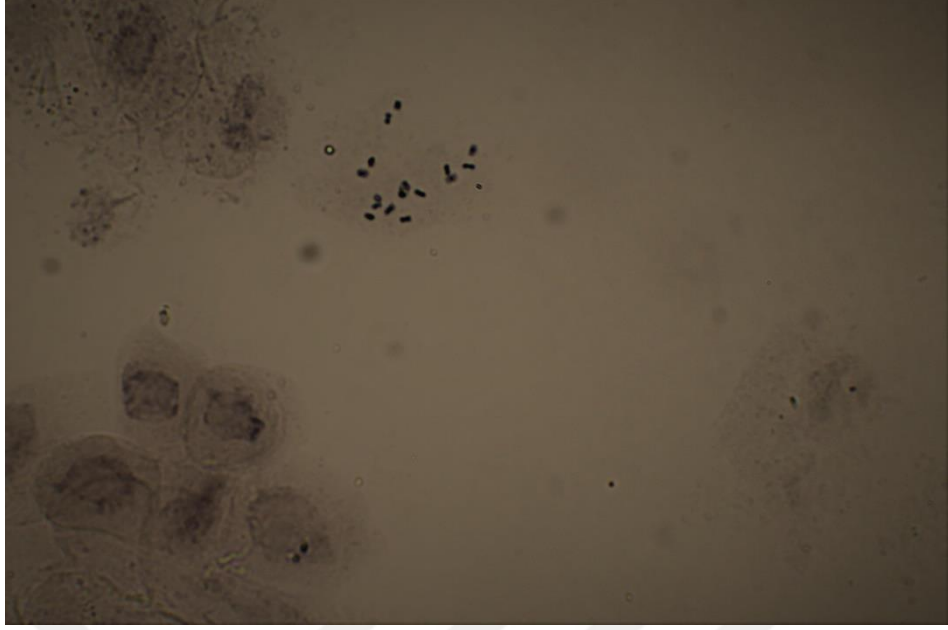
Yonca ekotip ve çeşitlerinin metafaz evresinde görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir. İside, Bilensoy çeşitleri ile Muş ekotipi diploid olup kromozom sayısı 16 dır.



Şekil 4.3 İside çeşidinin metafaz görüntüsü ($2n = 2x = 16$)



Şekil 4.4 Muş ekotipinin metafaz görüntüsü ($2n = 2x = 16$)



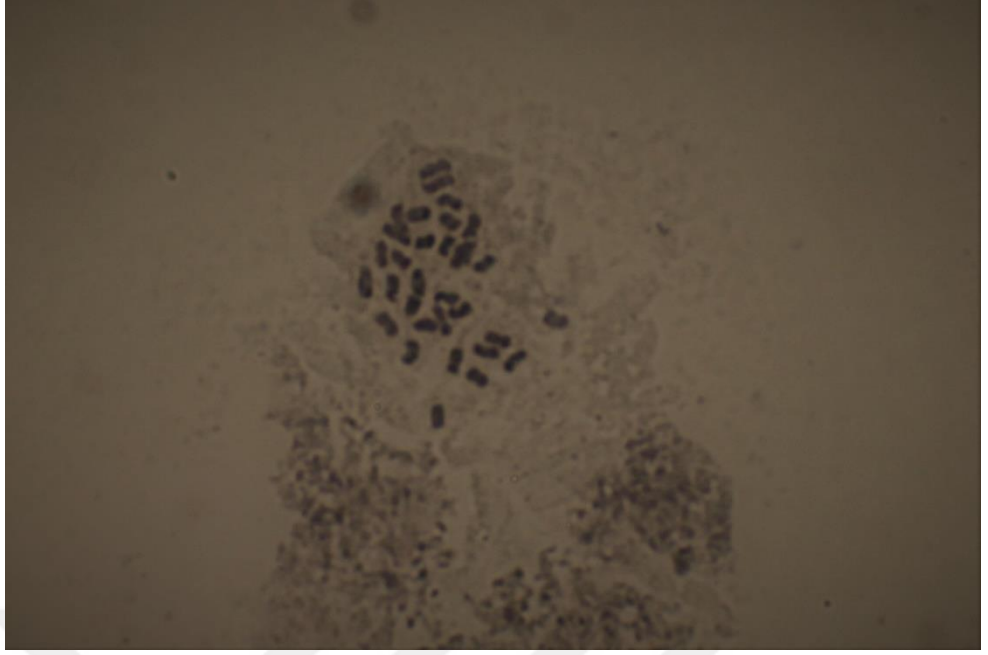
Şekil 4.5 Bilensoy çeşidinin metafaz görüntüsü ($2n = 2x = 16$)

Bilensoy82 çeşidi triploid olup kromozom sayısı 24 dür. Normalde yonca diploid ya da tetraploiddir. Yonca yabancı tozlaşma özelliğine sahip olduğu için genetik çeşitlilik kazandırmıştır.

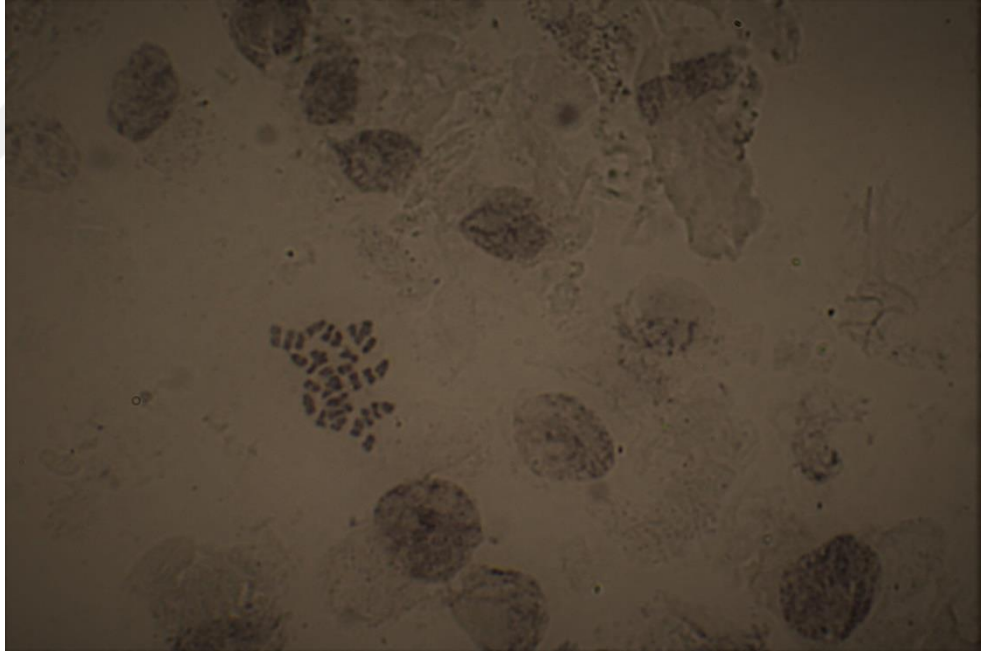


Şekil 4.6 Bilensoy 82 çeşidinin metafaz görüntüsü ($3n = 3x = 24$)

Erzurum ve Konya ekotiplerin kromozom sayısı 30 dur.



Şekil 4.7 Erzurum ekotipinin metafaz görüntüsü ($4n = 2x = 30$)



Şekil 4.8 Konya ekotipinin metafaz görüntüsü ($4x = 2n = 30$)



Şekil 4.9 Alsancak çeşidinin metafaz görüntüsü ($4n = 4x = 32$)



Şekil 4.10 Plato çeşidinin metafaz görüntüsü ($4x = 4n = 32$)

4.4 Flow Sitometri

Yonca ekotip ve çeşitlerinde çekirdek analizi yapılarak histogramlar oluşturulmuştur. Çekirdektdeki DNA içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Örneğin çekirdek DNA içeriği = örneğin floresan yoğunluğu / standardın floresan yoğunluğu X standardın bilinen DNA içeriği

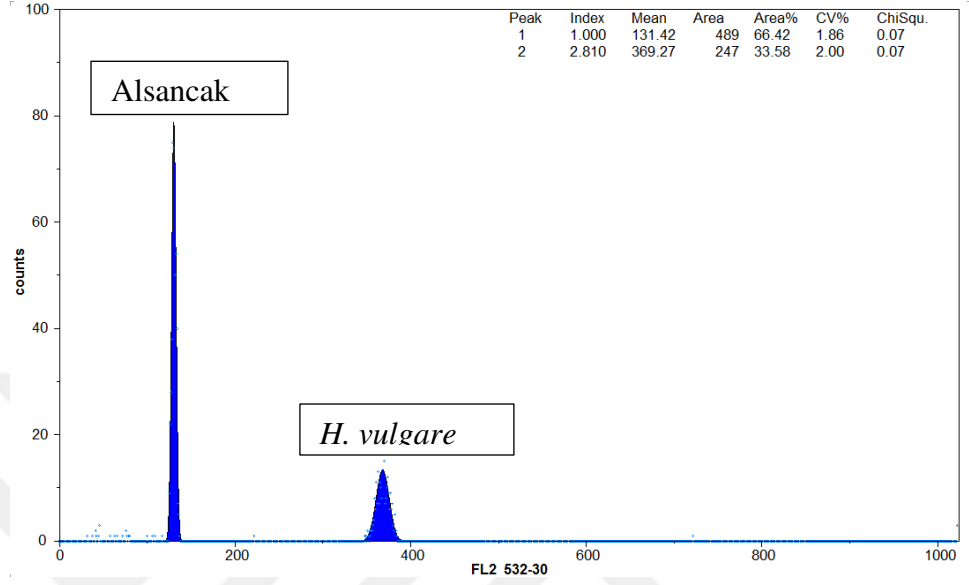
Çizelge 4.6 Yonca ekotip ve çeşitlerin DNA içerikleri

Yonca	Örnek pik	Standart pik	Standart	DNA içeriği(pg)	CV1 (yonca)	CV2 (arpa)
Alsancak	131,42	369,27	10,65	3,79	1,86	2
Bilensoy82	132,11	378,84	10,65	3,71	1,67	1,66
Bilensoy	135,94	374,25	10,65	3,87	2,02	2,06
Erzurum	130,49	370,37	10,65	3,75	2,15	1,96
İside	133,62	369,78	10,65	3,85	2,35	2,11
Konya	126,43	354,22	10,65	3,80	2,12	2,06
Muş	138,73	387,77	10,65	3,81	2,13	2,44
Plato	118,22	321,05	10,65	3,92	2,41	1,76

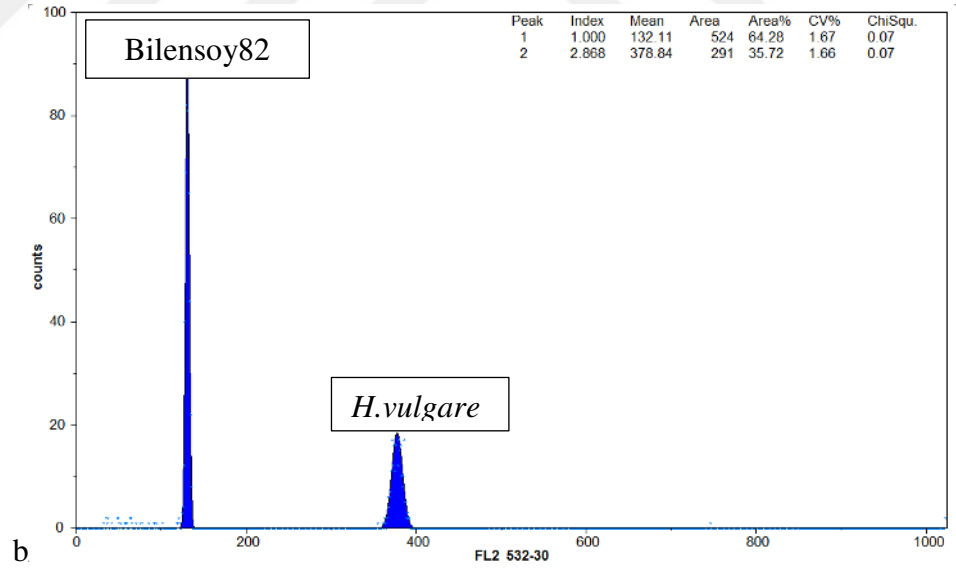
Yonca ekotip ve çeşitlerinde çekirdek analiz sonuçlarına bakıldığında çekirdek DNA içerik değerleri Çizelge 4.6'da gösterildiği gibi test edilen tüm yonca bitkilerinde birbirlerine çok yakın sonuçlar alınmış olup bu sonuçlar tüm bitkilerin tetraploid olduğunu göstermiştir. Klasik kromozom sayımı belirleme yönteminde ise Muş ekotipi, Bilensoy ve Iside çeşidi diploid kromozom sayısına sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Bilensoy82 çeşidinde kromozom sayısı triploid çıkmıştır. Flow sitometri sonuçlarına ait test edilen yonca bitkilerinin pik profilleri Şekil 4'de gösterilmiştir. Iva Viehmannova et al. (2014) bizim çalışmamıza benzer olarak flow sitometri analizi yapmıştır ve ploidi seviyesi hepsinde aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir. Kromozom sayısı bizim çalışmadan farklı olarak aynı sayıda olduğu tespit edilmiştir. Kromozom sayısı ile ploidi seviyesi bizim çalışmamızda ters korelasyon göstermiştir.

Bunun nedeni ise yonca'nın yabancı döllenme özelliğinin olması ve tohumların morfoloji olarak büyüklükleri homojen olmamasından dolayı sapmalar gözlemlenmiştir. Ayrıca Flow sitometri gibi dolaylı yöntemler bitkilerin ploidi seviyesini teyit etmede kesin sonuç vermediğinden dolayı kromozom sayılarını doğrulamada yanıltıcı olasılığı olduğu tespit edilmiştir. *Medicago* bitkilerinin flow sitometrik analizine ilişkin literatür oldukça zayıf olduğu tespit edilmiştir (Iantcheva et al. 2001; Elmaghrabi

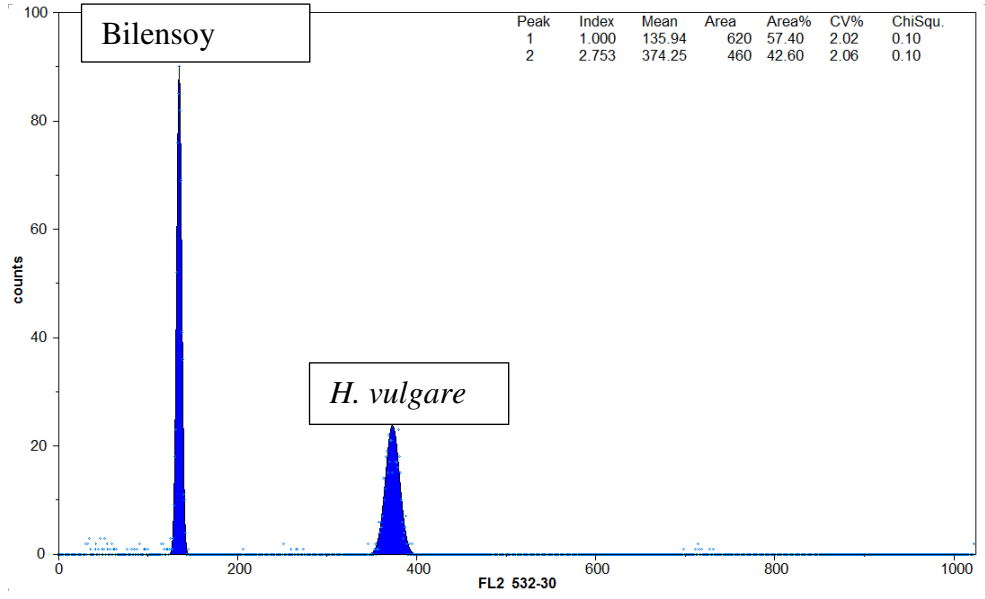
and Ochatt, 2006; Ochatt et al. 2005). Ochatt et al. (2005) bizim flow sitometri analizinde gibi ekotip ve çeşitlerinde üç pik oluşmuştur. Bunun nedeni ise endoreplikasyondan kaynaklanmıştır.



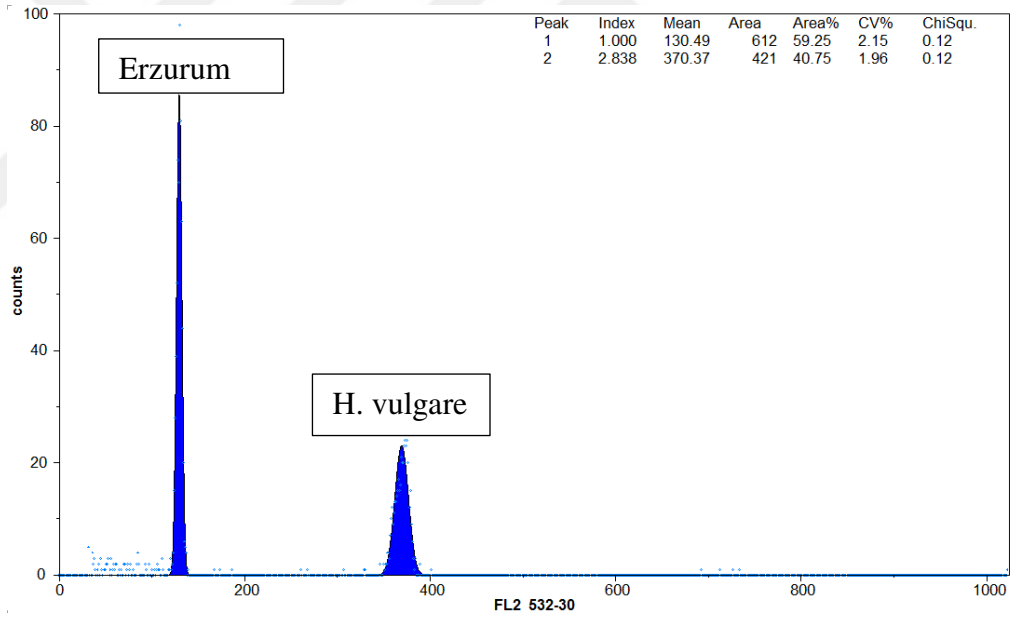
Şekil 4.11 Alsancak ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları



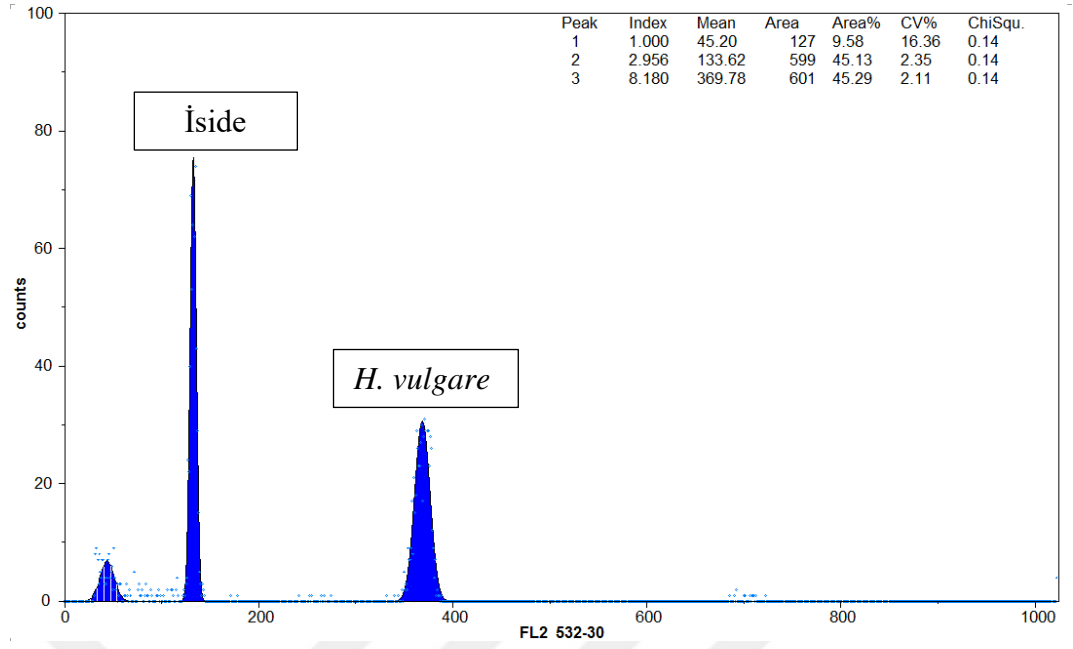
Şekil 4.12 Bilensoy82 ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları



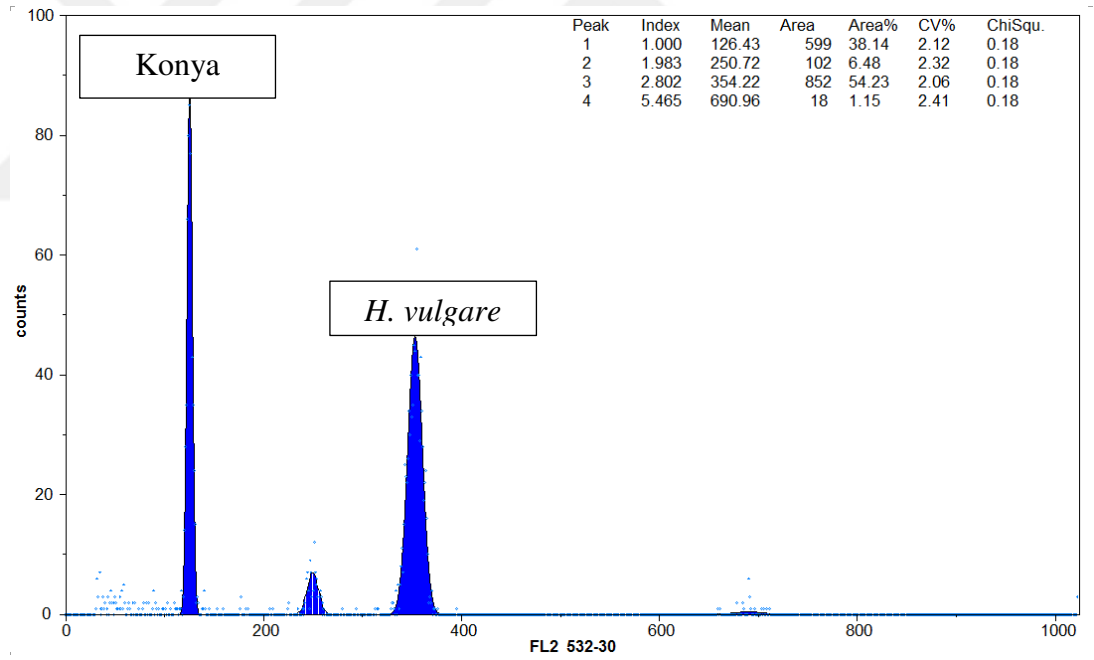
Şekil 4.13 Bilensoy ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları



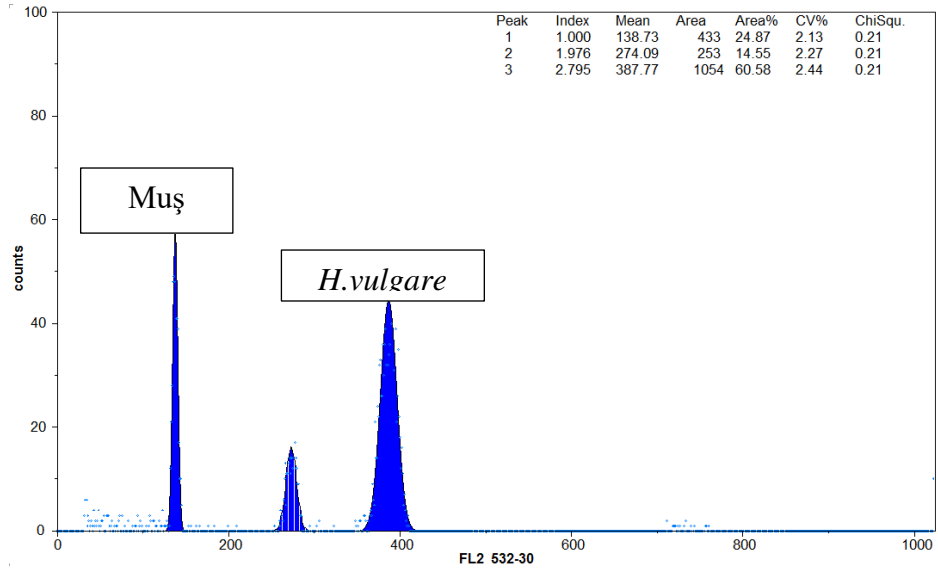
Şekil 4.14 Erzurum ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları



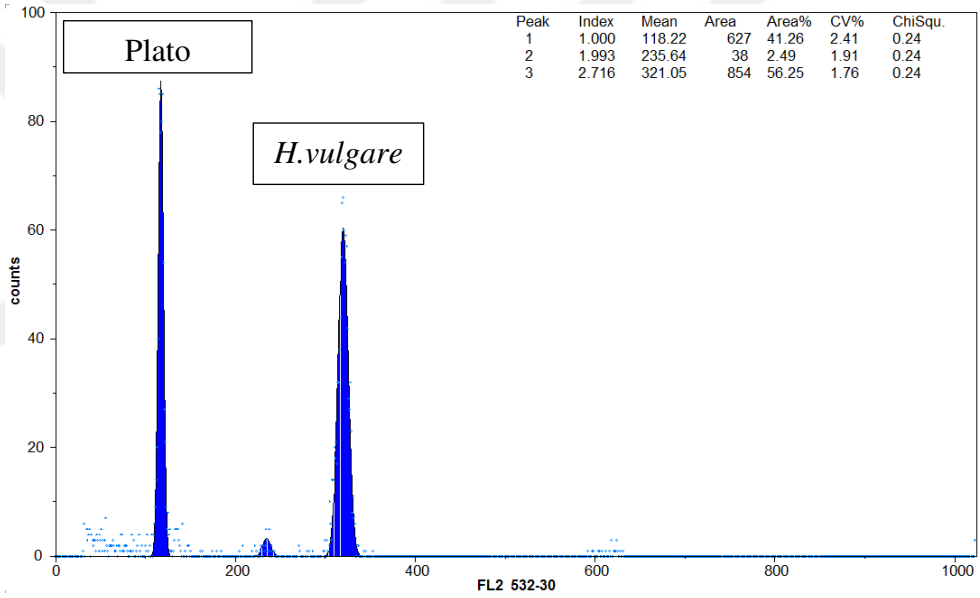
Şekil 4.15 İside ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları



Şekil 4.16 Konya ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları



Şekil 4.17 Muş ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları



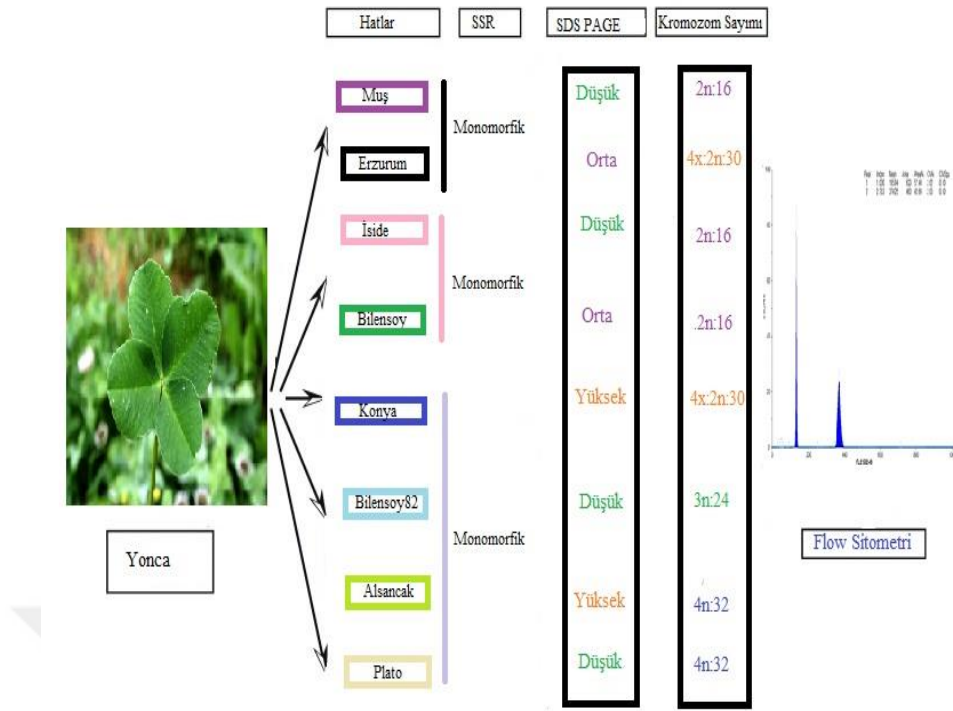
Şekil 4.18 Plato ve Arpa bitkilerine ait G1 piklerinin birbirlerine göre nispi pozisyonları

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada yonca ekotip ve çeşitlerinin çeşitlerinin DNA, protein, çekirdek analizi ve kromozom sayımıyla genetik çeşitlilik belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- ✚ Yonca ekotip ve çeşitlerinin akarabalık ilişkisinin incelenmesi amacıyla 11 SSR markörü kullanılmıştır. Bu SSR primerlerinin hepsinden PCR ürünü elde edilmiştir.
- ✚ Kullanılan 11 SSR markörünün tümü kullanılan populasyon üzerinde monomorfik bulunmuştur.
- ✚ Toplamda 11 SSR markörü ile 50 adet bant üretilmiştir.
- ✚ Nei (1972)'nin genetik benzerliği 0,32 ile 0,85 arasında değişmektedir.
- ✚ SSR markörleriyle kullanılarak yapılan kümeleme analizlerinde 2 ana grup elde edilmiş olup, bunlardan biri 3 alt gruba ayrılmıştır.
- ✚ Toplam protein miktarını SDS-PAGE'in bant profillerin yoğunluklarına göre kıyaslanmıştır. En yüksek miktarda protein Alsancak ve Plato çeşitlerinde, en düşük miktarda protein ise Muş, Bilensoy82 ve Plato çeşitinde tespit edilmiştir.
- ✚ Kromozom sayımında ise Muş, İside ve Bilensoy kromozom sayısı ($2n = 2x = 16$), Bilensoy82 ($3n = 3x = 24$), Konya ve Erzurum ($4n = 2x = 30$), Plato ve Alsancak ($4n = 4x = 32$) olduğu tespit edilmiştir.
- ✚ Flow sitometri analiz sonucu ise bütün ekotip ve çeşitler tetraploiddir.



Şekil 5.1 Sonuçların genel tablosu



Bu çalışmada elde edilen sonuçlara dayanarak yeni çeşit ve hat bitkilerin geliştirilmesi ve piyasaya sürülmesi, çiftçiye çeşit seçiminde olanak sağlanması amaçlanmıştır.



Bu çalışmada elde edilen sonuçlara dayanarak potansiyel olarak yararlı gen kaynakları içeren yerli çeşitlerin yerinin alması amaçlanmıştır. Ayrıca bitki türlerine göre ıslah yöntemleri, farklı coğrafik bölgelere uygun populasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Agayev, Y. M., 1998. Advanced squash methods for investigation of plant chromosomes. In Fourth Iranian Congress in Crop Production and Breeding Science (Aug. 25-28). Esfahan University of Technology, Esfahan.
- Allard, R. W., 1988. Genetic changes associated with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. *Journal of Heredity*, 79(4), 225-238.
- Allard, R. W., Babbel, G. R., Clegg, M. T., & Kahler, A. L., 1972. Evidence for coadaptation in *Avena barbata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(10), 3043-3048.
- Arora, R. K., 1997. Biodiversity convention, global plan of action and the national programmes. In *Plant Genetic Resources–Bangladesh Perspective, Proceedings of a National Workshop on Plant Genetic Resources* pp. 26-29.
- Aston, J. L., & Bradshaw, A. D., 1966. Evolution in closely adjacent plant populations II. *Agrostis stolonifera* in maritime habitats. *Heredity*, 21(4), 649.
- Avcı, S., İlhan, E., Erayman, M., & Sancak, C., 2014. Analysis of *Onobrychis* genetic diversity using SSR markers from related legume species. *J Anim Plant Sci*, 24, 556-566.
- Baatout, H., Marrakchi, M., & Pernes, J., 1990. Electrophoretic studies of genetic variation in natural populations of allogamous *Hedysarum capitatum* and autogamous *Hedysarum euspinosissimum*. *Plant Science*, 69(1), 49-64.
- Bauchan, G. R., & Greene, S. L., 2002. Status of the *Medicago* germplasm collection in the United States. International Plant Genetic Resources Institute.
- Bennett, E., 1970. Genecology, genetic resources and plant breeding. *Genetica Agraria*, 24, 210-20.
- Blondon, F., Marie, D., Brown, S., & Kondorosi, A., 1994. Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37(2), 264-270.
- Brown, W. L., 1983. Genetic diversity and genetic vulnerability—an appraisal. *Economic botany*, 37(1), 4-12.
- Brush, S. B., 1995. In situ conservation of landraces in centers of crop diversity. *Crop science*, 35(2), 346-354.
- Chang, T. T., 1994. The biodiversity crisis in Asian crop production and remedial measures. *Biodiversity and Terrestrial Ecosystems*. Taipei, Institute of Botany, Academia Sinica, Monograph Series, (14), 25-41.
- Chatterjee, T., & Sharma, A. K., 1969. Cytotaxonomy of cichorieae. *Genetica*, 40(1), 577-590.
- Doyle, J. J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Elmaghrabi, A., & Ochatt, S., 2006. Isoenzymes and flow cytometry for the assessment of true-to-typeness of calluses and cell suspensions of barrel medic prior to regeneration. *Plant cell, tissue and organ culture*, 85(1), 31-43.
- Frankel, O. H., & Bennett, E., 1970. Genetic resources in plants-their exploration and conservation. *Genetic resources in plants-their exploration and conservation*.
- Frankel, O. H., & Hawkes, J. G. (Eds.), 1975. *Crop genetic resources for today and tomorrow* (Vol. 2). CUP Archive.

- Fyad-Lameche, F. Z., Iantcheva, A., Siljak-Yakovlev, S., & Brown, S. C., 2016. Chromosome number, genome size, seed storage protein profile and competence for direct somatic embryo formation in Algerian annual *Medicago* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(3), 531-540.
- Goldblatt, P., 1980. Polyploidy in angiosperms: monocotyledons. In *Polyploidy* (pp. 219-239). Springer, Boston, MA.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M., 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics research international*.
- Grant, V., 1963. The origin of adaptations. *The origin of adaptations*.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., & Sherman-Broyles, S. L., 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. In *Population genetics of forest trees* pp. 95-124. Springer, Dordrecht.
- Hamrick, J. L., Murawski, D. A., & Nason, J. D., 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio*, 107(1), 281-297.
- Huggins, D. R., Randall, G. W., & Russelle, M. P., 2001. Subsurface drain losses of water and nitrate following conversion of perennials to row crops. *Agronomy Journal*, 93(3), 477-486.
- Iantcheva, A., Vlahova, M., Trinh, T. H., Brown, S. C., Slater, A., Elliott, M. C., & Atanassov, A., 2001. Assessment of polysomaty, embryo formation and regeneration in liquid media for various species of diploid annual *Medicago*. *Plant Science*, 160(4), 621-627.
- İlhan, E., Erayman, M., Kaplan, D., Haliloğlu, K., 2009. Buğday SSR markörlerinin arpa genomuna transfer edilebilirliği ve arpa (*Hordeum vulgare*) çeşitlerinde genetik çeşitliliğinin belirlenmesi, Türkiye VIII Tarla Bitkileri Kongresi-Poster Bildiriler, 19-22 Ekim, 531-534 Hatay.
- Iva Viehmannova, Zuzana Bortlova, Jan Vitamvas, Petra HLasna Cepkova, Katerina Elisaova, Eva Svobodova and Martina Travnickova., 2014. *Electronic Journal of Biotechnology* 17 (2014) 102-106.
- Julier, B., Flajoulot, S., Barre, P., Cardinet, G., Santoni, S., Huguet, T., & Huyghe, C., 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC plant biology*, 3(1), 9.
- Kahler, A. L., & Allard, R. W., 1981. Worldwide patterns of genetic variation among four esterase loci in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 59(2), 101-111. Kannenberg, L. W., & Falk, D. E., 1995. Models for activation of plant genetic resources for crop breeding programs. *Canadian Journal of Plant Science*, 75(1), 45-53.
- Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., Lavi, U., & Cregan, P. B., 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theoretical and Applied Genetics*, 93(8), 1282-1290.
- Korkut, O. B. K., 2005. Bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının tane verimi ve bazı fenolojik özelliklerinin belirlenmesi. *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(1), 58-65.
- Laane, M. M., & Höiland, K., 1986. Chromosome number and meiosis in herbarium specimens from the extinct Scandinavian population of *Crepis multicaulis*. *Hereditas*, 105(2), 187-192.

- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
- Lanner-Herrera, C., Gustafson, M., Filt, A. S., & Bryngelsson, T., 1996. Diversity in natural populations of wild Brassica oleracea as estimated by isozyme and RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43(1), 13-23.
- Leach, G. J., & Clements, R. J., 1984. Ecology and grazing management of alfalfa pastures in the subtropics. In *Advances in Agronomy* (Vol. 37, pp. 127-154). Academic Press.
- Lebot, V., 1992. Genetic vulnerability of Oceania's traditional crops. *Experimental Agriculture*, 28(3), 309-323.
- Leitch, I. J., & Bennett, M. D., 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological journal of the Linnean Society*, 82(4), 651-663.
- Litt, M., & Luty, J. A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 397.
- Ertuğ, M., Sabancı, C. O., Şensoy, S., 2016. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2016, 25 (Özel sayı-1):249-254 Araştırma Makalesi (Research Article)
- Maroof, M. S., Allard, R. W., & Zhang, Q. F., 1990. Genetic diversity and ecogeographical differentiation among ribosomal DNA alleles in wild and cultivated barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(21), 8486-8490.
- Martin, J. M., Blake, T. K., & Hockett, E. A., 1991. Diversity among North American spring barley cultivars based on coefficients of parentage. *Crop Science*, 31(5), 1131-1137.
- Masterson, J., 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264(5157), 421-424.
- McNeilly, T. (1997). Patterns of population differentiation. *Boccone*, 7, 89-93.
- Öten, M., Albayrak, S., 2016. Batı Akdeniz Sahil Kuşağından Toplanan Yonca (*Medicago sativa* L.) Populasyonlarının Moleküler Karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2).
- Morden, C. W., Doebley, J. F., & Schertz, K. F., 1989. Allozyme variation in old world races of *Sorghum bicolor* (Poaceae). *American journal of botany*, 247-255.
- Nevo, E., 1990. Molecular evolutionary genetics of isozymes: Pattern, theory, and application. In: Ogita ZI & Markert CL (eds) *Isozymes: Structure, Function, and Use in Biology and Medicine* (Progress in Clinical and Biological Research Vol 344), (pp 701-742). Wiley-Liss Inc.
- Nevo, E., Noy-Meir, I., Beiles, A., Krugman, T., & Agami, M., 1991. Natural selection of allozyme polymorphisms: Micro-geographical spatial and temporal ecological differentiation in wild emmer wheat. *Israel J. Bot.* 40: 419-449.
- Nevo, E., 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical population biology*, 13(1), 121-177.
- Nevo, E., Zohary, D., Brown, A. H. D., & Haber, M., 1979. Allozyme-environment relationship in natural populations of wild barley in Israel. *Evolution*, 33, 815-833.
- Ochatt, S. J., Delaitre, C., Lionneton, E., Huchette, O., Patat-Ochatt, E. M., & Kahane, R., 2005. One team, PCMV, and one approach, in vitro biotechnology, for one aim, the breeding of quality plants with a wide array of species. *Crops growth, quality and biotechnology*. Helsinki, Finland: WFL Publ. Sci. & Technol, 1038-67.

- Pignatta, D., Dilkes, B. P., Yoo, S. Y., Henry, I. M., Madlung, A., Doerge, R. W., ... & Comai, L., 2010. Differential sensitivity of the *Arabidopsis thaliana* transcriptome and enhancers to the effects of genome doubling. *New Phytologist*, 186(1), 194-206.
- Plucknett, D. L., Smith, N. J. H., Williams, J. T., & Anishetty, N. M., 1987. *Gene Banks and the world's food* Princeton University press, Princeton, NJ 247 pp. *Rhizoctonia bataticola*.
- Powell, W., Machray, G. C., & Provan, J., 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*, 1(7), 215-222.
- Prosperi, J. M., Jenczewski, E., Angevain, M., & Ronfort, J., 2006. Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 843-856.
- Putnam, D., Russelle, M., Orloff, S., Kuhn, J., Fitzhugh, L., Godfrey, L., & Long, R., 2001. Alfalfa, wildlife, and the environment. California Alfalfa and Forage Association, Novato, CA. Available at Web site: [http://www. calhay. org/environmental. Html](http://www.calhay.org/environmental.html).
- Quan, W., Liu, X., Wang, H., & Chan, Z., 2016. Physiological and transcriptional responses of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(1), 105-115.
- Rajasekharan, P., E., Sahijram, L., 2015. *In vitro* conservation of plant germplasm *Plant Biology and Biotechnology* pp 417-442.
- Rao, V. R., Riley, K. W., Quek, P., Mal, B., & Zhou, M., 1999. IPGRI-APO activities on plant genetic resources in the region—An overview. In ii SANPGR PROCEEDINGS (p. 74).
- Rao, V. R., & Hodgkin, T., 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant cell, tissue and organ culture*, 68(1), 1-19.
- Robinson, J. P., 2006. Introduction to flow cytometry. *Flow cytometry talks*. Purdue University Cytometry Laboratories.
- Rohlf, F. J., 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis: version 2.02. Exeter Software. Setauket, New York.
- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., & Ganal, M. W., 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4), 2007-2023.
- Schlarbaum, S. E., & Tsuchiya, T., 1984. Cytotaxonomy and phylogeny in certain species of Taxodiaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 147(1-2), 29-54.
- Singh, R. B., & Williams, J. T., 1984. Maintenance and multiplication of plant genetic resources. *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation* (JHW Holden and JT Williams, eds.). George Allen and Unwin, London, 120-130.
- Sledge, M. K., Ray, I. M., & Jiang, G., 2005. An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theoretical and applied genetics*, 111(5), 980-992.
- Soya, H. R., Avcioglu, and H. Geren., 2004. *Forage crops*, Hasad Press, Turkey, 223p.
- Stebbins Jr, G. L., 1938. Cytological characteristics associated with the different growth habits in the dicotyledons. *American Journal of Botany*, 189-198.
- Tachida, H., & Yoshimaru, H., 1996. Genetic diversity in partially selfing populations with the stepping-stone structure. *Heredity*, 77(5), 469.
- Tosun, H., Zencirci, N., Meyveci, K., Düşünceli, F., Ünal, S., 2003. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 22 (2), 41-96.

- Touil, L., Guesmi, F., Fares, K., Zagrouba, C., & Ferchichi, A., 2008. Genetic diversity of some Mediterranean populations of the cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using SSR markers. Pak. J. Biol. Sci, 11(15), 1923-1928.
- Savaş, T. Ü., G , Keleş, H., Göçmen, D., Güleriyüz, V., Nizam, İ., Cabi, E., Yazıcı, A., Çakal, Ş., Tuna, M ., 2016. Flow Sitometri ile Çok Yıllık Buğdaygil Yem Bitkisi Genetik Kaynaklarının Karakterizasyonu. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25 (2), 7-12. DOI: 10.21566/tarbitderg.281591.
- Valentine, O. N., Thirukkumaran, G., Pejman, A., & Raham, S. K., 2010. Stable integration and expression of wasabi defensin gene in “Egusi” melon (*Colocynthis citrullus* L.) confers resistance to Fusarium wilt and Alternaria leaf spot, 29(9):943-54. doi: 10.1007/s00299-010-0880-2.
- Watanabe, K. N., Rao, V. R., & Iwanaga, M., 1998. International trends on the conservation and use of plant genetic resources. Plant biotechnology, 15(3), 115-122.
- Yeh, F. C., 1999. Microsoft window based freeware for population genetic analysis. Popgene Ver. 1. 31.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

İsim–Soy isim : Büşra YAZICILAR
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi ve Yeri : 23.05.1993/Rize
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +90 (545) 919 66 03
e–mail : Busraben2839@gmail.com

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2018
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Erzurum Lisesi	2012