

**T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ERZİNCAN VE ÇEVRESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN
ASTRAGALUS L. TÜRLERİNİN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Engin DAĞ

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

**GENETİK VE BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2022**

Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ERZİNCAN VE ÇEVRESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN *ASTRAGALUS* L. TÜRLERİNİN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Engin DAĞ

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genetik Ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

Erzincan ve çevresinde 2021 yılının vejetasyon döneminde belirlenen 42 lokasyondan *Astragalus* L. cinsine ait örnekler toplanmıştır. Yapılan morfolojik çalışmalar sonucu 12 farklı tür belirlenmiştir. Bunlardan 3'ü endemiktir (*Astragalus pennatulus*, *Astragalus karamasicus*, *Astragalus lycius*). Belirlenen türler arasındaki genetik ilişki ISSR ve IRAP moleküler markırları ile araştırılmıştır. Çalışılan 5 IRAP primeri (3LTR-5, 5LTR1, LTR 6150, NIKITA E2647-, SUKKULA) 100-700 bp büyüklüğünde bantlar vermiştir. IRAP primerlerine göre polimorfizm %90 hesaplanmıştır. ISSR yönteminde 16 ISSR primeri (UBC868, UBC817, UBC807, UBC812, UBC816, UBC825, UBC824, UBC830, UBC836, UBC840, UBC848, UBC855, UBC856, UBC841, UBC842, UBC61) kullanılmıştır. PCR sonuçlarına göre çalışılan primerler 100-2000 bp uzunluğunda bantlar vermiştir. ISSR primerlerine göre polimorfizm % 90,8 hesaplanmıştır. ISSR ve IRAP verileri ile UPGMA yöntemi kullanılarak dendrogramlar oluşturulmuştur. Çalışılan bu tekniklerin *Astragalus* türlerini karakterize etmede uygun markırlar olduğu ortaya çıkmıştır.

2022, 66 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Astragalus*, Erzincan, Genetik çeşitlilik, IRAP, ISSR,

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY OF *ASTRAGALUS* L. SPECIES DISTRIBUTED IN ERZİNCAN AND ITS SURROUNDINGS BY MOLECULAR METHODS

Engin DAĞ

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Genetic and Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

In this study, *Astragalus* L. samples were collected from 42 locations of Erzincan determined in the vegetation period of 2021. As a result of the morphological studies, 12 different species were determined. 3 of them are endemic (*Astragalus pennatulus*, *Astragalus karamasicus*, *Astragalus lycius*). The genetic relationship between the identified species was investigated with ISSR and IRAP molecular markers. The 5 studied IRAP primers (3LTR-5, 5LTR1, LTR 6150, NIKITA E2647-, SUKKULA) yielded bands of 100-700 bp. Polymorphism was calculated as 90% according to IRAP primers. 16 ISSR primers (UBC868, UBC817, UBC807, UBC812, UBC816, UBC825, UBC824, UBC830, UBC836, UBC840, UBC848, UBC855, UBC856, UBC841, UBC842, UBC61) were used in the ISSR method. According to the PCR results, the primers studied gave bands of 100-2000 bp in length. Polymorphism was calculated as 90.8% according to ISSR primers. Dendrograms were created using the ISSR and IRAP data and the UPGMA method. These studied techniques turned out to be suitable markers for characterizing *Astragalus* species.

2022, 66 Pages

Keywords: *Astragalus*, Erzincan, Genetic diversity, IRAP, ISSR,

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince değerli bilgileri ile her konuda desteğini esirgemeyen, bilimsel çalışma ve düşünce deneyimimi artıran danışman hocam Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN'a, laboratuvar çalışmalarında bilgi ve desteğini gördüğüm Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU'ya ve çalışmanın her aşamasında bilgi ve fikir alış verişini yaptığımız, benimle birlikte aynı laboratuvarında çalışan kıymetli arkadaşlarım Muhammed Semih DARTAR, Sema KIRTILLI' ya, bitki örneklerinin toplanması ve teşhisini gerçekleştiren Doç.Dr. Mustafa KORKMAZ'a, herbaryum örneklerinden faydalandığımız ve çalışmamıza her türlü kolaylığı sağlayan biyoloji bölüm başkanı sayın Prof. Dr. Ali KANDEMİR' e, arazi çalışmalarında yardımını esirgemeyen Dr. İdris SARI'ya ve Mustafa Şahin ÖZBEY'ye teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca hayatım boyunca en büyük destekçim olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, başarı yolunda motivasyon kaynağım olan sevgili ailem'e, ve eşim Rümeyza DAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Engin DAĞ

Temmuz, 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
3. KURAMSAL TEMELLER.....	9
3.1. <i>Astragalus</i> Cinsinin Sistematikteki Yeri	9
3.2. <i>Astragalus L.</i> Genel Özellikleri	9
3.3. <i>Astragalus</i> 'un Dünya'da ve Türkiye' de Yayılış Alanları	10
3.4. <i>Astragalus</i> 'un Ekonomik Önemi ve Kullanım Alanları.....	11
3.5. Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Belirteçler.....	12
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
4.1. Materyal	16
4.1.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyal.....	16
4.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	16
4.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	17
4.1.4. Kullanılan solüsyon ve çözeltiler.....	18
4.1.5. Primerlerin hazırlanması.....	21
4.2. Yöntem	21
4.2.1. <i>Astragalus</i> türlerinden genomik DNA izolasyonun yapılması	21
4.2.2. DNA saflık tayini	22
4.2.3. IRAP analizi.....	22
4.2.4. ISSR analizi	24
4.2.5. IRAP ve ISSR jel elektroforez protokolü	26
4.2.6. Veri analiz.....	27
5. BULGULAR	28

5.1. Erzincan ve Çevresinden Örneklenen <i>Astragalus</i> Türleri	28
5.2. <i>Astragalus</i> türlerine ait DNA miktarları.....	37
5.3. IRAP- PCR Sonuçları.....	37
5.4. ISSR-PCR Sonuçları	43
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR	59



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 5.1. <i>Astragalus microcephalus</i> Willd. Subsp. <i>microcephalus</i> 'un genel görünümü	31
Şekil 5.2. <i>Astragalus kurdicus</i> Boiss.'un genel görünümü	31
Şekil 5.3. <i>Astragalus lycius</i> Boiss.'un genel görünümü.....	32
Şekil 5.4. <i>Astragalus cancellatus</i> Bunge'un genel görünümü	32
Şekil 5.5. <i>Astragalus compactus</i> lam.'ın genel görünümü.....	33
Şekil 5.6. <i>Astragalus pennatulus</i> Hub.-Mor. & D.F.Chamb.'ın genel görünümü	33
Şekil 5.7. <i>Astragalus angustifolius</i> Lam. subsp. <i>angustifolius</i> 'un genel görünümü	34
Şekil 5.8. <i>Astragalus aduncus</i> Willd.'un genel görüntüsü.....	34
Şekil 5.9. <i>Astragalus eriocephalus</i> Willd. subsp. <i>eriocephalus</i> 'un genel görünümü	35
Şekil 5.10. <i>Astragalus karamasicus</i> Boiss. & Balansa 'un genel görünümü	35
Şekil 5.11. <i>Astragalus lagurus</i> Willd.'un genel görünümü	36
Şekil 5.12. <i>Astragalus xylobasis</i> Freyn & Bornm.'ın genel görünümü	36
Şekil 5.13. LTR6150 primerine ait jel görüntüsü	38
Şekil 5.14. 3LTR-5 primerine ait jel görüntüsü	39
Şekil 5.15. Sukkula primerine ait jel görüntüsü	39
Şekil 5.16. Nikita primerine ait jel görüntüsü	40
Şekil 5.17. 5LTR 1 primerine ait jel görüntüsü	40
Şekil 5.18. IRAP yöntemi ile elde edilen Erzincan ve çevresinde yayılış gösteren 12 <i>Astragalus</i> türü arasındaki genotipik bağlantı	41
Şekil 5.19. UBC848 pirimerine ait jel görüntüsü.....	44
Şekil 5.20. UBC855 pirimerine ait jel görüntüsü.....	45
Şekil 5.21. UBC856 pirimerine ait jel görüntüsü.....	45
Şekil 5.22. UBC841 pirimerine ait jel görüntüsü.....	46
Şekil 5.23. UBC842 pirimerine ait jel görüntüsü.....	46
Şekil 5.24. UBC817 pirimerine ait jel görüntüsü.....	47
Şekil 5.25. UBC807 pirimerine ait jel görüntüsü.....	47
Şekil 5.26. UBC812 pirimerine ait jel görüntüsü.....	48
Şekil 5.27. UBC816 pirimerine ait jel görüntüsü.....	48

Şekil 5.28. UBC824 pirimerine ait jel görüntüsü.....	49
Şekil 5.29. UBC868 pirimerine ait jel görüntüsü.....	49
Şekil 5.30. UBC825 pirimerine ait jel görüntüsü.....	50
Şekil 5.31. UBC830 pirimerine ait jel görüntüsü.....	50
Şekil 5.32. UBC836 pirimerine ait jel görüntüsü.....	51
Şekil 5.33. UBC840 pirimerine ait jel görüntüsü.....	51
Şekil 5.34. UBC861 pirimerine ait jel görüntüsü.....	52
Şekil 5.35. ISSR yöntemi ile elde edilen Erzincan ve çevresinde yayılış gösteren 12 <i>Astragalus</i> türü arasındaki genotipik bağlantı.	53



TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 4.1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar	16
Tablo 4.2. ISSR, IRAP PCR Ve UV görüntülemeye kullanılan kimyasallar.	17
Tablo 4.3. Çalışmada kullanılan cihazlar ve modelleri.....	17
Tablo 4.4. IRAP-PCR analizinde kullanılan primerlerin adı, sekans bilgileri ve bağlanma sıcaklıkları	23
Tablo 4.5. IRAP-PCR master mix karışım içerik ve miktarları.....	23
Tablo 4.6. IRAP-PCR döngü protokolü.....	24
Tablo 4.7. ISSR-PCR analizinde kullanılan primerlerin adı, sekansları bilgileri ve bağlanma sıcaklıkları	24
Tablo 4.8. ISSR-PCR master mix karışımı içerik ve miktarları	25
Tablo 4.9. ISSR-PCR döngü protokolü	26
Tablo 5.1. Erzincan ve çevresinde teşhis edilen <i>Astragalus</i> türleri.	29
Tablo 5.2. DNA miktar ve saflık sonuçları.....	37
Tablo 5.3. IRAP primerlerinin meydana getirdiği bant büyüklüğü, bant sayısı ve polimorfizm.....	38
Tablo 5.4. IRAP yöntemine göre <i>Astragalus</i> türlerine ait genetik benzerlik indeksi	42
Tablo 5.5. ISSR primerlerinin meydana getirdiği bant büyüklüğü, bant sayısı ve polimorfizm.....	43
Tablo 5.6. ISSR yöntemine göre <i>Astragalus</i> türlerine ait genetik benzerlik indeksi	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
dk	Dakika
g	Gram
M	Molar
Ml	Mililitre
mM	Milimolar
mt	Metre
ng/ml	Nanogram/Mililitre
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
sn	Saniye
V	Volt

Kısaltmalar	Açıklamalar
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm
Bç	Baz çifti
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit fosfatlar
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
HCl	Hidroklorik asit
IRAP	Retrotranspozonlar Arası Çoğaltılmış Polimorfizm

ISSR	Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum klorid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Güçlendirilmiş Polimorfik DNA
RFLP	Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribo Nükleik Asit
SCAR	Sekans Karakteristikli Güçlendirilmiş Bölgeler
SSR	Basit Dizi Tekrarları
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	Trizma Base
UPGMA	Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup Yöntemi
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Genetik çeşitlilik bir canlı türünün bireylerinin gen havuzundaki kalıtsal bilgilerinin birbirinden farklı olma durumu olarak tanımlanır. Genetik çeşitlilik, günümüzde hızla değişen çevresel koşulları için önemli bir hayatta kalma mekanizmasıdır (Ashry, N. A. 2013). Yeterli genetik çeşitliliğe sahip olmayan canlı türleri değişen çevre şartlarına uyum sağlayamayarak yok olmaya mahkumdur (Berkes ve Kence, 1987). Bitki türlerindeki genetik çeşitlilik, birçok çevresel faktöre bağlıdır. Genetik çeşitliliğin seviyesi ve dağılımından esas olarak sorumlu olduğu düşünülen; yaşam öyküsü, üreme sistemi, tohum dağılımı, popülasyon büyüklüğü ve ekolojik özelliklerdir (Travis vd., 1996).

Ekolojik olarak bakıldığında, Türkiye zengin coğrafik bölgelere sahiptir. Her coğrafik bölgenin iklim ve florası farklılık göstermektedir. Özellikle doğusu ve batısı arasındaki yükseklik farkı çeşitli ekolojiler oluşturmaktadır. Türkiye de takson sayısı yaklaşık 12.000 civarındadır. Endemik bitki sayısı yaklaşık 3.700 olup endemizm oranı %32 dir. Yapılan çalışmalar ile bu sayı giderek artmaktadır (Güner vd., 2012). Türkiye'nin endemizm oranı bütün Avrupa ülkelerinden yüksektir (TÜRSAB, 2002). Endemizm en büyük kaynağı ülkemizin barındırdığı toprak çeşitliliğidir.

Bitki zenginliği ve endemizm bakımından Doğu Anadolu bölgesi Türkiye'nin önemli bölgeleri arasındadır. Doğu Karadeniz, Doğu Anadolu ve Orta Anadolu coğrafi bölgeleri arasında köprü olan Erzincan ili, zengin florası ile Türkiye'nin en çok bitki türünün yetiştiği Antalya ilinden sonra gelmektedir (TÜRSAB, 2002). Ayrıca Erzincan, Türkiye'nin 13 endemik bitki merkezinden 2'sine ve 6 önemli bitki alanına sahiptir. (Korkmaz vd., 2013). Erzincan'da çok fazla mikroiklim görülmesi, dağların uzanış yönleri ve oluşma şekillerinden dolayı farklı habitatlara sahip olması nedeniyle bitki çeşitliliği açısından oldukça zengin bir bölgedir. Avrupa-Sibirya ve İran-Turan fitocoğrafi bölgelerinin ve Anadolu Çaprazı'nın (Anadolu Diyagonali) geçiş noktaları üzerinde bulunmaktadır. Bu durum Erzincan'ın bir çok endemik türe ev sahipliği yapmasına imkan sağlamıştır (Kandemir, A., Sevindi, C., Korkmaz, M., & Çelikoğlu, Ş. 2015).

Erzincan’da endemik olan bitki türlerinin başında *Astragalus* gelmektedir. Erzurum-Erzincan arasındaki Fırat vadisinde bazı erozyonlu alanlarda yayılış gösteren *Astragalus* türleri bu alanlardaki yoğun toprak erozyonunu önleyici özellikleri olduğu da belirtilmektedir (Korkmaz ve Karacan, 2015).

Ülkemizde zengin olan bu türlerinin genetik çeşitliliğini belirlemek amacı ile birçok yöntem kullanılmaktadır. Fakat son yıllarda en çok tercih edilen ve güvenilir sonuçlar veren tekniklerin başında moleküler markır yöntemleri gelmektedir. Büyük bir organizasyona sahip olan bitki genomlarının genetik çeşitliliği moleküler markır yöntemleri kullanılarak araştırılmaktadır. Moleküler markırlar bitki popülasyonları veya populasyon içindeki birey genotipleri arasındaki çeşitliliğin belirlenmesinde %100’e yakın güvenilirlikle sonuçlar vermektedir (Gülşen, O., & Mutlu, N. 2005).

Erzincan ve çevresinde daha önce yapılan floristik çalışmalarda, bölgenin *Astragalus* (Geven) taksonlarının yayılışı bakımından oldukça zengin olduğu belirlenmiştir. (Korkmaz ve Karacan, 2015). Çalışmamızda Erzincan ve çevresinde yayılış gösteren *astragalus* L. türlerinin genetik çeşitliliğinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Astragalus ile ilgili yapılan morfolojik çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bunlardan bazıları şunlardır;

Abd El-Ghani vd. (2021), yaptığı çalışmada 4 *Astragalus* türünü temsil eden 10 taksonu, Şubat 2018'den Mayıs 2019'a kadar Mısır'ın farklı bölgelerinden toplamıştır. Toplanan *Astragalus* bitkilerinin morfolojik tanımlanması ve sınıflandırılması için Mısır Herbaryum'unda bulunan referans *Astragalus* örneklerinin taksonomik revizyonları ile karşılaştırılıp ışık mikroskobu kullanılarak teşhis etmiştir.

Alici (2019), Türkiye'de yayılış gösteren Fabaceae familyalarına ait *Astragalus galegiformis* L. örneklerinin tohumlarının en-boy ölçümleri mikroskop ve milimetrik kumpas ile tohumların yüzey morfolojisinin belirlenmesinde Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanarak araştırmıştır. Elde ettikleri sonuca göre *Astragalus galegiformis* tohumları düz kenarlı, yuvarlak uçlu, reniform (böbrek şeklinde) şeklinde olduğunu tespit etmiştir.

Metin (2018), *Astragalus victoriae* ve *Astragalus melanophrurius* türlerinin palinolojik, tohum ve broşür mikromorfolojik özellikleri ışık mikroskobu (LM) ve SEM kullanarak detaylı olarak araştırmıştır. İki tür içinde tohum morfolojileri bakımından ayırt edici önemli bir fark bulunmadığını gözlemlemiştir. Yaprakçık boyutları, şekli ve tüylerin *A.melanophrurius*'ta striat-granulat, *A. victoriae*'da striat stislemeye sahip olması ayırt edici olduğunu belirtmiştir. Polen büyüklüğü, şekli ve yüzey ornamentasyonu, incelenen taksonların sistematigi için önemli ve ayırt edici karakterler olarak tanımlanmıştır.

Vural (2013), Elazığ ili ve çevresinde yetişen *Astragalus L.* cinsinin Proselius Bunge. seksiyonuna ait *Astragalus tigridis* ve *Astragalus scabrifolius* (Fabaceae) türlerinin palinolojik, karyolojik, anatomik ve morfolojik özelliklerini incelemiştir. Yapılan anatomik çalışmalarda taksonların kök ve yaprakçık anatomileri belirlenmiştir. Morfolojik çalışmalar çerçevesinde toplanan bitki örneklerinin kök, yaprak ve çiçek yapıları belirlenmiştir.

Abd El-Ghani vd. (2021), 4 *Astragalus* türünü temsil eden 10 taksonu, moleküler doğrulama için, 10 SCoT primeri kullanmışlardır. 10 *Astragalus* örneği başına ortalama

12,2 bant ile toplamda 212 DNA parçası elde etmişlerdir. Çalışılan *Astragalus* taksonları arasında ayırım yapmak için benzersiz bir bantlama paterni yapmışlardır. ITS2 gen dizisi, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanında BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) kullanılarak *Astragalus L.*'yi tanımlamak için en uygun barkod olarak göstermişlerdir. Elde etikleri sonuçlar doğrultusunda, SCoT belirteçlerinin ve ITS2 bölgesinin *Astragalus* türleri arasındaki genetik ilişkileri belirlemede kullanılabilirliğini göstermişlerdir.

Agar G. vd. (2010), Türkiye'nin Doğu Anadolu bölgesinde yetişen sırasıyla *Astragalus atrocarpus*, *A. campylosema* subsp. *campylosema*, *A. fumosus*, *A. galegiformes*, *A. lineatus* var. *jildisianus* ve *A. trichostigma* arasındaki genotipik ve fenotipik ilişkileri incelemek amacı ile RAPD (Rastgele Güçlendirilmiş Polimorfik DNA) ve FA (Yağ Asitleri) yöntemlerini kullanmışlardır. RAPD sonuçları, *A. fumosus*, *A. lineatus* ve *A. trichostigma*'nın yakından ilişkili olduğunu ve taksonların geri kalanından tamamen farklı olduğunu göstermiştir. Hem RAPD hem de FA analizlerinin *Astragalus* türlerinin analizi için yararlı olduğunu belirtmişlerdir.

Alexander vd. (2004), ABD'nin Yılan Nehri ovasında bulunan dar endemik bir kserofit olan *Astragalus oniciformis* Barneby türünün populasyonları içindeki ve populasyonları arasındaki genetik farklılaşmanın düzeylerini ve dağılımını belirlemek amacı ile ISSR (Basit Diziler Arası Tekrarlar) moleküler belirteçleri kullanmışlardır. Sekiz populasyonun her birinden seçilen 15 birey üzerinde yapılan çalışmada *A. oniciformis*'te 40 polimorfik lokus elde etmişlerdir. Moleküler varyans analizinde, varyasyonun %88,69'u populasyonlardaki varyasyondan kaynaklandığı saptanmıştır.

Atasagun vd. (2018), yalnızca Kayseri'nin Erciyes Dağı'nda yetişen, nesli kritik tehlike altında olan endemik tür *A. argaeus*'un 4 populasyonundaki genetik çeşitliliği tespit etmek için ISSR belirteçleri kullanmışlardır. Erciyes Dağı'ndaki 4 lokalizasyondan toplanan 96 genotip arasındaki çeşitliliği değerlendirmek için 10 primer çalışılmıştır. Moleküler varyans analizinde, varyans yüzdesi populasyonlar arasında %38,2 ve populasyonlar içinde %61,28 olarak tespit etmişlerdir.

Bagheri vd. (2020), İran'ın kuzeybatısında Zencan eyaletinde Qezel Ozan Nehrinin üzerinde yüksek rakımlarda yetişen endemik bir tür olan *A.*

subrecognitus populasyonlarının genetik yapısını, moleküler belirteçler olarak ISSR ve SRAP (Sekansla İlişkili Amplified Polimorfizm) kullanarak araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, ISSR yönteminde %97,0 polimorfizm gösterirken, SRAP yönteminde %93,33 polimorfizm göstermiştir. Analiz sonuçlarında Qezel Ozan nehrinin doğusunda ve batısında 2 genetik grup tespit edilmiştir.

Gong vd. (2019), Kuzey Çin'de yaygın olarak yetiştirilen önemli bir baklagil yem bitkisi olan *Astragalus adsurgens* Pall.'in genetik çeşitliliğini belirlemek için EST-SSR (External Transcribed Spacer-Simple Sequence Repeats) belirteçlerini kullanmışlardır. Çalışmalarında, Illumina dizilimi kullanılarak *Astragalus adsurgens* Pall transkriptomundaki 30.262 unigen dizisinden toplam 39.163 EST-SSR lokusu tanımlamışlardır. Ayrıca, 22.367 EST-SSR primer çifti (PP) başarıyla tasarlanmışlardır. 27 Dik milkvetch katılımlarının genetik çeşitliliğini değerlendirmek için 51 PP rastgele seçilmiş, 51 PP'nin ortalama polimorfizm bilgi içeriği 0,682 gözlemlenmiştir.

Korchagina vd. (2022), yaptıkları çalışmada Rusya'nın Asya kesiminden dört *Astragalus* türünün (*A. frigidus*, *A. mongholicus*, *A. penduliflorus* ve *A. sericeocanus*) genetik çeşitliliği ve filogenetik ilişkileri, *trnL-trnF* cpDNA ve izoenzim markırları ile araştırılmıştır. Her tür için, spesifik kloroplast haplotipleri, alleleri ve izoenzim frekans kümeleri tanımlanmıştır. cpDNA verilerine göre, çalışılan populasyonlar düşük haplotip (h 0,095 ila 0,333 arasında değişir) ve nükleotid (π 0,00019 ila 0,00378 arasında değişir) çeşitliliği ile karakterizedir. Populasyonların çoğu (27 kişiden 20'si) monomorfik olup, izoenzim analizi verilerine göre, üç tür için polimorfizm göstergeleri (*A. penduliflorus*'un monomorfik populasyonu hariç) oldukça yüksek değerlere sahip olduğu belirtilmiştir.

Li vd. (2001), yaptıkları çalışmada *Astragalus adsurgens* Pall. Germplasm'ın (yetiştirilmiş türler, yerel türler ve yabani türler) genetik çeşitliliği ilk olarak RAPD belirteci kullanılarak analiz etmişlerdir. Sonuçlar, yabani türlerin DNA polimorfizminin, yetiştirilmiş türler ve yerel türlerden daha büyük olduğunu göstermiştir.

María J. Vicente vd.(2011) İspanya'nın güneydoğusunda endemik ve nesli tükenmekte bir tür olan *Astragalus nitidiflorus*' un 5 populasyonundaki genetik çeşitliliği ve populasyon yapısını değerlendirmek için ISSR belirteçleri kullanılmıştır. 8 primerden

40'ı (%51,3) polimorfik olmak üzere toplam 78 bant elde etmişlerdir. İstatistiksel sonuçlar, populasyon ve tür düzeyinde düşük bir genetik çeşitlilik olduğunu göstermiş, polimorfik bant (PPB) yüzdeleri % 28,2 ila %37,2 (ortalama %31,8) arasında gözlenmiş ve gen çeşitliliği oranları (HE) sırasıyla 0,129 ve 0,171, Shannon'un indeksi 0,160 ila 0,214 arasında değişmekte olduğu, tür düzeyinde 0,260 olarak tespit etmişlerdir. Populasyonlar arasında ise düşük bir genetik farklılaşma seviyesi tespit etmişlerdir.

Mehrnia M vd. (2005), İran *Astragalus microcephalus* kompleksine ait 20 birey üzerinde RAPD markırları ile çalışılmıştır. 8 primerden toplam 218 bant elde edilmiş ve veri analizi UPGMA (Aritmetik Ortalama İle Ağırlıklandırılmamış Çift Grup Yöntemi) kümeleme yöntemi ve ayrıca grup içindeki ilişkileri daha iyi anlamak için kladistik bir analiz yapılmıştır. Her iki veri analizi yöntemi de *A. microcephalus* ve *A. mesoleios* arasında çok yakın bir ilişki olduğunu ve morfolojik verilerle desteklenen bir öneri olarak ikisinin muhtemelen türdeş uyumlu olduğunu öne sürmüştür. Ayrıca *Astragalus keyserlingii* ve *Astragalus longistylus*'un *A. microcephalus* ile yakından ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Sonuçlar, RAPD yönteminin yakından ilişkili türler ve alt-spesifik taksonlar arasındaki sistematik ilişkileri incelemek için kullanılabileceğini göstermiştir.

Rahimmalek M vd. (2011), İsfahan vilayetinin üç korunan bölgesinden (Mooteh, Kolah-Ghazi ve Ghamishloo) toplanan beyaz (*Astragalus gossipinus*) ve sarı (*Astragalus microcephalus*) Astragallerin (*Astragalus Sp.*) genetik varyasyonu ISSR markır kullanılarak analiz etmişlerdir. 9 ISSR primeri ile 221 polimorfik bant elde etmişlerdir. En yüksek gen çeşitliliği Kolah-Gazi'de (0,366) gözlenmiş ve en az gen çeşitliliği Moote'a (0,129) olduğunu tespit etmişlerdir.

Sharawy vd. (2014), Mısır ve Suudi Arabistan'dan Sesamei (Fabaceae) bölümünde beş tür ve (*A. sinaicus*, *A. Asterias*, *A. Schimperi*, *A. Stella*(iki çeşit) ve *A. tribuloides*) iki çeşit *Astragalus L.* arasındaki ilişki RAPD ve ISSR yöntemi ile ortaya konarak morfolojik varyasyon ve moleküler polimorfizm temel alınarak yeniden değerlendirilmiştir. Morfolojik varyasyon analizi incelenen taksonları iki gruba ayırmıştır; taksonlardan biri *A. sinaicus*, *A. asterias* ve *A. schimperi*'yi temsil eden örneklerden, diğeri ise iki *A. stella* örneği ve *A. tribuloides*'i temsil eden örneklerden oluşmuştur.

Sunkar, G. (2021), çok yıllık baklagil bitkisi olan *Astragalus cicer L.*'nin sentromerik bölgelerindeki DNA dizilerini, polimeraz zincir reaksiyonu ve Southern hibridizasyon yöntemlerinin birleştirildiği moleküler biyoteknolojik bazı teknikler (Dot blot, Koloni PZR, Agaroz jel elektroforezi) ile analiz etmiştir. Çalışma sonucunda nohut geveni genomundaki 20-bç ardışık tekrar eden sentromerik DNA dizi monomerleri keşfedilmiş ve 5S, 45S ribozomal DNA'lar karakterize edilmiştir.

Szabo vd. (2021), SRAP belirteçleri kullanarak *A. exscapus* subsp. *transsilvanicus* populasyonunun genetik çeşitliliğini ve populasyon yapısını incelemişlerdir. Toplam 164 bant elde etmiş olup, polimorfizm oranını %96,7 olarak tespit etmişlerdir. AMOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) ile *A. exscapus* subsp. *transsilvanicus*'un toplam varyasyonunun %17'sinin populasyonlar arasında, %83'ünün ise populasyon içinde bulunduğunu belirtmişlerdir.

Walker vd. (2008), dar endemik *Astragalus jaegerianus*'taki genetik varyasyonun düzeyi ve bölümlenmesi, DNA sekans verileri ve AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm) belirteçleri kullanılarak araştırmışlardır. cpDNA *trnL-F* ve nrDNA ITS bölgeleri için DNA dizisi verileri *A. jaegerianus* için monomorfik, ancak iki türdeş için polimorfik olduğu gözlenmiştir. AFLP belirteçleri kullanılarak genom çapında yapılan araştırma, önemli gen çeşitliliğini (0,266) ve önemli populasyon yapısını (küresel olarak) ortaya koymuştur. Bu gen çeşitliliği seviyesi ve populasyonlar arasındaki bölünmesi, coğrafi olarak yaygın türlerin kalıplarıyla karşılaştırılabilir. Bu bulgular aynı zamanda gen çeşitliliği seviyelerinin populasyon büyüklüğü ile en iyi şekilde tahmin edildiği hipotezine de meydan okumaktadır. Bu durumda, populasyonlardaki gen çeşitliliği seviyeleri, populasyon yoğunluğu ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Xie vd. (2009), ekili *Astragalus membranaceus* Bge'nin üç morfolojik tipinde genetik çeşitliliği tespit etmek için ISSR belirteçleri kullanmışlardır. Analiz için kullanılan 8 primer 162'si (%98,18) polimorfik olan 165 bant vermiştir. UPGMA sonuçlarına göre 3 türün genetik olarak farklılaştığı belirtilmiştir.

Zhang vd. (2014) Çin'in farklı eyaletlerinden toplanan *Astragalus sinicus L.*'nin 22 türü arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek amacı ile ISSR belirteçleri kullanmışlardır. 10

ISSR primeri ile çalışılarak 500 ile 3.000 bp arasında toplam 684 bant meydana gelmiştir. Polimorfizm %59,2 olarak hesaplanmıştır. UPGMA analiz sonuçlarına göre benzerlik oranı 0,63 ile 0,95 arasında olduğu ve *Astragalus sinicus* L.'nin 22 türünün 4 farklı gruba ayrıldığı saptanmıştır.



3. KURAMSAL TEMELLER

3.1. *Astragalus* Cinsinin Sistematikteki Yeri

Alem	: <i>Plantae</i>
Altalem	: <i>Tracheobionta</i>
Bölüm	: <i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	: <i>Magnoliopsida</i>
Alt sınıf	: <i>Rosidae</i>
Takım	: <i>Fabales</i>
Familya	: <i>Fabaceae</i>
Cins	: <i>Astragalus</i>

3.2. *Astragalus* L. Genel Özellikleri

Astragalus L. Dünya üzerinde yaklaşık 3000 taksonu ile Fabaceae (Baklagiller) familyasının en büyük cinsidir. (Aytaç & Ekici, 2012; Ekici, 2010; Fırat, 2005; Podlech ve Zarre, 2013; Vural ve vd., 2017). *Astragalus*'un tarihi çok uzun yıllara uzanmaktadır. Tournefort (Fransız doğabilimci) doğudan elde ettiği iğne yapraklı *Astragalus* türlerine Tragacantha adını kullanmıştır. Tragacantha Yunanca bir kelime olup, Tragum=keçi, Acanthos=diken anlamında kullanılmaktadır. Fakat cins ismi olarak Tragacantha Miller açısından geçerli sayılıp yayınlanırken, Linneus cins ismi olarak *Astragalus*'u kabul etmiştir (Anonim, 2019a).

Astragalus cinsi, yıllık ve çok yıllık forma sahiptir. Morfolojik olarak otsu ve odunsu dikenli yastıklar şeklinde çeşitli gruplar içermektedirler. Bu kısa ömürlü bitkilerin yaşam alanı açık ve yarı kurak çöller, dağlık bozkırlar, Akdeniz bölgesi, güneybatı Asya, orta Asya ve Kuzey Amerikanın dağlık alanlarıdır (Podlech, 1986). İklimin daha nemli ve daha soğuk olduğu Doğu Asya ve Kuzey Avrupa'da, *Astragalus* türleri nadirdir veya yoktur (Podlech ve Zarre, 2013).

Astragalus toprak yapısı ve türü fark etmeksizin habitat alanı bulan otsu ve odunsu kökleriyle yayılış göstermektedir. Ayrıca Gevenler kuvvetli kök sistemleri ve ekstrem hava şartlarına dayanıklılıklarından dolayı erozyonu önlemektedir. Bu özellikleri ile toprağın koruyuculuğunu sağlamaktadır (Yılmaz vd., 2004).

Astragalus türlerinin, morfolojik sinapomorfiler tarafından desteklenmeyen, ancak cinsten uzun yıllardır uygulanan alt jenerik konseptle yakından eşleşen on bir ana dal oluşturduğu gösterilmiştir (Kazempour Osaloo vd., 2003, 2005; Azani vd., 2017). Şu anda cinsten bilinen ana dallar gayri resmi olarak *Glottis*, *Phaca*, *Hamosa*, *Trimeniaeus*, *Conturtoplicata*, *Ophiocarpus*, *Cercidothrix*, *Astracantha*, *Diholcos*, *Hypoglottis* ve *Neo-Astragalus* olarak adlandırılır (Azani vd., 2017).

3.3. *Astragalus*'un Dünya'da ve Türkiye' de Yayılış Alanları

Tür çeşitliliği merkezleri, Avrasya'nın serin ile ılık kurak veya yarı kurak ve dağlık bölgelerinde bulunur. Özellikle güneybatıdan orta Asya'ya, batı Kuzey Amerika'ya ve Güney Amerika'daki And Dağları'na kadar olan alanlardır (Wojciechowski, 2005; Scherson vd., 2008; Podlech ve Zarre, 2013).

Türler şu anda Eski Dünya'da 136 bölümde (Podlech ve Zarre, 2013) ve Yeni Dünya'da 93 bölümde (Barneby, 1964) sınıflandırılmaktadır. Eski Dünya'da *Astragalus* için iki ana dağılım modeli bilinmektedir, biri Akdeniz bölgesinde (Kuzey Afrika dahil) Orta Doğu'ya doğru İran'ın batı bölgelerine, diğeri ise Orta Asya veya Çin'den Hazar Denizi'nin doğusuna kadar uzanır (Podlech, 1986). Yeni Dünya'da, *Astragalus*, Amerika Birleşik Devletleri ve kuzey Meksika'nın çöllerinde, kıyı ovalarında ve vadilerinde daha düşük kotlarda bulunmaktadır (Barneby, 1964).

Türkiye'de *Astragalus* cinsine ait türler genel olarak İran –Turan bölgesinde habitat bulmuştur. Bu bölge *Astragalus* için çeşitlilik merkezi olarak bilinmektedir. Ülkemizde Geven olarak bilinen *Astragalus* cinsinin 485 taksonu bulunmaktadır. Bu taksonların içerisinde 224 tanesi endemik olup, endemizm oranı %47'lerdedir (Chamberlain ve Matthews 1970; Davis vd. 1988; Aytaç 2000; Aytaç vd., 2012; Anonim 2013). İran ise 700 tür ve %57 endemizm oranı ile bu cins için en büyük çeşitlilik merkezlerinden biridir.(Ghah Reman, 2002; Podlech 2001).

Ülkemizde, tarımsal alanda *Astragalus*'un ekimi yapılmamaktadır. Bu bitki türleri çayır-mera, bozkır gibi doğal alanlarda yetişirler. *Astragalus*'un bazı türleri hiçbir bitkinin yetişemediği doğal ve marjinal alanlarda yetişerek, toprağın korunmasına ve oluşumuna katkı sağlarlar. Bu alanlarda yetişen türler, evcil ve yaban hayvanlarının yem kaynaklarını oluşturmakla birlikte, aynı zamanda yabani hayvanlara barınma alanı sağlamaktadır (Sayar vd., 2015; Başbağ vd., 2017).

3.4. *Astragalus* 'un Ekonomik Önemi ve Kullanım Alanları

Astragalus türleri günümüzde çok çeşitli amaçlar ile kullanılmakta olup oldukça zengin faydaları bulunmaktadır. Ülkemiz İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde *Astragalus* L. köklerinden yapılan sıvı karışım kanser ve yara iyileştirmede, geleneksel olarak tedavilerde kullanılır (Bedir vd., 2000). *Astragalus*'un birkaç türü şifalı bitkiler olarak bilinir. Bu türler; analjezik, ağrı dindirici, mide ve bağırsak iltihabı ve tansiyon gibi hastalıklarda kullanılmaktadır. Örneğin *Astragalus gummifer* L. mukoza üzerine koruyucu etkisinden dolayı boğaz enfeksiyonlarında etkilidir (Kadioğlu vd., 2008).

Aynı zamanda bazı *Astragalus* türleri yakıt, sıvı yağlar, kereste, lif, gübre, bazı kimyasal maddelerin üretiminde ve bahçecilik alanında kullanılmaktadır (Lewis vd., 2005). Ayrıca insanlar ve hayvanlar tarafından gıda maddesi olarak kullanılan türleride vardır. Bazı türleri ilaç ve süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Seçmen vd., 2008). *Astragalus* türlerinin, içerdikleri önemli polisakkaritler sayesinde bağışıklık sistemi üzerinde güçlendirici ve düzenleyici etkileri vardır. Ayrıca viral hastalıkların tedavisinde ve fibrozis hastalığına karşı karaciğeri koruduğu da bilinmektedir. (Gui vd. 2006; Wang vd. 2016; Lai vd. 2017). Asya'daki bazı *Astragalus* türlerinin kitre sakızının doğal kaynağı olması bakımından ekonomik değeri vardır. Doğu Asya'da yetişen bazı türlerin kurutulmuş kökleri terlemeyi önleyici, idrar söktürücü, tonik olarak, nefrit, ampiroz, şeker hastalığı, hipertansiyon, siroz, lösemi gibi çeşitli hastalıklarda geleneksel ilaçlar olarak kullanılmaktadır (Avunduk vd. 2008; Choudhary vd. 2008). Uygulamalar *Astragalus*'un kalp hastalığı, yorgunluk, hepatit ve özellikle dalak ve akciğer hastalıklarına karşı terapötik etkileri olduğunu doğrulamıştır (Gong vd., 2018; Chen vd., 2020).

3.5. Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Belirteçler

Genetik çeşitlilik analizlerinde ve bitki türlerinin belirlenmesinde moleküler belirteçler kullanılmaktadır. Günümüzde moleküler markır teknolojileri daha önce kullanılan morfolojik yöntemlerin beraberinde getirdikleri bazı dezavantajları ortadan kaldırması yönünden oldukça avantajlı ve kullanışlı olmuştur. Moleküler markırların başlıca avantajları yüksek polimorfizm oranına sahip olması ve çevresel etmenlerden etkilenmemeleri, güvenilirliğinin fazla olması, zamandan tasarruf sağlamaları, kolay kullanılabilir olmaları, genetik olarak belirleyici olmaları sayılabilir. Aynı zamanda pleiotropik (bir genin birden çok fenotipik özellikte etkin rol oynaması) ve epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında baskılayıcı etkilerin olması durumu) etki göstermezler (Soller ve Beckmann, 1983; Tanksley, 1983; Bretting ve Widrlechner, 1995).

Genetik belirteçler hücre, birey, populasyon ve tür düzeyinde tanımlama ve ayrımlarda kullanılabilir. Genetik belirteçlerin uygulaması bitki dokularından DNA'nın izolasyonu ile başlar. Daha sonra uygun protokoller uygulanır. Elde edilen bilgiler veri haline getirilerek değerlendirilir. Buda genetik çeşitliği tanımlamamıza izin verir. Yapılacak olan çalışmaya en uygun markır seçimi, tür ve genomun karakteristiğine bağlıdır. Moleküler markılar, hibridizasyona dayalı markırlar ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) dayalı makırlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Staub vd., 1996; Ridout ve Donini, 1999). Günümüzde geliştirilen birçok moleküler markır tekniği bulunmakta ve sayıları her geçen gün artmaktadır.

Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markırlar

RFLP (Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi)

DNA izolasyonundan sonra spesifik DNA bölgelerini tanıyan restriksiyon enzimleri ile DNA kesilir. Restriksiyon enzimleri sayı olarak 1200'ün üzerindedir. Genel olarak tip 1-2-3 olarak gruplandırılır. Restriksiyon enzimi ile kesilen parçalara restriksiyon parçaları denir. DNA molekülü üzerinde birden fazla farklı kesim bölgeleri bulunur. Buda farklı restriksiyon enzimleri muamelesi sonucu farklı büyüklükteki restriksiyon

parçalarının oluşmasını sağlar. Bu restriksiyon parçaları jel elektroforezi yardımı ile büyüklüklerine göre ayrılırlar.

RFLP genetik tiplendirme için kullanılan ilk yöntemlerden biridir. RFLP'lerde güvenilirliğin yüksek olması ve eş baskınlık gibi avantajlar olurken, yoğun emek ve zaman alıcı olması, diğer analiz yöntemlerinden önemli ölçüde daha büyük örnek boyutları gerektirmeleri ve nispeten polimorfizmin düşük olması dezavantaj oluşturmaktadır (Yang vd., 2013).

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Dayalı Moleküler Markırlar

RAPD (Rastgele Güçlendirilmiş Polimorfik DNA)

İlk olarak Williams vd. (1990) tarafından geliştirilmiştir. PCR'ı temel alan bir yöntemdir. RAPD yönteminde temel prensip çalışılacak olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9–10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında rastgele bağlanarak PCR aracıyla ile çoğaltılmasına dayanmaktadır. Yöntemin devamında çoğaltılan ürün radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve elde edilen bantlar gözlemlenerek incelenir. (Williams vd., 1990; Welsh ve McClelland, 1990).

Zhang vd. (2005) RAPD markırlarının daha az örneğe ihtiyaç duyan özellikle dış çaprazlanan türlerle yapılmış çalışmalar için uygun olduğunu ifade etmişlerdir. Son on yılda, PCR'a dayalı RAPD tekniği, DNA markırlarını geliştirmek için en yaygın kullanılan moleküler tekniklerden biri olmuştur (Kumar vd., 2011). RAPD teknolojisi, DNA dizisi tabanlı tarama için hızlı ve verimli bir tarama sağlar. RAPD'nin en büyük avantajı dizi bilgisi gerektirmemesidir (Nandani vd., 2014).

SSR (Basit Dizi Tekrarları)

Mikrosatellit olarak bilinen SSR moleküler markırlar, 1-6 baz uzunluğundaki kısa tekrar dizileridir. Mikrosatellitler genel olarak dinükleotid tekrarlarından oluşmaktadır. Bitkilerde daha çok (AT)_n, (AAG)_n ve (AAT)_n gibi tekrarlar yaygındır (Akkaya vd., 1992). SSR moleküler markır yöntemi günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı sayıda SSR tekrarları farklı DNA parçaları oluşturur. Bitkiler hakkında oldukça

fazla bilgi edinmemizi sağlayan SSR, yüksek polimorfizm, yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek güvenilirlik sağlayan markır tekniğidir. Yöntemin dezavantajı yeni markır geliştirmek zordur. (Yıldırım ve Kandemir, 2001). SSR markırları bitkilerde genetik haritalama, tür teşhisi ve populasyon analizinde kullanılmaktadır (Gupta ve Varshney, 2000; Nimmakayala vd., 2010).

ISSR (Basit Diziler Arası Tekrarlar)

ISSR yönteminde 2-5 arasında tekrarlanan nükleotitleri içeren primerler kullanılmaktadır. Tekniğin temel prensibi bu primerler kulanılarak iki mikrosatellit noktası arasındaki bölgenin çoğaltılmasıdır. PCR ile çoğaltılan ürünler agaroz jelde yürütülerek etidyum bromid ile boyandıktan sonra belirlenebilmektedir (Zietkiewicz vd., 1994).

ISSR hızlı, basit, yüksek oranda tekrarlanabilir bir yöntemdir. Polimorfizm oranının yüksek olması ve yüksek üretkenlik göstermesi ISSR tekniğini cazip hale getirir. ISSR yöntemi gen haritalama çalışmaları, genetik çeşitlilik ve taksonomik analizlerde kullanılabilmektedir (Gupta vd., 1994; Zietkiewicz vd., 1994). ISSR tekniğinin dezavantajı tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve aynı büyüklükteki parçacıkların homolog olmamasıdır (Kesawat ve Das, 2009).

IRAP (Retrotranspozonlar Arası oğaltılmış Polimorfizm)

Retrotranspozonlar, büyüklüğü, tespit edilebilirliği, korunmuş dizileri ve replikasyon-aktif-elemanlarıyla yeni eklenmiş polimorfizm ürünleri oluşturmalarından dolayı moleküler markır sistemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamıştır (Kalendar vd., 1999). IRAP yöntemi ardışık retrotranspozonlar arasındaki polimorfik DNA parçalarının çoğaltılmasına dayanmaktadır. Bitkilerin tümünde retrotranspozonlar bulunmaktadır. Sentezlenen yer LTR (Uzun U Tekrarları) retrotranspozonları arasındaki DNA parçasıdır. IRAP yöntemi taksonomik ve genetik çalışmalarda oldukça rağbet görmektedir.

IRAP yönteminde LTR 'den dışa dönük bir veya iki primer kullanılır ve bundan dolayı yakın olan retrotranspozonlar arasında kalan DNA parçasını çoğaltır. İki primer aynı retrotranspozon element ailesinden veya farklı ailelerden olabilir. IRAP markır tekniği,

DNA düzeyindeki değişiklikleri belirlemek ve populasyonlardaki farklılıkları analiz etmek için kullanılabilir (Yüzbaşıoğlu, 2016; Yılmaz ve Gözükırmızı, 2016).

SCAR (Sekans Karakteristikli Güçlendirilmiş Bölgeler)

SCAR, genomik DNA'nın spesifik oligonükleotid primer çiftleri kullanılarak PCR amplifikasyonu ile tanımlanan, genetik olarak tanımlanmış lokusları temsil eden PCR tabanlı belirteçlerdir. Güçlendirilmiş bölge içinde yüksek kopyalı, dağılmış genomik diziler içerebilirler (Paran ve Michelmore, 1993). SCAR belirteçlerinin tekrarlanabilirliği ISSR ve RAPD markırlarına oranla daha yüksektir. Genel olarak dominat markırlardır fakat restriksiyon enzimlerinin kesimi ile kodominat markırlara dönüştürülebilir.

AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm)

AFLP, 1993 yılında Zabeau ve Vos tarafından geliştirilmiştir. RFLP ve PCR tekniklerinin bir kombinasyonudur. AFLP yönteminde; ilk olarak, genomik DNA bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve daha sonra kesilen fragmanlar sentetik adaptörlere bağlanır. Adaptörler üzerindeki seçici bir diziye tamamlayıcı olan primerlerle çoğaltılır. Çoğaltılan fragmanlar jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrılırlar. AFLP belirteçleri, sistematik, patotipleme, populasyon genetiği, DNA parmak izi ve nicel özellik lokusları (QTL) haritalaması gibi geniş uygulama alanına sahip işaretleyicidir (Mueller vd. 1999).

4. MATERİYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyal

Erzincan ve çevresinde 2021 yılı vejetasyon döneminde yürütülen arazi çalışmalarında *Astragalus* L. cinsine ait taksonların toplanması için belirli lokasyonlara gidilerek bitki örnekleri toplanmıştır. Bu lokasyonlar; Erzincan Merkez, Çayırılı, Kemah ve İliç başta olmak üzere bu bölgelere yakın köy ve mezralardan oluşmaktadır. Her bir tür için iki ayrı numune toplanmış, toplanan örnekler tarafımızca numaralandırılmış ve lokaliteleri ile beraber kayda alınmıştır. Çalışmamızın materyalini oluşturan bu bitki örneklerinin bir numunesi laboratuvar çalışmaları için -80° C derecede muhafaza edilmiş, diğer bir numunesi morfolojik teşhisler için Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü Herbaryumuna kaldırılmıştır.

4.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasal ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar

Sıvı Azot
2-Mercaptoethanol
2-Propanol (İsopropanol)
Amil alkol
Amonyum asetat
CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide)
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate)
Hidroklorik asit
Kloroform
NaCl (Sodyum klorid)
Saf su
Sodyum asetat

Tablo 4.1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar(Devamı)

Sodyum bisülfid
Sodyum hidroksit
TE (Tris-EDTA) buffer
TRIS (Trizma base)

Tablo 4.2. ISSR, IRAP PCR Ve UV Görüntülemeye Kullanılan Kimyasallar

1 KB DNA Ladder(100-3000 ve 100-1000 bp)
10 X Buffer without MgCl ₂
Agaroz
dNTP (Deoxynucleotide mix)
Ethidium Bromide
Jel Loading Solution
MgCl ₂
Primer
Taq DNA polimeraz
TBE (Tris/Borate/EDTA)
Ultra saf su

4.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Çalışmada kullanılan cihazlar ile marka ve modelleri

Cihaz Adı	Marka ve Modeli
Buzdolapları	Arçelik
Çalkalamalı inkübatör (8-60 °C)	Shellab SSI5
Derin dondurucu (-30 °C)	Haier
Elektroforez tankı	Thermo Owl Easycast B2-BP
Floresans mikroskobu	Olympus BX63
Güç kaynağı	Thermo EC 300 XL
Hassas terazi	Shimadzu ATX 120
ICP-MS cihazı	Agilent Technologies SPS 4 Autosamples

Tablo 4.3. Çalışmada kullanılan cihazlar ile marka ve modelleri(Devamı)

Jel görüntüleme cihazı	Vilber Lourmat Quantum ST5
Kar makinesi	Scotsman AF-20
Magnetik karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Standart
Mikrodalga fırın	Arzum
Otoklav	Sümer SM3
Otomatik pipet	Eppendorf Research Plus
PCR cihazı	Bio-Rad C1000 Touch
pH metre	Radiometer meterlab PHM 210
Saf su cihazı	Nüve
Soğutmalı santrifüj	Hanil Smart R17
Spektrofotometre	Perkin Elmer Lambda 35 UV-vis
Ultra-low dondurucu (-85 °C)	Haier, New Brunswick U410
Vorteks	Heidolph Reaxtop

4.1.4. Kullanılan solüsyon ve çözeltiler

1 M Tris-HCl (500 ml)

- 60,55 gr Tris base
- 350 ml distile su
- 21 ml konsantre HCl (%37,2-12,1 M)

350 ml saf su'ya 60,55 gr tris base ile karıştırılır. Üzerine 21 ml konsantre HCl ilave edilerek saf su ile hacim 500 ml tamamlanır ve otoklavlanır.

0,5 M EDTA PH=0,8 (500 ml)

- 68,05 g EDTA
- 10 gr NaOH
- 400 ml dH₂O

400 ml saf suya 68,05 gr EDTA çözölürölüp, ardından 10 gr NaOH eklenerek Ph=8.0 olarak ayarlanır. Filtreden geçirilir ve otoklavlanır.

5 M NaCl (500 ml)

- 146,1 gr NaCl
- 450 ml dH₂O

146,1 gr NaCl 450 ml sa suda eritilir. Toplam hacim 500 ml'ye tamamlanıp oda sıcaklığında saklanır (otoklavlanmaz).

10X TE Buffer (500 ml)

- 50 ml 1 M Tris-HCl Ph=8.0
- 10 ml 0,5 M EDTA

440 ml dH₂O eklenerek 500 ml tamamlanır.

1X TE Buffer(500ml)

- 10X TE Buffer'dan 50 ml alınıp 450 ml saf suyla 500'ye tamamlanır. (DNA 1X çözölür).

3 M Sodyum asetat (ph=5,2)(100 ml)

- 40,8 gr Sodyum Asetat (NaOAc.3H₂O) 80 ml ultra safsuda iyice eriilir. Ph=5,2 oluncaya kadar glasiyel asetit asit (GAA) eklenir ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.

10 M Amonyum asetat

- 77 gr Amonyum asetat
- 800 ml dH₂O

38,5 gr Amonyum asetat 400 ml distile su içerisinde çözülür. Distile su kullanarak hacmi 500 ml stok hazırlanır. Çalışmada 250 mM olacak şekilde seyreltilerek +4°C’de muhafaza edilir.

Kloroform: izoamil alkol

- 24 ml kloroform
- 1 ml izoamil alkol eklenerek toplam hacim 25 ml olacak şekilde katları hazırlanmıştır.

2- Propanol(izopropanol)

- Hazır olarak kullanılır.

Proteinaz K

- Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanır.

Ribonüklez (rnaz)

- Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanır.

%70’lik etil alkol

- 70 ml saf etil alkolün üzerine siteril distile su eklenerek 100 ml ye tamamlanır.

Etidyum bromür çözeltisi

- 50 ml 0,5X TBE tanponu içerisine 30 µl etidyum bromür aktarılarak hazır edilir. Işıktan muhafaza etmek için karanlıkta oda sıcaklığında bekletilir.

1 X TBE

- 50 ml 10X TBE tamponuna 450 ml saf su eklenerek hazırlanır.

DNA ekstraksiyon tamponu (25 örnek için):

- 0,5 gr toz CTAB (setil trimetil amonyum bromür)
- 0,25 gr (%0,1) Sodyum bisüfit Na₂S₂O₅
- 2,5 ml Tris-HCl(1 M)
- 7 ml NaCl (5 M)
- 1 ml EDTA (0,5 M)
- 50 µl β-Mercaptoethanol

Toplam hacim saf su ile 25 ml'ye tamamlanır

4.1.5. Primerlerin hazırlanması

Çalışılan primerler firmanın önerdiği prosedüre göre 1xTE ile sulandırılarak stok çözeltisi için diyalize edilmiştir.

4.2. Yöntem

4.2.1. *Astragalus* türlerinden genomik DNA izolasyonunun yapılması

Arazi çalışmaları ile toplanan -80 ° C'de muhafaza edilen örneklerin yaprakları DNA izolasyonu için kullanılmıştır. DNA izolasyonu Cheng Lin et al. (2001)'e göre yapılmıştır.

- Hazırlanan 25 ml'lik izolasyon tamponu 75°C' ye kadar su banyosunda ısıtılarak üzerine 50 µl β-mercaptoethanol eklenmiştir.
- Her örnek için 0,3 gr bitki materyali hassas terazide tartılarak havanda sıvı azot ile öğütülmüştür.
- Öğütme işleminden sonra örnekler 2 ml'lik eppendorf tüplerine alınmıştır.
- Her bir örnek tüpüne 1000 µl izolasyon çözeltisi aktarılmış ve 65 °C'deki su banyosuna alınmıştır. 1 saat süre boyunca inkübasyona bırakılıp her 10 dk. arayla örnekler 2 dk. boyunca alt üst edilerek iyice çözündürülmüştür.

- Örnek tüplerine ayrı ayrı 750 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) aktararak hassas bir şekilde alt üst işlemi yapılmıştır.
- Santrifüj işlemi için örnekler 24 °C’de 20 dk. 14000 rpm’ de santrifüj’e tabi tutulmuştur. İşlem sonrası oluşan katmanların en üstündeki (süpernatant) kısım pipet ile alınarak yeni eppendorf tüplerine konulmuştur.
- Süpernatant üzerine 1000 µl kloroform: izoamilalkol eklenerek alt üst edilmiştir. Ardından 20 dk 4 °C’de 14000 rpm de santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.
- Oluşan yeni üst katman dikkatli bir şekilde yeni eppendorf tüplerine alınarak DNA’yı çöktürmek amacı ile her tüp üzerine 100 µl 10 M amonyum asetat ve 100 µl 3 M sodyum asetat aktarılmıştır.
- Ardından 20 dk 4 °C’de 14000 rpm’de santrifüj edilerek üst faz atılmıştır. Oluşan pelet önce %100’lük daha sonra %70’lik soğuk etanol ile yıkanmıştır.
- Yıkanılan peletler inkübasyon işlemi için 37 °C’de 15 dk. kurutulması için bekletilmiştir.
- Elde edilen kurutulmuş genomik DNA’lara 100 µl TE tamponu eklenerek çözdürülmüştür.
- Çözdürülen DNA’lar bir gün +4 °C dinlendirildikten sonra -20 °C’de saklanmaya alınmıştır.

4.2.2. DNA saflık tayini

Bitki DNA’ların saflık tayini için spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. DNA konsantrasyonunu ng /µl ve 260/280 nm’deki absorbans değeri DNA’nın saflık derecesini ifade etmektedir. DNA saflığı 1,8 - 2 arasındaki örnekler çalışmada kullanılmıştır.

4.2.3. IRAP analizi

IRAP-PCR analizlerinde 5 IRAP primeri kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin adı,

sekans bilgileri ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 4.4' de verilmiştir.

Tablo 4.4. IRAP-PCR analizinde kullanılan primerlerin adı, sekans bilgileri ve bağlanma sıcaklıkları

Primer Adı	Baz Dizilimi 5'3'	Erime Sıcaklığı (°C)
3LTR-5	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCCAACA	64,6
5LTR1	TTGCCTCTAGGGCATATTTTCCAACA	58,4
LTR 6150	CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCC ACACATGTA	64,4
NIKITA E2647-	ACCCCTCTAGGCGACATCC	58,7
SUKKULA	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC	63,3

Retrotranspozon hareketliliğinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan IRAP-PCR analizi için master mix karışımı Tablo 4.5' deki oranlara göre hazırlanmıştır.

Tablo 4.5. IRAP-PCR master mix karışımı içerik ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
10 x PCR buffer	2
dNTP (Deoxynucleotide mix)	0,3
Magnezyum klorid (25 mM)	1,15
IRAP primer (5 mM)	1
Taq DNA polimeraz	0,5
Ultra saf su	14,05
Genomik DNA	1
Toplam Hacim	20

Hazırlanan karışımlar kullanılan primer bağlanma sıcaklığına göre Bio-Rad C1000 Touch PCR cihazında Tablo 4.6’da verilen döngü protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.6. IRAP-PCR döngü protokolü

PCR Aşmaları	Sıcaklık Derecesi	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95 °C	02:00 dk.	1x
Denatürasyon	95 °C	00:30 sn.	2x
Annealing	* °C	01:00 dk.	1x
Extension	72 °C	02:00 dk.	1x
Denatürasyon	95 °C	00:30 sn.	45x
Annealing	35 °C	01:00 dk.	1x
Extension	72 °C	02:00 dk.	1x
Son Uzama	72 °C	05:00 dk.	1x
Bekleme	4 °C		1x

*IRAP primerinin bağlanma sıcaklığı

4.2.4. ISSR analizi

ISSR-PCR analizi için 16 ISSR primeri kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin adı, sekansları bilgileri ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7. ISSR-PCR analizinde kullanılan primerlerin adı, sekansları bilgileri ve bağlanma sıcaklıkları

Primer Adı	Baz Dizisi 5’ 3’	Erime Sıcaklığı (0°C)
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	47°C
UBC817	CACACACACACACACAA	50°C
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50°C
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50°C

Tablo 4.7. ISSR-PCR analizinde kullanılan primerlerin adı, sekansları bilgileri ve bağlanma sıcaklıkları (Devamı)

UBC816	CACACACACACACACAT	50°C
UBC825	ACACACACACACACACT	50°C
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	53°C
UBC830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	53°C
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	54°C
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGACT	54°C
UBC848	CACACACACACACACAAG	54°C
UBC855	ACACACACACACACACCT	54°C
UBS856	ACACACACACACACACYA	54°C
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	56°C
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	56°C
UBC61	ACCACCACCACCACCACC	61°C

Y: Pirimidin

Mikrosatelit hareketliliğinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan ISSR-PCR analizi için master mix karışımı Tablo 4.8'deki oranlara göre hazırlanmıştır.

Tablo 4.8. ISSR-PCR master mix karışımı içerik ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
10 x PCR buffer	2
dNTP (Deoxynucleotide mix)	0,3
Magnezyum klorid (25 mM)	1,15
IRAP primer (5 mM)	1
Taq DNA polimeraz	0,5

Tablo 4.8. ISSR-PCR master mix karışımı içerik ve miktarları (Devamı)

Ultra saf su	14,05
Genomik DNA	1
Toplam Hacim	20

Hazırlanan karışımlar kullanılan primer bağlanma sıcaklığına göre Bio-Rad C1000 Touch PCR cihazında Tablo 4.9’ da verilen döngü protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.9. ISSR-PCR döngü protokolü

PCR aşamaları	Sıcaklık Derecesi	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95 °C	02:00 dk	1x
Denatürasyon	95 °C	00:30 sn.	2x
Annealing	* °C	01:00 dk.	1x
Extension	72 °C	02:00 dk.	1x
Denatürasyon	95 °C	00:30 sn.	35x
Annealing	35 °C	01:00 dk.	1x
Extension	72 °C	02:00 dk.	1x
Son Uzama	72 °C	05:00 dk.	1x
Bekleme	4 °C		1x

*ISSR primerinin bağlanma sıcaklığı

4.2.5. IRAP ve ISSR jel elektroforez protokolü

PCR işlemi sonrası elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Jel por çapları çalışılan türe ve yöntemine göre ayarlanmış olup, ISSR ve IRAP yöntemi için agaroz jel yoğunluğu % 1,5 olarak ayarlanmıştır. Bu işlem için 13 ml 10X TBE (Tris / Borate / EDTA, pH 8) üzerine saf su ile 130 ml’ye tamamlanarak 2 gr agaroz ile

Elektroforez tankının içine yeterince kuyucuk açmak için taraklar yerleştirilip jel dökümü yapılmıştır. 35 dk. donma süresi beklendikten sonra taraklar çıkartılmıştır. Ardından jelin üstünü kaplayacak şekilde taze hazırlanmış 1X TBE ile doldurulmuştur. Yükleme işlemi için 8 µl PCR ürünü ve 2 µl gel loading solution 6 x ile pipetaj yapılarak kuyucuklara yükleme yapılmıştır. En baştaki kuyucuğa 1 µl marker, 1 µl gel loading solution ve 1 µl saf su ile pipetaj yapılarak yükleme yapılmıştır.

4.2.6. Veri analizi

27

5. BULGULAR

5.1. Erzincan ve Çevresinden Örneklenen *Astragalus* Türleri

Çalışmamızda Erzincan ve çevresinden toplanan *Astragalus* L. cinsine ait taksonlar herbaryum tekniklerine uygun olarak preslenerek kurutulmuştur. Morfolojik teşhisleri Doç.Dr. Mustafa KORKMAZ ve Prof. Dr. Ali KANDEMİR tarafından yapılmıştır. Yapılan morfolojik teşhislerde, örneklerin kalitatif ve kantitatif özelliklerini minimum ve maksimum değerlerini saptamak için titiz ölçümler ve gözlemler yapılmıştır. Milimetrik yapılan ölçümler için stereo mikroskop kullanılırken, büyük yapılardaki ölçümler ise cetvel ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu teşhislere göre belirlenen türler Tablo 5.1' de verilmiştir.

Bu tabloda, sırasıyla türlerin bilimsel adları, ömürleri, yetiştiği yükseklikleri, lokaliteleri, habitatları, elementi, endemizm ve toplanma tarihleri belirtilmiştir.

- Belirlenen türlerin yetiştiği yükseklikleri 1450 m (*Astragalus aduncus*) ile 2293 m (*Astragalus lycius*) arasında değişmektedir.
- Bu türler 12 farklı lokaliteden toplanmıştır. Türlerin çoğunluğu Ergen Dağı ve Çayırli çevresinde yayılış göstermektedir.
- Çalışılan türlerin endemizmleri araştırıldığında TÜBİVES (Türkiye Bitkileri Veri Servisi, 2022) kaynağına göre altı tür (*Astragalus pennatulus*, *Astragalus karamasicus*, *Astragalus lycius*, *Astragalus eriocephalus* subsp. *eriocephalus*, *Astragalus compactus* ve *Astragalus xlobasis*) endemik olarak verilmiştir.
- Bizim Bitkiler (bizimbitkiler.org.tr, 2022) adlı sitede endemizm bakıldığında ise üç tür (*Astragalus pennatulus*, *Astragalus karamasicus*, *Astragalus lycius*) endemik olarak verilmektedir.
- Belirlenen türlerin habitatları; Kayalık Alanlar, Yamaçlar, Kreçli step alanlar, Dere yatağı kenarlıkları, Meyili step alanlar, Meyili step alanlar, Zayıf vejetasyon gösteren step alanlar, Akıntılı yamaçlar, Çayırlik step alanlar, Yol kenarı ve yamaçlar, Yol kenarı step ve Korunmuş alanlar olmuştur.

Tablo 5.1. Erzincan ve çevresinde teşhis edilen *Astragalus* türleri

Tür İsmi	Ömür	Yükseklik	Lokalite	Habitatları	Elementi	Endemizm	Tarih
<i>Astragalus microcephalus</i>	Çok Yıllık	2050 mt	Ergan Dağı, Kayak Tesisi, İkinci Pist	Kayalıklı Alanlar	İran turan		24.06.2021
<i>Astragalus kurdicus</i>	Çok Yıllık	2293 mt	Erzincan, Çayırılı Dağ Yolu 32. Km	Yamaçlar	İran turan		30.06.2021
<i>Astragalus lycius</i>	Çok Yıllık	2293 mt	Erzincan, Çayırılı Dağ Yolu 32. Km	Kreçli step alanlar	Bilinmiyor	Endemik (Bizimbitkiler.org.tr,)	30.06.2021
<i>Astragalus cancellatus</i>	Çok Yıllık	2280 mt	Erzincan Çayırılı Yaylalar Köyü Üstü Aksu Deresi Civarı	Dere yatağı kenarlıkları	İran turan		30.06.2021
<i>Astragalus compactus</i>	Çok Yıllık	1450 mt	Ergan Dağına Çıkarken 500 Mt	Meyili step alanlar	İran turan	Endemik (tübives)	24.06.2021
<i>Astragalus pennatulus</i>	Çok Yıllık	1550 mt	Ergan Dağına Çıkarken 5.Km	Meyili step alanlar	İran turan	Endemik (Bizimbitkiler.org.tr,)	24.06.2021
<i>Astragalus angustifolius subsp. angustifolius</i>	Çok Yıllık	2100 mt	Erzincan Spikor Dağı	Zayıf vejetasyon gösteren step alanlar	Bilinmiyor		17.06.2021

Tablo 5.1. Erzincan ve çevresinde teşhis edilen *Astragalus* türleri (Devamı)

<i>Astragalus aduncus</i>	Çok Yıllık	1450 mt	Dedek Köyü Yolu Step	Akıntılı yamaçlar	İran turan		26.06.2021
<i>Astragalus eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	Çok Yıllık	2250 mt	Ergan Dağı, kayak tesisi, İkinci Pist	Çayırılık step alanlar	İran turan	Endemik (tübives)	24.06.2021
<i>Astragalus karamasicus</i>	Çok Yıllık	1850 mt	Ergan Dağı kayak tesisi, birinci Pist	Yol kenarı ve yamaçlar	İran turan	Endemik (Bizimbitkiler.org.tr,)	24.06.2021
<i>Astragalus lagurus</i>	Çok Yıllık	1650 mt	Binkoç Köyü Üstü	Yol kenarı step	İran turan		24.06.2021
<i>Astragalus xylobasis</i>	Çok Yıllık	2000 mt	Erzincan Spikor Dağı	Korunmuş alanlar	İran turan	Endemik (tübives)	17.06.2021

✓ *Astragalus microcephalus*

Yastık görünümlü çalı şeklindedir. Yaprakları tüylü saplı dikenli olup, 1,5 -2,5 cm boyutundadırlar. Eliptik, diken uçlu, beyaz tüylüdür. Ezincan Ergan dağında 2050 metre yükseklikte tespit edilmiştir. Şekil 5.1’de doğal görünümü verilmiştir.



Şekil 5.1. *Astragalus microcephalus*’un genel görünümü Ergan dağı/Erzincan

✓ *Astragalus kurdicus*

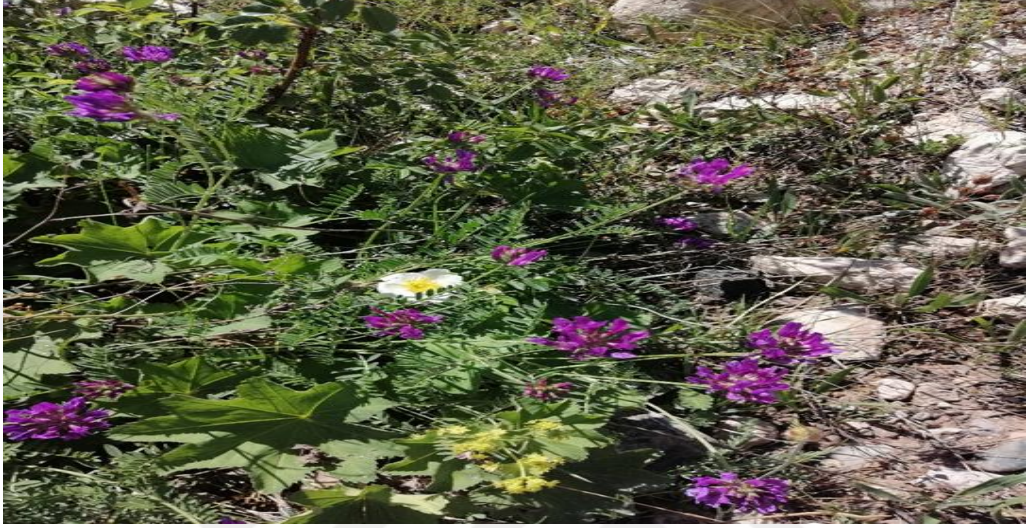
Çalı formunda olup, çok yıllık ve odunsu yapıya sahiptir. Boyları 10-20 cm arasındadır. Çiçeklenme Haziran-Ağustos aylarında gerçekleşir. Taç yapraklar pembe veya menekşe rengindedir. Erzincan Çayırılı yolunda, 2293 metre yükseklikte tespit edilmiştir. Doğal görünümü Şekil 5.2’de verilmiştir.



Şekil 5.2. *Astragalus kurdicus*’un genel görünümü Erzincan Çayırılı yolu/Erzincan

✓ *Astragalus lycius*

Çok yıllık otsu olup, odunsu kök yapısına sahiptir. Boyları 20-35 cm arasındadır. 400-1800 metre yüksekliklerde görünmektedir. Mor çiçeklidirler. 2293 metre yükseklikte Erzincan Çayırılı yolunda tespit edilmiştir. Doğal görünümü Şekil 5.3’de verilmiştir.



Şekil 5.3. *Astragalus lycius* 'un genel görünümü Erzincan Çayırılı yolu/Erzincan

✓ *Astragalus cancellatus*

Çok yıllık otsu bir bitkidir. Çiçeklenme dönemi Mayıs ve Haziran aylarıdır. 25-40 cm boyuna ulaşabilmektedir. Habitat olarak çakılı nehir terasında ve Artemisia bozkırlarında yayılış gösterirler. 2280 metre yükseklikte Erzincan Yaylalar köyü üstünde tespit edilmiştir. Doğal görünümü Şekil 5.4’de verilmiştir.



Şekil 5.4. *Astragalus cancellatus* 'un genel görünümü Yaylalar köyü üstü/Erzincan

✓ ***Astragalus compactus***

Çok yıllık endemik bir bitki türü olup çalı formundadır. Çiçeklenme süreleri Temmuz ve Ağustos aylarındadır. Ülkemizde Kars, Erzincan, Gümüşhane, Sivas, Yozgat illerinde 1200-1850 metre arasında yayılış göstermektedir. 1450 metre yükseklikte Erzincan Ergen Dağı eteklerinde tespit edilmiştir. Doğal görünümü Şekil 5.5’de verilmiştir.



Şekil 5.5. *Astragalus compactus* ’un genel görünümü Ergen dağı etekleri/Erzincan

✓ ***Astragalus pennatulus***

Çok yıllık endemik bir bitki olup, çalı formundadır. Çiçeklenme dönemleri Haziran-Eylül ayları arasındadır. Türkiyede Elazığ, Erzincan, Malatya ilerinde yayılış göstermektedir. 1550 metre yükseklikte Ergen Dağı eteklerinde tespit edilmiştir. Doğal görünümü Şekil 5.6’da verilmiştir.



Şekil 5.6. *Astragalus pennatulus* ’un genel görünümü Ergen dağı/Erzincan

✓ ***Astragalus angustifolius* subsp. *angustifolius***

Ülkemizde keçi geveni olarak bilinir, çiçeklenme dönemi Nisan-Ağustos ayları arasındadır. Bitki çalı tipinde olup, çok yıllıktır. Habitatı bozkırlardır. 2100 metre yükseklikte Erzincan Spikor Dağında tespit edilmiştir. Doğal görünümü Şekil 5.7’de verilmiştir.



Şekil 5.7. *Astragalus angustifolius* subsp. *angustifolius*’un genel görünümü Sipikor dağı/Erzincan

✓ ***Astragalus aduncus***

Çok yıllık otsu olup, odunsu kök yapısına sahiptir. Boyları 20-40 cm, yapraklar 2-6 cm, yaprakçıklar 4-14 mm arasında değişmektedir. Genel olarak 300-2370 metre yüksekliklerde görülmektedir. 1450 metre yüksekliğinde Erzincan Dedek köyünde tespit edilmiştir. Arazide örneklediğimiz türün görüntüsü Şekil 5.8’de verilmiştir.



Şekil 5.8. *Astragalus aduncus*’un genel görüntüsü Dedek köyü/Erzincan

✓ *Astragalus eriocephalus* subsp. *eriocephalus*

Cüce çalı görünümünde olup, yapraklar 1,5-5 cm arasındadır. 2000-3000 metre rakımda dağlar ve tepelik bozkırlarda yayılış gösterirler. 2250 metre yüksekliğinde Erzincan Ergen Dağında tespit edilmiştir. Çalışmamız esnasında görüntülediğimiz türün görüntüsü Şekil 5.9’da verilmiştir.



Şekil 5.9. *Astragalus eriocephalus* subsp. *eriocephalus*’un genel görünümü Ergen Dağı/Erzincan

✓ *Astragalus karamasicus*

Çok yıllık otsu olup, odunsu bir kök yapısına sahiptir. Boyları 10-20 cm, yaprakçıklar 3-8 mm arasındadır. Genel olarak 450-2060 metre arasında yayılış gösterirler. Çiçek renkleri mordur. 1850 metre yükseklikte Erzincan Ergen Dağında tespit edilmiştir. Doğal görünümü Şekil 5.10’da verilmiştir.



Şekil 5.10. *Astragalus karamasicus*’un genel görünümü Ergen Dağı/Erzincan

✓ *Astragalus lagurus*

Çok yıllık bir bitki olup, çiçeklenme Haziran ve Ağustos aylarında gerçekleşir. Tüylü sarı renkli çiçek yapısına sahiptir. Habitat olarak bozkır, dağlar ve tepelik meralarda yayılış gösterirler. 1650 metre yükseklikte Erzincan Binkoç köyü üstünde tespit edilmiştir. Doğal görünümü Şekil 5.11’de verilmiştir.



Şekil 5.11. *Astragalus lagurus*’un genel görünümü Binkoç Köyü üstü/Erzincan

✓ *Astragalus xylobasis*

Çok yıllık otsu olup, odunsu kök yapısına sahiptir. Boyları 20-35 cm, kök uzunluğu 15-30 cm, yaprakçıklar 10-20 mm arasındadır. Mor renkli çiçek yapısına sahiptir. 2000 metre yükseklikte Erzincan Sipikor Dağında tespit edilmiştir. Doğal görünümü Şekil 5.12’de verilmiştir.



Şekil 5.12. *Astragalus xylobasis*’in genel görünümü Sipikor Dağı/Erzincan

5.2. *Astragalus* türlerine ait DNA miktarları

Astragalus bitkisinde elde edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık sonuçları Tablo 5.2’ de verilmiştir.

Tablo 5.2. DNA miktar ve saflık sonuçları

Türün ismi	DNA miktarı(ng/ml)	DNA saflığı(260/280)
<i>A. microcephalus</i>	477,454	2,129
<i>A. lagurus</i>	241,223	1,95
<i>A. aduncus</i>	159,899	1,974
<i>A. xylobasis</i>	237,445	1,869
<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	1095,765	2,193
<i>A. compactus</i>	625,731	2,027
<i>A. pennatulus</i>	518,154	2,009
<i>A. karamasicus</i>	372,543	1,838
<i>A. kurdicus</i>	577,75	2,099
<i>A. cancellatus</i>	452,158	2,023
<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	663,386	1,574
<i>A. lycius</i>	437,045	1,904

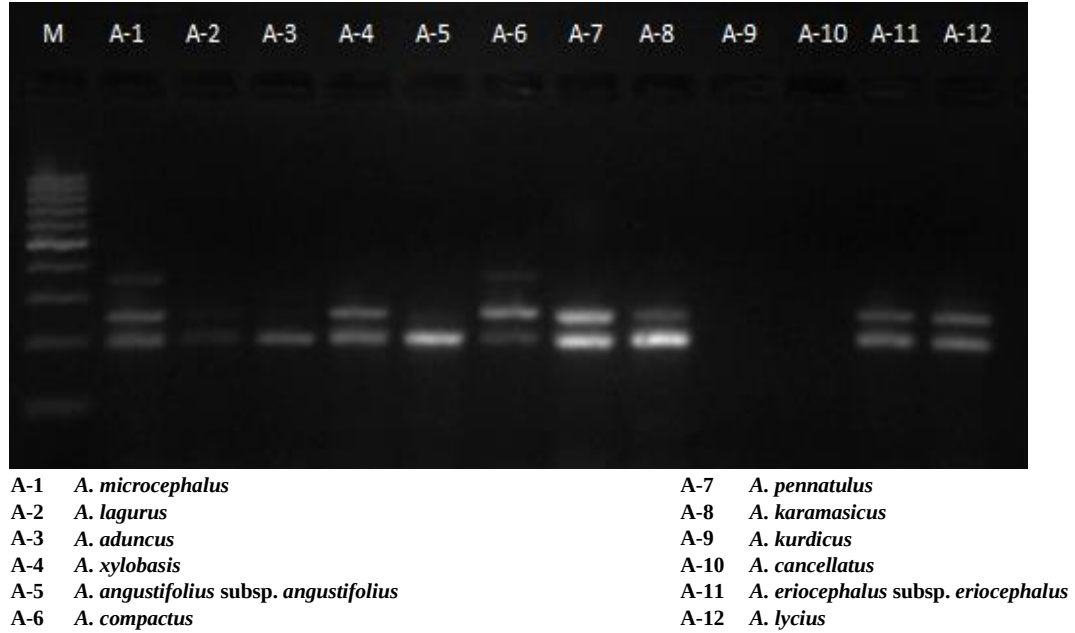
5.3. IRAP- PCR Sonuçları

Morfolojik olarak belirlenen 12 *Astragalus* L. türünde 5 IRAP primeri ile (3LTR-5, 5LTR1, LTR 6150, NIKITA E2647-, SUKKULA) çalışılmıştır. Yapılan çalışmada 100-700 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. Toplamda bant sayısı 20 olurken polimorfik bant sayısı 18 olarak hesaplanmıştır. En fazla bant veren primerler 5LTR1 ve NIKITA E2647 (5 bant) olurken, en az bant veren primer LTR 6150 ve Sukkula (3 bant) olmuştur. IRAP primerlerine göre polimorfizm % 90 olarak hesaplanmıştır. IRAP primerlerinin meydana getirdiği bant büyüklüğü, bant sayısı ve polimorfizm oranları Tablo 5.3’ de verilmiştir.

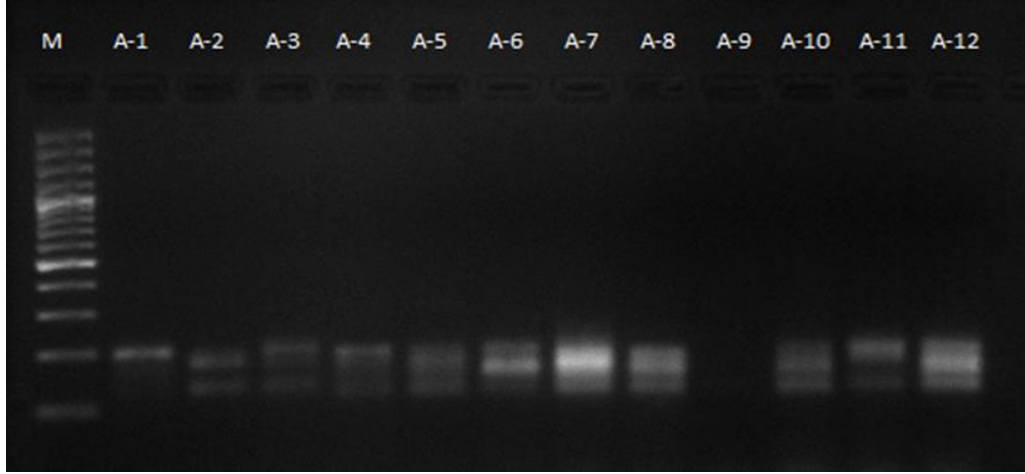
Tablo 5.3. IRAP primerlerinin meydana getirdiği bant büyüklüğü, bant sayısı ve polimorfizm

Primer adı	Molekül büyüklüğü (bp)	Toplam bant sayısı	Polimor. bant sayısı	% Polimorfizm
SUKKULA	100-250	3	3	100
3LTR-5	120-200	4	4	100
LTR 6150	200-380	3	2	66,6
NIKITA E2647-	150-500	5	4	80
5LTR1	200-700	5	5	100
Toplam		20	18	90

IRAP primerlerine ait jel görüntüleri Şekil 5.13., Şekil 5.14., Şekil 5.15., Şekil 5.16., Şekil 5.17’de verilmiştir.

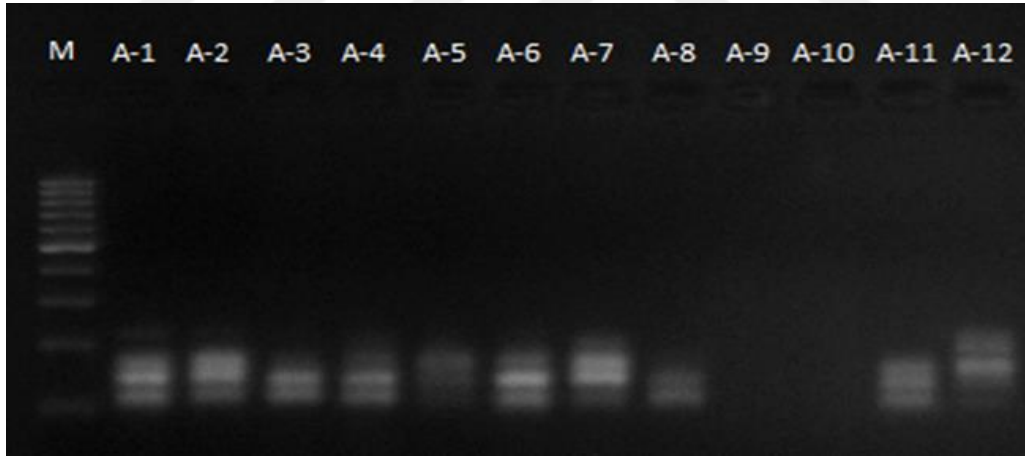


Şekil 5.13. LTR6150 primerine ait jel görüntüsü



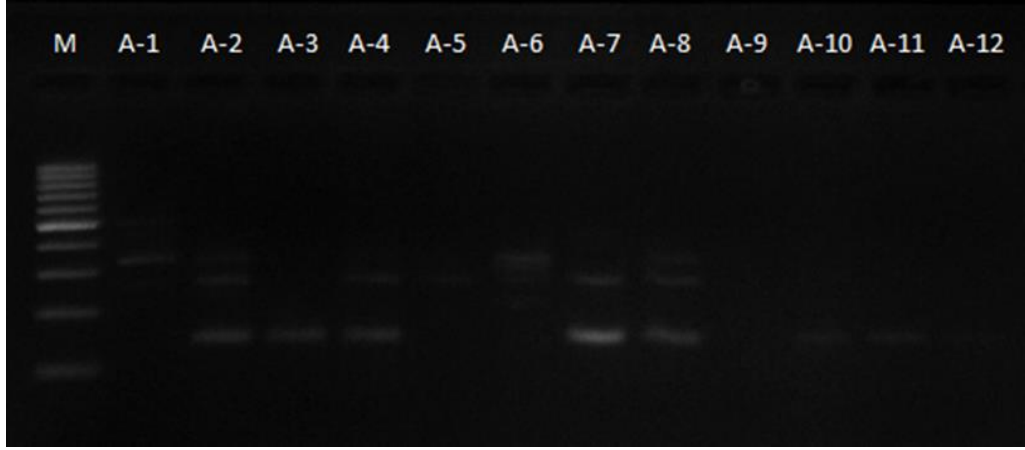
A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.14. 3LTR-5 primerine ait jel görüntüsü



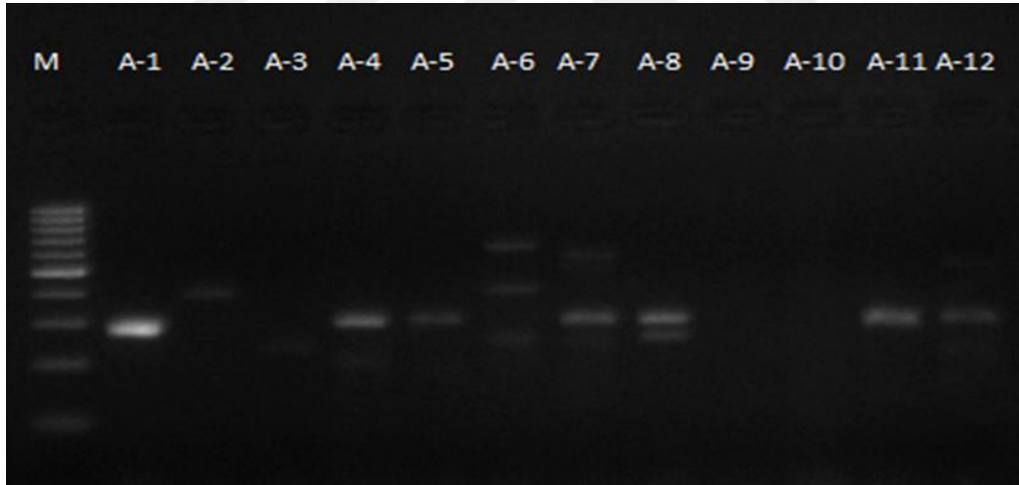
A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.15. Sukkula primerine ait jel görüntüsü



A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.16. Nikita primerine ait jel görüntüsü

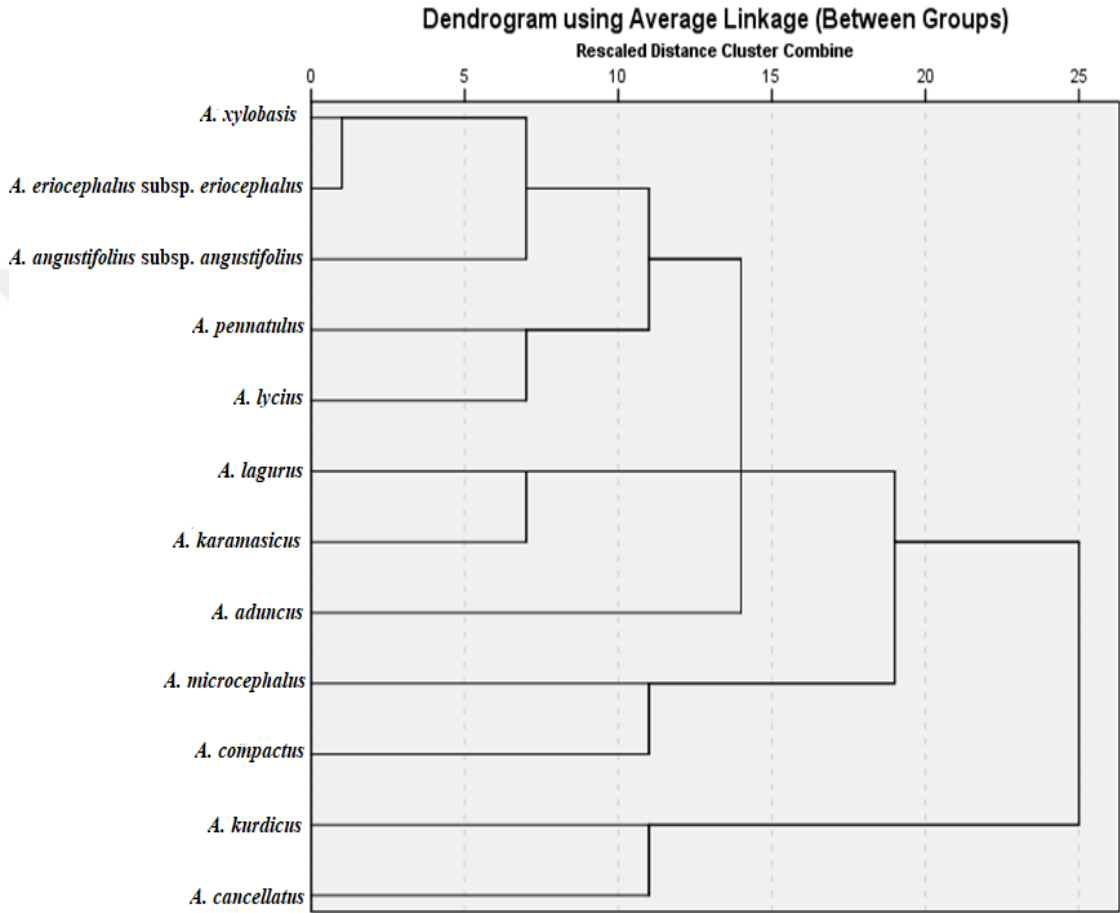


A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.17. 5LTR 1 primerine ait jel görüntüsü

Jaccard (1908) genetik benzerlik indeksine göre UPGMA yöntemi kullanılarak elde edilen dendrogram Şekil 5.18’de verilmiştir. Dendrograma göre çalışılan *Astragalus* türleri 2 gruba ayrılmıştır. Bunlardan 1. grupta *A. kurdicus* ve *A. cancellatus* bulunurken, 2. grupta 2 alt gruba ayrılmıştır. 1. Alt grupta *A. xylobasis*, *A. eriocephalus*

sobsp eriocephalus, *A. angustifolius supsp angustifolius*, *A. pennatulus*, *A. lycius*, *A. lagurus*, *A. karamasicus*, *A. aduncus* bulunurken, 2. Alt grupta *A. microcephalus* ve *A. compactus* türleri bulunmaktadır. En yüksek genetik benzerlik *A. xylobasis*, *A. eriocephalus sobsp. eriocephalus* türleri arasında olurken, en düşük genetik benzerlik *A. eriocephalus sobsp. eriocephalus* ve *A. kurdicus* türleri arasında görülmüştür.



Şekil 5.18. IRAP yöntemi ile elde edilen Erzincan ve çevresinde yayılış gösteren 12 *Astragalus* türü arasındaki genotipik bağlantı

Çalışılan *Astragalus* türlerine ait genetik benzerlik indeksi Tablo 5.4’de verilmiştir. *A. eriocephalus* subsp. *eriocephalus* ile *A. xylobasis* birbirlerine en yakın türler olurken (0.097), *A. eriocephalus* subsp. *eriocephalus* ile *A. kurdicus* birbirine en uzak türler (0.978) olmuştur.

Tablo.5.4. IRAP yöntemine göre *Astragalus* türlerine ait genetik benzerlik indeksi

	A. <i>microcephalus</i>	A. <i>lagurus</i>	A. <i>aduncus</i>	A. <i>xylobasis</i>	A. <i>angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A. <i>compactus</i>	A. <i>pennatulus</i>	A. <i>karamasicus</i>	A. <i>kurdicus</i>	A. <i>cancellatus</i>	A. <i>eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	A. <i>lycius</i>
<i>A. microcephalus</i>	,000											
<i>A. lagurus</i>	,452	,000										
<i>A. aduncus</i>	,584	,250	,000									
<i>A. xylobasis</i>	,625	,303	,415	,000								
<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	,695	,547	,398	,353	,000							
<i>A. compactus</i>	,362	,571	,571	,543	,501	,000						
<i>A. pennatulus</i>	,739	,448	,180	,257	,292	,529	,000					
<i>A. karamasicus</i>	,774	,489	,460	,411	,287	,537	,350	,000				
<i>A. kurdicus</i>	,816	,789	,641	,582	,505	,495	,462	,592	,000			
<i>A. cancellatus</i>	,257	,754	,583	,521	,401	,716	,397	,371	,435	,000		
<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	,870	,597	,338	,097	,295	,574	,877	,365	,978	,318	,000	
<i>A. lycius</i>	,868	,734	,528	,458	,239	,539	,318	,487	,288	,434	,227	,000

5.4. ISSR-PCR Sonuçları

ISSR-PCR tekniğinde 12 *Astragalus* türü üzerinden 16 ISSR primeri (UBC868, UBC817, UBC807, UBC812, UBC816, UBC825, UBC824, UBC830, UBC836, UBC840, UBC848, UBC855, UBC856, UBC841, UBC842, UBC861) çalışılmıştır. Bant büyüklükleri 100-2000 bp arasında gözlenmiştir. Toplamda 141 bant elde edilirken, polimorfik bant sayısı 128 ve yüzde polimorfizm % 90,8 olarak hesaplanmıştır. En fazla bant veren primerler UBC848, UBC836, UBC817 (12 bant) olurken, en düşük bant veren primerler UBC824 nolu primer (3 bant) olmuştur. ISSR primerlerinin meydana getirdiği bant büyüklüğü, bant sayısı ve polimorfizm oranları Tablo 5.5’ de verilmiştir.

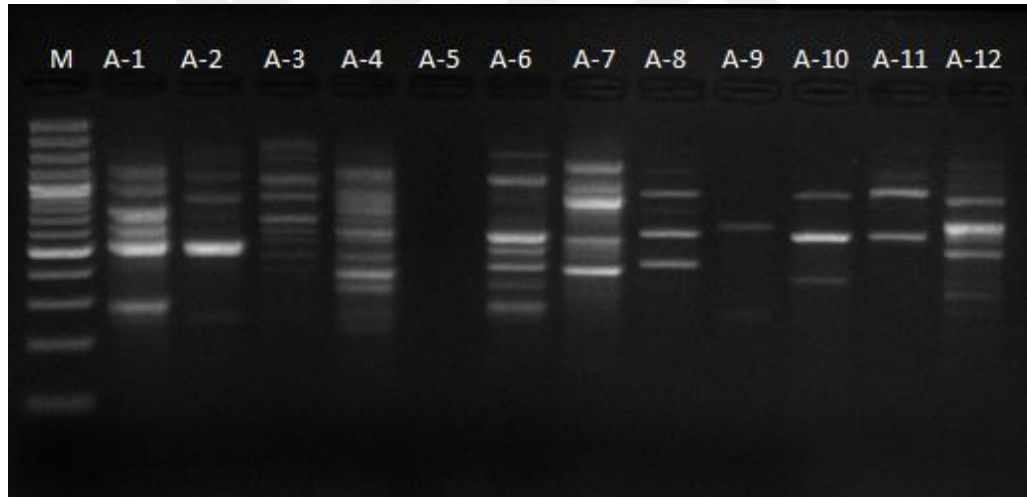
Tablo 5.5. ISSR primerlerinin meydana getirdiği bant büyüklüğü, bant sayısı ve polimorfizm

Primer adı	Molekül büyüklüğü (bp)	Toplam bant sayısı	Polimor. bant sayısı	% Polimorfizm
UBC807	600-2000	9	8	88,8
UBC812	400-1500	8	8	100
UBC816	500-1500	8	7	87,5
UBC817	300-2000	12	10	83,3
UBC824	900-1500	3	3	100
UBC868	100-400	5	4	80
UBC825	400-1500	11	10	90,9
UBC830	250-1000	9	8	88,8
UBC836	150-1200	12	10	83,3
UBC840	200-1500	11	10	90,9
UBC848	250-2000	12	12	100
UBC855	300-1200	10	9	90

Tablo 5.5. ISSR primerlerinin meydana getirdiği bant büyüklüğü, bant sayısı ve polimorfizm(Devamı)

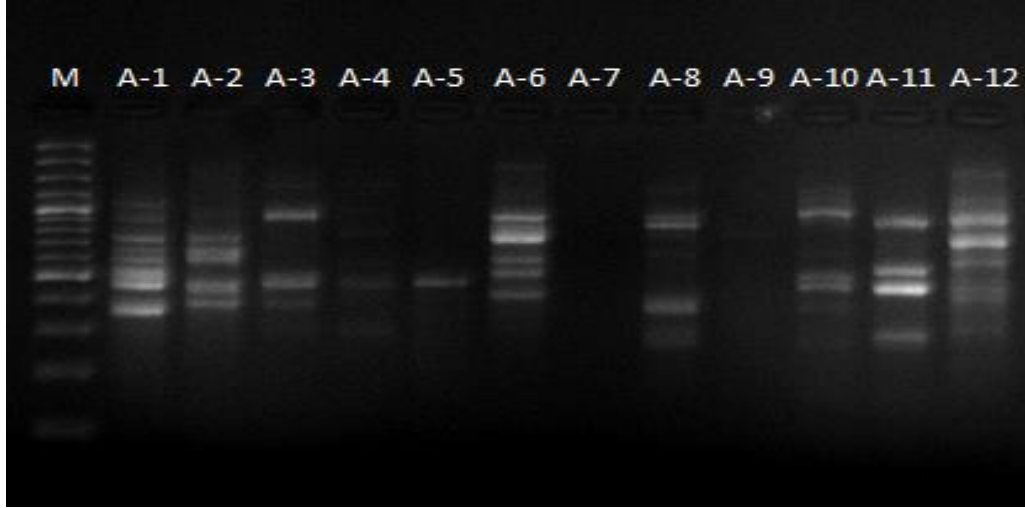
UBC856	200-800	6	5	83,3
UBC841	200-2000	11	11	100
UBC842	100-1000	9	8	88,8
UBC861	250-500	5	5	100
Toplam	100-2000	141	128	90,8

ISSR primerlerinden elde edilen jel görüntüleri Şekil 5.19., Şekil 5.20., Şekil 5.21., Şekil 5.22., Şekil 5.23., Şekil 5.24., Şekil 5.25., Şekil 5.26., Şekil 5.27., Şekil 5.28., Şekil 5.29., Şekil 5.30., Şekil 5.31., Şekil 5.32., Şekil 5.33. ve Şekil 5.34’de verilmiştir.



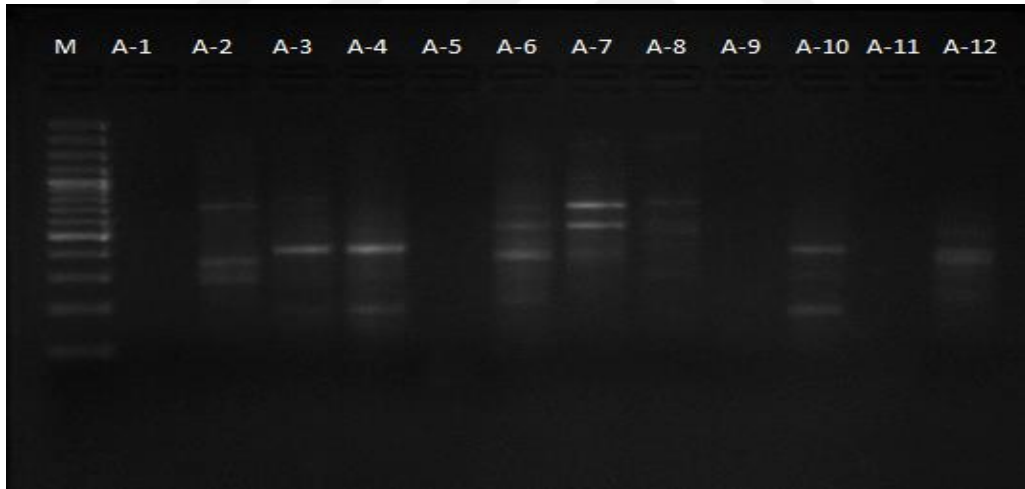
- | | | | |
|-----|---|------|---|
| A-1 | <i>A. microcephalus</i> | A-7 | <i>A. pennatulus</i> |
| A-2 | <i>A. lagurus</i> | A-8 | <i>A. karamasicus</i> |
| A-3 | <i>A. aduncus</i> | A-9 | <i>A. kurdicus</i> |
| A-4 | <i>A. xylobasis</i> | A-10 | <i>A. cancellatus</i> |
| A-5 | <i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i> | A-11 | <i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> |
| A-6 | <i>A. compactus</i> | A-12 | <i>A. lycius</i> |

Şekil 5.19. UBC848 pirimerine ait jel görüntüsü



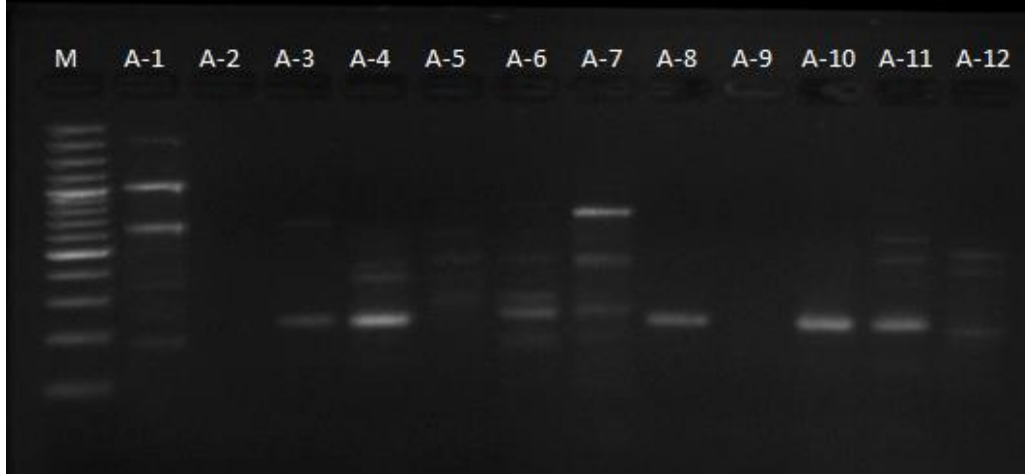
A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.20. UBC855 pirimerine ait jel görüntüsü



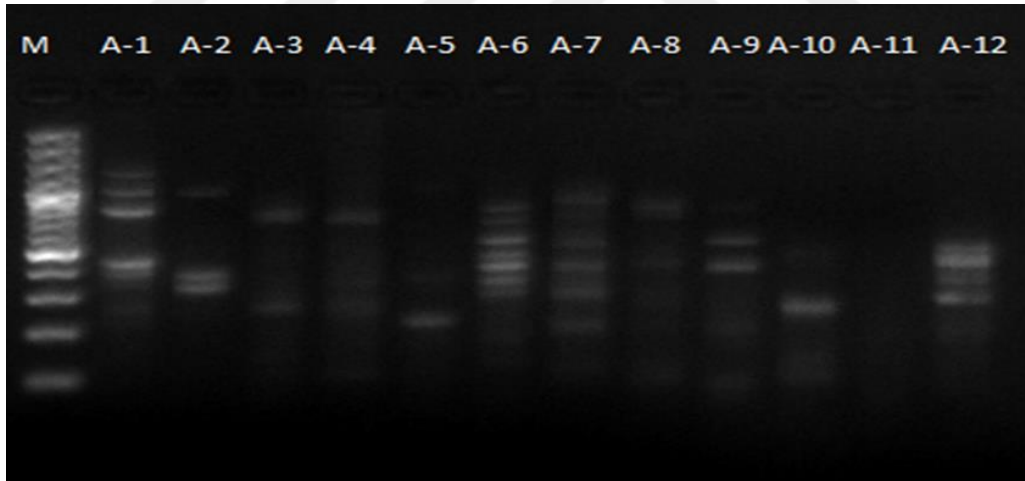
A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.21. UBC856 pirimerine ait jel görüntüsü



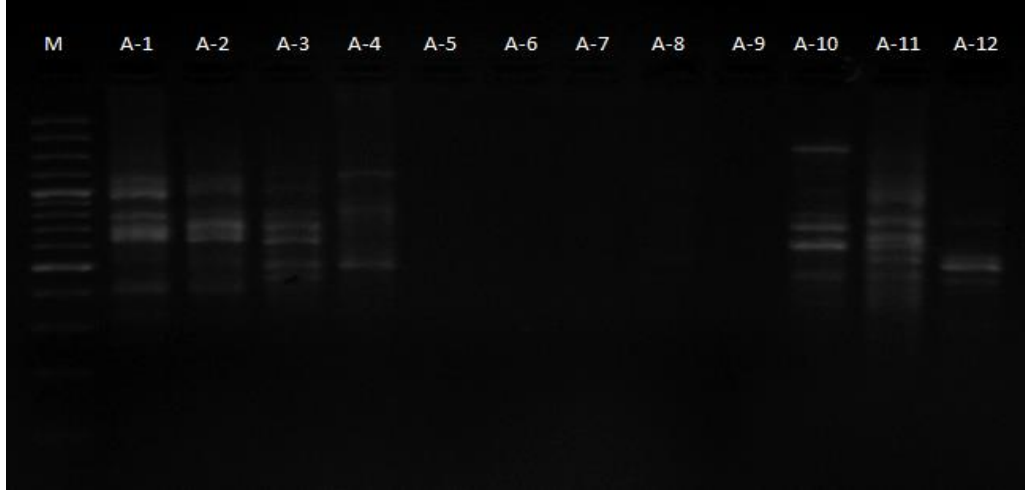
- | | | | |
|-----|---|------|---|
| A-1 | <i>A. microcephalus</i> | A-7 | <i>A. pennatulus</i> |
| A-2 | <i>A. lagurus</i> | A-8 | <i>A. karamasicus</i> |
| A-3 | <i>A. aduncus</i> | A-9 | <i>A. kurdicus</i> |
| A-4 | <i>A. xylobasis</i> | A-10 | <i>A. cancellatus</i> |
| A-5 | <i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i> | A-11 | <i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> |
| A-6 | <i>A. compactus</i> | A-12 | <i>A. lycius</i> |

Şekil 5.22. UBC841 pirimerine ait jel görüntüsü



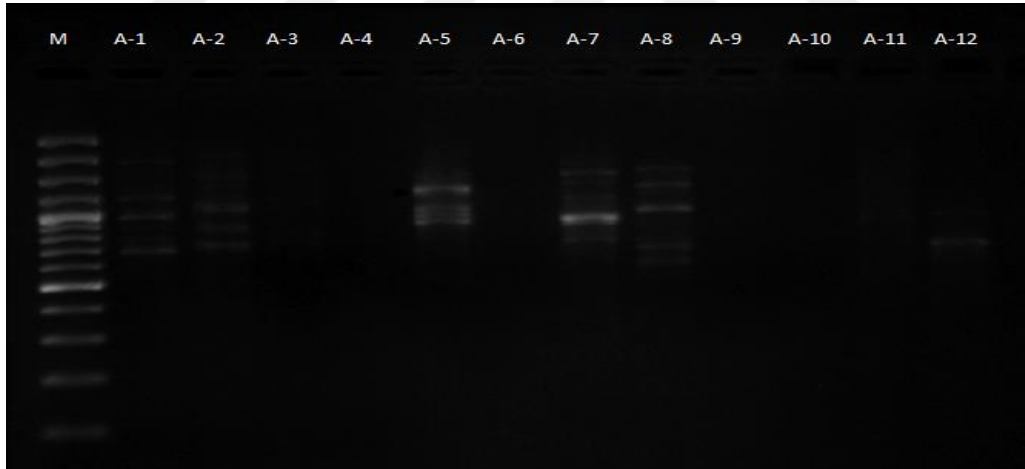
- | | | | |
|-----|---|------|---|
| A-1 | <i>A. microcephalus</i> | A-7 | <i>A. pennatulus</i> |
| A-2 | <i>A. lagurus</i> | A-8 | <i>A. karamasicus</i> |
| A-3 | <i>A. aduncus</i> | A-9 | <i>A. kurdicus</i> |
| A-4 | <i>A. xylobasis</i> | A-10 | <i>A. cancellatus</i> |
| A-5 | <i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i> | A-11 | <i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> |
| A-6 | <i>A. compactus</i> | A-12 | <i>A. lycius</i> |

Şekil 5.23. UBC842 pirimerine ait jel görüntüsü



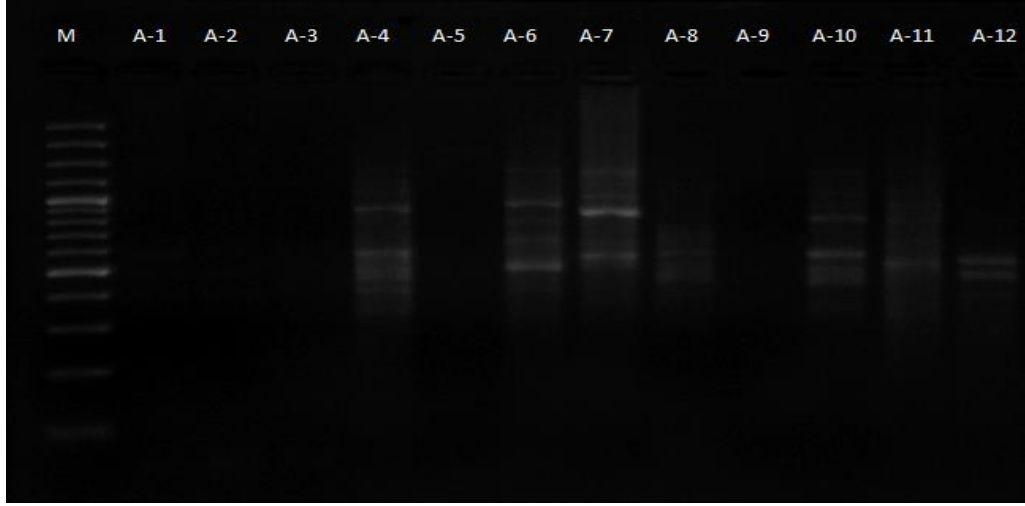
- | | | | |
|-----|---|------|---|
| A-1 | <i>A. microcephalus</i> | A-7 | <i>A. pennatulus</i> |
| A-2 | <i>A. lagurus</i> | A-8 | <i>A. karamasicus</i> |
| A-3 | <i>A. aduncus</i> | A-9 | <i>A. kurdicus</i> |
| A-4 | <i>A. xylobasis</i> | A-10 | <i>A. cancellatus</i> |
| A-5 | <i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i> | A-11 | <i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> |
| A-6 | <i>A. compactus</i> | A-12 | <i>A. lycius</i> |

Şekil 5.24. UBC817 pirimerine ait jel görüntüsü



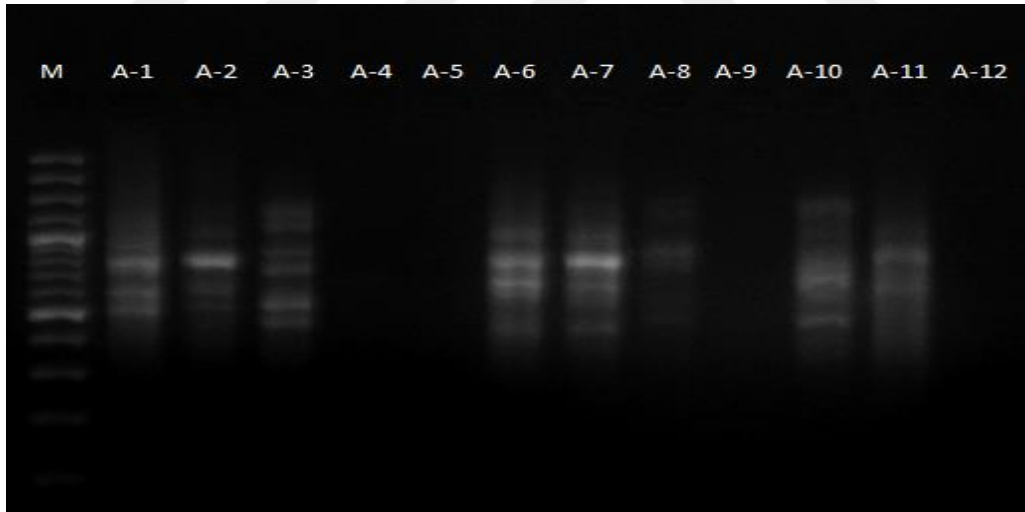
- | | | | |
|-----|---|------|---|
| A-1 | <i>A. microcephalus</i> | A-7 | <i>A. pennatulus</i> |
| A-2 | <i>A. lagurus</i> | A-8 | <i>A. karamasicus</i> |
| A-3 | <i>A. aduncus</i> | A-9 | <i>A. kurdicus</i> |
| A-4 | <i>A. xylobasis</i> | A-10 | <i>A. cancellatus</i> |
| A-5 | <i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i> | A-11 | <i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> |
| A-6 | <i>A. compactus</i> | A-12 | <i>A. lycius</i> |

Şekil 5.25. UBC807 pirimerine ait jel görüntüsü



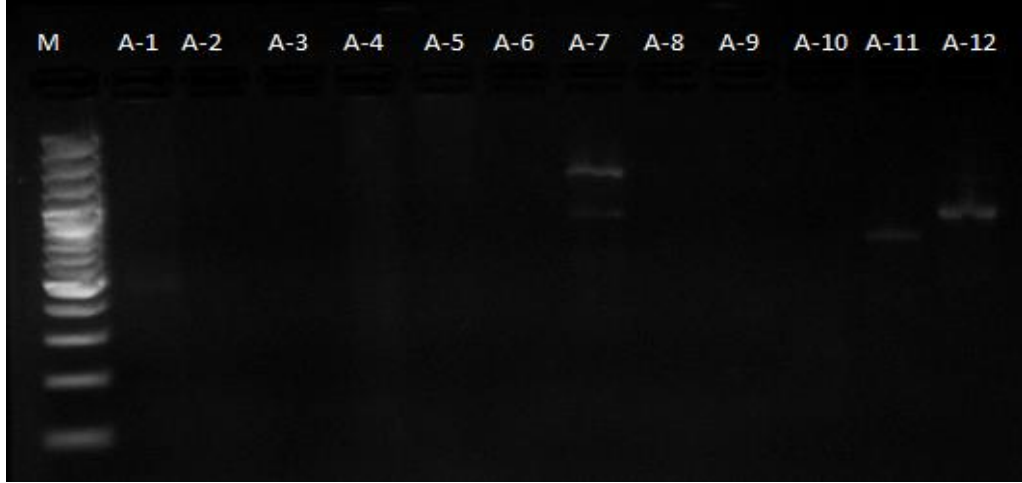
A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.26. UBC812 pirimerine ait jel görüntüsü



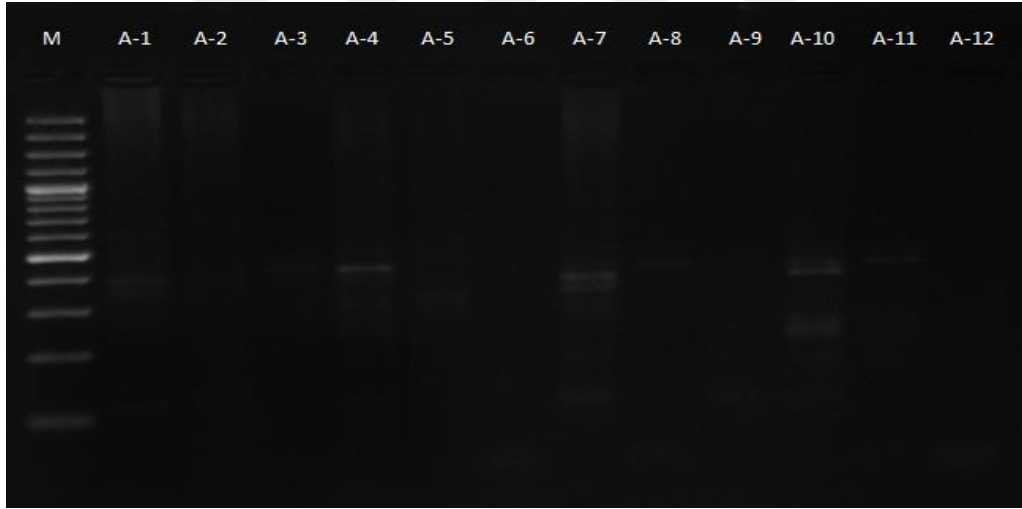
A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.27. UBC816 pirimerine ait jel görüntüsü



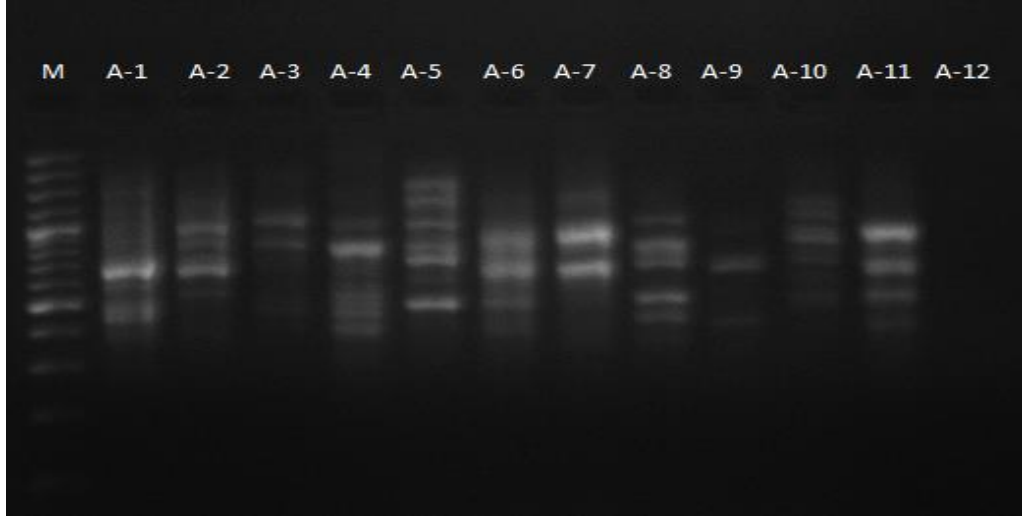
- | | | | |
|-----|---|------|---|
| A-1 | <i>A. microcephalus</i> | A-7 | <i>A. pennatulus</i> |
| A-2 | <i>A. lagurus</i> | A-8 | <i>A. karamasicus</i> |
| A-3 | <i>A. aduncus</i> | A-9 | <i>A. kurdicus</i> |
| A-4 | <i>A. xylobasis</i> | A-10 | <i>A. cancellatus</i> |
| A-5 | <i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i> | A-11 | <i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> |
| A-6 | <i>A. compactus</i> | A-12 | <i>A. lycius</i> |

Şekil 5.28. UBC824 pirimerine ait jel görüntüsü



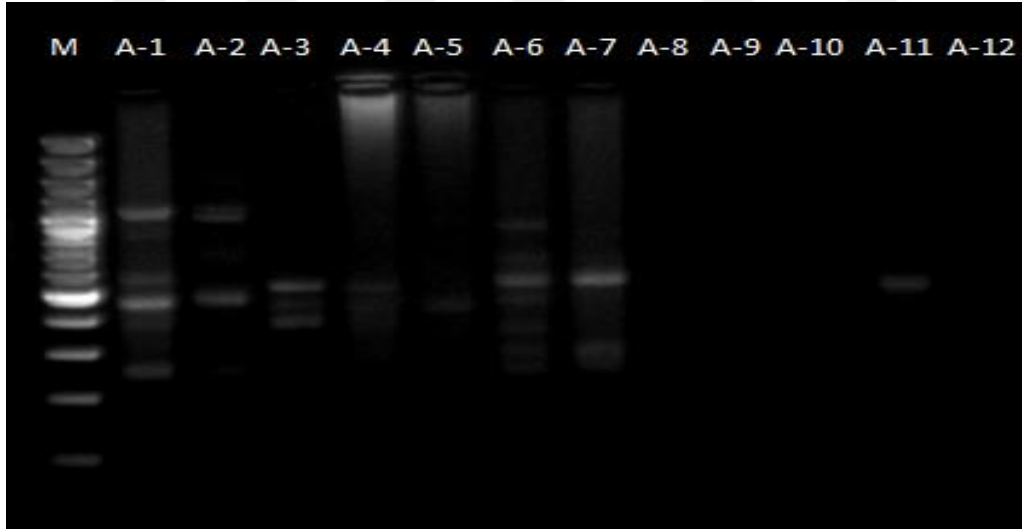
- | | | | |
|-----|---|------|---|
| A-1 | <i>A. microcephalus</i> | A-7 | <i>A. pennatulus</i> |
| A-2 | <i>A. lagurus</i> | A-8 | <i>A. karamasicus</i> |
| A-3 | <i>A. aduncus</i> | A-9 | <i>A. kurdicus</i> |
| A-4 | <i>A. xylobasis</i> | A-10 | <i>A. cancellatus</i> |
| A-5 | <i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i> | A-11 | <i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> |
| A-6 | <i>A. compactus</i> | A-12 | <i>A. lycius</i> |

Şekil 5.29. UBC868 pirimerine ait jel görüntüsü



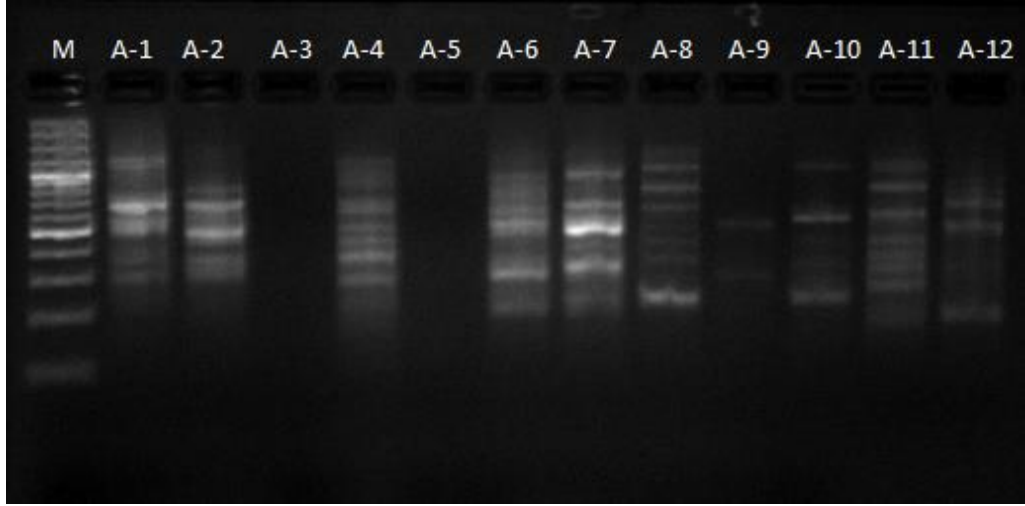
A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.30. UBC825 pirimerine ait jel görüntüsü



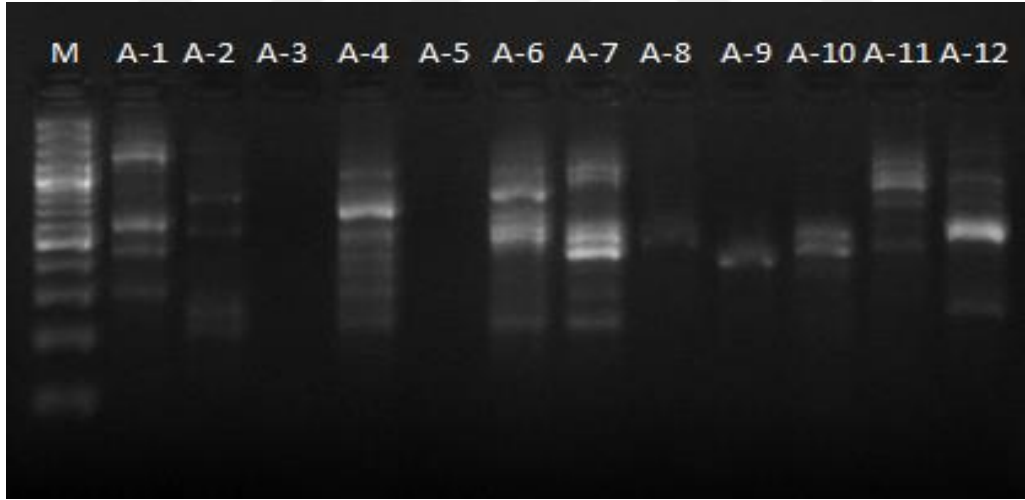
A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.31. UBC830 pirimerine ait jel görüntüsü



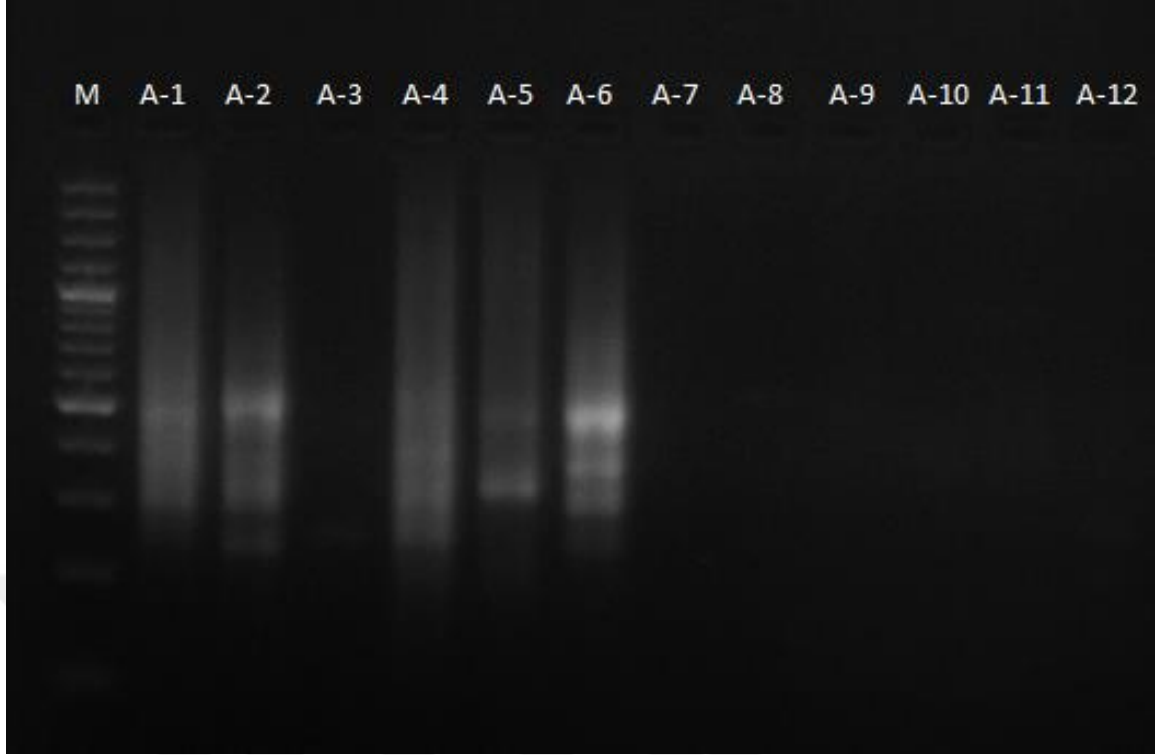
- | | | | |
|-----|---|------|---|
| A-1 | <i>A. microcephalus</i> | A-7 | <i>A. pennatulus</i> |
| A-2 | <i>A. lagurus</i> | A-8 | <i>A. karamasicus</i> |
| A-3 | <i>A. aduncus</i> | A-9 | <i>A. kurdicus</i> |
| A-4 | <i>A. xylobasis</i> | A-10 | <i>A. cancellatus</i> |
| A-5 | <i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i> | A-11 | <i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> |
| A-6 | <i>A. compactus</i> | A-12 | <i>A. lycius</i> |

Şekil 5.32. UBC836 pirimerine ait jel görüntüsü



- | | | | |
|-----|---|------|---|
| A-1 | <i>A. microcephalus</i> | A-7 | <i>A. pennatulus</i> |
| A-2 | <i>A. lagurus</i> | A-8 | <i>A. karamasicus</i> |
| A-3 | <i>A. aduncus</i> | A-9 | <i>A. kurdicus</i> |
| A-4 | <i>A. xylobasis</i> | A-10 | <i>A. cancellatus</i> |
| A-5 | <i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i> | A-11 | <i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> |
| A-6 | <i>A. compactus</i> | A-12 | <i>A. lycius</i> |

Şekil 5.33. UBC840 pirimerine ait jel görüntüsü

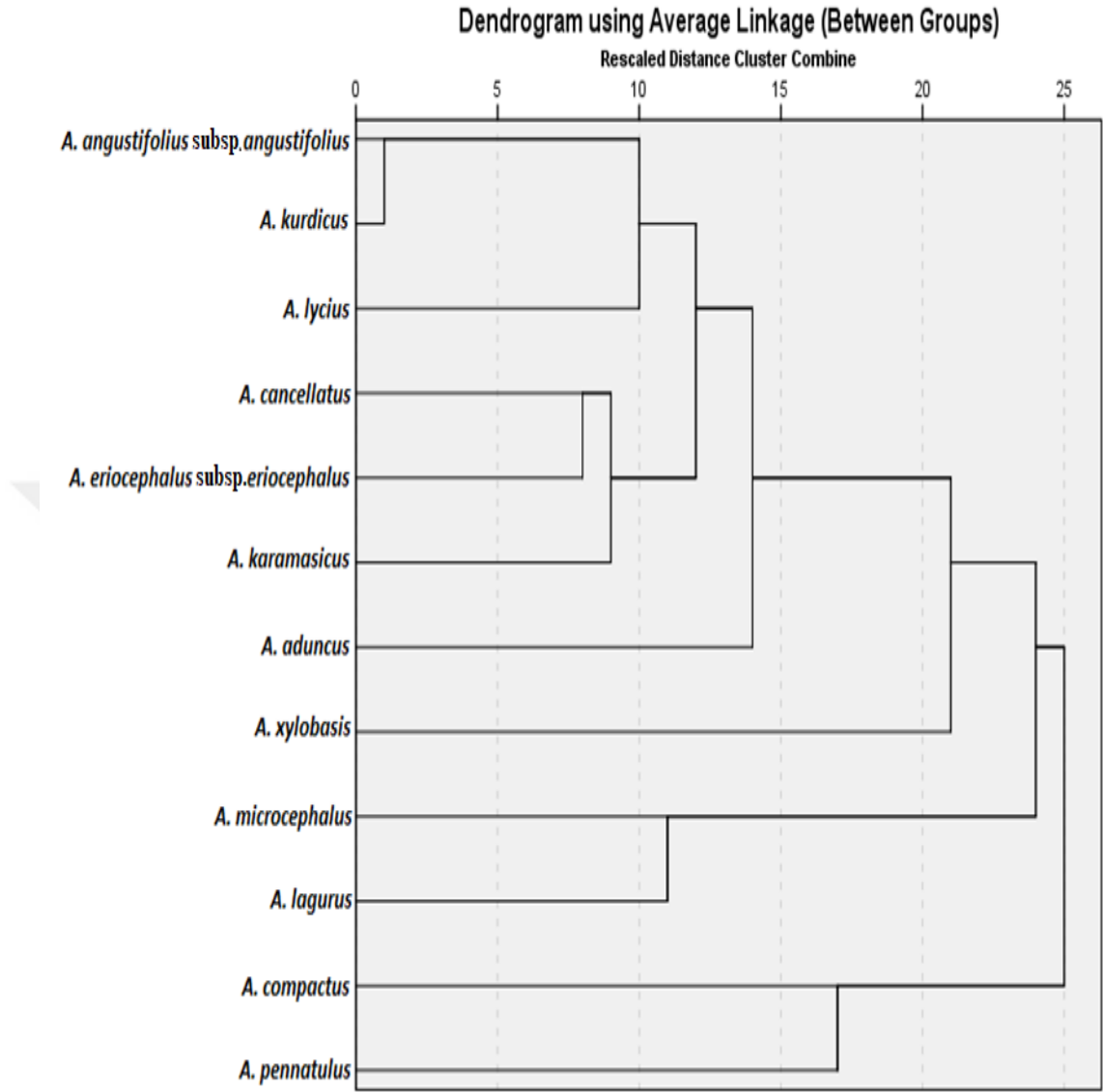


A-1	<i>A. microcephalus</i>	A-7	<i>A. pennatulus</i>
A-2	<i>A. lagurus</i>	A-8	<i>A. karamasicus</i>
A-3	<i>A. aduncus</i>	A-9	<i>A. kurdicus</i>
A-4	<i>A. xylobasis</i>	A-10	<i>A. cancellatus</i>
A-5	<i>A. angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A-11	<i>A. eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
A-6	<i>A. compactus</i>	A-12	<i>A. lycius</i>

Şekil 5.34. UBC861 pirimerine ait jel görüntüsü

Jaccard (1908) genetik benzerlik indeksine göre UPGMA yöntemi kullanılarak elde edilen dendrogram Şekil 5.35’de verilmiştir. Dendrogram verilerine göre 2 grup oluşmuştur. 1. Grupta *A. pennatulus* ve *A. compactus* yer alırken, 2. Grup 2 alt gruba ayrılmıştır. 1. Alt grupta *A. aduncus*, *A. xylobasis*, *A. angustifolius* subsp. *angustifolius*, *A. karamasicus*, *A. kurdicus*, *A. cancellatus*, *A. eriocephalus* subsp. *eriocephalus* ve *A. lycius* yer alırken, 2. Alt grupta *A. microcephalus* ve *A. lagurus* yer almıştır.

En yüksek genetik benzerlik *A. kurdicus* ile *A. angustifolius* supsp *angustifolius* türleri arasında olurken, en düşük genetik benzerlik *A. angustifolius* subsp *angustifolius* ile *A. pennatulus* arasında olmuştur.



Şekil 5.35. ISSR yöntemi ile elde edilen Erzincan ve çevresinde yayılış gösteren 12 *Astragalus* türü arasındaki genotipik bağlantı

Çalışılan türlerde yapılan genetik benzerlik indeksine göre *A. angustifolius* subsp. *angustifolius* ile *A. kurdicus* arasındaki genetik benzerlik 0,09 olurken, *A. angustifolius* subsp. *angustifolius* ile *A. pennatulus* arasındaki genetik benzerlik 0,967 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Tablo5.6).

Tablo 5.6. ISSR yöntemine göre *Astragalus* türlerine ait genetik benzerlik indeksi

	A. <i>microcephalus</i>	A. <i>lagurus</i>	A. <i>aduncus</i>	A. <i>xylobasis</i>	A. <i>angustifolius</i> subsp. <i>angustifolius</i>	A. <i>compactus</i>	A. <i>pennatulus</i>	A. <i>karamasicus</i>	A. <i>kurdicus</i>	A. <i>cancellatus</i>	A. <i>eriocephalus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	A. <i>lycius</i>
<i>A. microcephalus</i>	,000											
<i>A. lagurus</i>	,354	,000										
<i>A. aduncus</i>	,343	,501	,000									
<i>A. xylobasis</i>	,873	,765	,552	,000								
<i>A. angustifolius</i> subsp <i>angustifolius</i>	,535	,479	,368	,621	,000							
<i>A. compactus</i>	,813	,734	,552	,631	,826	,000						
<i>A. pennatulus</i>	,851	,893	,830	,102	,969	,537	,000					
<i>A. karamasicus</i>	,786	,577	,538	,771	,499	,583	,522	,000				
<i>A. kurdicus</i>	,393	,438	,285	,421	,009	,430	,374	,458	,000			
<i>A. cancellatus</i>	,867	,764	,388	,531	,336	,776	,572	,309	,236	,000		
<i>A. eriocephalus</i> subsp <i>eriocephalus</i>	,747	,721	,438	,538	,491	,736	,815	,361	,356	,254	,000	
<i>A. lycius</i>	,748	,556	,534	,544	,463	,587	,687	,457	,107	,557	,292	,000

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Dünya’da ve Türkiye’de *Astragalus* taksonlarının farklı özelliklerini ortaya koymak amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunlardan bazıları taksonomik içerikli (Maassoumi, 1998; Aytaç, 2000; Akan & Civelek, 2001; Karaman & Aytaç, 2013; Ekici vd., 2015; Estrada vd., 2016; 2020; Duman vd., 2020), fenolojik bileşik ve biyoaktivite içerikli (Işık, 2012; Albayrak, 2016), kullanım alanları ve önemi (Kadioğlu vd., 2008), karyolojik (Martin, 2015) ve anatomik, palinolojik (Özbek, 2012) çalışmalardır.

Floristik bakımdan oldukça zengin olan ülkemiz, jeolojik yapısı, coğrafik konumu ve topoğrafik yapısı ile her çeşit toprak türü bulundurmaktadır. Çeşitli toprak yapısına sahip olması, farklı iklim türlerinin oluşması ve aynı zamanda İran-Turan kökenli bitki türlerinin gen merkezi olması ile çok değişik vejetasyon tiplerini barındırmaktadır (Davis, 1970; Ekici vd., 2008; Güner vd., 2008; Aytaç ve Erkul, 2013).

Yapılan bu çalışmada Erzincan ve çevresinde toplanan *Astragalus* L. türleri ISSR ve IRAP moleküler markır yöntemleri kullanılarak türler arasındaki genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Kullanılan bu yöntemler türler arası genetik çeşitliliğin belirlenmesinde büyük kolaylık sağlamış ve güvenilir sonuçlar vermiştir.

Çalışmada Erzincan ve çevresinde *Astragalus* cinsine ait 42 örnek toplanmıştır. Toplanan türlerden 3’ü endemik (*Astragalus pennatulus*, *Astragalus karamasicus*, *Astragalus lycius*) olmak üzere 12 farklı tür belirlenmiştir. Bu türler; *Astragalus microcephalus* (Erzincan-Ergan Dağı), *Astragalus kurdicus* (Erzincan-Çayırılı), *Astragalus lycius* (Erzincan-Çayırılı), *Astragalus cancellatus* (Erzincan-Çayırılı Yaylalar köyü), *Astragalus compactus* (Erzincan-Ergan dağı), *Astragalus pennatulus* (Erzincan-Ergan Dağı), *Astragalus angustifolius* subsp. *angustifolius* (Erzincan-Spikor Dağı), *Astragalus aduncus* (Erzincan- Dedek köyü), *Astragalus eriocephalus* subsp. *eriocephalus* (Erzincan-Ergan Dağı), *Astragalus karamasicus* (Erzincan-Eran Dağı), *Astragalus lagurus* (Erzincan-Binkoç köyü), *Astragalus xylobasis* (Erzincan- Spikor Dağı). (Bkz. Tablo 5.1).

Çalışılan 12 taksondan ikisi (*Astragalus microcephalus* ve *Astragalus compactus*) sinonim olmuşlardır. Bu taksonların geçerli isimleri *Astragalus microcephalus* Willd. subsp. *microcephalus* ve *Astragalus compactus* Lam. subsp. *compactus* olmuştur.

Çalışılan türlerin endemizmeleri araştırıldığında TÜBİVES (Türkiye Bitkileri Veri Servisi, 2022) kaynağına göre altı tür (*Astragalus pennatulus*, *Astragalus karamasicus*, *Astragalus lycius*, *Astragalus eriocephalus* subsp. *eriocephalus*, *Astragalus compactus* ve *Astragalus xlobasis*) endemik olarak verilmesine karşın, Bizim Bitkiler (bizimbitkiler.org.tr, 2022) adlı sitede üç tür (*Astragalus pennatulus*, *Astragalus karamasicus*, *Astragalus lycius*) endemik olarak verilmektedir.

Türler arası varyasyonların belirlenmesinde daha önce morfolojik veriler kullanılmaktaydı. Günümüzde çevresel koşullardan etkilenmeyen moleküler markırlar geliştirilerek bu alanda yoğun bir şekilde faydalanılmaktadır. Moleküler markırlar genetik çeşitliliğin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmakta ve karşılaşılan problemlerde güvenilir sonuçlar üretmektedir. Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde en çok tercih edilen yöntemler arasında ISSR ve IRAP moleküler markırları yer almaktadır.

Bu çalışmada 12 *Astragalus* türüne ISSR ve IRAP moleküler markırları kullanılarak genetik çeşitlilik moleküler düzeyde belirlenmiştir. 6 IRAP primeri *Astragalus* L.'nin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda toplam 5 IRAP primerinin *Astragalus* L.'de çalıştığı belirlenmiştir. Bu primerler 3LTR-5, 5LTR1, LTR 6150, NIKITA E2647-, SUKKULA primerlerdir. 12 *Astragalus* türünden izole edilen DNA ile 5 IRAP primeri kullanılarak PCR reaksiyonu yapılmıştır. Amplifikasyonu yapılan DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi yardımıyla görüntülenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre IRAP primerleri ile polimorfizm %90 hesaplanmıştır. Çalışılan türlerde yapılan genetik benzerlik indeksine (Jaccard 1908) göre UPGMA yöntemi kullanılarak oluşturulan dendrogram sonuçları doğrultusunda *A. xylobasis* ile *A. eriocephalus* subsp. *eriocephalus* birbirlerine en yakın türler olurken (0.097), *A. eriocephalus* subsp. *eriocephalus* ile *A. kurdicus* birbirine en uzak türler (0.978) olmuştur.

Bir diğer yöntem olan ISSR'de ise toplamda 25 primer *Astragalus* L.'nin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla test edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda toplamda

16 ISSR primerinin *Astragalus* L.'de çalıştığı gözlemlenmiştir. Bu primerler UBC868, UBC817, UBC807, UBC812, UBC816, UBC825, UBC824, UBC830, UBC836, UBC840, UBC848, UBC855, UBS856, UBC841, UBC842, UBC61 primerleridir. 12 *Astragalus* L. türünde 16 ISSR primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ISSR primerleri ile polimorfizm %90,8 hesaplanmıştır. Çalışılan türlerde yapılan genetik benzerlik indeksine (Jaccard 1908) göre UPGMA yöntemi kullanılarak oluşturulan dendrogram sonuçları doğrultusunda *A. xylobasis* ile *A. eriocephalus* subsp. *eriocephalus* birbirlerine en yakın türler olurken (0.103), *A. xylobasis* ile *A. compactus* birbirlerine en uzak türler (0.952) olmuştur.

Yapılan çalışmanın bulgularına bakıldığında daha önce yapılan bazı çalışmalara paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Anand, vd. (2010) tarafından Hindistanın Himalaya bölgesinde toplanan *Astragalus rhizanthus* kompleksinin yakından ilişkili dört türüne (*A. rhizanthus*, *A. candolleanus*, *A. malacophyllus* ve *A. pindreensis*) ait kırk katılım, tür içi ve türler arası ilişki RAPD, ISSR ve DAMD moleküler markır teknikleri ile türler arasındaki genetik çeşitliliği incelemiştir. Çalışmada 18 RAPD, 15 ISSR ve 6 DAMD primeri kullanılmış olup, RAPD için toplam 449 bant, ISSR'den 326 bant ve DAMD'den 179 bant elde etmişlerdir. RAPD bantlarının yaklaşık %98,44'ünü, ISSR'nin %99,38'ini ve DAMD bantlarının %98,32'sini polimorfik olarak tespit etmişlerdir. Elde edilen veriler dört türün hepsinin farklı olduğunu göstermiştir. En yüksek derecede genetik benzerlik *A. rhizanthus* içinde gözlenmiş, bunu *A. malacophyllus*, *A. candolleanus* ve *A. pindreensis* izlemiştir. Yaptıkları çalışma ile bu belirteçlerin tür içi ve türler arasındaki genetik çeşitliliği analiz etmenin yanı sıra yakın akraba türleri ayırt etme yeteneğine sahip olduğunu kanıtlamışlardır.

Başka bir çalışmada Selyutina vd. (2016) tarafından Baykal Gölü bölgesine özgü nadir bir tür olan *Astragalus sericeocanus*'un altı popülasyonunda genetik çeşitlilik ve popülasyonun genetik yapısını değerlendirilmek amacı ile ISSR belirteçleri kullanmışlardır. Kullanılan 6 primerden 91 bant gözlemlenmiş bu bantların % 87,9'u polimorfik olmuştur. Mantel (Nathan Mantel)'in testi ile *A. Sericeocanus* popülasyonları arasında genetik uzaklık ile coğrafi uzaklık arasında anlamlı bir ilişki görmüşlerdir. *A. sericeocanus* için gözlenen düşük genetik çeşitlilik, esas olarak insan

aktivitesinin neden olduğu habitat bozulmasına bağlamışlardır. *A. sericeocanus'u* genetik çeşitlilik kaybına karşı korumak için etkili önlemler almaya acil ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır.

Diğer bir çalışmada Chaudhary vd. (2007) tarafından Hindistan'daki Himalaya'dan tanımlanmış, yeni bir tür olan *Astragalus himachalensis* taksonun örneklerinin gerçekten yeni bir *Astragalus* türünü temsil edip etmediğini değerlendirmek için, yeni türlerin katılımlarını RAPD ve DAMD yöntemlerini kullanarak yakın müttefik tür *A. himalayanus* ile analiz edip karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında, *Astragalus* türleri arasındaki moleküler ayrımı anlamak için 6 RAPD ve 4 DAMD primeri kullanmışlardır. 6 RAPD primerinden toplam 103 polimorfik bant, 4 DAMD primerinden toplam 76 polimorfik bant elde etmişlerdir. RAPD ve DAMD yöntemleriyle elde ettikleri veriler ile morfolojik parametreleri desteklemiş ve yeni bir tür olduğunu doğrulamışlardır.

Başka bir çalışmada Jie vd. (2019), *Astragalus membranaceus'un* 8 popülasyonu arasındaki genetik ilişkiyi analiz etmek için ISSR yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada 14 ISSR primeri kullanılmış, toplamda 118 polimorfik bant elde etmişlerdir. UPGMA kümelemesinin sonuçlarına göre 2 grup oluşturmuşlardır. İç Moğolistan'ın Xinghe İlçesi ve Hunyuan ülkesinin Guaner İlçesi, Shanxi Eyaleti'nin sırasıyla bir sınıfa ait olduğunu, çalışılan diğer popülasyonların ise diğer grupta olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada *A. membranaceus'* un genetik çeşitliliğini belirlemede ISSR yönteminin uygun olduğunu göstermişlerdir.

Rogenski vd. (2009), *Astragalus crassicaupus'un* Missouri'deki popülasyonlarını Illinois'deki nesli tükenmekte olan küçük popülasyonlarla karşılaştırmak için ISSR belirteçlerini kullanmışlardır. Illinois popülasyonlarının Missouri popülasyonlarından daha düşük bir genetik çeşitlilik değerine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Sonuç olarak yapılan literatür araştırmasında, Erzincan ve çevresinde *Astragalus* türleri ile ilgili detaylı bir çalışma gözlenmemiştir. Bu çalışma ile bölgedeki *Astragalus* türleri arasındaki genetik çeşitlilik ISSR ve IRAP moleküler teknikleri kullanılarak detaylı bir şekilde araştırılmış ve bu yöntemlerin *Astragalus* türleri üzerinde genetik çeşitlilik belirlemede ideal yöntemler olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Ghani, M. M., El-Sayed, A. S., Moubarak, A., Rashad, R., Nosier, H., & Khattab, A. (2021). Biosystematic study on some Egyptian species of *Astragalus* L.(fabaceae). *Agriculture*, 11(2), 125.
- Agar, G., Adiguzel, A., Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., & Sengul, M. (2010). Phenotypic and genotypic diversity among *Astragalus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*, 39(1), 1-7.
- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A., & Cregan, P. B. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132(4), 1131-1139.
- Alexander, J. A., Liston, A., & Popovich, S. J. (2004). Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 91(12), 2004-2012.
- Alici, E. *Türkiyede yayılış gösteren bazı taksonların tohum morfolojileri* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Anand, K. K., Srivastava, R. K., Chaudhary, L. B., & Singh, A. K. (2010). Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabaceae) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. *Taiwania*, 55(3), 197-207.
- Anonim, 2019a. *Astragalus*. http://www.turkastragalus.8m.net/C_Tar.htm (Erişim Tarihi: 16.01.2019).
- Anonim. 2013. *Bizimbitkiler* (2013). , [er. tar.: 26 04 2019].
- Ashry, N. A. (2013). Bitki biyoçeşitliliği ve biyoteknoloji. In *From Plant Genomics to Plant Biotechnology (Bitki Genomikinden Bitki Biyoteknolojisine)* (s. 205-222). Woodhead Yayıncılık.
- Atasagun, B., Aksoy, A., & Gürçan, K. (2018). Genetic diversity in *Astragalus argaeus*, a critically endangered species from Turkey. *Biologia*, 73(10), 927-936.
- Avunduk, S., Mitaine-Offer, A. C., Alankuş-Çalışkan, Ö., Miyamoto, T., Senol, S. G., & Lacaille-Dubois, M. A. (2008). Triterpene glycosides from the roots of *Astragalus flavescens*. *Journal of Natural products*, 71(1), 141-145.
- Aytaç, Z. 2000. *Astragalus* L. – In: Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (suppl. 2), Cilt 11: 79-88. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Aytaç, Z. and Ekici, M. 2012. *Astragalus*. In: Güner, A. et al. (Eds), *Türkiye bitkileri listesi (Damarlı Bitkiler)*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları, 427- 456.

- Aytaç, Z., Ekici, M. ve Akan, H. 2012. Astragalus L.- In: Guner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babac, M.T. 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gokyigit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, pp. 427 – 456.
- Azani, N., Bruneau, A., Wojciechowski, M. F., & Zarre, S. (2017). Molecular phylogenetics of annual Astragalus (Fabaceae) and its systematic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 184(3), 347-365.
- Bagheri, A., Abbasi, S., Mahmoodi, M., Roofgar, A. A., & Blattner, F. R. (2020). Genetic structure and conservation status of Astragalus subrecognitus (Fabaceae): a very rare and narrow endemic species. *Plant Ecology and Evolution*, 153(1), 101-107.
- Barneby, R. C. (1964). Atlas of North American Astragalus. *Mem NY Bot Gard*, 13, 1-1188.
- Başbağ, M., Çağan, E., Sayar, M. S., ve Karan, H. (2017). Some shrub and tree taxa in the grassland-pasture and natural vegetation of Turkey. *Middle East Journal of Science*, 3(2), 115-128.
- Beckmann, J. S., & Soller, M. (1983). Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*, 67(1), 35-43.
- Bedir, E., Calis, I., & Khan, I. A. (2000). Macrophyllosaponin E: a novel compound from the roots of Astragalus oleifolius. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 48(7), 1081-1083.
- Berkes, F., & Kence, A. (1987). Fishermen and the Prisoner's Dilemma Game: Conditions for the Evolution of Cooperation Among Users of Common Property Resources. *METU Journal of Pure and Applied Sciences*, 20, 209-27.
- Bizim bitkiler. "Damarlı Bitkiler", Bizimbitkiler.org.tr, 06.08.2022.
- Bretting, P. K., & Widrlechner, M. P. (1995). Genetic markers and horticultural germplasm management. *HortScience*, 30(7), 1349-1356.
- Chamberlain, D. F., & Matthews, V. (1970). Astragalus L. *Flora of Turkey and the East Aegean islands*, 3, 49-254.
- Chaudhary, L. B., Rana, T. S., Narzary, D., & Verma, S. (2007). A new species of Astragalus L.(Leguminosae) from India based on morphological and molecular markers. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154(1), 27-34.
- Chen, Z., Liu, L., Gao, C., Chen, W., Vong, C. T., Yao, P., ... & Wang, Y. (2020). Astragali Radix (Huangqi): a promising edible immunomodulatory herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 258, 112895.

- Choudhary, M. I., Jan, S., Abbaskhan, A., & Musharraf, S. G. (2008). Samreen, SA Sattar, Atta-ur-Rahman. *J. Nat. Prod*, 71, 1557.
- Davis, P.H., Tan, K. ve Mill, R.R. 1988. ***Flora of Turkey and the East Aegean Islands*** (suppl. 1). Vol.10, Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
- Ekici, M. (2010). *Astragalus* L. *Fabaceae*) cinsinin *Hypoglotidei* DC., *Incarni* DC. ve *Dissitiflori* DC. seksiyonlarında yer alan tükenmiş (EX) ve yetersiz veri (DD) basamağında bulunan taksonlar ile ilgili veriler. ***Sakarya Üni. Fen Edebiyat Dergisi***, 1, 31-42.
- Fırat M., 2005. "Contributions To The Check-List Of *Astragalus* Species in Van, Turkey ", International Symposium 7 th Plant Life of South West Asia, Eskişehir, Türkiye, 25 Haziran 2005 - 29 Haziran 2007, pp.65-65
- Ghahreman, A., Maassoumi, A. A., & Ghahremani-nejad, F. (2002). *Astragalus tuyehensis* (Fabaceae), a new species from Iran. ***Novon***, 47-49.
- Gomes, C. M., Gottlieb, O. R., Bettolo, G. B. M., Delle Monache, F., & Polhill, R. M. (1981). Systematic significance of flavonoids in *Derris* and *Lonchocarpus*. ***Biochemical Systematics and Ecology***, 9(2-3), 129-147.
- Gong, A. G., Duan, R., Wang, H. Y., Kong, X. P., Dong, T. T., Tsim, K. W., & Chan, K. (2018). Evaluation of the pharmaceutical properties and value of *Astragali Radix*. ***Medicines***, 5(2), 46.
- Gong, W., Ma, L., Gong, P., Liu, X., Wang, Z., & Zhao, G. (2019). Development and application of EST–SSRs markers for analysis of genetic diversity in erect milkvetch (*Astragalus adsurgens* Pall.). ***Molecular biology reports***, 46(1), 1323-1326.
- Gui, S. Y., Wei, W., Wang, H., Wu, L., Sun, W. Y., Chen, W. B., & Wu, C. Y. (2006). Effects and mechanisms of crude astragalosides fraction on liver fibrosis in rats. ***Journal of Ethnopharmacology***, 103(2), 154-159.
- Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., & Owen, J. L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. ***Theoretical and applied genetics***, 89(7), 998-1006.
- Gupta, P. K., & Varshney, R. K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. ***Euphytica***, 113(3), 163-185.
- Gülşen, O., & Mutlu, N. (2005). Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. ***Alatarım***, 4(2), 27-37.
- Güner, A., & Aslan, S. (Eds.). (2012). ***Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler)***. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları.

- Jie, C. U. I., Dandan, W. A. N. G., Qianyu, W. A. N. G., Tongyao, C. H. E. N., Fusheng, Z. H. A. N. G., & Xuemei, Q. I. N. (2019). ISSR system optimization and genetic diversity analysis of *Astragalus membranaceus* produced in Shanxi and Inner Mongolia. *Natural Product Research and Development*, 31(11), 1941.
- Kadioğlu, B., Kadioğlu, S., & Turan, Y. (2008). GEVENLERİN (*Astragalus* sp.) FARKLI KULLANIM ALANLARI VE ÖNEMİ. *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 14(1), 17-26.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., & Schulman, A. (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(5), 704-711.
- Kandemir, A., Sevindi, C., Korkmaz, M., & Çelikoğlu, Ş. (2015). Erzincan Türkiye'a özgü endemik bitki taksonlarının IUCN tehdit kategorileri. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 2(1), 43-65.
- Kazempour Osaloo, S. H., Maassoumi, A. A., & Murakami, N. (2005). Molecular systematics of the Old World *Astragalus* (Fabaceae) as inferred from nrDNA ITS sequence data. *Brittonia*, 57(4), 367-381.
- Kesawat, M. S., & Das Kumar, B. (2009). Molecular markers: it's application in crop improvement. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12(4), 169-181.
- Korchagina, O. S., Krivenko, D. A., & Belyaev, A. Y. (2022). Genetic Diversity of Four Species of the Genus *Astragalus* L. Section *Cenantrum* Bunge (Fabaceae) in the Asian Part of Russia according to the Data of trnL-trnF Chloroplast DNA Variability and Isozyme Markers. *Russian Journal of Genetics*, 58(1), 27-35.
- Korkmaz, M., ve Karacan, S. (2015). Erzincan'ndaki bazı erozyonlu alanlar ve bu alanların dominant bitki türleri. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 8(2), 12-23.
- Korkmaz, Y., ve Çölgeçen, H. (2013). Bitki doku kültürü çalışmalarında somaklonal varyasyon. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 74-78.
- Kumar, N. S., & Gurusubramanian, G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci Vis*, 11(3), 116-124.
- Lai, X., Xia, W., Wei, J., & Ding, X. (2017). Therapeutic effect of *Astragalus* polysaccharides on hepatocellular carcinoma H22-bearing mice. *Dose-response*, 15(1), 1559325816685182.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., & Lock, M. (2005). Legumes of the world. Royal botanic gardens. Kew, Surrey, UK.
- Li, G., & Quiros, C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping

- and gene tagging in Brassica. *Theoretical and applied genetics*, 103(2), 455-461.
- Li, X., Qu, L., Dong, Y., Han, L., Liu, E., Fang, S., ... & Wang, T. (2014). A review of recent research progress on the astragalus genus. *Molecules*, 19(11), 18850-18880.
- Lin, Z. X., He, D., Zhang, X. L., Nie, Y., Guo, X., Feng, C., & Stewart, J. M. (2005). Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD. *Plant breeding*, 124(2), 180-187.
- Mehrnia, M., Zarre, S., & Sokhan-Sanj, A. (2005). Intra-and inter-specific relationships within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. *Biochemical systematics and ecology*, 33(2), 149-158.
- Metin, H. (2018). *Astragalus victoriae* ve *Astragalus melanophrurius* (Fabaceae) türlerinin morfolojisi, ekolojisi ve anatomisi (**Master's thesis, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**).
- Mueller, U. G., & Wolfenbarger, L. L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in ecology & evolution*, 14(10), 389-394.
- Nandani, K., & Thakur, S. K. (2014). Randomly amplified polymorphic DNA-a brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9(1), 6-13.
- Nimmakayala, P., Tomason, Y. R., Jeong, J., Ponniah, S. K., Karunathilake, A., Levi, A., ... & Reddy, U. K. (2010). Genetic reticulation and interrelationships among *Citrullus* species as revealed by joint analysis of shared AFLPs and species-specific SSR alleles. *Plant Genetic Resources*, 8(1), 16-25.
- Noroozisharaf, A., Hatamzadeh, A., Lahiji, H. S., & Bakhshi, D. (2015). Genetic diversity of endangered primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) accessions from Iran revealed by ISSR and IRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 190, 173-178.
- Osaloo, S. K., Maassoumi, A. A., & Murakami, N. (2003). Molecular systematics of the genus *Astragalus* L.(Fabaceae): phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers and chloroplast gene *ndhF* sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 242(1), 1-32.
- Paran, I., & Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and applied genetics*, 85(8), 985-993.
- Podlech, D. (1986). Taxonomic and phytogeographical problems in *Astragalus* of the Old World and South-West Asia. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences*, 89, 37-43.
- Podlech, D. (2001). Contributions to the knowledge of the genus *Astragalus* L.(Leguminosae) VII-X. *Sendtnera*, 7, 163-201.

- Podlech, D. (2013). Zarre Sh. A *taxonomic revision of the genus Astragalus L.(Leguminosae) in the Old World. Vienna, 1.*
- Podlech, D., & Zarre, S. (2013). with collaboration of Ekici, M., Maassoumi, AA & Sytin, A. A *taxonomic revision of the genus Astragalus L.(Leguminosae) in the Old World. Vienna: Natural History Museum, 1, 1.*
- Polhill, R. M. (1981). Papilionoideae. *Advances in Legume Systematics Part 1*, 191-208.
- Rahimmalek, M., Fazilati, M., Gharibi, S. H., & Vahabi, M. (2011). Evaluation of Genetic Variation of Yellow and White Astragals (*Astragalus* sp.) in Protected Regions of Isfahan Province Using ISSR Marker. *Isfahan University of Technology-Journal of Crop Production and Processing*, 1(1), 25-34.
- Ridout, C. J., Donini, P., Ridout, C. J., & Donini, P. (1999). Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant Science*, 4(2), 76-79.
- Rogenski, C., Smith, M., & Esselman, E. (2009). ISSR Marker Diversity of the Threatened *Astragalus crassicaulus* var. *trichocalyx* in Illinois Populations. *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, 102.
- Sayar, M. S., Han, Y., Basbag, M., Gul, İ., & Polat, T. (2015). Rangeland improvement and management studies in the Southeastern Anatolia Region of Turkey. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 52(1).
- Scherson, R. A., Vidal, R., & Sanderson, M. J. (2008). Phylogeny, biogeography, and rates of diversification of New World *Astragalus* (Leguminosae) with an emphasis on South American radiations. *American Journal of Botany*, 95(8), 1030-1039.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., & Leblebici, E. (2008). Tohumlu Bitkiler Sistematigi, Ege Üniversitesi Basımevi.
- Selyutina, I. Y. E., Konichenko, E. S., Dorogina, O. V., & Sandanov, D. V. (2016). Genetic diversity of the endangered endemic milkvetch *Astragalus sericeocanus* Gontsch., Fabaceae from the Lake Baikal region. *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, 163-169.
- Sharawy, S. M., & Badr, A. (2014). Relationships of *Astragalus* L. in section *Sesamei* based on morphological criteria and molecular markers. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 21(1), 1-12.
- Staub, J. E., Serquen, F. C., & Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, 31(5), 729-741.
- Sunkar, G. (2021). *Nohut geveni (Astragalus cicer L.) sentromerik DNA dizilerinin moleküler klonlanması* (Master's thesis, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü).

- Szabo, K., Pamfil, D., Bădărău, A. S., & Hârta, M. (2021). Assessment of Genetic Diversity and Population Structure of the Endangered *Astragalus exscapus* subsp. *transsilvanicus* through DNA-Based Molecular Markers. *Plants*, 10(12), 2732.
- Tanksley, S. D. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(1), 3-8.
- Travis, S. E., Maschinski, J., & Keim, P. (1996). An analysis of genetic variation in *Astragalus cremonophylax* var. *cremonophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology*, 5(6), 735-745.
- Tübives, 194.27.225.161, 06.08.2022.
- Tünbel, N. (1993). *Bazı Astragalus (Fabaceae) Türleri Üzerinde Morfolojik, Anatomik ve Karyolojik Bir Araştırma* (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 8-57).
- Türsab, (2002). "Türkiye Seyahat Acentaları Birliği Botanik Semineri". http://www.tursab.org.tr/dosya/1021/02mtflora2_1021_1811.pdf Erişim Tarihi: 21.07.2022
- Vicente, M. J., Segura, F., Aguado, M., Migliaro, D., Franco, J. A., & Martínez-Sánchez, J. J. (2011). Genetic diversity of *Astragalus nitidiflorus*, a critically endangered endemic of SE Spain, and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(3), 175-182.
- Vural, M. (2013). *Astragalus tigridis* Boiss. ve *Astragalus scabrifolius* Boiss. türlerinin (Fabaceae) taksonomik yönden incelenmesi/Investigation of the taxonomy of species *Astragalus tigridis* and *Astragalus scabrifolius*.
- Vural, M., Subaşı, Ü., Ayyıldız, G., & Samancı, İ. (2017). Ankara İli Er Geveni (*Astragalus bozakmanii*) Tür Koruma Eylem Planı. *Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü, IX. Bölge Müdürlüğü-Ankara Şube Müdürlüğü*.
- Walker, G. F., & Metcalf, A. E. (2008). Genetic variation in the endangered *Astragalus jaegerianus* (Fabaceae, Papilionoideae): a geographically restricted species. *Bulletin, Southern California Academy of Sciences*, 107(3), 158-177.
- Wang, Y., Chen, Y., Du, H., Yang, J., Ming, K., Song, M., & Liu, J. (2017). Comparison of the anti-duck hepatitis A virus activities of phosphorylated and sulfated *Astragalus* polysaccharides. *Experimental Biology and Medicine*, 242(3), 344-353.
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218.

- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Wojciechowski, M. F. (2005). *Astragalus* (Fabaceae): A molecular phylogenetic perspective. *Brittonia*, 57(4), 382-396.
- Xie, X., Hu, Y., Wang, L., Yang, J., Li, Y., & Peng, M. (2009). Genetic diversity in three morphological types of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao as revealed by inter simple. ***African Journal of Biotechnology***, 8(18).
- Yang, W., Kang, X., Yang, Q., Lin, Y., & Fang, M. (2013). Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. ***Journal of animal science and biotechnology***, 4(1), 1-6.
- Yıldırım, A., Kandemir, N. 2001. Genetik markörler ve analiz metodları. Bitki biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Ed: Özcan S, Gürel E, Babaoğlu M., Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Yılmaz, H., Karahan, F., Bulut, Z., Demircan, N., & Turgut, H. (2004). Kurak bölgelerde havza planlamasında bazı sekonder bitkilerin biyolojik onarım yönünden değerlendirilmesi.
- Yüzbaşıoğlu, G., Yılmaz, S., ve Gözükmızı, N. (2016). Houba retrotransposon-based molecular markers: a tool for variation analysis in rice. ***Turkish Journal of Agriculture and Forestry***, 40(3), 456-464.
- Zabeau, M. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European. *Patent Application* 924026 29. 7.
- Zhang, H., Jichen, C. H. E. N., & Xinjian, L. I. N. (2014). Genetic Variability of *Astragalus sinicus* L. Based on ISSR Markers. ***Agricultural Science & Technology***, 15(8).
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. ***Genomics***, 20(2), 176-183.