



**SSR MARKÖRLERİ KULLANARAK TÜRKİYE’NİN  
FARKLI YERLERİNDEN TOPLANAN  
YONCA (*Medicago sativa L*) POPULASYONLARI  
ARASINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

**Büşra Nur AKGÜL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU**

**2022**

**Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SSR MARKÖRLERİ KULLANARAK TÜRKİYE’NİN FARKLI  
YERLERİNDEN TOPLANAN YONCA (*Medicago sativa* L) POPULASYONLARI  
ARASINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

**Büşra Nur AKGÜL**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. İsmail BEZİRĞANOĞLU**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Erzurum**

**2022**

**Her hakkı saklıdır**

## **ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

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

23 / 06 / 2022

Büşra Nur AKGÜL

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# SSR MARKÖRLERİ KULLANARAK TÜRKİYE’NİN FARKLI YERLERİNDEN TOPLANAN YONCA (*Medicago sativa* L) POPULASYONLARI ARASINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Büşra Nur AKGÜL

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRĞANOĞLU

*Medicago sativa*, Baklagiller (Fabaceae) ailesine mensup çok yıllık, besin değeri yüksek yem bitkisidir. Yonca baklagil bitkileri içerisinde uzun ömürlü olması ve farklı çevresel koşullara karşı dayanıklı olması nedeniyle en çok tercih edilen türlerden biridir. Bu çalışmada yonca yetiştiriciliğinde büyük paya sahip olan Türkiye’nin farklı bölgelerinden toplanan yonca populasyonlarının genetik çeşitliliğinin SSR markörleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece ülkemiz açısından ekonomik önemi olan, bölgeye uygun yonca çeşitleri geliştirmeye yönelik ıslah programlarına katkıda bulunmak hedeflenmiştir. Tez çalışmamızda, Türkiye’nin farklı bölgelerinden toplanmış olan 72 yonca populasyonu kullanılmış ve basit dizi tekrarları (SSR) kullanılarak populasyonlar arasındaki genetik uzaklık belirlenmiştir. Farklı bölgelerden alınan tohumlar MS ortamına ekimi yapıp, fidelerden alınan genç yaprak örneklerinden CTAB metoduna göre DNA izolasyonu yapılmış ve seçilmiş SSR primerleri ile yapılmış PCR işlemleri sonucunda oluşan bantlarda populasyonların genetik çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerden elde edilen sonuçlar Türkiye’de yetiştirilen yerel yonca popülasyonlarının yerel kültürvarlar ve ticariler şeklinde 2 ana gruba ayrıldığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlar STRUCTURE, PCA ve filogenetik analizlerle doğrulanmıştır. Çeşitlilik analizleri neticesinde bu popülasyonlarda 0.28’lik heterozigotluk oranı elde edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan SSR markörlerinin ilgili genotipler için bilgi verici olduğu sonucuna da varılmıştır. Çalışma sonucunda Türkiye’nin farklı yerlerine ait yonca populasyonlarının sahip olduğu genetik çeşitlilik SSR markörleri ile ortaya konulmuştur.

**2022, 51 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Yonca, Genetik Çeşitlilik, SSR, CTAB, bitki ıslahı

## ABSTRACT

MS. Thesis

### DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY AMONG CLOVER POPULATIONS (*Medicago Sativa* L.) COLLECTED FROM DIFFERENT PARTS OF TURKEY USING SSR MARKÖRS

Büşra Nur AKGÜL

Erzurum Technical University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İsmail BEZİRĖANOGLU

*Medicago sativa* is a perennial forage plant with high nutritional value belonging to the Legumes (Fabaceae) family. Alfalfa is one of the most preferred species among leguminous plants due to its longevity and resistance to different environmental conditions. In this study, it was aimed to determine the genetic diversity of alfalfa populations collected from different regions of Turkey, which has a large share in alfalfa cultivation, by using SSR markörs. Thus, it is aimed to contribute to breeding programs for developing alfalfa varieties suitable for the region, which are economically important for our country. In our thesis study, 72 alfalfa populations collected from different regions of Turkey were used and genetic distance between populations was determined by using simple sequence repeats (SSR). Seeds taken from different regions were planted in MS medium, DNA isolation was made from young leaf samples taken from seedlings according to the CTAB method, and genetic diversity analyzes of populations were performed in the bands formed as a result of PCR processes with selected SSR primers. The results obtained from the analyzes showed that the local alfalfa populations grown in Turkey are divided into 2 main groups as local cultivars and commercial ones. The results obtained were confirmed by STRUCTURE, PCA and phylogenetic analysis. As a result of diversity analysis, a heterozygosity rate of 0.28 was obtained in these populations. In addition, it was concluded that the SSR markörs used in this study were informative for the relevant genotypes. As a result of the study, the genetic diversity of alfalfa populations belonging to different parts of Turkey was revealed by SSR markörs.

**2022, 51 Page**

**Keywords:** *Medicago sativa* L, genetic variation, SSR, CTAB, plant breeding

## TEŞEKKÜR

Çalışma süresince yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, beraber çalıőmaktan ve her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. İsmail BEZİRĖANOĖLU'na teőekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde çalıőmalarıma katkılar sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Doğan İLHAN' a ve Laboratuvar çalıőmalarım boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen laboratuvar çalışma arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olan, maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen aileme sabır ve anlayıőları için sonsuz teşekkür ederim.

**Büşra Nur AKĖİL**  
**Haziran 2022**

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	x
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Yonca ( <i>Medicago sativa</i> L.) ve Tarımı.....	1
1.2. Yonca ( <i>Medicago sativa</i> L.) Bilimsel Sınıflandırılması.....	3
1.3. Yonca ( <i>Medicago sativa</i> L.) Ekolojisi.....	5
1.3.1. İklim koşulları.....	5
1.3.2. Toprak koşulları.....	5
1.3.3. Su koşulları.....	5
1.3.4. Sıcaklık koşulları.....	6
1.4. Yonca ( <i>Medicago sativa</i> L.) Besin Değeri ve Faydaları.....	6
1.5. Yonca ( <i>Medicago Sativa</i> L.) Yerel Çeşitleri.....	7
1.6 Yonca ( <i>Medicago Sativa</i> L.) Genetiği ve Moleküler Çalışmalar.....	7
1.7. Moleküler Markörler.....	9
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	12
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	15
3.1. Bitkisel Materyaller.....	15
3.1.1. Bitkilesel materyallerin uygun ortam koşullarında yetiştirilmesi.....	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Moleküler markörler ve genotip karakterizasyonu.....	17
3.2.2. Bitkilerden DNA izolasyonu.....	17
3.2.3. DNA konsantrasyonun ölçülmesi ve saflığının belirlenmesi.....	19
3.2.4. SSR markörlerinin seçimi.....	20
3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR).....	20
3.2.6. Agaroz jel elektroforezi.....	23

3.2.7. Veri analizleri.....	24
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>26</b>
4.1. Jel Görüntüleri.....	26
4.2. Genetik Çeşitlilik Analizi.....	36
4.3. Populasyon Yapısı Analizi.....	38
4.4. Ana Komponent Analizi .....	40
4.5. Filogenetik Analizi.....	41
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>43</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>45</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler      Açıklama

%	Yüzde
µl	Mikrolitre
bp	Baz çifti
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
M	Molar
Mb	Megabaz
mg	Miligram
mL	Mililitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
°	Derece
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye
V	Volt

### Kısaltmalar      Açıklama

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
CTAB	Hekzadesil trimetil amonyum bromür
ddH <sub>2</sub> O	Ultra saf ve steril su
dH <sub>2</sub> O	Distile su
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	Etidyum Bromür
ISSR	Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
NaCl	Sodyum Klorür
NaClO	Sodyum Hipoklorit

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVP	Polivinil Prolidon
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSR	Basit Dizi Tekrarları
TAE	Tris-Asetat-Etilendiamin Tetraasetik Asit
Tris	Tris-hydroxymethyl aminomethane
UV	Ultraviyole



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 4.1.</b> Mtic 7 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72.....	26
<b>Şekil 4.2.</b> Mtic 14 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72.....	27
<b>Şekil 4.3.</b> Mtic 51 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72.....	27
<b>Şekil 4.4.</b> Mtic 64 primerin yonca genotiplerinde oluşturdukları SSR bant profilleri 43-72.....	28
<b>Şekil 4.5.</b> Mtic 210 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72.....	28
<b>Şekil 4.6.</b> Mtic 230 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-21.....	29
<b>Şekil 4.7.</b> Mtic 230 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 22-51.....	29
<b>Şekil 4.8.</b> Mtic 230 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 52-72.....	30
<b>Şekil 4.9</b> Mtic 237 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-13.....	30
<b>Şekil 4.10.</b> Mtic 237 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 14-43.....	31
<b>Şekil 4.11.</b> Mtic 237 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 44-72.....	31
<b>Şekil 4.12.</b> Mtic 238 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72.....	32
<b>Şekil 4.13.</b> Mtic 248 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-30.....	32
<b>Şekil 4.14.</b> Mtic 248 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 31-49.....	33
<b>Şekil 4.15.</b> Mtic 248 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 50-72.....	33

<b>Şekil 4.16.</b> Mtic 249 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 2-72 .....	34
<b>Şekil 4.17.</b> Mtic 471 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72 .....	34
<b>Şekil 4.18.</b> 72 yonca popülasyonuna ait SSR varyasyonu neticesinde kümelenme gösteren 2 ana popülasyon .....	41
<b>Şekil 4.19.</b> 72 yonca popülasyonunun 16 SSR primeri ile elde edilen genetik mesafeleri temelinde oluşturulan Neighbor-Joining dendrogramı (Nei et al. 1983).....	42



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Tüik verilerine göre 1990-2021 yılları arasında yonca yem bitkisinin üretim tablosu .....	3
<b>Çizelge 1.2.</b> Yoncannn bilimsel sınıflandırılma basamakları .....	4
<b>Çizelge 1.3.</b> Çeşitli üyeler arasında <i>Medicago sativa L.</i> cinsinin taksonomik ilişkisi. ....	4
<b>Çizelge 1.4.</b> Komplekse ait birimlerin morfolojik özellikleri.....	9
<b>Çizelge 3.1.</b> Bu çalışmada kullanılan yonca popülasyonlarına ait lokasyon bilgileri ....	15
<b>Çizelge 3.2.</b> Standart MS besiyeri için kullanılan kimyasallar ve miktarları .....	16
<b>Çizelge 3.3.</b> DNA İzolasyon işlemi için kullanılan kimyasallar ve miktarları .....	17
<b>Çizelge 3.4.</b> Hatların saflık oranı (260/280 nm) ve konsantrasyonu (ng/µl).....	19
<b>Çizelge 3.5.</b> Çalışmada kullanılan SSR markörler.....	20
<b>Çizelge 3.6.</b> 6 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar .....	21
<b>Çizelge 3.7.</b> 4 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar .....	21
<b>Çizelge 3.8.</b> 3 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar .....	21
<b>Çizelge 3.9.</b> 2 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar .....	22
<b>Çizelge 3.10.</b> 1 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar .....	22
<b>Çizelge 3.11.</b> 0,5 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar .....	22
<b>Çizelge 3.12</b> SSR-PCR döngüsü.....	23
<b>Çizelge 3.13.</b> Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları .....	23
<b>Çizelge 4.1</b> 72 farklı yerel yonca ( <i>Medicago sativa L.</i> ) popülasyonunun 16 SSR primerine dayanan minimum ve maksimum genetik çeşitlilik istatistikleri .....	37
<b>Çizelge 4.2.</b> Yonca popülasyonlarında kullanılan herbir SSR primeri için ortalama PIC değerleri, ortalama allel frekansları, monomorfik polimorfik bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri .....	37
<b>Çizelge 4.3.</b> 72 yonca popülasyonu için ad hoc prosedürü (Pritchard et al. 2000) neticesinde elde edilen K=2 değeri. ....	39
<b>Çizelge 4.4.</b> 72 yonca popülasyonu için Δk metodu (Evanno et al. 2005) neticesinde elde edilen K=2 değeri .....	39
<b>Çizelge 4.5.</b> 72 yonca popülasyonu 16 SSR markörü ile 2 ana popülasyon (K=2) şeklinde kümeleşti .....	40

### 1. GİRİŞ

#### 1.1. Yonca (*Medicago sativa* L.) ve Tarımı

*Medicago sativa*, uzun ve zengin bir geçmişe sahip, kültüre alınmış ilk yem bitkilerindendir. Çalışmalar bu bitkinin Türkiye coğrafyası kökenli olduğunu ifade etmektedir (Putnam et al. 2001). Yonca baklagiller (Fabaceae) ailesine mensup çok yıllık bir yem bitkisidir. Yeşil yem veya kuru ot olarak kullanım amacının yanı sıra mera ortamında hayvanların otlatılmasında da kullanılmaktadır. Yonca esas olarak büyükbaş hayvan yemidir. 1990-2021 yılları arasında yonca yem bitkisinin ekilen alan ve üretim değişimi Çizelge 1.1 de verilmiş olup bu veriler ışığında kuru ot olarak kullanımının önemi açıkça görülmektedir (TÜİK 2021). Buna ilaveten belirli dönemde üretimi yapılan yoncanın kanatlılar için önemli protein kaynağı olduğu bildirilmiştir (Soya et al. 2004). Yonca 350 cins ve 10.000 kadar türe sahip baklagiller familyasına ait bir türdür. Özellikle dünya üzerinde geniş alanlarda yetiştirilmektedir. Tohum amaçlı yetiştirildiğinde ekim koşulları değişmektedir. Bu koşullar sulanabilir olduğunda 40 cm, kurak koşullarda 60-90 cm sıralarda ekimi yapılmalı ve dekar başına 1-1,5 kg tohumluk kullanılmaktadır (Manga et al. 2003). Yonca hem biyotik hemde abiyotik olarak iki kısma ayrılan stres faktörlerine karşı dayanıklıdır. Yüksek verim kapasitesine sahip olduğundan sürdürülebilir tarım için en önemli yem bitkisi olarak düşünülmektedir (Altıntaş 2017). Yoncanın tohum verimi coğrafi bölgelere göre değişkenlik göstermektedir. Kıraç koşullarda dekar başına verim 10-30 kg arasında iken sulu koşullarda 30-100 kg arasında değişmektedir (Manga et al. 2003). Yoncanın tohum veriminin Doğu Anadolu Bölgesi'nde 20-50 kg/da arasında değiştiği bildirilmektedir (Açıkgöz 2001). Ayrıca yonca Doğu Anadolu Bölgesi'nde yem bitkisi ekim alanlarının % 57,5'sini oluşturmaktadır. Bu oran 6.564.217 dekara karşılık gelmektedir. Yonca ekimi Akdeniz ikliminin hâkim olduğu bölgelerde genellikle sonbaharda, diğer iklim koşullarında ise ilkbaharda yapılmalıdır. Ancak toprak sıcaklığı, nem gibi faktörler de tohum çıkışında etkili olmaktadır (Tıknazoğlu 2009).

Yonca bitkisi Dünya genelinde farklı coğrafik koşullar altında geniş adaptasyon kabiliyetine sahiptir (Demiroğlu Topçu 2015).

## 1. GİRİŞ

---

Yukarıda sıralanan özelliklerinin yanısıra yüksek verim, toprak erozyonunu önleme, azot yoluyla toprağın iyileştirilmesi gibi özelliklerinin oluşu yoncanın sürdürülebilir tarım sisteminin ana bileşeni olarak görülmesine neden olmaktadır (Huggins et al. 2001).

Yonca toprak verimini artırdığı için birçok kaynakta “Yem bitkilerinin kraliçesi” olarak adlandırılmaktadır (Elçi 2005).

Verimi etkileyen faktörler içerisinde yem bitkilerinin ana sap uzunluğu ve sap kalınlığı önemlidir. Yoncanın erken dönemlerinde ana sap ince ve yumuşak olmakta, bitki gelişimine bağlı olarak bu durum değişmektedir (Erol 2021)

Yoncada verimi etkileyen bir diğer husus dormansidir. Dormansi gelişmenin durdurulduğu doğal bir durumdur ve tüm yaşam formlarında meydana gelebilmektedir (Willis et al. 2014). Yonca bitkisinde bu durum kış döneminde gelişimini yavaşlatılarak diğer mevsimde daha iyi bir dayanım göstermesi durumudur. Bu davranışı gösteren yoncalar dormant bitki olarak adlandırılır. Kış dormansisi özelliğine bakılarak uygun ekimi yapılacak çeşit ile verim ve fayda artışı gerçekleştirilebilir (Özkan et al. 2015).

Bitki türlerinin devamlılığı için verimi etkileyen bir diğer faktör ise tozlaşma ve dölleme. Yonca da tozlaşma ve dölleme aşamaları yabancı çiçek tozları ile yapılır. Polen toplayan yabani arılar bu aşamada çok etkindir ki bu durum tohum verimliliğini de artırmaktadır. Bununla birlikte doğal tozlaşma koşulları yoncanın tozlaşması üzerinde çok etkili değildir. Çünkü yonca bitkisi balözü açısından zengin bitki değildir (Açıkgöz 2001).

## 1. GİRİŞ

**Çizelge 1.1.** Tük verilerine göre 1990-2021 yılları arasında yonca yem bitkisinin üretim tablosu.

YILLAR	Yonca - Alfalfa <sup>(5)</sup>		
	Ekilen alan Area sown (Dekar-Decare)	Üretim-Production (Ton-Tonnes)	
		Yeşil ot Green	Kuru ot Hay <sup>(4)</sup>
1990	1 974 390	1 848 825	1 105 819
1991	1 726 250	1 675 103	1 082 277
1992	1 955 430	1 658 646	1 226 501
1993	2 061 480	1 581 610	1 292 228
1994	1 948 010	1 570 439	1 292 772
1995	2 140 100	1 803 190	1 399 341
1996	2 290 510	1 935 087	1 444 466
1997	2 175 000	1 905 800	1 364 200
1998	2 300 000	1 750 000	1 550 000
1999	2 456 060	1 594 670	1 641 000
2000	2 508 000	1 807 000	1 540 000
2001	2 490 000	1 830 000	1 563 000
2002	2 600 000	1 900 000	1 700 000
2003	2 900 000	2 100 000	1 800 000
2004	3 200 000	2 300 000	2 000 000
2005	3 750 000	2 100 000	2 400 000
2006	4 440 296	1 814 990	2 820 225
2007	5 348 965	1 697 645	3 513 945
2008	5 557 215	1 843 961	3 907 403
2009	5 692 958	1 747 676	4 037 132
2010	5 688 107	11 676 115	-
2011	5 585 525	12 076 159	-
2012	6 741 832	11 536 328	-
2013	6 286 419	12 616 178	-
2014	6 923 055	13 432 968	-
2015	6 620 459	13 949 958	-
2016	6 501 107	15 714 381	-
2017	6 594 319	17 561 190	-
2018	6 351 052	17 544 946	-
2019	6 412 128	17 949 264	-
2020	6 628 887	19 290 519	-
2021	6 730 474	19 310 959	-

### 1.2. Yonca (*Medicago sativa L.*) Bilimsel Sınıflandırılması

Bitkiler de sınıflandırma Âlem, bölüm, sınıf, takım, familya, cins ve tür olmak üzere 7 şekilde yapılmaktadır. Tarla bitkileri, bitkiler âleminde "spermatophyta" olarak bilinen bölüme aittir. Bu terim tohumla çoğalan bitkiler olarak adlandırılmaktadır. Yonca bitkisi de bu bölüm içindeki angiospermae yani "kapalı tohumlular" alt bölümüne aittir. Kapalı tohumlular iki sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar magnoliopsida ve liliopsidadır. Buğdaygiller, tohumlarında tek kotiledon bulundururken, Baklagiller tohumlarında iki kotiledon bulunur. Bu şekilde birçok takım, alt familya, cins ve tür şeklinde gruplara ayrılmaktadırlar. Çizelge 1.2 de *Medicago sativa L.* nin sistematik yeri verilmiştir

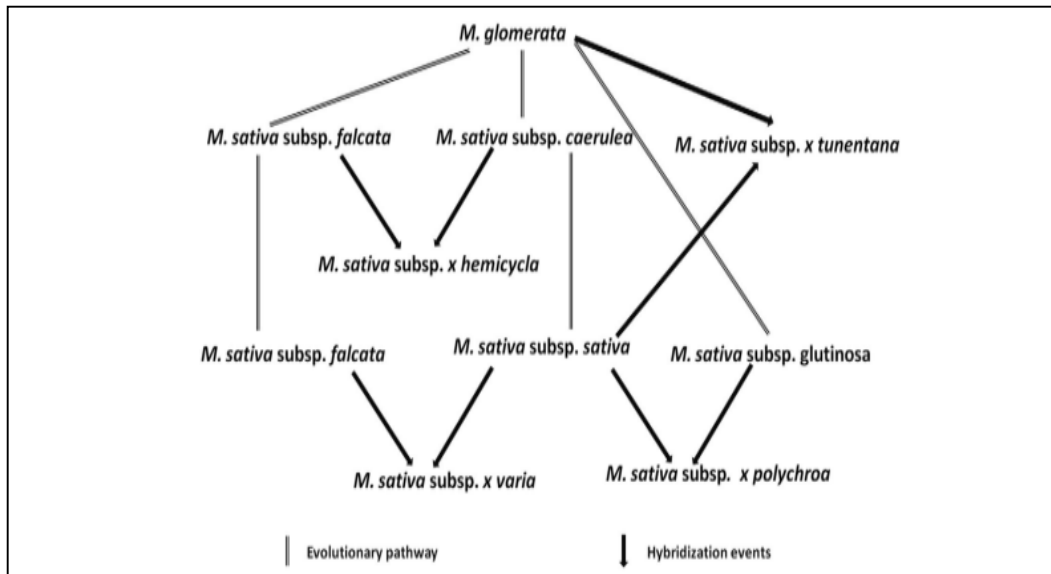
## 1. GİRİŞ

**Çizelge 1.2.** Yoncanın bilimsel sınıflandırılma basamakları (Schoch CL et al. 2020)

<p><b>Âlem: Bitkiler alemi (Plantae)</b></p> <p><b>Bölüm: Kapalı Tohumlular (Magnoliophyta)</b></p> <p><b>Sınıf: İki Çenekliler (Magnoliopsida)</b></p> <p><b>Takım: Fabales</b></p> <p><b>Familya: Fabaceae (Baklagiller)</b></p> <p><b>Alt Familya: Faboideae</b></p> <p><b>Cins: <i>Medicago</i></b></p> <p><b>Tür: <i>Medicago sativa</i> L.</b></p>
--

Çizelge 1. 3’de Çeşitli üyeler arasında *Medicago sativa* L. türünün taksonomik ilişkisi gösterilmiştir. Alt birimleri diploid ve tetraploidtir. Üyeler arasında diploit türleri; *M.sativa glomerata*, *M.sativa falcata*, *M.sativa caerulea* ve *M.sativa falcata*, *M.sativa caerulea* ‘nın melezlenmesi sonucu oluşan *M.sativa hemicycla*’dır. Kompleksin tetraploit türleri ise *M.sativa alt tür sativa* L., *M.sativa alt tür falcata* ve *M.sativa alt tür xvaria* ‘dır (Şakiroğlu and İlhan 2021).

**Çizelge 1.3.** Çeşitli üyeler arasında *Medicago sativa* L. cinsinin taksonomik ilişkisi (Şakiroğlu and İlhan 2021).



### 1.3. Yonca (*Medicago sativa* L.) Ekolojisi

#### 1.3.1. İklim koşulları

Yonca karasal iklim kuşağından ılıman iklim kuşağına kadar hemen hemen tüm iklim koşullarında yetişebilmektedir. Derin kök sistemine sahip olduğundan dış etmenlere karşı dayanıklıdır. Ancak yoncanın soğuğa dayanıklılığı çeşitlere göre değişmektedir. Yonca için en uygun yetişme ortamı, yazları sıcak ve kurak olan, toprak neminin yeterince bulunduğu ortam koşullarıdır (Orak ve Gökkaya 2014).

#### 1.3.2. Toprak koşulları

Yonca için toprak koşulları iklim koşulları gibi özel şartlar gerektirmemekle beraber bitki yetiştiriciliği için uygun, ince bünyeli, az kumlu aynı zamanda yeteri miktarda kireç içeren topraklarda daha iyi gelişim göstermektedir. Özellikle derin, aşırı tuzlu ve asidik olmayan topraklarda yetiştiriciliği yapılır. Yonca tarımı için pH sı 6,5'tan az olmayan topraklar tercih edilmektedir. Yapılan bir araştırmada yoncada kuru ot veriminin PH oranına göre değiştiği özellikle pH = 7,5 olan ortamın pH değeri 5,3 olan ortama göre verimi 2,5 kat arttırdığı rapor edilmiştir (Orak ve Gökkaya 2014).

#### 1.3.3. Su koşulları

Yonca derin kök sistemine sahip olması nedeniyle kuraklığa dayanıklılığı yüksektir fakat su miktarının fazla olduğu şartlarda da verimi artan bir bitkidir. Yağışın yıllık 350-450 mm olduğu koşullarda yılda birden fazla biçim olacak şekilde, yağışın 2500 mm olduğu ortam koşullarda ise sulama gerçekleştirilmeden yetiştirilebileceği bildirilmiştir (Gökalp vd 2017; Tan 2018; Keskin vd 2020). Yoncanın 1 kg kuru ot elde edebilmek için ortalama 800 kg su kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Bu nedenle yoncanın vejetasyon döneminde yağışın az olduğu bölgelerde özellikle sulama yapılması gerekmektedir (Gençkan vd 1992).

### 1.3.4. Sıcaklık koşulları

Yonca seçici olmayan bir bitkidir ve hemen hemen her çeşit toprakta yetişmekte ve farklı ortam şartlarına kolaylıkla adapte olabilmektedir. İklim koşulları açısından birbirinden oldukça farklı olan Erzurum ve Adana gibi illerimizde yetiştiriciliği mümkün olabilmektedir. Bununla birlikte sıcaklığın aşırı düşük ya da yüksek olduğu durumlarda verim etkilenmektedir. Yazların sıcak ve kurak olduğu, toprak nemi uygun ve toprağın sulanabilir olduğu şartlarda ise yetişmektedir (Orak ve Gökkaya 2014). Yoncanın yetiştiği en ideal sıcaklık 25-26 °C arasındadır (Gökalp vd 2017).

### 1.4. Yonca (*Medicago sativa* L.) Besin Değeri ve Faydaları

*Medicago Sativa* L. çok uzun yıllardan beri üstün özellikleri, kolay adaptasyon koşulları ve besin değeri ile hem dünyada hem de ülkemizde yaygın olarak tarımı yapılan baklagil yem bitkilerinden biridir (Kaya 2018). Yem bitkileri özellikle hayvanların günlük ihtiyaç duydukları proteinin karşılanmasında önemli yer tutar. Dünya nüfusundaki artışa paralel olarak insan ve hayvan beslenmesinde baklagillerin önemi de artmaktadır (Kaçar vd 2005).

Yonca'nın ham protein içeriği belirli dönemlerinde farklılık göstermektedir. Bitkinin genç döneminden olgunlaşmanın ileri dönemlerine kadar yonca'nın %9,9 ile %23,3 oranında ham protein içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir (Açıkgöz 1995).

Ham protein içeriğinin yüksek oluşu, kaliteli yem kullanılması hayvanlarda verimin iyileşmesine katkı sağlar. Aynı zamanda beslenmeye bağlı birçok hastalığın önlenmesine önemli katkı sağlar (Alçıçek vd 1999, 2002).

Diğer yem bitkileri ile kıyaslandığında ninyoncanın besin değeri oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Yonca vitamin içeriği bakımından da zengin olup A vitamini, D vitamini, E vitamini, K vitamini, C vitamini, B1 vitamini, B2 vitamini, B3 vitamini, B5 vitamini, B7 vitamini ve B9 vitaminleri gibi en az 10 farklı vitamin çeşidi içerdiği bilinmektedir. Ayrıca karoten (provitamin A), tokoferol (E vitamini), K vitamini,

## 1. GİRİŞ

---

ksantofil (Xanthophyll) bakımından zengindir. (Bauchan and Greene 2002; Soya et al. 2004).

### 1.5. Yonca (*Medicago Sativa* L.) Yerel Çeşitleri

Ülkemizde yonca tarımı yapılırken genellikle yerel populasyonlar kullanılmaktadır. Tarımı yapılan yonca varyeteleri adi yonca, melez yonca ve peru olmak üzere 3 grupta incelenmektedir (Açıkgöz 1995).

Yonca üzerine devlet kuruluşlarınca geliştirilen ilk 2 çeşit 1964 yılında geliştirilmiş ve üretim izni alınmıştır. Bunlar Sazova-Kır yoncası (L-1576) ve Kayseri yoncası olarak bilinmektedir. 'Bilensoy-80' çeşidi ise Ankara Çayır Mera ve Zootekni Araştırma Enstitüsü tarafından üretim izni alınan ve 1984 yılında tescil edilmiş yonca çeşididir. Yine 1983 yılında 'Elçi yoncası' ve 'Yeşim' olarak adlandırılan 2 yonca çeşidine üretim izni verilmiştir. Bunların yanısıra, özel sektör tarafından geliştirilen 'Sünter' çeşidi mevcuttur. Bu çeşidin tescili 1984 yılında yapılmış olup bu çeşitlere ilave 'Baron' ve 'Granada' çeşitlerine de üretim izni verilmiştir (Ürem 1985).

### 1.6. Yonca (*Medicago Sativa* L.) Genetiği ve Moleküler Çalışmalar

Baklagiller içerisinde *Medicago* cinsi önemli yer tutmaktadır (İlhan 2016). Hem yem bitkisi olarak kullanılıp hem yaygın ekim alanına sahiptir. *M. sativa* L. ile *M. truncatula* genomik açıdan benzerdir. Bunların yanı sıra *Medicago* cinsini kıymetli kılan bir diğer unsur *Medicago truncatula* cinsinin model organizma olarak sekanslanıp ayrıca metagenom çalışmalarında önemli kaynak olarak kullanılmasıdır. *Medicago truncatula* özellikle bakterilerle oluşturduğu simbiyotik yaşamın moleküler temellerinin anlaşılması için model olarak kullanılmaktadır. Genel anlamda gen fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için *Medicago truncatula* üzerine oldukça nitelikli çalışmalar bulunmaktadır (Barker et al. 1990; Starker et al. 2006).

Bu çalışmaların başarılı ve nitelikli oluşunun sebepleri arasında;

## 1. GİRİŞ

---

1. Bitki genomunun küçük oluşu
2. Transformasyonun kolayca gerçekleştirilebilmesi
3. Tekrarlı dizilerin ve duplikasyonların az olması sayılabilir (Barker et al. 1990; Nam et al. 1999; Cook 1999) .

Yonca bitkisinin *Medicago sativa* tür kompleksi ya da *Medicago sativa-falcata* kompleksi olarak adlandırılan taksonomik bir grup içerisinde yer aldığı ve zamanla ıslah çalışmaları neticesinde diploit ve tetraploit alt birimlerden oluştuğu belirlenmiştir. Bu alt birimler statü olarak bu kompleks içerisinde teşhis edilmeye çalışılmış ve en son bunların alttür oldukları sonucuna varılmıştır (İlhan et al. 2016). Gen kaynakları açısından önemli olan bu kompleks üyelerinin sistematik birimlerinin açıklanması, karakterizasyonu, genetik kaynakların depolanması ve korunması açısından önemlidir (Bauchan et al. 2002). Kompleksin alttürleri ploidi evrimi araştırmalarında model organizma olarak önerilmiş olup çalışmaları devam etmektedir (Havananda et al. 2010, 2019). Kompleks içindeki sistematik ayrışmada birimlerin morfolojik özelliklerine de bakılır. Bu amaçla 2 temel karaktere odaklanılmıştır. Bunlar çiçek rengi ve meyve şeklidir. Kompleksin morfolojik karakterleri sadece birkaç gen ile kontrol edildiği için sınıflandırmanın geçerliliğinde moleküler metodlar ve markerlar kullanılmıştır (İlhan et al. 2016).

Kompleksin diploit türleri; *M.sativa glomerata*, *M.sativa falcata*, *M.sativa caerulea* ve *M.sativa falcata*, *M.sativa caerulea*'nın melezlenmesi sonucu oluşan *M.sativa hemicycla*'dır. Kompleksin tetraploit türleri ise *M.sativa alt tür sativa* L., *M.sativa alt tür falcata* ve *M.sativa alt tür xvaria*'dır. *M.sativa alt tür sativa* L., *M.sativa alt tür falcata*'nın melezlenmesi sonucu *M.sativa alt tür xaria* oluşmaktadır.

*M.sativa falcata* 'dan, *M.sativa alt tür falcata* 'ya ve *M. sativa caerulea* 'dan *M.sativa alt tür sativa* L.'ye gen akışının olduğu açıklanmaktadır (İlhan 2016).

Bitki morfolojisinde tohum şekli ve büyüklüğü, çiçek rengi ve polen yapısı gibi karakterlere bakılırken *Medicago sativa* Tür kompleksi için çiçek rengi, ploidi düzeyi ve

## 1. GİRİŞ

tohum şekli olmak üzere 3 karaktere odaklanılır. Yonca üyelerinde sarı, ebruli, mor menekşe olmak üzere 3 ayrı çiçek rengi görülür. Meyve şeklinde ise orak ve kıvrımlı olmak üzere 2 morfolojik karaktere dikkat edilir (Quirus and Bauchan 1988).

Morfolojik çalışmalar, tüm genomun temsilinde ve farklı alt türleri ayırmada çiçek rengi ve meyve kıvrım sayısının birkaç gen ile kontrol edildiği için yeterli olmadığını göstermiştir. Bunun yanı sıra birimler arası yoğun melezleşmeler morfolojik özelliklerin kullanışlı oluşunu olumsuz etkilemektedir (Barnes 1972; Small and Brookes 1984; Şakiroğlu 2010, 2012). Bu nedenle DNA belirteçlerine ihtiyaç duyulmaktadır. *M.sativa*'nın alt türlerini ayırmak için kimyasal elementlerin miktar analizi yapılmıştır. Ancak element düzeyinde farklılaşma tespit edilse bile morfolojik özellikler kadar güvenilir olduğu düşünülmemiştir (Small and Brookes 1984, Small 2011). Hem içerdiği bilgi hem de ploidi düzeyi tespit açısından DNA belirteçleri kompleksin sistematğinde rutin hale gelmiştir. Sistematik konumlandırmanın tespitinde ise belirli dizi çalışmaları yapılmıştır. Moleküler markör teknolojileri bu noktada önem arz etmiştir (İlhan 2016).

**Çizelge 1.4.** Komplekse ait birimlerin morfolojik özellikleri (Şakiroğlu and İlhan 2021)

Taxa	Ploidy level	Flower color	Pod shape
<i>M. sativa</i> subsp. <i>caerulea</i>	Diploid	Purple	Coiled
<i>M. sativa</i> subsp. <i>falcata</i>	Diploid, tetraploid	Yellow	Falcate
<i>M. sativa</i> subsp. <i>x hemicycla</i>	Diploid	Variegated	Semi-coiled
<i>M. sativa</i> subsp. <i>glutinosa</i>	Diploid	Yellow	Coiled
<i>M. sativa</i> subsp. <i>sativa</i>	Tetraploid	Purple	Coiled
<i>M. sativa</i> subsp. <i>x varia</i>	Tetraploid	Variegated	Semi-coiled
<i>M. sativa</i> subsp. <i>glomerata</i>	Tetraploid	Yellow	Coiled

### 1.7. Moleküler Markörler

Genomda herhangi bir gen veya gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasına moleküler markör (DNA markörları) adı verilir. DNA markörlerinin özelliklerine bakıldığında; stabildirler, tüm dokularda ortaya çıkabilirler, ko-dominant ya da dominant özellikte olabilirler, kalıtımı basit ilkelere sahiptir ve çevre koşullardan etkilenmezler (Williams et al. 1990).

## 1. GİRİŞ

---

Moleküler markörler genetik çeşitliliğin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Staub et al. 1996). Bu yöntem temelde DNA molekülünde meydana gelen polimorfizmin tespit edilmesi esasına dayanır. Bu polimorfik bölgeler kaliteli genotip üretebilme yeteneğine sahip olmalarının yanı sıra genomda fazla miktarda bulunurlar ve maliyet gereksinimleri düşüktür (Semang et al. 2006). Moleküler markörler, bitki ıslah çalışmalarında kullanılabilecek en iyi araçlardan biridir. Çünkü biyokimyasal ve morfolojik markörlara göre daha güvenilirdir. Ayrıca lokuslar arası interaksiyon oluşturmayıp, bitki gelişim evrelerinde kolayca gözlemlenebilirler (Ovesna et al. 2002).

Moleküler markörler, genetik çeşitlilik analizlerinin yanı sıra Markör destekli seleksiyon (MAS) ile ıslah çalışmalarında, genetik haritalamada, QTL (Quantitative Trait Loci) analizlerinde, genetik akrabalıkların belirlenmesinde ve gen kaynaklarının karakterize edilmesinde sıklıkla kullanılırlar (Yorgancılar vd 2015). Moleküler markörler polimorfik davranış göstermeli, farklı genotipleri ayırt edebilmeli, bütün dokularda gözlemlenebilmeli, kodominant kalıtım göstermeli, genomda fazla miktarda bulunmalı ve düzgün dağılım göstermeli, seçici davranış göstermeli, uygulama maliyeti düşük olmalı, otomasyona uygun olmalı, kolay ve hızlı değerlendirilmeli, aynı genetik materyal üzerinde yapılan bir markör analizinde sonuçlar aynı olup güvenilir olmalıdır.

Moleküler markörler kullanım yöntemleri açısından Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı markörler (SSR, RAPD, AFLP, ISSR) ve Hibridizasyona Dayalı (RFLP) olarak 2 gruba ayrılır. Bu markörlerden RFLP tekniği radyoaktif madde kullanılması, zaman alıcı olup pahalı olması ve çok miktarda DNA ya ihtiyaç duymasından dolayı tercih edilmemektedir (Grover et al. 2015).

Son yıllarda DNA Dizi teknolojisinde kullanılan moleküler markörler arasında SSR ve SNP günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tekniklerin tercih edilme nedenleri arasında, düşük mutasyon düzeyine ve yüksek polimorfizme sahip olması ve genomda çok miktarda bulunması gösterilebilir (Duran et al. 2009).

Basit dizi tekrarları olarak da bilinen SSR'lar, DNA dizilerinde 1 ile 6 bp arasındaki tekrarlardır. çoğaltılmak istenen bölgenin bilgisi mevcutsa o bölgelere uygun primerler tasarlanarak (primerlerin uzunluğu genelde 20–25 bp uzunluğunda olmalıdır.)

## 1. GİRİŞ

---

PCR ile çoğaltımı yapıp, agaroz jel elektroforezi ile görüntülenebilmektedir (Matsuoka et al. 2002; İlhan et al. 2016).

SSR markörlerinin avantajları arasında yüksek oranda polimorfik olmaları (bu durum bitkilerde oldukça fazla bilgi elde etmeyi sağlar) kodominant markör vermesi ve PCR kolaylığına sahip olması gösterilebilir (Röder et al. 1995).



### 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Günümüze kadar genetik çeşitlilik üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar da daha çok çeşitliliği belirlemeye yönelik markör sistemli çalışmalar ve bitki ıslah çalışmaları üzerine odaklanılmıştır.

Parfitt et al. (1997) kloroplasttan izole ettikleri DNA'yı kullanarak 10 *Pistacia* türü arasında filogenetik sınıflandırma yapmışlardır. Çalışmada RFLP tekniğini kullanmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre, *P. mexicana* ile *P. texana* ve *Pistacia vera* ile *P. khinjuk* türleri arasında farklılık bulunmadığını belirterek aynı tür olabileceğini açıklamışlardır.

Hurtado et al. (2002) kayısında, *Goldrich* x *Valenciano* çaprazı ile elde edilmiş 81 bitki üzerinde, SSR, AFLP, RAPD ve RFLP markörleriyle genetik haritalama çalışması yapmışlardır.

Ahmad et al. (2005) tarafından kerman fıstık çeşidinin DNA'sının kullanıldığı bir diğer çalışmada, antep fıstığında SSR primeri geliştirmek amacıyla genomik kütüphane oluşturmuşlardır. Çalışmada CTT, CA, CT tekrarlarını kullanarak hazır klonlar elde etmişlerdir.

Li et al. (2008) şeftalide (*Prunus persica* L.) SSR yöntemiyle çalışmışlar yöntem sonuçlarına göre 51 şeftali çeşidinin evrimsel gelişimi ve şeftalide filogenetik ilişkiyi incelemişlerdir.

Touil et al. (2008) farklı yonca populasyonları arasındaki genetik çeşitliliği SSR markörler kullanarak araştırmıştır. Çalışmada kullanılan hatlar İtalya, Avusturya, Fas, Tunus ve Fransa'nın farklı bölgelerinden temin edilmiştir. Sonuç olarak SSR markör yönteminin genetik çeşitliliği belirlemede güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Mamadov et al. (2012) pirinçte, genetik analiz ve markör destekli ıslaha yönelik yaptıkları çalışmada DNA belirteci olarak SNP'lerin uygulanabilirliğini değerlendirmek

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

için Piz ve Piz-t pirinç direnç genleri içeren genomik bölgedeki sekans polimorfizminin analiz edilmesi ve PCR-bazlı SNP markörleri geliştirilmesini amaçlamıştır. Araştırmada, SNP'lerin Piz ve Piz-t'de (her 248 bp'de bir SNP ortalaması) fazla olduğu keşfedilmiştir. Yoğun SNP dağılımı, bu genlerin yakınında bulunan SNP markörlerinin geliştirilmesine yardımcı olmuştur. Pirinç genomundaki gelişmeler, birkaç genin ve QTL'yi kontrol eden agronomik açıdan önemli özelliklerin haritalanmasına ve klonlanmasına, MAS için SNP markörlerinin rutin kullanımına ve markör destekli ıslaha (MAB) izin vermiştir.

Lateef et al. (2015) tek bir nükleotid baz olarak moleküler markörlerin en basit ve en uygun formu olan SNP ler üzerine yaptıkları çalışma da SNP lerin hayvanlarda ve bitkilerde sıklıkla görüldüğünü, hedef bir gende polimorfizmleri bulma olasılığının, önceki markörlere göre çok büyük bir avantaj sağladığını bildirmişlerdir.

Öten ve Albayrak (2016) Antalya iline bağlı 13 ilçeden toplanan toplam 26 farklı yonca genotipleri üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmada SSR tekniği kullanılmış ve kullanılan primerler polimorfik bant vermiştir. Benzerlik kat sayılarındaki değişime göre genotiplerden bazıları uzak genetik benzerliğe sahipken bazı genotipler arasında yakın genetik benzerlik tespit edilmiştir. Gazipaşa-1 Alanya, Aksu-1, Aksu-2, Kepez-1, Döşemealtı-1, Kemer-1, Finike-1, Demre-1 ve Kaş-1 populasyonları da ıslah amaçlı kullanım için seçilmiştir.

Ertuş vd (2016) Van ili ve çevre illerden temin edilen 6 tescilli çeşit ile 70 adet yonca ekotipi (toplamda 76 çeşit) üzerinde popülasyonlardaki akrabalık ilişkilerini tespit etmek için çalışma yapmışlardır. Çalışmada genetik uzaklık öklit kat sayısı ile belirlenmiş en yüksek genetik çeşitlilik ve polimorfizmin Gürpınar hattında olduğu bildirilmiştir

Tekin vd (2017) SSR markörleri kullanılarak farklı kaynaklardan elde edilen Türkiye orijinli 384 yulaf genotipinin genetik çeşitliliği incelenmiştir. Çalışma sonucunda, yulaf genotipleri 40 SSR markörü ile genotiplenmiş ve yerel genotiplerin gen bankasına kazandırıldığı bildirilmiştir

Harun vd (2017) *Pistacia* türleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek ve SSR markörleri geliştirmek için çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda, SSR

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

markörlerinin genetik haritalama ve QTL çalışmalarında güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir

Kayak vd (2018) 83 adet çerezlik kabak (*Cucurbita pepo* L.) genotipinde SSR markörleri ile genetik çeşitlilik analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada SSR tekniği kullanılmış toplamda 107 tanesi (% 87,70) polimorfik olan toplam 122 adet bant elde edilmiştir. Sonuç olarak SSR markör yönteminin ıslah programlarında önemli fayda sağlayacağını bildirmişlerdir.



## 3. MATERYAL ve YÖNTEM

## 3.1. Bitkisel Materyaller

Çalışmada Doğu Anadolu Bölgesi yoğunlukta olmak üzere Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış 72 yonca popülasyonu kullanılmıştır. Yonca tohumları 33%'lük NaOCl kullanılarak steril edilmiş ve 3 kez deiyonize su ile yıkanmıştır. Tohumlar MS (Murashige and Skoog) ortamına ekilerek %70'lık nemde, 16/8 ışık/karanlık fotoperiyoduna sahip bir iklim kabininde 4 hafta bekletilmiştir. Bu çalışmada kullanılan yonca popülasyonlarına ait lokasyon bilgileri aşağıda çizelgede verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Bu çalışmada kullanılan yonca popülasyonlarına ait lokasyon bilgileri

1-Gözlü-1	29-Van Merkez Değirmenarkı	60-Alsancak
2-Van Başkale Albayrak	30-Van Çatak Uzuntekne	61-Bilensoy82
3-Van Başkale Barış	31-Van Çaldıran Kurtoğlan	62-Ömerbey
4-Van Muradiye Yumaklı	32-Van Çaldıran	63-Sivas Yıldızeli
5-Van Başkale Merkez	Boğulukaynak	64-MA-225
6-Van Başkale Yolmaçayır	33-Van Gevaş Göründü	Çeşidi
7-Van Erciş Pay	34-Van Erciş Taşlıçay	65-Tavlaş
8-Van Gevaş Yemişli	35-Van Gevaş Yuva	66-Bilensoy
9-Van Çatak Ağaçalı	36-Van Özalp Aksorguç	67-Batman
10-Van Gürpınar Merkez	37-Konya-Cihanbeyli	68-Sazova
11-Van Erciş Karlıyayla	38-Konya-Merkez	69-Van Gevaş Taşevler
12-Van Gürpınar Bozyiğit	39-Konya-Ereğli	70-Plato
13-Van Gevaş Abalı	40-Konya-Çumra	71-Erzurum
14-Van Gevaş Koçak	41-Muş-Varto	72-Ferruh
15-Van Çaldıran Salahane	42-Muş-Sungu	
16-Van Çaldıran Duyumalan	43-Muş-Üçdere	
17-Van Erciş Kozluca	44-Muş-Varto Akçatepe	
18-Van Gürpınar	45-Uşak-Çamyuva	
Değirmendüzü	46-Bingöl-Kumgeçit	
19-Van Özalp Seydibey	47-Bingöl-Küçüktekiren	
20-Van Çatak Alaçayır	48-Bingöl-Çeltiksuyu	
21-Van Çaldıran	49-Bingöl-Garip	
Yukarıyanıktaş	50-Bingöl-Gençmesedalı	
22-Van Çaldıran İncealan	51-Bingöl-Ortaköy	
23-Van Gürpınar Sakalar	52-Kayseri-Merkez	
24-Van Merkez Irgat	53-Ağrı-Kalender	
25-Van Erciş Kocapınar	54-Savaş	
26-Van Gevaş Reşadiye	55-Side Bölgesi	
27-Van Gürpınar	56-Bitlis Hizanduyumlu	
Yukarıkaymaz	57-Bitlis-Mutki	
28-Van Gürpınar	58-Nimet	
Koyunyatağı	59-Hımıs Yöresi	

#### 3.1.1. Bitkilesel materyallerin uygun ortam koşullarında yetiştirilmesi

Bu çalışma; tohum sterilizasyon aşamasıyla başlamıştır. Sterilizasyon aşamasında her bir hat, çalkalayıcı yardımıyla %33 'lük sodyum hipoklorit içerisinde 185rpm'de 20 dk steril edilmiştir. Tohumlar 3 kez distile sudan geçirilerek kabin içerisinde filtre kağıdına alınıp Std-MS ortamına ekim yapılmıştır.

**Çizelge 3.2.** Standart MS besiyeri için kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kimyasal Madde	Miktarı
Makro Elementler	50 ml
Mikro Elementler	1000 ml
Demir Şelat	10 ml
Şeker	20 gr
Agar	7,5 gr

pH=5.8 olacak şekilde son hacim 1000 ml distile suya tamamlanmıştır. En son 121° C ayarlı otoklavda 1.5 saat steril edilmiştir. 1 litrelik besiyerlerine steril kabin içerisinde :

C Vitamini=1000 µL

Ms Vitamin=1000 µL filtrelenip karıştırılarak petri kaplarına dağıtımı sağlanmıştır.

Tohum sterilizasyon aşamasından sonra tohum ekimi yapılmıştır. Bu aşamada; 1 gece kabinde bekletilerek hazırlanmış Standart-MS besi yerlerine, farklı bölgelerden toplanan tohumların (72-hat) sırasıyla ekimi yapılmıştır. Tohumlar, iklimlendirme kabininde 2 hafta yaprak oluşumu için bekletilmiştir.

(1 hat, 3 petri olacak şekilde ekim yapılmıştır)

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Moleküler markörler ve genotip karakterizasyonu

##### 3.2.2. Bitkilerden DNA izolasyonu

Yonca fidelerinin genç yapraklarından CTAB yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır (Doyle and Doyle 1990). Elde edilen bu DNA'lar PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları:

##### **CTAB Ekstraksiyon Tamponu İçeriği**

CTAB ( Hexadecylmethyl Ammonium Bromide): 2g

1M Tris (pH:8 ): 10 ml

5M NaCl: 28 ml

0,5M EDTA (pH: 8): 4 ml

PVP:1 gr

Distile su: 40 ml

(Ependorf tüpler 72 hat sırasına uygun şekilde numaralandırılmıştır).

##### **Kloroform/İso-Amil Alkol**

Kloroform: 96 ml

İso-Amil Alkol: 4 ml

**Çizelge 3.3.** DNA İzolasyon işlemi için kullanılan kimyasallar ve miktarları

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Miktarı</b>
CTAB Buffer	680 µl
Fenol: kloroform: izoamilalkol	680 µl
İsopropanol	600 µl
%76 EtOH	500 µl
TE	300 µl

DNA izolasyon işlemi için örneklerin hazırlanması:

Yetiştirilen yonca tohumlarından alınan yapraklar ependorf tüplerine alınarak -20 °C'de donduruldu. Ardından örnekler sıvı azot içerisine alınarak ezme işlemine tabii tutuldu. Bu aşama örnekler iyice toz haline getirilinceye kadar sürdürüldü.

#### **DNA İzolasyonu**

- 1) Yonca yapraklarından 0.03 gram tartılarak sıvı azotta parçalanıp, 2 ml ependorf tüplerine alınıp 680 µl CTAB ilave edildi.
- 2) Ependorf tüpleri su banyosunda 65 °C de 1 saat bekletildi.
- 3) Ardından 680 µl kloroform: izoamil alkol konulup 15 dakika inkübe edildi.
- 4) 6000-8000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı başka tüpe alındı.
- 5) Üzerine 600 µl izopropanol eklenip santrifüj edildi.
- 6) Elde edilen pellet alınıp 1 ml amonyum asetat ( %76' lık etil alkolle hazırlanmıştır) ilave edildi. 8 dk-6000 rpm de santrifüj edildi.
- 7) Santrifüj aşamasından sonra süpernatant kısmı dökülerek kurutmaya bırakıldı.
- 8) Kuruduktan sonra 300 µl TE eklenip + 4 °C de / 1 gece bekletilip O.D ölçümü yapıldı.

### 3.2.3. DNA konsantrasyonunun ölçülmesi ve saflığının belirlenmesi

DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop adlı spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. DNA saflığını hesaplamak için 260 ve 280 nm absorpsiyon değerleri tespit edilip, oranları hesaplanmıştır. Hatların oranları aşağıda belirtilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Hatların saflık oranı (260/280 nm) ve konsantrasyonu (ng/µl)

<b>1</b>	1,737	62,17	<b>2</b>	1,487	146,4	<b>45</b>	2,057	180,7	<b>46</b>	1,809	53,04
<b>3</b>	1,599	88,73	<b>4</b>	1,847	143	<b>47</b>	1,684	213,4	<b>48</b>	1,736	62,45
<b>5</b>	1,351	58,14	<b>6</b>	1,840	40,59	<b>49</b>	1,742	45,10	<b>50</b>	1,723	483,7
<b>7</b>	1,535	356,3	<b>8</b>	1,720	82,45	<b>51</b>	1,838	294,2	<b>52</b>	1,855	273
<b>9</b>	1,733	41,96	<b>10</b>	1,755	113,9	<b>53</b>	1,658	86,96	<b>54</b>	1,779	48,14
<b>11</b>	1,716	372,7	<b>12</b>	1,738	38,33	<b>55</b>	1,659	137,9	<b>56</b>	1,758	64,80
<b>13</b>	1,736	126,3	<b>14</b>	1,854	98,33	<b>57</b>	2,028	50,10	<b>58</b>	2,060	349,3
<b>15</b>	1,590	174,3	<b>16</b>		64,02	<b>59</b>	1,916	42,25	<b>60</b>	1,685	115,3
<b>17</b>		91,18	<b>18</b>		94,51	<b>61</b>	1,943	272,4	<b>62</b>	2,066	49,41
<b>19</b>		241,6	<b>20</b>		103,8	<b>63</b>	1,865	780,7	<b>64</b>	1,753	45,20
<b>21</b>		158,2	<b>22</b>		413,6	<b>65</b>	1,622	636,8	<b>66</b>	1,785	138,4
<b>23</b>		341,9	<b>24</b>		214,7	<b>67</b>	1,922	166	<b>68</b>	1,720	291,7
<b>25</b>		85	<b>26</b>		454,7	<b>69</b>	1,980	39,02	<b>70</b>	1,838	86,67
<b>27</b>		503,8	<b>28</b>		57,27	<b>71</b>	2,028	43,33	<b>72</b>	2,088	90,69
<b>29</b>		154,3	<b>30</b>		125,4						
<b>31</b>	1,564	117	<b>32</b>	1,720	214						
<b>33</b>	1,932	44,71	<b>34</b>	1,567	196,8						
<b>35</b>	1,535	98,73	<b>36</b>	1,598	74,90						
<b>37</b>	1,550	201	<b>38</b>	1,863	155,4						
<b>39</b>	1,956	90,49	<b>40</b>	1,810	1003						
<b>41</b>	2,019	146,7	<b>42</b>	1,760	92,84						
<b>43</b>	1,644	87,84	<b>44</b>	1,833	492,6						

#### 3.2.4. SSR markörlerinin seçimi

Çalışmanın başlangıcında, önceki çalışmalarda tespit edilen SSR markörlerinden amplifikasyon yeteneği yüksek olup aynı zamanda kolay skorlanan 30 adet SSR markörü denenmiş olup içerisinde 16 adet SSR markörü seçilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Çalışmada kullanılan SSR markörler

LOKUS	FORWARD	REVERSE
Mtic 7	ACCACTTCTCCATCCATC	CAAGCTTGCTGCATGAGTGCT
Mtic 14	TCTAGAAAAAGCAATGATG	TGCAACAGAAGAAGCAAAA
Mtic 51	AGTATAGTGATGAAGTGGT	ACAAAACTCTCCCGGCTTT
Mtic 64	CCCGTTCTTTTATGTTGTGG	AACAAACACAATGGCATGGA
Mtic 93	AGCAGGATTTGGGACAGTTG	TACCGTAGCTCCCTTTTCCA
Mtic 210	CCAAACTGGCTGTGTTCAA	GCGGTAAGCCTTGCTGTATG
Mtic 230	GTAAGCGCCTGCTTGGACTGAG	ATTCTGCCAAAATGCAA
Mtic 232	AGTATAGTGATGAAGTGG	ACAAAACTCTCCCGGCTTT
Mtic 237	CCCATATGCAACAGACCTTA	TGGTGAAGATTCTGTTGTTG
Mtic 238	TTCTTCTTCTAGGAATTTG	CCTTAGCCAAGCAAGTAAAA
Mtic 248	TATCTCCCTTCTCCTTCTCC	GGATTGTGATGAAGAAATGG
Mtic 249	GAAGAAGAAAAAGAGATAG	GGCAGGAACAGATCCTTGAA
Mtic 251	GCGATGCTATTGAGAAACT	AAATAAACCCAAAGGACTCG
Mtic 452	CTAGTGCCAACACAAAAACA	TCACAAAACTGCATAAAGC
Mtic 470	GGTTCGTGTATTTGTTGAT	CCCTTCACAGAATGATTGAT
Mtic 471	ATCAGGTGATGATTGGTTTT	CCAACCATCTTTGTTTCTTA

#### 3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)

PCR işlemi ‘‘Sensquest cyclers’’ cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR işlemlerinde kullanılan maddeler ve miktarları Çizelge 3. 6 - 3. 11 ‘de verilmiştir. SSR-PCR döngü koşulları Çizelge 3.12 ‘de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.6.** 6 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar

Kullanılan maddeler	Miktarları(µl)
PCR mix (2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 µl dNTP, Taq Polimeraz 0,3) (1,5 µl KCl, 1,5 µl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5,8
DNA (10 ng)	6
Primer	1
ddH <sub>2</sub> O	7,2

**Çizelge 3.7.** 4 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar

Kullanılan maddeler	Miktarları(µl)
PCR mix (2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 µl dNTP, Taq Polimeraz 0,5) (1,5 µl KCl, 1,5 µl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	6
DNA (10 ng)	4
Primer	1
ddH <sub>2</sub> O	9

**Çizelge 3.8.** 3 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar

Kullanılan maddeler	Miktarları(µl)
PCR mix (2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 µl dNTP, Taq Polimeraz 0,3) (1,5 µl KCl, 1,5 µl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5,8
DNA (10 ng)	3
Primer	1
ddH <sub>2</sub> O	10,2

**Çizelge 3.9.** 2 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar

Kullanılan maddeler	Miktarları(µl)
PCR mix (2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 µl dNTP, Taq Polimeraz 0,3) (1,5 µl KCl, 1,5 µl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5,8
DNA (10 ng)	2
Primer	1
ddH <sub>2</sub> O	11,2

**Çizelge 3.10.** 1 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar

Kullanılan maddeler	Miktarları(µl)
PCR mix (2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 µl dNTP, Taq Polimeraz 0,3) (1,5 µl KCl, 1,5 µl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5,8
DNA (10 ng)	1
Primer	1
ddH <sub>2</sub> O	12,2

**Çizelge 3.11.** 0,5 µl DNA içeren PCR koşullarındaki miktarlar

Kullanılan maddeler	Miktarları(µl)
PCR mix (2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 µl dNTP, Taq Polimeraz 0,3) (1,5 µl KCl, 1,5 µl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	7,3
DNA (10 ng)	0,5
Primer	1
ddH <sub>2</sub> O	11,2

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tüm reaksiyonlar 20µl final total hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR işlemlerinde kullanılan primerlerin en uygun bağlanma sıcaklıkları (T<sub>m</sub>) ise daha önce yapılan çalışmalardaki tekrarlı ön denemeler sonucunda belirlenmiş olup SSR-PCR Döngüsü Çizelge 3.12’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.12.** SSR-PCR döngüsü

İşlem	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	95 <sup>0</sup> C	5 dk
Denatürasyon	94 <sup>0</sup> C	1 dk
Bağlanma	45-58 <sup>0</sup> C	1 dk
Uzama	72 <sup>0</sup> C	1 dk
Son Uzama	72 <sup>0</sup> C	10 dk

#### 3.2.6. Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünleri % 2’lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak ayrılmıştır. DNA markörü olarak 100 bp büyüklüğüne sahip markör tercih edilmiştir. Agaroz jelde DNA örnekleri koşturulduktan sonra elde edilen bantlar yorumlanmış ve bantların allel boyutuna göre skorlama işlemi yapılmıştır.

Jel elektroforezi için kullanılan kimyasallar Çizelge 3.13 ‘de belirtilmiştir.

**Çizelge 3.13.** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Miktar
Agaroz (%2)	5 gr
Tampon Çözelti 1X	250 ml
Etidyum-Bromür	7 µl
Markör	9 µl
DNA Loading Dye	2 µl
PCR ürünü	15-20 µl
Ladder	5 µl

#### Agaroz jel elektroforezi sistemine hazırlık prosedürü

- 1) 5 gr agaroz tartılıp, erlene konuldu.
- 2) 250 ml 1X TAE agarozun üzerine eklendi.
- 3) Hafifçe çalkalanıp ve tamamen eriyene kadar mikrodalga fırında kaynatıldı.
- 4) Jel 65 °C ye kadar soğutuldu ve üzerine 7 µl Et-Br eklendi.
- 5) Önceden tarakları yerleştirilip hazırlanmış olan elektroforez aparatına döküldü.
- 6) Ortalama 30-40 dk kadar jelin donması beklendi ve taraklar dikkatlice çıkarıldı. Jel üzerinde örneklerin yüklenmesini sağlayacak kuyucuklar oluşturuldu.
- 7) Elektroforez aparatı içerisine jelin üzerini kapatacak şekilde tampon çözelti eklendi.
- 8) PCR ürünü ve DNA Loading Dye karıştırılarak kuyucuklara dikkatlice yüklendi.
- 9) İlk kuyucuğa 9 µl markör konuldu.
- 10) Cihaz 100 Volтта 150 dakikaya ayarlanarak başlatıldı örnekler kuyucuklardan çıktıktan sonra 120 Volтта işlem devam ettirildi.
- 11) Jel görüntüleme cihazında görüntülenerek işlem tamamlandırıldı.

#### 3.2.7. Veri analizleri

Jel görüntüleme sisteminden elde edilen görüntüler kullanılarak, bantlar kodominant markör siteminden dolayı 1 ya da 0 şeklinde skorlanmıştır. Skorlamadan elde edilen veriler kullanılarak genetik çeşitlilik ve diğer analizler gerçekleştirilmiştir. Çeşitlilik analizleri için allel sayıları ve frekansları, major allel frekansı, gen çeşitliliği, PIC (Polimorfik Bilgi İçeriği) gibi parametreler kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Ayrıca her bir primer için ortalama PIC değerleri, monomorfik ve polimorfik bant sayıları ile polimorfik bant yüzdeleri de analiz edilmiştir. Bu analizler POWERMARKÖR v3.25 (Liu and Muse 2005) yazılım programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Türkiye'ye ait yerel yonca popülasyonlarının alt popülasyonlarını ve popülasyonlarının ayrışmalarını belirlemek amacıyla STRUCTURE adlı program kullanılmıştır (Evanno et al. 2005). Populasyon dinamikleri ve ayrışmaları hem ad hoc

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

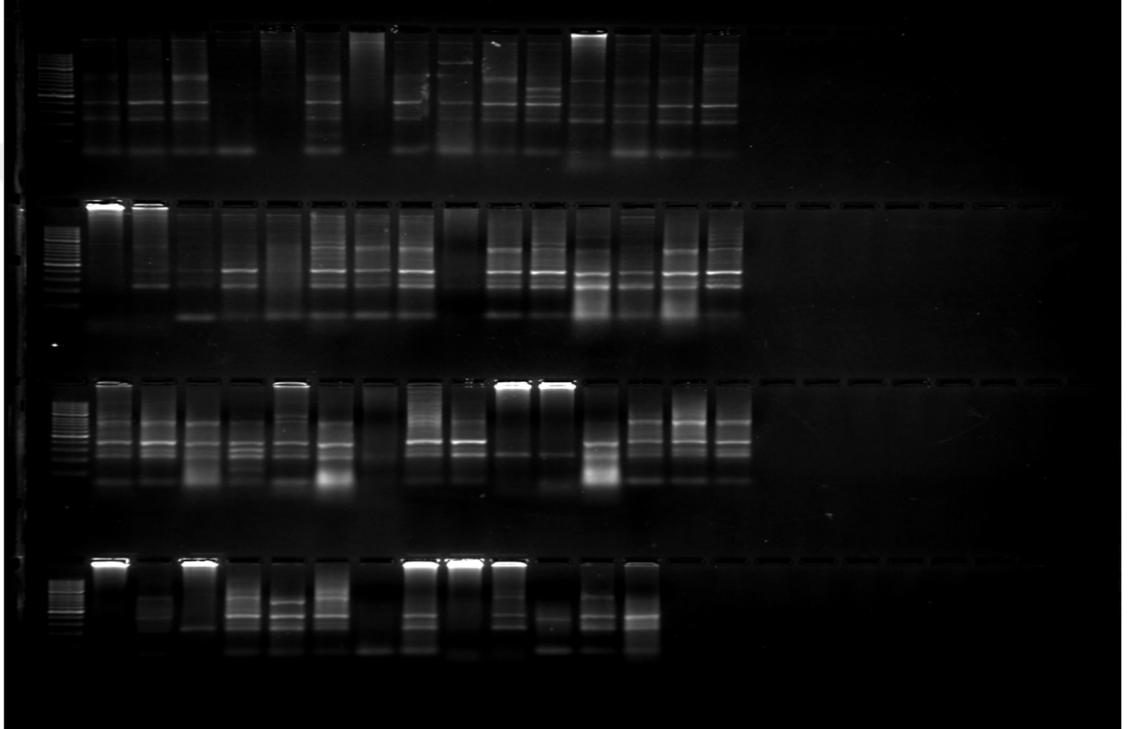
prosedürü (Pritchard et al. 2000) hem de Evanno et al. (2005) tarafından geliştirilen  $\Delta k$  metodu ile değerlendirilmiştir. Popülasyonlardaki varyasyonları belirlemek amacıyla GenAIEx6.1 (Peakall and Smouse 2001) programı kullanılarak Principal Component Analizleri (PCA) de yapılmıştır. Hem STRUCTURE hem de PCA'dan elde edilen sonuçların doğrulanması için ise filogenetik analizler çalışmaya dahil edilmiştir. Bu kapsamda yine POWERMARKÖR v3.25 (Liu and Muse 2005) programı kullanılarak, allel frekansları hesaplanmış, allel frekansları temelinde Nei et al. (1983) tarafından geliştirilen yönteme göre genetik mesafeler hesaplanarak filogenetik ağaç verileri elde edilmiştir. Elde edilen veriler en son olarak DENDROSCOPE programı (Huson et al. 2010) ile görselleştirilerek Neihgbor-joining yöntemine göre dendrogram oluşturulmuştur.



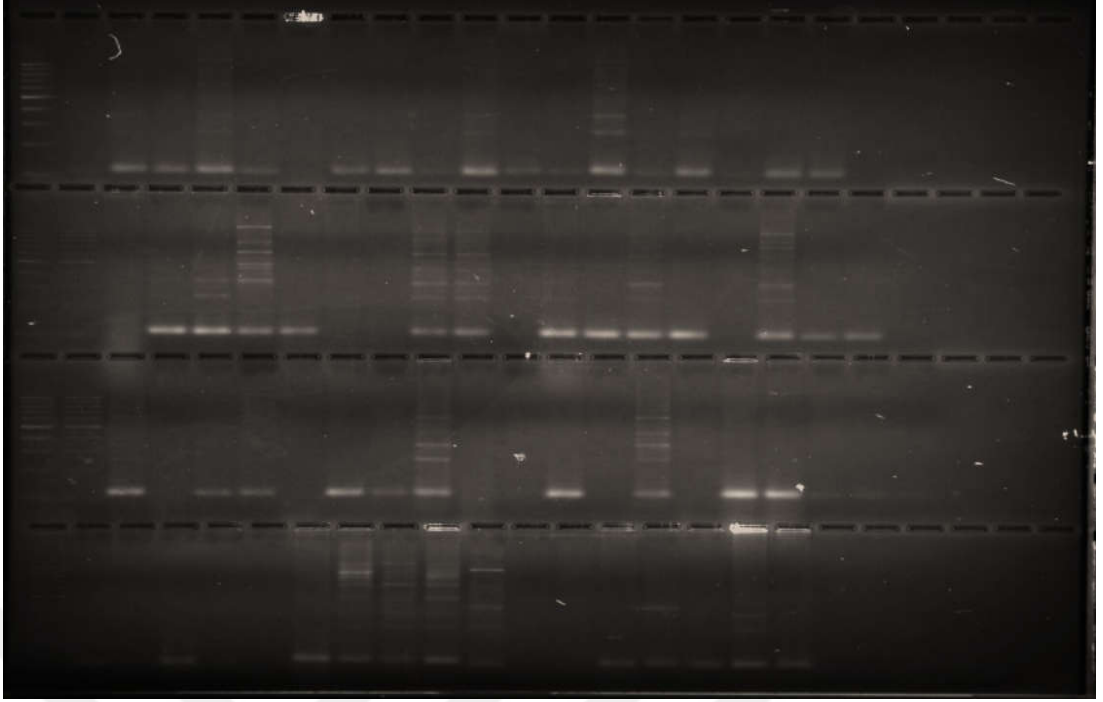
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Jel G6r6nt6leri

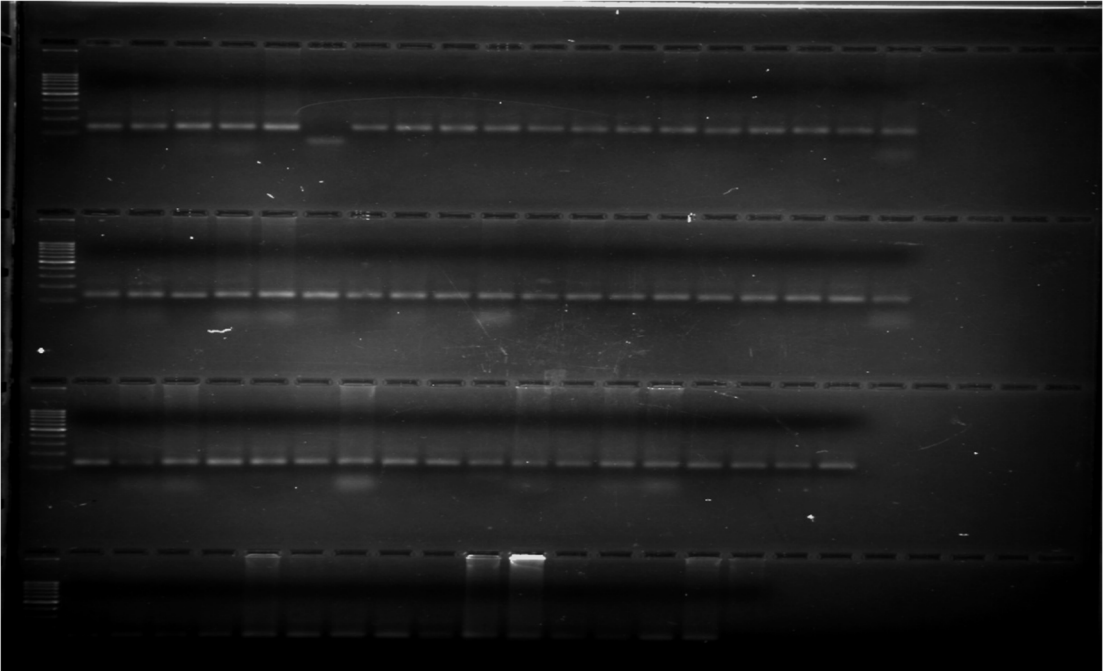
Çalışmada 72 yonca (*Medicago sativa*) hattı, 16 SSR primeri ile taranmıŐtır. Araştırmada kullanılan yonca genotiplerine ait SSR-PCR analizlerinden elde edilen elektroforez jel g6r6nt6leri aşağıda verilmiştir.



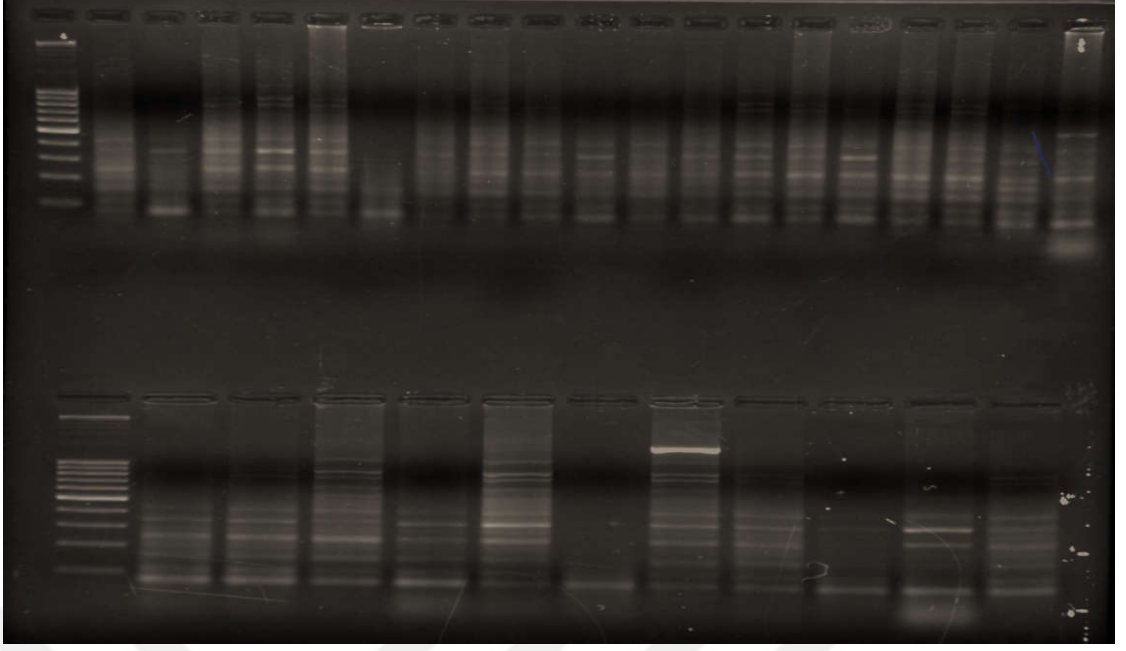
Şekil 4.1. Mtic 7 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72



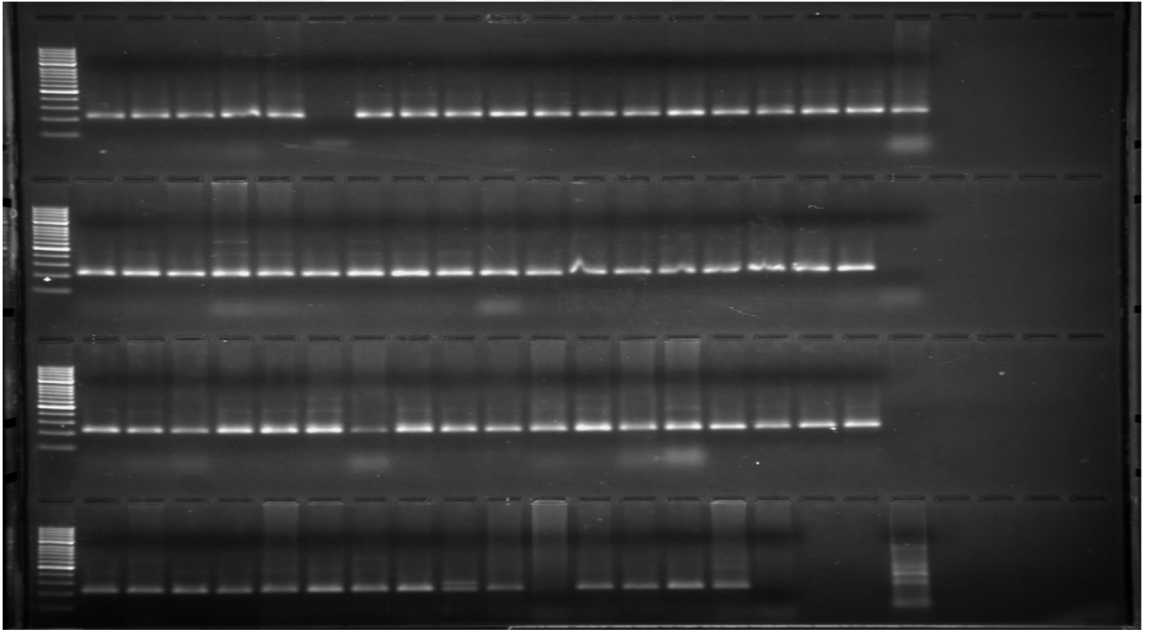
Şekil 4.2. Mtic 14 primerin yonca genotiplerinde oluŐtrduđu SSR bant profilleri 1-72



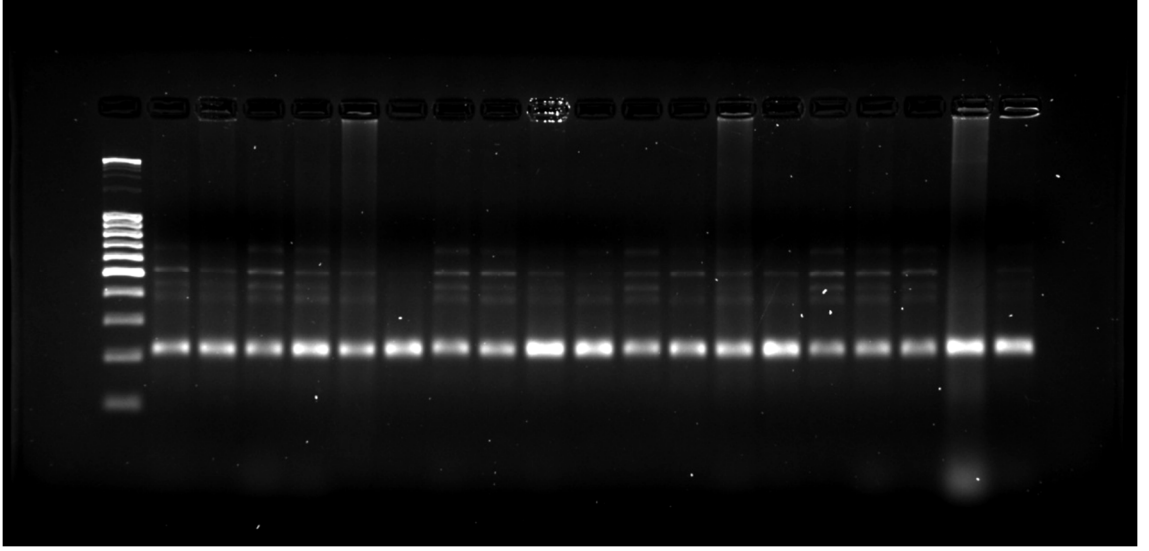
Şekil 4.3. Mtic 51 primerin yonca genotiplerinde oluŐtrduđu SSR bant profilleri 1-72



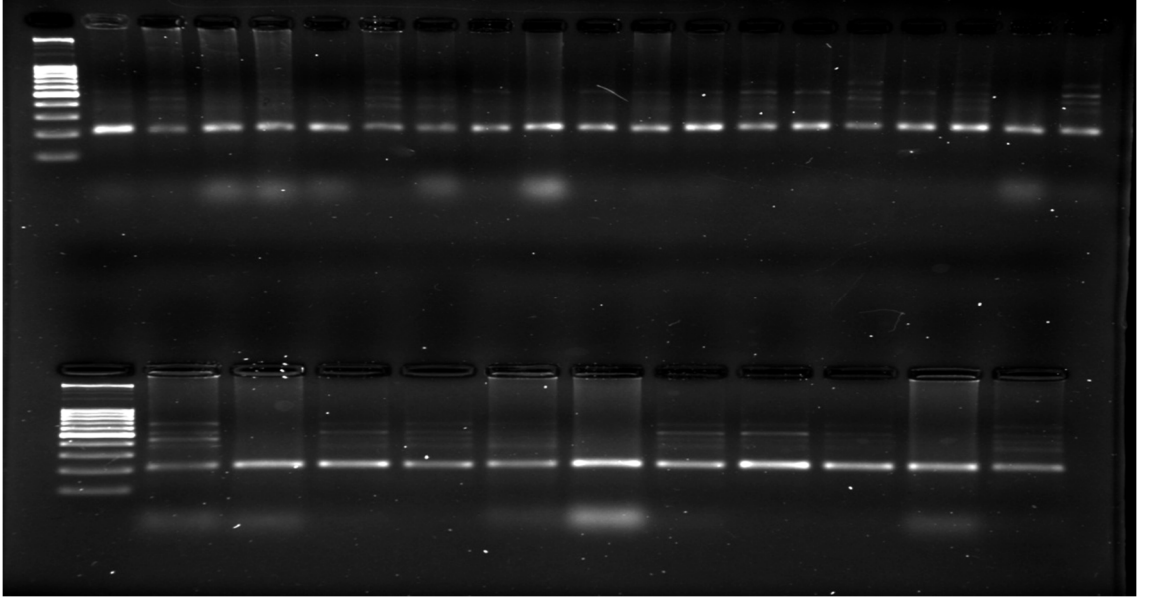
Şekil 4.4. Mtic 64 primerin yonca genotiplerde oluşturdukları SSR bant profilleri 43-72



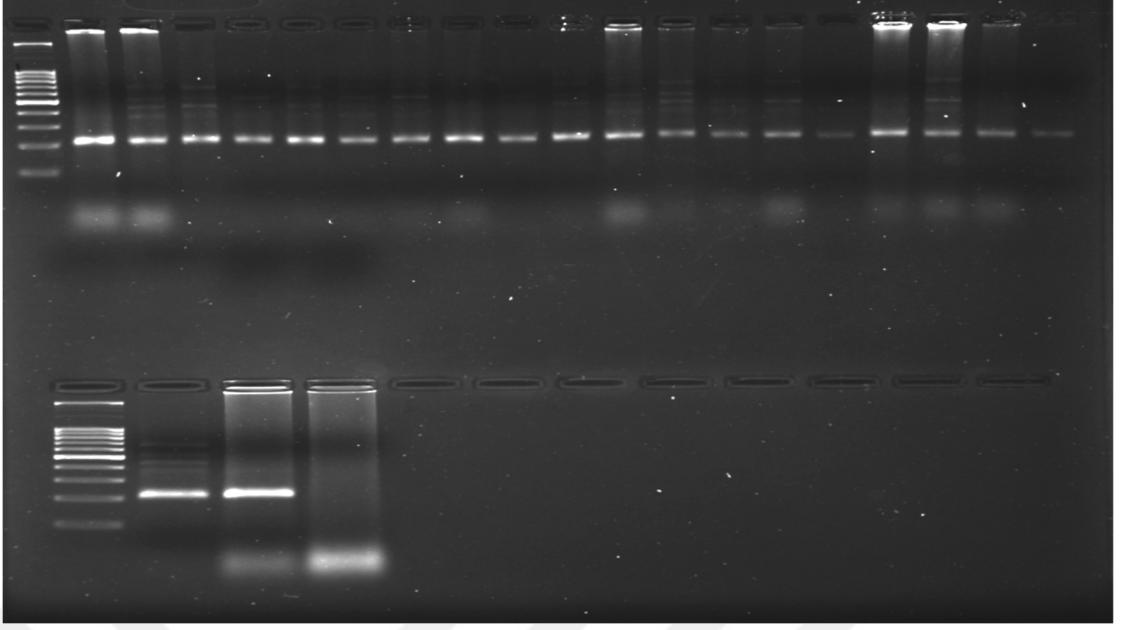
Şekil 4.5. Mtic 210 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72



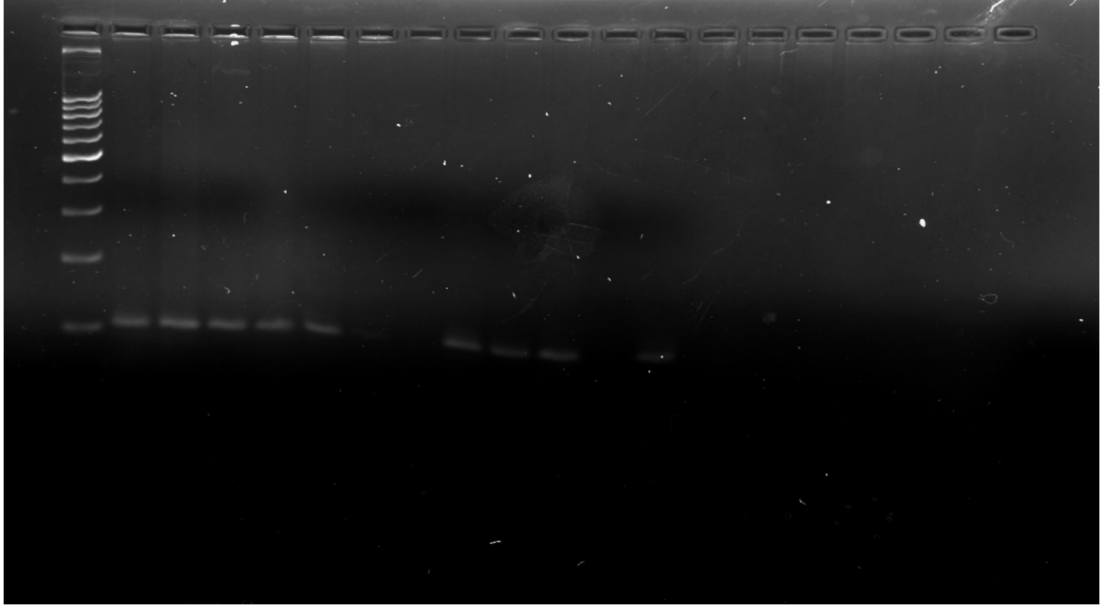
Şekil 4.6. Mtic 230 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-21



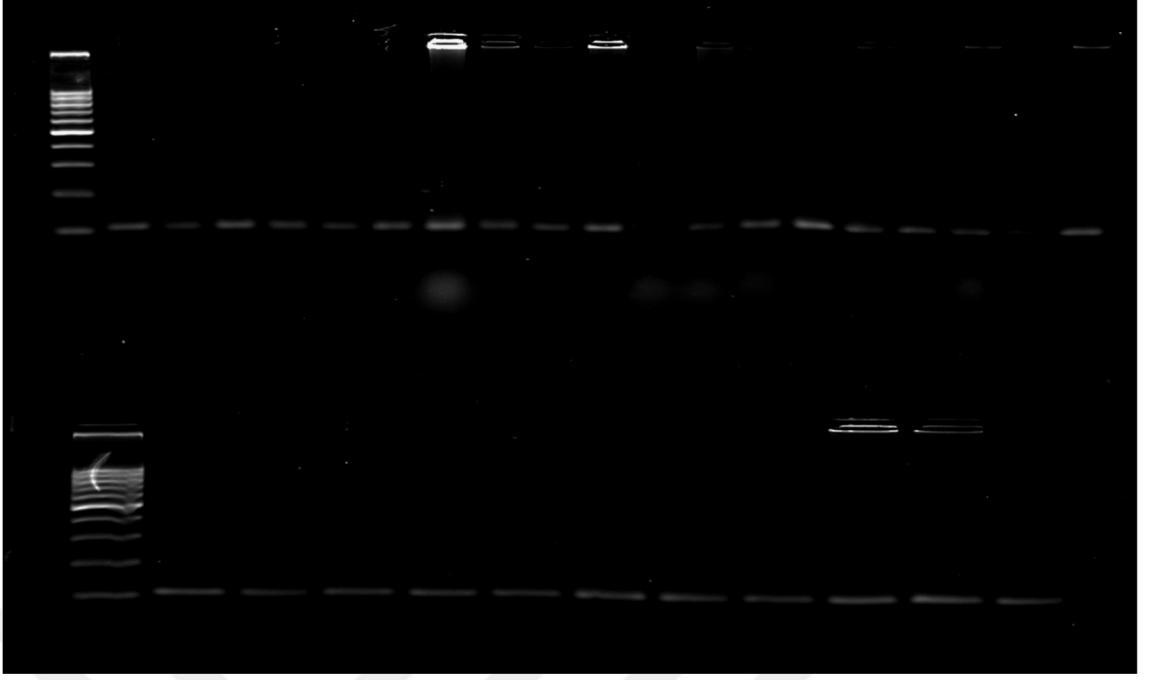
Şekil 4.7. Mtic 230 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 22-51



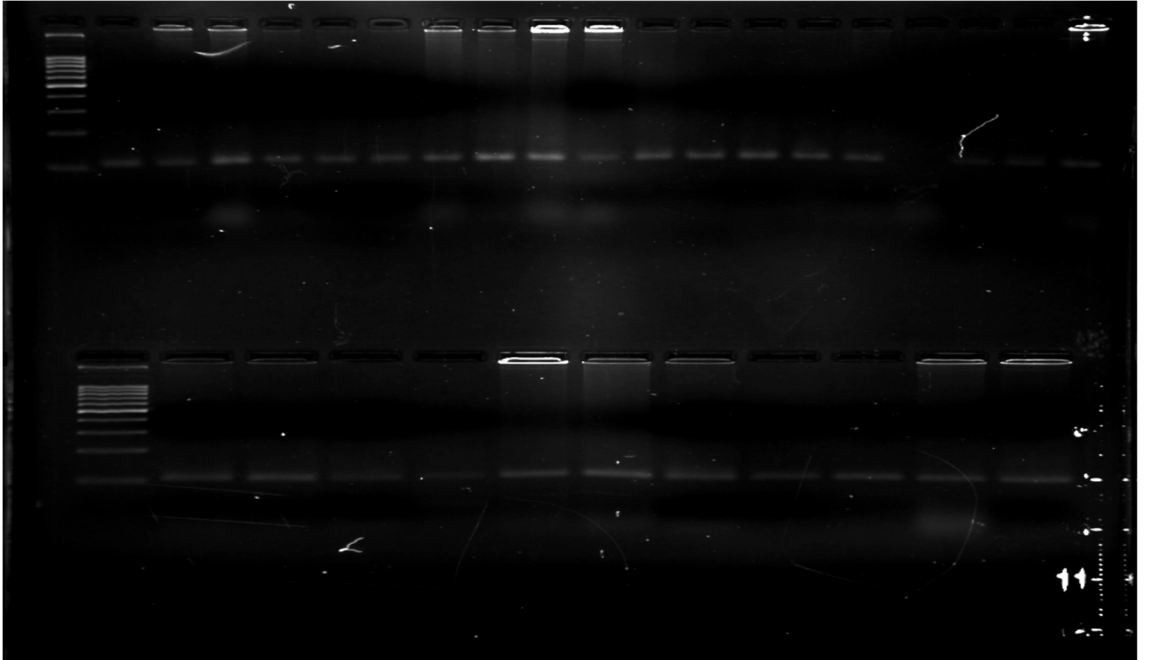
Şekil 4.8. Mtic 230 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 52-72



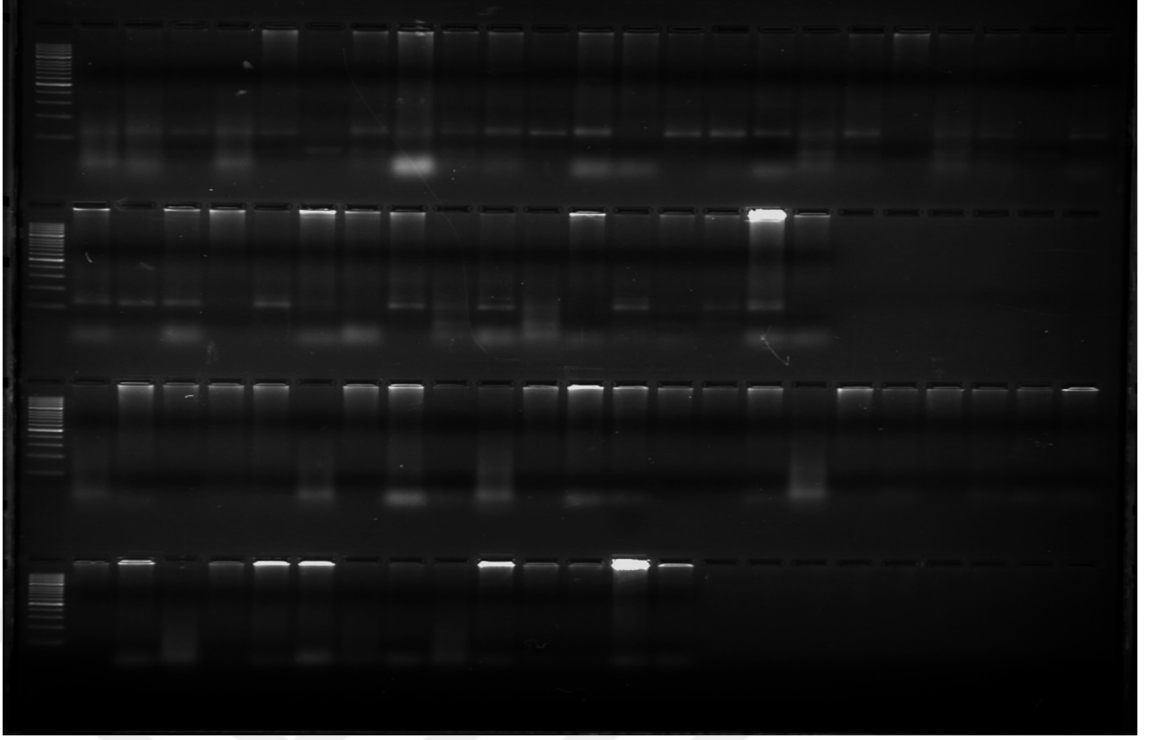
Şekil 4.9. Mtic 237 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-13



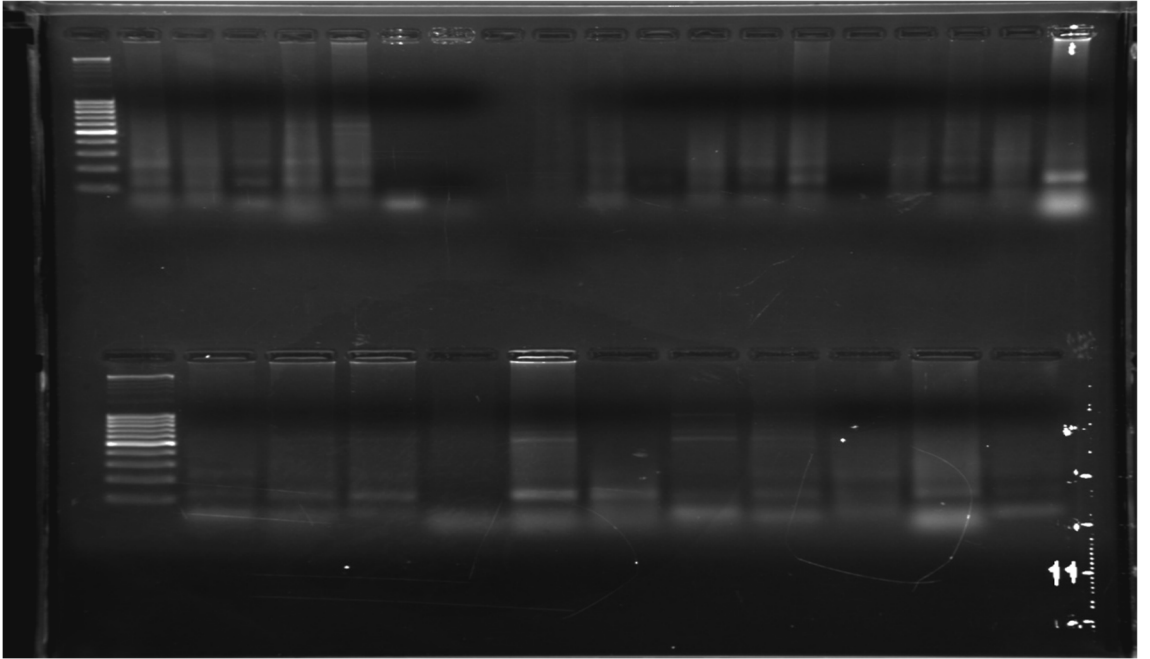
**Şekil 4.10.** Mtic 237 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 14-43.



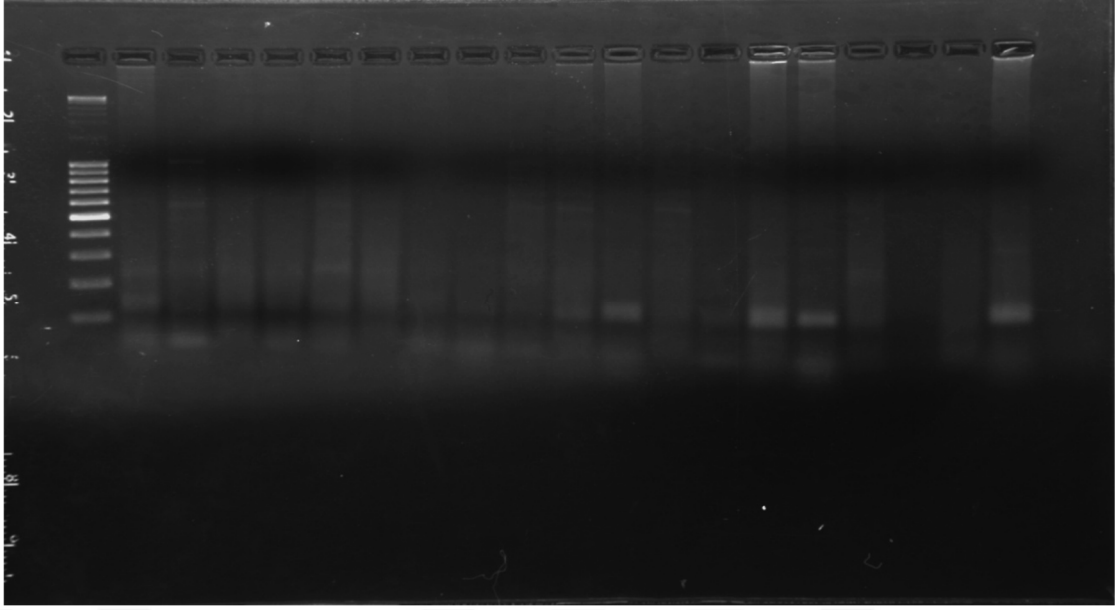
**Şekil 4.11.** Mtic 237 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 44-72.



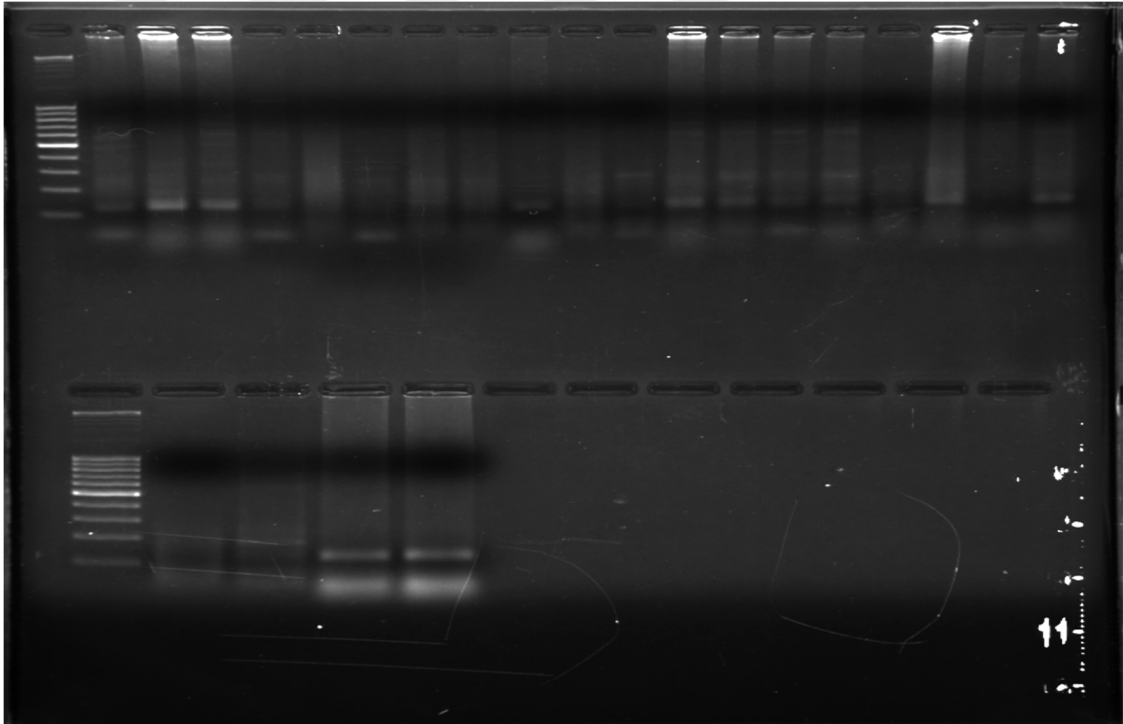
Şekil 4.12. Mtic 238 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72



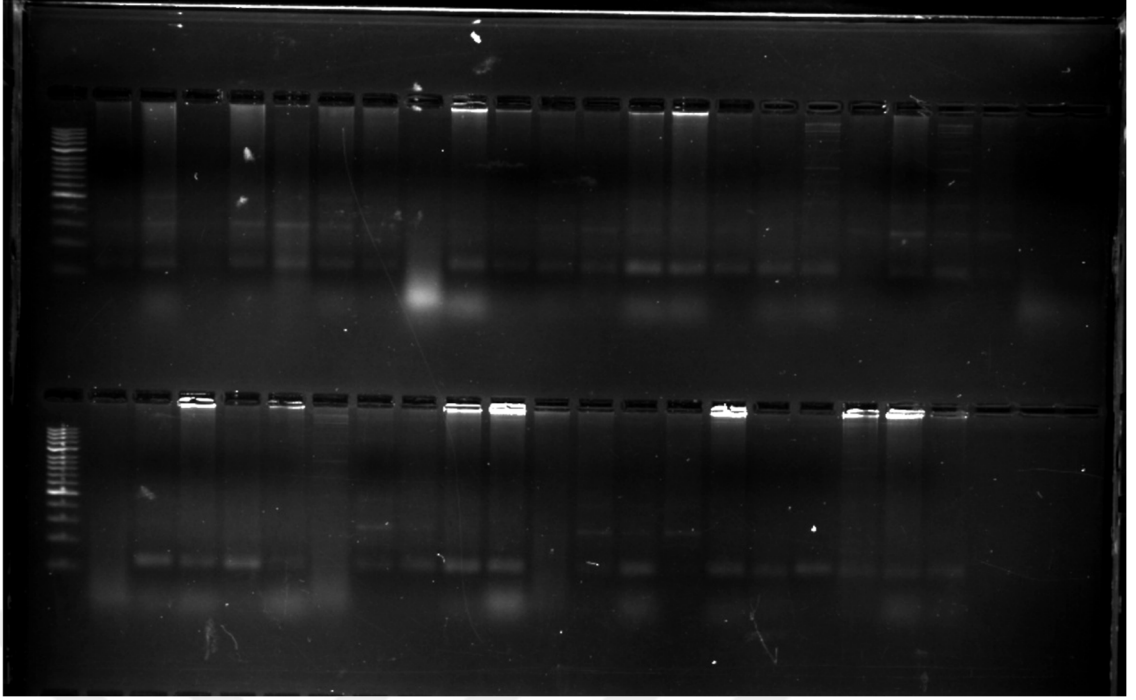
Şekil 4.13. Mtic 248 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-30.



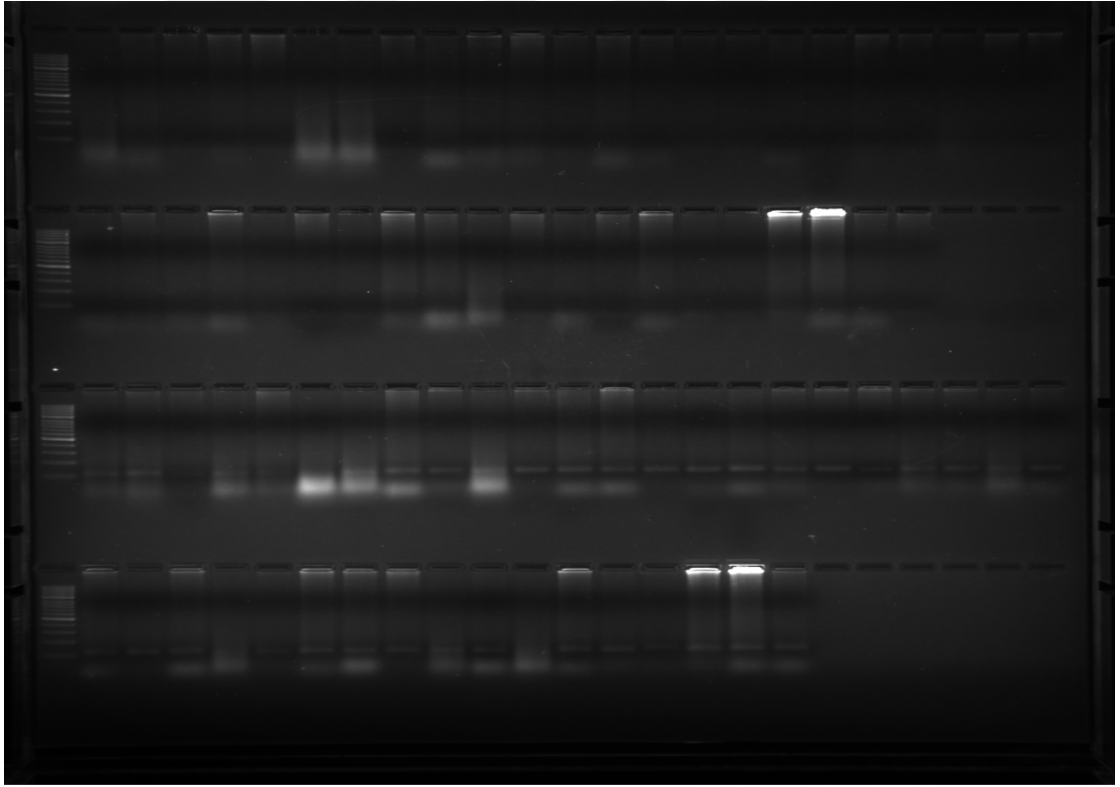
Şekil 4.14. Mtic 248 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 31-49.



Şekil 4.15. Mtic 248 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 50-72.



Şekil 4.16. Mtic 249 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 2-72



Şekil 4.17. Mtic 471 primerin yonca genotiplerinde oluşturduğu SSR bant profilleri 1-72

Çalışmamızda kullandığımız SSR tekniği; filogenetik analizler, genetik çeşitlilik, ıslah ve genetik haritalama gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Öten ve Albayrak 2016). Antalya iline bağlı 13 ilçeden toplanan toplam 26 farklı yonca genotipleri üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmada SSR tekniği kullanılmış ve kullanılan primerler polimorfik bant vermiştir. Benzerlik kat sayılarındaki değişime göre Gazipaşa-1 ve Kumluca-2 genotipleri uzak genetik benzerliğe sahipken Kaş-2 ve Çeşit-1 genotipleri arasında yakın genetik benzerlik tespit edilmiştir. Gazipaşa-1 Alanya, Aksu-1, Aksu-2, Kepez-1, Döşemealtı-1, Kemer-1, Finike-1, Demre-1 ve Kaş-1 populasyonlarında ıslah amaçlı kullanım için seçilmiştir. Kayak vd (2018) 83 adet çerezlik kabak (*Cucurbita pepo* L.) genotipinde SSR markörleri ile genetik çeşitlilik analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada SSR tekniği kullanılmış toplamda 107 tanesi (% 87,70) polimorfik olan toplam 122 adet bant elde edilmiştir. Sonuç olarak SSR markör yönteminin ıslah programlarında önemli fayda sağlayacağını bildirmişlerdir.

Ertuş vd (2016) Van ili ve çevre illerden temin edilen 6 tescilli çeşit ile 70 adet yonca ekotipi (toplamda 76 çeşit) üzerinde popülasyonlardaki akrabalık ilişkilerini tespit etmek için çalışma yapmışlardır. Çalışmada genetik uzaklık öklit kat sayısı ile belirlenmiş en yüksek genetik çeşitlilik ve polimorfizmin Gürpınar hattında olduğu bildirilmiştir. Tekin vd (2017) SSR markörleri kullanılarak farklı kaynaklardan elde edilen Türkiye orijinli 384 yulaf genotipinin genetik çeşitliliği incelenmiştir. Çalışma sonucunda, yulaf genotipleri 40 SSR markörü ile genotiplenmiş ve yerel genotiplerin gen bankasına kazandırıldığı bildirilmiştir. Harun vd (2017) *Pistacia* türleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek ve SSR markörleri geliştirmek için çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda, SSR markörlerinin genetik haritalama ve QTL çalışmalarında güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamıza ait SSR bant görüntülerinden yola çıkılarak elde edilen analiz sonuçlarına göre oluşan genetik farklılıkların sebebi birbirine uzak olan populasyonlarda gen akışı azalması ve coğrafik izolasyon olarak düşünülmüştür. Aynı coğrafyada yer alan yonca popülasyonlarının genomik içerik bakımından yüksek oranda benzerlik göstererek aynı popülasyon gruplarında yer almalarının temel nedeni genel olarak bu yonca popülasyonlarının ortak gen akışına sahip olmaları düşünülmüştür. Bunun yanısıra benzer iklim koşulları ve yükseklik gibi coğrafi faktörler de bu popülasyonların 2 ana küme şeklinde ayrışmasını sağlamıştır.

Araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre SSR markörlerinin genetik çeşitlilik için uygun moleküler araçlar oldukları anlaşılmaktadır.

#### 4.2. Genetik Çeşitlilik Analizi

Çalışma kapsamında Türkiye' nin farklı lokasyonlarından toplanan 72 adet yonca popülasyonlarının 16 adet SSR markörü ile genetik çeşitliliği değerlendirilmiştir. Çeşitlilik analizleri için allel sayıları ve frekansları, major allel frekansı, gen çeşitliliği, PIC (Polimorfik Bilgi İçeriği) gibi parametreler kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Ayrıca her bir primer için ortalama PIC değerleri, monomorfik ve polimorfik bant sayıları ile polimorfik bant yüzdeleri de analizler kapsamında belirlenmiştir. Bu analizler POWERMARKÖR v3.25 (Liu and Muse 2005) program kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına bakıldığında 16 adet SSR markörü 4,1'lik ortalama ile toplamda 67 polimorfik bant üretmiştir (Çizelge 4.2). Allel sayıları 1 ile 10 arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 4.1). Popülasyonlardaki major allel frekansları için ortalama değer 0,80 olarak tespit edilmiştir. En yüksek major allel frekansı ise 1,00 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Genetik çeşitliliğin ve beklenen heterozigotluğun önemli bir göstergesi olan gen çeşitliliği parametresi tüm popülasyonlarda 0,00 ile 0,65 arasında değişerek 0,28'lik bir ortalama ile tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). PIC değerleri, kullanılan markör sitemlerinin etkinliğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma kapsamında kullanılan 16 adet SSR markörü için ortalama polimorfik bilgi içeriği 0,22 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca minimum PIC değeri 0,00 iken maksimum PIC değeri de 0,60'dir (Çizelge 4.1). Bu değerler bu çalışmada kullanılan SSR markör sisteminin verimli bir şekilde çalışarak popülasyonlar arasındaki farklılıkları ortaya koyabilme gücüne sahip olduğunu göstermektedir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

**Çizelge 4.1** 72 farklı yerel yonca (*Medicago sativa* L.) popülasyonunun 16 SSR primerine dayanan minimum ve maksimum genetik çeşitlilik istatistikleri.

Genetik Çeşitlilik Parametresi	Ortalama	Minimum değer	Maximum değer
Allel Sayısı	4,1	1	10
MajorAllel Frekansı	0,80	0,50	1,00
Gen Çeşitliliği	0,28	0,00	0,65
PIC	0,22	0,00	0,60

PIC: Polimorfik Bilgi İçeriği

Genetik çeşitlilik analizleri kapsamında primerlerin etkinliğini karşılaştırmak için her bir primer için ortalama PIC değerleri de belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Mtic 232 primeri 0,36'lık ortalama PIC değeri ile en yüksek verimliliğe sahipken 0,10'luk ortalama PIC değerine sahip olan Mtic 237 ve Mtic 470 primerleri ise en düşük verimliliğe sahiptir. Mtic 14 ve Mtic 64 primerleri en fazla bant oluştururken (10bant) Mtic251 ve Mtic 471 primerleri en az bant üreten (1 bant) primerlerdir (Çizelge 4.2). En yüksek polimorfizm yüzdesi gösteren primerler Mtic 7, Mtic14, Mtic 64, Mtic 232, Mtic 238, Mtic 248, Mtic 251 ve Mtic 471'dir. Tüm SSR primerleri için ortalama polimorfizm yüzdesi %85,3 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Yonca popülasyonlarında kullanılan her bir SSR primeri için ortalama PIC değerleri, ortalama allel frekansları, monomorfik polimorfik bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri.

Primer Sayısı	Primer	Ortalama PIC	Monomorfik Bant	Polimorfi k Bant	Toplam Bant	Polimorfik Bant (%)
1	mtic7	0,20	-	8	8	100
2	mtic14	0,14	-	10	10	100
3	mtic51	0,20	1	2	3	67
4	mtic64	0,34	-	10	10	100
5	mtic93	0,30	1	4	5	80
6	mtic210	0,18	1	4	5	80
7	mtic230	0,27	1	5	6	83
8	mtic232	0,36	-	2	2	100
9	mtic237	0,10	1	3	4	75
10	mtic238	0,23	-	3	3	100
11	mtic248	0,22	-	7	7	100
12	mtic249	0,26	1	4	5	80
13	mtic251	0,19	-	1	1	100
14	mtic452	0,14	1	1	2	50
15	mtic470	0,10	1	1	2	50
16	mtic471	0,23	-	1	1	100
Toplam			8	67	75	
Ortalama		0,22				85,3

### 4.3. Populasyon Yapısı Analizi

Türkiye'nin farklı lokasyonlarından elde edilen yerel yonca populasyonlarının alt populasyonlarını ve populasyonlarının ayrışmalarını belirlemek amacıyla STRUCTURE adlı program kullanılmıştır (Evanno et al. 2005). Bu çalışmada 72 farklı genotip için populasyonları ayırmada kullanılan bu program MCMC tekrarlarını ve K gruplarını içermektedir. Başlangıçta optimal K değerini (Küme sayısı) belirlemek amacıyla K'nın 1'den 10'a kadar değerlendirilmesi için 72 genotipin tamamı kullanılmıştır. Bu çalışmadaki modelde, farklı ve büyük populasyonlardan dolayı *karışım modeli (Admixture)* kullanılmış ve allel frekanslarının ilişkili olabildiği düşünülmüştür. Çünkü bu durum benzer populasyonların ortak allellere sahip olabileceğini varsaymaktadır. Kaydedilen MarkovChain Monte Carlo (MCMC) replikasyonlarının uzunluğu 10.000 adeti veri toplanmadan atılmış ve her bir yürütmeye 100.000'den daha fazla MCMC replikasyonlarından veri toplanmıştır. Populasyon dinamikleri ve ayrışmaları hem ad hoc prosedürü (Pritchard et al. 2000) (Çizelge 4.3) hem de Evanno et al. (2005) tarafından geliştirilen  $\Delta k$  metodu (Çizelge 4.4) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemle analiz neticesinde elde edilen sonuçlar optimal K değerinin 2 olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.3 ve 4.4). Yine STRUCTURE programından alınan ayrılmış populasyonların görüntüleri de uygun K değerinin 2 olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.5).

STRUCTURE analizi neticesinde özellikle,

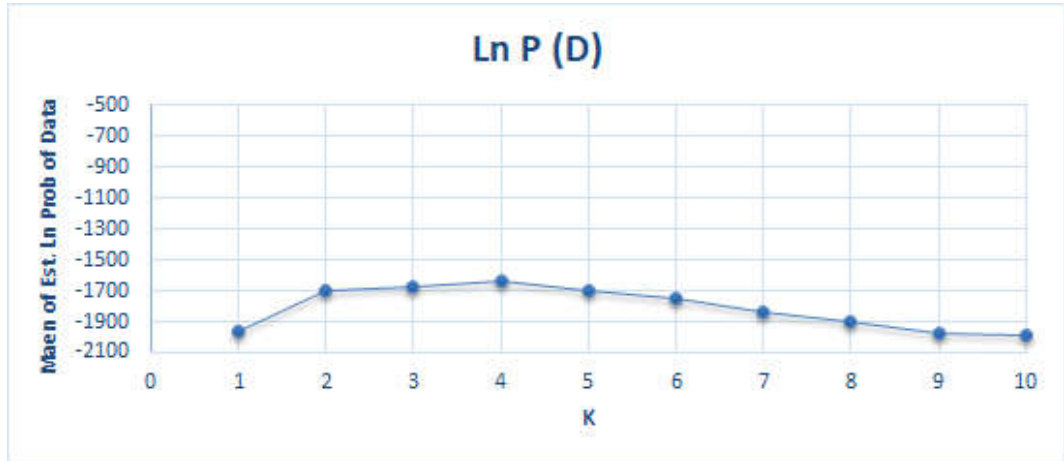
I. grup (Kırmızı renkle gösterilen genotipler= 1-42, 44, 48, 49, 67 ve 70 no'lu genotipler)

II. Grup (Yeşil renkle gösterilen genotipler=43, 45, 46, 47, 50-66, 68, 69, 71 ve 72 no'lu genotipler) populasyonları oluşturan lokasyonlarda genomik kompozisyon bakımından 2 ana populasyon için ayrışımın yanı sıra 44 (Muş Varto Akçatepe), 48 (Bingöl Çeltiksuyu), 49 (Bingöl Garip) ve 67 (Batman) ve 70 (Plato) no'lu populasyon örneklerinin I. gruba ait olduğu da belirlenmiştir (Çizelge 3.18).

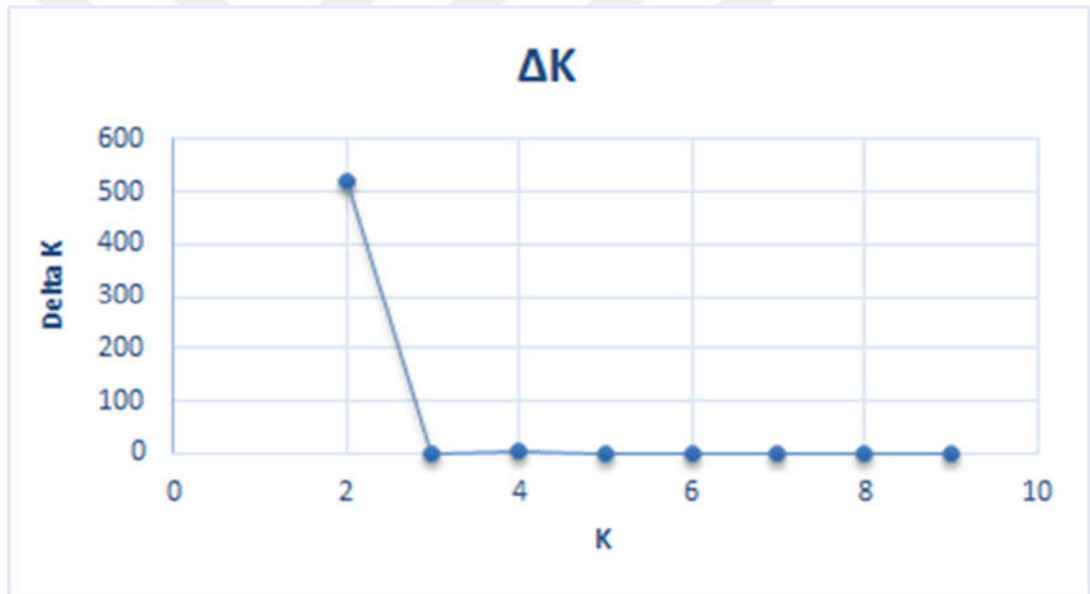
(Yonca hat lokasyonları Çizelge 3.1'de belirtilmiştir)

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

**Çizelge 4.3.** 72 yonca popülasyonu için ad hoc prosedürü (Pritchard et al. 2000) neticesinde elde edilen  $K=2$  değeri.

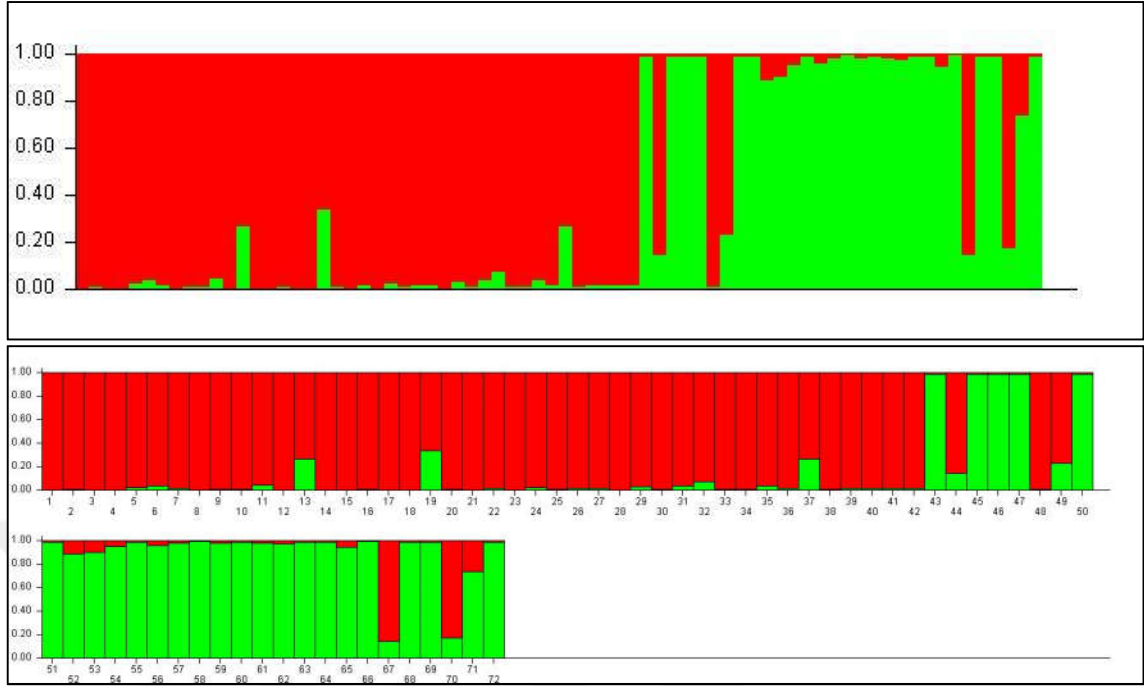


**Çizelge 4.4.** 72 yonca popülasyonu için  $\Delta k$  metodu (Evanno et al. 2005) neticesinde elde edilen  $K=2$  değeri.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

**Çizelge 4.5.** 72 yonca popülasyonu 16 SSR markörü ile 2 ana popülasyon (K=2) şeklinde kümeleşti.



(Yonca hat lokasyonları Çizelge 3.1’de belirtilmiştir)

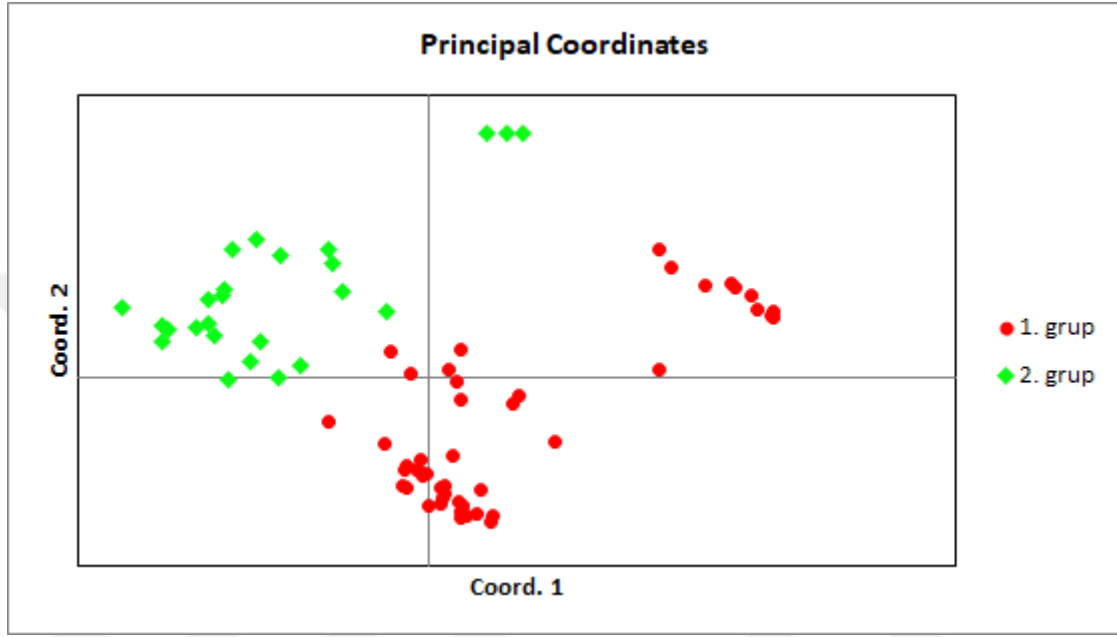
I. grup: (Kırmızı renkli genotipler) 1-42, 44, 48-49, 67 ve 70. Hat lokasyonları iken,

II. grup: (Yeşil renkli genotipler) 43, 45-47, 50-66, 68-69, 71-72. Hatlardan oluşmaktadır.

#### 4.4. Ana Komponent Analizi

Popülasyonlardaki varyasyonları belirlemek amacıyla GenAlEx6.1 (Peakall ve Smouse, 2001) programı kullanılarak Principal Component Analizleri (PCA) de yapılmıştır. 72 yonca popülasyonu arasındaki toplam %56’lık SSR genetik varyasyonunun %30’u PC1 tarafından %26’sı da PC2 tarafından açıklanmıştır (Şekil 4. 18). Elde edilen PCA sonuçları STRUCTURE analizi tarafından ortaya çıkarılan 2 ana popülasyonun ayrışmasını desteklemiştir. Fakat bu ayrışma sırasında I. grupta yer alan 3, 8, 9, 13, 15, 26, 34, 38, 39 ve 49 no’lu genotipler ile II. gruba ait 55, 60 ve 72 no’lu

genotiplerin (PCA grafiğinde 1.grup koordinatlarında bulunan yeşil 3'lü grup olarak görülmektedir.) kendi içlerinde genomik farklılaşma gösterdiği de görülmüştür. Ayrıca STRUCTURE analizinde 2. grupta konumlanan fakat genomik yapısı itibari ile I. grupta yer alması gereken 44, 48, 49, 67 ve 70 no'lu genotipler genetik varyasyonları temelinde PCA neticesinde de I. grupta yer alması gerektiği anlaşılmıştır (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** 72 yonca popülasyonuna ait SSR varyasyonu neticesinde kümelenme gösteren 2 ana popülasyon.

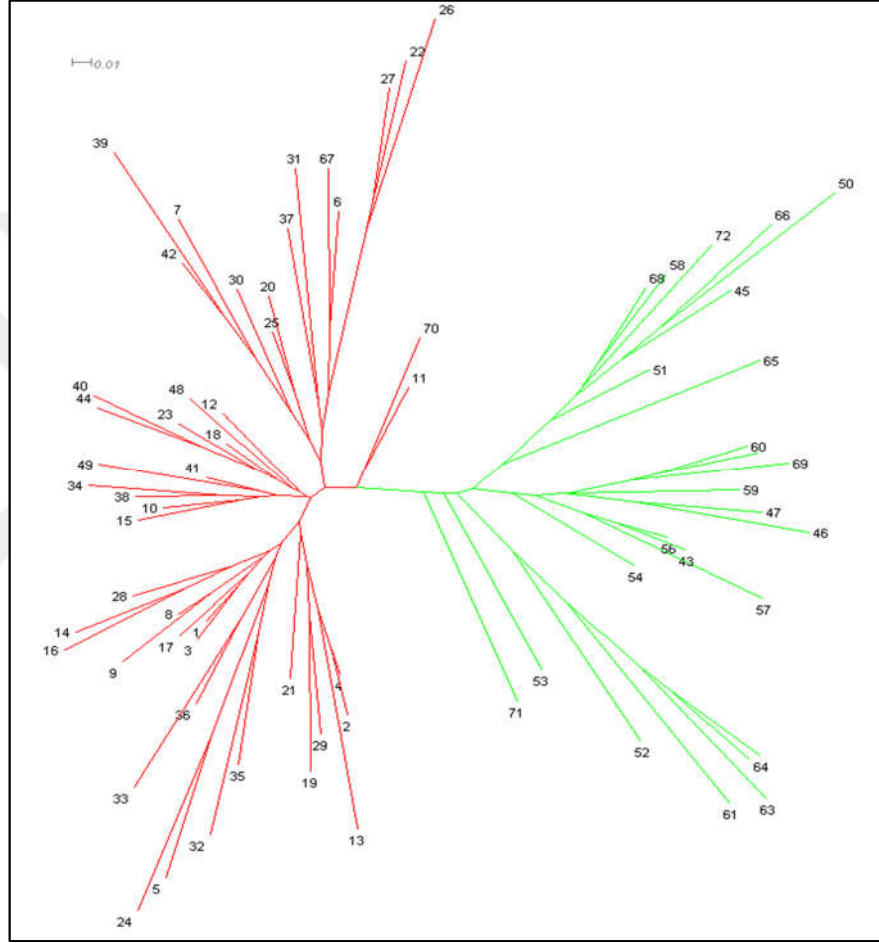
(Yonca hat lokasyonları Çizelge 3.1'de belirtilmiştir)

#### 4.5. Filogenetik Analizi

Hem STRUCTURE hem de PCA'dan elde edilen sonuçların doğrulanması amacı ile de filogenetik analizler çalışmaya dahil edilmiştir. Bu kapsamda yine POWERMARKÖR v3.25 (Liu and Muse, 2005) programı kullanılarak, allel frekansları hesaplanmış, allel frekansları temelinde Nei et al. (1983) tarafından geliştirilen yöntemle göre genetik mesafeler hesaplanarak filogenetik ağaç verileri elde edilmiştir. Elde edilen veriler en son olarak DENDROSCOPE programı (Huson et al. 2010) ile görselleştirilerek Neighbor-joining yöntemine göre dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 4.19). 72 popülasyon için oluşturulan Neighbor-Joining dendrogramı analiz edildiğinde

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

STRUCTURE ve PCA'dan elde edilen sonuçlar doğrulanarak popülasyonların net bir şekilde 2 ana küme şeklinde ayrıştığı görülmüştür. STRUCTURE analizinde 2. grupta konumlanan fakat genomik yapısı itibari ile I. grupta yer alması gereken 44, 48, 49, 67 ve 70 no'lu genotipler filogenetik analiz neticesinde de I. grupta yer alması gerektiği kesinleşmiştir. Bu farklılaşmalar aynı zamanda PCA analizi sonuçlarını da desteklemiştir (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** 72 yonca popülasyonunun 16 SSR primeri ile elde edilen genetik mesafeleri temelinde oluşturulan Neighbor-Joining dendrogramı (Nei et al. 1983).

(Yonca hat lokasyonları Çizelge 3.1 'de belirtilmiştir)

Dendrograma göre I. grup: 1-42, 44, 48-49, 67 ve 70. II. grup: 43, 45-47, 50-66, 68-69, 71-72. hatlardan oluşmaktadır.

### 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında Türkiye'nin farklı coğrafyalarından elde edilen yerel olarak yetiştirilen yonca (*Medicago sativa* L.) popülasyonlarına ait genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu amaçla farklı lokasyonlardan toplanan 72 farklı yonca popülasyonu kullanılmıştır. Genetik çeşitliliği değerlendirmek amacıyla son yıllarda oldukça yaygın olarak kullanılan SSR (Basit Dizi Tekrarları) markörleri PCR reaksiyonlarında çoğaltılarak bantlar belirlenmiş ve tüm analizler elde edilen bu verilerden gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta 30 SSR markörü taranmış fakat bu markörlerden polimorfik ve üretken olan 16 tanesi çalışmada kullanılmıştır. Kapsamlı olarak yapılan çeşitlilik analizinde tüm yonca popülasyonları için allel frekansları, majorallel frekansları, gen çeşitliliği, PIC değerleri, her bir primer için ortalama PIC değerleri, monomorfik ve polimorfik bant sayıları ile polimorfizm yüzdeleri hesaplanmıştır. Ayrıca çeşitlilik bilgilerinin yanısıra yerel yonca popülasyonlarının popülasyon bazında değerlendirmeleri de yapılmıştır. Bu amaçla genomik bilgilerine göre popülasyonlar STRUCTURE programı ile ayrılmış Principal Component Analizi (PCA) ve filogenetik analizler ile bu ayrışmalar doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde yerel yonca popülasyonlarında 0,28'lik bir gen çeşitliliği ortalaması yani beklenen heterozigoti değeri elde edilmiştir. 0,22'lük bir PIC ortalaması ve %85,3'lük polimorfizm oranı ise SSR markörlerinin bu çalışmada verimli ve kullanışlı olduklarını göstermiştir. Popülasyon analizi (STRUCTURE) sonuçları PCA ve filogenetik analiz sonuçlarını destekleyerek Türkiye'de yerel olarak yetiştirilen bu yonca popülasyonlarının 2 ana popülasyona ayrıştığını ve bu ayrışmalarda temel faktörün iklimsel ve coğrafik nedenli (yüksekti) olduğunu da ortaya çıkarmıştır. Genomik olarak yüksek düzeyde benzerliğin asıl nedeninin ise gen akışı mekanizmasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar ile özellikle yerel yonca genomunda gen akışı ve melezleşmelerden dolayı genetik çeşitliliğin daha yüksek düzeyde olduğu fikri daha da netlik kazanmıştır. Çünkü yabani ve yerel yonca gen kaynakları birincil ve ikincil gen havuzuna ait allelik çeşitliliği taşımaktadırlar.

Bu çalışmada kullanılan yonca popülasyonlarının çoğu Doğu Anadolu Bölgesi (Ağırlıklı olarak Van ili) yerel çeşitleridir. Genel olarak değerlendirildiğinde I. grupta yer alan yerel yonca popülasyonlarının özellikle Van ilindeki popülasyonlar, Muş, Bingöl,

Batman illerinde yer alan popülasyonlar oluşturmaktadır. İstisnai olarak Ticari Konya ve Sazova örneklerinin bu grupta genomik benzerlik göstermesinin asıl nedeni her iki çeşidin gen kaynağının bu bölgeden temin edilmiş olma olasılığı düşünülebilir. II. grupta yer alan popülasyonlar daha çok tescilli ticari çeşitler ile diğer bölgelere de uyum sağlayabilen yerel yonca popülasyonlarıdır (Muş, Uşak, Bingöl, Kayseri, Ağrı, Side, Bitlis, Sivas, Hınıs, Van, Erzurum, Ticari Savaş, Nimet, Alsancak, Bilensoy, Sazova, Tavlaş, Ferruh, Ömerbey ve MA-225 çeşitleri).

I. ve II. grupta, grup içlerinde SSR markörleri temelinde ortaya çıkarılan genomik benzerliklerin temel nedenleri arasında benzer gen kaynaklarının bulunmalarının yanısıra özellikle Van ili içerisinde benzer coğrafik-iklimsel koşullar ile yakın mesafeli gen akışı durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Uzak coğrafyalarda yer alan yonca popülasyonları genelde farklı gruplarda konumlanmışlardır. Aralarında önemli izolasyon bariyerlerinden dolayı sadece iklimsel koşullara adapte olabilenler insan eliyle diğer coğrafyalara taşınmıştır ya da ticari olarak Türkiye sınırları içerisinde değerlendirilmiştir. Yoncanın özellikle yabani çeşitlerinin orijin gen bölgesi olarak bilinen Doğu Anadolu Bölgesini de içerisine alan Kafkas bölgesinden dünyaya yayıldığı bilinmektedir. Dolayısıyla Türkiye'nin farklı coğrafyalarından elde edilen popülasyonların da bu bağlamda yüksek düzeyde allelik zenginliğine sahip olduğu da şüphesizdir. İslah çalışmalarında temel teşkil eden yabani ve yerel ırkların zaman içerisinde geliştirilerek modern ya da kültür çeşitlerinin oluşturulmasında yüksek düzeydeki allelik zenginlik ve gen havuzu birinci derecede önem arz etmektedir. Bu sebeple, ülkemizden toplanan yerel yonca popülasyonlarının genetik çeşitlilik düzeylerinin belirlenerek istenilen özellikler bakımından bunların ıslah çalışmalarında kullanılmaları gerekmektedir. Daha önce yoncada tanımlanmış olan SSR markörlerinin, yonca ve diğer canlılar için genetik çeşitlilik ve beraberinde ıslah çalışmalarında, popülasyon dinamiği ve moleküler genetik çalışmalarında oldukça kullanışlı araçlar oldukları görülmüştür. Ayrıca, ülkemizde yonca genetik kaynaklarının oluşturulması ve kullanılması açısından bu çalışmanın önemli bir referans olacağı düşünülmektedir. Bilimsel anlamda yonca genomu hakkında daha detaylı bilgiye sahip olmak ve elde edilen bilimsel verileri uygulamaya yönelik alanlarda kullanımına sunmak için daha fazla markör sayıları ile birlikte daha da farklı diğer moleküler metodolojilerin de kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Açıkgöz E. 1995. Yem bitkileri (II. Baskı). Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Basımevi, 456, Bursa.
- Açıkgöz E. 2001. Yem Bitkileri (3. Baskı). Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, 584, Bursa.
- Ahmad, R., Ferguson L., Southwick, S. 2003. Molecular markör analyses of Pistachio rootstocks by simple sequence repeats and sequence related amplified polymorphisms. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 80(3), 382-386.
- Alçıçek, A. 2002. Süt Sığırı Rasyonu Yapımında Temel İlkeler. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, 124-135, İzmir.
- Alçıçek, A., Tarhan, F., Özkan, K., Adışen, F. 1999. İzmir ili ve civarında bazı süt sığırcılığı işletmelerinde yapılan silo yemlerinin besin madde içeriği ve silaj kalitesinin saptanması üzerine bir araştırma. Hayvansal Üretim, 39-40, 1-63.
- Altıntaş, G., Altıntaş, A., Çakmak, E. 2017. Yem bitkileri üretiminde sürdürülebilirlik üzerine bir çalışma: Sivas ili örneği. Tarım Ekonomisi Araştırmaları Dergisi, 3(1), 38-51.
- Anonim, 2003. Web Sitesi: <http://www.izmir.edu.tr>, Erişim Tarihi: 15.08.2013.
- Anonymous, 2003. Web Sitesi: <http://www.novo.dk>, Erişim Tarihi: 15.08.2013. Anonim, 2016. Rapor. Türkiye Yem Bitkileri Üretimi, Mevcut Durumu ve Desteklemeleri. Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü, Tarım Havzaları Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- Barker, Bianchi, S., Blondon, F., Dattée, Y., Duc, G., Essad, S., Flament, P., Gallusci, P., Génier, G., Guy, P. 1990. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. Plant Molecular Biology Reporter, 8(1), 40-49.
- Bauchan, Greene, S.L 2002. Status of the *Medicago* germplasm collection in the United States. Plant Genetic Resources Newsletter, 129:1-8.
- Bauchan, Greene, S. L 2002. Status of the *Medicago* germplasm collection in the United States. International Plant Genetic Resources Institute 129:1-10.
- Bozcuk, S. 1986. Bitki Fizyolojisi. Hatipoğlu yayınevi, 89, Ankara.
- Cook, D. 1999. *Medicago truncatula* — a model in the making. Current Opinion in Plant Biolog, 2:301–304.
- Demiroğlu, T., Geren, G., Avcıoğlu, H., Avcıoğlu, R. 2008. Farklı yonca (*Medicago sativa* L.) genotiplerinin ege bölgesi koşullarına adaptasyonu. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 45(1), 1-10.

- Dong, P., Wei, Y.M., Chen G., Li, Wang, J.R., Nevo, E., and Zheng, Y.L. 2009. ESTSSR diversity correlated with ecological and genetic factors of wild emmer wheat in Israel. *Hereditas*, 146(1), 1-10.
- Doyle, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12-15.
- Duran, C., Appleby, N., Vardy, M., Imelfort, M., Edwards, D. 2009. Single nucleotide polymorphism discovery in barley using autoSNPdb. *Plant Biotechnology Journal*, 7(4), 326-333.
- Elçi, Ş. 2005. Baklagil ve buğdaygil yem bitkileri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. ISBN 975-407-189-6. 486, Ankara.
- Erol, S., Çarpıcı, E. 2021. Bursa İli'nden Toplanan Yonca (*Medicago sativa* L.) Genotiplerinde verim ve verim komponentleri arasındaki ilişkilerin korelasyon ve path analizi ile belirlenmesi. *Bursa Uludag Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 75-84.
- Erte, E., Güvenç, A., Kunter, B., Keskin, N., Mehmetoğlu, Ü. 2007. Effect of ultrasound as abiotic elicitor on the production of transresveratrol in *vitisvinifera* european congress of chemical engineering, September, Book of Abstracts, 16(20), 987-988, Copenhagen, Denmark.
- Ertuş, M. M., Sabancı, O., Şensoy, S. 2016. ISSR primerleri ile kültürü yapılan bazı yonca (*Medicago sativa* L.) ekotiplerinde moleküler farklılıkların belirlenmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 249-254.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Fahima, T., Röder, M. S., Wendelhake, K., Kirzhmer, V., Nevo, E., 2002. Microsatellite polymorphism in natural populations of wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, Israel. *Theor Appl Genetic*, 11(4), 3119-3127.
- Ferradini, N., Iannaccone, R., Capomaccio, S., Metelli, A., Armentano, N., Semeraro, L., Cellini, F., Veronesi, F., Rosellini, D. 2015. Assessment of heat shock protein 70 induction by heat in alfalfa varieties and constitutive over expression in transgenic plants. *PLoS One* 10(5), 1-15.
- Gençkan, S., 1992. Yem Bitkileri Tarımı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 467, İzmir.
- Gökalp, S., Yazıcı, L., Çankaya, N., İspirli, K., 2017. Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) çeşitlerinin Tokat-Kazova ekolojik koşullarında ot verimi ve kalite performanslarının belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34(3), 114-127.
- Grover, A., Sharma, C. 2015. Development and use of molecular markörs: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 190-302.

- Habulin, M., Knez, Z. 2001. Activity and stability of lipases from different sources in super critical carbondioxide and near critical propane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(2), 1260-1266.
- Havananda, T., Brummer, EC., Doyle, JJ. 2011. Complex patterns of autopolyploid evolution in alfalfa ve allies (*Medicago sativa*; Leguminosae). *American Journal of Botany*, 98(10), 1633-1646.
- Havananda, T., Brummer, C., Maureira, B., Ivan, J., Doyle, JJ. 2010. Relationships among diploit members of the *Medicago sativa* (Fabaceae) species complex based on chloroplast ve mitochondrial DNA sequences. *Systematic Botany* 35(1), 140-150.
- Huggins, R., Randall, W., Russelle, P. 2001. Subsurface drain losses of water and nitrate following conversion of perennials to row crops. *Agronomy Journal*, 93(3), 477-486.
- Hurtado, A., Romero, C., Vilanova, S. 2002. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armenica* L.) and mapping of PPV (sharka) resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2-3), 182-191.
- Huson, DH., Rupp, R., Scornavacca, C., 2010. *Phylogenetic Networks: Concepts, Algorithms and Applications*. Cambridge University. 61(1), 176-177.
- İlhan, D., Li, X., Brummer, C., Şakiroğlu, M. 2016. Genetic diversity and population structure of tetraploid accessions of the *Medicago sativa*-falcata complex. *Crop Science*, 56(3), 1146-1156.
- Kaçar, O., Göksu, E., Azkan, N. 2005. Bursa koşullarında farklı bakteri suşları ile aşılamanın bazı nohut (*Cicer arietinum* L.) çeşit ve hatlarında verim ve verim öğeleri üzerine etkisinin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42(3), 21-32.
- Kaya, K. 2018. Hatay ili yonca üretim alanlarında bulunan böcek faunasının tespiti ve bazı türlerin popülasyon yoğunlukları. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(3), 352-359.
- Kayak, N., Türkmen, Ö., Uncu, A., Dal, Y. 2018. Çerezlik kabak (*Cucurbita pepo* L.) Hatlarının SSR (Simple Sequence Repeat) Markörleri ile Karakterizasyonu *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*. 8(2), 17-24.
- Keskin, B., Temel, S., Eren, B. 2021. Determination of Quality Characteristics of Some Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Varieties in Iğdır Ecological Conditions. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2), 1568-1581.
- Keskin, B., Temel, S., Eren, B. 2020. Iğdır Ekolojik Şartlarında Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerine Ait Ot Verimlerinin Belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(3),757-764.
- Lateef, D. 2015. DNA Markör Technologies in Plants and Applications for Crop Improvements. *Journal of Biosciences and Medicines*, 3(5), 7-18.

- Li, T., Li, Y., Li, Z., Zhang, H., Qi, Y., Wang, T. 2008. Simple sequence repeat analysis of genetic diversity in primary core collection of Peach (*Prunus persica*). Journal of Integrative Plant Biology, 50(1), 102-110.
- Li, H., Wang, Z., Ke, Q., Ji, Y., Jeong, C., Lee, S., Lim, Y., Xu, B., Deng, P., Kwak, S., 2014. Overexpression of CodA Gene Confers Enhanced Tolerance to Abiotic Stresses in Alfalfa. Plant Physiology and Biochemistry, 85(2014), 31-40.
- Liu, J., Muse, S. 2005. PowerMarkör: an integrated analysis environment for genetic markör analysis. Raleigh, North Carolina State University, Bioinformatics Research Center, 21(9), 2128-2129.
- Lowe, J., Hinotte, O., Guarino, L., 1996. Standardization of Molecular Genetic Techniques for The Characterization of Germplasm Collections: The Case of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Plant Genetic Resources Newsletter, 107, 50-54.
- Mammadov, J., Jafar, A., Buyyarapu, R., Kumpatla, S. 2012. SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding. Hindawi, Publishing Corporation International Journal of Plant Genomics Article ID 728398, 1-12, USA
- Manga, İ., Acar, Z., Ayan, İ. 2003. Baklagil Yem Bitkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, 7(2), 143, Samsun.
- Matsuoka, Y., Mitchell, E., Kresovich, S., Goodman, M., Doebley, J. 2002. Microsatellites in Zea-variability, patterns of mutations and use for evolutionary studies. Theoretical and Applied Genetics, 104(2-3), 436-450.
- Mavi, K. 2009. Kabakgil türlerinde tohum gücü testlerinin kullanımı ve streskoşullarında çıkış ile ilişkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 190, Ankara.
- Mcintosh, S., Miller, A. 1981. Genetic and soil moisture effects on the branching root traits in alfalfa, Crop Science, 21, 15-18.
- Michaud, R., Lehman, F., Rumbaugh, D. 1988. World distribution ve historical development. Alfalfa ve alfalfa improvement, Agronomy monograph American Society of Agronomy, Crop Science Society of Agronomy, ve Soil Science Society of Agronomy, 29, 93-124, USA.
- Mirza, Z., Güvenç, A., Yıldız, N., Mehmetoğlu, Ü. 2008. Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Boyar Maddelerin Farklı Adsorbanlarla Giderimi, 8. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-8), 26-29 Ağustos, İnönü Üniversitesi, Bildiri Özetleri Kitabı, ÇDT-59, 277, Malatya.
- Nam, W., Penmetsa, R., Endre, G., Uribe, P., Kim, D., Cook, D. 1999. Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Medicago truncatula* ve identification of clones containing ethylene-response genes. Theoretical and Applied Genetics, 98, 638-646.

- Nei, M., Tajima, F., Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data, *Journal of Molecular Evolution*, 19, 153-170.
- Orak, A., Gökkaya, G. 2014. *Yonca Tarımı. İlgi Matbaacılık*, 2(3), 27-31. Ankara.
- Ovesna, J., Polakova, K., Leisova, L. 2002. DNA analyses and their Applications in Plant Breeding. *Czech Journal Genetics Plant Breeding*, 38(1), 29-40.
- Öten, M., Albayrak, S. 2016. Batı Akdeniz Sahil Kuşağından Toplanan Yonca (*Medicago sativa* L.) Populasyonlarının Moleküler Karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 220-225.
- Ozkan, U., Sevimay, S., Demirbağ., N. 2015. Yonca (*Medicago sativa* L.)' da kış dormansisi ve ölçüm metodu. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(1), 51-53.
- Parfitt, D., Badenes, M. 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(15), 7987-7992.
- Peakall, R., Smouse, E. 2001. GenA1Ex V6: genetic analysis in Excel population genetic software for teaching and research. *Australian National University*, 6(1), 288295.
- Peterson, W., Dong, Y., Horbach, C., Fu, Y. 2014. Genotyping-By-Sequencing for Plant Genetic Diversity Analysis: A Lab Guide for SNP Genotyping Diversity, 6(4), 665-680.
- Putnam, D., Russelle, M., Orloff, S., Kuhn, J., Fitzhugh, L., Godfrey, L., Long, R., 2001. Alfalfa, wildlife, and the environment. *California Alfalfa and Forage Association Novato, CA*, 20(3), 587-291.
- Pritchard, K., Stevens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Quiros, C., Bauchan, G., 1988. The genus *Medicago* ve the origin of the *Medicago sativa* complex, *Madison, WI*, 29(3), 93-124.
- Rafalski, A., Morgante, M., Powell, W., Vogel, J., Tingey, S. 1996. Generating and Using DNA Markörs in Plants, *Semantic Scholar*, 75-134.
- Riday, H., Brummer, E. 2002. Heterosis of agronomic traits in alfalfa. *Crop Science*, 42(4), 1081-1087.
- Röder, S., Plaschke, P., König, U., Börner, A., Sorrells, E., Tanksley, D., Ganai, W., 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics*, 246: 327-333.
- Savaş, G., Keleş, H., Göçmen, D., Güteryüz, V., Nizam, İ., Cabi, E., Yazıcı, A., Çakal, Ş., Tuna, M. 2016. Flow Sitometri ile Çok Yıllık Buğdaygil Yem Bitkisi Genetik Kaynaklarının Karakterizasyonu. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(2), 7-12.

- Schoch, L. 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database, Oxford University, 1-21.
- Semang, K., Bjornstad, A., Ndjioudjop, N., 2006. An Overview of Molecular Markır Methods for Plants. African Journal of Biotechnology, 5(25), 2540-2568.
- Sheaffer, C., Tanner, B., Kirkham, B. 1988. Alfalfa Water Relations And Irrigation. Alfalfa and Alfalfa Improvement. ASA, CSSA, SSSA Publishers. Madison: Ed. Hanson, A., Barnes, K., Hill, R. 373-409.
- Small E., Brookes B. 1984. Taxonomic circumscription and identification in the *Medicago sativa-falcata* (alfalfa) continuum. Journal of Economics, 38: 83-96.
- Small, E., Jomphe, M. 1989. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). Canadian Journal of Botany, 67(11), 3260-3294.
- Small, E., Jurzysta, M., Nozzolillo, C. 1990. The Evolution of Hemolytic Saponin Content in Wild ve Cultivated Alfalfa (*Medicago sativa*, Fabaceae). Economic botany, 44(2), 226-235.
- Small, E., Lefkovitch, P. 1982. Agrochemotaxometry of alfalfa. Canadian Journal of Plant Science, 62(4), 919-928.
- Soya, H., Avcioğlu, R., Geren, H. 2004. Yem Bitkileri. Hasad Yayıncılık, 45(1),11-19, İstanbul.
- Stebbins, Jr., Laurance, G. 1938. Cytological characteristics associated with the different growth habits in the dicotyledons. American Journal of Botany, 34(10), 189-198
- Starker, G., Parra L., Smith, L., Mitra, M., Long, R. 2006. Nitrogen Fixation Mutants of *Medicago truncatula* Fail to Support Plant ve Bacterial Symbiotic Gene Expression. Plant Physiology, 140(2), 671-680.
- Staub, E., Serquen, C., Gubta, M. 1996. Genetic markörs, map construction, and their application in plant breeding. Hort Science, 31, 729-740
- Stern, R. 2005. Yazılı görüşme. Batı Avustralya Üniversitesi Tarım Enstitüsü Agronomi Bölümü, Nedland, Avustralya.
- Şakiroğlu, M., Brummer, C. 2012. Presence of phylogeographic structure among wild diploit alfalfa accessions (*Medicago sativa* subsp. *microcarpa* Urb.) with evidence of the center of origin. Genetic Resourcer Crop Evolution, 60(1), 2331.
- Şakiroğlu, M., Doyle, JJ., Brummer, EC. 2010. Inferring population structure ve genetic diversity of broad range of wild diploit alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions using SSRmarkörs. Theoretical ve Applied Genetics, 121, 403-415.
- Şakiroğlu, M., İlhan, D. 2021. *Medicago sativa* species complex: Re-visiting the century old problem in the light of molecular tools. Crop Science, 61, 827- 838.
- Tan, M., 2018. Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları 256, 356.

- Tang, L., Cai, H., Ji, W., Luo, X., Wang, Z., Wu, J., Wang, X., Cui, L., Wang, Y., Zhu, Y., Bai, X., 2013. Overexpression of GsZFP1 Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology Biochemical*, 71: 22-30.
- Tekin, A., Aslan, E., Herek, S., Dokuyucu, T., Gezginç, H. 2017. Türkiye orjinli yulaf genotiplerinin basit dizi tekrarları markörleriyle karakterizasyonu. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(4), 378384.
- Tıknaçoğlu, B., 2009. Yem Bitkileri Tarımı ve Silaj Yapımı. İl Tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayını, Samsun.
- Tiryaki, İ., 2016. Yoncada (*Medicago sativa* L.) Kuraklık Stresi ve Tolerantlık Mekanizması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi* 19(3), 296-305.
- Touil, L., Guesmi, F., Fares, K., Zagrouba, C., Ferchichi, A. 2008. Genetic diversity of some Mediterranean populations of the cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using SSR markörs. *Journal of Biology Science*, 11(15), 1923-1928.
- Ürem, A. 1985. Türkiye’de önemli yem bitkilerinin üretimi, yetiştirilmesi ve bazı tescilli çeşitlerin özellikleri ile tohumluk sorunları. *Ege Bölge Zirai Araştırma Enstitüsü Yayınları* 27(1), 51-55. Menemen, İzmir
- Walther, G. 1959. Luzerne, Verlag Gerhard Rautenburg, Leer, 13, 272-282.
- Williams, K., Kubelik, R., Livak, J., Rafalski, A., Tingey, V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markörs. *nucleic acids research* 18, 6531-6535.
- Willis, G., Baskin, C., Baskin, J., Auld, J., Venable, D., Cavender, J. 2014. NESCent Germination Working Group. The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist*, 203, 300-309.
- Zhang, M., Zhang, M., Liu, H., Li, C., Guo, L., Li, L. 2015. The Wheat NHX antiporter gene tanhx2 confers salt tolerance in transgenic alfalfa by increasing the retention capacity of intracellular potassium. *Plant Molecular Biology*, 87(3), 317-27.
- Yorgancılar, M., Yakışır, E., Erkoyuncu, T. 2015. Moleküler markörlerin bitki ıslahında kullanımı. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 4(2), 1-12.