

TEŞEKKÜR

Bu alıőma konusunun belirlenmesinde ve bu çalıőmanın yűrűtűlűp sonuçlandırılmasında, bana her zaman yűn ve destek veren Saygıdeęer hocam Y.Doç.Dr İsmail GŪL'e, kuruluőun tűm olanaklarından yararlanmamı saęlayan Dicle Ŭniversitesi Ziraat Fakűltesi Dekanı sayın Prof.Dr. Doęan ŐAKAR'a, Bahçe ve Tarla Bitkileri Bűlűm baőkanları Sayın Y.Doç.Dr. Vedat PİRİNÇ ve Doç.Dr. Mehmet BAŐBAę'a, Laboratuar imkanlarımı sonuna kadar aan .Ŭ.Ziraat Fakűltesi Tarla Bitkileri Bűlűmű űęretim űyesi sayın hocam Doç.Dr. Hakan ŐZKAN'a ve aileme teőekkűrlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
AMAÇ.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
1.GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Morfolojik ve Tarımsal Özelliklerle ilgili Çalışmalar.....	4
2.2. Moleküler Analizlerle İlgili Çalışmalar.....	4
3. MATERYAL ve METOT.....	7
3.1. Materyal.....	7
3.2. Metot.....	7
3.2.1. Deneme Planı.....	7
3.2.2. İncelemelerin Yapılacağı Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	7
3.2.3. İncelenecek Özellikler.....	10
3.2.3.1. Vejetatif Özellikler.....	10
3.2.3.2. Generatif Özellikler.....	10
3.2.4. DNA Analizi.....	10
3.2.4.1. DNA İzolasyonu.....	10
3.2.4.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	11
3.2.4.3. ISSR Analizi.....	12
3.2.4.4. Elektroforez.....	13
3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi.....	13
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	14
4.1. Vejetatif Özellikler.....	14
4.1.1. Bitki Boyu.....	14
4.1.2. Ana dal sayısı (bitki\adet).....	15
4.1.3. Yaş ot ağırlığı (gr).....	16
4.1.4. Kuru ot ağırlığı (gr).....	17
4.2. Generatif Özellikler.....	18
4.2.1. % 50 çiçeklenme süresi.....	18
4.2.2. Tek meyvedeki tohum sayısı (adet/meyve).....	19
4.2.3. Meyve Çapı (mm).....	20
4.2.4. Tohum verimi(gr/bitki).....	21
4.3. ISSR Analizleri.....	22
5.KAYNAKLAR.....	28
6.ÇİZELGE LİSTESİ.....	33
7.ÖZGEÇMİŞ.....	34

AMAÇ

Türkiye’de doğal florada bulunan ve genetik varyasyon gösteren buton (Diskvari) yoncaların morfolojik özelliklerini ve ISSR DNA moleküler işaretleyicisi ile moleküler özelliklerini inceleyerek, bu genotipler arasındaki genetik benzerlik ve uzaklıkları saptamak, çeşitlerin genetik tabanını ortaya koymak, incelenen buton yonca genotipleri için DNA parmak izini tespit etmek ve genotip kütük defteri oluşturmak amacıyla sürdürülmüştür.

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİNDEN TOPLANAN BUTON YONCASININ (*Medicago orbicularis*) MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Saadet ALINCA

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd.Doç.Dr. İsmail GÜL
Yıl: 2008, Sayfa:34
Jüri: Yard.Doç.Dr. İsmail GÜL
Yrd.Doç.Dr. Mehmet YILDIRIM
Doç.Dr.Hakan ÖZKAN

Bu araştırma, farklı buton yonca genotiplerinin morfolojik özellikleri ve adaptasyonları ile DNA işaretleyicileri kullanılarak ISSR yöntemiyle moleküler karakterizasyonunun saptanması amacıyla yürütülmüştür.

Buton yoncası; Akdeniz bölgesi orjinli tek yıllık serin mevsim bir baklagildir. Tek yıllık yonca türlerinin şimdye kadar ülkemizde mera ve yembitkileri alanları için bir çeşidi ortaya konulamamıştır.

Denemede vejetatif gözlemler bitkilerin % 50 çiçeklenme döneminde, generatif özellikler fizyolojik dönemde alınmıştır. Moleküler farklılıklar 14 adet ISSR primeri kullanılarak saptanmıştır.

Güneydoğu Anadolu Bölgesinin 17 farklı ekolojik ve coğrafik kısımlarından toplanan buton yoncasının (*Medicago orbicularis*) genetic yapısı ve çeşitliliği; Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarında ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) yöntemi ile analiz edilmiştir. Jackard benzerlik katsayısı 17 buton yonca genotipinde 0,63 ile 1.00 arasında değişmiş olup, ortalama 0.70 olarak bulunmuştur. A ve B olmak üzere iki ana grup oluşmuştur. A grubu kendi içinde ilk önce ikiye ayrılmıştır. A1 grubunun grubunda Kulp, Diyarbakır, eğil-1, Eğil-2, idil ve Ovabağ yer almıştır.İkiye bölünün A2 grubunun bir grubunda Silvan, Hilvan, Adıyaman, Derik, Malabadi ve erdurağı yer alırken diğer grubunda Gaziantep, Çermik, Ergani ve Palanlı yer almıştır.

Anahtar Kelimeler: Buton yoncası, *Medicago orbicularis*, DNA, ISSR, morfolojik özellikler

ABSTRACT

MsC THESIS

DETERMINATION OF MOLECULAR CHARACTERIZATION, WITH MORPHOLOGICAL TRAITS AND ADAPTATIONS OF BUTTON MEDIC (*Medicago orbicularis*) COLLECTED FROM SOUTHEASTERN TURKEY.

Saadet ALINCA

DEPARTMENT OF FIELD CROPS
INSTITUTE OF NATUREL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

Supervisor: Yrd.Doç.Dr. İsmail GÜL

Year: 2008, Pages:34

Jury: Yrd.Doç.Dr. Mehmet YILDIRIM

Doç.Dr.Hakan ÖZKAN

The aim of this study was to investigate morphological traits of button medic genotypes and determine their molecular characterization by the using of ISSR methods.

Button medic is a cool-season annual legume that originated in the Mediterranean region and has become naturalized throughout most of Turkey. Annual *Medicago* spp, have not been recommended as a pasture and forage varieties for our country.

Vegetative traits will be assessment at % 50 anthesis period; however generative trait was measured at physiologically period. Molecular diversity was studied by using 14 of ISSR primers.

To assess the genetic diversity and the genetic structure of wild button medic (*Medicago orbicularis*) of Southeastern Anatolian Region, some genotypes collected from fifteen ecologically and geographically different locations was analyzed by means of ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) at Cukurova University, Agricultural Faculty, Biotechnology Laboratory. According to the Jaccard's similarity index, similarity between genotypes ranged from a minimum of 0,63 to a maximum of 1, the average being 0.70. In the dendogram obtained from similarity index data plants of 17 genotypes formed two main groups, as A and B. Group A was divided two (A1 and A2) sub-groups. Kulp, Diyarbakır, Eğil-1, Eğil-2, idil ve Ovabağ fell in to sub-group of A1. At dividing A2 group, one groups was Silvan, Hilvan, Adıyaman, Derik, Malabadi ve Erdurağı, in other group Gaziantep, Çermik, Ergani and Palanlı fell in to sub-group A2.

Key Words: Button medic, *Medicago orbicularis*, DNA, ISSR, morphological traits

1.GİRİŞ

Tüm dünya uluslarında olduğu gibi ülkemizde de en önemli temel hedef, insanlarımızın yeterli beslenmesi için gereken miktar ve kalitedeki gıda üretilmesidir. İnsanoğlunun beslenmesi hayvansal ve bitkisel gıdalara dayanmaktadır. Kompleks bir varlık olan insanın sağlıklı bir şekilde yaşamını sürdürebilmesi için hem bitkisel ve hem de hayvansal gıda maddelerine gereksinim vardır. Ülkemizde yeterli bitkisel gıda maddeleri üretimi açısından halen önemli bir sorun bulunmamasına karşılık, insanlarımız sağlıklı beslenebilmeleri için gerekli miktarda hayvansal gıda maddeleri tüketememektedir. Ülkemiz insanların yeterli hayvansal gıda maddesi tüketememesinin nedeni, ülkemiz hayvancılığının karşı karşıya bulunduğu sorunlardan kaynaklanmaktadır. Ülkemiz hayvancılığının en önemli sorunlarından birisini, hayvanlarımızın yeterince beslenememesi oluşturmaktadır. Ülkemiz hayvancılığı, doğal çayır meralara dayalı ekstansif bir hayvancılıktır. Ancak doğal çayır-meralarımız, uzun yıllardan beri amenajman kuralları uygulanmaksızın otlatılmaları veya biçilmeleri sonucu verim potansiyellerini büyük ölçüde kaybetmişlerdir. Meralarımızın bir çoğunda bitki ile kaplı alan oranı %10-15 civarındadır (Tükel ve Hatipoğlu, 1997). Diğer taraftan, hayvancılığın bir diğer önemli kaba yem kaynağı olan yem bitkileri tarımı ülkemizde yeterince gelişmemiştir. Ülkemizde halen üzerinde işlemeli tarım yapılan alanların yalnızca % 3.5'inde yem bitkisi yetiştirilmektedir (TÜİK, 2006). Buna karşılık, hayvancılığı gelişmiş ülkelerde bu oran en az % 25'dir.

Ülkemiz hayvancılığının beslenme sorununun çözülebilmesi için, doğal çayır-meralarımızın uygun ıslah yöntemleri ile ıslah edilerek yeniden kaliteli ve bol yem üretir duruma getirilmeleri yanında, yem bitkileri tarımının da geliştirilmesi gerekir. Yem bitkileri tarımının geliştirilebilmesi için, ülkemizin farklı ekolojik bölgelerinde kaliteli ve yüksek ot verimi verebilecek yem bitkisi tür ve çeşitlerinin saptanması ve bunların yeterli miktarda tohumlarının üretilmesi gerekmektedir. Meralarda bulunan ve mera için önem arz eden türlerin özelliklerinin saptanması ve bunlardan çeşit geliştirilerek mera ıslahında kullanılması büyük önem arz etmektedir. Yürütülen araştırmalarda, değişik ekolojik bölgelerimizde yetiştirilebilecek yem bitkisi türleri

saptanmış durumdadır. Ancak, söz konusu türlerin mevcut ekolojik koşullarda en yüksek ve en kaliteli verimi verebilecek çeşitlerinin geliştirilmesi ve bu çeşitlerin yeterli miktarda tohumlarının üretilmesi gerekmektedir. Bir çok yem bitkisi türünün ana vatanı olan ülkemizde, yem bitkileri ıslahına gereken önem verilmemiştir. Bugüne kadar üniversiteler ve kamu araştırma kuruluşları tarafından yürütülen bitki ıslahı çalışmalarında, yem bitkileri ıslahı konusu çok az yer bulmuştur. Bu duruma neden olarak, her şeyden önce bu konuda talep olmaması gösterilebilirse de, ülkemizdeki yem bitkisi gen kaynaklarının yeterince değerlendirilmemiş olması, yem bitkileri ıslah çalışmalarının diğer kültür bitkilerinin ıslahına göre daha zor olması, ülkemizde yakın zamana kadar ıslahçı hakları ile ilgili yasal düzenlemelerin bulunmaması gibi nedenler de ülkemizde yem bitkileri ıslahı çalışmalarına gereken önemin verilmemesi ile ilgili nedenler arasında sayılabilir.

Morfolojik ve biyokimyasal işaretleyicilerinin yerine son yıllarda çeşitlerin karakterizasyonunda, DNA işaretleyicileri kullanılmaya başlanmıştır. Bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılan ilk DNA işaretleyicisi RFLP'dir (Tanksley ve ark., 1989). Ancak bu yöntemin maliyetinin çok yüksek ve yavaş olması, PCR'a dayalı moleküler işaretleyicilerin gelişmesine neden olmuştur. Bunlardan bazıları, RAPD (Random Amplified Polimorphic DNAs), AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphisms), SSR (Simple Sequence Repeats) ve ISSR (Intersimple Sequence Repeats)'dir. Bu tekniklerden RAPD (Random Amplified Polimorphic DNAs), AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphisms), SSR (Simple Sequence Repeats) ve ISSR (Intersimple Sequence Repeats) DNA işaretleyicileri, kültür bitkilerinde genetik çeşitliliğin saptanmasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda polimorfizm bakımından SSR ve AFLP işaretleyicileri, maliyet bakımından RAPD ve ISSR teknikleri, tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, ISSR ve AFLP işaretleyicilerinin avantajlı oldukları belirlenmiştir. Bunların ötesinde çalışılacak laboratuvar olanakları göz önünde bulundurulduğunda, RAPD, SSR ve ISSR yöntemlerinin radyoaktif madde kullanımının olmadığı ve araştırma koşulların sınırlı olduğu laboratuvarlarda rahatlıkla kullanılacak yöntemler olduğu bildirilmiştir

(Belaj ve ark., 2003; Mignouna ve ark., 2003; Rana ve Bhat, 2004; Kwon ve ark., 2004).

ISSR DNA işaretleyicisi, son yıllarda yoğun olarak kültür bitkilerin karakterizasyonunda kullanılmıştır (Zietkiewicz ve ark. 1994; Liu ve Wendel 2001; Hollingsworth ve ark. 1998; Gyulai ve ark. 2000; Gupta ve ark. 1994, 2000; Godwin ve ark. 1997; Gillings ve ark. 1997; Gilbert ve ark. 1999; Ge ve ark. 1999; Fang ve ark. 1997, 1998, Esselman ve ark. 1999; ,de Oliveira ve ark. 1996; Davis, 1999; Chen ve ark. 1998; Charters ve ark.1996, 2000; Cavan ve ark. 2000; Blair ve ark. 1999; Basik ve ark. 1997; Barcaccia ve ark. 2000; Arcade ve ark. 2000; Albani ve ark. 1998; Akagi ve ark. 1996; Ajibade ve ark. 2000).

Türkiye’de daha tescili bile yapılmamış buton (diskvari) yoncanın bugüne kadar morfolojik özellikleri detaylı olarak incelenmemiş ve rapor edilmemiştir. Aynı zamanda buton yoncaların DNA düzeyinde genetik çeşitliliğin saptanması üzerine ayrıntılı araştırmalar yapılmadığından, çeşitler arası genetik benzerlikler veya farklılıklar ortaya konulamamıştır. Ülkemizde yetiştirilebilecek buton yoncaların DNA düzeyinde tanımlamasının yapılması, ülkemizde bu konuda çalışma yapanlar için büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışma; Türkiye’de doğal florada bulunan ve genetik varyasyon gösteren buton yoncaların morfolojik özelliklerini ve ISSR DNA moleküler işaretleyicisi ile moleküler özelliklerini inceleyerek, bu genotipler arasındaki genetik benzerlik ve uzaklıkları saptamak, çeşitlerin genetik tabanını ortaya koymak, incelenen buton yonca genotipleri için DNA parmak izini tespit etmek ve genotip kütük defteri oluşturmak amacıyla sürdürülmüştür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Morfolojik ve Tarımsal Özelliklerle İlgili Çalışmalar

Anonim (2008), diskvari yonca ya da buton yonca ülkemiz meralarında bulunan 10-40 cm boyunda, tek yıllık, genellikle tüsüz otsu bir bitkidir. Korolla çoğunlukla sarı, bazen morumsu mavi damarlıdır. Taşlık alanlar, nadasa bırakılmış tarlalarda ve meralarda bulunur.

2.2. Moleküler Analizlerle İlgili Çalışmalar

Metais ve ark. (2000), 24 fasulye çeşidinde polimorfizm ve genetik ilişkileri saptamak amacıyla RFLP, DAMD-PCR, ISSR ve RAPD markörlerini karşılaştırmışlardır ve DAMD-PCR tekniğinin çoğaltılan lokus sayısının azlığı nedeniyle fasulye çeşitleri arasındaki genetik varyasyonun belirlenmesinde yetersiz kaldığını, test edilen 5 ISSR primerinden yalnızca birinin çoklu band profili oluşturduğu ve bunun da farklı fasulye çeşitlerini ayırt etmede yetersiz kaldığını, kullanılan 7 RAPD primerinin test edilen fasulye genotiplerini ayırt etmek için yeterli RAPD profili oluşturduğunu, aynı coğrafik bölge orijinli çeşitlerin aynı grup içerisinde yer aldığını saptamışlardır.

Chowdhury ve ark. (2002), 19 nohut çeşit ve hattında genetik ilişkileri saptamak amacıyla 22 RAPD ve 22 ISSR markörü kullanmışlar ve 6 genotipi genotipe özel markörler ile tanımlamışlardır. ISSR primerleri RAPD primerlerine göre daha az markör oluşturmuştur. Buna karşılık ISSR primerleri RAPD primerlerine göre daha yüksek polimorfizm oluşturmuştur. İncelenen nohut çeşitlerinde homojenliğin yüksek olduğu, benzer genetik tabana sahip genotiplerin daha yakın genetik ilişkiye sahip olduğu, benzer tohum tipindeki genotiplerin benzer grup içerisinde yer aldığı saptanmıştır.

Potokina ve ark. (2002), Rusya'da Vavilov Enstitüsünde bulunan ve Sovyetler Birliği'nin farklı bölgelerinden toplanmış olan 673 adi fiğ populasyonu ve Almanya'daki Bitki genetik Enstitüsünde bulunan dünya koleksiyonundan seçilen 450 adi fiğ populasyonu ile sürdürdükleri araştırmada 111 AFLP primer kombinasyonundan seçilen 6 primer ile 70 farklı polimorfik band elde etmişlerdir.

Söz konusu polimorfik bandların ortaya çıkış frekansı populasyonlara bağlı olarak farklılık göstermiştir.

Reddy ve ark. (2002), ISSR (Inter simple sequence repeat) tekniğinin, çok lokuslu markörleri oluşturmak amacıyla PCR'da primer olarak mikrosatellit sekanslarını kullanan bir teknik olduğunu, tekniğin basit ve hızlı bir metod olduğunu, ISSR markörlerinin oldukça polimorfik olduğunu ve tekniğin genetik çeşitlilik, filogenetik, gen işaretleme, gen haritalaması ve evolüsyon biyolojisi çalışmalarında kullanışlı bir teknik olduğunu bildirmektedirler.

Galvan ve ark. (2003), Arjantin orijinli 10 ve Fransa orijinli üç fasulye genotipinde genetik çeşitliliği ve genotipler arası ilişkileri saptamak amacıyla 23 ISSR primeri kullanmışlar ve bu primerlerin 9 adedinin polimorfik olduğunu, bu polimorfik primerlerin 75 adet polimorfik band oluşturduğunu, oluşan bandların büyüklüğünün 300-2400 bp arasında değiştiğini, 33 adet polimorfik bandın tanımlanabilir olduğunu, trinükleotid motif primerleri ile oluşturulan ISSR markörlerinin % 53'ünün polimorfik olmasına karşılık, dinükleotid primerleri ile oluşturulan ISSR markörlerinin % 38'inin polimorfik olduğunu, ISSR markörlerinin incelenen genotipleri Peru ve Arjantin gen havuzu orijinli ve Orta Amerika gen havuzu orijinli olmak üzere iki gruba ayırdığını, Fransa orijinli genotiplerin Peru ve Arjantin gen havuzu orijinli grup ile % 72 genetik benzerlik gösterdiğini, Fransa orijinli genotiplerin Arjantin orijinli genotiplere göre daha az genetik varyasyon gösterdiğini saptamışlardır.

Dangi ve ark. (2004), farklı orijinli 17 *Trigonella foenum-graecum* ve 9 *T. Coerulea* populasyonunda ISSR ve RAPD markörlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, her iki türün farklı coğrafik bölgelerden toplanan farklı populasyonlarının farklı grupları oluşturduğunu, Pakistan ve Afganistan orijinli *T.foenum-graecum* populasyonların aynı grup içinde yer aldığını, Hindistan ve Nepal orijinlilerin ise diğer bir grupta yer aldığını, Türkiye orijinli populasyonların farklı gruplara dağıldığını saptamışlardır.

Aydınoğlu ve ark. (2005), Antalya koşullarında 10 fiğ hattı ile sürdürdükleri araştırmalarda tohum verimi ve verim komponentlerini incelemişler ve çeşitler arasındaki genetik farklılık ve benzerlikleri ortaya koymak için minisatellit

markörlerini kullanmışlardır. Araştırmada, hatların tohum verimi ve verim komponentleri açısından önemli farklılıklar gösterdiği, incelenen hatlarda 1000 tane ağırlığının 34-80 g, boğumda meyve sayısının 1-2 adet, bitkide meyve sayısının 3-73 adet, meyveli boğum sayısının 2-10 adet, meyvede tohum sayısının 3-8 adet, çiçeklenme süresinin 125-159 gün, bitki boyunun 20-104 cm, yaprakçık sayısının 8-16 adet arasında değiştiği, tohum verimi ile bitkide meyve sayısı, meyveli boğum sayısı, meyvede tohum sayısı, çiçeklenme süresi, bitki boyu ve yaprakçık sayısı arasında olumlu ve önemli ilişki, tohum verimi ile 1000 tane ağırlığı ve boğumda meyve sayısı arasında ise olumlu ve önemsiz ilişki olduğu saptanmıştır. 12 adet minisatellit primeri kullanılarak yapılan genetik ilişki incelemesinde çeşitlerin tohum verimleri ve 1000 tane ağırlıkları ile genetik yakınları arasında önemli bir ilişki olduğu saptanmıştır.

Talhinhas ve ark. (2005), 61 yabancı lüpen (*Lupinus angustifolius*) popülasyonu ve 27 lüpen çeşit ve hattı ile sürdürdükleri araştırmada, incelenen materyalin morfolojik özellikler açısından önemli bir varyasyon gösterdiğini, moleküler analizler için 3 ISSR primeri kullanılarak 25 band elde edildiğini, incelenen 35 popülasyon arasındaki benzerlik katsayısının 0.5185 ile 0.9767 arasında değiştiğini, markörlerden yararlanılarak yapılan gruptamada modern çeşitlerin yabancı popülasyon içerisinde bir alt grup olarak ortaya çıktığını, bu durumun ise modern çeşitlerin dar bir genetik tabana dayandığını gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ünverdi (2007), Türkiye’de tescil ettirilmiş 10 fiğ çeşidi arasındaki moleküler farklılıklarını belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada, Jaccard benzerlik katsayısı 10 fiğ çeşidinde 0.36 ile 0.62 arasında değiştiğini, ortalama 0.52 olarak tespit etmiştir. ISSR analiz sonuçlarına göre 10 fiğ çeşidi iki ana gruba ayrıldığını bildirmektedir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Araştırmada buton yonca genotipi olarak, Güneydoğu Anadolu bölgesinde doğal floradan toplanan 17 adet genotip incelenmiştir.

Çizelge 3.1. Buton yoncaların toplandığı yer ve özellikleri

Toplanan yer	Toplanma tarihi	Elevation (m)	Latitude (°N)	Longitude (°E)
Kulp zeyrek	08.07.2006	854	38°28'11.0"	40°51'39.1"
Silvan baraj göleti	09.07.2006	620	38°08'31.4"	41°00'29.2"
Gaziantep	06.06.2006	891	37°07'39.8"	37°23'26.9"
İdil	31.07.2006	773	37°34'00.2"	41°90'00.0"
Derik	07.07.2006	780	37°22'00.1"	40°16'00.0"
Çermik-Petekkaya köyü	01.08.2006	710	38°13'99.0"	39°45'99.0"
Diyarbakır fakülte önü	20.07.2006	650	37°54'52.4"	40°16'21.2"
Malabadi	27.06.2006	613	38°09'13.5"	41°12'12.6"
Alatosun karacadağ	25.07.2006	1252	37°37'00.5"	40°04'00."
Erdurağı Kurtalan	04.08.2006	630		
Eğil-1	05.08.2006	900	38°15'24.4"	40°05'00.2"
Ovabağ	05.08.2006	670	37°43'00.8"	39°59'00.3"
Hilvan	12.08.2006	600	37°35'21.2"	38°57'13.2"
Eğil-2	10.18.2006	900	38°15'24.4"	40°05'00.2"
Adıyaman Esence köyü	08.07.2006	850	37°75'24.4"	38°25'22.4"
Ergani mildağı	18.08.2006	957	38°15'21.5"	39°41'43.8"
Adıyaman palanlı köyü	24.08.2006	750	37°49'55.4"	38°18'36.2"

3.2. Metot

3.2.1. Deneme Planı

Araştırma; laboratuvar koşullarında viyollere ekilen tohumların, daha sonra plastik torbalara ekilmesi ile oluşturulmuş 10 bitkiden ibarettir.

3.2.2. İncelemelerin Yapılacağı Bitkilerin Yetiştirilmesi

Deneme, tek bitki deneme deseninde 10 tekrarlamalı olarak kurulmuştur. Denemede ekim, viyollere 8 Kasım 2006 tarihinde yapılmış, 20 kasımda plastik torbalara şaşırtılmıştır. Araştırmada değerlendirmeler tek bitki üzerinden yapılmıştır.

Generatif ve vejetatif özelliklerin inceleneceği DNA analizleri için bitki materyalleri bu torbadaki bitkilerden alınmıştır.

Araştırmada, vejetatif özellikler % 50 çiçeklenme döneminde; generatif özellikler ise hasat olgunluğu döneminde 10 bitkide yapılmıştır.

Moleküler incelemelerde kullanılacak bitki örnekleri, bitkilerin 4-5 yapraklı olduğu dönemde her yöre grubundan tek torbadaki bitkilerin genç yapraklarından yaklaşık 10 g alınarak elde edilmiştir. Denemeden çekilmiş bazı resimler görülmektedir.

Resim 1. Denemeden bazı resimler





3.2.3. İncelenecek Özellikler

3.2.3.1. Vejetatif Özellikler

Bitki boyu (cm): Bitkinin doğal durumunu bozmadan, toprak yüzeyi ile bitkinin en uç noktası arasındaki yükseklik her parselin 10 farklı noktasında ölçülecek ve bu değerlerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Ana dal sayısı (bitki/adet): Her parselden seçilen 10 bitkide bitkinin birinci derecedeki dalları sayılıp, ortalaması alınarak belirlenmiştir.

Yaş ot ağırlığı (gr): Kök boğazından kesilen bitkilerin toprak üstü aksamaları 0,1 g hassasiyetli terazide tartılıp ortalaması alınarak belirlenmiştir.

Kuru ot ağırlığı (gr): Yaş ot ağırlığının belirlenmesi amacıyla hasat edilen bitkilerin kurutma dolabında 70 °C'de ağırlıkları sabitleninceye kadar tutularak ve daha sonra 0,01 grama kadar hassas terazide tartılarak kuru ot ağırlıkları belirlenmiştir.

3.2.3.2. Generatif Özellikler

% 50 çiçeklenme süresi (gün): Her parselde, bitkilerin % 50'sinin 1-4 çiçek oluşturdıkları tarih ile ekim tarihi arasındaki gün sayısı olarak hesaplanmıştır.

Meyvede tohum sayısı(bitki/adet): 10 bitkideki tohum sayısının sayılmasıyla elde edilen değerlerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Meyve genişliği(mm): 10 bitkide her bitkideki aynı 10 meyvenin orta yerinden en geniş kısım kompasla 0,01''mm''duyarlıkta ölçülerek ortalamaları kayıt edilmek suretiyle hesaplanmıştır.

Tohum verimi(gr/bitki): Bitkilerinin meyveleri el ile harman edildikten sonra 0.01 grama hassas terazide tartılarak değerler bulunmuş ve bunların hesaplamaları yapılarak ortalamalarının alınmasıyla hesaplanmıştır.

3.2.4. DNA Analizi

3.2.4.1. DNA İzolasyonu

Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Uygulama ve Araştırma alanında yukarıda açıklandığı şekilde kurulan denemeden her popülasyonu temsilen 4-5 bitkiden alınan genç yapraklar bulk olarak hasat edilmiştir.

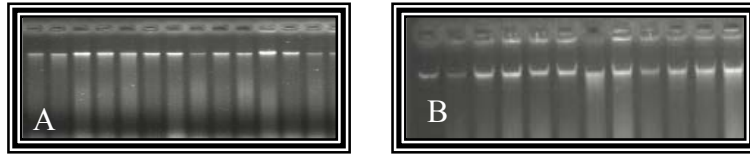
Laboratuvara getirilen bu genç yapraklardan Doyle ve Doyle (1987)'nin bildirmiş olduğu yönteme göre bulk olarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

Laboratuvara getirilen örnekler, sıvı azot yardımıyla havanda öğütüldükten sonra 2 ml'lik eppendorf tüplere alınmış ve üzerine 1 ml CTAB DNA izolasyon çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra tüpler 65⁰C'de 1.5 saat su banyosunda bekletilmiştir. Tüpler su banyosunda iken her 10 dakikada bir nazıkçe çalkalanmıştır. Su banyosundan çıkarılan tüpler, oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış (yaklaşık 15-20 dk) ve daha sonra bu tüplere 0.5 ml kloroform:isoamil alkol karışımı (24:1) eklenmiş ve yine elde nazıkçe 15 dk çalkalanmıştır. Daha sonra tüpler 10 dk süre ile 12 000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj yapılan tüplerin üst fazları alınarak 1.5 ml'lik yeni eppendorf tüplere aktarılmıştır. Bu tüplerin üzerine 300 ul isopropanol eklenmiş ve yavaşça tek faz haline getirilerek DNA'nin çökeltilmesi sağlanmıştır. DNA dipte kalacak şekilde tüm sıvı dökülmüş ve DNA örneği iki defa içerisinde 10mM Amonyum Asetat bulunan % 76'lik etil alkol ile yıkanmış ve örnekler oda sıcaklığında bir gece boyunca tutularak kuruması sağlanmıştır. Kuruyan DNA örneklerine 50 ul ddH₂O eklenerek çözülmesi sağlanmış ve çözülen DNA örnekleri -20⁰C'de saklanmıştır.

3.2.4.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Herhangi bir DNA moleküler markör tekniği ile çalışırken bitki örneklerinden elde edilen DNA'nın kalitesi ve konsantrasyonu bilinmesi çok önemlidir. Bundan dolayı DNA konsantrasyonunun çok iyi ayarlanması ve kalitesinin iyi olması gerekmektedir. Elde edilmiş DNA örneklerinde ilk önce DNA kalitesini ve elde edilen DNA örneğinin konsantrasyonunu belirlemek için 2 ul DNA örneği 0.5 ml'lik eppendorf tüpüne konulmuş. bunun üzerine 4 ul blue dye ve 14 ul ddH₂O eklenmiştir. Karışım vortekste iyice karıştırılmış. sonrada kısa santrifüj yapılmıştır. Hazırlanan bu örnekler içersinden alınan 10 ul örnek, 0.5X TBE solüsyonu içersinde bulunan % 0.8'lik agaroz jele yüklenmiştir. Agaroz jele yüklenen bu örnekler 90 voltta 60 dakika koşturulmuştur. Koşturmadan sonra ethidium bromüd ile boyanan agaroz jel UV transilluminatör yardımıyla görüntülenmiştir. Örneklerin DNA kalitesini

belirlemek için agaroz jellere standart olarak lamda DNA (25 ng – 50 ng – 100 ng - 200 ng) koşulmuş ve bunlar yardımıyla DNA konsantrasyonlar belirlenmiştir. Elde edilen DNA miktarı ve konsantrasyonuna ait resim Şekil 3.A'da, PCR analizlerinde kullanılacak ve 5 ng/ul olarak hazırlanmış DNA konsantrasyonuna ait resim Şekil 3.B'de verilmiştir.



Şekil 3. A) Bazı Bitkilerden Elde Edilen DNA Miktarı, Konsantrasyonu ve Kalitesi, B) Bazı Bitkilerde PCR Analizlerinde Kullanılmak Üzere 5ng/ul'ye Ayarlanmış DNA Örnekleri

3.2.4.3. ISSR Analizi

Bu alışmada. British Columbia Üniwersitesinden temin edilen ve primer isimleri. DNA dizilimleri ve yapışma sıcaklık değerleri izelge 3.3'de verilen ISSR primerleri DNA analizinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.3 alışmada Kullanılan Primerlerin Özellikleri

Primer Adı	DNA dizilimi (3'- 5')	Yapışma sıcaklığı (°C)
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	50
UBC813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	50
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	50
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	50
UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	52
UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	52
UBC836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	52
UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	52
UBC847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	52
UBC849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	52
UBC851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	54
UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	52
UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	52

Araştırmada, Zietkiewicz ve ark. (1994)'nın belirttiği ISSR protokolü kullanılmıştır. ISSR analizi aşağıda açıklanan protokole göre yapılmıştır. 25 ul amplifikasyon reaksiyon çözeltisi; 75 mM Tris-HCl, pH=8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20, 100 uM dATP, 100 uM dTTP, 100 uM dGTP, 100 uM dCTP, 0.2 uM primer, 1.0 ünite Taq DNA polymerase ve 10 ng DNA içermektedir. Sıcaklık ve döngü koşulları olarak; 94°C'de 2 dk ön denatürasyon işleminden sonra 35 döngü boyunca örnekler denatürasyon için 94 °C'de 45 sn. primerin DNA'ya yapışması için 0-60 °C'de (primere göre değişmek üzere) 1 dk. ve uzama safhası için 72°C'de 2 dk tutulmuştur. Ayrıca. örnekler son uzama safhası için 72°C'de 7 dk bekletilmişlerdir. Her reaksiyon en az iki defa tekrarlanmış, böylece sonuçların elde edilebilirliği test edilmiştir. Kullanılan ISSR primerlerinin DNA'ya yapışma sıcaklığı olarak Kafkas ve ark. (2006)'rının bildirmiş olduğu değerler kullanılmıştır.

3.2.4.4. Elektroforez

Elde edilen PCR ürünleri % 1.8 agaroz jelde 4.5 V/cm olacak şekilde elektroforezde 3 saat 0.5 X TBE tampon çözeltisinde koşturulmuş, jel 15 dk Ethidium Bromid çözeltisi ile boyandıktan sonra 15 dk saf suda yıkanmış. UV transilluminatör yardımı ile resimlerin görüntülenmesi sağlanmış ve elde edilen resimler jel görüntüleme aleti kullanılarak bilgisayara kayıt edilmiştir ve skorlama çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma ile ilgili tarla denemesinden elde edilen verilerde standart hatalar Excel programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Jelde görüntülenen bantlar polimorfik olup olmamasına göre 1 (var) veya 0 (yok) olarak sınıflandırılıp matris oluşturularak genetik benzerlik katsayısı Jaccard (1908)'e göre hesaplanmıştır. Kümeleme analizi ve diğer analizler NTSYS-pc-2.01 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Vejetatif Özellikler

4.1.1. Bitki Boyu

Bitkinin doğal durumunu bozmadan, toprak yüzeyi ile bitkinin en uç noktası arasındaki yükseklik her bitkinin 10 farklı noktasında ölçülmüş ve bu değerlerin ortalaması 71.7 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1.1 Farklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Bitki Boyu Ortalamaları (cm)

Yörelere	Ortalama	Standart sapma
Kulp	77,8	2,0
Silvan	76,1	7,0
Gaziantep	67,4	7,9
İdil	82,6	8,1
Derik	77,4	6,5
Çermik	77,2	7,2
Diyarbakır	67,6	7,1
Malabadi	86,3	5,4
Alatosun	76,6	2,0
Erdurağı	72,8	6,3
Eğil-1	86,4	7,0
Ovabağ	70,9	6,0
Hilvan	63,7	8,5
Eğil-2	60,6	6,4
Adıyaman	68,0	5,7
Ergani	60,8	5,9
Palanlı	46,2	6,4
Ort	71,7	

Bitki boyunun 46,2 cm ile 86,4 cm arasında değiştiği saptanmıştır. Çeşitler arasında en yüksek bitki boyunun Eğil-1 yöresinden toplanan genotipe ait olduğu (86,4 cm) olarak elde edilmiştir. En düşük bitki boyu Adıyaman Palanlı köyünden toplanan genotipde (46,2 cm) tespit edilmiştir.

4.1.2. Ana dal sayısı (bitki\adet)

Her parselden seçilen 10 bitkide bitkinin birinci derecedeki dalları sayılıp, ortalaması alınarak 3.4 olarak belirlenmiştir. Genotipler arasında geniş bir varyasyon elde edilmiştir.

Çizelge 4.1.2 Farklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Ana dal sayısı Ortalamaları (adet/bitki)

Yörelere	Ortalama	Standart sapma
Kulp	5,2	1,7
Silvan	3,3	1,2
Gaziantep	5,3	1,6
İdil	3,4	1,6
Derik	4,1	1,4
Çermik	4,4	1,6
Diyarbakır	2,7	0,9
Malabadi	3,5	1,1
Alatosun	3,6	0,8
Erdurağı	2,6	1,7
Eğil-1	6,5	2,1
Ovabağ	3,0	1,2
Hilvan	1,5	0,5
Eğil-2	2,4	0,8
Adıyaman	1,7	0,7
Ergani	1,8	0,8
Palanlı	2,6	1,1
Ort	3.4	

Ana dal sayısının 1.5-6.5 adet/bitki arasında değıştiğı saptanmıştır. Çeşitler arasında en yüksek ana dal sayısının Eğil-1 ilçesinden toplanan genotipe ait olduğı (6.5 adet/bitki) olarak elde edilmiştir. En düşük ana dal sayısı Şanlıurfa Hilvan ilçesinden toplanan genotipten (1.5 adet/bitki) elde edildiğı tespit edilmiştir.

4.1.3.Yaş ot ağırlığı (gr)

Rasgele seçilerek kök boğazından kesilen bitkilerin toprak üstü aksamları 0,1 g hassasiyetli terazide tartılıp ortalaması alınarak 9.56 g olarak belirlenmiştir. Genotipler arasında geniş bir varyasyon bulunmuştur.

Çizelge 4.1.3. Farklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Bitki başına yaş ot ağırlığı Ortalamaları (gr/bitki)

Yörelere	Ortalama	Standart sapma
Kulp	14,45	0,3
Silvan	7,67	0,5
Gaziantep	8,07	0,4
İdil	8,85	0,2
Derik	11,27	0,7
Çermik	8,47	0,3
Diyarbakır	6,82	0,3
Malabadi	6,14	0,3
Alatosun	8,37	0,8
Erdurağı	11,15	0,3
Eğil-1	14,92	0,7
Ovabağ	11,15	0,3
Hilvan	7,71	0,5
Eğil-2	10,76	0,3
Adıyaman	8,46	1,2
Ergani	9,18	0,3
Palanlı	9,14	0,5
Ort	9,56	

Yaş ot ağırlığının 6.14 gr ile 14.92 gr arasında değiştiği saptanmıştır. Genotipler arasında en yüksek bitki başına yaş ot ağırlığının Eğil-1 ilçesinden toplanan genotipe ait olduğu (14.92 gr) tespit edilmiştir. Bunu Diyarbakır ili Kulp ilçesi Zeyrek köyü (14.45 gr) takip etmiştir. En düşük yaş ot ağırlığının (6.14 gr) Malabadi köprüsü yanından toplanan genotipe ait olduğu tespit edilmiştir.

4.1.4. Kuru ot ağırlığı (gr)

Yaş ot ağırlığının belirlenmesi amacıyla hasat edilen bitkilerin kurutma dolabında 70 °C'de ağırlıkları sabitleninceye kadar tutularak ve daha sonra 0,01 grama kadar hassas terazide tartılarak kuru ot ağırlıkları ortalaması 2.22 gr olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1.4. Farklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Bitki başına Kuru ot ağırlığı Ortalamaları (gr/bitki)

Yörelere	Ortalama	Standart sapma
Kulp	3,25	0,09
Silvan	1,86	0,11
Gaziantep	2,05	0,10
İdil	2,18	0,11
Derik	2,73	0,11
Çermik	1,87	0,11
Diyarbakır	1,26	0,12
Malabadi	1,49	0,21
Alatosun	1,76	0,13
Erdurağı	2,34	0,10
Eğil-1	3,76	0,12
Ovabağ	2,39	0,09
Hilvan	1,85	0,10
Eğil-2	2,74	0,11
Adıyaman	1,86	0,10
Ergani	2,22	0,13
Palanlı	2,13	0,19
Ort	2,22	

Bitki başına kuru ot ağırlığının 1.49 gr ile 3.76 gr arasında değiştiği saptanmıştır. Genotipler arasında en yüksek bitki başına kuru ot ağırlığının Eğil-1 ilçesinden toplanan genotipe ait olduğu (3.76 gr) tespit edilmiştir. Bunu Kulp ilçesi Zeyrek köyü (3.25 gr) ve Eğil-2 ilçesi genotipleri takip etmiştir. En düşük yaş ot ağırlığının (1.26 gr) Diyarbakırdan toplanan genotipe ait olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Generatif Özellikler

4.2.1. % 50 çiçeklenme süresi

Her parselde, bitkilerin % 50'sinin çiçek oluşturdıkları tarih ile ekim tarihi arasındaki gün sayısı ortalama 150 gün olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2.1. Farklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan % 50 Çiçeklenme Gün Sayısı Ortalamaları (gün)

Yörelere	Ortalama	Standart sapma
Kulp	143,8	0,8
Silvan	143,7	0,7
Gaziantep	151,1	0,3
İdil	151,9	0,3
Derik	150,8	0,4
Çermik	150,0	0,5
Diyarbakır	150,0	0,0
Malabadi	149,7	0,7
Alatosun	149,6	0,7
Erdurağı	149,5	0,7
Eğil-1	149,9	0,3
Ovabağ	150,1	0,3
Hilvan	151,9	0,3
Eğil-2	152,2	0,4
Adıyaman	151,9	0,9
Ergani	152,0	0,5
Palanlı	150,9	0,3
Ort	151,7	0,7
Kulp	150,0	

Çizelge 4.2.1.'de izlendiği gibi %50 çiçeklenme gün sayısının 143 gün ile 152 gün arasında değiştiği saptanmıştır. Genotipler arasında en yüksek %50 çiçeklenme gün sayısının Adıyaman ilçesinden toplanan genotipe ait olduğu (151.9 gün) tespit edilmiştir. En düşük %50 çiçeklenme gün sayısının (143.8) Diyarbakır ili Kulp ilçesinden toplanan genotipe ait olduğu tespit edilmiştir.

4.2.2. Tek meyvedeki tohum sayısı (adet/meyve)

Her torbadaki 10 adet meyvelerin bitkiler hasat olgunluğuna eriştiğinde bitkide tohum içeren normal gelişmiş meyveler sayılarak ortalama 12.45 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2.2. Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Meyvedeki Tohum Sayısı Ortalamaları (adet/bitki)

Yreler	Ortalama	Standart sapma
Kulp	14,49	0,2
Silvan	12,67	0,1
Gaziantep	12,53	0,1
İdil	11,95	0,2
Derik	13,28	0,5
ermik	15,53	0,3
Diyarbakır	9,28	0,5
Malabadi	9,68	0,2
Alatosun	10,81	0,1
Erdurağı	14,25	0,3
Eğil-1	14,34	0,3
Ovabağ	11,46	0,2
Hilvan	15,48	0,6
Eğil-2	12,24	0,2
Adıyaman	11,45	0,1
Ergani	10,78	0,2
Palanlı	11,51	0,2
Ort	12,45	

Çizelge 4.2.2.'de meyvedeki tohum sayısının 9.28 adet ile 15.53 adet arasında değiştiği saptanmıştır. Çeşitler arasında en yüksek meyvedeki tohum sayısının ermik ilçesinden toplanan genotipten elde edildiğini, en düşük değer ise Diyarbakır fakülte nnden toplanan genotipten elde edilmiştir.

4.2.3. Meyve apı (mm)

Her parselde 10 bitkide her bitkiden rasgele seçilen 10 meyvenin (en az bir tohum taşıyan) apı kumpasla 0.01 ‘‘mm’’duyarlılıkta ölçülmüş ve ortalaması 16.08 mm olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2.3. Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Meyve apı Ortalamaları (mm)

Yreler	Ortalama	Standart sapma
Kulp	16,40	1,4
Silvan	15,72	1,5
Gaziantep	15,52	1,3
İdil	16,33	1,4
Derik	16,56	1,0
ermik	16,04	1,6
Diyarbakır	12,93	1,5
Malabadi	14,11	1,4
Alatosun	13,94	1,3
Erdurağı	16,76	1,1
Eğil-1	17,09	1,8
Ovabağ	17,29	1,2
Hilvan	17,25	1,0
Eğil-2	17,00	1,7
Adıyaman	17,21	1,1
Ergani	17,40	0,9
Palanlı	15,89	1,7
Ort	16,08	

^{*)} Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $P \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde istatistiksel birbirinden farklıdır.

Meyve apı değerinin 12.93 mm ile 17.40 mm arasında değiştiği saptanmıştır. Genotipler arasında en yüksek meyve çapı değerinin Ergani İlçesinden toplanan genotipe ait olduğu (17.40 mm) tespit edilmiştir. En düşük meyve çapının (12.93 mm) ile Diyarbakır Fakültesi nnden toplanan genotipe ait olduğu tespit edilmiştir.

4.2.4. Tohum verimi(gr/bitki)

Her torbanın bitkisinin meyveleri el ile harman edildikten sonra 0.01 grama hassas terazide tartılarak değerler bulunmuş ve bunların hesaplamaları yapılarak ortalamaları 0.80 gr olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2.4. Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Tohum Verimi Ortalamaları (gr)

Yörelere	Ortalama	Standart sapma
Kulp	1,13	0,08
Silvan	0,39	0,07
Gaziantep	0,69	0,05
İdil	0,75	0,06
Derik	1,02	0,14
Çermik	0,62	0,05
Diyarbakır	0,65	0,04
Malabadi	0,55	0,09
Alatosun	0,51	0,08
Erdurağı	0,63	0,05
Eğil-1	1,15	0,26
Ovabağ	0,72	0,04
Hilvan	0,71	0,05
Eğil-2	1,14	0,07
Adıyaman	0,81	0,05
Ergani	1,42	1,72
Palanlı	0,73	0,05
Ort	0,80	

Bitki başına tohum verimi değerinin 0.39 gr ile 1.42 gr arasında değiştiiği saptanmıştır. Genotipler arasında en yüksek bitki başına tohum verimi Ergani ilçesi Mildağı mevkisinden toplanan genotipe ait olduğu (1.42 gr) tespit edilmiştir. En düşük tohum veriminin (0.39 gr) ile Silvan ilçesinden toplanan genotipe ait olduğu tespit edilmiştir.

4.3. ISSR Analizleri

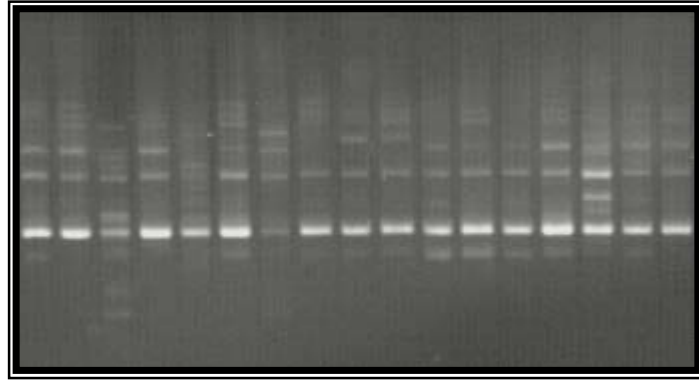
Farklı ekolojik bölgelerden toplanmış buton yoncasında genetik çeşitliliği belirlemek için ISSR DNA moleküler markörü kullanılmıştır. Bu çalışmada toplam 14 adet ISSR primeri kullanılmış olup, kullanılan primer adı, primerlerin DNA dizilimi, toplam skorlanan bant sayısı ve polimorfizm oranı Çizelge 2’de verilmiştir. 14 ISSR primeri kullanılarak 17 buton yonca ekotipinde yapılan PCR analizi sonucunda, 14 ISSR primerinin bu 17 buyon yoncasında toplam 82 bant oluşturduğu ve bunun da 54 adedinin polimorfik bulunduğu saptanmıştır. Primer başına ortalama bant sayısı 5.85 olup en fazla band sayısı UBC 10 ISSR primerlerinden 9 adet ile elde edilirken, en düşük bant sayısı UBC 840 ISSR primerlerinden 3 adet ile elde edilmiştir. Primer başına polimorfik bant sayısı 3.85 olarak bulunmuş olup en fazla 5 adet ile UBC 813, UBC 817, UBC 836 ve UBC 856 ISSR primerlerinden, en düşük ise UBC 826 ISSR primerlerinden elde edilmiştir. Ortalama polimorfizm oranı % 66 olarak bulunmuş olup % 33 ile %100 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.3.1 Araştırmada Kullanılan ISSR Primer Adı, DNA Dizilimi, Toplam Skorlanan Bant Sayısı ve Polimorfik Bant Sayısı ve Oranı

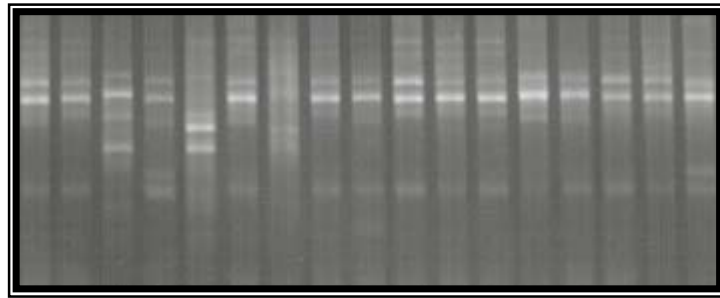
Primer Adı	DNA dizilimi (3’- 5’)	Toplam skorlanan bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	
			n	%
UBC810	(GA) ₈ T	9	3	33
UBC812	(GA) ₈ A	5	4	80
UBC813	(CT) ₈ T	6	5	83
UBC817	(CA) ₈ A	8	5	63
UBC825	(AC) ₈ T	7	3	43
UBC826	(AC) ₈ C	6	2	33
UBC834	(AG) ₈ YT	6	4	67
UBC836	(AG) ₈ YA	8	5	63
UBC840	(GA) ₈ YT	3	3	100
UBC847	(CA) ₈ RC	4	3	100
UBC849	(GT) ₈ YA	5	4	80
UBC851	(GT) ₈ YG	4	4	100
UBC855	(AC) ₈ YT	5	4	80
UBC856	(AC) ₈ YA	6	5	83
Toplam / Ortalama		82/ 5.85	54/ 3.85	---- 66



Şekil 4.3.1. 17 Buton Yoca Ekotipinde ISSR801 Primerları Kullanılarak Elde edilen PCR sonucu.



Şekil 4.3.2. 17 Buton Yoca Ekotipinde ISSR857 Primerları Kullanılarak Elde edilen PCR sonucu.



Şekil 4.3.3. 17 Buton Yoca Ekotipinde ISSR865 Primerları Kullanılarak Elde edilen PCR sonucu.

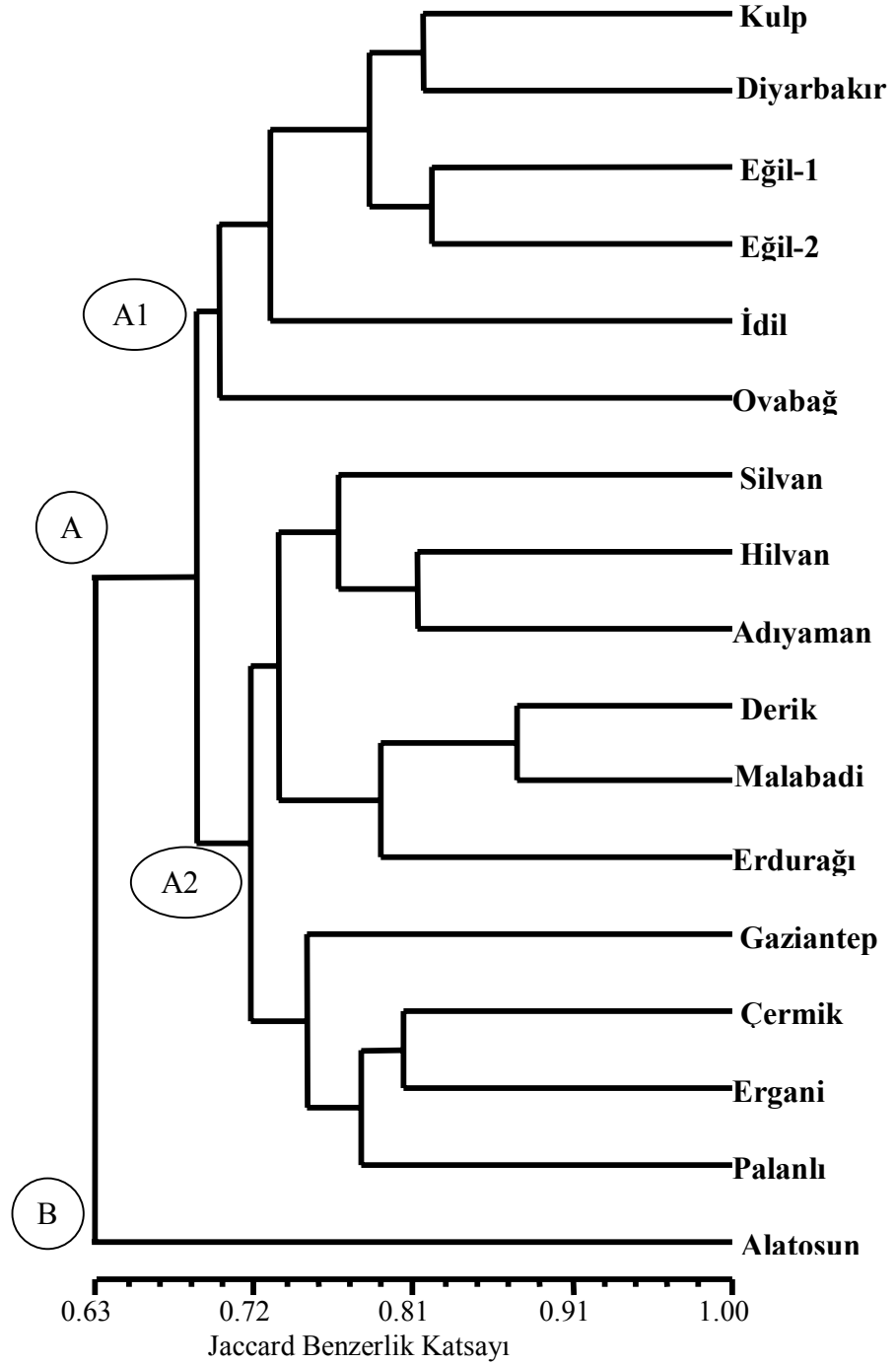
ISSR DNA markör verileri kullanılarak buton yonca ekotipleri arasında Jaccard (1908) yöntemine göre hesaplanan Jaccard benzerlik katsayı değerleri Çizelge 5’de verilmiştir. Ortalama Jaccard benzerlik katsayısı 0,70 olarak bulunmuştur. En yakın genetik yakınlık 0.87 ile 83 ile 79 arasında, en uzak genetik yakınlık ise 95 ile 84 arasında bulunmuştur.

ISSR verileri kullanılarak Jaccard genetik benzerlik katsayısına göre NTSYS-pc2.1 paket programında UPGMA (Unweighted Pair Group With Arithmetic Average) metoduna göre çizilen dendrogram Şekil 1’de verilmiştir. Şekil 1’de görüldüğü gibi yapılan analiz sonucunda A ve B olmak üzere iki ana grup oluşmuştur. A grubu kendi içinde ilk önce ikiye ayrılmıştır. A1 grubunun grubunda Kulp, Diyarbakır, eğil-1, Eğil-2, idil ve Ovabağ yer almıştır. İkiye bölünün A2 grubunun bir grubunda Silvan, Hilvan, Adıyaman, Derik, Malabadi ve Erdurağı yer alırken diğer grubunda Gaziantep, Çermik, Ergani ve Palanlı yer almıştır. Özellikle ISSR DNA analiz sonuçları kullanılarak hesaplanan Jaccard benzerlik katsayısı ve buna bağlı olarak oluşturulan dendrogramda farklı bölgelerden toplanan veya diğer bir deyişle farklı ekolojik bölgelerden toplanmış olan buton yoncaları toplandıkları bölgelere göre bir grup oluşturmamışlardır. Bu durum özellikle farklı bölgelerden toplanmış olan buton yoncalarının kendi içinde yüksek bir genetik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim Jaccard genetik yakınlık değerleri incelendiğinde de bu durum oldukça açıktır. Her ne kadar ortalama genetik yakınlık değeri 0.70 olsa da buton yoncasının farklı ekotipleri arasında bu yakınlık 0.50-0.60 değerlerine kadar düşmektedir. Buda özellikle buton yoncasının genetik çeşitliliğini ve amaca göre farklı alanlarda kullanılabileceğini göstermektedir.

Bitki ıslahı veya Çayır mer’a ıslahında gen kaynaklarının etkin olarak kullanılabilmesi, gen kaynaklarının nasıl tanımlandığı ile direk ilişkilidir. Çayır mer’a ıslahında farklı yabancı bitkilerin tanımlanması, bunların diğer bitkilerle rekabet durumunun ortaya çıkarılması ve bu bitkilerin karakterizasyonu önemlidir. Yabancı gen kaynaklarının karakterizasyonuna ilk önce morfolojik karakterlerin incelenmesi ile başlanmış ve bunu biokimyasal analizler takip etmiştir. Fakat morfolojik özelliklerin çevre şartlarından etkilenmesi ve hem morfolojik özelliklerin hem de biokimyasal markörlerin genetik çeşitliliğini belirlemede sınırlı olması

araştışıcıları yeni metotlar geliştirmeye yöneltmiştir. Bu bağlamda araştışıcılar, son 30 yıl içerisinde yeni teknolojiler geliştirmiştir. Özellikle PCR teknolojisinin keşfedilmesi ve bu teknolojinin bitki gen kaynaklarında kullanılabileceğinin anlaşılması önemli bir kilometre taşıdır. Bitki gen kaynaklarının karakterizasyonunda PCR teknolojisine dayalı birçok DNA moleküler markör tekniği geliştirilmiştir. Bunlardan en fazla bilinen ve birçok araştışıcı tarafından gen kaynaklarının karakterizasyonunda kullanılan DNA markör teknikleri ISSR, RAPD, AFLP, SRAP'dır. Özellikle uygulamadaki kolaylığı ve tekrar edilebilme özelliğinden dolayısıyla ISSR DNA moleküler markör tekniği bir çok araştışıcı tarafından tercih edilmektedir (Kafkas ve ark., 2006).

Bu alışmada, ISSR moleküler markör tekniği kullanılarak Güneydoğu Anadolu bölgesinin farklı bölgelerinden toplanmış buton yoncalarının genetik çeşitliliği ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Özellikle bu çalışma sonucunda ISSR markörünün buton yoncasında genetik çeşitlilik çalışmasında rahatlıkla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



Sekil 4.3.4. ISSR Verileri Kullanılarak UPGMA Metoduna Göre NTSYSpc-2.1 Paket Programı Kullanılarak Çizilen Dengrogram.

Çizelge 4.3.2.. ISSR DNA Analizi Sonuçları Kullanılarak 17 Buton Yanca Ekotipinde Jaccard (1908)'e Göre Hesaplanan Benzerlik Katsayı Değerleri

	73	74	77	78	79	81	82	83	84	85	87	88	90	91	92	94
74	0.71															
77	0.68	0.73														
78	0.70	0.67	0.68													
79	0.78	0.70	0.67	0.65												
81	0.78	0.75	0.76	0.66	0.77											
82	0.82	0.62	0.66	0.73	0.72	0.72										
83	0.75	0.76	0.73	0.63	0.87	0.75	0.69									
84	0.68	0.69	0.58	0.68	0.56	0.68	0.59	0.57								
85	0.75	0.72	0.65	0.63	0.78	0.79	0.62	0.80	0.69							
87	0.81	0.61	0.65	0.72	0.67	0.64	0.79	0.65	0.61	0.65						
88	0.71	0.57	0.65	0.63	0.70	0.67	0.69	0.76	0.57	0.68	0.73					
90	0.79	0.76	0.65	0.71	0.74	0.78	0.70	0.68	0.65	0.72	0.69	0.65				
91	0.76	0.61	0.69	0.76	0.67	0.71	0.78	0.68	0.65	0.65	0.82	0.72	0.69			
92	0.77	0.78	0.75	0.69	0.76	0.72	0.67	0.78	0.62	0.73	0.75	0.65	0.81	0.70		
94	0.65	0.69	0.75	0.65	0.72	0.80	0.67	0.78	0.59	0.73	0.59	0.73	0.66	0.66	0.71	
95	0.77	0.65	0.75	0.65	0.72	0.76	0.80	0.73	0.55	0.65	0.70	0.69	0.70	0.70	0.71	0.80

Ortalama genetik yakınlık=0.70

5. KAYNAKLAR

- AJIBADE, S. R., WEEDEN, N. F. AND CHITE; S. M., 2000. Inter Simple Sequence Repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica* 111 :47-55.
- AKAGI, H., YOKOZEKI, Y., INAGAKI, A., NAKAMURA, A. AND FUJIMURA, T., 1996. A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, Rf-1, identified with inter SSR fingerprinting. *Genome* 39:1205-1209.
- ALBANI, M. C. AND WILKINSON, M. J., 1998. Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breed.*117 :573-575
- ANONIM, 2008. Türkiye'nin Çayır ve Mera Bitkileri (editör: Yunus Serin). T.C.Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü.
- ARCADE, A., ANSELIN, F., FAIVRE RAMPANT, P., LESAGE, M. C., PAQUES, L.E. AND PRAT, D.,2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of european and japanese larch. *Theor. Appl. Genet.* 100:299-307
- AYDINOĞLU, B., KARACA, M., ÇAKMAKÇI, S., İNCE A.G. VE ELMASULU, S.Y. 2005. DNA Minisatellit Markırlarından Yararlanılarak Fığde (*Vicia sativa* L.) Tane Veriminin Önceden Belirlenmesi Olanakları. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*,18(2):169-174.
- BARCACCIA, G., ALBERTINI, E., ROSELLINI, D., TAVOLETTI, S. AND VERONESI, F., 2000. Inheritance and mapping of 2n-egg production in diploid alfalfa. *Genome* 43 :528-537.
- BASIK, M., STOLER, D. L., KONTZOGLOU, K. C., RODRIQUEZBIGAS, M.A.,PETRELLI, N. J. AND ANDERSON, G. R., 1997. Genomic instability in sporadic colorectal cancer quantitated by inter-simple sequence repeat per analysis.*Gen. Chrom.and Can.* 18:19-29.

- BELAJ, A., SATOVIC, Z ., CDPRIANI, G., BALDONI, L., TESTOLEV, R., RALLO, L. AND TRUJTLLO I., 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor. Appl. Genet.* 107(4): 736-744.
- BLAIR, M. W., PANAUD, O. AND MCCOUCH, S. R ., 1999. Inter- simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor.Appl. Genet* .98:780-792.
- CAVAN, G., POTOIER, V. AND. MOSS, S. R., 2000. Genetic diversity of weeds growing in continuous wheat. *Weed Res.* 40 :301-310.
- CHARTERS, Y. M., ROBERTSON, A. M., WILKINSON, J. AND RAMSAY, G., 1996. PCR analysis of oilseed primers. *Theor. Appl. Genet.*92:442-447.
- CHARTERS, Y. M. AND WILKINSON, M. J., 2000. The use of self-pollinated progenies as ‘in-groups’ for the genetic characterization of Cocoa germplasm. *Theor.Appl. Genet.*100: 160-166.
- CHEN, Y., HAUSNER, G., KENASCHUK, E., PROCUNIER, D., DRIBNENKI, P. AND PENNER G..1998. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. *Plant Cell Rep.*18 :44-48.
- CHOWDHURY, M.A., VANDENBERG, B. AND WARKENTIN, T., 2002. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.): *Euphytica* 127:317-325..
- DANGI, R:S., LAGU, M.D., CHOUDHARY, L:B., RANJEKAR, P.K AND GUPTA, V.S. 2004. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. *Bmc Plant Biology* 4:13
- DOYLE, J.J and DOYLE, J.L.,1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.

- FANG, D. Q., KRRUEGER, R. R. AND ROOSE, M. L., 1998. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Am.Soc. Hort.Sci.*123:612-617.
- GALVAN, M.Z., BORNET, B., BALATTI, P.A AND BRANCHARD, M., 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Euphytica* 132:297-301.
- GE, X. J. And SUN, M., 1999. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove, *Aegiceras corniculatum* (Myrtinaceae) using allozyme and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Mol. Ecol.* 8 :2061-2069.
- GILBERT, J. E., LEWIS, R. V., WILKINSON, M.J. AND CALIGARI, P.D.S., 1999. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theo. Appl. Genet.* 98 :1125-1131.
- GILLINGS, M. AND HOLLEY, M., 1997. Amplification of anonymous DNA fragments using pairs of long primers generates reproducible DNA fingerprints that are sensitive to genetic variation. *Electrop.* 18:1512-1518.
- GODWIN, I.D., AITKEN, E. B. AND SMITH, L.W., 1997. Application of intersimple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrop* 18 :1524-1528.
- GUPTA, M., CHYI, Y.-S ROMERO- SEVERSON, J. AND OWEN, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple–sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*89:998-1006
- GYULAI, G., GEMESNE, J. A., SAGI, Z., VENCZEL, G., PINTER, P., KROSTOF, Z., TORJEK, O., Heszky, L., Bottka, S., Kiss, J. And Zatyko, L., 200. Doubled Haploid development and PCR-analysis of F-1 hybrid derived DH-R-2 Paprika (*Capsicum annum* L.) lines. *J. Plant physiol.*156:168-174.
- HOLLINGSWORTH, P. M., TEBBITT, M., WATSON, K. J. AND GORNALL, R.J., 1998. conservation genetic of an arctic species, *Saxifgra rivularis* L., in Britain. *Bot.J. Linnean Soc.* 128:1 -14.

- JACCARD, P., 1908. Nouvelle Recherches Sur La Distribution Florale. Bull Soc Vaud Sci. Nat. 44 :223-227
- KAFKAS, S. OZKAN, H., AK,B.E., ACAR, I., ATLI, H.S., KOYUNCU, S., 2006. Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: comprasion of AFLP, ISSR, and RAPD markers. Journal of the American Society for Hortiltural Science 131 (84):522-529.
- KWON,Y. S.,RYU, T.H., KIM, C. H., SONG , I. H., AND KIM, K.M.,2004. A Comparative study of the rapd and ssr markers in establng a genetic relationship of the varios types of Cucurbita. Korean J. of Gen. 26 (2): 115-122.
- LIU, B. AND WENDEL, J. F., 2001. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in Cotton. Molec. Ecol. Not.1 (3):205-208.
- METAIS, I., AUBRY, C., HAMON, B., JALOUZOT, R. AND PELTIER, D., 2000. Description and analysis of genetic diversity between commercial Bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.) Theor. Appl. Genet. 101 :1207 -1214.
- MIGNOUNA, H.D, ABANF, M.M AND FAGBEMI S.A.,2003. A Comparative Assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and SSR) for White yam (*Dioscirea rotundata* Poir)germ plasm characterisation. Ann. Appl. Biol. 142 :269-276.
- POTOKINA, E., BILATTNER, F.R., ALEXANDRA, T. AND BACHMANN, K. 2002. AFLP diversity in the Common vetch (*Vicia sativa* L.) on the world scale. Theor. Appl. Genet. 105:58-67.
- RANA, M.K. AND BHAT, K. V., 2004. A Comparison of AFLP and RAPD markers for genetic diversity and cultivar identification in Cotton. J. Plant Biochem. Biotec.13 (1): 342-351.
- REDDY, M.P., SARLA, N. AND SIDDIQ, E.A.2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128:9-17.
- TALHINHAS, P., LEITAO, J. AND NEVES-MARTINS, J., 2005. Collection of *Lupinus angustifolis* L. Germplasm and characterisation of morphological and molecular diversity. Genetic Resources and Crop Evolution 100:1-16.

- TANKSLEY S.D., YOUNG, N.D., PETERSON A.H., BONIERBALE, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding:new tools for old sciences. *Biotechnology* 7:257-264.
- TUİK, 2006. Tarım İstatistikleri.<http://www.tuik.gov.tr>
- TÜKEL,T. VE HATİPOĞLU, R.,1997. Çayır-Mera Amenajmanı. Ç.Ü.Zir.Fak. Genel Yayın No :191, Ders Kitapları No:a-59.
- ÜNVERDİ, M.A., 2007. Türkiye’de Tescil Ettirilmiş Bazı Fiğ (*Vicia sativa* L.) Çeşitleri Arasındaki Morfolojik ve Moleküler Farklılıkların Saptanması Üzerinde bir Araştırma. Ç.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, 68 s. Adana.
- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. AND LABUDA, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1. Buton yoncaların toplandığı yer ve özellikleri	12
Çizelge 3.3 Çalışmada Kullanılan Primerlerin Özellikleri	17
Çizelge 4.1.1 Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Bitki Boyu Ortalamaları (cm).....	19
Çizelge 4.1.2 Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Ana dal sayısı Ortalamaları (adet/bitki).....	20
Çizelge 4.1.3. Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Bitki başına yaş ot ağırlığı Ortalamaları (gr/bitki).....	21
Çizelge 4.1.4. Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Bitki başına Kuru ot ağırlığı Ortalamaları (gr/bitki).....	22
Çizelge 4.2.1. Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan % 50 Çiçeklenme Gün Sayısı Ortalamaları (gün).....	23
Çizelge 4.2.2. Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Meyvedeki Tohum Sayısı Ortalamaları (adet/bitki).....	24
Çizelge 4.2.3. Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Meyve Çapı Ortalamaları (mm).....	25
Çizelge 4.2.4. Faklı Buton Yonca Genotiplerinde Saptanan Tohum Verimi Ortalamaları (gr).....	26
Çizelge 4.3.1 Araştırmada Kullanılan ISSR Primer Adı, DNA Dizilimi, Toplam Skorlanan Bant Sayısı ve Polimorfik Bant Sayısı ve Oranı	27

ÖZGEÇMİŞ

11/11/1978 tarihinde Diyarbakır'da dünyaya geldim. İlk orta ve lise öğrenimimi Diyarbakır'da tamamladım.1998 yılında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni bölümünü kazandım. 2002 yılında mezun oldum. 2005 yılında Dicle üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri bölümünde yüksek lisans yapmaya başladım.Şu an Kocaköy İlçe tarım Müdürlüğünde sözleşmeli ziraat mühendisi olarak çalışmaktayım.