

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TETRAPLOİT YONCADA (*Medicago sativa* L.) GENETİK ÇEŞİTLİLİK,
POPULASYON YAPISI VE MOLEKÜLER FİLOGENETİK**

Doğan İLHAN
DOKTORA TEZİ

Danışmanlar

Yrd. Doç.Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Dr. Xuehui LI

OCAK 2014

KARS

Bu tez çalışması 2012-FEF-29 numaralı proje ile Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TETRAPLOİT YONCADA (*Medicago sativa* L.) GENETİK ÇEŞİTLİLİK,
POPULASYON YAPISI VE MOLEKÜLER FİLOGENETİK**

Doğan İLHAN

DOKTORA TEZİ

Danışmanlar

Yrd. Doç.Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Dr. Xuehui LI

OCAK 2014

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı Doktora öğrencisi Doğan İLHAN'ın Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU ve Dr. Xuchui LI danışmanlığında doktora tezi olarak hazırladığı "Tetraploit Yoncada (*Medicago sativa* L.) Genetik Çeşitlilik, Populasyon Yapısı ve Moleküler Filogenetik" adlı bu çalışma, yapılan tez savunma sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

06/01/2014

Adı ve Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Mitat ŞAHİN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Süleyman TEMEL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Yusuf ERSAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet SARI

İmza



Bu tezin kabulü, Fen Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun// 2014 gün ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Dalı'nda doktora tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmada, *Medicago sativa* tür kompleksi içerisinde yer alan tetraploit yonca (*Medicago sativa* L.)'nın SSR markırları kullanılarak, populasyon yapısının, genetik çeşitliliğinin ve moleküler filogenetiğinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Tezimin hazırlanmasında bilimsel birikimlerini benimle paylaşan, fikirleriyle beni yönlendiren ve olumlu düşünceleriyle desteğini benden esirgemeyen değerli danışmanlarım Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU ve Dr. Xuehui LI'ye ve gerek laboratuvar imkanları, gerekse bilimsel tecrübeleriyle bana bu çalışmamda destek olan Dr. E. Charles BRUMMER ve ekibine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca her türlü desteğini benden esirgemeyen değerli eşime ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı 2012-FEF-29 no'lu projesi ile destekleyen Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne de teşekkürlerimi sunarım.

Kars-2014

Doğan İLHAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kültür Yoncası	4
2.2 Poliploidi	4
2.3 <i>Medicago sativa</i> Tür Kompleksi	5
2.3.1 Komplekte Genetik Yapı	7
2.3.2 Kompleksin Populasyon Yapısı	9
2.3.3 Kompleksin Bilinmeyenleri	9
2.4 Moleküler Markırlar	9
2.4.2 Moleküler Markırların Komplekte Kullanılması	10
2.5 Linkage Eşitsizliği (LD) ve Kompleks	11
2.6 Literatür Özeti	12
2.7 Çalışmanın Amacı	28
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1 Bitkisel Materyaller	29
3.2 Bitkilerin Yetiştirilmesi	29
3.3 Morfolojik Analizler	29
3.4 Moleküler Markırlar, Populasyon Yapısı ve Genetik Çeşitliliğin Değerlendirmesi	34
3.4.1 Bitkilerden DNA Ekstraksiyonu	34

3.4.2 DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Belirlenmesi	36
3.4.3 SSR Markırlarının Seçilimi ve PCR Reaksiyonları	37
3.4.4 Verilerin Skorlanması	44
3.4.5 Veri Analizleri	45
3.5 Linkage Eşitsizliği (LD) Analizi	47
4. BULGULAR.....	48
4.1 Morfolojik Analiz	48
4.2 Populasyon Yapısı ve Dinamiği Analizi.....	53
4.3 Ana Komponent Analizi (PCA)	56
4.4 Moleküler Filogenetik Analizi	57
4.5 Moleküler Varyans Analizi (AMOVA).....	60
4.6 Genetik Çeşitlilik Analizi	62
4.7 Linkage Eşitsizliği (LD) Analizi	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
6. KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	82

ÖZET

Yonca (*Medicago sativa* L.) bitkisi, hem ekonomik önemi hem de besin içeriğinden dolayı dünyada yaygın bir şekilde yetiştirilen önemli bir baklagil yem bitkisidir. *Medicago sativa* Tür Kompleksi ya da *Medicago sativa-falcata* kompleksi olarak bilinen bir taksonomik grup içerisinde yer alan bu bitki, ploidi seviyesine göre diploit ve tetraploit altbirimlerden oluşmaktadır. Bu altbirimlere geçmişte çeşitli taksonomik statüler verilerek değerlendirmeler yapılmıştır. Son yapılan değerlendirmeler neticesinde kompleksin diploit üyelerinin statüsü moleküler bilgiler ışığında aydınlatılmış ve alttür statüsünde olduklarına karar verilmiştir ancak tetraploit üyeler henüz kapsamlı bir değerlendirmeye tabi tutulmamışlardır.

Bu çalışma kapsamında, *Medicago sativa* tür kompleksi içerisinde yer alan, tetraploit birimlerin taksonomik ilişkilerini belirlemek amacıyla, populasyon yapısı, genetik çeşitliliği değerlendirilmiştir.

Çalışmanın sonunda, tetraploit üyelerden alttür *sativa* ve alttür *falcata*'nın birbirinden ayrılan iki alttürü temsil ettiği, bu iki alttürün melezi kabul edilen *varia* alttürünün de yüksek düzeyde hibritleşme özelliği gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuçlar populasyon analizleri ve moleküler filogenetik analizlerle de desteklenmiştir. Ayrıca populasyondaki alttürler arasında yüksek allelik zenginlikten dolayı önemli sayılabilecek bir genetik farklılaşmanın olduğu da belirlenmiştir. Çalışmanın yonca genetik kaynaklarının değerlendirilmesi ve kullanılması açısından önemli bir referans olacağı düşünülmektedir.

2014, 82 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Genetik Çeşitlilik, *Medicago sativa* Tür Kompleksi, Moleküler Filogenetik, Populasyon Yapısı, Tetraploit Yonca

ABSTRACT

The legume forage alfalfa is very valuable both economically and based on nutrition composition and is grown worldwide. Presence of interploidy variations made alfalfa attractive for genomic studies. The taxonomic group *Medicago sativa* species complex or *Medicago sativa-falcata* complex has two different ploidy levels; diploid ($2n=2X=16$) and tetraploid ($2n=4X=32$). There was an ambiguity in the taxonomic status of the members of complex until recently. Extensive efforts have been devoted to untangle the status of diploid members using molecular markers and the members were considered as subspecies. The status of tetraploid members remained unclear.

The aim of this study was to investigate the structure of tetraploid members of the *Medicago sativa* species complex using genomewide SSR markers. We used a number of broad based wild tetraploid accessions from USDA collections originally collected from the entire natural distribution range.

Based on the molecular marker patterns, it was observed that the tetraploid alfalfa has two different main groups corresponding to known subspecies (*Medicago sativa* ssp. *sativa* and *Medicago sativa* ssp. *falcata*). Moreover, the *Medicago sativa* ssp. *varia* found to be hybrid between *Medicago sativa* ssp. *sativa* and *Medicago sativa* ssp. *falcata*. These results were supported with two other independent analyses (Principle Component Analyses and Molecular Phylogenetic Analyses). Basic population genetics analyses were also conducted to determine the patterns of demarcation among accessions and germplasm groups. Our results have implications for collection and utilization of alfalfa germplasm resources.

2014, 82 pages

Key words: Genetic Diversity, *Medicago sativa* species complex, Molecular Phylogenetics, Population Structure, Tetraploidy

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bp	Baz çifti
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
Φ_{PT}	Populasyonun farklılaşma ölçütü
P	Önemlilik düzeyi
cM	Santimorgan
r^2	Korelasyon katsayısı
M	Molar
mM	Milimolar
ml	Mililitre
sn	Saniye
μl	Mikrolitre
g	Gram
ng	Nanogram
rpm	Dakikadaki devir sayısı
%	Yüzde
ln	Bilinen logaritma
log	Logaritma

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
ISSR	Basit iç dizi tekrarları
SCAR	Belirlenmiş ve çoğaltılmış polimorfik diziler
STS	Dizisi etiketlenmiş bölgeler
CAP	Kesilip çoğaltılmış polimorfik dizi
SSR	Basit dizi tekrarları
EST	İşaretili ifade edilen diziler
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
DarT	Çeşitlilik dizisi teknolojisi
VNTRs	Çeşitli sayıda ardışık tekrarlar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
cDNA	Komplementer DNA
MgCl ₂	Magnezyum klorür
A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
UPGMA	Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu
NJ	Neighbour joining
n	Haploid kromozom sayısı
x	Kromozom seti
n	Haploid kromozom sayısı
PCA	Ana komponent analizi
USDA-GRIN	ABD Tarım Bakanlığı Bitki Genetik Kaynaklar Sistemi
F	Populasyonun kendileştirme katsayısı
LD	Bağlantı eşitsizliği
TNC	Yapısal olmayan karbonhidratların toplam yüzdesi

Kısaltmalar

N	Azot
G6PDA	Glukoz-6- fosfat dehidrogenaz
WSP	DNA ve suda çözünür protein konsantrasyonu
DM	Kuru madde
F ₁	İlk nesil
F ₂	İkinci nesil
WISFAL	<i>M. sativa</i> ssp. <i>falcata</i> 'ya ait bir ekotip
SRAP	Sekans ilişkili çoğaltılmış polimorfizm
PIC	Polimorfik bilgi içeriği
RSI	Yoncanın bir çeşit varyetesi
rDNA	Ribozomal DNA
QTL	Kantitatif karakter lokusu
SDA	Tek doz alleli
CTAB	Cetyl methyl tri-ammonium bromide
NaCl	Sodyum klorür
EDTA	Ethylene di-amin tetra acetic acid
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
H ₂ O	Su
K	Küme sayısı
NPGS	Ulusal bitki genetik kaynak sistemi
He	Beklenen heterozigotluk

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.3.1 <i>Medicago sativa</i> tür kompleksi içerisindeki birimlerin taksonomik ilişkisi[37].....	6
Şekil 4.2.1 Optimal K değerinin belirlenmesi için (A) Pritchard ve arkadaşları (2000) tarafından tanımlanmış olan <i>ad hoc</i> prosedürüne göre elde edilen sonuç	54
Şekil 4.2.2 Optimal K değerinin belirlenmesi için (B) Evanno ve arkadaşları (2005) tarafından tanımlanmış olan (ΔK) prosedürüne göre elde edilen sonuç	55
Şekil 4.2.3 31 SSR markırı ile analiz edilmiş 280 bireysel genotip arasında Bayesian çıkarımı temelinde iki küme oluşturduğu tahmin edilen (K=2) tetraploit yonca popülasyonu STRUCTURE görüntüsü.....	55
Şekil 4.3.1 31 SSR markırının kullanıldığı analizden elde edilen iki ana komponent temelinde tetraploit yonca popülasyonlarına ait üç alttürün (<i>sativa</i> , <i>varia</i> ve tetraploit <i>falcata</i>) birbirinden ayrılması.....	57
Şekil 4.4.1 280 Tetraploit Bireyin Filogenetik İlişkisinin NJ Ağacı	59
Şekil 4.4.2 70 Aksesyona Ait Filogenetik İlişkisinin NJ Ağacı	59
Şekil 4.7.1 70 Tetraploit yonca (<i>M. sativa</i> L.) aksesyonuna ait 280 bireyde, <i>M. truncatula</i> genom dizisi temelinde, Megabazlık fiziksel mesafelerine göre tüm kromozomlardaki SSR lokusları arasındaki linkage eşitsizliği (-log (Q value)) plotu... 66	66

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.2.1 Yonca aksesyonlarına ait tohumların viyollerde yetiştirilmesi	33
Resim 3.2.2 Yonca aksesyonlarına ait tohumların viyollerde yetiştirilmesi (1 aylık fideler).....	33
Resim 3.2.3 Yonca aksesyonlarına ait tohumların viyollerde yetiştirilmesi (2 aylık fideler).....	33
Resim 3.2.4 Yonca aksesyonlarına ait fidelerin saksılara transferi (3 aylık fideler)	33
Resim 3.2.5 Yonca aksesyonlarına ait 4 aylık fideler	33
Resim 3.2.6 Yonca aksesyonlarına ait 6 aylık fideler	33
Resim 3.4.2.1 DNA'ların seyreltilmesi ve konsantrasyonlarının belirlenmesi	37
Resim 3.4.3.1 Seçilmiş 31 markırın İleri ve Geri primerlerinin hazırlanması.....	39
Resim 3.4.3.2 Seçilmiş 31 markırın İleri ve Geri primerlerinin hazırlanması.....	39
Resim 3.4.3.1.1 PCR reaksiyonlarında kullanılacak M13 primerleri ve Taq DNA polimeraz.....	40
Resim 3.4.3.1.2 PCR reaksiyonları için PCR tampon karışımı ve plate'lerin hazırlanması.....	40
Resim 3.4.3.1.3 PCR reaksiyon karışımları eklenen plate'lere DNA'ların eklenmesi ..	40
Resim 3.4.3.1.4 Hazırlanmış PCR plate'lerinin filmler ile kapatılması.....	40
Resim 3.4.3.1.5 PCR reaksiyonları için hazır plate'ler	40
Resim 3.4.3.1.6 PCR reaksiyonları için Thermocycler	40
Resim 3.4.3.2.2.1 PCR ürünlerinin kapiller elektroforez için hazırlanması.....	43
Resim 3.4.3.2.2.2 PCR ürünlerinin kapiller elektroforez için hazırlanması.....	43
Resim 3.4.3.2.2.3 Transferi yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez plate'lerine aktarılması	43
Resim 3.4.3.2.2.4 Kapiller elektroforez için Liz ve Hi-Di Formamide karışımının hazırlanması.....	43
Resim 3.4.3.2.2.5 Kapiller sistem için plate'lerinin denatürasyon PCR işlemi.....	43
Resim 3.4.3.2.2.6 Kapiller sistem için plate'lerinin sekanslama cihazına gönderilmesi	43
Resim 4.1.1 Yoncannın <i>sativa</i> alttürüne ait morfolojik sonuçlar	52
Resim 4.1.2 Yoncannın <i>sativa</i> alttürüne ait morfolojik sonuçlar	52
Resim 4.1.3 Yoncannın <i>varia</i> alttürüne ait morfolojik sonuçlar	52
Resim 4.1.4 Yoncannın <i>varia</i> alttürüne ait morfolojik sonuçlar	52

Resim 4.1.5 Yoncannın <i>varia</i> alttürüne ait morfolojik sonuçlar	52
Resim 4.1.6 Yoncannın <i>falcata</i> alttürüne ait morfolojik sonuçlar	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.3.1.1 <i>Medicago sativa</i> tür kompleksinin diploit alttürleri[5].	6
Çizelge 2.3.2.1 <i>Medicago sativa</i> tür kompleksinin tetraploit alttürleri[5].	7
Çizelge 3.1.1 Kullanılan populasyonların lokalite ve genetik kaynak bilgileri	30
Çizelge 3.1.1 (Devam) Kullanılan populasyonların lokalite ve genetik kaynak bilgileri	31
Çizelge 3.1.2 Kullanılacak bitki örneklerine ait sayısal veriler	32
Çizelge 3.4.3.1 Seçilmiş olan 31 adet polimorfik markırın primerleri ve allel boyutları	38
Çizelge 3.4.3.1.1 PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları	39
Çizelge 4.1.1 Bu çalışmada kullanılan bireysel genotip sayıları, orjin ülkeleri, kromozom sayıları ve çiçek renkleri ile birlikte tetraploit aksesyonların listesi ve her bir aksesyonun bu çalışma temelinde sınıflandırılması	50
Çizelge 4.1.1 (Devam) Bu çalışmada kullanılan bireysel genotip sayıları, orjin ülkeleri, kromozom sayıları ve çiçek renkleri ile birlikte tetraploit aksesyonların listesi ve her bir aksesyonun bu çalışma temelinde sınıflandırılması	51
Çizelge 4.5.1 70 aksesyondan elde edilen 280 adet tetraploit genotipin üç farklı alttür (<i>sativa</i> , <i>varia</i> ve <i>falcata</i>) için Moleküler Varyans Analizi ve varyasyonun her bir kaynağına katkıda bulunan toplam genetik varyansın yüzdesi	61
Çizelge 4.5.2 70 aksesyondan elde edilen 280 adet tetraploit genotipin iki farklı alttür (<i>varia</i> alttürü ile birleştirilmiş <i>sativa</i> ve <i>falcata</i>) için Moleküler Varyans Analizi ve varyasyonun her bir kaynağına katkıda bulunan toplam genetik varyansın yüzdesi.....	61
Çizelge 4.5.3 58 aksesyondan elde edilen 232 adet tetraploit genotipin iki farklı alttür (<i>varia</i> alttürü çıkarılmış olarak <i>sativa</i> ve <i>falcata</i>) için Moleküler Varyans Analizi ve varyasyonun her bir kaynağına katkıda bulunan toplam genetik varyansın yüzdesi.....	62
Çizelge 4.6.1 280 adet tetraploit genotip için STRUCTURE analizi temelinde belirlenmiş üç alttürün (<i>sativa</i> , <i>varia</i> ve tetraploit <i>falcata</i>) çiftli Φ_{PT} değerleri.....	62
Çizelge 4.6.2 Üç alttürün (<i>sativa</i> , <i>falcata</i> ve <i>varia</i>) 280 adet bireysel genotipi için 31 SSR lokusu temelinde aralıkları ile birlikte (parantez içerisinde) çeşitlilik istatistikleri	64
Çizelge 4.6.3 İki alttürün (<i>varia</i> ile birleştirilmiş <i>sativa</i> ve tetraploit <i>falcata</i>) 280 adet bireysel genotipi için 31 SSR lokusu temelinde aralıkları ile birlikte (parantez içerisinde) çeşitlilik istatistikleri.....	64

Çizelge 4.6.4 İki alttürün (<i>varia</i> alttürü çıkarılmış olarak <i>sativa</i> ve tetraploit <i>falcata</i>) 232 adet bireysel genotipi için 31 SSR lokusu temelinde aralıkları ile birlikte (parantez içerisinde) çeşitlilik istatistikleri.....	65
--	----

1. GİRİŞ

Birbirine yakın sistematik birimler arasındaki taksonomik ilişkiler bazı canlı grupları için çok belirgin değildir. Türler ya da diğer taksonomik birimler arasında morfolojik olarak yorum yapmanın zorlaştığı ve üreme engellerinin tam oluşmadığı durumları ifade eden böylesi birimler için ‘tür kompleksi’ tanımı kullanılmaktadır. Tür kompleksi, genellikle birden fazla tür ve alttürün ayrıştırılmadığı sistematik birimleri ifade etmektedir. Türlerin tam ve doğru bir biçimde teşhis edilmesi, onların henüz tamamlanmamış olan üreme izolasyonları ve birimler arasında devam eden gen akışlarından dolayı oldukça zordur. Hibrit birimler ise üreme açısından bariyerlerin güçlü olmadıkları durumlarda iki birimin melezlenmesi sonucu oluşan birimleri ifade etmekte ve zamanla farklılaşarak bağımsız birimleri oluşturmaktadırlar. Tür kompleksleri bitkiler arasında daha yaygındır. Ancak hayvanlarda da *Canis* cinsinde köpek-kurt-çakal kompleksi, *Naja* cinsinde kobra kompleksi, *Arion* cinsinde bazı böcek kompleksleri ve *Cyanea* cinsinde denizanası kompleksi gibi örnekleri mevcuttur[1]. Hayvanlardan ziyade bitkiler arasında da çeşitli tür kompleksleri bulunmaktadır. Bunlar arasında bilinen en önemli tür komplekslerinden birisi de baklagiller familyasındaki *Medicago* cinsinde bulunan *Medicago sativa* tür kompleksi ya da *Medicago sativa* – *falcata* kompleksidir[2].

Medicago cinsi altmıştan daha fazla birbirinden farklı tek yıllık ve çok yıllık türlerden oluşmaktadır. Cinsin ilk çeşitlilik merkezi Kafkasya, Kuzeybatı İran ve Kuzeydoğu Türkiye’de bulunmuştur. *Medicago* cinsinin temel genomik kromozom sayısı 7’den ibaret olan birkaç türün dışında genel olarak 8’dir. *Medicago* cinsinde diploit, tetraploit ve heksaploid türler oluşmaktadır. *Medicago*’nun evriminin tersiyer periyodunda yer aldığı düşünülmektedir. Tek yıllık otogam türlerin çok yıllık allogam türlerden orjinlendiği düşünülmektedir. Taksonomik olarak *Medicago* türleri baklagil ve tohum özellikleri, tüy, polen tanesi morfolojisi ve kromozom sayılarıyla esas olarak birbirlerinden ayrılabilirler. Diğer biyokimyasal karakterler de bu amaç için başarılı bir şekilde kullanılabilirler. Lesins ve Lesins[3]’in birkaç modifikasyon ile belirttikleri *Medicago* alttürlerinin anahtarı tür tanımlanması için bir rehber olarak görev yapmaktadır[2].

Medicago sativa tür kompleksi, içerisinde kültür yoncasının da yer aldığı, morfoloji ve ploidi düzeyi (diploit ve tetraploit) varyasyonu gösteren ve aralarında üreme engeli olmayan bir dizi üyeden oluşan taksonomik bir gruptur. Kompleksteki taksonomik birimleri araştırmacılar önceleri tür olarak kabul etmişler[3], daha sonra ise alttür seviyesine indirgemişlerdir[4]. Bu indirgenme son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalarla desteklenmiştir[5]. Ayrıca bu kompleks, poliploid evrim çalışmaları için model olarak önerilmiştir[6,7]. Bununla birlikte, kompleksin üyeleri arasında bulunan *Medicago sativa* alttür *sativa* (bundan sonra alttür *sativa*), *Medicago sativa* alttür *caerulea* (bundan sonra alttür *caerulea*), *Medicago sativa* alttür *falcata* (bundan sonra alttür *falcata*), *Medicago sativa* alttür *varia* (bundan sonra alttür *varia*), *Medicago sativa* alttür *hemicycla* (bundan sonra alttür *hemicycla*), *Medicago sativa* alttür *polychroa* (bundan sonra alttür *polychroa*), *Medicago sativa* alttür *tunetana* (bundan sonra alttür *tunetana*) ve *Medicago sativa* alttür *glutinosa* (bundan sonra alttür *glutinosa*), *M. sativa*'nın alttürlerini oluşturmaktadır. *Medicago glomerata* ve *Medicago prostrata* ise kompleks ile yakından ilişkili olan diğer iki türdür. *M. sativa*'nın, eski türler olan diploit *M. sativa* ssp. *caerulea* ve *M. sativa* ssp. *falcata*'nın atasal türleri olduğu düşünülmektedir. Tetraploit alttürler olan *M. sativa* ssp. *sativa* ve *M. sativa* ssp. *falcata* büyük olasılıkla indirgenmemiş gametler aracılığıyla diploitlerden orjinlenmiştir[2].

Yonca dünyanın en önemli baklagil yem bitkileri arasında yer almaktadır. Kompleksin tetraploit üyelerinden birisi olan kültür yoncası dünyada tarımı yapılan yem bitkileri arasında üst sıralarda yer almaktadır ve dünya çapında 80 milyon hektarı aşkın alanda yetiştirilmektedir[8, 9, 10]. Islah çalışmaları için en önemli ihtiyaç yeterli miktarda ve ulaşılabilir genetik kaynaktır. Genetik kaynakların önemli bir kısmını ise zirai açıdan değerli pek çok özelliği barındıran yabani kaynaklar oluşturmaktadır [11]. Örneğin yabani olarak kabul edilen ve ekim için çok değerli olmadığı düşünülen *M. sativa* ssp. *falcata*'dan kışa dayanıklılık, sürünücü kök yapısı ve bazı yaprak hastalıklarına direnci içeren zirai karakterleri kontrol eden genler modern kültür yoncasına aktarılmıştır. Soğuk habitatlara adapte olmuş bu alttürlerin kullanımı daha kuzey bölgeler için oldukça değerli olarak görülmektedir. Bu yüzden *M. sativa* tür kompleksi içerisindeki tüm sistematik birimler ile ilişkili türlerin aynı zamanda zirai kullanım açısından da toplanması, tanımlaması ve koruma altına alınması oldukça önemlidir[2].

Poliploidi fenomeni bitkilerde oldukça sık rastlanan bir durumdur. Fosil bilgileri angiospermilerin %70 kadarının poliploid kökene sahip olduklarını göstermektedir[12, 13, 14]. Poliploidi evriminde henüz aydınlatılamamış noktalar bulunmaktadır ve moleküler araçların etkin kullanımı ile bu noktaların aydınlatılması mümkündür. Bu durum özellikle otopoliploidi açısından düşünüldüğünde daha geçerli görünmektedir[15, 16, 17, 18]. *Medicago sativa* L. (Fabaceae) pek çok nedenden dolayı poliploidi çalışmaları için ilgi çekici bir bitkidir[7]. Yonca genetik kaynakları başarılı bir şekilde depolandığı için araştırmacıların ulaşabildiği oldukça zengin bir gen havuzu vardır ve bu havuz hem diploit hem de tetraploit üyeleri kapsamaktadır. Ayrıca tetraploitleşme ve diploitleşme halen devam etmektedir[6].

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kültür Yoncası

Eski bir ekim tarihine sahip olan kültür yoncası, yüksek verime, yem kalitesine ve dayanıklılığa sahip olduğu için zirai açıdan tercih edilen çok yıllık otsu bir bitkidir. Zengin protein ve vitamin içeriğinden dolayı hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı tüm dünyada ‘Yem Bitkilerinin Kraliçesi’ olarak nitelendirilmektedir[19]. En önemli özelliklerinden birisi de atmosferde bolca bulunan ancak bitkiler tarafından doğrudan kullanılamayan gaz azotu organik azota dönüştürebilme yeteneğine sahip olmasıdır. Yonca hem kuru ot üretimi hem silo yemi yapmak amacıyla kullanılmasının yanında otlatılmaya da elverişli olduğu bilinmektedir. Yüksek adaptasyon yeteneği, uzun ömrü, bir vejetasyon devresinde birçok defa biçilebilir olması, yüksek verime sahip olması, yüksek besin değerli olması, gibi özellikleri onu diğer yem bitkilerinden üstün kılmaktadır[20]. Ayrıca bitki, kuru maddesinde, % 15-22 protein, % 2–4 yağ ve % 18-26 oranında lif içermektedir[21].

Yonca bitkisi, *Medicago sativa-falcata* kompleksi ya da *Medicago sativa* tür kompleksi olarak adlandırılan bir birimden yapay seleksiyon sonucu geliştirilmiştir[4]. Bu ıslah sürecinde kompleksin birimleri kullanıldığı için de komplekse dâhil edilen birimler kültür yoncasının birincil gen havuzunu oluşturmaktadırlar[4, 8, 22].

2.2 Poliploidi

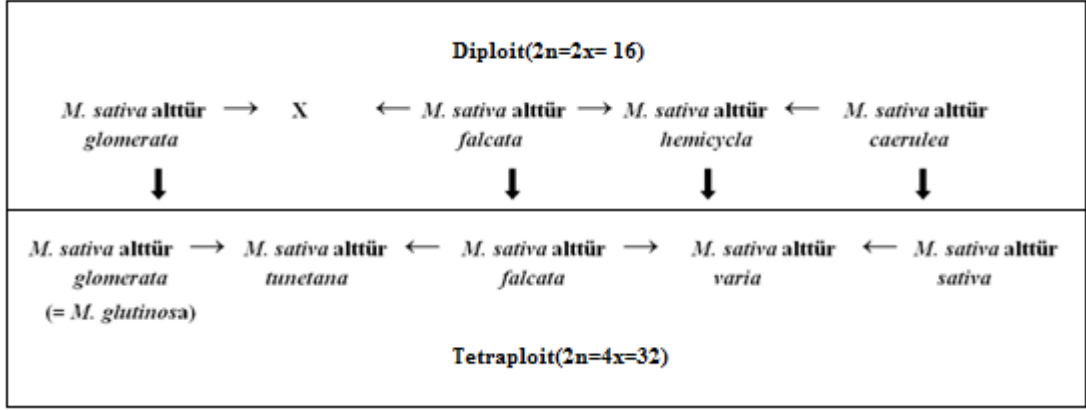
Kromozomların canlılardaki temel sayısı haploit ismi ile ifade edilmektedir. Gelişmiş yüksek organizmalar yapılarında birisi anneden diğeri de babadan gelen iki genom kopyası içermektedirler. Bundan dolayı bu canlılar diploit organizmalar olarak ifade edilmektedir. Canlılarda kromozom sayılarında değişiklikler görülebilmektedir. Bu değişiklikler, setlerde ya da setin sadece bir kısmında meydana gelebilmektedir. İki den daha fazla kromozom seti ihtiva eden canlılara ise poliploit canlılar denilmektedir. Poliploidi hayvanlarda seyrek olmasına karşın bitkilerde ise çok daha yaygındır. Poliploidi taşıdığı genomun kökenine göre Allopoliploidi ve Autopoliploidi şeklinde genel olarak 2’ye ayrılmaktadır[7, 23, 24]. Allopoliploidiler birden fazla türün melezleşmesiyle ya da daha başka bir ifadeyle farklı genomların fizyonu sonucu

oluşurlar[7, 28, 29]. Otopoliploidiler aynı tür içinde kromozomların katlar halinde artmasıyla oluşurlar. Yani ilave olan her bir kromozom atasal türün aynısıdır[7, 23, 24].

Kompleksin birimleri diploit ($2n=2x=16$) ve tetraploit ($2n=4x=32$) olmak üzere iki farklı ploidi düzeyine sahiptirler. Kompleksin farklı ploidi düzeyleri arasında hibridizasyon bariyerleri bulunmamaktadır[25, 26, 27].



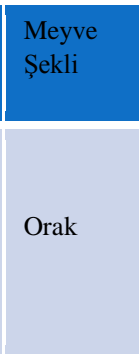
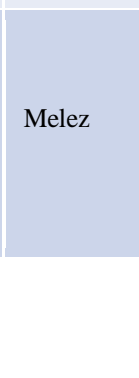
2.3 *Medicago sativa* Tür Kompleksi

Kompleks, aralarında üreme engeli bulunmayan diploit ($2n = 2x = 16$) ve tetraploit ($2n = 4x = 32$) alttürlerden oluşmaktadır (Şekil 2.3.1). Bu birimlerin ayrıştırılması son zamanlara kadar sadece çiçek rengi ve meyve şekli gibi morfolojik karakterler üzerinden yapılmıştır[3, 4, 28]. Bu kriterler sadece birkaç gen ile kontrol edildiğinden moleküler metodların kullanılma gereksinimi duyulmuş ve sınıflandırmanın test edilmesi gerektiği vurgulanmıştır[29]. Morfolojik karakterlerin yanısıra moleküler teknikler ve markırlar kullanılarak ploidi düzeyine göre de sınıflandırma yapılmıştır[5]. *M. sativa* tür kompleksinin üyelerinde üç farklı çiçek rengi görülmektedir. Bu renkler sarı, mor-menekşe ve ebruli (sarı-mor) renklerdir. Meyve şekli ise orak ya da kıvrımlı olabilmekte ve kıvrım sayısı kademeli olarak artış göstermektedir[3, 4, 28]. Her bir sistematik birimin tanımlanmasında kullanılan morfolojik karakterler detaylandırılmıştır (Çizelge 2.3.1.1 ve Çizelge 2.3.2.1). *M. sativa* subsp. *falcata* (sarı çiçek rengi, orak şeklinde meyve), *M. sativa* subsp. *caerulea* (mor-menekşe çiçek rengi, kıvrılmış meyve) ve bu iki alttürün doğal melezi olan *M. sativa* subsp. *hemicycla* (ebruli çiçek rengi, melez meyve şekli) diploit alttürleri oluşturmaktadır. *M. sativa* subsp. *sativa* (diploit alttür olan *caerulea*'nın morfolojik eşleniği) *M. sativa* subsp. *falcata* ve tetraploit melez olan *M. sativa* subsp. *varia* kompleksin tetraploit birimlerini oluşturmaktadır.









Şekil 2.3.1 *Medicago sativa* tür kompleksi içerisindeki birimlerin taksonomik ilişkisi[30].

Çizelge 2.3.1.1 *Medicago sativa* tür kompleksinin diploit alttürleri[5].

Altür İsmi	Çiçek Rengi	Çiçekler	Meyve Şekli	Meyveler
<i>M. sativa</i> subsp. <i>falcata</i>	Sarı		Orak	
<i>M. sativa</i> subsp. <i>caerulea</i>	Mor Menekşe		Kıvrılmış	
<i>M. sativa</i> subsp. <i>hemicycla</i> (Melez)	Ebruli		Melez	

Çizelge 2.3.2.1 *Medicago sativa* tür kompleksinin tetraploit alttürleri[5].

Alttür İsmi	Çiçek Rengi	Çiçekler	Meyve Şekli	Meyveler
<i>M. sativa</i> subsp. <i>sativa</i>	Mor Menekşe		Kıvrılmış	
<i>M. sativa</i> subsp. <i>falcata</i>	Sarı		Orak	
<i>M. sativa</i> subsp. <i>varia</i> (Melez)	Ebruli		Melez	

2.3.1 Komplekste Genetik Yapı

Diploit alttür *falcata* ve *caerulea*'nın kendi içerisinde melezleşmesi diploit *hemicycla* hibritinin oluşumuna izin verirken tetraploit alttürler olan *sativa* ve *falcata* ise alttür *varia* hibritinin oluşumuna izin vermektedir. Komplekste gerçekleşen gen akışı genetik çeşitliliğin önemli bir parçasını oluşturmaktadır[27].

Diploit ve tetraploit alt türlere ait gen havuzunun belirlenmesi genetik çeşitlilik ve populasyon yapılarının ortaya çıkarılması için önemli bir kaynak sunmaktadır[8]. Mor çiçekli alttürler olan diploit *caerulea* ve tetraploit *sativa* sıcak bölgelere adapte olmuşlardır. Mor çiçekli alttürlerin yayılış alanları içerisinde olduğu düşünülen ilk bölge Kafkas Bölgesi[3, 4, 28, 31], diğer bölge ise Kazakistan ve Özbekistan'ı içeren Orta Asya bölgesidir[4, 31]. Ayrıca Akdeniz bölgesi ve Güney Asya'da yayılış gösterdiği

bilinmektedir fakat tetraploit *sativa* Avrasya ve Kuzey Afrika bölgesinde daha fazla yayılış göstermektedir. Tetraploit *sativa*'nın genetik kaynağının büyük olasılıkla diploit *cearulea*'dan indirgenmemiş gametler yoluyla ortaya çıktığı ve kültür yoncasının ıslahı ile geliştiği düşünülmektedir[4]. Kültür yoncasının verimi diploit alttürlerden daha fazla olduğu için ekonomik açıdan daha fazla öneme sahiptir. Bu durum ise alttür *sativa*'nın dünyada daha hızlı yayılmasına neden olmuştur[8].

Kompleksteki alttürler arasında yer alan, sarı çiçekli ve oraksı tohum şekline sahip olan alttür *falcata* Almanya'dan Doğu Sibirya'ya ve Karadenizden Kuzey Rusya'ya kadar yayılış göstermektedir. Ayrıca soğuk bölgelere oldukça iyi adapte olmakta ve modern çeşitler için kışa dayanıklılığa katkıda bulunduğu düşünülmektedir[4, 32]. Bunun yanı sıra alttür *falcata* yonca ıslah çalışmaları için verim artışına katkıda bulunma potansiyeline sahiptir[33, 34, 35, 36]. Bu alttür doğada hem diploit hem de tetraploit sitotiplere sahiptir. Takson içerisinde diploit alttürlerin hibridi alttür *hemicycla*, tetraploit alttürlerin hibriti ise alttür *varia*'dır. Bu hibritler her iki grup için ara çiçek rengi ve tohum şekline sahiptirler. Taksonlar içerisinde hibridizasyon mevcuttur ve farklı ploidi düzeylerinde bile indirgenmemiş gametler yoluyla gen akışı olmaktadır[27].

Yoncanın genetik kaynak koleksiyonları, bitki ıslah programları için hayati öneme sahiptirler. Çünkü ıslah materyallerini desteklemek amacıyla bu genetik kaynaklar kullanılmaktadır. Ayrıca genetik ve koruma çalışmaları için uygun genetik kaynak seçiminde yardımcı olmaktadır[37, 38]. Amerikan Tarım Bakanlığı Genetik Kaynakları Bölümü (USDA-GRIN) dünyadaki en büyük genetik kaynak koleksiyonunu korumakta ve komplekse ait tüm dünyadan toplanmış 4000'den daha fazla aksesyonu içermektedir.

2.3.2 Kompleksin Populasyon Yapısı

Medicago sativa–falcata kompleksi'nin populasyon yapısının belirlenebilmesi için kompleksin diploit ve tetraploit üyeleri kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Kompleksin diploit alttürlerine ait populasyon yapısının değerlendirildiği temel çalışmada[5] *caerulea* alttürü ile *falcata* alttürünün birbirinden ayrıldığı moleküler belirteçler ve bunların analizi neticesinde belirlenmiştir. Diploitler için dünyanın farklı coğrafyalarından elde edilen farklı yonca populasyonları kullanılmıştır. Bu populasyonlar Amerika'da bulunan ve dünyanın en büyük genetik kaynak rezervi olan USDA-GRIN sisteminde kayıtlı olan alttürlerden oluşturulmuştur. Her iki alttüre ait morfolojik farklılıklar genetik markırlarla desteklenerek ayırım doğrulanmıştır. Analizler derinleştirildiğinde ise hem *caerulea* alttürünün hem de *falcata* alttürünün kendi içlerinde ikişer alt populasyona ayrıldığını da ortaya koymuştur. Bu ayrılma *caerulea* alttüründe kuzey ve güney yayılış alanları temelinde coğrafik olarak gerçekleşirken, *falcata* alttüründe ekocoğrafik olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca burada diğer bir alttürü ifade eden küme olan *hemicycla* genomuna ait populasyonların bağımsız bir grubu oluşturduğu saptanmıştır[5].

2.3.3 Kompleksin Bilinmeyenleri

Komplekste, diploit alttürler, bunların sınıflandırılması ve populasyon yapısı bilinmektedir. Sınıflandırma için sadece diploit alttürlerin kullanılması yeterli değildir. Bu bağlamda tetraploit üyelerin de moleküler düzeyde (markır destekli) çalışılması ve sınıflandırılması gerekmektedir. Gerek tetraploit üyelerin gerekse diploit üyelerin çalışılmasıyla birlikte kompleks hakkında daha fazla bilgi elde edilecektir.

2.4 Moleküler Markırlar

Bitkilerin sistematik analizleri için yoğunlukla canlıların morfolojik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Morfolojik olarak ortaya çıkan çeşitlilik, genetik çeşitliliğin sadece küçük bir yüzdesini oluşturduğu gibi, genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı da morfolojiye

yansınamaktadır[39]. Moleküler markırlar, DNA'nın bir parçası ya da belirli bir genle beraber kalıtılan DNA parçası olarak tanımlanabilirler. Canlıların yapısını belirleyen şifre de DNA zincirlerinde bulunduğu için markırlar, canlı popülasyonundaki çeşitlilik veya genotipler arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirliğe sahiptirler[40]. Yaygın olarak kullanılan markır metodları; RFLP, RAPD, AFLP, ISSR, SCAR, STS, CAP, SSR, EST, SNP ve DarT şeklinde sıralanabilir[39].

2.4.1 SSR: Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeats) / VNTRs: Çeşitli Sayıda Ardışık Tekrarlar (Variable Number Tandem Repeats)

Yüksek organizmalarda henüz görevleri tam olarak bilinmeyen fakat düzenleyici rollere sahip oldukları düşünülen, rastgele olarak ardışık tekrarlanan, 2-6 nükleotit gruplarından oluşan bölgeler bulunmaktadır. Bu tekrarlar içerdikleri nükleotit sayısına göre mikrosatellit veya minisatellit olarak adlandırılmaktadırlar. (AT), (GT), (ATT), (CTT) veya (GATA) gibi nükleotitlerin n sayıda tekrarlarından oluşmaktadırlar. Mikrosatellitler aynı zamanda STR (Short Tandem Repeats) veya SSR (Simple Sequence Repeats) olarak da ifade edilmektedirler. 11-60 bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitlerden (VNTR: Variable Number Tandem Repeats) farklıdırlar[40]. Yüksek düzeyde polimorfizm göstermelerinin yanı sıra kodominant olmaları, PCR yoluyla hızlı bir şekilde çoğaltılabilmeleri ve bilinen primerlerinin olması gibi olumlu yönlerinden dolayı SSR markırları diğer markır sistemlerinden daha kullanışlı ve verimlidirler[41]. EST (İşaretli İfade Edilen Diziler)'ler 150-400 baz çifti büyüklüğünde olup farklı mRNA'ların tamamına veya belli bir bölümüne karşılık gelen cDNA klonlarının dizi analizi sonucu oluşturulmuş DNA markırlarıdır. Bu markırlar, tanımlama ve haritalama çalışmalarında kullanıldıkları gibi SSR'ların belirlenmesinde de kullanılmaktadırlar[42].

2.4.2 Moleküler Markırların Komplekste Kullanılması

Restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmleri (RFLP) analizi vasıtasıyla mitokondrial DNA varyasyonunun değerlendirildiği bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın neticesinde, tüm veri setinde (155 birey) yirmi iki mitotip teşhis edilmiştir.

Tahmin edilen sahanın orjininden (Merkezi Asyanın yakın doğusu) elde edilen yabancı havuzunda çeşitlilik yüksek olarak bulunmuştur[43].

Polimorfik DNA markırları olarak bilinen SSR lokuslarının kullanımı, birincil olarak kolaylıkları ve populasyon genetik analizleri gücünden dolayı hem çalışma miktarında hem de organizma miktarında son on yılı aşkın bir süredir oldukça yaygınlaşmıştır[44]. Çok yıllık *Medicago* türleri ve populasyonları arasındaki varyasyonun düzeyini belirlemek amacıyla SSR markırları kullanılarak birkaç çalışma gerçekleştirilmiştir. Diwan ve arkadaşları[45] SSR markırlarını ilk kez *Medicago*'da geliştirmişlerdir. Bu araştırmacılar, yoncada genetik çeşitliliği tanımlamak ve genotipler arasındaki genetik ilişkiyi analiz etmek için SSR'ların nasıl kullanılabildiğini göstermişlerdir. Mengoni ve arkadaşları[46] kültür yoncası çeşitlerindeki polimorfizmi belirlemek için kloroplastik SSR'in gücünü teyit etmişlerdir. Son zamanlarda, 107 SSR'dan oluşan bir takım ile *M. sativa*'da haritası çıkarılmış[47] ve bu haritanın *Medicago truncatula* ile karşılaştırılması yapılmıştır. İlerleyen zamanlarda ise komplekste yer alan birimlerin sistematik konumları için moleküler markırlar kullanılmaya başlanmıştır[5, 6, 7, 29, 48]. Bu amaçla yapılan en detaylı çalışmalarda[5, 6] diploit alttür *falcata* ile *caerulea*'nın ayrıştığı tespit edilmiştir. Moleküler araçlar aynı zamanda genetik çeşitliliğin merkezlerini tespit etmek amacıyla da kullanılmışlardır. Alttür *caerulea*'nın çeşitlilik merkezinin tespiti amacıyla yapılan çalışmada, Kafkasya ve Orta Asya kökenli populasyonların ortalama F_{ST} değeri, allel çeşitliliği ve heterozigotik değeri karşılaştırılmış ve Güney Kafkasya bölgesinin, alttür *caerulea*'nın çeşitlilik merkezi olabileceği önerilmiştir[48].

2.5 Linkage Eşitsizliği (LD) ve Kompleks

Bitki ıslah programlarında fenotipik varyasyona sebep olan DNA polimorfizmlerini tespit etmek gittikçe yaygınlaşan bir hedeftir[49]. Tarihsel olarak, moleküler markırlar kullanılarak kontrollü çaprazlamalar sonucu ayrışan populasyonlar fenotip ile genetik materyal arasındaki ilişkiyi tespit etmede kullanılmıştır[50]. Son dönemlerde ise bu amaç doğrultusunda 'Association Mapping (İlişki Haritalama)' çalışmaları kullanılmaya başlanmıştır[51]. Bu haritalama tekniğinde bir populasyon içerisindeki

rekombinasyonun zaman içerisinde kromozomdaki eşitsizlikleri çok kısa kromozomal mesafelere daraltacağı gerçeğinden hareketle DNA varyasyonları ile fenotip arasında istatistiksel ilişki kurmayı hedeflemektedir[52]. Linkage eşitsizliğinin genomdaki mesafesi genotip ve fenotipler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi için ihtiyaç duyulan markırların sayısının belirlenmesinde ve haritalama stratejisinin kurgulanmasında önemli bir parametredir[53, 54]. Sonuç olarak ilişki haritalama çalışmaları için genomların LD yapısı bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır[55]. Komplekste tüm genoma ait LD'nin düzeyi ve uzunluğu yabancı diploit populasyonlar ile bir tetraploit ıslah populasyonunda SSR markırları kullanılarak hesaplanmış ve LD'nin çok kısa mesafelerde bile tamamen yok olduğu görülmüştür[5, 56]. Gen içi LD hesaplarında ise yine diploit birimlerde ve bazı tetraploit ıslah populasyonlarında hesaplanmış ve 500 baz mesafesinden sonra LD'nin düştüğü tespit edilmiştir[57].

2.6 Literatür Özeti

Günümüze kadar konuyla ilgili pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar daha çok kompleksin üyelerini belirlemeye yönelik, değişik markırların kullanıldığı populasyon yapısı analizleri, genetik çeşitlilik analizleri, moleküler sınıflandırma analizleri şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

SSR markırları kullanılarak kompleksin diploit birimlerinin populasyon yapısının anlaşılması için yapılan bir çalışmada, morfoloji temelli mevcut sınıflandırmanın moleküler markır bilgileri ile örtüştüğü ortaya çıkmıştır. *M. sativa* subsp. *falcata* ile *M. sativa* subsp. *caerulea*'nın genetik olarak ayrıştığı net olarak tespit edilirken *M. sativa* subsp. *hemicycla*'nın melez olduğu teyit edilmiştir. Bunlara ilaveten *M. sativa* subsp. *caerulea* ile *M. sativa* subsp. *falcata*'nın kendi içlerinde ikişer ekotipe ayrıldığı bulunmuştur. Alttür *caerulea*'ya ait aksesyonlar buldukları enlemlere göre ayrışırken alttür *falcata*'nın populasyonlarındaki ayrışımın ekocoğrafyaya dayanmakta olduğu tespit edilmiştir[5].

Yapılan diğer bir çalışmada, 89 mikrosatellit markırı ile gösterilen üç alttürün (*M. sativa* ssp. *caerulea*, *falcata* ve *hemicycla*) yaygın doğal varyasyonu 120 aksesyondan elde edilen 374 bireysel genotipin değerlendirilmesiyle yabancı diploit yonca genetik

kaynağının populasyon genetik yapısı analiz edilmiştir. Genom kompozisyonu simpatrisel olarak büyümüş olan alttürlerin içerisindeki alttürler ya da grupların olduğu yerlerde oldukça fazla miktarda gen akışının olduğunu göstermektedir. Bu sonuçların ıslahçılara genetik kaynak geliştirme uygulamalarında maksimum boyutlarda çeşitlilik için uygun diploit aksesyonların tanımlanmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir[29].

Yapılan bir başka çalışmada, yoncanın yabani - kültür tür kompleksinde olduğu düşünülen iki nötral çekirdek lokusunda DNA sekans çeşitliliği araştırılmıştır. Çalışmanın neticesinde, yüksek düzeyde polimorfizm bulunmuştur. Kültürleştirilmiş havuz, yabani havuzdan ortalama %31 daha az çeşitlilik taşımaktadır fakat lokuslar arasında yüksek bir farklılık taşımaktadır. Kültürleşme prosesinin birleştirilmiş simülasyonları bu sonucun tahmin edilen sabit bir populasyon boyutuyla açıklanamayacağını fakat daha çok kültürleşme sırasında nüfusal bir şişe boynu etkisi ile uyumlu olduğunu göstermiştir. *M. sativa* tür kompleksinin ilişkili alttürleri arasındakine benzer olarak yabani ve kültürleştirilmiş formlar arasında çeşitliliğin çok düşük bir düzeyi belirlenmiştir. Bununla birlikte yabani İspanya populasyonlarının orijinalliği mitokondrial DNA polimorfizmi temelinde gözlenmiş ve onaylanmıştır. Bu sonuçlar, populasyon içi polimorfizminin örnekleri ile birlikte tarihsel nüfus ve evrimsel prosesleri araştırmak için mitokondrial DNA ve fenotipik değerlendirmelere tamamlayıcı olarak çekirdek dizi polimorfizminin umut verici bir araç olabildiğini göstermektedir[32].

Diğer bir çalışmada ise, *falcata* genetik kaynağının geniş bir kapsamda morfolojik varyasyonunu araştırmak ve *falcata* morfolojik varyasyonunun kendiliğinden alttür *sativa* ile hibrit çaprazlarındaki *falcata* genetik kaynağındaki performansla nasıl ilişkili olduğu belirlenmiştir. Çalışma kapsamında yerel alttürleri kapsayan 40 populasyondan elde edilen *falcata* genotipleri seçilmiştir ve biyokütle verimi, bitki genişliği, bitki boyu, büyüme tarzı, biyokütle yoğunluğu, bitki olgunluğu ve kesim sonrası yeniden büyüme karakterleri genotiplerde ölçülmüştür. Ayrıca, büyüme sezonunda onların hibrit soyları üç kez gerçekleşmiştir. Bunun yanı sıra, haftalık bitki boyları ölçülmüş ve büyüme oranları bir Gompertz fonksiyonu ile belirlenmiştir. *Falcata* parental genotipleri; bitki genişliği, bitki boyu, büyüme tarzı, yoğunluğu ve erişkinliği için fenotiplerin tam bir

çeşidini göstermiştir. Heterosis sadece biyokütle verimi için gözlenmemiş aynı zamanda bitki eni, bitki boyu ve daha dik büyüme alışkanlığı için de gözlenmiştir. En verimli *sativa – falcata* hibritleri; bitki eni, bitki boyu ve bitki yoğunluğu ile artmıştır. Avrupa genetik kaynağı Asya materyalinden daha uzundur ve daha hızlı yeniden büyüme göstermiştir. *Sativa – falcata* hibritleri birinci ve üçüncü hasatlardan önceki, sadece iki-üç haftaya kadar olan büyümeden sonra yarı alttürlerden üstün biyokütle verimi oluşturmuştur. İkinci hasattan önce biyokütle üretimi ortalama 30 gün için yarı alttürlerden daha düşük olarak belirlenmiştir. Bir ebeveyn olarak *falcata* kullanılan hibritler düşük seviyedeki yeniden gelişimlerinden dolayı yoğun hasat üretimine son zamanlarda adapte olamamışlardır[36].

SSR markırlarının değerlendirildiği bir çalışmada, *Medicago* cinsinden elde edilen, SSR içeren sekansların varlığı için gen bankası araştırılmış, yonca genomunda SSR DNA'sının varlığı ile frekansı değerlendirilmiş ve çok yıllık-tek yıllık *Medicago* türlerinin bir spektrumunda seçilmiş markırların fonksiyonu belirlenmiştir. Bir yonca genomik DNA kütüphanesinin taranması ve SSR'ları taşıdığı düşünülen klonların sekanslanması, tetraploit genomda yaklaşık olarak $19000 (AT)_n + (CT)_n + (CA)_n + (ATT)_n$ 'nin olduğunu göstermiştir. Farklı temel motifleri ile seçilmiş 4 SSR lokusunda kalıtım Mendel beklentileri ile uyum göstermiştir. Ek olarak, *Medicago* türlerinin bir dizi genotipi de uyum göstermiştir. *M. sativa* kompleksinin çok yıllık 10 alttürü ve diğer çok-tek yıllık *Medicago* türleri herbir genotipte, herbir lokustaki SSR allellerinin varlığını, sayısını ve boyutunu öğrenmek için lokusların herbirinde analiz yapılmıştır. Bu çalışmalar, genetik haritaların yapımı için yoncada SSR markırlarının fonksiyon görebildiğini ayrıca genotip teşhisi, genetik ilişkileri değerlendirme ve taksonomik ilişkileri değerlendirme amaçları için *Medicago* türlerinin bir serisinde kullanışlı olabileceğini göstermektedir[45].

İki farklı markır grubunun kullanıldığı başka bir çalışmada, İtalya ve Mısır genetik kaynaklarından elde edilen yoncannın dört ekotipi ve iki varyetesinde rastgele çoğalmış polimorfik DNA (RAPD) ve mikrosatellit varyasyonunun düzeyi değerlendirilmiştir. 10 populasyondan toplanan 100 bitkilik bir örnek, 41 RAPD markırı ve 37 basit dizi tekrar (SSR) markırları vasıtasıyla analiz edilmiştir. Hem kültür populasyonlarının herbiri içerisinde çok yüksek derecede genetik çeşitliliğin olduğu hem de mevcut bitkilerin

herbiri için eşsiz bir parmakizi yönteminin tasarlanabildiği belirlenmiştir. Bitkiler ve populasyonlar arasındaki genetik ilişkiler AMOVA (Moleküler Varyans Analizi) ve F_{ST} analizleri ile hesaplanarak analiz edilmiştir. RAPD'ler Mısır varyetesinden İtalyan populasyonlarını ayırt etme yeteneği göstermiştir. SSR'lar ise dört İtalyan yonca ekotipinin güçlü ayırma olanak tanımıştır. RAPD ve mikrosatellitlerin tetraploit yoncada genetik varyasyon ve genetik ilişkiyi değerlendirmek için kullanışlı ve güçlü araçlar olabildiği sonucuna varılmıştır[46].

Genetik yapı ile genetik harita hazırlama zorluğu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada, ayrışan populasyonlarda QTL'leri belirleyebilmek amacıyla EST database'inden elde edilen model baklagil *Medicago truncatula*'da çoğu tanımlanmış olan mevcut kodominant mikrosatellit markırları (SSR'lar) kullanılmıştır. Ototetraploitler için özel haritalama prosedürleri kullanılarak AFLP ve SSR markırları ile bir genetik harita inşa edilmiştir. Haritalanan bir yonca populasyonunda tetrasomik kalıtım inşa edilmiştir. Çalışmada, yonca DNA'sı ile çoğaltılmış *Medicago truncatula* EST database'inde SSR motiflerinin her bir yanında primer çiftlerinin %80'inin tanımlandığı kanıtlanmıştır. Magali ve Mercedes kültür yoncalarından elde edilen 2 heterozigot parental bitkinin çaprazlanması sonucu oluşturulan 168 bireylik bir F_1 haritalama populasyonu kullanılmıştır. Neticesinde 599 AFLP markırı ve 107 SSR lokusu elde edilmiştir. Sadece 3 lokus, açık bir tetrasomik kalıtım göstermiştir. Çoğu SSR lokusu için çift indirgenme durumu önemli değildir. Diğer lokuslar için özel olmayan genotipler oluşturulmuştur. Böylece önemli çift indirgenme, ayrışım bozukluğundan ortaya çıkabilmektedir. Herbir ebeveyn için genetik harita dört homolog kromozomun 8 grubunu taşımaktadır. Haritaların uzunluğu Magali ve Mercedes ebeveynleri için markırlar arasında 7.6 ve 9 cM'lık ortalama bir mesafe ile sırasıyla 2649 ve 3045 cM'dır. Sadece SSR markırları kullanılarak 709 cM'ı kapsayan bir bileşim haritası inşa edilmiştir[47].

Diğer bir çalışmada, diploit ($2n = 2x = 16$) yoncanın geliştirilmiş bir genetik haritası, 137 bireysel bitkiden oluşan bir F_2 populasyonunda 800'den fazla genetik markırım kalıtım analizleriyle geliştirilmiştir. *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* x *Medicago sativa* ssp. *caerulea* çaprazının bir bireysel F_1 hibritinin kendi kendine döllenmesinden, F_2 ayrışma populasyonu elde edilmiştir. Bu haritalama populasyonunun önceki yonca

genetik haritasının yapımı için kullanılan ile aynı olduğu görülmüştür. Maximum-likelihood eşitlikleri ve ilişkili bilgisayar programları kullanılarak genetik analizler gerçekleştirilmiştir. Kendisinde geliştirilen yoncanın genetik haritası 8 linkage grubunda 868 markırdan (4 morfolojik, 12 izozim, 26 tohum proteini, 216 RFLP, 608 RAPD ve 2 özel PCR markırı) oluşmaktadır. 80 markır, bilinen genler, önceki 2 tanesi sitolojik olarak lokalize genleri içerenler, rDNA ve tubulin lokuslarıdır. Genetik harita ortalama 0.8/cM'lık bir markır yoğunluğu ile 754 cM'lık alanı kapsamaktadır. Fiziksel ve genetik mesafeler arasındaki ilişki herbir santimorganda yaklaşık 1000-1300 kilobaz çiftidir. Bu haritada 6, 7 ve 8 linkage gruplarında bazı markırların linkage ilişkisi bir önce yayınlanmış olandan farklıdır. Bu çelişkinin nedeni bozulmuş ayrışma gösteren genetik linkage markırlarının bağlantısı kopmuş yapay olarak bağlı genetik bölgelerine sahip olmasıdır. Rekombinasyon fraksiyonlarındaki fazla miktardaki heterozigot genotiplerin dezavantajlı etkisinden kurtulmak için yanıtıcı linkageleri dışarıda bırakmaya ve genetik mesafeleri daha doğru bir şekilde tahmin etmeye izin veren yeni tanımlanan maximum-likelihood formülleri ve renkli haritalama yöntemleri kullanılmıştır[58].

Populasyon farklılaşmasının değerlendirildiği bir çalışmada, hem allozimler hem de kantitatif karakterler konusunda, yabani ve kültür gen havuzu arasındaki ve içerisindeki populasyon farklılaşma örneği ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. Çeşitlilik örnekleri doğal populasyonların üç çeşidini tanımlamıştır. Birincisi, bazı populasyonlar hem allozimler hem de kantitatif karakterler bakımından arada yer almaktadır. Bu durum, üründen yabani örneklere gen akışının bazı lokasyonlarda hibrit populasyonlar oluşturduğunu göstermektedir. İkincisi, bazı populasyonlar hem allozimler hem de kantitatif karakterler bakımından, tüm kültürü yapılmış yerel ırklardan farklılık göstermektedir. Bu durum muhtemelen doğal ya da kültür populasyonlarında nüfussal plansızlıktan dolayı yer ve zaman bakımından değişebilen gen akışı ile sonuçlanmaktadır. Üçüncüsü ise, kültürü yapılmış yerel ırklardan sağlanan farklılaşma iki populasyonda sadece kantitatif karakterler için başarılıdır fakat allozimler için başarısızdır. Bu durum ise bazı lokasyonlarda doğal seleksiyonun, doğal çaprazlanan populasyonların içerisine kültüre edilmiş karakterleri yerleştirmek için gen akışına karşı koyabileceğini göstermektedir[59].

Yapılan bir çalışmada, yonca hastalıkları ve böcek direncine adapte olamamış iki genetik kaynak (*Medicago sativa* ssp. *sativa* Peruvian ve *M. sativa* ssp. *falcata* WISFAL) ve Kuzey Amerika'nın adapte olmuş kültür yoncaları arasında genetik çeşitlilik ve kombine olmuş yeteneği değerlendirilmiştir. Populasyon yapısı analizleri WISFAL ve Peruvian genetik kaynaklarının kültür yoncalarından elde edilenlere göre genetik olarak oldukça farklı olduklarını ortaya koymuştur. Halbuki, Peruvian kültür yoncalarına göreceli olarak daha yakın bulunmuştur. Peruvian ve WISFAL genetik kaynakları yeni bir hibrid populasyonun oluşumuna aracılık etmişlerdir. Bu populasyon numuneler olarak üç kültür yoncası ile test edilmiş ve çaprazlanmıştır. Geri çaprazlama ataları; hibrid populasyon, orjinal genetik kaynaklar (Peruvian, WISFAL ve kültür yoncaları), üç kültür yoncası ve kültür yoncalarını üçlü hibritinin Peruvian ve WISFAL geri çaprazlamaları için yem verimi amacıyla değerlendirilmiştir. Çalışma, Amerika'da Temuco, Şili, Arlington ve Wisconsin şehirlerinde gerçekleştirilmiştir. Arazi iki sezon boyunca hasat edilmiştir. Bu değerlendirmelerden elde edilen sonuçlar, Peruvian x WISFAL populasyonu ve onların kültür yoncaları arasındaki hibritlerin, kültür yoncaları kadar verimle sonuçlandığını ortaya koymuştur. Peruvian ile WISFAL arasında ve bu genetik kaynaklar ile kültür yoncaları arasında heterosis gözlenmiştir. Her bir genetik kaynağın, farklı önemli allelleri taşıdığı belirlenmiştir. Peruvian ve WISFAL populasyonları kültür yoncalarına tamamlayıcı olan farklı lokustaki allelleri taşımaktadırlar. Tek bir populasyonda bir araya gelen ve zenginleşen bu alleller yonca kültürleri ile geliştirilmiş birleşme yeteneğinde sonuçlanabilmektedirler[60].

Diğer bir çalışmanın konusu ise, sekiz SSR markırı ile ıslah havuzunda ve kültürler arasında bir ıslah programından orjinlenen yedi kültür arasındaki farklılaşma düzeyini araştırmaktır. Herbir lokustaki allellerin sayısı 3 ile 24 arasında değişmektedir. Muhtemelen null allellerden dolayı sadece bir istisna ile kültür yoncalarında tüm lokuslar bir panmiktik dengesinde olarak belirlenmiştir. Yedi SSR lokusu ile her bir kültür panmiktik dengesi bulunmuştur. Kültür yoncalarında ortalama gen çeşitliliği 0.665'ten 0.717'ye kadar sıralanan aralıkta oldukça yüksek çıkmıştır. Bunlar arasındaki çeşitlilik düşük fakat önemli bir F_{ST} parametresi göstermiştir. 21 çift kültür yoncası arasında 15 tanesi önemli derecede farklılığa sahip olarak ortaya çıkmıştır. Islah havuzu da yüksek bir çeşitliliğe sahiptir ve en yeni olanın dışında herbir kültür yoncasından önemli derecede farklıdır. SSR lokusundaki populasyon genetiği parametrelerinin

tahmini varyete ayrımı ya da genetik kaynakların kullanılması için kültür yoncaları ya da populasyonlar arasında değerlendirilen farklılıklar için uygulanabilir olmaktadır[61].

İran yoncası için yapılan bir diğer çalışmada ise Kerman populasyonunda (düşük enlemeler) ortalama genetik çeşitlilik 0.82 şeklinde ve Ghareyonjeh populasyonunda (daha yüksek enlemler) 0.93 şeklinde bulunmuştur. Populasyonlar arasındaki genetik ilişkiler UPGMA algoritmasıyla kümeleme analizi kullanılarak analiz edilmiştir. Populasyonlar arası genetik çeşitlilikteki değişimler enlem değişimleriyle uyumlu olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar SSR markırlarının populasyonlar içerisindeki ve populasyonlar arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmede ve genetik farklılaşmanın tahmininde yonca populasyonlarının tanımlanması için kullanışlı olduklarını göstermektedir[62].

Yapılan bir çalışmada ise, 4x-2x çaprazlarından sayısal olarak indirgenmiş gametler ve partenogenetik olarak geliştirilmiş haploitlerden yararlanılarak eşeyssel olarak diploit ve tetraploit yonca populasyonları üretilmiştir. Farklı plodi düzeylerinde bireylerden ziyade genetiksel olarak kıyaslanabilir populasyonların aşırı kolşisin ile katlandığı bilinmektedir. Ek olarak aynı sitoplazmada her iki ploidi seviyesi gözlenmektedir. Populasyonlar, yapısal olmayan karbonhidratların toplam yüzdesi (TNC), toplam azot yüzdesi (N), üç yapraklıların taze yaprak ağırlığı, glukoz-6- fosfat dehidrogenaz (G6PDA) aktivitesi, DNA ve suda çözünür protein konsantrasyonu (WSP) şeklinde takip eden karakterlerin analizi için bir fidanlık alanında ve kuru madde (DM) üretimini belirlemek amacıyla otlak alanlarda yetiştirilmiştir. Beklendiği gibi, DNA, WSP ve N'in konsantrasyonları temelde diploitlerde ve tetraploitlerde aynı olarak tespit edilmiştir. Tetraploit/diploit oranı, ploidi ile güçlü bir şekilde etkilenen bu karakterleri göstererek kuru madde verimi için 2.10, üç yapraklıların taze yaprak ağırlığı için 2.05, üç yapraklıların DNA'sı için 2.09 ve üç yapraklıların G6PDA'sı için de 1.78 şeklinde bulunmuştur. Üç yapraklıların G6PDA'sı tetraploitlerde daha yüksek olarak belirlenirken ploidiye ek faktörler tarafından etkilenen bu enzimin aktivitesini gösteren sadece bir D-T karşılaştırmasında önemli derecede yüksek olarak belirlenmiştir. Fenotipik farklılıklar, artan gen dozajı (poliploidi) ve genetik düzenleme arasındaki bir kompleks etkileşiminin sonucu olarak kanıtlanmıştır[63].

Yapılan farklı bir çalışmada mor petalli nodülsüz tek bir MN-1008 mutant yonca bitkisinin 7000'den fazla çiçeği diploit sarı çiçekli tek bir yonca bitkisinden elde edilen polen ile çaprazlanmıştır. Bu çaprazlamalardan elde edilen olgun tohumlar toplanmıştır ve sonrasında DNA fingerprinting ile birlikte morfolojik ve sitogenetik analizlere maruz bırakılmak üzere çimlendirilmiştir. Aynı nesilden gelen bir tanesi *M. sativa* DN-1008 gibi nodülsüz, mor çiçekli diploit bir bitki olabilmesine rağmen 26 canlı neslin dışında 6 tane hibrit bitki ve 19 tanesi de MN-1008'in kendini dölleyebilen türevleri olabilmektedir. Bu diploit nodülsüz yonca bitkisi, simbiyotik kök nodül gelişim biyolojisi hakkında daha fazla bilgi öğrenmek amacıyla nodül oluşumunun kapsamlı morfolojik, fizyolojik ve genetik analizlerini (gen klonlama ve haritalama) kolaylaştırmak için başlangıç materyali olarak görev yapmaktadır. Diploit, nodüllü hibrit F₁ bitkileri üretmek için DN-1008 sarı çiçekli diploit bir *M. sativa* ssp. *quasifalcata* bitkisi ile çaprazlanmıştır. Genetik analizlerde diploit bir durumda nn₁ ve nn₂ genlerine ayrılan bir F₂ popülasyonunun bir tetraploit popülasyondakinden daha kolay olduğu belirtilmiştir ve F₁ bitkilerinin kendileştirilmesiyle oluşturulabildiği ifade edilmiştir[64].

Yapılan bir başka çalışmada, Güney Manitoba (Kanada)'dan orjinlenen 12 adet yabancı yoncanın, 10 adet kültür yoncasının ve *M. falcata* genetik kaynağının genetik çeşitliliği 8 adet SSR markırı ve 14 adet fenotipik karakter kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda yabancı popülasyonlarda gözlemlenmiş genetik çeşitliliğin 10 kültür yoncası arasında belirlenmiş çeşitlilikle benzer olduğu bulunmuştur. Moleküler varyans analizi, farklı yabancı popülasyonlardakilerden ziyade popülasyonlar içerisinde (%99.8) oldukça büyük miktarda genetik varyasyon ile ortaya çıkmıştır. Küme analizi nötral lokus için yabancı popülasyonlar ve kültür yoncaları arasında farklılık göstermemiştir. Fenotipik karakterler için yüksek düzeydeki popülasyon farklılaşması, adapte olmuş karakterler için heterojen varlığı göstermektedir. Burada çalışılan fenotipik karakterler kültür yoncalarından elde edilen yabancı popülasyonlardan farklı bir biçimde ayrılmamıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar yabancı yonca popülasyonlarının genetiksel olarak değiştirilen yeni karakterlere ihtiyaç duyduğunu göstermiştir[65].

Genetik çeşitliliğin değerlendirildiği farklı bir çalışmada yoncanın kültür popülasyonları olan dört adet İran popülasyonundan elde edilen 48 bireysel bitkinin genetik çeşitliliği sekans-ilişkili çoğaltılmış polimorfizm (SRAP) markırları kullanılarak değerlendirilmiştir. 14 adet SRAP primer kombinasyonu, 95 tanesi polimorfik olan 193 fragment şeklinde üretilmiştir. Polimorfik fragmentlerin sayısı her bir primer kombinasyonu için 6.78'lik bir bant ortalaması ile 3'ten 10'a kadar sıralanmıştır. Ortalama polimorfik bilgi içeriği (PIC) tüm primer kombinasyonlar için 0.343 olarak bulunmuştur. AMOVA sonuçları, popülasyonlar arası genetik çeşitlilikte ($P < 0.0001$) önemli bir farklılığın olduğunu göstermesine rağmen popülasyon içerisindeki varyasyon tarafından açıklanan genetik varyasyon toplam genetik varyasyonun %93.17'si olarak hesaplanmıştır. Markır verisinin aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu (UPGMA) analizi, geliştirilmiş bir popülasyon olan Kodi'nin yanı sıra subtropikal (Yazdi) ve yarı soğuk (Hamadani ve Nikshahri) popülasyonlarını bariz bir şekilde ayırmıştır. Çalışmanın neticesinde SRAP markırlarının yonca popülasyonları içerisindeki ve arasındaki çeşitlilik ve akrabalık çalışmaları için kullanışlı markırlar oldukları sonucuna varılmıştır[66].

Yapılan bir diğer çalışmada ise, Ladakh'ın (Jammu ve Kashmir) trans-Himalaya bölgesinin Leh vadisinden toplanan *Medicago* türlerine ait 25 aksesyon iç basit dizi tekrarları (ISSR) ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) markırları kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmanın sonuçları toplanmış *Medicago* ekotiplerinde genetik varyasyon düzeyinin değişken olarak yüksek olduğunu ($P = 96.54$, $I = 0.430$, $H_t = 0.285$) ortaya çıkarmıştır. RAPD yöntemi ISSR yönteminden (%95.12) daha yüksek düzeyde polimorfik lokusa (%97.96) sahip olarak belirlenmiştir. Dendrogramdan elde edilen RAPD ve ISSR karşılaştırıldığında gruplar içerisindeki genotiplerin kümeleşmesi farklı olarak bulunmuştur. Halbuki genotiplerin kümelenme örneği RAPD ve RAPD ile kombine edilmiş ISSR'de daha fazla ya da daha az olarak aynı şekilde ortaya çıkmıştır. Popülasyonlar içerisindeki %30.23'lük genetik çeşitliliği gösteren farklılaşmanın ortalama ortak etkinlik değeri (G_{st}) 0.0584 olarak bulunmuştur. Popülasyonlar arasındaki gen değişimlerinin büyük bir kısmı ortalama tahmin edilen gen akışının tüm değeri ($N_m = 8.0682$) şeklinde ortaya çıkmıştır. Moleküler varyans analizi (AMOVA) genetik çeşitliliğinin dağılımının popülasyonlar arasında %49 ve popülasyonlar içerisinde %51 olduğunu göstermiştir. Çalışmanın neticesinde elde edilen genetik

varyasyon *Medicago* türlerinin genetik araştırmalar için uygun bir bitki olduğunu ve geliştirilmiş yem-mera varyeteleri için bu türlerin büyük potansiyele sahip olduklarını göstermektedir[67].

Genetik çeşitliliğin değerlendirildiği farklı bir çalışmada, atasal testler içeren beş yonca varyetesinin genetik çeşitliliği RAPD markırları temelinde karakterize edilmiştir. Genetik çeşitlilik analizi için taranan 60 primerden 17 tanesi seçilmiştir. 156 polimorfik bant her bir primer için 10.6'lık bant ile üretilmiştir. Polimorfik lokusların yüzdesi ve sayısı, allellerin etkinlik sayısı, beklenen heterozigoti ve Shannon's information index ve genetik varyasyonu tahmin etmek amacıyla test edilmiş tüm parametreler için en yüksek değere sahip olarak belirlenmiştir. Halbuki, RSI 20 varyetesi en düşük seviyeyi göstermiştir. Moleküler varyans analizi (AMOVA), %88.39'luk toplam genetik varyasyonun varyeteler içindeki varyansına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Her bir örneğin ve varyetenin küme analizi, onların populasyon yapılarında farklılıkları ortaya ıkarımiştir. Zuzanna varyetesi çok yüksek bir düzeyde genetik varyasyon göstermiştir. Peczy ve RSI 20 varyeteleri göreceli olarak eşsiz olmalarına rağmen Banat ve Ghareh alt populasyonlarda ikiye bölünmüştür. Bu çalışmada önerilen ışlah programlarında, araştırılmış genetik kaynağın artış yolları onların populasyon yapısı ve çeşitliliğine bağlanımiştir. RAPD analizi yarı hibrit yonca ışlahı programlarında ana populasyonların analizinde yeni homojen genetik kaynakların geliştirilmesi ve tamamlayıcı genetik kaynağın geliştirilmesinde uygulanabilme potansiyeli göstermektedir[68].

SSR markırlarının genetik çeşitlilik için kullanıldığı bir çalışmada, 24 aksesyon Kuzey Çin'den toplanan örneklerle analiz edilmiştir. Bu analizler allozim ve mikrosatellit markırları ile genetik varyasyon modellerini belirlemek için yapılmıştır. Polimorfizm değerleri açısından iki analiz sonucunda farklılıklar tespit edilmiştir. Polimorfizm oranının mikrosatellitlerde daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Allozimler ve mikrosatellit markırları için 24 populasyonda beklenen ortalama heterozigotluk sırasıyla; 0.160-0.485 ve 0.274 ve 0.5316 şeklindedir. Heterozigotluk için ana gözlem, 24 populasyonun her bir lokusunda allozimler için 0.422 iken SSR markırları için 0.4149'dur. Allozimler için populasyonlar arası genetik çeşitliliğin ortalama değer 0.2733, populasyonlar arası ortalama genetik çeşitlilik ise 0.0473 olarak tespit edilmiştir. Gen farklılaşması için ana katsayı populasyon düzeyinde 0.1813 olarak

tahmin edilmiştir. G_{ST} esas alınırsa populasyon düzeyinde gen akışı allozimler için 1.4427, SSR markırları için ise 1.2040'tır ve bu da açık olarak populasyonlar arası gen akışına işaret etmektedir. Allozimlerde populasyonlar arası düşük düzey farklılaşma: $F_{ST} = 0.179$; SSR markırlarda; $F_{ST}=0.1816$ olarak temel genetik varyasyonların populasyonlar boyunca uzandığını gösterir. Sonuçlar *Medicago ruthenica* (L.) populasyonlarında genetik çeşitliğin yüksek olduğunu göstermektedir[69].

Sahadaki yoncaların genetik kaynaklarının genetik farklılaşmalarını aydınlatmak ve onların dahili varyasyonlarını incelemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, Siwa'daki (Mısır) on yedi çiftlikten yerel ırk örnekleri toplanmıştır. Biyozirai karakterli iki yıllık kültür mahsulü ve SSR markırlardan örnek kütleler ile dördü Mısır'lı, üçü İtalyan kültür ile çalışılmıştır. (120 bitki/populasyon) Siwa'nın mahsullerinin genetik kaynakları kuraklık sorunu olan kültür yoncalarıyla benzerdir ancak ilkel ve düşük şartlarda gelişen bitki formlarından farklıdır. SSR analizleri 31 polimorfik DNA parçasına dayanmaktadır. Bunlar Siwa yerel ırklarından iki varyete grubu olarak ayrılmıştır. Siwa grubundaki varyasyon, biyozirai özellikler taşıyan tür ile onu tamamlayıcı niteliktedir. Ortalama genetik benzerlik oranı yüksektir. (0.8959) ve UPGMA diagramı yerel ırklar arasında zayıf izolasyona işaret etmektedir. Bunlara rağmen iki örnek haricindeki diğer bütün örnekler parmak izi tekniğiyle analiz edilmiştir. Var olduğu düşünülen saf alttürlerin yüksek zirai değerleri yonca varyeteleri için yapısal yöntemlerle tartışılmıştır[70].

Örnek boyutunun çeşitlilik çalışmasına olan etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada ise, kodominant SSR markırları kullanılarak dışarıdan döllen bir ototetraploit tür olan yonca populasyonları arasındaki farklılıkların teşhisi için örnek boyutu belirlenmiştir. Yakın ilişkili iki populasyonun her birinden elde edilen 120 genotip, 2 markır ile analiz edilmiştir. 3 örnek boyutunun (10, 20 ve 40 genotip) her biri için rastgele 20 alt örnekleme yapılmıştır. 120 genotiplik populasyonlar ile karşılaştırıldığında 10 genotiplik alt örnekleme yapıldığında oldukça fazla bulunan allellerin de dahil edilmemesine rağmen, 40 genotiplik alt örnekleme yapıldığında allellerin nadiren bulunduğu belirlenmiştir. İki populasyon arasındaki alt örnekleme çiftleri için F_{st} değerleri, 40 genotip temelinde daima önemli derecede farklılık göstermiştir. Halbuki, 10 genotip için çiftlerin yarısından daha fazlası önemli derecede

farklılığa sahip değildir. Çalışmanın neticesinde 40 adet genotipin SSR markırlarıyla araştırılan tetraploit yoncanın yakın ilişkili populasyonlar ile çeşitlilik çalışmaları açısından örnek boyutunun bir nedeni olabildiğini ortaya koymuştur. 20 genotip, büyük ölçekli çalışmalarda ekonomik bir alternatif olabilir fakat 10 genotip, güvenilir sonuçlar açısından oldukça düşük bir rakam olarak görülmektedir[71].

Moleküler biyolojinin yonca gelişimine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, son yüzyılı aşkın bir süredir moleküler biyolojinin avantajları ile birlikte yonca geliştirme girişimlerinin etkinliği değerlendirilmiştir. 1986 ve 1998 yılları arasında Amerika yakınlarında eski yonca kültürlerinin direnci ve verimi kıyaslanmıştır. 1990'lı yıllardan itibaren oluşturulan yeni kültürler özellikle Eylül ayının ilk dönemlerinde sonbaharda dormansinin azalmasından dolayı dördüncü hasatta daha yüksek verimle neticelenmiştir. Geliştirilmiş hastalık direnci ve kış sertliğine direnç gibi faktörler temelinde, yonca direncini geliştirme girişimleri de pek çok lokasyonda yeterince etkili olamamıştır. Moleküler biyoloji ve bunun paralelinde daha yüksek verim, güçlendirilmiş yem ya da mera kalitesi ve direnç gelişimi için önemli zirai karakterleri kontrol eden genlerin tanımlanması temelinde yonca gelişimi açısından önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Yoncada poliploit yapıyla birlikte komplike bir şekilde ortaya çıkan bazı genlerin tanımlanması yapılmıştır fakat bu genlerin ürettikleri proteinler ve onların düzenlenme fonksiyonları ile ilgili pek az şeyin bilindiği belirtilmiştir. Bu genlerin istenen bir fenotipi elde etmek için yoncaya transferi ile etkinlikleri ortaya konacağı ifade edilmiştir[72].

Tetraploit ve diploitler arasında hibridizasyon oluşturma amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, tetraploit ($2n = 4x = 32$) *M. sativa* ve diploit ($2n = 2x = 16$) *M. falcata* arasında somatik hibritler oluşturmak ve onların genomik yapılarını analiz etmek amaçlanmıştır. *M. sativa*'nın Rangelander kültürü ve *M. falcata*'nın Wisfal-1 kültüründen rejenerasyon yeteneği için seçilen genotiplerden elde edilen protoplastlar elektriksel olarak birleştirilmiştir. Yedi somatik hibrit grubu üretilmiştir ve onlardan bir tanesi rejenerasyonla bitkileri oluşturmuştur. Bu bitkilerin hibrit doğası ve genetik kompozisyonu morfolojik, sitolojik ve moleküler analizlerle değerlendirilmiştir. Bitkiler hiper-anöploidi ($2n = 33$) ile sonuçlanmıştır ve onlar, bir translokasyon şeklinde konumlanma gösteren ekstra uzun bir kromozomu içermiştir. RAPD analizinde ebeveyn

sekanslarının her ikisinin de varlığı bitkilerin doğru hibrit doğasını onaylamıştır. Ebeveyn genomları içerisindeki yeniden düzenlemeler ve hibrit bitkiler arasındaki somaklonal varyasyonun varlığı, çekirdek organizasyon bölgesinin (NOR) RFLP analizi vasıtasıyla gözlenmiştir. Tüm genomik değişiklikler için olası nedenler ve yabancı türlerden kültüre edilmiş yoncaya transfer edilen kullanışlı zirai özellikler için bu metodun uygunluğu tartışılmaktadır[73].

Farklı yonca varyetelerinin kullanıldığı bir çalışmada, yaygın 7 kültür yonca varyetesi ve merkezi İtalyaya adapte olmuş 3 ekotip, türlerde polimorfizmin kapsamını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Herbir aksesyon için 20 bitki, 3 restriksiyon enzimi (toplamda 48 prob/enzim kombinasyonu) ile kombine olan 16 RFLP probu ile analiz edilmiştir. Veriler, populasyon içerisindeki ve arasındaki RFLP çeşitliliğinin bir ölçüsü olarak alınan Nei benzerlik indeksini hesaplamak amacıyla kullanılmıştır. Genelde çeşitler ekotiplerden daha homojen olarak belirlenmiştir. Adriana ve Florida kültür yoncaları diğerlerinden daha kolay bir şekilde farklılaşma göstermişlerdir. Birkaç aksesyona özgü hibridize olan fragmentler skorlanmıştır ve 7 populasyon, özel fragmentlerin frekanslarındaki önemli farklılıklar temelinde diğerlerinden ayrılabilmiştir. 7 boyuttaki bitki populasyonlarının DNA'sı alınmıştır ve kuyucuklardaki örneklerde, bir fragmenti belirleme yeteneği, kütlesi oluşturulan bitkiler arasında fragmente sahip olan bitkilerin fraksiyonu ile ilişkili olarak bulunmuştur. Sonuçlar, varyetal tanımlama için RFLP'lerin pratik kullanımı özel vurgusu ile tartışılmıştır[74].

RFLP analizinin gerçekleştirildiği farklı bir çalışmada, yoncanın herbiri için farklı üretim firmalarından elde edilen 3 tohum grubu; *Medicago sativa* L. ekotipleri Vogherese, Maremmana ile birlikte bir kontrol olarak Iside varyetesi RFLP analizi aracılığıyla ayrılma olasılığını test etmek amacıyla çalışılmıştır. Herbir tohum grubu için 155 bilgi verici polimorfik fragmenti sağlayan 25 DNA probu ile 20 bitki analiz edilmiştir. Kısmi varyans, populasyon içerisindeki çeşitliliğin toplam varyansın yaklaşık %98'i için hesaplandığını göstermektedir fakat gruplar arası çeşitlilikten dolayı toplam varyansa önemli küçük bir katkı sağlamaktadır. Vogherese'nin, sonraki ile karşılaştırılan önceki ekotipin adaptasyon alanının daha geniş çevresel homojenliğinin bir sonucu olarak, Maremmana'dan daha homojen olduğu tespit edilmiştir[75].

AFLP markırlarının kullanıldığı bir çalışmada, yonca aksesyolları arasındaki genetik mesafelerin yüksek verimli karakterizasyonu için bir strateji olarak fazla sayıdaki çoklu genotiplerinin DNA kütleleri ile kombine olarak çoğalmış fragment uzunluk polimorfizm (AFLP) DNA markırlarını kullanma potansiyeli değerlendirilmiştir. 9 adet kuyucuk içerisinde tanımlanmış genetik kaynakların (Afrika, şili, Hindistan, Flaman, Ladak, *Medicago sativa* subsp. *falcata*, *Medicago sativa* subsp. *varia*, Peru ve Türkistan) herbiri içerisinde 30 genotipten elde edilen kitlesel DNA kalıpları, 34 primer kombinasyonu kullanılarak değerlendirilmiştir. 3754 fragmentlik bir toplam tanımlanmıştır, bunların 1541 tanesi polimorfiktir. Polimorfik fragmentlerin sayısı herbir primer kombinasyonu için 20'den 85'e kadar sıralanmış bir şekilde belirlenmiştir. 9 genetik kaynak arasındaki Pairwise D tahminleri genetiksel olarak en farklı olan *M. sativa* subsp. *falcata* ile 0.52'den 1.46'ya sıralanmıştır. Markır verisinin Unweighted pair-group method aritmetik ortalama analizi iki ana küme oluşturmuştur, (i) *Medicago sativa* subsp. *sativa* ve *Medicago sativa* subsp. *varia* ve (ii) *M. sativa* subsp. *falcata*. şili, Peru, Flaman ve *Medicago sativa* subsp. *varia* arasındaki küme analiz sonuçları ve D tahminleri Peru'nun şiliden daha çok Merkezi ve Güney Amerika içerisindeki orjinal İşpanyol olanlarına daha fazla benzediği hipotezini desteklemektedir. 9 genetik kaynağın hiyerarşik düzeni onların sırasıyla coğrafik, alttüre zđ ve alttürler arası hibrit orjinleriyle desteklenmektedir. Yüksek derecede bilgi verici 7 primer çifti kadar olan alt kümeler, tüm data verileri ile karşılaştırılan D tahminleri ve benzer hiyerarşik düzenlerin oluşturulması şeklinde tanımlanmıştır. Sonuçlar, kitlesel DNA kalıplarının AFLP analizi ile primer çiftlerinin kullanımının büyük miktardaki yonca populusyonları arasındaki genetik çeşitliliği doğru bir şekilde karakterize etmede, yüksek verimli bir sistem olarak görev yapabildiğini göstermektedir[76].

Diğer bir çalışmada, yonca genomunda bulunan SSR markırlarının tanımlanmıştır. Buna ek olarak *M. sativa* ssp. *sativa*, *falcata* ve *caerulea* ile model baklagil olan *M. truncatula* şeklinde 7 aksesyon ve Kuzey Amerika kültür yoncasının tarihsel olarak tanımlanmış atalarını (Afrika, şili, Falcata, Flemish, Hindistan, Ladak, Peru, Türkistan ve Varia) ayırmak için bu markırların kalitesi değerlendirilmiştir. Ototetraploit yonca genetik kaynağı olan W10'dan elde edilen genomik DNA; AC, AT, CT, CTT, GAT ve GGT motiflerini taşıyan oğaltılmış SSR'ları, 81 primer çifti ile geliştirmek için kullanılmıştır. Primer çiftlerinin büyük çoğunluğu (%96) fonksiyoneldir ve 61 tanesi

(%78.2) aksesyonlar arasında 2'den 11'e kadar polimorfik olarak belirlenmiştir. Üç ana kümeyi gösteren bu veriden elde edilen kümeleme analizi kullanılarak bir dendrogram yapılandırılmıştır. Bu kümelerden birincisi diploit ssp. *falcata*, ikincisi *M. truncatula* ve üçüncüsü ise geriye kalanların tamamıdır. Bazı aksesyonların ayırımına ek olarak [*M. truncatula* ('Jemalong'), Ladak ('Ladak'), Fall dormancy 11 (UC-1465), Indian (Sirsa Type 9), Flemish ('Dupuit'), Peruvian ('Hairy Peruvian') ve African 2 ('Moapa')] çoklu yanıtlayıcı analizler elde edilmiştir. Bu genomik yonca SSR'ları, yoncanın filogenetik ve genetik haritalama çalışmaları için potansiyel uygulamaları ile polimorfik değerlendirmelerinde mükemmel bir şekilde faydalı olarak belirlenmiştir[77].

Linkage'den yararlanılarak haritalamanın yapıldığı bir çalışmada, ototetraploit yoncanın bir F₁ genotipi için herbir populasyonda 82 tek doz restriksiyon fragmenti ayrışması ve 101 bireyin herbirinin iki geri çaprazlama populasyonu kullanılarak bir genetik linkage haritası yapılmıştır. Kendileşmiş diploit haritalama populasyonları (%18-54 ile karşılaştırıldığında %4-9) için muhtemelen ototetraploitlerin silici resesif allellerin etkilerine karşı daha fazla savunma kapasitesinden dolayı Mendel oranlarından sapan markır lokuslarının yüzdesi rapor edilenden oldukça az olarak belirlenmiştir. Diploit yoncanın 8 linkage grubundan 7 tanesi için dört homolog bağlantı safhasının ikili ayırım grupları belirlenmiştir ve ortak problemler kullanılarak sıralanmıştır. Bu çaprazlamada polimorfizm kayıplarından dolayı linkage grubu 7 için ikili ayırımı olmayan gruplar bulunmuştur. Dört homolog, ikili ayrışma gruplarının birleştirilmesiyle ve 443 cM'lık alanı kapsayan 7 linkage grubunda 88 lokustan oluşan bir bileşim haritası elde edilmiştir. Lokus haritası sıraları ve uzaklıkları diploit yoncadaki bu bulgular ile genel olarak uyumlu olarak belirlenmiştir. Haritalanan populasyonlar kış sertliği, sonbahar dormansisi ve donmaya tolerans için ayrılmaktadır ve harita bu özellikleri etkileyen genomik bölgelerin yerini saptamak için kullanılabilir[78].

Farklı bir çalışmada, öncelikle EST'den ve *M. truncatula* içerisine dahil olmuş bakteri yapay kromozomundan (BAC) türetilmiş SSR markırları kullanılarak, tetraploit yoncanın moleküler bir haritasını inşa etmek amaçlanmıştır. Bu harita yoncada kuraklığa tolerans QTL' inin tanımlanması için kullanılabilir nitelikte görülmüştür. İlk iki nesil geri çaprazlama populasyonları yüksek su kullanma verimine sahip bir *M. sativa* subsp. *falcata* genotipi ile düşük su kullanma verimine sahip olan *M. sativa*

subsp. *sativa* genotipi arasındaki bir çaprazlamadan elde edilmiştir. İki ebeveyn ve onların F_1 'i, SSR'ları çoğaltmak amacıyla dizayn edilmiş 1680 primer çifti ile taranmıştır ve 605 tek doz alleli (SDAs) çoğaltılmıştır. F_1 'de 41 linkage grubu için 256 lokusdan elde edilen 351 SDAs haritalanmıştır. SDA'leri F_1 'le kalıtılmamıştır fakat geri çaprazlama popülasyonlarında ayrışan ve tekrarlayan ebeveynler vasıtasıyla aktarılmıştır, 43 linkage grubu haritalanmış ve bu lokuslardan 44 tanesi kompozite haritanın içerisine dahil edilmiştir. *M. sativa*'nın 8 kromozomunu gösteren 8 birleşim linkage grubunu oluşturmak için homolog linkage grupları birleştirilmiştir. Birleşim haritası *M. truncatula* EST sekanslarından elde edilen 243 SDA, *M. truncatula* BAC klon sekanslarından elde edilen 38 SDA ve yonca genomik SSR'larından elde edilen 5 SDA ile 8 birleşim linkage grubundan oluşmaktadır. Toplam birleşim haritası uzunluğu herbir birleşim linkage grubunda 1.5'dan 4.4 cM'a sıralanan ortalama markır yoğunluğu ve 2.2 cM'luk toplam bir ortalama yoğunluk ile 624 cM'dır. Ayrışım bozukluğu %10'dur ve bu bozulmuş lokusun, bazı linkage gruplarının homolog bireylerinde küme oluşturma eğiliminde olduğu bulunmuştur[79].

Markırların kullanıldığı bir çalışmada, diploit ve tetraploit yoncada haritalama için SSR DNA markırlarının kullanımı değerlendirilmiştir. F_2 diploit yoncalarından oluşan RFLP haritası içinde 10 adet SSR markırı kullanılmıştır. Ayrıca F_2 tetraploit popülasyon da haritalanmıştır. Tetraploit popülasyonun her bir lokusunda 2'den 4'e kadar allellerin bulunduğu saptanmıştır. Tetraploit haritalama popülasyonunda bu allellerin ayrışması genel olarak net ve yorumlamak ta oldukça kolay olarak belirtilmiştir. Tetrasomik linkage analizinin kompleksliğinden dolayı ve uygun bilgisayar yazılımlarının eksikliğinden dolayı tetraploit düzeyde linkage ilişkileri tek doz allel analizi (SDA) kullanılarak belirlenmiştir. Tek doz allel analizi, aynı lokusta yer alan diğer allellerden bağımsız olarak her bir allelin varlığı ya da yokluğu şeklinde skorlanmıştır. Tek doz allel analiz diploit haritası da standart kodominant metot için SDA haritalamasıyla karşılaştırmak amacıyla yapılandırılmıştır. Linkage grupları tetraploit ve iki diploit linkage haritası arasında birkaç ayrışma hatası gösteren segmentler dışında genel olarak korunmuştur. Ayrışma bozulması hem diploit hem de tetraploit popülasyonlarda büyük olasılıkla kendileştirme depresyonundan kaynaklanmıştır. Analizin kolaylığıyla birlikte yonca genomunda SSR lokuslarının fazlalığı SSR markırlarının tetraploit yonca haritalamaları için kullanışlı bir araç olması gerektiğini göstermiştir[80].

Gerçekleştirilen diğerk bir çalışmanın konusu ise, diploit yonca genomunda LD bozulma örneğini anlamaktır. Çalışmada kromozom boyunca LD örneklelerini göstermek amacıyla 120 aksesiyondan elde edilen 374 adet yabancı diploit yonca genotiplerinde oldukça yüksek düzeyde polimorfik olan 89 adet SSR lokusu kullanılmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında tek nükleotit polimorfizmlerini (SNP) tanımlamak için ve LD'nin gen içerisindeki tahminlerini göstermek için de 4 adet lignin biyosentez aday geni (*caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (CCoAoMT)*, *ferulate-5-hydroxylase (F5H)*, *caffeic acid-O-methyltransferase (COMT)* ve *phenylalanine amoniyase (PAL 1)*) sekanslanmıştır. Çalışmanın ikinci konusu olarak SSR markırları ve 4 aday genden elde edilen SNP'ler kullanılarak hücre duvarı bileşenleri ve zirai karakterleri için ilişkilendirme haritalaması yapılmıştır. Çalışmanın sonunda, genom kapsamlı ilişkilendirme çalışmaları için sınırlı düzeyde uygulanan SSR markırları arasında oldukça az LD bulunmuştur. Buna karşın gen içerisindeki LD 4 aday genin üçünde 0.2 lik r^2 altında 300 baz çifti içerisinde bozulma olmuştur. Biyokütle verimi ile ilgili olan bir SSR ve yüksek derecede önemli olan iki adet SNP tanımlanmıştır[81].

2.7 Çalışmanın Amacı

Komplekste diploit alttürler, bunların sınıflandırılması ve populasyon yapısı bilinmemektedir fakat tetraploitlerin moleküler sistematığı ve populasyon yapısı henüz detaylı olarak bilinmemektedir. Kompleksin tetraploit üyelerinin populasyon yapısının bilinmesi ve bunların hem diploitlerle olan ilişkisi, hem de kendi aralarındaki ilişkisi ortaya çıkarılmış olacaktır. Bu bağlamda tetraploit üyelerin de moleküler düzeyde markır destekli olarak çalışılması ve sınıflandırılması gerekmektedir. Gerek tetraploit üyelerin gerekse diploit üyelerin çalışılmasıyla birlikte kompleksin tüm üyelerinin sistematik pozisyonları açığa çıkarılacaktır. Bu çalışmanın amacı SSR markırları kullanılarak tetraploit birimlerinin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi, populasyon yapısının değerlendirilmesi ve moleküler filogenetiğinin analiz edilmesidir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Bitkisel Materyaller

Bitkisel materyal olarak *Medicago sativa* tür kompleksinin tetraploit üyelerinden üç farklı alttüre (*sativa*, *varia* ve *falcata*) ait 70 farklı aksesyon kullanılmıştır. Her aksesyon için 4'er bitki alınarak toplam 280 adet bitki ile çalışılmıştır (Çizelge 3.1.1 ve Çizelge 3.1.2). Bu çalışmada kullanılan tüm bitkilere ait tohumlar ABD Tarım Bakanlığı Bitki Genetik Kaynaklar Sisteminden (USDA-GRIN) temin edilmiştir. Bu tohumlar üç nedenden dolayı ABD USDA-GRIN' den temin edilmiştir; (i) Başlangıç karakterizasyonu önceden gerçekleştirilmiştir. (ii) USDA-GRIN kapsamındaki bitkiler referans genetik kaynak olarak işlev görmektedir. (iii) USDA koleksiyonları *M. sativa-falcata* kompleksine ait tüm sistematik birimlerin doğal yayılım alanından toplanmış 3700'den daha fazla yonca aksesyonunu içermektedir. Yoncanın doğal yayılım alanı, kuzeyde Sibirya, güneyde Kuzey Afrika doğuda Çin ve batıda ise Batı Avrupa olacak şekilde geniş bir coğrafyaya tekabül etmektedir. Zengin koleksiyon, coğrafik dağılım alanlarından ve alttürlerden oldukça iyi bir örnekleme yapmaya imkân tanımaktadır.

3.2 Bitkilerin Yetiştirilmesi

Tetraploit bitkilere ait tohumlar 16/8 saatlik uzun gün fotoperiyodunu ve 25 °C oda sıcaklığını içeren iklim odasında ilk önce viyollerde çimlendirilip geliştirilmiştir. Daha sonra ise herbir viyolde bulunan bitkilerin bireysel olarak saksılara aktararak büyümesi sağlanmıştır. Bitkilerin çiçek ve tohum şekli verilerinin tespiti için Mayıs ayında bitkilerin araziye transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3 Morfolojik Analizler

Bu çalışma kapsamında, morfolojik karakterlerin tayini için Barnes [82] tarafından önerilmiş olan skala kullanılmıştır.

Çizelge 3.1.1 Kullanılan populasyonların lokalite ve genetik kaynak bilgileri

No	Ploidi	PI	Alttür	Orjin Ülkesi	Enlem	Boylam	Statüsü
1	32	PI 173733	<i>sativa</i>	Türkiye	37 der. 16 dak. 0 san. N (37.26666667)	38 der. 49 dak. 0 san. E (38.81666667)	Belirsiz
2	32	PI 179369	<i>sativa</i>	Türkiye	39 der. 0 dak. 0 san. N (39)	43 der. 21 dak. 0 san. E (43.35)	Belirsiz
3	32	PI 180303	<i>sativa</i>	Hindistan	22 der. 18 dak. 0 san. N (22.3)	70 der. 53 dak. E (70.88333333)	Belirsiz
4	32	PI 182240	<i>sativa</i>	Türkiye	38 der. 13 dak. 0 san. N (38.21666667)	37 der. 12 dak. 0 san. E (37.2)	Belirsiz
5	32	PI 183262	<i>sativa</i>	Suudi Arabistan	YOK	YOK	Belirsiz
6	32	PI 196225	<i>sativa</i>	Hindistan	YOK	YOK	Belirsiz
7	32	PI 198963	<i>sativa</i>	Kıbrıs	YOK	YOK	Belirsiz
8	32	PI 199273	<i>sativa</i>	Polonya	YOK	YOK	Yerel Irk
9	32	PI 201863	<i>sativa</i>	İran	31 der. 55 dak. 0 san. N (31.91666667)	54 der. 22 dak. 0 san. E (54.36666667)	Belirsiz
10	32	PI 206576	<i>sativa</i>	Yunanistan	YOK	YOK	Belirsiz
11	32	PI 206698	<i>sativa</i>	Türkiye	38 der. 36 dak. 0 san. N (38.6)	39 der. 2 dak. E (39.03333333)	Belirsiz
12	32	PI 208683	<i>sativa</i>	Cezayir	YOK	YOK	Belirsiz
13	32	PI 210763	<i>sativa</i>	İspanya	YOK	YOK	Belirsiz
14	32	PI 214218	<i>falcata</i>	Danimarka	YOK	YOK	Yabani
15	32	PI 217648	<i>sativa</i>	Irak	YOK	YOK	Belirsiz
16	32	PI 220531	<i>sativa</i>	Afganistan	34 der. 20 dak. N (34.33333333)	62 der. 12 dak. 0 san. E (62.2)	Belirsiz
17	32	PI 222198	<i>falcata</i>	Afganistan	33 der. 42 dak. 36 san. N (33.71)	69 der. 10 dak. 12 san. E (69.17)	Yabani
18	32	PI 239954	<i>sativa</i>	Cezayir	35 der. 33 dak. 0 san. N (35.55)	5 der. 10 dak. 12 san. E (5.17)	Belirsiz
19	32	PI 244317	<i>sativa</i>	İspanya	YOK	YOK	Belirsiz
20	32	PI 256337	<i>sativa</i>	Pakistan	YOK	YOK	Belirsiz
21	32	PI 262544	<i>sativa</i>	İsrail	YOK	YOK	Belirsiz
22	32	PI 299053	<i>sativa</i>	SSCB	YOK	YOK	Belirsiz
23	32	PI 315484	<i>sativa</i>	SSCB	YOK	YOK	Yabani
24	32	PI 399551	<i>sativa</i>	Romanya	YOK	YOK	Belirsiz
25	32	PI 420400	<i>sativa</i>	İspanya	41 der. 38 dak. N (41.63333333)	0 der. 53 dak. W (- .88333333)	Belirsiz
26	32	PI 440517	<i>sativa</i>	Kazakistan	YOK	YOK	Yabani
27	32	PI 442877	<i>sativa</i>	Çin	YOK	YOK	Belirsiz
28	32	PI 464801	<i>varia</i>	Türkiye	YOK	YOK	Yabani
29	32	PI 464813	<i>varia</i>	Türkiye	YOK	YOK	Yabani
30	32	PI 476393	<i>varia</i>	Ukrayna	YOK	YOK	Kültür
31	32	PI 486202	<i>varia</i>	Ukrayna	YOK	YOK	Yabani
32	32	PI 486210	<i>varia</i>	SSCB	YOK	YOK	Yabani
33	32	PI 491407	<i>falcata</i>	Çin	YOK	YOK	Belirsiz
34	32	PI 494661	<i>falcata</i>	Romanya	46 der. 54 dak. 36 san. N (46.91)	23 der. 25 dak. 12 san. E (23.42)	Yabani
35	32	PI 499548	<i>falcata</i>	Çin	43 der. 58 dak. 0 san. N (43.96666667)	116 der. 2 dak. E (116.03333333)	Yabani
36	32	PI 499664	<i>falcata</i>	Çin	44 der. 5 dak. 24 san. N (44.09)	88 der. 30 dak. 36 san. E (88.51)	Yabani
37	32	PI 499665	<i>falcata</i>	Çin	43 der. 34 dak. 12 san. N (43.57)	87 der. 2 dak. 24 san. E (87.04)	Yabani
38	32	PI 502441	<i>falcata</i>	Rusya	46 der. 11 dak. 24 san. N (46.19)	43 der. 53 dak. 24 san. E (43.89)	Yabani

Çizelge 3.1.1 (Devam) Kullanılan populasyonların lokalite ve genetik kaynak bilgileri

No	Ploidi	PI	Alttür	Orjin Ülkesi	Enlem	Boylam	Statüsü
39	32	PI 502446	<i>falcata</i>	Rusya	YOK	YOK	Yabani
40	32	PI 502459	<i>sativa</i>	Kazakistan	YOK	YOK	Yabani
41	32	PI 502474	<i>sativa</i>	Ermenistan	YOK	YOK	Yabani
42	32	PI 502514	<i>varia</i>	SSCB	YOK	YOK	Kültür
43	32	PI 502521	<i>varia</i>	SSCB	YOK	YOK	Kültür
44	32	PI 502529	<i>varia</i>	SSCB	YOK	YOK	Kültür
45	32	PI 502532	<i>varia</i>	SSCB	YOK	YOK	Kültür
46	32	PI 502533	<i>varia</i>	SSCB	YOK	YOK	Kültür
47	32	PI 502540	<i>varia</i>	SSCB	YOK	YOK	Kültür
48	32	PI 503867	<i>varia</i>	Romanya	45 der. 2 dak. N (45.03333333)	29 der. 10 dak. 0 san. E (29.16666667)	Belirsiz
49	32	PI 516902	<i>sativa</i>	Fas	31 der. 38 dak. 24 san. N (31.64)	7 der. 43 dak. 48 san. W (-7.73)	Yabani
50	32	PI 538983	<i>falcata</i>	Ukrayna	YOK	YOK	Yabani
51	32	PI 631573	<i>falcata</i>	İtalya	45 der. 38 dak. N (45.63333333)	13 der. 46 dak. 0 san. E (13.76666667)	Yabani
52	32	PI 631579	<i>falcata</i>	İtalya	45 der. 52 dak. 0 san. N (45.86666667)	13 der. 29 dak. E (13.48333333)	Yabani
53	32	PI 631582	<i>falcata</i>	Türkiye	39 der. 45 dak. 0 san. N (39.75)	37 der. 2 dak. E (37.03333333)	Yabani
54	32	PI 631585	<i>falcata</i>	İtalya	45 der. 39 dak. 0 san. N (45.65)	13 der. 47 dak. E (13.78333333)	Yabani
55	32	PI 631592	<i>falcata</i>	İtalya	45 der. 39 dak. 0 san. N (45.65)	13 der. 47 dak. E (13.78333333)	Yabani
56	32	PI 631796	<i>falcata</i>	Çek Cumhuriyeti	49 der. 12 dak. 0 san. N (49.2)	16 der. 38 dak. E (16.63333333)	Yabani
57	32	PI 631845	<i>falcata</i>	İsveç	YOK	YOK	Yabani
58	32	PI 631855	<i>falcata</i>	İsveç	57 der. 11 dak. N (57.18333333)	12 der. 20 dak. E (12.33333333)	Yabani
59	32	PI 631859	<i>falcata</i>	İsveç	YOK	YOK	Yabani
60	32	PI 641381	<i>falcata</i>	Rusya	56 der. 5 dak. N (56.08333333)	92 der. 46 dak. 0 san. E (92.76666667)	Yabani
61	32	PI 641383	<i>falcata</i>	Rusya	55 der. 27 dak. 0 san. N (55.45)	78 der. 18 dak. 0 san. E (78.3)	Yabani
62	32	PI 641400	<i>falcata</i>	Rusya	YOK	YOK	Yabani
63	32	PI 641545	<i>falcata</i>	Moğolistan	49 der. 59 dak. 7 san. N (49.98527778)	107 der. 13 dak. 37 san. E (107.22694444)	Yabani
64	32	PI 641546	<i>falcata</i>	Moğolistan	50 der. 17 dak. 59 san. N (50.29972222)	104 der. 58 dak. 51 san. E (104.98083333)	Yabani
65	32	PI 641548	<i>falcata</i>	Moğolistan	50 der. 1 dak. 43 san. N (50.02861111)	105 der. 17 dak. 27 san. E (105.29083333)	Yabani
66	32	PI 641581	<i>falcata</i>	Kazakistan	49 der. 26 dak. 24 san. N (49.44)	58 der. 37 dak. 14 san. E (58.62055556)	Yabani
67	32	PI 641582	<i>falcata</i>	Kazakistan	49 der. 27 dak. 6 san. N (49.45166667)	58 der. 37 dak. 14 san. E (58.62055556)	Yabani
68	32	PI 641585	<i>falcata</i>	Kazakistan	49 der. 33 dak. 51 san. N (49.56416667)	58 der. 55 dak. 0 san. E (58.91666667)	Yabani
69	32	PI 641588	<i>falcata</i>	Kazakistan	49 der. 18 dak. 51 san. N (49.31416667)	59 der. 3 dak. 34 san. E (59.05944444)	Yabani
70	32	PI 641599	<i>falcata</i>	Kazakistan	48 der. 34 dak. 19 san. N (48.57194444)	57 der. 19 dak. 6 san. E (57.31833333)	Yabani

Çizelge 3.1.2 Kullanılacak bitki örneklerine ait sayısal veriler

Tanımlama	Taksonomik Birim	Kullanılacak Aksesyon Sayısı	Kullanılacak Birey Sayısı
Yabani Varyete	<i>M. sativa</i> ssp. <i>sativa</i>	28	112
	<i>M. sativa</i> ssp. <i>falcata</i>	30	120
	<i>M. sativa</i> ssp. <i>varia</i>	12	48
Toplam		70	280



Resim 3.2.1 Yonca aksesyonlarına ait tohumların viyollerde yetiştirilmesi



Resim 3.2.2 Yonca aksesyonlarına ait tohumların viyollerde yetiştirilmesi (1 aylık fideler)



Resim 3.2.3 Yonca aksesyonlarına ait tohumların viyollerde yetiştirilmesi (2 aylık fideler)



Resim 3.2.4 Yonca aksesyonlarına ait fidelerin saksılara transferi (3 aylık fideler)



Resim 3.2.5 Yonca aksesyonlarına ait 4 aylık fideler



Resim 3.2.6 Yonca aksesyonlarına ait 6 aylık fideler

3.4 Moleküler Markırlar, Populasyon Yapısı ve Genetik Çeşitliliğin Değerlendirmesi

3.4.1 Bitkilerden DNA Ekstraksiyonu

3.4.1.1 Kullanılan Kimyasallar ve Miktarları

CTAB Ekstraksiyon Tamponu (Herbir Litrede)

CTAB (Hexadecylmethyl Ammonium Bromide): 20 g

2M Tris-Cl (Ph 8) : 50 ml

5M NaCl: 280 ml

0.5M EDTA (Ph 8): 40 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Kloroform/İso-Amil Alkol (24:1) (Herbir 100 ml'de)

Kloroform: 96 ml

İso-Amil Alkol: 4 ml

İsopropanol

Ethanol (%70'lik)

3.4.1.2 DNA İzolasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması

1. 96' lık bir PCR plate'i (0.2 ml'lik), 1.7-2.5 mm'lik boncuklarla (Cat#: MS-203L, MO-SCI Corporation) doldurulur ve doğru sıralandığına emin olunan boşlukların bulunduğu PCR plate'i bir 96'lık rakta (Cat#: 1412-1400 from USA scientific) 1.2 ml'lik şeritli tüplerle (Cat#: 1212-8000 from USA scientific) dikkatli bir şekilde konumlandırıldı. PCR plate'i ve şeritli tüpler beraberce elle sıkıştırıldı ve ters çevrildi. Böylece PCR plate'inde bulunan boncukların 1.2 ml'lik şeritli tüplerin içine düşeceği

düşünülmüştür.

2. Tüplerin bize dönük yüzleri 1'den 12'ye kadar sırayla etiketlendirildi.

3. Yonca bitkilerinin triplet (üçlü) şeklinde olan yapraklarından 1-5 kadar yaprak (sayı, yaprakların boyutuna bağlı olarak değişir) toplanarak 96'lık raklarda bulunan 1.2 ml'lik şeritli tüpler içerisine bırakıldı. Her bir rak porlu bir yapışkan film (Cat#: 60941-084 from VWR) ile kapatıldı ve 1-3 günlük süre boyunca kuru dondurucuda (liyofilizatör) kurutulup donduruldu.

4. 3 gün sonrasında yapışkan film çıkarıldı ve şeritli kapaklar (Cat#: C1000-8 or C1000-12 from Marsh Biomedical) ile konumlandırıldı. Daha sonra kurutulup dondurulmuş örnekler çalkalayıcıda 30 sn-1 dakika'lık sürede rakların çalkanması suretiyle dağıtıldı. Bu işlem, doku örneklerinin tüplerin dibinde iyice toz haline getirilinceye kadar devam ettirildi[83].

3.4.1.3 DNA Ekstraksiyon Prosedürü

5. İnkübatör 65 °C'ye ayarlanarak açılır ve CTAB ekstraksiyon tamponu inkübatöre kondu.

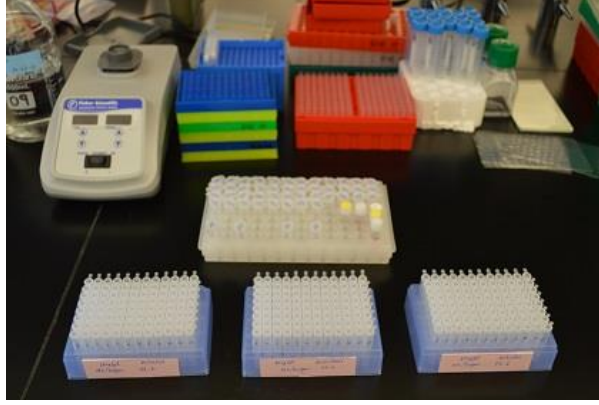
6. Toz haline gelmiş olan yaprak dokusunun tüplerin dibine çökmesi için laboratuvarında tezgahın üzerinde bulunan raka yavaşça vuruldu ve kısa bir süre için çevrildi. Dikkatli bir şekilde tüplerin kapakları açılarak her birisine 500 µl CTAB ekstraksiyon tamponu eklendi. Tüplerin kapakları tekrar kapatıldı ve yavaş bir çevirme işlemiyle tüpler iyice karıştırıldı. Sonrasında tüpler inkübatöre alınarak 30 dakika-2 saatlik süre boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sırasında yaklaşık her 20 dakikada bir reaksiyonu karıştırmak tavsiye edilir (Şayet işlem bu basamakta durdurulmak istenirse DNA örnekleri -20 °C'de saklanabilir).

7. Örnekler yaklaşık 10 dakika boyunca 4 °C'de ya da çekerocakta bekletilerek soğutuldu. Daha sonra kısaca örnekler spin edildi. Bu spin işlemi, dış kontaminasyon potansiyelini minimize etmek açısından önemlidir.

8. DNA ekstraktı içerisine 250 µl 24:1 Kloroform/İso-Amil Alkol (özel plastik taşıyıcıda tutulan) eklenir. Plate, ters çevirmek suretiyle 20 kez iyice karıştırıldı. 3600 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj işlemi yapıldı.
9. Tüplerin üst bölgesinde bulunan sıvı kısım yeniden etiketlenmiş işaretli tüplere transfer edilir ve her bir tüpün içerisine oda sıcaklığında olan isopropanolden 0.6-1 µl hacim şeklinde ilave yapıldı. DNA'yı çökeltmek için 20 kez ters çevirme işlemi gerçekleştirildi. Bu süreçte iplik şeklinde çökelmiş DNA görülmelidir.
10. Pellet DNA için 3600 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj yapıldı. İşaretli her bir tüpün içerisinde sıvı kısım oldukça yavaş bir şekilde döküldü. Her bir tüpün dibinde bir pellet görüldü.
11. Her bir tüpün içerisine 300 µl %70'lik etanolden ilave edilerek pelletler yıkandı. 3600 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası etanol oldukça yavaş bir şekilde döküldü. Daha sonra DNA pelleti oda sıcaklığında bir gece boyunca ya da çekerocakta yaklaşık 2 saat boyunca bırakıldı.
12. En son aşamada pelletler 100 µl su ile çözüldü ve DNA örnekleri -20 °C'de saklandı[83].

3.4.2 DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Belirlenmesi

Elde edilen DNA'ların öncelikle NanoDrop adlı spektrofotometrede konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Sonrasında ise PCR'da kullanılmak üzere seyreltmeler yapılarak bu konsantrasyonlar önce 100 ng/µl düzeyinde eşitlendi ve daha sonra 10 ng/µl yoğunluğa seyreltilerek PCR reaksiyonları için hazır hale getirildi.



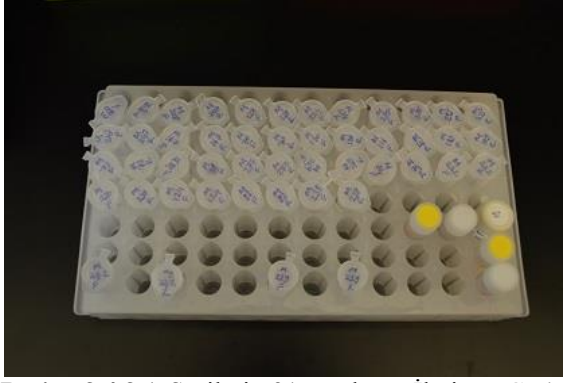
Resim 3.4.2.1 DNA'ların seyreltilmesi ve konsantrasyonlarının belirlenmesi

3.4.3 SSR Markırlarının Seçilimi ve PCR Reaksiyonları

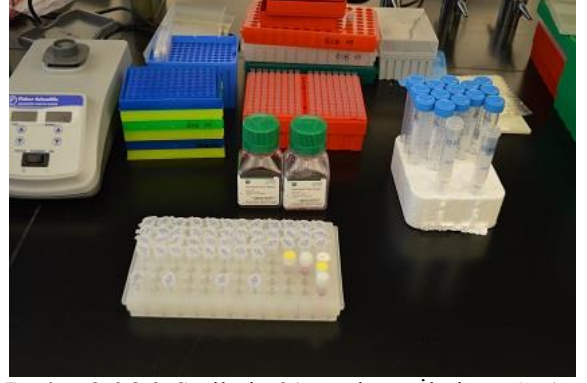
Daha önceki çalışmalarda kullanılan SSR markırlarından kolay skorlanan ve amplifikasyonu yüksek olan 31 polimorfik SSR markırı (Çizelge 3.4.3.1) seçilmiştir ve M13 kuyruk metodu ile PCR ürünleri etiketlenmiştir[84]. Herbir lokus, PCR ve bir M13 kuyruk düzeni ile floresan olarak işaretlenmeye M13 ön sekansı ile 5' uca eklenmiş ön primerin olduğu yerde çoğaltılmıştır ve floresan olarak işaretli bir M13 ön primeri ile birleştirilerek kullanılmıştır. PCR reaksiyonları bir ABI BioApplied Thermocycler'ında (The Samuel Roberts Noble Foundation Inc.) gerçekleştirilmiştir. 95⁰C'deki 2 dakikalık bir denatürasyon periyodu 95⁰C'deki 30 saniyelik 30 döngü ile, erime sıcaklığında (T_m=60⁰C) 45 saniye, 72⁰C'de 45 saniye ve sonrasında tekrar 95⁰C'deki 30 saniyelik 10 döngü ile M13 primerinin annealing sıcaklığı olan 53⁰C'de 45 saniye, 72⁰C'de 45 saniye ve final uzaması için de 72⁰C'de 7 dakika şeklinde takip edilmiştir. Reaksiyonlar 1X buffer, herbirinde 10mM dNTP, 0.25µM ileri SSR primerleri, 0.5µM geri SSR primerleri ve 10µM floresan olarak işaretli M13 primerleri, 25mM MgCl₂, 2 µl seyreltilmiş genomik DNA (10ng/µl) ve 5U/µl TaqGold DNA Polimeraz (Invitrogen Inc.)'ı içeren 10 µl'lik final hacminde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4.3.1.1)[79]. Sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin denatürasyon PCR'ı gerçekleştirilmiştir ve bu ürünler ABD'de yer alan The Samuel Robert Noble Foundation enstitüsüne ait ABI 3730 kapillari sisteminde yürütülerek ayrılmıştır.

Çizelge 3.4.3.1 Seçilmiş olan 31 adet polimorfik markırın primerleri ve allel boyutları

Markır İsmi	İleri Primer	Geri Primer	Allel Boyutları
al369471	AACCAGTGAGTGGATGTGGTC	GTGAAAACCTTAGCACCGA	155-222
aw373	TATCATCCTGGTTCGTTCTCT	GGTTGAGCTTGAGAAAATCTGA	118-152
mtic332	CCCTGGGTTTTGATCCAG	GGTCATACGAGCTCCTCCAT	119-170
bg648700	GCTTTTCACACCTCCACTCC	ACGGGAAAGACTCCCCTCT	208-273
aw282	CGACCAAATCACTTCTTCAA	AATCCAAGACCATTCACTGAG	208-308
bf650422	ACAACAACGATGGACAACGA	CAGGCATTGGTGGAAACAGT	265-319
aw774443	ATTCGCAGTGAGCTGATCCT	GACATTTGCAGACCACCATT	215-239
aw394	AGGATGATGTGGAAGGAAGAAA	TTGCTAGAGCCTTAAACCTGT	233-275
aw319	AAAAGGTTTTCTAACACCAAGCA	TTCTGACTTCCATGATCCTT	216-246
aw586158	GATCAATTTCGTGCAGAAGCA	ATTCATCCTTGCTCGTTTTCG	202-236
b21e13	GCCGATGGTACTAATGTAGG	AAATCTTGCTTGCTTCTCAG	133-192
aw690263	TTACCATATTAACCCCGCA	CGCATATCACCTCCAGAAT	245-265
aw379	GTCTCTCTATTCTTCCCTTTTC	TTCTCGAAATCTCTGCTCTCG	208-262
aw691701	CACCACAAAACGCAAACAAC	ACCCTATTGTCTCCCATCC	107-162
aw387	GAACACTCTCGAAACAAGGAC	ATAAGCCATTCTCAGCACCGTA	194-226
aw688546	GGTGAATTTTCTCCACTTCCA	TCGGCTCAGTTTAGGCTTCT	292-350
al367160	CCCCATTGACGCATTCTTAC	TCCTCAACCAACCCTTCT	246-330
aw559239	TTCTCTCCCAATGGACAG	TCTCTGATACCAATTTGCC	239-389
bg448975	TCGGATCTGACACGATTTTG	TTGGTTAAAAGATGAAGATGAACG	207-256
aw685868	AAGCAAGTTCTGTTGATGGAGA	TTGTGAAAGCCAAAACACCA	271-310
be100	GCATTAGCACCTCATTTCATATC	TGCAGAGACTTTTGAACACCTT	273-311
aw295	CAACATTCTTCCATTTCCTTCC	TCTTCATCTTCGTCTCTCAA	216-277
aw348	GCAACCATCTAAACCAACAA	AGGCTAATCGACGGGAAAAT	206-255
bg647796	GCAAGAAAGCATAGGCTGAGA	GTGAAGCTGCACGAATTCA	260-307
mtic14	CAAAACAAACAACACAAACATGG	CCCATTGATTGGTCAAGGTT	121-139
aw256	ACCACTACTGCGTTTGTGTTGTG	TAAGGAGTTTGAATGGGAAGA	212-240
aw343	GGTTCGTGTATTTGTTTCGATCC	AATCTCCAAGGTTCCATCTTCA	205-243
afct45	TAAAAAACGGAAAGAGTTGGTTAG	GCCATCTTTTCTTTTGCTTC	135-179
aa660573	TTCCGCCCATAGTCTTTGAC	TAAATGTGTCCTGCGTCTGG	294-363
bg454744	TCACAAAGCGAAAAATGTGA	CCAGGATCAAGGTAAGCCAA	365-403
aw695813	AACAGAATGCATTGCACGAA	TTCGTTGAACGTTGGATTGA	265-727



Resim 3.4.3.1 Seçilmiş 31 markırın İleri ve Geri primerlerinin hazırlanması

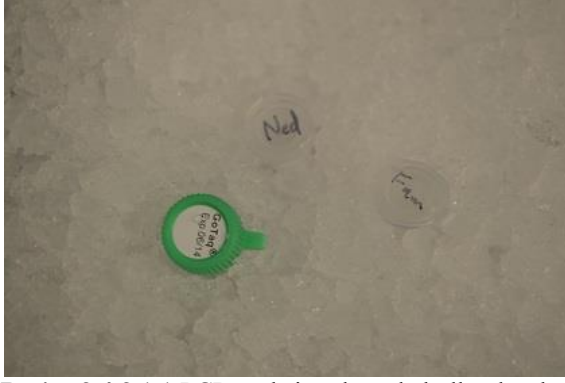


Resim 3.4.3.2 Seçilmiş 31 markırın İleri ve Geri primerlerinin hazırlanması

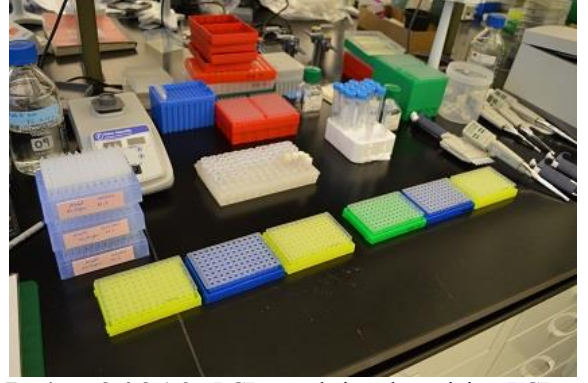
3.4.3.1 PCR Kimyasalları ve Reaksiyonlarının Hazırlanması

Çizelge 3.4.3.1.1 PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları

Bir PCR reaksiyonu için (10 μ l) reaksiyon formülü	μ l
10 PCR buffer II	1
MgCl ₂ (25mM)	1
dNTP (2.0mM)	0.75
İleri Primer (0.25 μ M)	1
Geri Primer (0.5 μ M)	2
M13 Primer (Hex, Ned, or Fam) (10 μ M)	0.1
TaqGold DNA polymerase (5U/ μ l)	0.1
ddH ₂ O	2.05
DNA Template (10 ng/ μ l)	2
Total	10



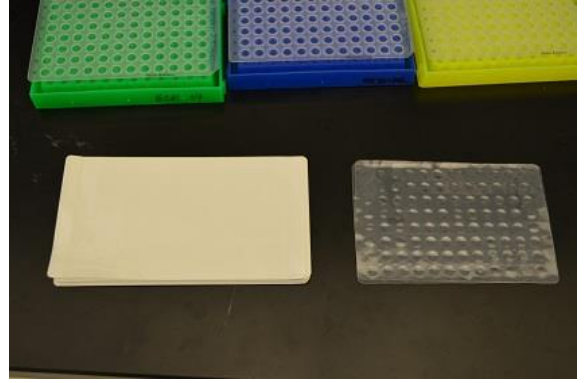
Resim 3.4.3.1.1 PCR reaksiyonlarında kullanılacak M13 primerleri ve Taq DNA polimeraz



Resim 3.4.3.1.2 PCR reaksiyonları için PCR tampon karışımı ve plate'lerin hazırlanması



Resim 3.4.3.1.3 PCR reaksiyon karışımları eklenen plate'lere DNA'ların eklenmesi



Resim 3.4.3.1.4 Hazırlanmış PCR plate'lerinin filmler ile kapatılması



Resim 3.4.3.1.5 PCR reaksiyonları için hazır plate'ler



Resim 3.4.3.1.6 PCR reaksiyonları için Thermocycler

3.4.3.2 PCR Ürünlerinin Kapiller Elektroforez için Hazırlanması

Reaksiyonlara ait PCR ürünleri, kapiler elektroforez cihazına gönderilmeden önce birleştirilmiştir. İşaretlenen PCR ürünleri ABD’de bulunan Nobel Foundation adlı kuruluştta bulunan ABI 3730 adlı kapilar elektroforez cihazında yürütülerek bant uzunlukları tesbit edilmiştir.

3.4.3.2.1 Kullanılan Kimyasallar

Formamide (CRS Cat #: 319715)

96’lık kısmi sınırlı Plate (KSE Cat #: 1956-3580)

Barkot (VWR Cat #: HP5958-9442)

LIZ500 (ABI Cat #: 401734)

3.4.3.2.2 ABI 3730 Kapiller Elektroforez Sistemine Hazırlık Prosedürü

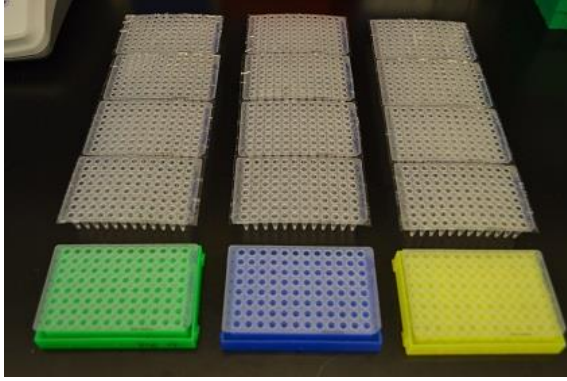
1. PCR ürünleri 1:10 oranında seyreltilmelidir. 1 primerle PCR’ın yürütülmesi için seyreltme işlemi, 2 µl PCR örneği ve 18 µl H₂O şeklinde yapılır. PCR’ın 4 primerle gerçekleştirildiği durumda ise seyreltme işlemi 2 µl PCR örneği ve 12 µl H₂O şeklinde yapıldı. Zayıf primerler ya da DNA 1:6 ya da 1:8 oranlarında seyreltmeye ihtiyaç gösterir.

2. 100 X şeklinde bir plate’de kurulması tasarlanan reaksiyonlar için, içerisinde 25 µl LIZ, 400 µl H₂O ve 400 µl formamide bulunan bir ‘master mix’ yapıldı. Bu karışım önce vortexlendi sonra birkaç saniye spin santrifüj işlemi gerçekleştirildi. 96’lık plate’in her bir boşluğuna bu karışımdan 8’er µl boşaltıldı (Bu durumda plate’deki tek bir boşluğun içerisinde 0.25 µl LIZ500 standartı, 4 µl H₂O, 4 µl formamide ile 2 µl’lik seyreltilmiş olan PCR ürünü bulunmaktadır).

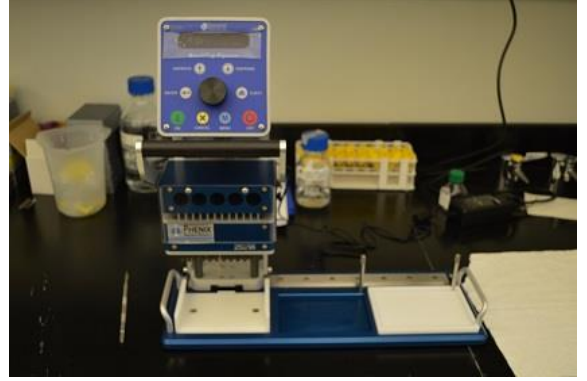
3. 96’lık plate’in kuyucuklarına sırasıyla (DNA’lar karışmayacak şekilde) PCR ürünlerinden 2’şer µl eklendi.

4. Birkaç saniye spin santrifüj işlemi gerçekleştirildi (<2000g).

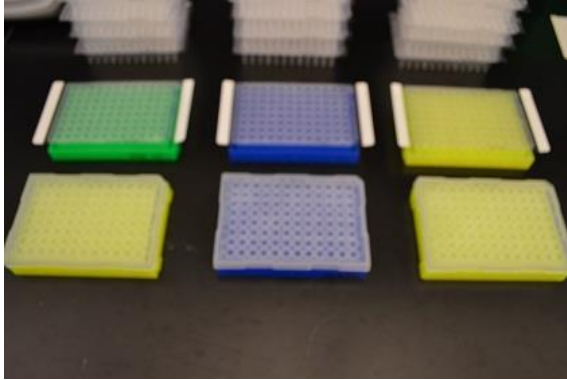
5. Sıcaklığı 95 °C' ye ayarlanmış Thermocycler'da 5-10 dakikalık sürede denatürasyon PCR'ı gerçekleştirildi.
6. PCR sonrası Thermocycler'dan alınan plate 5-10 dakika kadar buzun üzerine konularak bekletildi.
7. Vorteks işlemi ve takiben birkaç saniyelik spin santrifüj işlemi yapıldı.
8. Plate'ler folyo ile sarılarak DNA sekanslama cihazına götürüldü ya da +4 °C'ye kaldırılarak kısa süreli olmak kaydıyla saklandı[5].



Resim 3.4.3.2.2.1 PCR ürünlerinin kapiller elektroforez için hazırlanması



Resim 3.4.3.2.2.2 PCR ürünlerinin kapiller elektroforez için hazırlanması



Resim 3.4.3.2.2.3 Transfere yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez plate'lerine aktarılması



Resim 3.4.3.2.2.4 Kapiller elektroforez için Liz ve Hi-Di Formamide karışımının hazırlanması



Resim 3.4.3.2.2.5 Kapiller sistem için plate'lerinin denatürasyon PCR işlemi



Resim 3.4.3.2.2.6 Kapiller sistem için plate'lerinin sekanslama cihazına gönderilmesi

3.4.4 Verilerin Skorlanması

Skorlama işlemi, tetraploit aksasyonlardan dolayı genotipler kullanılarak yapılabildiği gibi bireysel allellerin varlığı ya da yokluğu şeklinde de yapılabilmektedir. Tetraploitlerde genotipi belirlemek (simplex, duplex, triplex durumları) mümkün olmadığından bu çalışmada skorlama işlemi bireysel allellerin varlığı ya da yokluğu şeklinde yapıldı. Kapiler elektroforezden elde edilen veriler GENEMARKER adlı program ile skorlandı. Skorlama sırasında her bir markır için toplam 280 adet farklı genotipe sahip bitki örneklerinin jel görüntüleri değerlendirildi. Işık yoğunluğu ve kontrastı ayarlandı ve yoğunluk profilleri her bir bireyi doğru bir şekilde skorlamak için kullanıldı. Görüntüler GENEMARKER yazılımı (Scanalytics, Inc.) ile iki basamakta ele alındı. İlk basamakta farklı alleller tanımlandı. Daima diğeri ile birlikte görülen bazı bantlar kopyalar olarak düşünüldü ve atıldı (stutter). İkinci basamakta ise herbir birey için (örn. Herbir şerit ya da yol içerisindeki) farklı allellerin sayısı belirlendi. Hassas jel verisi GENEMARKER yazılımı kullanılarak bir database şeklinde elde edildi ve istatistiksel analiz için girdi dosyası şeklinde daha fazla düzenleme amacıyla allel boyutları olarak kaydedildi.

Verilerin skorlanması işlemi oldukça fazla hassasiyet ve dikkat gerektiren bir basamaktır. Çünkü hatalı skorlamalar sonuçların yanlış olarak yorumlanmasına bunun neticesinde de yanlış sonuçların elde edilmesine neden olmaktadır. Verilerin skorlanması işleminde dikkat edilmesi gereken temel unsurlar şu şekilde sıralanabilir;

- Skorlama sırasında oluşan piklere bakıldığında, markırın alleli çok fazla olmamalıdır. Şayet fazla allel bulunuyorsa, her birisi her bir genotip için ayrı ayrı kontrol edilmelidir.
- Skorlamada diploitler iki, tetraploitler ise iki ve daha fazla bant ya da allel piki oluşturmalıdırlar. Bant ya da piklerin hiç görülmediği durumda PCR amplifikasyonunun olmadığı sonucuna varılmaktadır fakat bazı bantlar oldukça zayıftırlar ve zor görünebilmektedirler.
- Veriler skorlanırken oluşan pikler kalitesine göre çok net, kaliteli ve kalitesiz olmak üzere üç gruba ayrılmalıdırlar.
- Skorlamada dikkat edilmesi gereken en önemli hususların başında gerçek alleller ile allel olmayan piklerin (Stutter) karıştırılmamasıdır. Stutter'lar genelde daha

zayıftırlar. Gerçek alleller ise her zaman tüm bireylerde aynı pikleri vermektedirler.

- Piklerin çok yoğun ve yakın bir şekilde zikzak çizdikleri görüntü durumlarında bu alleller skorlama için tercih edilmemelidir.
- Bazen iki allel yan yana bulunarak benzer boyutlarda pik oluşturabilmektedir. Bu piklerin her ikisi de gerçek allellere ait olabilir. Bu nedenle her iki alleli de detaylı olarak incelemek gerekir.
- Gerçek olan alleller genellikle yanında bulunan bant ya da piklerden daha büyük pik oluştururlar. Örneğin 3, 4 ya da 5 pikin birlikte yan yana bir küme şeklinde bulunduğu bir durumda, genotipler tetraploit bireylere ait ise genelde 3'lü olanlardan en büyük 2 tanesi, 4'lü olanlardan en büyük 2-3 tanesi, ve 5'li olanlardan da en büyük 2-4 tanesi gerçek bant olarak değerlendirilmelidir fakat bazı genotiplerde pikler küçük olarak ta görülebilmektedir. Bu piklerin doğruluğundan emin olmak için diğer tüm bireyler de kontrol edilmelidir. Gerçek olmayan bantlar stutter'lardır.
- Piklerin kontrolü yapılırken gerçek olmadığı belirlenen allellerin silinerek tekrar GENEMARKER programında analiz işlemi yapılmalıdır.
- Gerçek allellere ait olan pikler belirlenirken aşağı doğru tüm bireylere bakıldığında aynı bölgelerde olanlar (hep solda ya da hep sağda) seçilmelidir.
-

3.4.5 Veri Analizleri

GENEMARKER adlı bilgisayar yazılımı ile tüm bitkilere ait genotipler skorlandıktan sonra populasyon yapısının belirlenmesi için STRUCTURE adlı software kullanıldı. STRUCTURE programı Bayesian istatistiğine dayanmaktadır. Populasyonların genetik olarak kaç alt gruba ayrıldığını, bu alt gruplar arasındaki genetik çeşitliliği en fazla hangi grubun açıkladığını belirlemek için kullanılmaktadır. 280 farklı genotip için populasyonlarda bulunan alttürleri ayırmak için kullanılan bu program MCMC tekrarlarını ve K gruplarını içermektedir. Başlangıçta optimal K değerini (Küme sayısı) ortaya çıkarmak için K'nın 1'den 10'a kadar değerlendirilmesi için 280 genotipin tamamı kullanıldı. Bu çalışmadaki modelde, farklı ve büyük populasyonlardan dolayı *karışım modeli* kullanıldı ve allel frekanslarının ilişkili olabildiği farzedildi. Çünkü bu durum benzer populasyonların ortak allellere sahip olabileceğini varsaymaktadır.

Kaydedilen Markov Chain Monte Carlo (MCMC) replikasyonlarının uzunluğu 10000 adeti veri toplanmadan atıldı ve her bir yürütmeye 100000'den daha fazla MCMC replikasyonlarından veri toplandı. Önceki literatürlerde bu düzeyin yeterli olduğu belirtilmiştir[85]. Hem ad hoc prosedürü hem de Evanno ve arkadaşları (2005) tarafından geliştirilen metod kullanılarak optimal K değeri hesaplandı[86].

STRUCTURE programından elde edilen verileri doğrulamak ve alt popülasyonları onaylamak için GenAIEx[87] kullanılarak bir Principal Component Analizi (PCA) gerçekleştirildi ve ilk iki Principal Component tahminleri için genotipik değerler plotlandı. İkincisinde, bir genetik mesafe matrisi[88] hesaplandı ve yazılım programı POWERMARKER V3.25[89] kullanılarak bir neighbor-joining dendrogramı oluşturuldu. Programdan elde ettiğimiz verileri kullanarak da hem 280 tetraploid bireyin bireysel bazda moleküler ilişkisi için hem de bu bireylere ait 70 adet aksesyonun popülasyon düzeyinde moleküler ilişkisi için DENDROSCOPE adlı programı kullanarak Neighbour Joining ağacı görselleştirildi[90].

Ayrıca popülasyonlar arasındaki, aksesyonlar arasındaki ve içerisindeki moleküler genetik varyansları belirlemek amacıyla moleküler genetik varyans için Moleküler Varyans Analizi (AMOVA) gerçekleştirildi. Aksesyon içerisindeki varyansı hesap edebilmek amacıyla AMOVA analizleri için 70 aksesyonun tamamı kullanıldı. GenAIEx 6.1[87] yazılım programı kullanılarak AMOVA gerçekleştirildi. Çeşitliliğin ölçümleri aksesyonların tüm alttürleri ve bireyleri için hesaplandı. Çeşitlilik ölçümleri; allel frekansları, majör allel frekansları, gen çeşitliliği (beklenen heterozigoti H_e), ve polimorfizm bilgisi içeriği (PIC)'ni içermektedir. Hesaplamalar POWERMARKER v3.23[89] yazılım programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Popülasyonlar arasındaki genetik mesafelerin belirlenmesi ve F istatistiklerinin hesaplanması için de GenAIEx 6.1[87] programından yararlanıldı.

3.5 Linkage Eşitsizliği (LD) Analizi

Tetraploit yoncada Linkage Eşitsizliği (Linkage Disequilibrium) durumunu SSR lokuslarını kullanarak değerlendirmek amacıyla POWERMARKER v3.23[89] programını kullanarak veriler için LD analizi gerçekleştirildi. Kullanılan her bir markırın ikiden fazla lokusa sahip olmasından dolayı bu analiz için Exact-P değerleri belirlendi. Elde edilen P değerlerindeki %0,05'lik istatistiksel hata payını minimize etmek amacıyla geliştirilmiş olan QValue 1.36.0[91] programını kullanarak P değerleri için Q değerleri elde edildi. Daha sonra, önceki analizlerde kullanılan 31 adet SSR markırından 23 tanesine ait olan alleller için fiziksel lokasyonları *M. truncatula* genom sekans build programını (3.5.1 versiyonu) kullanarak belirlendi. Son aşamada ise LD değerleri ile fiziksel mesafelerini karşılaştırarak LD'nin değeri hesaplandı

4. BULGULAR

4.1 Morfolojik Analiz

Kompleksin alttürleri, ABD Tarım Bakanlığı Bitki Genetik Kaynaklar Sisteminde (USDA-GRIN) çiçek rengi ve meyve şekli gibi morfolojik kriterlerine göre tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır fakat sınıflandırmada bazı hataların olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple bu çalışmada aynı morfolojik kriterleri kullanarak alttürleri tanımlanmış ve tekrar sınıflandırılmıştır. Tetraploit *sativa* tipik olarak diploit *caerulea* gibi mor çiçekli ve çok sayıda meyve kıvrımlı olarak tanımlanırken tetraploit *falcata* diploit *falcata* gibi sarı çiçekli ve oraksı meyvelere sahip olarak tanımlanmıştır. Tetraploit hibrit *varia* ise diploit hibrit *hemicycla* gibi melez (ebruli) renkli çiçekler ile kısmen kıvrımlı meyveler ile karakterize edilmiştir. Bu çalışma kapsamında ilkin morfolojik kriterler kullanılarak kompleksin tetraploit alttürleri ayrılmaya çalışılmıştır. Tetraploitlerde morfolojik analizler için 70 aksesyonda çiçek rengi ve meyve şekilleri belirlenerek alttür tanımlamaları yapılmıştır (Çizelge 4.1.1).

Bulunan sonuçlar tetraploit genotiplerin genellikle GRIN-USDA sistemde tanımlanan alttürler ile bazı istisnalar dışında aynı morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. PI183262 numaralı aksesyon GRIN sisteminde *sativa* alttürü olarak ifade edilmiştir fakat morfolojik analizlerimiz sonucunda *sativa* alttüründen farklı olarak 0.6'lık meyve kıvrım sayısı ile tetraploit *falcata* alttürüne yakınlık göstermiştir. Aynı şekilde PI214218 ve PI217648 numaralı aksesyonlar da *sativa* alttürü olarak belirtilmelerine rağmen bu analiz neticesinde sırasıyla 1.2 ve 1.0'lık meyve kıvrım sayıları ile melez alttür olan *varia* genomuna yakınlık göstermişlerdir. PI244317 ve PI420400, 1.4'lük meyve kıvrım sayıları ile; PI442877 ise 1.5'lik meyve kıvrım sayısı ile *varia* alttürüne yakın bir özellik gösterirken PI502474 ve PI516902 numaralı aksesyonlar 0.8'lik meyve kıvrım sayıları ve ilginç bir şekilde mor çiçek renkleri ile daha çok ya da melez *varia* alttürlerine yakın morfolojik özellikler göstermiştir. Diğer taraftan PI 206576 numaralı aksesyon GRIN'de *sativa* alttürü olarak gösterilmesine rağmen melez çiçek rengi ve 1.0'lık meyve kıvrımı ile PI239954 numaralı aksesyon ise aynı şekilde *sativa* alttürü olarak ifade edilirken melez çiçek rengi ve 1.3'lük meyve kıvrımı ile melez alttür olan *varia* alttürüne benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.1.1).

GRIN sisteminde *varia* alttürü olarak gösterilen PI 476393 numaralı aksesyon da ise mor çiçek rengi ve 2.0'lık meyve kıvrım sayısı ile *sativa* alttürü genomuna yakınlık belirlenmiştir (Çizelge 4.1.1).

Tetraploit *falcata* alttürü olarak GRIN sisteminde sınıflandırılan aksesyonlardan PI 502441 numaralı aksesyonda şaşırtıcı bir durum olarak mor çiçek rengi ile *sativa* alttürünün morfolojik özelliklerini göstermiştir. PI 538983 ve PI 631585 no'lu aksesyonlarda melez çiçek renkleri ve 1.0'lık melez meyve kıvrım sayıları ile *varia* daha fazla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan PI 631579 no'lu aksesyon mor çiçek rengi ve 1.1'lik meyve kıvrım sayısı ile, PI 641546 ise mor çiçek rengi ve 1.6'lık meyve kıvrım sayısı ile melez *varia* alttürünün tipik özelliklerini göstermişlerdir (Çizelge 4.1.1).

Çizelge 4.1.1 Bu çalışmada kullanılan bireysel genotip sayıları, orjin ülkeleri, kromozom sayıları ve çiçek renkleri ile birlikte tetraploit aksesyonların listesi ve her bir aksesyonun bu çalışma temelinde sınıflandırılması

PI Numarası	Kullanıldığı Genotip Sayısı	Orjin Ülkesi	Kromozom Sayısı	Çiçek Rengi ^a	Meyve Kıvrımı	GRIN Sistemindeki Sınıflandırma	Sınıflandırma (Bu çalışma temelinde)
PI 173733	4	Türkiye	32	P	2.7	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 179369	4	Türkiye	32	P	2.3	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 180303	4	Hindistan	32	P	0.8	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 182240	4	Türkiye	32	P	1.7	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 183262	4	Suudi Arabistan	32	P	0.6	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 196225	4	Hindistan	32	P		<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 198963	4	Kıbrıs	32	P	2.9	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 199273	4	Polonya	32	P	2.8	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 201863	4	İran	32			<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 206576	4	Yunanistan	32	P/V	1.0	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 206698	4	Türkiye	32	P		<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 208683	4	Cezayir	32	P	2.2	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 210763	4	İspanya	32	P	2.5	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 214218	4	Danimarka	32	P	1.2	<i>sativa</i>	<i>Varia</i>
PI 217648	4	Irak	32	P	1.0	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 220531	4	Afganistan	32	P	2.0	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 222198	4	Afganistan	32	P	1.8	<i>sativa</i>	<i>sativa-varia</i>
PI 239954	4	Cezayir	32	P/V	1.3	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 244317	4	İspanya	32	P	1.4	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 256337	4	Pakistan	32	P	1.8	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 262544	4	İsrail	32	P	2.2	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 299053	4	SSCB	32	P	1.7	<i>sativa</i>	<i>sativa-varia</i>
PI 315484	4	SSCB	32	P	1.8	<i>sativa</i>	<i>sativa-varia</i>
PI 399551	4	Romanya	32	P	1.9	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 420400	4	İspanya	32	P	1.4	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 440517	4	Kazakistan	32	P	1.7	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 442877	4	Çin	32	P	1.5	<i>sativa</i>	<i>varia-sativa</i>
PI 464801	4	Türkiye	32	P	1.5	<i>varia</i>	<i>varia-sativa</i>
PI 464813	4	Türkiye	32	P	0.8	<i>varia</i>	<i>varia-falcata</i>
PI 476393	4	Ukrayna	32	P	2.0	<i>varia</i>	<i>sativa-varia</i>
PI 486202	4	Ukrayna	32	P	1.6	<i>varia</i>	<i>sativa-varia</i>
PI 486210	4	SSCB	32	P	1.1	<i>varia</i>	<i>Varia</i>
PI 491407	4	Çin	32	Y		<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 494661	4	Romanya	32	Y	0.6	<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 499548	4	Çin	32			<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 499664	4	Çin	32			<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 499665	4	Çin	32			<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>

Çizelge 4.1.1 (Devam) Bu çalışmada kullanılan bireysel genotip sayıları, orjin ülkeleri, kromozom sayıları ve çiçek renkleri ile birlikte tetraploit aksesyonların listesi ve her bir aksesyonun bu çalışma temelinde sınıflandırılması

PI Numarası	Kullanıldığı Genotip Sayısı	Orjin Ülkesi	Kromozom Sayısı	Çiçek Rengi ^a	Meyve Kıvrımı	GRIN Sistemindeki Sınıflandırma	Sınıflandırma (Bu çalışma temelinde)
PI 502441	4	Rusya	32	P	0.6	<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 502446	4	Rusya	32			<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 502459	4	Kazakistan	32	P	1.9	<i>sativa</i>	<i>sativa-varia</i>
PI 502474	4	Ermenistan	32	P	0.8	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 502514	4	SSCB	32			<i>varia</i>	<i>varia-sativa</i>
PI 502521	4	SSCB	32			<i>varia</i>	<i>varia-sativa</i>
PI 502529	4	SSCB	32			<i>varia</i>	<i>varia-sativa</i>
PI 502532	4	SSCB	32	P		<i>varia</i>	<i>varia-sativa</i>
PI 502533	4	SSCB	32			<i>varia</i>	<i>varia-sativa</i>
PI 502540	4	SSCB	32	P	1.6	<i>varia</i>	<i>varia-sativa</i>
PI 503867	4	Romanya	32	P		<i>varia</i>	<i>varia-sativa</i>
PI 516902	4	Fas	32	P	0.8	<i>sativa</i>	<i>Sativa</i>
PI 538983	4	Ukrayna	32	P/V	1.0	<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 631573	4	İtalya	32			<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 631579	4	İtalya	32	P	1.1	<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 631582	4	Türkiye	32			<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 631585	4	İtalya	32	P/V	1.0	<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 631592	4	İtalya	32			<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 631796	4	Çek Cumhuriyeti	32	P/V	0.7	<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 631845	4	İsveç	32			<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 631855	4	İsveç	32			<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 631859	4	İsveç	32		0.6	<i>falcata</i>	<i>Varia</i>
PI 641381	4	Rusya	32	P/V	0.7	<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 641383	4	Rusya	32	Y		<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 641400	4	Rusya	32	Y	0.5	<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 641545	4	Moğolistan	32			<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 641546	4	Moğolistan	32	P	1.6	<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 641548	4	Moğolistan	32			<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 641581	4	Kazakistan	32			<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>
PI 641582	4	Kazakistan	32	P/Y	0.6	<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 641585	4	Kazakistan	32	P		<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 641588	4	Kazakistan	32	P	0.7	<i>falcata</i>	<i>Falcata</i>
PI 641599	4	Kazakistan	32	P	0.5	<i>falcata</i>	<i>falcata-varia</i>

^a P Mor rengi, Y sarı rengi, and V melez rengi göstermektedir.

^b Başlangıçta USDA-GRIN'de *sativa* olarak tanımlanmıştır.

^c Başlangıçta USDA-GRIN'de *falcata* olarak tanımlanmıştır.

Kırmızı renkle işaretlenmiş ifadeler GRIN sistemine göre farklı sonuçları göstermektedir.

^d Çiçek rengi ve tohum şekli beklentilerinden sapanlar.



Resim 4.1.1 Yoncannın *sativa* alttürüne ait morfolojik sonuçlar



Resim 4.1.2 Yoncannın *sativa* alttürüne ait morfolojik sonuçlar



Resim 4.1.3 Yoncannın *varia* alttürüne ait morfolojik sonuçlar



Resim 4.1.4 Yoncannın *varia* alttürüne ait morfolojik sonuçlar



Resim 4.1.5 Yoncannın *varia* alttürüne ait morfolojik sonuçlar



Resim 4.1.6 Yoncannın *falcata* alttürüne ait morfolojik sonuçlar

4.2 Populasyon Yapısı ve Dinamiği Analizi

Optimal K değeri hem Pritchard ve arkadaşları tarafından tanımlanan ad hoc prosedürü hem de Evanno ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre belirlenmiştir. Aşağıdaki grafikler (Şekil 4.2.1-A ve Şekil 4.2.2-B) her iki metodun optimal K değerini tespitini şematize etmektedir. Her iki metotta da optimal K değerinin 2 olduğu yani verilerin bireylerinin iki ana populasyona ayrıldığı anlaşılmıştır. Böylece optimal K değerinin 2 olduğu sonucuna varılmıştır. STRUCTURE analizinde *varia* alttürleri için hibrit genomların oluştuğu da görülmüştür fakat bu bu alttürün yeni bir küme oluşturacak kadar farklı bir genetik yapıya sahip olmadığı görülmüştür (Şekil 4.2.3).

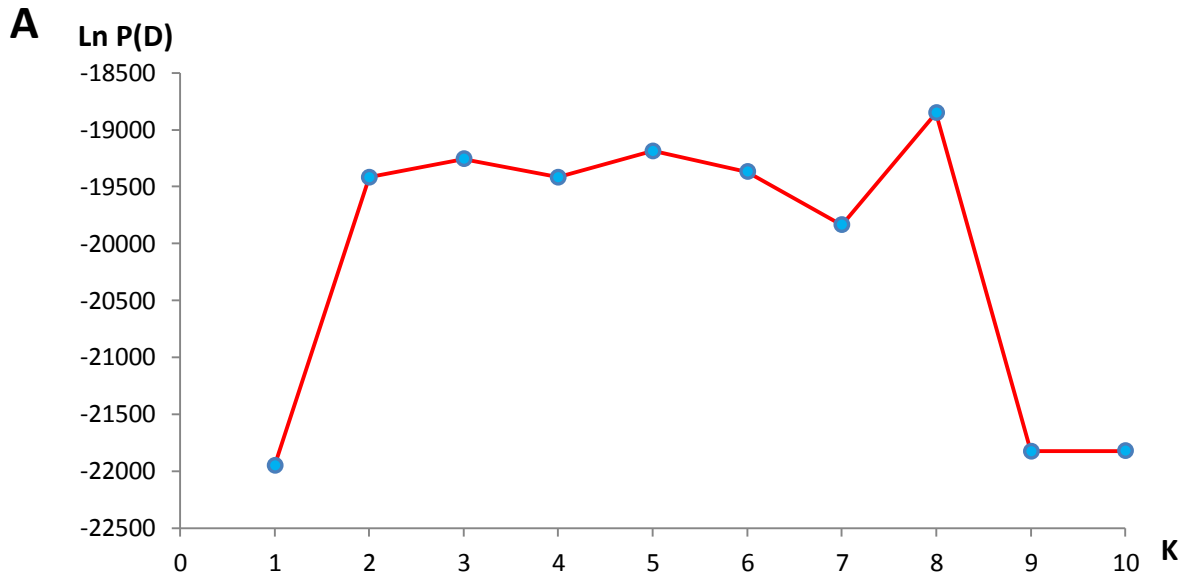
Yukarıdaki genel analizlerin yanısıra her bir populasyon ve bu populasyonun her bir bireyi ayrı ayrı değerlendirilerek detaylı analizler de yapılmıştır. PI 315484 aksasyon numaralı populasyona ait 4 no'lu birey, PI 299053 aksasyonuna ait 2 ve 3 no'lu bireyler, PI 442877 aksasyonuna ait 1, 2 ve 3 no'lu bireyler ile PI 502459 aksasyonuna ait 2, 3 ve 4 no'lu bireyler GRIN sistemi tarafından oluşturulan sınıflandırmada *sativa* alttürleri olarak ifade edilmiştir fakat populasyon yapılarını ve dinamiklerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen STRUCTURE analizi sonuçlarına göre bu bireylerin genom yüzdesi içerikleri bakımından *varia* alttürüne ait genom özellikleri gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 4.2.3).

USDA-GRIN sisteminde *varia* alttürü olarak sınıflandırılan PI502532 aksasyon numaralı populasyonun 2 ve 3 no'lu bireyleri, PI464801 aksasyonunun 2 no'lu bireyi, PI502514 ve PI502521 aksasyonlarının 2, 3 ve 4 no'lu bireyleri, PI476393 aksasyonunun 1 ve 3 no'lu bireyleri, PI503867 aksasyonunun 1, 2 ve 3 no'lu bireyleri, PI486202 aksasyonunun 1 ve 3 no'lu bireyleri, PI502529 aksasyonunun 3 ve 4 no'lu bireyleri, PI 502533 aksasyonunun 2, 3 ve 4 no'lu bireyleri, PI502540 aksasyonunun 1, 2 ve 3 no'lu bireyleri STRUCTURE analizi sonuçlarına göre genom yüzdesi içerikleri bakımından *sativa* alttürü özelliği göstermektedirler. Aynı şekilde PI464813 aksasyon numaralı populasyonun 4 no'lu bireyi de *falcata* alttürünün genom özelliğini göstermiştir (Şekil 4.2.3).

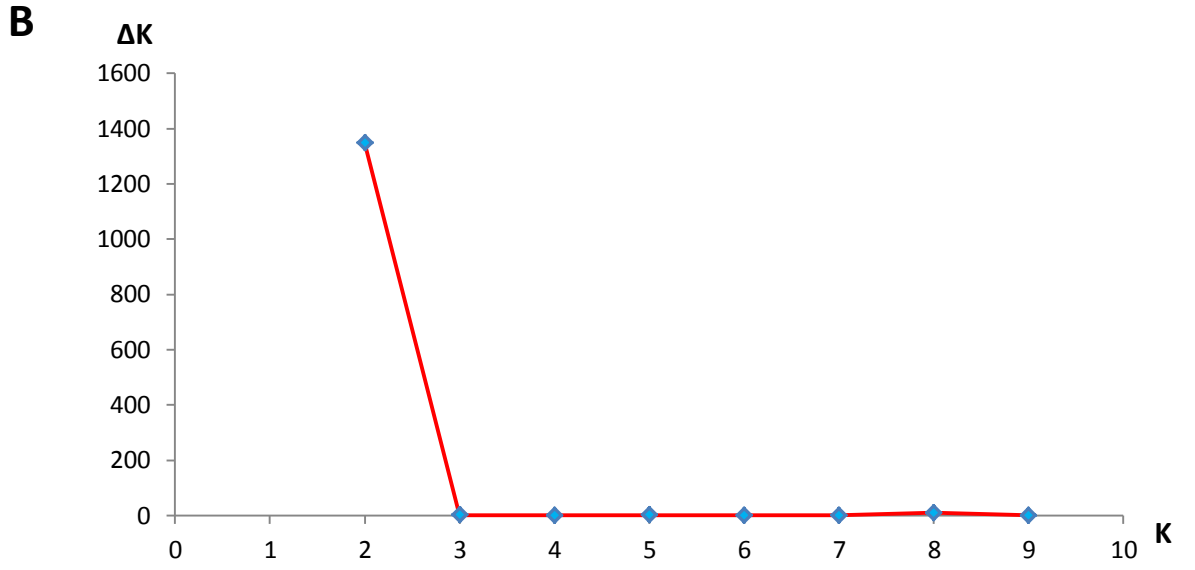
USDA-GRIN sisteminde *falcata* alttürüne dâhil edilen PI 222198 aksasyonun 1 ve 4 no'lu bireyleri STRUCTURE analizi neticesine göre genom yüzdesi bakımından *sativa* alttürüne daha yakın olarak ortaya çıkmıştır. Aynı şekilde PI 214218 aksasyon numaralı

populasyonun dört bireyinin tamamı, PI 538983 aksesyonunun 1, 2 ve 3 no'lu bireyleri, PI 222198 aksesyonuna ait 2 ve 3 no'lu bireyler, PI 631796 aksesyonuna ait 1 no'lu birey, PI 631859 aksesyonuna ait dört bireyin tamamı, PI 631585 aksesyonların ait 1, 2 ve 3 no'lu bireyler, PI 641381 ve PI 641383 aksesyonlarına ait 1 no'lu bireyler, PI 631579 aksesyonuna ait 1, 2 ve 4 no'lu bireyler, PI 631592 aksesyonuna ait 1 no'lu birey, PI 631582 ve PI 641400 aksesyonlarına ait 3 no'lu bireyler, PI 641581 aksesyonuna ait 1 no'lu birey ile PI 641599 aksesyonuna ait 3 no'lu birey GRIN sisteminde tetraploit *falcata* alttürleri olarak sınıflandırılmıştır fakat burada yapılan analiz sonuçlarına göre genom yüzdesi bakımından *varia* alttürüne daha yakın oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.2.3).

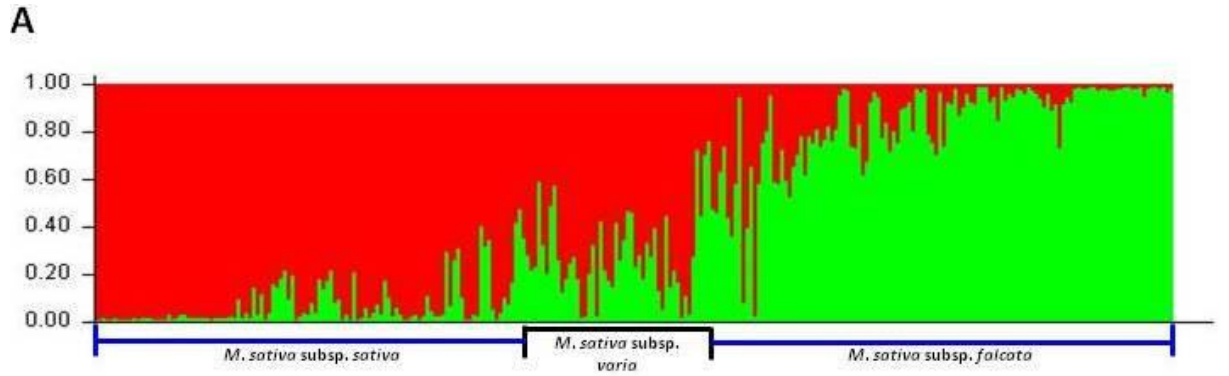
Elde ettiğimiz sonuçlar, genom kompozisyonları bakımından birbirinden kısmen ayrılan iki temel kümenin bulunduğunu göstermektedir. Bu iki genomun ayrışma sebepleri için alttür tanımlarına bakıldığında ise genel olarak bu grupların alttürler olan *sativa* ve tetraploit *falcata*'ya tekabül ettiği tespit edilmiştir. Bunun yanısıra onların melez alttürü olarak tanımlanan *varia* alttürüne dahil edilen populasyonların da genomunun beklenen şekilde melez özellik gösteren bireylerden oluştuğu saptanmıştır. Ancak hibrit *varia* genomunun her iki alttürün ikisinin orta bölgesinde daha çok *sativa* alttürlerinin genom yüzdesine önemsenecek derecede yakın bir şekilde ortaya çıkmıştır. (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.1 Optimal K değerinin belirlenmesi için (A) Pritchard ve arkadaşları (2000) tarafından tanımlanmış olan *ad hoc* prosedürüne göre elde edilen sonuç



Şekil 4.2.2 Optimal K değerinin belirlenmesi için (B) Evanno ve arkadaşları (2005) tarafından tanımlanmış olan (ΔK) prosedürüne göre elde edilen sonuç



Şekil 4.2.3 31 SSR markırı ile analiz edilmiş 280 bireysel genotip arasında Bayesian çıkarımı temelinde iki küme oluşturduğu tahmin edilen ($K=2$) tetraploit yonca popülasyonu STRUCTURE görüntüsü

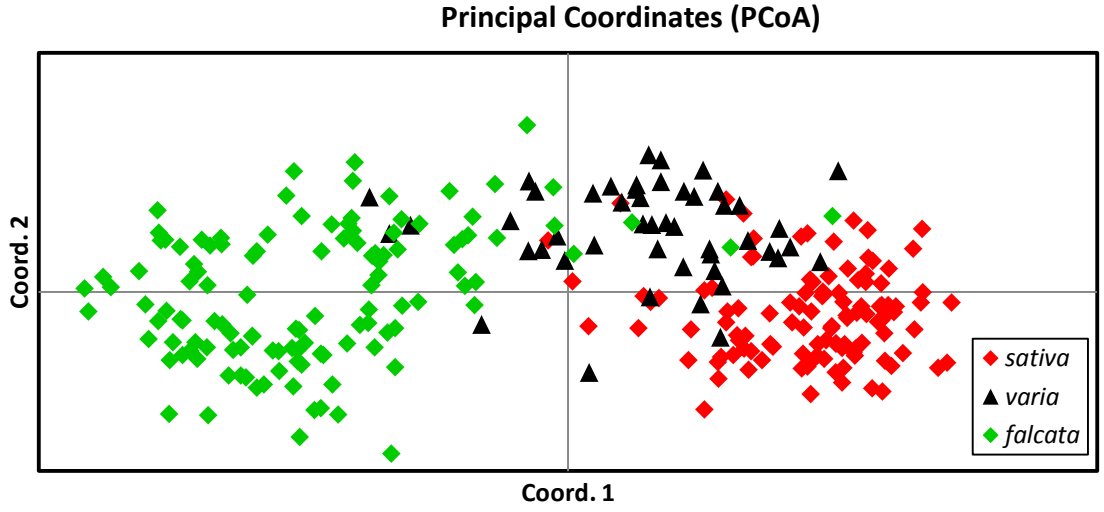
4.3 Ana Komponent Analizi (PCA)

STRUCTURE analizi sonuçlarını doğrulamak ve oluşan popülasyonların yapısını kanıtlamak amacıyla 280 tetraploit genotip için Ana Komponent Analizini (PCA) de gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için de *sativa*, *varia* ve tetraploit *falcata* alttürleri aynı şekilde kullanılarak ana komponent analizleri görselleştirilmiş ve her bir alttür tanınma kolaylığı için farklı renklerle kodlanmıştır. 280 tetraploit genotip arasındaki SSR varyasyonunun %56'sı PC1 tarafından, %11'i de PC2 tarafından açıklanmıştır (Şekil 4.3.1).

Elde edilen PCA sonuçları, STRUCTURE analizi tarafından elde edilen iki grubun (*sativa* ve tetraploit *falcata*) benzer şekilde 2 farklı küme şeklinde ayrıştığını göstermiştir. *Sativa* (kırmızı renkli grup) ve tetraploit *falcata* (yeşil renkli grup) alttürleri birbirinden oldukça bariz bir şekilde ayrışım göstermiştir fakat onların hibriti olan *varia* alttürüne ait bireylerden oluşan grup (siyah renkli grup) her iki grubun arasında daha çok *sativa* alttür grubuna yakın bir bölgede konumlanmıştır (Şekil 4.3.1).

PI 502459 aksesyon numaralı popülasyona ait 2, 3 no'lu bireyler GRIN tarafından oluşturulan alttür sınıflandırmasında *sativa* alttürleri olarak belirtilmiştir fakat gerçekleştirmiş olduğumuz PCA neticesinde bu bireylerin *varia* alttür bölgesinde konumlandığı belirlendi (Şekil 4.3.1). PI 208683 aksesyonuna ait 1 no'lu birey ve PI 464813 aksesyonuna ait 3 ve 4 no'lu bireyler sistemde *varia* alttürü olarak tanımlanmalarına rağmen tetraploit *falcata* alttür bölgesinde yer almışlardır. Sistemde *varia* olarak tanımlanan bireylerden çoğu bu analiz sonucunda ilginç bir şekilde *sativa* alttür bölgesi ile iç içe bir pozisyonda yer almıştır (Şekil 4.3.1).

PI 222198 aksesyon numaralı popülasyonun 1 no'lu bireyi ve PI 538983 numaralı aksesyonun 2 no'lu bireyi sistemde tetraploit *falcata* olarak belirtilmiştir fakat bu analiz neticesinde bu bireylerin *sativa* alttür bölgesinde yer aldığı görülmüştür. Aynı şekilde PI 222198 ve PI 538983 aksesyonlarına ait 2 no'lu bireyler sistemde tetraploit *falcata* bölgelerinde olarak sınıflandırılırken elde ettiğimiz analiz sonuçlarına göre *varia* alttür bölgesinde konumlanmıştır (Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.1. 31 SSR markırının kullanıldığı analizden elde edilen iki ana komponent temelinde tetraploit yonca populasyonlarına ait üç alttürün (*sativa*, *varia* ve tetraploit *falcata*) birbirinden ayrılması

4.4 Moleküler Filogenetik Analizler

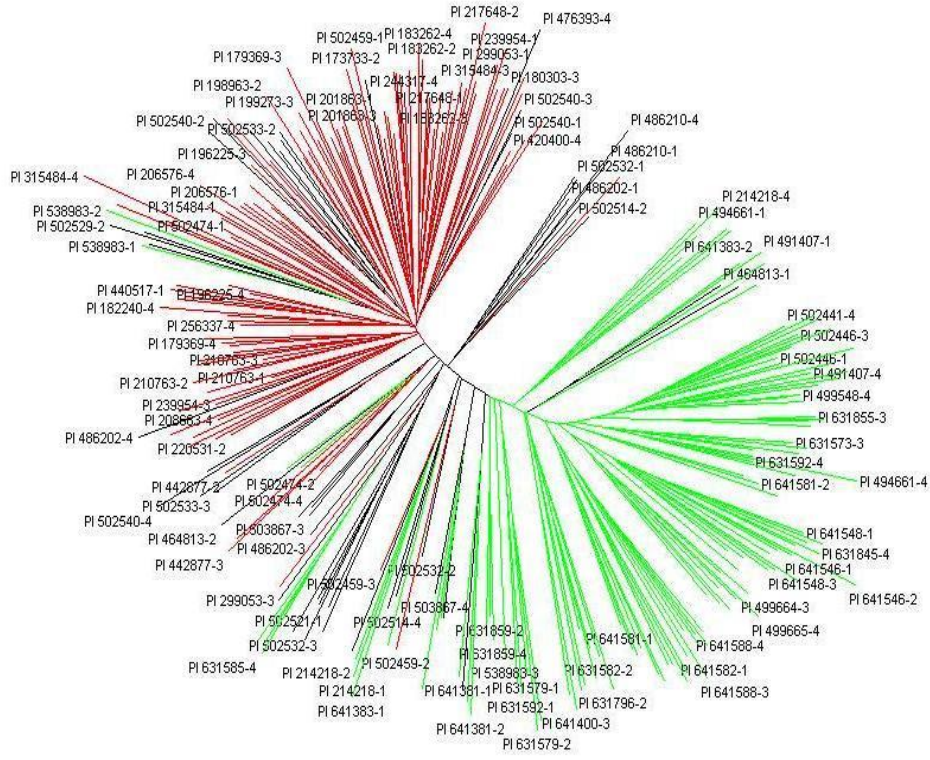
STRUCTURE ve Ana Komponent Analizinden elde edilmiş sonuçları teyit etmek ve 280 tetraploit genotipe ait moleküler ilişkileri belirlemek amacıyla moleküler filogenetik analiz gerçekleştirildi. Bu analiz için POWERMARKER V3.25 programı kullanıldı. Programdan elde edilen verileri kullanarak da hem 280 tetraploit bireyin bireysel bazda moleküler ilişkisi için (Şekil 4.4.1) hem de bu bireylere ait 70 adet aksesyonun populasyon düzeyinde moleküler ilişkisinin (Şekil 4.4.2). belirlenmesi için oluşturulan Neighbour-Joining ağacı DENDROSCOPE adlı programı kullanarak görselleştirilmiştir.

280 adet genotip için oluşturulan NJ ağacı analiz edildiğinde, ağacın sol bölgesinde kümelenen genotiplerin (kırmızı çizgiler) *sativa* alttürüne, sağ bölgesinde kümelenen genotiplerin (Yeşil çizgiler) ise tetraploit *falcata* alttürüne ait oldukları belirlendi. Her iki alttürün melezi olarak orta kısımda yer alan *varia* alttürüne ait genotiplerin (siyah çizgiler) özellikle *sativa* alttürü ile aynı kümeye dâhil edilebilecek kadar yakın bir derecede moleküler ilişki gösterdiği belirlenmiştir.

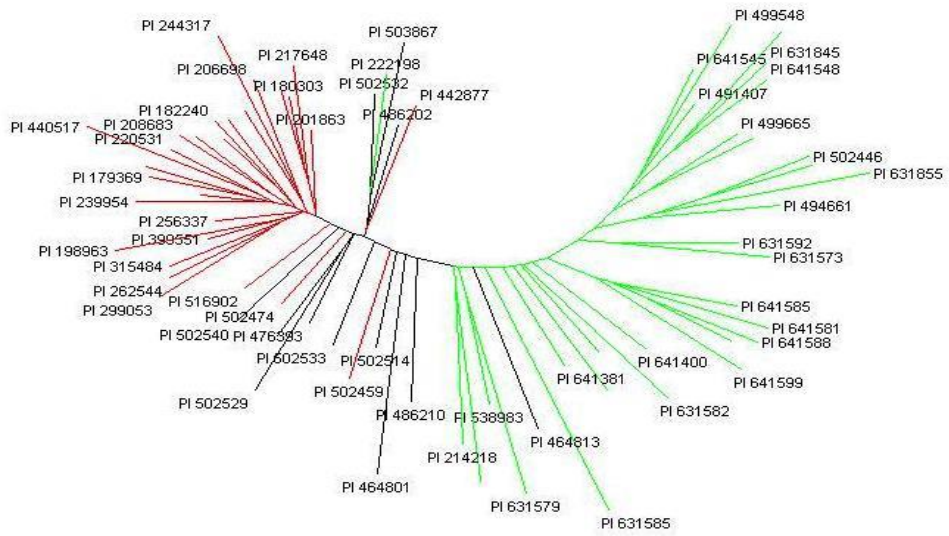
PI 299053 aksesyona numaralı populyasyona ait 3 no'lu birey, PI 442877 aksesyona ait 1, 2 ve 3 no'lu bireyler, PI 502474 ve PI 502459 aksesyona ait 2, 3 ve 4 no'lu bireyler GRIN sistemi tarafindan oluşturulan sınıflandırmada *sativa* alttürleri olarak ifade edilmiştir fakat filogenetik analiz sonuçlarına göre bu bireylerin *varia* alttür bölgesinde konumlandığı belirlenmiştir (Şekil 4.4.1).

PI 502514 aksesyona numaralı populyasyonun 3 no'lu bireyi, PI 502521 aksesyona ait 3 ve 4 no'lu bireyleri, PI 476393 aksesyona ait 2, 3 ve 4 no'lu bireyleri, PI 486202 aksesyona ait 4 no'lu bireyi, PI 502529 aksesyona ait dört bireyin tamamı, PI 502533 aksesyona ait 2 no'lu bireyi, PI 502540 aksesyona ait 1, 2 ve 3 no'lu bireyleri ile PI 464813 aksesyona ait 2 no'lu bireyi sistemde *varia* alttürüne dahil iken bu bireyler NJ analizi sonucunda *sativa* alttürüne yakın bölgede konumlanmıştır. Aynı şekilde PI 464813 aksesyona numaralı populyasyonun 1, 3 ve 4 no'lu bireyleri de sistemde *varia* alttür bölgesinde ifade edilirken NJ analiz sonuçlarımıza göre ilginç bir şekilde tetraploit *falcata* bölgesinde konumlanmıştır (Şekil 4.4.1).

PI 538983 aksesyona numaralı populyasyonun 1 ve 2 no'lu bireyleri GRIN sistemine göre yapılan sınıflandırmada tetraploit *falcata* alttürleri şeklinde ifade edilirken yapmış olduğumuz NJ analizi neticesinde *sativa* alttürüne ait kümelenmenin olduğu bölgede yer almıştır. Aynı şekilde PI 214218 aksesyona numaralı populyasyonun 1 ve 2 no'lu bireyleri, PI 538983 aksesyona ait 3 no'lu bireyi, PI 222198 aksesyona ait dört bireyin tamamı, PI 631796 aksesyona ait 1 no'lu birey, PI 631859 ve PI 631585 aksesyona ait tüm bireyler, PI 641381 aksesyona ait 1, 2 ve 3 no'lu bireyler ve PI 641383 aksesyona ait 1 no'lu birey sistemde tetraploit *falcata* alttürleri olarak belirtilmiştir fakat yapmış olduğumuz NJ analizi neticesinde *varia* alttür bölgesinde konumlanmıştır (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1 280 Tetraploit Bireyin Filogenetik İlişkininin NJ Ağacı



Şekil 4.4.2 70 Aksesyona Ait Filogenetik İlişkininin NJ Ağacı

4.5 Moleküler Varyans Analizi (AMOVA)

Var olan genetik varyasyonun 3 farklı tetraploit alttüre dağılımı için çeşitli kombinasyonlarla Moleküler Varyans Analizleri (AMOVA) gerçekleştirildi. Moleküler Varyans Analizleri için GenAlEx 6.1 adlı bilgisayar programı kullanıldı. Aksesyonlar içerisindeki varyansı hesaplayabilmek amacıyla AMOVA analizi için herbirinde 4'er tane birey bulunan 70 aksesyondan oluşan toplam 280 tetraploit genotip kullanıldı. AMOVA analizlerini gerçekleştirmek amacıyla 280 tetraploit bireyden oluşan alttürlerin 3 farklı kombinasyonu oluşturuldu. İlk olarak 3 alttürün birlikteliği şeklinde (*sativa*, *varia* ve tetraploit *falcata*), ikinci analizde alttür *varia*, genom olarak benzerlik gösterdiği *sativa* alttürü ile birleştirilerek *sativa* alttürü olarak değerlendirilerek 2 alttür şeklinde (*sativa* ve tetraploit *falcata*) ve son kombinasyon olarak ise alttür *varia*'nın tamamen çıkarılmasıyla yine 2 alttür şeklinde (*sativa* ve tetraploit *falcata*) bir düzenleme yapılmıştır.

Tetraploitlerin ilk kombinasyonunda 3 alttür tarafından açıklanan genetik varyans %19, aksesyonlar arasındaki genetik varyans %15 ve aksesyonlar içerisindeki genetik varyans ise %66 olarak (Çizelge 4.5.1) hesaplandı. İkinci analizde 2 alttür tarafından açıklanan toplam genetik varyans %21, aksesyonlar arasındaki %15 ve aksesyonlar içerisindeki ise %64 olarak (Çizelge 4.5.2) olarak hesaplandı. Son kombinasyonda ise aynı şekilde 2 alttür tarafından açıklanan toplam genetik varyans %25, aksesyonlar arasındaki %15 ve aksesyonlar içerisindeki ise %60 olarak (Çizelge 4.5.3) bulunmuştur.

Bir aksesyonun içerisindeki bireyler arasındaki genetik varyans, aksesyonların ve alttürlerin farklılaşması 280 tetraploit birey için istatistiksel açıdan yüksek derecede anlamlı ($P < 0.001$) bulunmuştur.

Toplam genetik varyanslara bakıldığında en yüksek toplam genetik varyansın *sativa* alttürü ile tetraploit *falcata* arasında (%25) olduğu görülmektedir. En düşük toplam genetik varyans ise 3 alttürün beraber analiz edildiği durumda (%19) ortaya çıkmıştır. Alttür sayısı arttığında alttürlerin açıkladığı genetik varyans azalmıştır. Populasyonlar arasındaki genetik varyans üçüncü kombinasyonda populasyon sayısı azalmasına rağmen her üç kombinasyon için aynı kalmıştır. Populasyonlar içerisindeki bireyler arasındaki genetik varyans ise en yüksek olarak 3 alttürün kullanıldığı ilk kombinasyonda (%66), en düşük olarak ise *varia* alttürünün çıkarıldığı üçüncü

kombinyonda (%60) bulunmuştur. Populasyon içerisindeki birey sayısının azalması populasyonlar içerisindeki genetik varyansı düşürmüştür.

Tetraploit populasyonlar içerisindeki bireyler arasındaki genetik varyasyon yüksekken alttürler arasındaki varyasyonlar daha düşük olarak bulunmuştur. Tetraploit populasyonlar arasındaki genetik varyasyonlar da yüksek olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.5.1 70 aksesyondan elde edilen 280 adet tetraploit genotipin üç farklı alttür (*sativa*, *varia* ve *falcata*) için Moleküler Varyans Analizi ve varyasyonun her bir kaynağına katkıda bulunan toplam genetik varyansın yüzdesi

Kaynak	df	SS	MS	Varyans İçeriği	Varyans Yüzdesi	Φ	P
Gruplar Arasında	2	1050.619	525.310	5.575	19%	0.194	0.001
Aksesyonlar Arasında	67	2408.506	35.948	4.247	15%	0.183	0.001
Aksesyonlar İçerisinde	210	3981.500	18.960	18.960	66%	0.341	0.001

Çizelge 4.5.2 70 aksesyondan elde edilen 280 adet tetraploit genotipin iki farklı alttür (*varia* alttürü ile birleştirilmiş *sativa* ve *falcata*) için Moleküler Varyans Analizi ve varyasyonun her bir kaynağına katkıda bulunan toplam genetik varyansın yüzdesi

Kaynak	df	SS	MS	Varyans İçeriği	Varyans Yüzdesi	ϕ	P
Gruplar Arasında	1	896.606	896.606	6.265	21%	0.210	0.001
Aksesyonlar Arasında	68	2543.319	37.402	4.611	15%	0.196	0.001
Aksesyonlar İçerisinde	210	3981.500	18.960	18.960	64%	0.365	0.001

Çizelge 4.5.3 58 aksesyondan elde edilen 232 adet tetraploit genotipin iki farklı alttür (*varia* alttürü çıkarılmış olarak *sativa* ve *falcata*) için Moleküler Varyans Analizi ve varyasyonun her bir kaynağına katkıda bulunan toplam genetik varyansın yüzdesi

Kaynak	df	SS	MS	Varyans İçeriği	Varyans Yüzdesi	ϕ	P
Gruplar Arasında	1	921.066	921.066	7.633	25%	0.249	0.001
Aksesyonlar Arasında	56	2057.214	36.736	4.554	15%	0.197	0.001
Aksesyonlar İçerisinde	17 4	3222.750	18.522	18.522	60%	0.397	0.001

4.6 Genetik Çeşitlilik Analizi

Çeşitlilik analizleri kapsamında 280 tetraploit genotipin Φ_{PT} değerlerini incelediğimizde bu değerlerin 3 alttür için (*sativa*, *varia* ve tetraploit *falcata*) 0.0076'dan (*sativa* ve *varia*) 0.314'e (*sativa* ve tetraploit *falcata* arasında) (Çizelge 4.6.1) kadar sıralandığını görmekteyiz. Herbir Φ_{PT} çifti değerleri 9999'luk rastgele permütasyonlar temelinde gerçekleştirilen testlere göre 0'dan önemli derecede farklılaşmıştır.

Bu sonuçlar genetik çeşitlilik ve farklılaşmanın *sativa* ile *falcata* arasında en fazla olduğunu, çeşitlilik ve farklılaşmanın *sativa* ile *varia* arasında en az olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.6.1 280 adet tetraploit genotip için STRUCTURE analizi temelinde belirlenmiş üç alttürün (*sativa*, *varia* ve tetraploit *falcata*) çiftli Φ_{PT} değerleri

Group	<i>Sativa</i>	<i>Varia</i>
<i>Varia</i>	0.076	
Tetraploit <i>Falcata</i>	0.314	0.156

^aTüm Φ_{PT} değerleri P=0.0001'de önemlidir

Çalışmamızın kapsamında 280 tetraploit genotipe ait genetik çeşitliliği hesaplamak amacıyla, Allel Frekansı, Majör Allel Frekansı, Gen çeşitliliği ve Polimorfik Bilgi İçeriği gibi değişik genetik çeşitlilik parametreleri içeren analizler gerçekleştirildi. Bu analizler için 280 tetraploit genotipe sahip olan 3 alttürün AMOVA analizine benzer şekilde 3 farklı kombinasyonu için değerlendirilmesi yapıldı. İlk kombinasyonda (*sativa*, *varia* and tetraploit *falcata* alttürlerinin bulunduğu) tüm genotipler için herbir SSR lokusundaki allellerin total miktarı 34.5'lük bir ortalama ile 5'den 93.6'ya kadar sıralanmıştır. *Sativa* alttürüne ait allel frekansı 37.1'lik bir ortalama ile tıpkı majör allel frekansında olduğu gibi (0.79'lük ortalama ile) *varia* ve tetraploit *falcata* alttüründen daha yüksek çıkmıştır. Gen çeşitliliği beklenen heterozigotinin yansıması olarak bilinmektedir ve bu analiz neticesinde total gen çeşitliliği 0.10'dan 0.50'ye 0.35'lik bir ortalama ile sıralanmıştır. En yüksek gen çeşitliliğine sahip alttür ise 0.32'lik bir ortalama ile tetraploit *falcata* alttürü bulunmuştur. Tüm genotiplerin ortalama polimorfik bilgi içeriğine baktığımızda yine tetraploit *falcata* alttüründe 0.28'lik bir ortalama ile *sativa* ve *varia* alttüründen daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6.2). İkinci kombinasyonda (*varia* ile birleştirilmiş *sativa* ve tetraploit *falcata* alttürü) total allel frekansı, majör allel frekansı, gen çeşitliliği ve polimorfik bilgi içeriğinin ortalama sayıları bir önceki analizde elde edilen ortalamalar ile aynı olarak bulunmuştur fakat *sativa* alttürüne *varia* alttürü eklenmesi sonucu *sativa* olarak kabul edilen alttürün allel frekansının (36.6'lık bir ortalama ile) ve majör allel frekansının (0.78'lik bir ortalama ile) ortalamaları tetraploit *falcata* alttüründen daha yüksek olmasına rağmen 0.30'lük bir ortalama ile daha düşük olarak bulunmuştur. Tüm genotiplere ait ortalama polimorfik bilgi içeriği ise tetraploit *falcata* alttüründe 0.28'lik bir ortalama ile *varia* ile birleştirilen *sativa* alttüründen daha yüksek olarak ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.6.3). Son kombinasyon (*varia* alttürünün çıkarılması sonucu *sativa* ve tetraploit *falcata* alttürleri ile) için yapılan analiz sonuçlarına baktığımızda ise total ortalama allel frekanslarının önceki iki kombinasyona göre değişen ortalamalar ile 6.00'dan 93.5'e kadar sıralanarak 34.2'lik bir ortalama ile azaldığı gözlenmiştir. *Sativa* alttüründe hem allel frekansı hem de majör allel frekansı için önceki sonuçları doğrulayacak şekilde tetraploit *falcata*'dan daha büyük olduğunu ortaya konmuştur. Majör allel frekansı da allel frekansı gibi azalmıştır. Gen çeşitliliği ve polimorfik bilgi

içeriklerinin ortalama değerlerinin ise önceki iki kombinasyonda elde edilen ortalamalar ile aynı olduğu söylenebilir (Çizelge 4.6.4).

Sonuç olarak tetraploitlerde gerek allel frekansı (34.5), gen çeşitliliği (0.35) ve gerekse polimorfik bilgi içeriklerinin (0.28) yüksek düzeyde oluşu, genetik çeşitliliğin tetraploit *M. sativa-falcata* kompleksinde oldukça yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir. Ayrıca alttürler arasında en fazla farklılaşmanın Φ PT analizinde olduğu gibi *sativa* alttürü ile tetraploit *falcata* alttürü arasında olması bu iki genetik kaynağın allel çeşitliliği bakımından farklılaştığı ve bitki ıslahında oldukça değerli olduklarını göstermektedir. Bunun neticesinde aynı ploidi seviyesinde yer alan türler arasındaki farklılaşma yüksek düzeyde olabilmektedir.

Çizelge 4.6.2 Üç alttürün (*sativa*, *falcata* ve *varia*) 280 adet bireysel genotipi için 31 SSR lokusu temelinde aralıkları ile birlikte (parantez içerisinde) çeşitlilik istatistikleri

Parametre	Tamamı	<i>M. sativa</i> subsp. <i>sativa</i>	<i>M. sativa</i> subsp. <i>varia</i>	<i>M. sativa</i> subsp. <i>falcata</i>
Birey Sayısı	280	112	48	120
Allel Frekansı	34.5 (5.00-93.6)	37.1 (0.00-100.0)	35.5 (0.00-97.9)	31.6 (0.00-94.1)
Majör Allel Frekansı	0.74 (0.95-0.51)	0.79 (0.51-1.00)	0.77 (0.50-1.00)	0.77 (0.51-1.00)
Gen Çeşitliliği	0.35 (0.10-0.50)	0.28 (0.00-0.50)	0.31 (0.00-0.50)	0.32 (0.00-0.50)
Polimorfik Bilgi İçeriği	0.28 (0.09-0.37)	0.23 (0.00-0.37)	0.25 (0.00-0.38)	0.26 (0.00-0.37)

Çizelge 4.6.3 İki alttürün (*varia* ile birleştirilmiş *sativa* ve tetraploit *falcata*) 280 adet bireysel genotipi için 31 SSR lokusu temelinde aralıkları ile birlikte (parantez içerisinde) çeşitlilik istatistikleri

Parametre	Tamamı	<i>M. sativa</i> subsp. <i>sativa</i> (ve <i>varia</i>)	<i>M. sativa</i> subsp. <i>falcata</i>
Birey Sayısı	280	160	120
Allel Frekansı	34.5 (5.00-93.6)	36.6 (0.00-99.4)	31.6 (0.00-94.1)
Büyük Allel Frekansı	0.74 (0.95-0.51)	0.78 (0.50-1.00)	0.77 (0.50-1.00)
Gen Çeşitliliği	0.35 (0.10-0.50)	0.30 (0.00-0.50)	0.32 (0.00-0.50)
Polimorfik Bilgi İçeriği	0.28 (0.09-0.37)	0.24 (0.00-0.38)	0.26 (0.00-0.37)

Çizelge 4.6.4 İki alttürün (*varia* alttürü çıkarılmış olarak *sativa* ve tetraploit *falcata*) 232 adet bireysel genotipi için 31 SSR lokusu temelinde aralıkları ile birlikte (parantez içerisinde) çeşitlilik istatistikleri

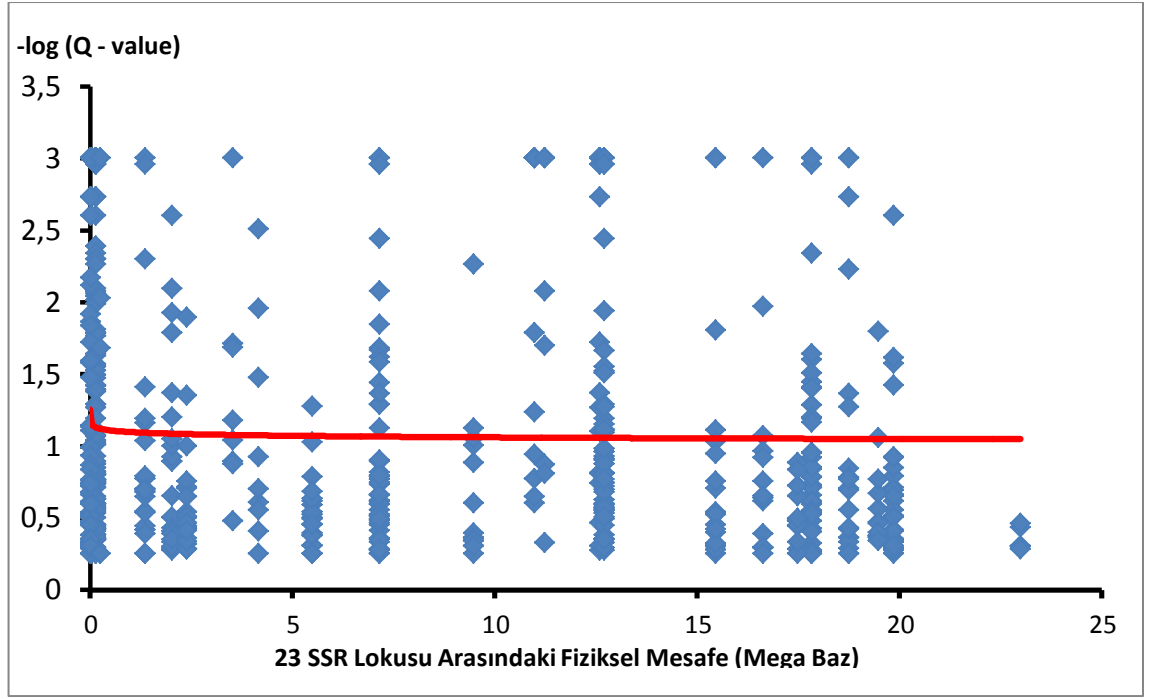
Parametre	Tamamı	<i>M. sativa</i> subsp. <i>sativa</i>	<i>M. sativa</i> subsp. <i>falcata</i>
Birey Sayısı	232	112	120
Allel Frekansı	34.2 (6.00-93.5)	37.1 (0.00-100.0)	31.6 (0.00-94.1)
Büyük Allel Frekansı	0.73 (0.51-0.94)	0.79 (0.51-1.00)	0.77 (0.50-1.00)
Gen Çeşitliliği	0.35 (0.11-0.50)	0.28 (0.00-0.50)	0.32 (0.00-0.50)
Polimorfik Bilgi İçeriği	0.28 (0.11-0.37)	0.23 (0.00-0.37)	0.260.00-0.37)

4.7 Linkage Eşitsizliği (LD) Analizi

SSR markırlarının her birinin bir diğerine göre bağlantı eşitsizliğinin analizleri için var yok eksenli skorlamadan dolayı ancak allel testleri gerçekleştirilebilmiştir. Analizlerde markırların kromozom üzerindeki lokasyonları için *M. truncatula* genetik haritası kullanılmıştır. Buna göre aw774443 ve AW981317 markırları 1. kromozomda yer alarak Linkage 1 grubunu, AW691788, aw586158, B21E13 markırları 2. kromozomda yer alarak Linkage 2 grubunu, aw690263, AW776398, aw691701, AW980858 markırları 3. kromozomda yer alarak Linkage 3 grubunu, aw688546, al367160, aw559239, bg448975 markırları 4. kromozomda yer alarak Linkage 4 grubunu, BE317308, AW689203, AW695900 markırları 5. kromozomda yer alarak Linkage 5 grubunu, AW686906, AW694962, afct45 markırları 7. kromozomda yer alarak Linkage 7 grubunu ve aa660573, aw695813, bg647796 markırları da 8. kromozomda yer alarak Linkage 8 grubunu oluşturmuştur. 6. kromozomda sadece mtic14 markırı yer aldığı için bu kromozom için LD hesaplaması yapılamamıştır.

Sonuç olarak, 103 lokustan oluşan 23 markırın *M. truncatula*'nın 8 kromozomu üzerindeki fiziksel mesafeleri belirlenmiş ve LD analizi gerçekleştirilmiştir. LD analizi sonrası elde edilen P değerleri daha kolay görselleştirme için $-\log(P)$ değerleri şeklinde dönüştürülmüştür. Sonrasında ise Q değerleri olarak alındığı için $-\log(Q)$ değerleri şeklinde

almıştır. Elde edilen P değerinin 0.0001 ya da daha düşük olduğu durumda [$-\log(Q \text{ değeri}) \geq 3$] logaritmik Q değerleri ile bu markırların kromozomlar üzerindeki mega baz boyutundaki fiziksel mesafeleri karşılaştırıldığında bu tetraploit aksesyonlarda önemli derecede ($p < 0,0001$) LD'nin olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil. 4.7.1).



Şekil 4.7.1 70 Tetraploit yonca aksesyonuna ait 280 bireyde, *M. truncatula* genom dizisi temelinde, Megabazlık fiziksel mesafelerine göre tüm kromozomlardaki SSR lokusları arasındaki linkage eşitsizliği ($-\log(Q \text{ value})$) plotu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada oldukça yaygın bir alanda yetiştirilen yonca (*M. sativa* L.) bitkisi, *Medicago* cinsi içerisinde yer alan önemli bir baklagil yem bitkisidir[19]. Yüksek verim ve yem kalitesi ile birlikte farklı coğrafyalara adapte olabilme yeteneğine sahiptir[20]. Kültür yoncası, tetrasomik kalıtım ($2n = 4x = 32$) gösteren bir tetraploit olup ve zaman içerisinde *M. sativa* tür kompleksinden ıslah yoluyla elde edilmiştir[4]. Kompleks bir sistematik grup olan *Medicago sativa-falcata* tür kompleksi adlı bir taksonomik grup olup ploidi seviyesi bakımından farklılık gösteren diploit ve tetraploit alt taksonomik birimlerden oluşmaktadır. Komplekse dâhil olan sistematik birimler arasında herhangi bir üreme engeli bulunmamaktadır ve farklı ploidi düzeyleri arasında bile gen akışı olmaktadır. Bu çalışmada alttür *varia* ile alttür *sativa* arasında farklılaşmanın oldukça sınırlı olması da gen akışının yoğun olarak gerçekleştiği anlamına gelmektedir.

M. sativa-falcata kompleksindeki taksonun türler ya da alttürler olarak sınıflandırılması tartışmalıdır[3, 4, 92, 93]. Sinskaya[92] *caerulea*, *hemicycla*, *falcata* ve *sativa*'yı türler olarak göstermiş ve onları, türlerin bir anahtarı olarak diğer taksonun bir kısmı ile birlikte düşünmüştür. Sinskaya[92] aynı ploidi düzeyi içindeki takson'un birbiri ile daha yakın ilişkili olduğunu varsayarak ploidi temelinde takson'yı ilk kez bölümlere ayırmıştır. Lesins ve Lesins[3], *falcata* ve *sativa*'yı *Medicago*'nun farklı türleri olarak sınıflandırmış, aynı zamanda *hemicycla* ve *caerulea*'yı alttür düzeyine indirgemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, *falcata* ve *sativa*'nın bariz morfolojiksel farklılıkları olmasına rağmen *falcata* ve *sativa* arasında hibridizasyon engellerinin olmadığını da not etmişlerdir. Çok yakın geçmişte, bu takson'un tamamına *M. sativa-falcata* kompleksi[4] içerisinde alttür statüsü verilmiştir ve bu adlandırma NPGS (National Plant Germplasm System) tarafından kabul edilmiş ve GRIN'de kullanılmıştır. Kompleksin içerisinde yer alan alttürleri ve bunlar arasındaki ilişkileri belirlemek amacıyla özellikle son yıllarda geliştirilen moleküler teknikler ve markırlar aracılığıyla alttürlerin populasyon yapıları, genetik çeşitlilikleri ve moleküler sınıflandırmaları hakkında bilgiler elde edilmektedir[5, 94].

Çalışmamızın ilk basamağını oluşturan morfolojik analizlerden elde ettiğimiz sonuçlar, tetraploit genotiplerin genellikle GRIN-USDA sistemde tanımlanan alttürler ile bazı istisnalar dışında genelde aynı morfolojiye sahip alttürler olduğunu göstermiştir. Bu

sonuçların, Şakiroğlu[5] tarafından yapılan morfoloji çalışması ile paralel sonuçlar gösterdiğini görmekteyiz. Tetraploit populasyonların genetik yapılarına göre ayrılarak alttürlerin ve onların arasındaki ilişkilerin belirlenmesi için gerçekleştirdiğimiz STRUCTURE analizi, tetraploit düzeyde bir ayrışmanın olduğunu ve özellikle alttür *falcata* ve alttür *sativa*'nın bu anlamda alttür kabul edilebilecek kadar farklılaştığını göstermektedir. Alttür *varia*'nın melezlik durumu ve alttür *falcata* ile alttür *sativa* arasında görülen geçişler üreme engellerinin tam olarak oluşmadığı dolayısıyla bu birimlerin tür olarak kabul edilemeyeceğini göstermektedir.

Bunun yanısıra onların melez alttürü olarak gösterilebilecek *varia* genomuna ait hibrit sinyalleri veren bireylerin de mevcut olduğunu çalışmamızın kapsamında tespit ettik. Hibrit *varia* genomu ise her iki alttürün arasında daha çok *sativa* alttürlerinin genom yüzdesine önemsenecek derecede yakın bir şekilde üçüncü alttür olarak ortaya çıkmıştır. STRUCTURE analiz sonuçlarını doğrulamak ve oluşan populasyonların yapısını kanıtlamak amacıyla gerçekleştirdiğimiz Ana Komponent Analizi (PCA) de elde edilen iki alttürün (*sativa* ve tetraploit *falcata*) onların melezi olan *varia* ile birlikte 3 farklı küme şeklinde ayrıştığını göstermiştir. Alttür *sativa* ve alttür *falcata* arasındaki ayrışım oldukça barizdir fakat alttür *varia*'nın her iki grubun arasında daha çok *sativa* alttür grubuna yakın bir bölgede konumlandığı görülmüştür. Bu durum ise STRUCTURE analiz sonuçlarını doğrulamıştır. Populasyon yapısını ve alttürlerin kompleks içerisindeki pozisyonlarını belirlemeye çalıştığımız son analizde ise, SSR markırlarını kullanarak alttürler arasındaki moleküler ilişkiler belirlendi. Bu amaçla alttürlerin SSR dizilerine göre mesafe temelli Neighbour Joining (NJ) ağacı oluşturduk. NJ analiz sonuçları hem STRUCTURE hem de Ana Komponent Analiz (PCA) sonuçlarını destekler niteliktedir. Temel olarak, *sativa* ve tetraploit *falcata* şeklinde, genom kompozisyonları bakımından birbirinden ayrılan iki esas alttürün olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, Şakiroğlu[5], Havananda ve arkadaşları[6] tarafından eşzamanlı olarak gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları ile uyumluluk göstermiştir fakat 89 SSR markırı ile ayrılan diploit alttürlerde melez alttür *hemicycla*'nın yanı sıra coğrafik dağılımlara ve ekocoğrafik yapıya göre ikiye ayrılan *falcata* ve *cerulea* alttür genomları belirlenmiştir[5]. Diploitlerde daha kesin ayrımlar görülmesine rağmen aynı ayrımların tetraploit birimlerde görülmemesi iki şekilde açıklanabilir: daha önceki çalışmalarda daha yüksek sayıda markır kullanılmıştır ve diploitlikten dolayı markırlar

biallelik olarak skorlanmıştır. Dolayısıyla markırların sunabileceği tüm bilgiden faydalanılmıştır. Ancak bu çalışmada 31 markır kullanılmıştır ve tetraploit materyalden dolayı skorlama binary olarak yapılmak zorunda kalmıştır ve moleküler markırlar tam ayrışmaları tespit edememiş olabilir. Bu olasılığın yanında daha güçlü olasılık ise tetraploitlerin antropojenik etkiler sayesinde sürekli yer değiştirilerek genetik homojenizasyona sebebiyet vermiş olabilir. Yukardaki her iki olasılığın hangisinin bu farka sebep olduğunu anlamak sekans verilerinin diploit ve tetraploit birimlere aynı anda uygulanabilmesi ile mümkündür ve oldukça ilginç bir çalışma konusu olacaktır.

Tetraploit birimler arasında görülen genetik varyansın kaynaklarını analiz için gerçekleştirilen Moleküler Varyans Analizinde (AMOVA) genetik varyansın çoğu bir aksiyonun içerisindeki bireyler arasında olmasına rağmen aksiyonların ve alttürlerin farklılaşması 280 tetraploit birey için yüksek derecede önemli ($P < 0.001$) olarak belirlenmiştir. Toplam genetik varyanslara bakıldığında en yüksek toplam genetik varyansın *sativa* alttürü ile tetraploit *falcata* arasında (%25) olduğu görülmektedir. En düşük toplam genetik varyans ise 3 alttürün beraber analiz edildiği durumda (%19) ortaya çıkmıştır. Alttür sayısı arttığında toplam genetik varyans azalmıştır. Populasyonlar arasındaki genetik varyans üçüncü kombinasyonda populasyon sayısı azalmasına rağmen her üç kombinasyon için aynı kalmıştır. Populasyonlar içerisindeki bireyler arasındaki genetik varyans ise en yüksek olarak 3 alttürün kullanıldığı ilk kombinasyonda (%66), en düşük olarak ise *varia* alttürünün çıkarıldığı üçüncü kombinasyonda (%60) bulunmuştur. Populasyon içerisindeki birey sayısının azalması populasyonlar içerisindeki genetik varyansı düşürmüştür. Tetraploit populasyonlar içerisindeki bireyler arasındaki genetik varyasyon yüksek iken alttürler arasındaki varyasyonlar daha düşük olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar daha önce gerçekleştirilen benzer çalışmalardaki sonuçlarla örtüşmektedir[5, 66, 68]. Türler arası eşleşen pek çok bitki türü populasyon içi genetik varyasyonun büyük bir miktarını göstermektedir ve kültive edilmiş yonca istisna değildir[61].

Alttürler arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek amacıyla gerçekleştirdiğimiz çeşitlilik analizleri kapsamında, 280 tetraploit genotipe ait Φ_{PT} değerlerini inceledik. Bu değerlerin 3 alttür için (*sativa*, *varia* and tetraploit *falcata*) 0.000'dan (*sativa* ve *sativa*, *varia* ve *varia*, tetraploit *falcata* ve tetraploit *falcata* arasında) 0.314'e (*sativa* ve

tetraploit *falcata* arasında) (Çizelge 4.6.1) kadar sıralandığını gördük. Herbir Φ PT çifti değerleri 9.999'luk rastgele permütasyonlar temelinde gerçekleştirilen testlere göre 0'dan önemli derecede farklılaşmıştır. Bu sonuçlar genetik çeşitlilik ve farklılaşmanın *sativa* ile tetraploit *falcata* arasında en fazla olduğunu, çeşitlilik ve farklılaşmanın aynı ploidi düzeyi içerisinde ve aynı alttürler arasında en az olduğunu göstermektedir. Konuyla ilgili diğer çalışmalarda da benzer sonuçların elde edildiğini görmekteyiz[5, 46, 61]. Mitokondrial DNA varyasyonu[43] temelinde *falcata* ve *caerulea* ya da *sativa* arasında kısmen farklılaşmanın olduğu belirtilmiştir. Muller ve arkadaşları[43] pek çok aksesyonu tetraploit olarak değerlendirmesine rağmen onların elde ettikleri sonuçlar alttürler arasında gen akışının meydana geldiğini ve bu çalışmadan elde edilen sonuçların açıklama ile uyumlu olduğunu göstermektedir. İspanya'dan elde edilen bir 12 setlik yabancı ve kültive edilmiş *M. sativa* populasyonlarında Jenczewski ve arkadaşları[59] izozimler ile 0.0490'lık bir F_{ST} bulmuşlardır. Bu değer bu çalışmadan elde edilen sonuçtan daha düşüktür.

Çalışma kapsamında analiz edilen bir diğer veri ise temel moleküler populyasyon genetiği parametrelerinin karşılaştırmasıdır. Sonuç olarak tetraploitlerde gerek allel frekansı (34.5), gen çeşitliliği (0.35) ve gerekse polimorfik bilgi içeriklerinin (0.28) yüksek düzeyde oluşu, genetik çeşitliliğin tetraploit *M. sativa-falcata* kompleksinde oldukça yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçları diploit sonuçlarla[5] kıyasladığımızda tetraploitlerdeki allel frekansının, gen çeşitliliğinin ve polimorfik bilgi içeriğinin diploitlere göre fazla olduklarını görmekteyiz. Bu durum ise tetraploit gen havuzunun daha yüksek çeşitlilikte allel içerdiğini ve bu çeşitliliğin kompleksin genetik çeşitliliğini artırarak yoncanın gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın son basamağında ise tetraploit yoncada SSR lokuslarını kullanarak Linkage Eşitsizliği (Linkage Disequilibrium)'ni değerlendirmek amacıyla LD analizi gerçekleştirdik. 103 lokustan oluşan 23 markırın kullanıldığı analizde, *M. truncatula*'nın 8 kromozomu üzerindeki fiziksel mesafeler belirlenmiş ve LD analizi gerçekleştirilmiştir. Logaritmik Q değerleri ile bu markırların kromozomlar üzerindeki Mega baz çifti boyutundaki fiziksel mesafeleri karşılaştırıldığında bu tetraploit aksesyonlarda önemli derecede ($p < 0,001$) LD'nin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma kapsamında, tüm genomu kapsayan moleküler SSR markırları kullanılarak *M. sativa-falcata* kompleksi'nin tetraploit üyelerinin taksonomik konumları anlamlandırılmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, komplekste tetraploitlerin yanı sıra, bunların diploitlerle olan ilişkilerinin de aydınlatılmasında önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Daha önce yoncada tanımlanmış olan SSR markırlarının, yonca ve diğer canlılar için genetik çeşitlilik ve beraberinde ıslah çalışmalarında, populasyon dinamiği ve moleküler genetik çalışmalarında oldukça kullanışlı araçlar oldukları görülmüştür. Hem ekonomik değerinden hem de model bir kompleks olan *M. sativa-falcata* tür kompleks birimlerinin moleküler sınıflandırmasının yapılması bilimsel açıdan oldukça önemlidir. Tetraploitlerde genetik çeşitliliğin saptanması ve bu çeşitliliğin varyete ve alttür düzeylerindeki dağılımının bilinmesi bitki genetik kaynaklarının yonca geliştirmede ıslahçılar tarafından daha etkin kullanılmasının önünü açacaktır. Ülkemizde, yonca genetik kaynaklarının oluşturulması ve kullanılması açısından bu çalışmanın önemli bir referans olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] http://en.wikipedia.org/wiki/Species_complex (Erişim tarihi: Aralık 2013).
- [2] Hanson, A. A., Barnes, D. K. ve Hill, JR., ‘‘Alfalfa and Alfalfa Improvement’’, ISBN: 0-89118-094-X, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA, 1988.
- [3] Lesins, K.A. ve Lesins, I., 1979. Genus *Medicago* (Fabaceae), A taxogenetic study. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- [4] Quiros, C.F. ve Bauchan, G. R., 1988. The Genus *Medicago* and the Origin of the *Medicago sativa* Complex, 93-124.
- [5] şakiroğlu, M., Doyle, J.J. ve Brummer, E.C., 2010. Inferring Population Structure and Genetic Diversity of Broad Range of Wild Diploid Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Accessions Using SSR Markers. Theor. and Appl. Genet. 121(3): 403-415.
- [6] Havananda, T., Brummer, E.C., Maureira-Butler, I.J. ve Doyle. J.J., 2010. Relationships among Diploid Members of the *Medicago sativa* (Fabaceae) Species Complex Based on Chloroplast and Mitochondrial DNA Sequences. Systematic Botany. 35(1): 140-150. (2010).
- [7] Havananda, T., Brummer, E.C. ve J.J. Doyle., 2011. Complex Patterns of Autopolyploid Evaluation in Alfalfa and Allies (*Medicago sativa*; Leguminosae). American Journal of Botany. 98 (10): 1633-1646.
- [8] Michaud, R., Lehman, W. F. ve Rumbaugh, M. D., 1988. World distribution ve historical development. In A. A. Hanson[ed.], D. K. Barnes ve R. R. Hill Jr.[co-eds.], Alfalfa ve alfalfa improvement, Agronomy monograph 29, 93 – 124. American Society of Agronomy, Crop Science Society of Agronomy, ve Soil Science Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
- [9] Frame, J., Charlton, J.F.L. ve Laidlaw, A.S., 1997. Temperate forage legumes. CAB International, Wallingford, UK.
- [10] Russelle, M.P., 2001. Alfalfa: After an 8,000-year journey, the ‘‘Queen of forage’’ stands poised to enjoy renewed popularity. American Scientist, 89: 252-261.

- [11] Tanksley, S.D. ve McCouch, S.R., 1997. Seed Banks and Molecular Maps: Unlocking Genetic Potential from the Wild. *Science*, 277 (5329): 1063-1066.
- [12] Masterson, J., 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidi in majority of angiosperms. *Science*, 264: 421.
- [13] Jiao, Y., Wickett, N. J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A.S., Landherr, L., Ralph, P. E., Tomsho, L.P., et. al., 2011. Ancestral Polyploid in seed plants and angiosperms. *Nature*, 473: 97-100.
- [14] Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B. ve Rieseberg, L. H., 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106: 13875-13879.
- [15] Soltis, P.S. ve Soltis, D. E., 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 7051-7057.
- [16] Soltis, D.E., Soltis, P.S. ve Tate, J.A., 2004. Advances in the study of polyploid since Plant Speciation. *New Phytologist*, 161: 173-191.
- [17] Soltis, D.E., Soltis, P.S., Schemske, D.W., Hancock, J.F., Thompson, J.N., Husband, B.C. ve Judd, W.S., 2007. Autopolyploidi in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? *Taxon*, 56: 13-30.
- [18] Parisod, C., Holderegger, R. ve Brochmann, C., 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidi. *New Phytologist*, 186: 5-17.
- [19] Kır, B. ve Soya., H., 2008. Kimi Mer'a Tipi Yonca Çeşitlerinin Bazı Verim ve Kalite Özellikleri Üzerinde Bir Araştırma. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 45 (1): 11-19.
- [20] Conner J. K., 2002. Genetic Mechanisms of Floral Trait Correlations in A Natural Population, *Nature* 420, 407-410
- [21] Birouk, A. ve Datter, Y., 1989. Organisation de la variabilite enzymatique des populations marocaines de luzerne (*Medicago sativa* L.): structures geniques et genotypiques. *Genome* 32, 120-128.

- [22] Riday, H. ve Brummer, E.C., 2002. Heterosis of agronomic traits in alfalfa. *Crop Science* 42: 1081-1087.
- [23] Wahlstrom, R. ve Laane, M.M., 1979. Polyploidi. *Naturen (Norway)*, 103 (4): 217-224.
- [24] Ancev, M., 2006. Polyploidy and hybridization in Bulgarian Brassicaceae: distribution and evolutionary role. *Phytologia Balcanica*, 12 (3): 357-366.
- [25] Bingham, E.T., 1968. Transfer of diploid *Medicago* ssp. germplasm to tetraploid *Medicago sativa* L. in 4x-2x crosses. *Crop. Sci*, 8: 760-762.
- [26] McCoy, T.J., 1982. The inheritance of 2n pollen formation in diploid alfalfa *Medicago sativa*. *Can J Genet Cytol.*, 24:315-323.
- [27] McCoy T. J. ve Bingham E. T., 1988 Cytology and cytogenetics of alfalfa. In *Alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy Monograph 29* (ed. A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill), pp. 737-776. Madison, USA.
- [28] Small, E., Jurzysta, M. ve Nozzolillo, C., 1990. The Evolution of Hemolytic Saponin Content in Wild ve Cultivated Alfalfa (*Medicago sativa*, Fabaceae). *Economic botany*. 44.(2) : 226-235.
- [29] Şakiroğlu, M., Doyle, J. ve Brummer, E.C., 2009. The population genetic structure of Diploid *Medicago sativa* L. germplasm. *Sustainable use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding*, pp: 143-148.
- [30] Şakiroğlu, M., İlhan, D., Kaya, M.M., Demirözoğul, O., Uluçay, O. ve Eren, B., 2011. Moleküler Veriler Işığında *Medicago sativa* L. Tür Kompleksinin Mevcut Durumu. *Kafkas Üniv. Fen Bil. Enst. Der.*, 4(1): 32-42.
- [31] Sinskaya, E.N., 1950. XIII. Perennial leguminous plants. In: Sinskaya, E.N. (ed) *Flora of Cultivated Plants of the U.S.S.R.* Moskva, Leningrad, pp. 3-425.
- [32] Muller, M-H., Poncet, C., Prosperi, J.M., Santoni, S. ve Ronfort, J., 2005. Domestication history in the *Medicago sativa* species complex: inferences from nuclear

sequence polymorphism. Mol Ecol., 15:1589–1602.

[33] Riday, H., Brummer, E.C. ve Moore, K.J., 2002. Heterosis of forage quality in alfalfa. Crop. Sci. 42: 1088-1093.

[34] Riday, H. ve Brummer, E.C., 2002a. Forage yield heterosis in alfalfa. Crop. Sci., 42: 716-723.

[35] Riday, H. ve Brummer, E.C., 2002b. Heterosis of agronomic traits in alfalfa. Crop. Sci. 42: 1081-1087.

[36] Riday, H. ve Brummer, E.C., 2004. Morphological variation of *Medicago sativa* subsp. *falcata* genotypes and their hybride progeny. Euphytica, 138: 1-12.

[37] Lincy, A. ve Sasikumar, B., 2010. Enhanced adventitious shoot regeneration from aerial stem explants of ginger using TDZ and its histological studies. Turk J Bot., 34: 21-29.

[38] Sahai, A., Shahzad, A. ve Anis, M., 2010. High frequency plant production via shoot organogenesis and somatic embriyogenesis from callus in *Tylophora indica*, an endangered plant species. Turk J Bot., 34: 11-20.

[39] Semagn, K., Bjornstad, A. ve Ndjiondjop, M., 2006. An overview of molecular marker methods for plants. Afr. J. Biotechnol. 5: 2540-2568.

[40] Gülşen, O. ve Mutlu, M., 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markerlar ve kullanım alanları. Alatarım, 4(2): 27-37.

[41] Saghai-Marooif, M.A., Biyashev, R.B., Yang, G.P., Lhang, Q. ve Allard, R.W., 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal locations and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci., 91:5466-5470.

[42] Ellis, J.R. ve Burke, J.M., 2007. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. Heredity, 99: 125-132.

[43] Muller, M-H., Prospero, J.M., Santoni, S. ve Ronfort, J., 2003. Inferences from

mitochondrial DNA patterns on the domestication history of Alfalfa (*Medicago sativa*). *Molecular Ecology*, 12:2187-2199.

[44] Estoup, A. ve Angers, B., 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology, theoretical and empirical considerations: In: *Advances in molecular ecology* (Carvalho, G. ed). Amsterdam: IOS Press; 55-86.

[45] Diwan, N., Bhagwat, A.A., Bauchan, G.B. ve Cregan, P.B., 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome*, 40: 887-895.

[46] Mengoni, A., Gori, A. ve Bazzicalupo, M., 2000. Use of RAPD and Microsatellite (SSR) Variation to Assess Genetic Relationships among Populations of Tetraploid Alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breed.* 119,311-317.

[47] Julier, B., Flajoulot, S., Barre, P., Cardinet, G., Santoni, S., Huguet, T. ve Huyghe, C., 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biol.*, 3:9.

[48] Şakiroğlu, M. ve Brummer, E.C., 2012. Presence of phylogeographic structure among wild diploid alfalfa accessions (*Medicago sativa* subsp. *microcarpa* Urb.) with evidence of the center of origin. *Genet Resour Crop Evo.*, 60:23-31.

[49] Lande, R. ve Thompson, R., 1990. Efficiency of marker-assisted selection in improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124: 743-756.

[50] Stuber, C.W., Polacco, M. ve Senior, M.L., 1999. Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential. *Crop Sci.*, 39: 1571-1583.

[51] Stich, B., Melchinger, A.E., Frisch, M., Maurer, H.P., Heckenberger, M. ve Reif, J.C., 2005. Linkage disequilibrium in European elite maize germplasm investigated with SSRs. *Theor Appl Genet.*, 111: 723-730.

[52] Jannink, J.L. ve Walsh, B., 2002. Association mapping in plant populations. In:

Kang, M.S. editor. Quantitative genetics, genomics and plant breeding. Wallingford, (UK): CAB International. p 59-68.

[53] Rafalski, A. ve Morgante, M., 2004. Corn and Humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. *Trends Genet.*, 20:103-111.

[54] Hagenblad, J. ve Nordborg, M., 2002. Sequence variation and haplotype structure surrounding the flowering time locus *FRI* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 161 (1): 289-298.

[55] Oraguzie, N.C., Rikkerink, E.H.A., Gardiner, S.E. ve Silva H.N., 2007. Association Mapping in Plants. Springer, Tokio and New York, pp. 277.

[56] Li, X., Wei, Y., Moore, K.J., Michaud, R., Viands, D.R., Hansen, J.L., Acharya, A. ve Brummer, E.C., 2011. Association mapping of Biomass Yield and Stem Composition in a Tetraploid Alfalfa Breeding Population. *The Plant Genome*, 4: 24-35.

[57] Herrmann, D., Barre, P., Santoni, S. ve Julier, B., 2010. Association of a CONSTANS-LIKE gene to flowering and height in autotetraploid alfalfa. *Theor Appl Genet.*, 121: 865-876.

[58] Kalo, P., Endre, G., Zimanyi, L., Csanadi, G. ve Kiss, G.B., 2000. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Theor Appl Genet.*, 100: 641-657.

[59] Jenczewski, E., Prosperi, J.M. ve Ronfort, J., 1999. Evidence for Gene Flow between Wild and Cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on Allozyme Markers and Quantitative Traits. *American Journal of Botany*, 86 (5): 677-687.

[60] Maureira, I.J., Ortega, F., Campos, H., Osborn, T.C., 2004. Population structure and combining ability of diverse *Medicago sativa* germplasms. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 775-782.

[61] Flajoulot, S., Ronfort, J., Baudouin, P., Barre, P., Huguet, C. ve Julier, B., 2005. Genetic Diversity among Alfalfa (*Medicago sativa*) Cultivars Coming from a Breeding

Program, Using SSR markers. Theor. Appl. Genet. 111, 1420-1429.

[62] Anbaran-Falahati, M., Habashi, A.A., Esfahany M., Mohammadi, S.A. ve Ghareyazie, B., 2007. Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centers of origin of the species. Journal of Genetics, 86 (1): 59-61.

[63] Dunbier, M.W., Eskew, D.L., Bingham, E.T. ve Schrader, L.E., 1975. Performance of Genetically Comparable Diploid and Tetraploid Alfalfa: Agronomic and Physiological Parameters. Crop Science 15: 211-214.

[64] Endre, G., Kalo, P., Hangyel Tarczy, M., Csanadi, G. ve Kiss, G.B., 1996. Reducing the tetraploid non-nodulating alfalfa (*Medicago sativa*) MnNC-1008 (NN) germplasm to the diploid level. Theor Appl Genet., 93:1061-1065.

[65] Bagavathiannan, M.V., Julier, B., Barre, P., Gulden, R.H. ve Van Acker, R.C., 2010. Genetic diversity of feral alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations occurring in Manitoba, Canada and comparison with alfalfa cultivars: an analysis using SSR markers and phenotypic traits. Euphytica, 173: 419-432.

[66] Talebi, M., Hajiahmadi, Z. ve Rahimmalek, M., 2011. Genetic diversity and population structure of four Iranian alfalfa populations revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) Markers, J. Crop Sci. Biotech, September 14 (3) : 173-178

[67] Xavier, R.J., Jitendra, K. ve Srivastava, R.B., 2011. Characterization of genetic structure of alfalfa (*Medicago* sp.) from trans-Himalaya using RAPD and ISSR markers. DRDO, C/O 56 APO, Leh, Ladakh, Jammu and Kashmir, African Journal of Biotechnology Vol. 10(42), 8176-8187.

[68] Nagl, N., Taski-Ajdukovic, K., Barac, G., Baburski, A., Seccareccia, I., Milic, D. ve Katic, S., 2011. Estimation of the genetic diversity in tetraploid alfalfa populations based on RAPD markers for breeding purposes, Int. Journal of Molecular Sci., 12, 5449-5460; doi:10.3390/ijms 12085449.

- [69] Yu-Ping, R., Zhe, C., Ling-ling, Z., Min, Z., Yong-juan, Z., ve Ke-yu, B., 2012. Genetic variation patterns of *Medicago ruthenica* populations from Northern China, African Journal of Biotechnology Vol. 11(22), pp. 6011-6017.
- [70] Carelli, M., Gnocchi, G. ve Scotti, C., 2009. Alfalfa germplasm from a Sahara oasis: characterization by means of bio-agronomic traits and SSR markers. Plant Breeding 128, 271-277.
- [71] Herrmann, D., Flajoulot, S. ve Julier, B., 2010. Sample size for diversity studies in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) based on codominantly coded SSR markers. Springer, 171: 441-446.
- [72] Volenec J.J., Cunningham S. M., Haagensohn D. M., Berg W. K., Joern B. C. Ve Wiersma D.W., 2002. Physiological genetics of alfalfa improvement: past failures, future prospects. Field Crops Research, 75, 97-110.
- [73] Crea, F., Calderini, O., Nenz, E., Cluster, P.D., Damiani, F. ve Arcioni, S., 1997. Chromosomal and molecular rearrangements in somatic hybrids between tetraploid *Medicago sativa* and diploid *Medicago falcata*. Theor Appl Genet, 95: 1112-1118.
- [74] Pupilli, F., Businelli, S., Paolocci, F., Scotti C., Damiani F. ve Arcioni S., 1996. Extent of RFLP variability in tetraploid populations of alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breed 115: 106-112.
- [75] Pupilli, F., Labombarda, P., Scotti, C. ve Arcioni, S., 2000. RFLP analysis allows for the identification of alfalfa ecotypes. Plant Breed 119: 271-276
- [76] Segovia-Lerma, A., Cantrell, R.G., Conway, J.M. ve Ray, I.M., 2003. AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. Genome. 46(1): 51-58.
- [77] He, X., Xia, L., Campbell, T.A. ve Bauchan, G.R., 2009. Development and characterization of SSR markers and their use to assess genetic relationships among alfalfa germplasms. Crop Sci., Vol. 49., 2176-2186.

- [78] Brouwer, D.J. ve Osborn, T.C., 1999. A molecular marker linkage map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) Theor Appl Genet 99: 1194-1200.
- [79] Sledge, M.K. Ray, I.M. ve Jiang, G., 2005. An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) Theor Appl Genet, 111: 980-992.
- [80] Diwan, N., Bouton, J.H., Kochert, G. ve Cregan, P.B., 2000. Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. Theor Appl Genet., 101: 165-172.
- [81] Şakiroğlu, M., Broyles, S.S., Story, A., Moore, K.J., Doyle J.J. ve Brummer E.C., 2012. Patterns of linkage disequilibrium and association mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) Theor Appl Genet, DOI, 10.1007/s00122-012-1854-2.
- [82] Barnes, D.K. 'A System for Visually Classifying Alfalfa Flower Color'. Agriculture Handbook, No: 24, Washington, USA, 1972..
- [83] Doyle, J.J. ve Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–15.
- [84] Schuelke M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nat Biotechnol 18:233–234.
- [85] Evanno, G., Regnaut, S. ve Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14:2611–2620.
- [86] Pritchard, J.K., Stevens, M. ve Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959.
- [87] Peakall, R. ve Smouse, P.E., 2001. GenAIEx V6: genetic analysis in excel population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIE>.
- [88] Nei, M., Tajima, F. ve Tateno, Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data, Journal of Molecular Evolution, 19,153-170.

- [89] Liu, J., 2002. POWERMARKER—a powerful software for marker data analysis. Raleigh, NC: North Carolina State University, Bioinformatics Research Center. <http://www.POWERMARKER.net>
- [90] Huson, D.H., Rupp, R. ve Scornavacca, C., Phylogenetic Networks. Cambridge University, 2010.
- [91] Dabney, A.R. ve Storey, J.D., 2007. A new approach to intensity-dependent normalization of two-channel microarrays. *Biostatistics* 8: 128-139.
- [92] Sinskaya, E.N., 1961. Flora of cultivated plants of the U.S.S.R. XIII. perennial leguminous. National Science Foundation, Washington, DC.
- [93] Ivanov, A.I., 1988. Alfalfa. Amerind Publishing, New Delhi.
- [94] Brummer, E.C., Cazcarro, P.M. ve Luth, D., 1999. Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. *Crop Science*, 39 (4): 1202.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Doğan İLHAN
Doğum Yeri : KIRŞEHİR
Doğum Tarihi : 09.01.1983
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kırşehir Lisesi-2000
Lisans : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi-2005
Yüksek Lisans : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi-2008

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Kafkas Üniversitesi, 2009-Devam ediyor

Yayımları (SCI ve Diğer)

1. İlhan, D. ve Akı, C. 2009. The Evaluation of Genetical Effects of some Genotoxic Compounds in *Tradescantia pallida* H. with Stamen Hair Mutation Test and Micronucleus Test (Fresenius Environmental Bulletin (FEB) dergisi).
2. Acar, O., Demirbas, S., İlhan, D. Ve Özdiç, N. 2010. The Effects of Glyphosate Isopropylamine on Mitotic Activity, Superoxide Dismutase and Peroxidase Activities on *Allium cepa* L. Root Tip Cells (Fresenius Environmental Bulletin (FEB) dergisi).
3. İlhan, D. ve Akı, C. 2010. Mutagenicity of Sunset Yellow and Brilliant Black in *Vicia faba* L. and *Allium cepa* L. (Fresenius Environmental Bulletin (FEB) dergisi).
4. Sakiroglu, M., D. İlhan, M. Mavioglu Kaya, O. Demirozogul, O. Uluçay, and B. Eren. 2011. Moleküler Veriler Işığında *Medicago Sativa* L. Tür Kompleksinin Mevcut Durumu. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 4(1):32-42

Diğer Konular