

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

Medicago sativa subsp. *varia*
POPULASYONLARININ PLOİDİ SEVİYESİNİN
FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Müge MAVİOĞLU KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

2010- KARS

Bu tez çalışması 109O860 numaralı proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

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

Medicago sativa subsp. *varia*
POPULASYONLARININ PLOİDİ SEVİYESİNİN
FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Müge MAVİOĞLU KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

2010- KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Müge MAVİOĞLU KAYA'nın Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "*Medicago sativa* subsp. *varia* Populasyonlarının Ploidi Seviyesinin Flow Sitometri Yöntemiyle Belirlenmesi" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy *birliği*..... ile kabul edilmiştir.

29./06/2010

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU
Üye : Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ
Üye : Yrd. Doç. Dr. Aysel GÜVEN

M. Şakiroğlu
.....
.....
Aysel Güven
.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../ 2010 gün ve/.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdullah DOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada flow sitometri ile Türkiye'de yetişen *Medicago sativa* subsp. *varia*'nın ploidi düzeyleri ve DNA içerikleri belirlenmiştir. Yonca alttürlerinde ploidi düzeyleri ve DNA içeriklerinin bilimsel veriler halinde sunulması bitki sınıflandırma ve ıslahı açısından oldukça önemlidir.

Tez çalışmamda en büyük emeği geçen, yoğun çalışmalarından bana zaman ayırarak bilimsel katkı ve önerileri ile yol gösteren, çalışmamı yürütme ve sonuçlandırma konusunda olanakları en iyi şekilde kullanmamı sağlayan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU'na, Doç. Dr. Metin TUNA ve yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca 1002-Hızlı Destek Program'ı ile çalışmamın projelendirilmesine maddi destek sağlayan TÜBİTAK (Proje No: 109O860)'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Medicago sativa</i> L. (Alfalfa, Yonca Bitkisi)	1
1.1.1. Yoncannn Taksonomik Birimlerinin Sitogenetiği, <i>Medicago sativa</i> Tür Kompleksi (<i>Medicago sativa-falcata</i> kompleksi) ve <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	4
1.2. Türkiye’de Yonca Yetiştiriciliği	7
1.3. Yonca Bitkisinin Besleme Değeri	9
1.4. Bitkilerde Genetik Değişiklikler ve Genetik Bankalar	9
1.5. Ploidi Düzeyi Belirleme	10
1.6. Çalışmanın Amacı	12
2. MATERYAL VE METOD	13
2.1. Bitki Materyalleri	13
2.2. Örneklerin Hazırlanması	14
2.3. Yoncannn Sahip Olduğu DNA Miktarının Hesaplanması	15
3. BULGULAR	17
3.1. Ploidi Düzeyi	17
3.2. DNA Miktarının Tespiti	19
4. TARTIşMA	24
5. KAYNAKLAR	26
ÖZGEÇMİş	30

ÖZET

Alfalfa (*Medicago sativa* L.), verimi, yem kalitesi ve dayanıklılığı sayesinde dünyada yaygın olarak yetiştirilen çok yıllık otsu bir bitkidir. Kültürü yapılan yonca, tetrasomik özellik gösteren tetraploid ($2n=4x=32$) bir bitki olup *Medicago sativa* ya da *Medicago sativa-falcata* tür kompleksi olarak bilinen karmaşık bir komplekse dahildir. Bu kompleks serbest bir şekilde melezleşebilen farklı alttürleri bulundurmaktadır. Bu çalışmanın amacı komplekse dahil olan *M. sativa* subsp. *varia*'nın ploidi seviyesi ve DNA miktarlarının belirlenmesidir. ABD Tarım Bakanlığı Ulusal Bitki Genetik Kaynaklar Sistemi (USDA-GRIN) koleksiyonundan 25 adet *M. sativa* subsp. *varia* varyetesi temin edildi. Ploidi seviyelerini belirlemek için her populasyondan 3 adet çalışıldı. Ploidi düzeyleri tespit edilmiş biri diploid (CADL) diğeri tetraploid (Buldog 505) iki yonca bitkisi standart olarak kullanıldı. Diploid (CADL) ve tetraploid (Buldog 505) standart bitkilerin oluşturduğu floresan yoğunluğu ölçüldüğünde diploid standardın 183 nm'de pik yaptığı gözlemlenirken tetraploid standardın yaklaşık 361 nm'de pik yaptığı gözlemlendi. Tüm aksesyonların tetraploid olduğu tespit edilmiş olup hiçbir populasyonda populasyon içi ploidi düzeyi varyasyonlarına rastlanmadı. DNA miktarını tespit edebilmek için DNA miktarı daha önce ölçülen domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisi kullanıldı. Yoncanın DNA miktarı diploidlerde yaklaşık olarak domatese eşit çıkarken (1.90pg), tetraploidlerde diploidlerin 1.7 katı olarak 3.25pg dolayında tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada aynı ploidi düzeyine sahip alttürler arasında DNA miktarı bakımından farklar görülmüştür. Bu yüzden eşit ploidi seviyelerinde kromozom bantlanma figürleri ve kromozom boyutlarındaki değişikliklerin DNA miktarına yansımaları gibi konuların araştırılmasına da ihtiyaç vardır.

2010, 30 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Medicago sativa* subsp. *varia*, Flow Sitometri, Ploidi Düzeyi, Yonca

ABSTRACT

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a perennial herbaceous plant that is widely cultivated throughout the world because of its high yield, forage quality, and persistence. Cultivated alfalfa is a tetrasomic tetraploid ($2n=4x=32$) and belongs to a complex taxonomic group known as *Medicago sativa* species complex or the *Medicago sativa-falcata* complex. The complex includes several subspecies that can freely hybridize. The aim of this study was to determine ploidy levels and DNA contents of *M. sativa* subsp. *varia* accessions. About 25 accessions from *M. sativa* subsp. *varia* varieties were obtained from the USDA National Plant Germplasm System (USDA-GRIN) collections. Ploidy levels of the accessions were determined using three accessions from each population. A diploid (CADL) and a tetraploid (Bulldog 505) sample with known ploidy level were used as standards. Fluorescence intensity of diploid and tetraploid standard plants was observed at 183 nm and 361 nm, respectively. All accessions were found to be tetraploid without any within population ploidy level variation. So as to determine DNA content of subsp. *varia* accessions a tomato plant with known DNA content used as a standard. DNA content was found to be approximately 3.25pg, about 1.7 times as high as that of diploids. Furthermore, the DNA content of one single genotype was found to be significantly higher (4.99pg) suggesting taxonomic differentiation.

2010, total 30 pages

Keywords: *Medicago sativa* subsp. *varia*, Flow Cytometer, Ploidy Level, Alfalfa

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

subsp : Subspecies

pg : Pikogram

nm : Nanometre

DNA : Deoksiribonükleik Asit

PI : Propidiyum İyodür

USDA-GRIN : ABD Tarım Bakanlığı Ulusal Bitki Genetik Kaynaklar Sistemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.1 <i>Medicago sativa</i> tür kompleksi içerisindeki birimlerin taksonomik ilişkisi	6
Şekil 3.1 Diploid standart CADL bitkisinde çekirdek sayısının fonksiyonu olarak floresans yoğunluğu	17
Şekil 3.2 Tetraploid standart (Buldog 505) bitkisinde çekirdek sayısının fonksiyonu olarak floresans yoğunluğu	18
Şekil 3.3 Domates (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) ile <i>M. sativa</i> subsp. <i>varia</i> 'ya ait bir bitkinin floresans yoğunluğunun karşılaştırması	20
Şekil 3.4 <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i> 'ya ait bitkilerin DNA miktarlarının frekans grafiği (Histogram)	23

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.2.1. Türkiye’de 1986-2006 döneminde yoncanın ekim alanları, kuru ot ve tohum üretimleri	8
Çizelge 1.2.2. Türkiye’de mevcut yem bitkisi ekim alanlarının ve kuru ot verimlerinin oransal olarak dağılımı	9
Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan <i>M. sativa</i> subsp. <i>varia</i> ’ya ait populasyonlar ile bu populasyonların toplandığı yerler ve kullanılan bitki sayısı	13
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan populasyonların kromozom sayıları	18
Çizelge 3.2 <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i> ’ya ait bitkiler ile standart domates bitkisinin floresans yoğunlukları ve <i>varia</i> alttürüne ait bitkilerin DNA miktarı (pg)	20

1. GİRİŞ

1.1. *Medicago sativa* L. (Alfalfa, Yonca Bitkisi)

Yonca bitkisinin, bilinen yem bitkileri içerisinde en zengin ve en uzun tarihe sahip olan bitki olduğu ifade edilmektedir [1]. Yonca bitkisi hakkında verilen en eski bilgilerin M.Ö. 1300 yılında Anadolu'da ve M.Ö. 700 yılında Babil'de olduğu bildirilmektedir. Bununla beraber M.Ö. 4000 yılında yonca bitkisinin Doğu Akdeniz'de bulunan ülkelere deniz ticareti ile yayılmış olduğu da ifade edilmektedir. Arkeolojik çalışmalardan sağlanan tabletlerde M.Ö. 1400-1200'lü yıllarda yoncanın kış boyunca hayvan yemi olarak kullanıldığı ve oldukça besleyici olduğunun anlaşıldığı tespit edilmiştir. M.Ö. 4. yüzyılda askerlerin atlarını ve diğer hayvanları beslemek için yoncayı Avrupa'ya getirdikleri ileri sürülmektedir. M.Ö. 2. yüzyılda yoncanın İtalya'ya getirildiği belirtilmekte olup yoncanın İtalya'ya ulaşması ile dünya çapında yayılmaya başladığı bildirilmektedir. İspanya ve İsviçre'de M.Ö. 1. yüzyılda kullanılmaya başlayan yoncanın ancak 18. yüzyılda Avrupa'dan Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda'ya taşınabilmiştir [2,3].

Eski çağlardan beri çok iyi nitelikte bir yem bitkisi olarak bilinen yonca (*Medicago sativa*), Anadolu kökenli bir türdür. Türkçe'de "yonca" sözcüğünden "*M. sativa*" anlaşılmaktadır. Dünyanın değişik yerlerinde filizleri salata bitkisi olarak tüketilmesine rağmen, Anadolu'da sadece yem elde etmek amacıyla ekilmektedir ve yonca ekilen yerler "yoncalık" diye ifade edilmektedir [4]. Yoncanın başlıca gen merkezlerinden birisi olan Türkiye, hemen her bölgede yoncanın yabani formlarını çok yaygın olarak bulundurmaktadır. Türkiye'de başlıca üç yonca ekotipi olup [5], İran'dan gelen tiplerin bu karışımda yoğunluk oluşturduğu bilinmektedir [3]. Hasat edildikten sonra gelişmesi hızlı olan bu ekotip, iyi bir adaptasyon kabiliyetine sahiptir. Doğu Anadolu ekotipi olarak ifade edilen ekotipi yaygın olarak Anadolu'da bulunmaktadır [1]. Yoncanın bir diğer ekotipi ise Ege Bölgesinde yetiştirilen yerli yoncadır [3].

Yerkürede yaşamın sürmesi ve besin döngüsünün (bitki-hayvan-insan) devamlılığı bitkisel üretime bağlıdır. Ekim alanlarının tarım dışı kullanımlara yönelik olarak değerlendirilmesi, erozyon, tuzlanma ve çölleşme yoluyla toprak verimliliğinin azalması üretim alanlarının daralmasına neden olmaktadır. Bu etmenler karşısında üretimin artırılarak sürdürülmesi yüksek verimli, biyotik (hastalık ve zararlı) ve abiyotik (kuraklık, soğuk, tuzluluk gibi) baskılara dayanıklı türlerin geliştirilmesi ile sağlanabileceği düşüncesi savunulmaktadır. Son 50 yıldaki ürün artışında bitki ıslahı çalışmalarının önemli payı olduğu görülmektedir. Klasik bitki ıslahı yöntemleri sayesinde, özellikle melez çeşitlerden yararlanarak elde edilen ürün miktar ve kalitesinde önemli artışlar sağlanmaktadır. Bununla birlikte; hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık başta olmak üzere bitkinin diğer birçok tarımsal özelliklerini iyileştirmede önemli engellerle karşılaşmaktadır. Örneğin, kısırılık ve uyumsuzluk nedeniyle türler arası melezlemenin yapılabildiği bitki sayısının azlığı, istenilen karakterlerin bu bitkiler arasında aktarılma başarısını da azaltmaktadır [6].

Yem bitkilerinin en önemlisi olarak tanımlanan yonca, adaptasyon yeteneğinin yüksek, uzun ömürlü, bir vejetasyon devresinde birçok defa hasat edilebilir, yüksek verimli, yüksek besin değerli ve bazı çeşitlerinin otlatılabilir olması nedenleriyle diğer yem bitkilerinden ayrılmaktadır. Yonca genellikle kuru ot üretimi, otlatma veya silo yemi yapmak amacıyla yetiştirilmektedir. Ayrıca, buğdaygil yem bitkileri ile iyi karışımlar elde edilebilmektedir [7,8]. Böylesine değerli bir yem bitkisi Türkiye'nin hemen her bölgesinde doğal olarak görülmekte ve tarımı son yıllarda giderek yaygınlaşmaktadır. Bu durum mevcut yonca çeşitlerine ek olarak Türkiye'de uygun yeni çeşitlerin araştırılması ve adaptasyonlarının sağlanmasını zorunlu hale getirmekte ve bölge meralarının ıslahında kullanılacak mera tipi yoncaların ortaya konulması da büyük bir gereksinim olarak görülmektedir [9].

Protein verimi yüksek olan yoncanın kuru ve yeşil halinin beslenme açısından diğer bitkilere göre daha öncelikli olarak tercih edilmesinin sebebi basit bir ifade ile besleyici ve lezzetli olması ile açıklanabilmektedir. Yoncanın vitamin bakımından da çok zengin olduğu bildirilmektedir. Özellikle karotin (provitamin A), tokoferol (vitamin E), vitamin K ve ksantofil (xanthophyl) yönünden oldukça zengindir [10]. Yonca otunun hayvanlara

yaklaşık %15-22 arasında ham protein sağlayabildiği belirtilmektedir [11]. Ayrıca yonca yağda ve suda çözünen vitaminleri bulundurmakta olup fosfor, potasyum, sodyum, kalsiyum, kükürt, klor, magnezyum, demir, kobalt, bakır, mangan, bor, molibden, nikel, kurşun, stronsiyum ve palladium minerallerini de içermektedir [3].

Dünyada çok değişik ekolojik koşullara adapte olabilme ve geniş genetik varyasyon gösterebilme yeteneğine sahip olan yoncanın verim özelliklerinin de değişken olduğu kaydedilmektedir [12]. Bu bitki kış dormansisi gösterip göstermemesine göre gruplara ayrılmaktadır. Bazı yonca çeşitlerinin kış dormansisi uzun olduğu için gelişmelerinin de yavaşlamasına bağlı olarak verim düşüklüğü görüldüğü bildirilmektedir [13]. Baklagiller içerisinde *in vitro* rejenerasyon kabiliyeti nedeniyle doku kültürü ve genetik mühendisliği çalışmalarında model bitki olarak kullanılmasına karşın, rejenerasyon kabiliyetinin de genotipler arasında önemli farklılıklar gösterebildiği kaydedilmektedir [14].

Yoncanın adaptasyon özellikleri ve kullanımları ile ilgili geniş bilgiler verilmiştir. Çeşitlerinin dağılımını sınırlayan temel faktörün yağış ve sıcaklık olduğu vurgulanmaktadır [15].

Yonca kurak bölgelerde ortaya çıkan tuza karşı oldukça dayanıklıdır. Diğer bitkiler ile kıyaslandığı zaman orta derecede (3-6 mm hos/cm) dayanıklı yem bitkileri arasında yer alır. En uygun toprak tuzluluğu 2.0 mm hos/cm dir [15]. Genellikle dik olarak yetişen sap, yetiştirme koşullarına ve çeşidine bağlı olarak 30–120 cm kadar boylanır. Sap gelişmesi yarı yatık olan yonca tiplerine de rastlanmaktadır. Genç bitkilerde sap ince ve yumuşak olmasına karşın, olgunlaştıkça odunlaşır. Sapın enine kesiti kareye yakın köşelidir. Dallenma genellikle dipten olmaktadır [16]. Yapraklar, tipik üç yaprakçıkta oluşmuştur. Orta yaprakçık sapı, belirgin bir şekilde uzundur. Yaprakçıklar, uzun, eliptik şekilde, kenarları belirgin bir şekilde uzundur. Çiçekler yaprak koltuğundan çıkan sapçıklar üzerinde bir araya gelerek gevşek bir salkım oluşturur. Çiçek renkleri menekşe ya da mordur [16].

Yoncanın ekilmesindeki avantajları arasında örtü bitkisi, yeşil gübre veya toprak ıslah edici bitki olarak kullanılabilmesi gibi nedenler sayılabilir. Köklerinin toprağın derinlerine kadar inmesi sebebi ile toprak derinlerindeki su ve bitki besin maddelerinden kolayca yararlanabilmektedir. Yonca diğer baklagil bitkilerinde olduğu gibi kazık kök sistemine sahip bir bitkidir. Yalnız kökleri diğer birçok baklagil bitkilerinden farklı olarak toprakta oldukça derin tabakalara kadar inebilmektedir [17]. Genel olarak tınlı, kumlu, çok olmayan killi, yeter derecede kireç içeren topraklarda yetişmektedir. Kökler derinlere indiğinden toprak profilinin bu niteliklerde olması gerekmektedir. Toprak profilinde köklerin derinlere inmesini engelleyecek şekilde kum, çakıl, kaya gibi engeller olmamalıdır. Taban suyunun yükselmesi yoncaya olumsuz etki yapar. Bu koşullarda sarararak kısa ömürlü olan yonca, birçok bitkinin derinlerden alamadığı bitki besin maddelerini alıp üst katmanlara kadar taşımaktadır [15]. Kendinden sonra ekilen yüzeysel köke sahip bitkiler için organik madde ve azotça zengin, su tutma kapasitesi iyi olan bir ekin toprağı sağlamaktadır. Ayrıca yoncanın, köklerindeki nodüller sayesinde toprak azotunu artırma özelliğine sahip olduğu ifade edilmektedir [10]. Yonca bitkisi, buraya kadar sayılan üstün özelliklerinden dolayı Türkiye’de tarımının yapılması en çok önem gerektiren yem bitkilerinden biridir.

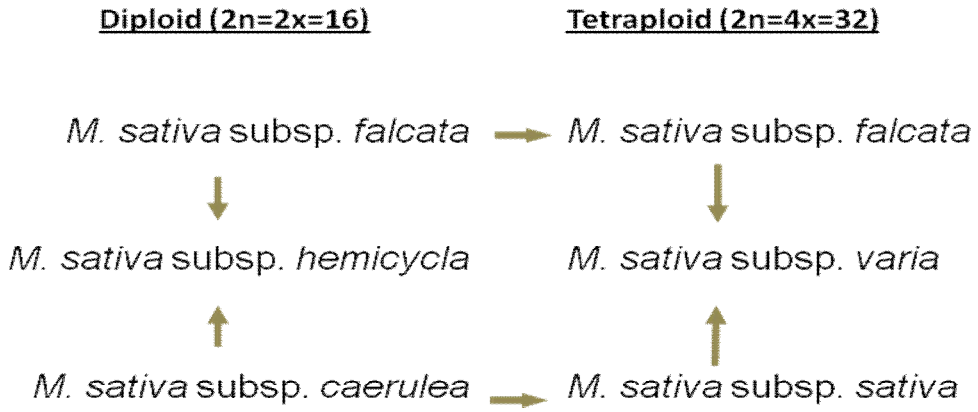
1.1.1. Yoncanın Taksonomik Birimlerinin Sitogenetiği, *Medicago sativa* Tür Kompleksi (*Medicago sativa-falcata* kompleksi) ve *Medicago sativa* subsp. *varia*

Ekilen yonca, genetik olarak tetrasomik (tetraploid ayrışım özellikleri gösteren) özellik gösteren tetraploid ($2n=4x=32$) bir bitkidir ve karmaşık bir taksonomik grup olan *Medicago sativa* tür kompleksi ya da *Medicago sativa-falcata* kompleksi olarak bilinen bir birimden ıslah yolu ile geliştirilmiştir. Kompleks aralarında tozlaşma engeli bulunmayan diploid ($2n=2x=16$) ve tetraploid ($2n=4x=32$) alttürlerden oluşmaktadır. *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) diploid alttürleri oluştururken; *M. sativa* subsp. *sativa* (diploid alttür olan *caerulea*’nın morfolojik eşleniği), *M. sativa* subsp. *falcata*, ile tetraploid melez olan *M. sativa* subsp. *varia*

kompleksin tetraploid birimlerini oluşturular. Kompleks *Falcago* bölümünün *Falcatae* alt bölümüne aittir [26]. Buradaki bitkiler aynı karyotipleri paylaşmakta olup, birbirleriyle çaprazlanabilmektedirler. Bazı yazarlar tarafından bu kategorideki türlerin ve alt türlerin hiyerarşisi verilmektedir. Ancak uzun zaman boyunca tür olarak kabul gören bu birimlerin arasında üreme engeli bulunmayışı bu birimlerin türün altında ancak alttür olarak kabul edilebileceği yargısını güçlendirmişlerdir. Son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar da bu birimlerin alttür olarak kabul edilmesini önermektedirler [27,28]. Aynı gen havuzunu oluşturan *M. sativa* kompleksi ile yakından ilişkili olan diğer türler *M. glutinosa*, *M. glomerata* ve *M. prostrata*'dır.

M. sativa subsp. *falcata* orak şekilli meyveleri ve sarı renkli çiçekleriyle karakterize edilmektedir. Bu özellikler *M. sativa* subsp. *sativa*'da bulunmadığı için *M. sativa* subsp. *falcata* uzun bir süre ayrı bir tür olarak sınıflandırılmıştır. *M. sativa*'nın diploid ($2n=2x=16$) ve tetraploid ($4n=4x=32$) tür ve alttürleri bulunmaktadır. Yüksek ölçüde değişken morfolojik özelliklere sahiptirler. Bu çeşitlilikten dolayı diploid formlar *borealis*, *romanica*, *altissima*, *glandulosa*, *difalcata*, *tenderensis* ve *erecta* gibi tür ya da alttür statülerine alınabilirler. Diploid *M. sativa* subsp. *falcata*, *M. sativa* subsp. *caerulea* ve *M. sativa* subsp. *X hemicycla* grossh'da birkaç izozimin kalıtımı bildirilmektedir [26]. Bir çalışmada, genetik markırlar esas alınarak doğal diploid popülasyonların genetik çeşitliliği özetlenmektedir [26,29]. Genetik markörler olarak peroksidaz ve lösin amino peptidaz izozimleri kullanılmıştır. *M. sativa* kompleksindeki tetraploid alttürler *M. sativa* subsp. *sativa*, *M. sativa* subsp. *X varia*, *M. sativa* subsp. *falcata* ve *M. sativa* subsp. *glutinosa* çiçek ve tohumların daha büyük olmasıyla diploidlerden ayırt edilmektedir.

Medicago sativa subsp. *varia* doğal olarak *Medicago sativa* subsp. *falcata* ile *Medicago sativa* subsp. *sativa*'nın hibridizasyonu ile ortaya çıkmakta olup Asya'nın merkezi ve bazı Avrupa bölgelerinde bulunmaktadır [26,30] (Şekil 1.1.1).



Şekil. 1.1.1. *Medicago sativa* tür kompleksi içerisindeki birimlerin taksonomik ilişkisi

Yapılan bir çalışmada, *M. sativa*, *M. falcata* ve *M. sativa* subsp. *varia* in vitro sindirilebilir kuru madde ve ham protein bakımından birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Buna göre, en yüksek ham protein içeriğinin *M. sativa* subsp. *varia*'da olduğu, in vitro sindirilebilir kuru maddenin de en fazla *M. sativa*'da bulunduğu bildirilmektedir [31]. Erzurum'da yapılan bir çalışmada da, melez yoncada 7-21 arasında değişim gösteren yan dal sayısının deneme çeşitlerinde ortalama 12.15, ana dal çapının en düşük 1.40, en yüksek 3.50 mm ve ortalama ana sap çapının 2.26 mm olduğu belirlenmiştir [32].

Medicago sativa subsp. *varia*'nın ebeveynlere ait populasyon içi çaprazlanmalardan meydana gelen oluşumlardan % 47.5 oranında daha fazla verim sağladığı tespit edilmiştir [31]. Yonca ıslahında *M. sativa* subsp. *varia*'nın sert çevre koşulları ve kayalık topraklara adaptasyonlarından dolayı çevresel strese dirençli olabileceği belirtilmektedir. Bu alttürün Tibet'te 5000 m yüksekliğe de adapte olduğu bildirilmektedir [26].

Geçmişten günümüze kadar yem bitkisi olarak yoncanın yetiştirilmesi ve geliştirilmesinde büyük oranda içerisinde melez alttür olan *M. sativa* subsp. *varia*'nın da bulunduğu tetraploidler kullanılmıştır. Barnes ve ark. (1977) tarafından alttür *varia*'nın dünyada halen en yaygın kullanılan modern yonca varietelerinin temelini oluşturan dokuz öncül genetik kaynaktan biri olduğunu tespit edilmiştir [33]. Bu çalışmada, morfolojik karakterlerin (özellikle çiçek renginin ve meyve şeklinin) ve

ploidi seviyesinin doğru olarak kayıt altına alınması *M. sativa* subsp. *varia*'nın doğru olarak tanımlanmasına ve bu da genetik kaynakların bitki ıslahında etkin kullanımına önemli oranda katkı sağlayacaktır.

1.2 Türkiye'de Yonca Yetiştiriciliği

Türkiye'de 163 familyaya ait 1225 cins ve 9000 tür doğal olarak yetişmektedir. Bunların 3000'i Türkiye'ye özgü (endemik) bitkilerdir [18]. Akdeniz ile Yakın Doğu arasında geçit oluşturan Türkiye, birçok yem bitkisinin doğal yaşam alanı içerisinde yer almakta ve ılıman bölge yem bitkilerinin hemen hemen tamamı da Türkiye'de doğal olarak yetişmektedir. Bu nedenle Türkiye ılıman bölge yem bitkileri ıslahı için iyi bir kaynak durumundadır [19].

Adaptasyon yeteneğinin yüksek olması ve uzun ömürlülüğü, vejetasyon döneminde birçok defa biçilebilmesi, verim ve besin değerinin yüksekliği, ekim nöbetinde önemli etkinliği ve kimi çeşitlerinin otlatılmaya dayanıklılığı, yoncayı diğer yem bitkilerinden üstün kılan özelliklerdir [7].

Yonca üretim alanları, desteklemelerden önceki yıllar olan 1998 ve 1999 yıllarında 230.000 ve 245.606 hektar iken, desteklemenin başlaması ile bu alanlar 2000, 2001, 2002, 2003, 2004 ve 2005 yıllarında sırası ile 250.800, 249.000, 260.000, 290.000, 320.000, 375.000 hektara kadar çıkmıştır (Çizelge 1.2.1) [20]. Türkiye'deki yonca ekim alanı 2006 yılına gelindiğinde ise çok önemli artış göstererek 444.030 hektara ulaşmıştır. Yonca ekim alanı 2006 yılı verilerine göre tüm yem bitkileri ekim alanının %36.6'sını teşkil etmekte, kuru ot üretiminin ise %19.3'ünü oluşturmaktadır [20]. Gerek yem bitkileri desteklemelerinin etkisi gerekse artan melez ve kültür ırkı hayvanlarının yem ihtiyaçlarının karşılanması amacı ile arttırılan yonca ekim alanı 1999'dan 2006'ya % 80.8 oranında artış göstermiştir.

Yonca üretim alanlarının artması direkt olarak üretilen kuru ot miktarlarında da artışa neden olmuştur. Desteklemeler başlamadan önce 1999 yılında kuru ot üretimi 1.641.000

ton iken 2005 yılında 2.400.000 ton'a ulaşmıştır. Bu miktar 2006 yılında ise 2.820.225 ton olmuştur. 1999 yılına kıyasla 2006 yılında yonca kuru ot üretimi % 71.9 oranında artış göstermiştir. Türkiye'deki yonca tohumu üretimi ise 1999 yılında 1.220 ton iken teşviklerin başlaması ile 2000 yılında 1.900 tona 2005 yılında ise 2.900 tona ulaşmıştır. Fakat 2006 yılında tohum üretimi bir miktar azalma göstererek 2.714 ton olmuştur [20]. Türkiye'de tohum üretim miktarındaki yıllar arası dalgalanmaların ana nedeni yurt dışından getirilen tohum miktarlarıdır. İthal edilerek temin edilen tohum miktarları iç piyasadaki arz talep dengesini önemli ölçüde etkilemektedir.

Çizelge 1.2.1. Türkiye'de 1986-2006 döneminde yoncanın ekim alanları, kuru ot ve tohum üretimleri [20]

Yıllar	YONCA		
	Ekim Alanı (ha)	Kuru Ot (ton)	Tohum (ton)
1986	183.890	850.000	3.289
1990	197.439	1.105.819	1.292
1994	194.801	1.292.772	1.094
1997	217.500	1.364.200	1.930
1998	230.000	1.550.000	2.260
1999	245.606	1.641.000	1.220
2000	250.800	1.540.000	1.900
2001	249.000	1.563.000	1.910
2002	260.000	1.700.000	2.300
2003	290.000	1.800.000	3.200
2004	320.000	2.000.000	3.500
2005	375.000	2.400.000	2.900
2006	444.030	2.820.225	2.714

Türkiye'de mevcut yem bitkileri ekim alanları içerisinde en fazla yonca bitkisi yetiştirilmekte olup (% 36.6), bunu sırası ile fiğ (% 31.9), mısır (% 21.4) ve korunga (% 9.7) bitkisi takip etmektedir [20]. Üretilen toplam kuru ot miktarının ise % 68.9'unu mısır, % 19.3'ünü yonca, % 8.3'ünü fiğ, % 3.4'ünü korunga, % 0.07'sini üçgül, % 0.06'sini ise burçak kuru otu oluşturmaktadır (Çizelge 1.2.2).

Çizelge 1.2.2. Türkiye’de mevcut yem bitkisi ekim alanlarının ve kuru ot verimlerinin oransal olarak dağılımı [20]

Yem Bitkileri	Ekim Alanı (%)	Kuru Ot Üretimi (%)
Yonca	36.6	19.3
Korunga	9.7	3.4
Fiğ	31.9	8.3
Üçgül	0.17	0.07
Burçak	0.24	0.06
Mısır	21.4	68.9
Toplam	100	100

1.3. Yonca Bitkisinin Besleme Değeri

Yem kalitesi genellikle yemin kimyasal, fiziksel ve biyolojik değerlerinin ölçülmesi ile saptanır. ABD’de yonca bitkisi için geliştirilen ve diğer yemler içinde kullanılan nispi yem değeri (NYD) (*Relative Feed Value, RFV*) yemlerin besleme değerini ölçmede kullanılmaktadır [21]. Nispi yem değerinin hesaplanmasında asit deterjan lif (ADF) ve nötr deterjan lif (NDF) değerlerinden yararlanılmaktadır [22]. Nispi yem değeri tam çiçekteki yonca kuru otunun içerdiği % 41 ADF ve % 53 NDF içeriğinden hesaplanan 100 değerini esas alır. Nispi yem değeri 100’ ün altına düştükçe yem kalitesi düşmekte, yükselmesi durumunda ise artmaktadır [23]. Buna göre NYD 75’in altında ise 5. kalite, 75-86 ise 4. kalite, 87-102 ise 3. kalite, 103-124 ise 2. kalite, 125-150 ise 1. kalite ve 150’nin üzerinde ise en iyi kalite olarak kabul edilmektedir [24,25].

1.4. Bitkilerde Genetik Değişiklikler ve Genetik Bankaları

Bitkiler evrimsel gelişimleri sürecinde gerek buldukları çevre koşullarının neden olduğu doğal mutasyonlar sonucunda, gerekse çevrede bulunan diğer bitkilerden yabancı tozlanma yolu ile meydana gelen bir takım DNA modifikasyonlarına uğramışlardır [34,35]. Buğday ve bazı yem bitkilerinde diploid, tetraploid ya da hexaploid çeşitlerin evrimsel süreç içinde oluşması doğal olarak meydana gelen genetik modifikasyonların bir çeşidine örnek gösterilebilir [36,37]. Komperatif (karşılaştırmalı)

genetik olarak isimlendirilen alan tür düzeyinde genetik materyaldeki değişimlerin içeriği ve boyutları ile bu değişiklikler üzerinden cins ve türler arasındaki ilişkiler hakkında ipuçları vermeye çalışmaktadır [37-39].

Gen kaynağı olarak toplanmış materyalin karakter belirleme çalışmaları yapılmadan ıslah programlarında etkili kullanılması mümkün değildir. Bu nedenle toplanan ve genetik bankalarda muhafaza edilen materyalin genetik yapısının bitki ıslahçılarının etkin olarak kullanabileceği şekilde değerlendirilmesi gereklidir [40]. Halen ülkemizde Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü kapsamında muhafaza edilen birçok bitkisel kaynak koleksiyonu yeterince değerlendirilemediği için ıslahçılar tarafından gerçek değeri ile kullanılmamaktadır. Koleksiyon hakkında bilgi, materyalin orijin yeri, fenolojik, morfolojik, fizyolojik ve patolojik özelliklerinin yanında bilinen biyokimyasal özelliklerinin de açıkça belirlenmesi ıslahçılar için referans olacaktır.

Halen yonca genetik kaynakları açısından dünyada en etkin kullanılan gen bankası olan ABD Tarım Bakanlığı Ulusal Bitki Genetik Kaynaklar Sistemi (USDA-GRIN), yoncanın yabanî varyeteleri ve yerel ırklarından oluşan oldukça geniş bir koleksiyona sahiptir. Bu koleksiyonun değişik ploidi düzeyine sahip alttürlere ait popülasyonları, yonca ıslah çalışmalarında sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Bu alttürler arasında iki alttürün doğal melezi olan tetraploid alttür *M. sativa* subsp. *varia* yoncanın gen havuzuna dahildir ve yonca ıslahı için önemli bir genetik kaynak konumundadır. Ancak bu alttürün aksesyonları (popülasyon) henüz morfolojik açıdan değerlendirilmemiş ve ploidi seviyeleri belirlenmemiştir.

1.5. Ploidi Düzeyi Belirleme

Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenebilmesi için temelde üç metod kullanılmaktadır:

Fenotipik Gözleme: Bitkilerde kromozom sayısı artışına paralel olarak bitkinin tüm organlarında bir irileşme meydana gelmektedir. Örneğin haploid bitkiler diploidlere, tetraploidler ile daha yüksek ploidi düzeyinde sahip bitkiler ise diploidlere göre daha

büyük hacimli olmaktadır. Ancak bu metodun en büyük sorunu, daha düşük ploidi düzeyinin yüksek performansına sahip bitkinin, yüksek ploidi düzeyinin düşük performanslı bitkilerinden ayırdetmede başarısız olmasıdır.

Kromozom Sayımları: Bitkilerin genellikle kök uçlarında yapılan kromozom sayımları, nisbeten daha tutarlı sonuçlar vermektedir. Sağlıklı ve güçlü bir gelişme gösteren taze kök uçlarından alınan örnekler, kromozom sayımları için uygun materyaldir. Kromozom sayımları için yapılan laboratuvar işlemlerinin uzun süre alması ve deneyimli elemana ihtiyaç göstermesi ise en büyük dezavantajdır. Yoncada kromozomların sayıca fazlalığı ve boyutlarının küçük olması nedeniyle bu metod verimli olamamaktadır.

Flow Sitometri: Flow sitometri verimli, güvenilir, hızlı ve yeni bir yöntemdir. Bu yöntem mali yönden de oldukça caziptir. Bitki ve hayvan türlerinin ploidi seviyesi ve nükleer DNA miktarı artık bu yöntem kullanılarak belirlenebilmektedir. Özellikle, populasyonlar içi ploidi düzeyi varyasyonu durumunda oldukça hızlı ve etkin bir alternatiftir [27,41].

Temel olarak bir flow sitometri, süspansiyon içerisindeki boyanmış partiküllerin (hücre çekirdeği ya da DNA) bir floresans mikroskobu aracılığıyla okunmasıdır. Okunma sırasında yaklaşık olarak 10.000 adet hücre çekirdeğinin DNA miktarları floresans yardımıyla okunur ve bu çekirdeklere ait floresans yoğunluğu grafiğe dökülür.

Ploidi belirlemesi için klasik kromozom sayımları iyi bir laboratuvar altyapısı ve deneyimli elemana ihtiyaç göstermenin yanında bazı bitki türlerinde çok güç hatta bazen olanaksız olabilmektedir. Çünkü çok az sayıda hücrenin kromozomları sayılabilmektedir ve küçük, kırık kromozomlar ile endopolyploidi yanlış sonuçlara sebep olmaktadır [42].

Flow sitometri metodunun hızlı, güvenilir ve etkinliği hem tek tek bitkilerle yapılan çalışmalarda hem de bir populasyona ait bireylerin toplu olarak analizinde gösterilmiş

olup [43-45], yoncanın ploidi düzeyinin belirlenmesinde daha önceki başka çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmıştır [27,41,46].

1.6 Çalışmanın Amacı

ABD Tarım Bakanlığı Ulusal Bitki Genetik Kaynaklar Sistemi (USDA-GRIN), *M. sativa-falcata* kompleksinin tüm üyelerini kapsayacak şekilde oldukça geniş bir koleksiyona sahiptir ve yabani yoncanın tüm doğal yayılım alanlarından toplanan bu koleksiyondaki varyete sayısı 3700'ü aşmış durumdadır. Ancak bu koleksiyondaki popülasyonlar taksonomik olarak sıklıkla yanlış sınıflandırılmıştır [27,41, 47]. Özellikle diploid melez alttür olan *M. sativa* subsp. *hemicycla*'ya ait popülasyonların tamamına yakını tetraploiddir ve bir kısmı sarı renkli çiçeklere sahiptir [27,47]. Bu durumda bu varyetelerin ya *M. sativa* subsp. *falcata* veya tetraploid melez olan *M. sativa* subsp. *varia* olarak düzeltilmesi gerekmektedir. Buna karşın *M. sativa* subsp. *falcata* ve *M. sativa* subsp. *caerulea* olarak tasnif edilen birçok varyetenin ise hem morfolojik özellikleri yönüyle hem de genetik markır bilgisi ışığında *M. sativa* subsp. *hemicycla* oldukları gözlenmiştir [47]. Yoncada ploidi seviyesinin belirlenmesine dönük önceki çalışmalar ya *M. sativa* subsp. *falcata* alttürüne ait popülasyonlara [41] ya da diploid alttürlerle odaklanmıştır [27]. Tetraploid melez alttür olan *M. sativa* subsp. *varia* alttürüne ait popülasyonların ploidi seviyeleri bilinmemektedir. Bu çalışma ile Türkiye'de yetişen *Medicago sativa* subsp. *varia*'nın ploidi düzeyleri ve DNA miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın iki alana katkı sunması beklenmektedir: (i) *M. sativa* subsp. *varia* olarak sınıflandırılan popülasyonların doğru sınıflandırılıp sınıflandırılmadıkları tespit edilecek ve (ii) bu alt türe ait popülasyonların ıslah çalışmalarında etkin kullanılabilmeleri için genetik özelliklerinin daha da aydınlatılmasını sağlayacaktır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Bitki Materyalleri

Bu çalışma ile dünyadaki en büyük genetik kaynak rezervine sahip USDA-GRIN sistemindeki yonca populasyonlarından 25 adet varyetenin ploidi düzeyinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *M. sativa* subsp. *varia* 'ya ait varyetelerden yerel olarak değerlendirilen ve Türkiye'den 1940'lı yıllarda değişik bölgelerden toplanan 25 adet varyete seçilerek (Çizelge 2.1) tohumları istendi. Ploidi düzeyinin belirlenmesi için her populasyondan 3 adet bitki kullanıldı.

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan *M. sativa* subsp. *varia* 'ya ait populasyonlar ile bu populasyonların toplandığı yerler ve kullanılan bitki sayısı

No	Aksesyon	Alttür	Toplandığı Bölge	Kullanılan Bitki Sayısı
1	PI 171719	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Tokat/Türkiye	3
2	PI 172429	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Ardahan/Türkiye	3
3	PI 206281	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Sivas/Türkiye	3
4	PI 206282	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Sivas/Türkiye	3
5	PI 238145	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Tunceli/Türkiye	3
6	PI 238150	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Sivas/Türkiye	3
7	PI 238151	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Sivas/Türkiye	3
8	PI 383693	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Pertek/Türkiye	3
9	PI 464800	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Sivas/Türkiye	3
10	PI 464801	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Elazığ/Türkiye	3
11	PI 464802	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Bingöl/Türkiye	3
12	PI 464803	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Kars/Türkiye	3
13	PI 464804	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Kars/Türkiye	3
14	PI 464805	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Kars/Türkiye	3
15	PI 464806	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Kars/Türkiye	3
16	PI 464807	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i>	Kars/Türkiye	3

Çizelge 2.1 (Devam) Çalışmada kullanılan *M. sativa* subsp. *varia* 'ya ait populasyonlar ile bu populasyonların toplandığı yerler ve kullanılan bitki sayısı

No	Aksesyon	Alttür	Toplandığı Bölge	Kullanılan Bitki Sayısı
17	PI 464808	Medicago sativa subsp. varia	Kars/Türkiye	3
18	PI 464809	Medicago sativa subsp. varia	Erzincan/Türkiye	3
19	PI 464810	Medicago sativa subsp. varia	Sivas/Türkiye	3
20	PI 464811	Medicago sativa subsp. varia	Sivas/Türkiye	3
21	PI 464812	Medicago sativa subsp. varia	Yozgat/Türkiye	3
22	PI 464813	Medicago sativa subsp. varia	Yozgat/Türkiye	3
23	PI 464814	Medicago sativa subsp. varia	Ankara/Türkiye	3
24	PI 577511	Medicago sativa subsp. varia	Erpeler/Türkiye	3
25	PI 5577512	Medicago sativa subsp. varia	Erzincan/Türkiye	3
26	Buldog 505	Medicago sativa subsp. sativa	Tetraploid Standart	2
27	CADL	Medicago sativa subsp. sativa	Diploid Standart	1

Ayrıca ploidi düzeyi belirlenirken daha önce hem kromozom sayımı metodu hem flow sitometri hem de markör profilleri aracılığıyla ploidi düzeyleri tespit edilmiş biri diploid (CADL) diğeri tetraploid (Buldog 505) iki yonca bitkisi standart olarak kullanıldı. DNA miktarlarının hesaplanmasında ise önceden DNA miktarı ölçümü için domates bitkisi standart olarak kullanıldı.

2.2. Örneklerin Hazırlanması

Yaklaşık bir aylık *M. sativa* subsp. *varia* fidelerinin genç yapraklarından alınmış yaklaşık 15 µg doku ile domates bitkisinden alınan 10 µg doku kullanıldı. Bitki dokuları, hücre çekirdeklerinin ayıklanması amacıyla tek taraflı neşterler aracılığıyla içerisinde doğrama tamponu bulunan petri kapları içinde doğrandı. Doğrama sonrasında bitki kalıntıları ile çekirdek ihtiva eden tampon 20 µm süzme aralıklarına sahip filtreden geçirilerek çekirdeklerin bitki doku kalıntılarından ayrılması sağlandı. Tampon ile çekirdek karışımının ayrılması için bu kombinasyon bir kaç saniye santrifüj edildi ve süpernatant dökülüp hücre çekirdeklerinden oluşan pelet 500 µl Propidium İyodür (PI)

çözültüsünün içerisinde yeniden çözdürüldü. Dokulardan hücre çekirdeklerinin ayıklanması ve boyanması işlemi Namık Kemal Üniversitesi (Tekirdağ) Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Sitogenetik laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmanın tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi ve analizlere kadar hazırlanmış örnekler karanlıkta muhafaza edildi.

Çalışmanın moleküler ölçüm aşaması Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Hematoloji Bölümü'nde tamamlandı. Burada ölçüme hazırlanmış olan domates-yonca hücre çekirdekleri flow sitometri (Beckman Coulter Cytomics FC 500 series Flow Cytometry) ile tek tek okutulduktan sonra veriler kaydedildi.

Daha önce yapılmış çalışmalarda ploidi düzeyi tespit edilmiş bir diploid ve bir tetraploid yonca standart olarak kullanıldı. Flow sitometri analizlerinde flow cytometer cihazı çekirdek sayısını floresans seviyesinin bir fonksiyonu olarak grafiğe dökmektedir. Sonuç olarak her iki standart bitki birer tane pik oluşturur ve tetraploid pik daha yüksek floresans seviyesine sahiptir. Her bir bitkinin flow sitometri sonucu oluşturduğu pik, bu standart pikler ile karşılaştırılarak ploidi düzeyi belirlendi.

2.3. Yoncanın Sahip Olduğu DNA Miktarının Hesaplanması

DNA miktarının tespiti, yonca ve domates bitkilerinin floresans yoğunlukları doğru orantı ile hesaplanıp karşılaştırılarak yapıldı. Örnek bitkinin floresans yoğunluğunun standart bitkinin floresans yoğunluğuna oranı, standart bitkinin DNA miktarı ile çarpılarak DNA miktarı aşağıdaki formüle göre tayin edildi.

$$\text{DNA miktarı} = \frac{\text{Örnek Bitkinin Floresans Yoğunluğu}}{\text{Standart Bitkinin Floresans Yoğunluğu}} \times \text{Standart Bitkinin DNA Miktarı}$$

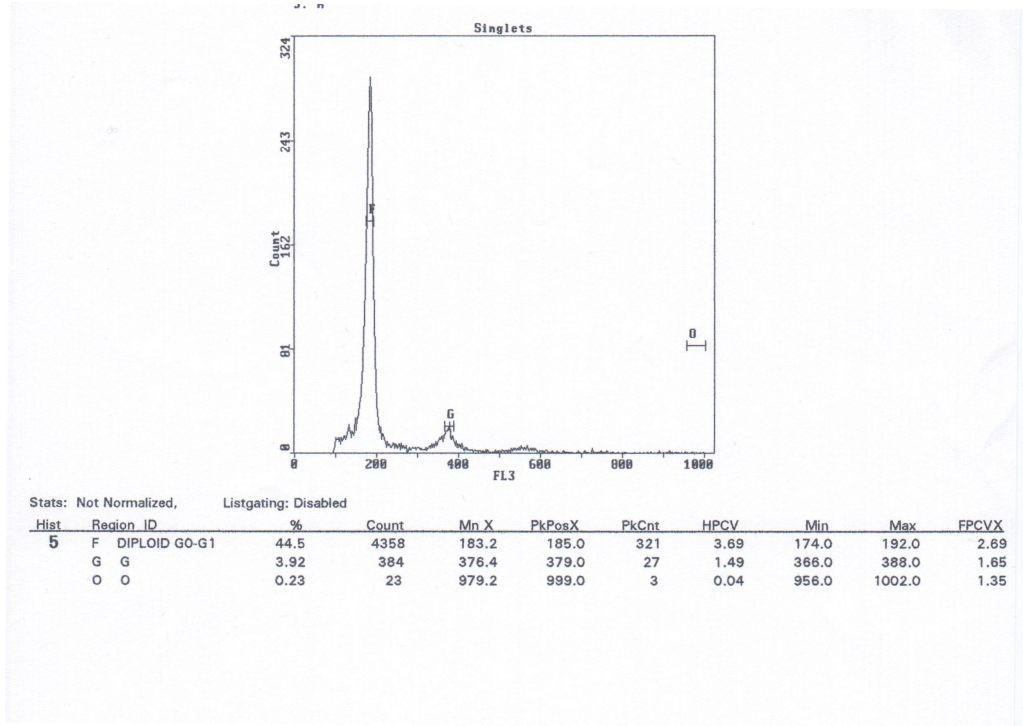
Standart olarak kullanılan domates bitkisinin net floresans sinyalleri sağlamada etkisiz kaldığı durumlarda piklerin karşılaştırılması yapılamadığından DNA miktarları

saptanamadı. Bu yüzden 12 aksesyonun DNA miktarları üç bitkiden elde edilirken 7 aksesyonun DNA miktarları iki bitkiden ve 6 aksesyonun DNA miktarları ise o aksesyonu temsilen bir bitkiden alındı.

3. BULGULAR

3.1. Ploidi Düzeyi

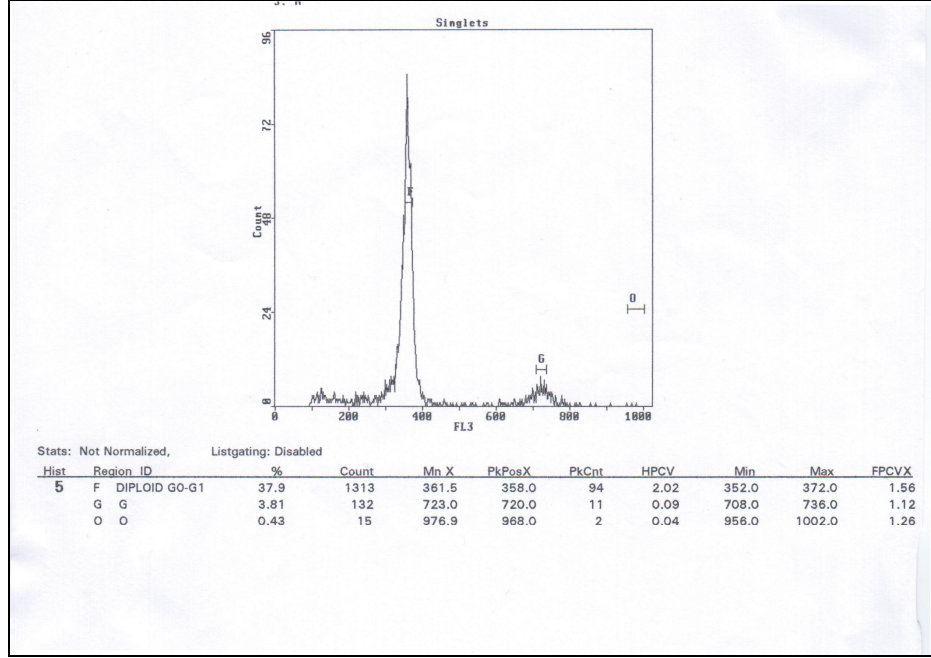
Diploid (CADL) ve tetraploid (Buldog 505) standart bitkilerin oluşturduğu floresans yoğunluğu ölçüldüğünde diploid standardın 183 nm’de pik yaptığı (Şekil 3.1) gözlemlenirken, tetraploid standardın yaklaşık 361 nm’de pik yaptığı (Şekil 3.2) gözlemlendi.



Şekil 3.1. Diploid standart CADL bitkisinde çekirdek sayısının fonksiyonu olarak floresans yoğunluğu (nm)

Diploid bitkinin floresans yoğunluğu yaklaşık olarak tetraploid bitkinin floresans yoğunluğunun yarısı kadar oldu. Standart bitkilerin floresans yoğunluğu ile karşılaştırılan tüm *M. sativa* subsp. *varia* populasyonlarının tüm genotiplerin (bitkilerin) floresans yoğunluğunun tetraploid yoğunluğa eşit olduğu tespit edildi. Yani tüm

aksasyonların tetraploid olduğu tespit edildi. Hiç bir populasyon için populasyon içi ploidi düzeyi varyasyonlarına rastlanmadı.



Şekil 3.2. Tetraploid standart (Buldog 505) bitkisinde çekirdek sayısının fonksiyonu olarak floresans yoğunluğu (nm)

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan populasyonların kromozom sayıları

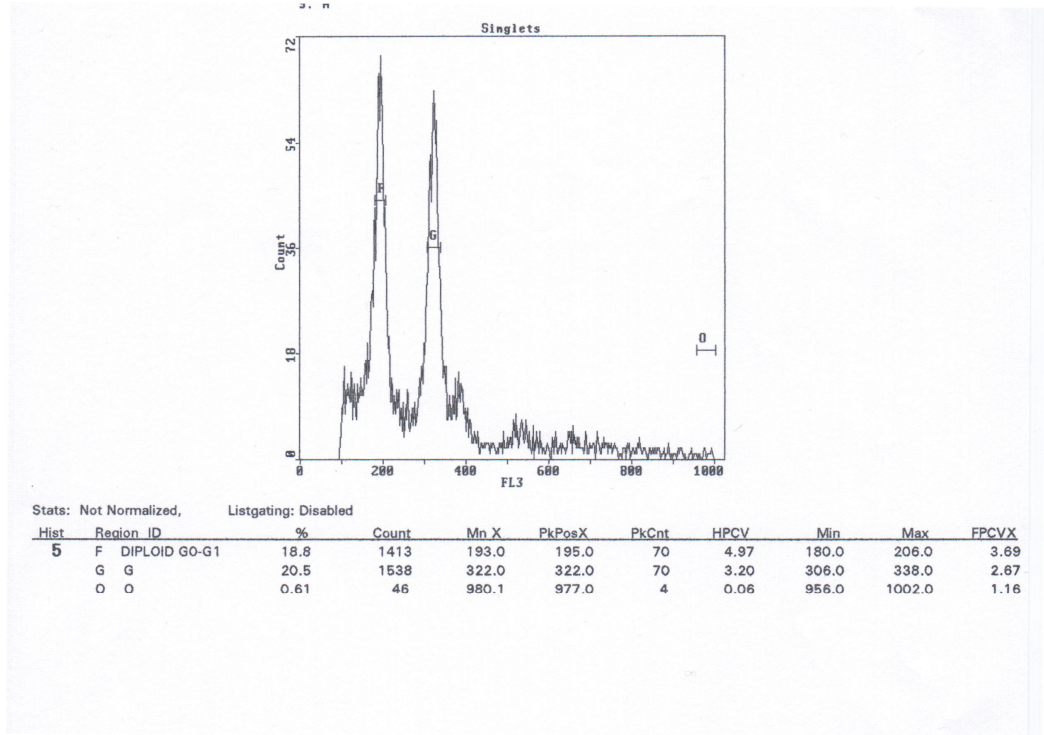
No	Aksasyon	Alt tür	Kromozom Sayısı
1	PI 171719	Medicago sativa subsp. varia	32
2	PI 172429	Medicago sativa subsp. varia	32
3	PI 206281	Medicago sativa subsp. varia	32
4	PI 206282	Medicago sativa subsp. varia	32
5	PI 238145	Medicago sativa subsp. varia	32
6	PI 238150	Medicago sativa subsp. varia	32
7	PI 238151	Medicago sativa subsp. varia	32
8	PI 383693	Medicago sativa subsp. varia	32
9	PI 464800	Medicago sativa subsp. varia	32
10	PI 464801	Medicago sativa subsp. varia	32
11	PI 464802	Medicago sativa subsp. varia	32
12	PI 464803	Medicago sativa subsp. varia	32

Çizelge 3.1. (Devam) Çalışmada kullanılan populasyonların kromozom sayıları

No	Aksesyon	Alttür	Kromozom Sayısı
13	PI 464804	Medicago sativa subsp. varia	32
14	PI 464805	Medicago sativa subsp. varia	32
15	PI 464806	Medicago sativa subsp. varia	32
16	PI 464807	Medicago sativa subsp. varia	32
17	PI 464808	Medicago sativa subsp. varia	32
18	PI 464809	Medicago sativa subsp. varia	32
19	PI 464810	Medicago sativa subsp. varia	32
20	PI 464811	Medicago sativa subsp. varia	32
21	PI 464812	Medicago sativa subsp. varia	32
22	PI 464813	Medicago sativa subsp. varia	32
23	PI 464814	Medicago sativa subsp. varia	32
24	PI 577511	Medicago sativa subsp. varia	32
25	PI 5577512	Medicago sativa subsp. varia	32
26	Buldog 505	Medicago sativa subsp. sativa	32
27	CADL	Medicago sativa subsp. sativa	16

3.2. DNA Miktarının Tespiti

Yoncanın tetraploid hibrit alttürü olan *M. sativa* subsp. *varia*'yanın DNA miktarını tespit edebilmek için bitkilerde standart olarak kullanılmaya başlanan ve DNA miktarı bilinen domates bitkisi (*Solanum lycopersicum* L.) ile karşılaştırıldı (Şekil 3.3). Hepsi tetraploid olarak kayda geçirilen alttür *varia*'ya ait populasyonlarının DNA miktarlarının yaklaşık olarak domatesin DNA miktarının 1.7 katı kadar olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.2). Domatesin DNA miktarı daha önceki referans çalışmalarda 1.90 pg olarak ölçülmüştü.



Şekil 3.3. Domates (*Solanum lycopersicum* L.) ile *M. sativa* subsp. *varia*'ya ait bir bitkinin floresans yoğunluğunun karşılaştırması

Standart olarak kullanılan domates bitkisine ait floresans düzeyleri tam olarak tespit edilemediği için ploidi düzeyinin ölçülmesi amacıyla her bir aksesyondan seçilen 3 bitkinin tamamının DNA miktarları ölçülememi. Böylece DNA miktarları gösterilen aksesyonların bazıları sadece bir ya da iki birey ile temsil edildiler (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *Medicago sativa* subsp. *varia*'ya ait bitkiler ile standart domates bitkisinin floresans yoğunlukları ve *varia* alttürüne ait bitkilerin DNA miktarı (pg)

No	Aksesyon	Standardın	Örneğin	DNA Miktarı (pg)
		Floresans Yoğunluğu	Floresans Yoğunluğu	
1	PI 171719	212	370	3.31
		202	349	3.29
		234	380	3.08
2	PI 172429	219	359	3.12
		237	386	3.10
		228	383	3.20

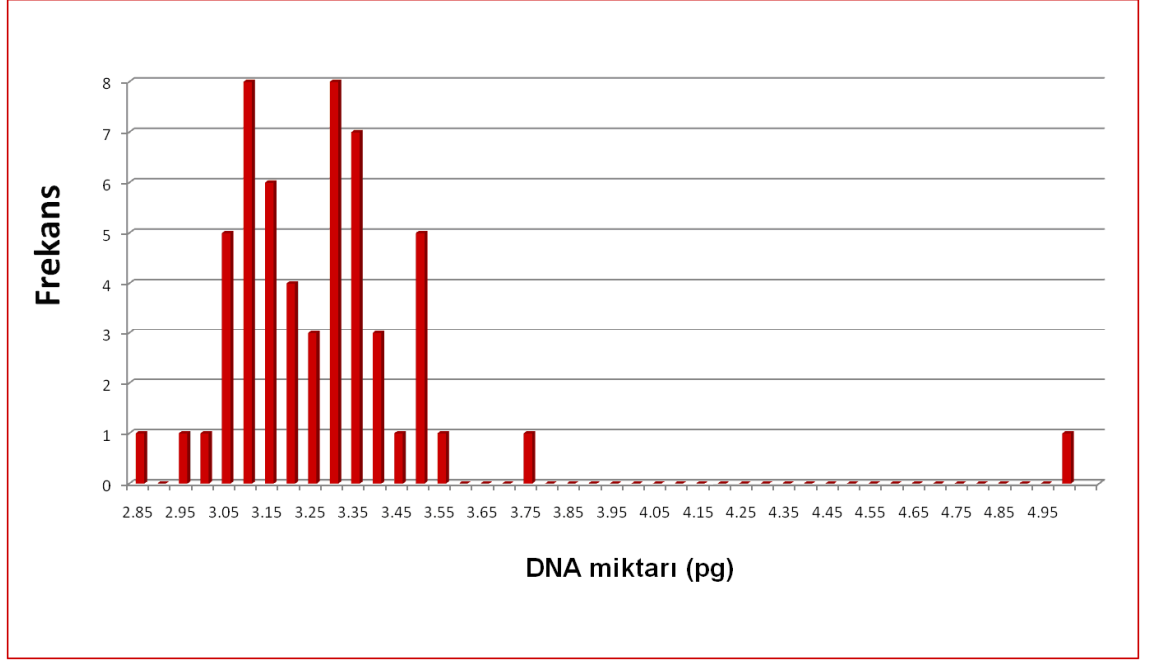
Çizelge 3.2. (Devam) *Medicago sativa* subsp. *varia*'ya ait bitkiler ile standart domates bitkisinin floresans yoğunlukları ve *varia* alttürüne ait bitkilerin DNA miktarı (pg)

No	Aksesyon	Standardın	Örneğin	DNA Miktarı (pg)
		Floresans Yoğunluğu	Floresans Yoğunluğu	
3	PI 206281	183	315	3.27
		182	312	3.26
4	PI 206282	191	328	3.26
5	PI 238145	212	387	3.47
		220	361	3.12
		204	319	2.97
6	PI 238150	211	364	3.28
		208	360	3.29
7	PI 238151	140	210	2.85
		225	371	3.13
		211	358	3.22
8	PI 383693	203	356	3.33
		201	365	3.45
		190	334	3.35
9	PI 464800	199	351	3.34
		201	366	3.46
10	PI 464801	213	372	3.32
		197	343	3.31
		203	336	3.15
11	PI 464802	207	347	3.18
		178	324	3.46
		153	243	3.02
12	PI 464803	212	416	3.72
13	PI 464804	206	365	3.37
		210	372	3.37
14	PI 464805	188	305	3.08
15	PI 464806	198	339	3.26

Çizelge 3.2. (Devam) *Medicago sativa* subsp. *varia*'ya ait bitkiler ile standart domates bitkisinin floresans yoğunlukları ve *varia* alttürüne ait bitkilerin DNA miktarı (pg)

No	Aksesyon	Standardın	Örneğin	DNA Miktarı (pg)
		Floresans Yoğunluğu	Floresans Yoğunluğu	
16	PI 464807	167	271	3.08
		254	409	3.06
		196	351	3.40
17	PI 464808	226	385	3.23
18	PI 464809	212	358	3.20
		230	373	3.08
		228	366	3.05
19	PI 464810	225	356	3.01
20	PI 464811	191	303	3.01
		248	396	3.04
		235	376	3.05
21	PI 464812	221	366	3.15
		218	353	3.08
		193	297	2.92
22	PI 464813	184	341	3.52
		177	325	3.49
23	PI 464814	195	512	4.99
		192	323	3.20
24	PI 577511	202	351	3.30
		195	322	3.14
25	PI 5577512	229	405	3.35
		202	331	3.12
		204	353	3.29
Ortalama		212	370	3.25
St. Sapma		21	43	0.29

PI 464818 nolu aksesyona ait bir bitkinin içerdiği DNA miktarı beklenenin çok üstünde yaklaşık olarak 5 pg civarında ölçüldü. Bunun dışında tüm populasyonların DNA miktarları ortalamamın iki standart sapma birimi içerisinde kaldıkları gözlemlendi.



Şekil 3.4. *Medicago sativa* subsp. *varia*'ya ait bitkilerin DNA miktarlarının frekans grafiği (Histogram)

4. TARTIŞMA

Kültür yoncasının dahil olduğu taksonomik kompleks olan *Medicago sativa-falcata* kompleksi içerisindeki birimleri ayırmada ploidi düzeyi oldukça önemli bir kriteridir. ABD Tarım Bakanlığı (USDA) Ulusal Bitki Genetik Kaynaklar Sistemi (NPGS-GRIN) ekonomik öneminden dolayı yoncanın tüm yabancı ve ekilen formlarını kapsayan bir genetik koleksiyon toplamış durumdadır. Doğal olarak bu koleksiyon *Medicago sativa-falcata* kompleksi içerisindeki tüm birimleri kapsayacak kadar geniştir. Bu taksonomik birimler son zamanlarda alttür olarak kabul görmüşlerdir. Esas belirleyici kriterlerden olan çiçek rengi ve meyve şeklinin ayırt edici olabilmesi için bitkilere ait ploidi düzeyinin bilinmesi zorunludur. Ne varki bu büyük koleksiyonun içerisindeki populasyonların ploidi düzeyi genellikle bilinmemektedir. Bu durumda yapılan taksonomik ayrışma ise kesin olamamaktadır. Nitekim daha önce yapılan iki çalışmada da bir çok aksesyonun yanlış sınıflandırıldığı görülmüştür [27,41]. İlk çalışma daha çok alttür *sativa* ve *falcata* 'ya yoğunlaşırken [41] ikinci çalışma ise sadece diploid alttürlerle yoğunlaşmış [27] ve *Medicago sativa* subsp. *varia* tamamıyla gözardı edilmişti. Bu çalışma ile *Medicago sativa* subsp. *varia* 'nın ploidi düzeyi ilk defa ölçülmüş oldu. Tüm varyetelerin tetraploid çıkması en azında ploidi düzeyi seviyesinde bu populasyonların doğru olarak tasnif edilmiş olduğunu göstermektedir. Bunun bir sebebi her ne kadar bu populasyonlar alttür *varia* olarak sınıflandırılmış olsalar da aynı zamanda yerel ırk olarak da kayıt altına alınmışlardır. Dolayısıyla, ekilmiş materyalden elde edildikleri için de tamamının tetraploid çıkması şaşırtıcı değildir. Ayrıca yoncada sık rastlanan populasyon içi ploidi düzeyi varyasyonlarına da rastlanmadı.

Ancak ploidi düzeyinin tespiti alttürü belirlemede yeterli olmadığı için bu aksesyonlara ait bitkilerin çiçek rengi ile meyve şeklinin de ölçülmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın devamında bu iki morfolojik karakter de ölçülerek bu populasyonların tam tasnifi yapılacaktır.

Değişik ploidi düzeyleri arasında çaprazlamalar yapmak oldukça sınırlı sayıda ve ancak indirgenmemiş gametler aracılığıyla olmaktadır ve bu sadece ploidi düzeyleri arasındaki

gen akışı için uygun bir methoddur. Oysa ki yonca gibi sentetik varyetelerde varyete içi bariyersiz gen akışı ve geniş temelli çaprazlamalar zaruridir. Ploidi düzeyinin tespitinin en büyük katkısı bu materyalin tetraploid olduğunun teyid edilmesi ve dolayısıyla ıslah programlarında kullanılabilmelerinin önü açılması olmuştur.

Bu çalışma yoncanın DNA miktarı ile Flow Sitometri yöntemi kullanılarak yapılmış bilindiği kadarıyla ilk karşılaştırmalı çalışmadır. Yoncanın DNA miktarı diploidlerde yaklaşık olarak domatese eşit çıkarken (1.90pg), tetraploidlerde ise diploidlerin 1.7 katı olarak 3.25pg dolayında tespit edilmiştir. Ancak bu değerler *Medicago sativa* subsp. *varia* 'ya ait değerler olup genelleştirilemeyebilirler. Nitekim PI 464818 nolu aksesyona ait bir bitkinin içerdiği DNA miktarı beklenin çok üstünde yaklaşık olarak 5pg olarak ölçülmesi *Medicago sativa-falcata* kompleksinde aynı ploidi düzeyine sahip alttürler arasında DNA miktarı açısından farklar görülebileceğini de göstermektedir. Daha önce kromozom düzeyinde yapılmış çalışmalarda eşit ploidi seviyelerinde kromozom bantlanma figürlerinde ve kromozom boyutlarında değişiklikler rapor edilmiştir [48] ve bu değişikliklerin DNA miktarına yansımalarının araştırılması alttür düzeyinde DNA miktarındaki (varsa) değişiklik için aydınlatıcı olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Michaud, R., W.F. Lehman, et al, "World Distribution And Historical Development", p.25–56. In A. A. Hanson, et al., eds. Alfalfa and alfalfa improvement. ASA-CSSA-SSSA, ISBN: 0-89118-094-X, Madison, WI, 1988.
- [2] Barnes, F.R., and Gordon, C.H., "Alfalfa Science and Technology. Ed.by Hanson. Madison, Wisconsin, ISBN: 89118.USA, 1972.
- [3] Yeşil, M., "Türkiye'nin Değişik Yörelere Toplanan Yonca Ekotiplerinin Bazı Morfolojik ve Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma", Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.
- [4] Uluocak, N., 1984. "Toprak Koruması ve Yem Niteliği Bakımından Türkiye'nin Önemli Doğal Otlak Bitkileri", İstanbul Üniv. Orman Fak. Yay. 3198, s:29-30 İstanbul.
- [5] Gençkan, M.S., 1983. "Yem Bitkileri Tarımı", İzmir, Ege Üniv. Ziraat Fak. Yay. No: 464519. s5-s6.
- [6] Koyuncu, N., 2008. "Farklı MS Dozlarının Buğdayda (*Triticum* sp.) Doku Kültürü Parametrelerine Etkileri", Tarım Bilimleri Dergisi 14 (1), s82-s86.
- [7] Soya, H., Avcıoğlu, R., vd, "Yem Bitkileri", Hasad Yayıncılık, sayfa 223, 2004.
- [8] Elçi, Ş. ve Açıkgöz, E., "Baklagil (Leguminosae) ve Buğdaygil (Gramineae) Yembitkileri, Tanıtma Klavuzu", Tigem Yayınları, Afşaroğlu Matbaası, Ankara, 1993.
- [9] Kır, B., Soya, H., 2008. "Kimi Mer'a Tipi Yonca Çeşitlerinin Bazı Verim ve Kalite Özellikleri Üzerinde Bir Araştırma", Ege Üniv Ziraat Fak Derg, 45 (1), s11-s19,
- [10] Açıkgöz, E., 2001. Yem bitkileri. III. Baskı, U.Ü. Güçlendirme Vakfı yay. No: 182, Bursa, 584 s.
- [11] Hanson, A.A., Barnes, D.K., et al, "Alfalfa and Alfalfa Improvement", The American Society of Agronomy, Monograph No:29, ISBN 0-89118-094-X, 1988.
- [12] Lowe, C. C., Marble, W. L., et al, "Alfalfa Adaptation, Varieties and Usage", Amer Soc Agron Inc, Madison, Wisconsin, USA, 1972.
- [13] Smith, D., Marten, G. G., et al, "Dry Matter Yields of Vernal and Du Puits Alfalfa", Res Rep, Div Col Ag and Life Science, 1968.
- [14] Erişen, S., 2005. "Yonca (*Medicago sativa* L.)'da somatik embriyogenesis aracılığıyla bitki rejenerasyonu", Tarım Bilimleri Dergisi, 11(3), s311-s315.

- [15] Tülücü, K., “Özel Bitkilerin Sulanması”, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü, Genel Yayın No:254, Ders Kitapları Yayın No: A-82, Adana, 2003.
- [16] Acar, Z., Ayan, İ., “Yem Bitkileri Kültürü”, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, No: 2 (2. Baskı), Samsun, 2004.
- [17] Elçi, Ş., “Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri”, TC Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara, 2005.
- [18] Özgen, M., vd., “Bitkisel Gen Kaynaklarının Korunma ve Kullanımında Yeni Yaklaşımlar”, Türkiye Ziraat Mühendisliği 5. Teknik Kongresi, 259-284, Ankara, 17-21, Ocak 2000.
- [19] Avcıoğlu, R., Soya, H., Açıkgöz, E. ve Tan, A., “Yem Bitkileri Üretimi”, Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, (1), 567-586, Milli Kütüphane, Ankara, 17-21, Ocak 2000.
- [20] Yolcu, H., ve Tan, M., 2008. “Ülkemiz Yem Bitkileri Tarımına Genel Bir Bakış”, Tarım Bilimleri Dergisi 14(3), s303-s312.
- [21] Ball, D. M., Hoveland, C. S., et al, “Forage Quality”, In: Southern Forages (2nd edition). p. 124-132. Potash and Phosphate Institute and Foundation for Agronomic Research, Norcross, GA, 1996.
- [22] Moore, J. E. and Undersander, D. J., “Relative Forage Quality: Alternative to Relative Feed Value and Quality Index”, Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, p.16 -32 (2002).
- [23] Redfearn, D., H. Zhang., et al, 2006. <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2557/F-2117web.pdf> Forage Quality Interpretations. Oklahoma Cooperative Extension Service F-2117. (Erişim Tarihi: Mart 2009).
- [24] Rohweder, D. A., Barnes, R. F., et al, “Proposed Hay Grading Standards Based on Laboratory Analyses for Evaluating Quality”, Journal of Animal Science 47, s747-s759 (1978).
- [25] Canbolat, Ö., Karaman, Ş., 2009. “Bazı Baklagil Kaba Yemlerinin *in Vitro* Gaz Üretimi, Organik Madde Sindirimi, Nispi Yem Değeri ve Metabolik Enerji İçeriklerinin Karşılaştırılması”, Tarım Bilimleri Dergisi 5(2), s188-s195.

- [26] Quiros, C.F. and Bauchan, G. R., “The Genus *Medicago* and the Origin of the *Medicago sativa* Complex”, p. 93-124, In A. A. Hanson, et al., eds. Alfalfa and alfalfa improvement. ASA-CSSA-SSSA, ISBN: 0-89118-094-X, Madison, WI, 1988.
- [27] Şakiroğlu, M., “Inferring Population Structure and Genetic Diversity of Broad Range of Wild Diploid Alfalfa (*Medicago Sativa* L.)Accessions Using SSR Markers”, Theoretical and Applied Genetics (Baskıda), 2010.
- [28] Havananda, T., “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).
- [29] Quiros, C. F., “Alfalfa, luzerne (*Medicago sativa* L.)”, p.253-294. In S.D. Tanksley and T.J. Orton (ed). Isozymes in plant genetics and breeding, Part B. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1983.
- [30] Riday, H. and Brummer, E. C., “Heterosis in a Broad Range of Alfalfa Germplasm”, Crop Sci 45: 8–17 (2005).
- [31] Riday, H. and Brummer, E. C., “Forage Yield Heterosis in Alfalfa”, Crop Sci 42, s716–s723 (2002).
- [32] Koç, A. ve M. Tan, “Erzurum Meralarında Doğal Olarak Yetişen Melez Yonca (*Medicago varia* L.)’nın Bazı Özellikleri”, Türkiye 3. Çayır-Mera ve Yem Bitkileri Kongresi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, s621-s626, Erzurum, 17-19 Haziran 1996.
- [33] Barnes, D. K., Bingham, E. T., et al, “Alfalfa Germplasm in the United States: Genetic Vulnerability, Use, Improvement and Maintenance”. U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 1571, U.S. Printing Office, 1977.
- [34] Ellstrand, N. C., Prentice, H. C., et al “Gene Flow and Introgression from Domesticated Plants into Their Wild Relatives”, Annu Rev Ecol Syst 30, s539-s563 (1999).
- [35] Stokstad, E. L., “A Little Pollen Goes A Long Way”, Science 296, s2314 (2002).
- [36] Conner, J. K., “Genetic Mechanisms of Floral Trait Correlations in A Natural Population”, Nature 420, s407-s410 (2002).
- [37] Karaca, M., 2002. “Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Linked to the Ligon Lintless (Li(1)) Mutant in Cotton”, J Hered 93, s221-s224.

- [38] Doyle, J. J. and Luckow, M. A., “The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in A Phylogenetic Context”, *Plant Physiol* 131, s900-s910 (2003).
- [39] Tiryaki, İ., 2005. “Genetik Yapısı Değiştirilmiş Bitkiler: Dünü, Bugünü ve Geleceği”, *OMÜ Zir Fak Derg* 20(2), s121-s126.
- [40] Balkaya, A. ve Yanmaz, R., 2001. “Bitki Genetik Kaynaklarının Muhafaza imkanları ve Tohum Gen Bankalarının Çalışma Sistemleri”, *Ekoloji Çevre Dergisi* 10(39), s25-s30.
- [41] Brummer, E. C., et al., “Ploidy Determination of Alfalfa Germplasm Accessions Using Flow Cytometry”, *Crop Science* 39(4), s1202 (1999).
- [42] Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., vd, “Haploid Bitki Üretimi”, *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt:1, Ed: Babaoğlu, M., Özcan, S., Gürel, E., 137-189, ISBN 975-6652-04-7, 2002.
- [43] Galbraith, D.W., “Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues”, *Science* 220, s1049-s1051 (1983).
- [44] De Laat, A. M. M., et al., “Determination of Ploidy of Single Plants and Plant Populations by Flow Cytometry”, *Plant Breed* 99, s303-s307, 1987.
- [45] Tuna, M., “DNA Content and Ploidy Determination of Bromegrass Germplasm Accessions by Flow Cytometry”, *Crop Science* 41(5), s1629 (2001).
- [46] Blondon, F., “Genome Size and Base Composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* Species”, *Genome* 37(2), s264-s270 (1994).
- [47] Şakiroğlu, M., J.J. Doyle, et al “The population genetic structure of diploid *Medicago sativa* L. germplasm. In C. Huyghe, ed. XXVIII Meeting of Eucarpia Fodder Crops and Amenity Grasses Section”. Springer, Berlin, 2010.
- [48] Bauchan, G. R., Hossain, M.A., “Karyotypic Analysis of C-Banded Chromosomes of Diploid Alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *caerulea* and ssp. *falcata* and Their Hybrid”, *Journal of Heredity*. 88(6):533 (1997).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Müge MAVİOĞLU KAYA

Doğum Yeri: Bursa

Doğum Tarihi: 11.05.1984

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Bursa Cumhuriyet Lisesi (YDA)

Lisans: Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim
Dalı, Moleküler Biyoloji Alanı