



**BAZI KORUNGA HATLARININ  
MİKROSATELLİT (SSR) BELİRTEÇLERİ İLE  
GENETİK KARAKTERİZASYONU**

**Tuğba SÜTÇÜ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN**

**2020**

**T.C.**  
**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI KORUNGA HATLARININ MİKROSATELLİT (SSR)  
BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK KARAKTERİZASYONU**

**Tuğba SÜTÇÜ**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN**

**TEKİRDAĞ-2020**

**Her hakkı saklıdır.**



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Tuğba SÜTÇÜ



Bu tez TÜBİTAK tarafından TÜBİTAK-TOVAG 2150526 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN danışmanlığında, Tuğba SÜTÇÜ tarafından hazırlanan “Bazı Korunga Hatlarının Mikrosatellit (SSR) Belirteçleri ile Genetik Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından 15.01.2020 tarihinde Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Metin TUNA

*İmza:*

Üye : Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ

*İmza:*

Üye : Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN (Danışman)

*İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ  
Enstitü Müdürü

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

## BAZI KORUNGA HATLARININ MİKROSATELLİT (SSR) BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK KARAKTERİZASYONU

**Tuğba SÜTÇÜ**

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN

*Onobrychis viciifolia* Scop. (korunga) farklı ekolojik bölgelere uyum sağlamış, ülkemizde özellikle Orta ve Doğu Anadolu'da tarımı yapılan çok yıllık baklagil türüdür. Korunga zengin protein içeriği, kıraç ve kireçli topraklarda kolaylıkla yetişme, abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklılık gibi önemli özelliklere sahip bir yem bitkisidir. Bu tez çalışmasında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tarla Bitkileri deneme alanından örneklenen 83 korunga hattı 10 SSR primeri (OVK036, OVK046, OVK094, OVK101, OVK125, OVK161, OVK174, OVM033, OVM061 ve OVM125) kullanılarak karakterize edilmiştir. Çalışmada kullanılan SSR lokuslarının tamamı polimorfik olarak saptanmıştır. Analiz edilen 83 örnekte 10 SSR lokusu için toplam 92 allel saptanmıştır. Ortalama gözlenen allel sayısı 9,2 olarak hesaplanmıştır. Genetik çeşitlilik parametrelerinden, Shannon Sabiti ( $H=0,375$ ), Nei'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri ( $uh=0,243$ ) ve ortalama polimorfik bilgi içeriği ( $PIC=0,240$ ) olarak hesaplanmıştır. Genetik mesafe değerleri kullanılarak UPGMA kümelendirme yöntemi ile dendrogram oluşturulmuş ve çalışılan korunga aksesyonlarının 2 ana kümeye ayrıldığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, çalışılan korunga hatlarının genetik yapıları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Korungada yapılan bu tez çalışmasından elde edilen genetik veriler korunga ıslah çalışmalarına ve geliştirilecek yeni çeşitlerin tarıma kazandırılmasına katkılar sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Korunga, Genetik karakterizasyon, *Onobrychis viciifolia*, SSR, UPGMA

2020, 62 sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

GENETIC CHARACTERIZATION OF SOME SAINFOIN LINES BY MICROSATELLITE  
(SSR) MARKERS

**Tuğba SÜTÇÜ**

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Behiye Banu BİLGEN

*Onobrychis viciifolia* Scop. (sainfoin) has been adapted to different ecological regions and cultivated especially in Central and Eastern Anatolia. Sainfoin is a forage plant with important properties such as rich protein content, easy growing in arid and calcareous soils, and also resistant to different abiotic stress conditions. In this thesis, characterization of 83 sainfoin lines was performed by using 10 SSR primers (OVK036, OVK046, OVK094, OVK101, OVK125, OVK161, OVK174, OVM033, OVM061, and OVM125). All SSR loci used in our study were found to be polymorphic. A total of 92 alleles were detected for 10 SSR loci. The mean observed number of alleles was calculated as 9.2. Among the genetic diversity parameters, Shannon Index ( $I=0.375$ ), unbiased genetic diversity value ( $uh=0.243$ ) and mean polymorphic information content ( $PIC=0.240$ ) were calculated. Dendrograms were built by UPGMA clustering method using genetic distance values and it was observed that the studied sainfoin lines were divided into two main clusters. The results obtained from our study provide significant information about the genetic structures of the studied sainfoin lines. Genetic data obtained from our study will contribute to sainfoin breeding studies and gain new varieties to agriculture.

**Key words:** Sainfoin, Genetic Characterization, *Onobrychis viciifolia*, SSR, UPGMA

2020, 62 pages

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>3</b>
2.1. Korunga Bitkisi.....	3
2.2. Korunga Bitkisinin Önemli Özellikleri .....	5
2.3. Korunganın Arı ile İlişkisi .....	6
2.4. Korunganın Türkiye’deki Ekonomik Önemi.....	7
2.5. Korunga Bitkisinde Yapılmış Çalışmalar .....	8
2.5.1. Morfolojik Çalışmalar .....	8
2.5.2. Genetik Karakterizasyon ve Çeşitlilik Çalışmaları.....	10
2.5.3. Korunga Islah Çalışmaları .....	15
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>17</b>
3.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali .....	17
3.2. Örnek Toplama ve Genomik DNA İzolasyonu .....	19
3.3. İzole Edilen DNA Örneklerinde Kalite ve Miktar Tayini .....	21
3.4. Çalışmada Kullanılan SSR Primerleri, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri ve Elektroforez.....	23
3.5. Verilerin İstatiksel Analizi.....	25
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>27</b>
4.1. Mikrosatellit (SSR) Primerlerine ait Allellerin Belirlenmesi .....	27
4.2. Genetik Çeşitlilik Parametreleri .....	37
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>40</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>45</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>53</b>



## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan korunga aksesyonları .....	17
Çizelge 3.2. Korunga genomik DNA örneklerinin miktar ve kalite ölçüm sonuçları .....	22
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılmak üzere belirlenen SSR primerlerine ait bilgiler .....	23
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan optimize edilmiş PCR koşullarına ait bilgiler .....	24
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan optimize edilmiş PCR döngülerine ait bilgiler .....	24
Çizelge 4.1. Çalışmada analiz edilen 10 SSR lokusuna ait allellerin frekansları .....	30
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan 10 SSR lokusuna ait genetik parametreler .....	37
Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan 10 SSR primerine ait PIC değerlerinin diğer çalışmalarla karşılaştırılması.....	42



## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Korunga bitkisinin genel görüntüsü .....	3
Şekil 3.1. Korunga yapraklarının Retsch® MM400 model vibrasyonlu homojenizatör ile parçalanması .....	19
Şekil 3.2. Üstteki sıvı kısmın steril 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılması.....	20
Şekil 3.3. Nanodrop® 1000 spektrofotometre ile miktar ve kalitesi ölçülmüş DNA örneği ...	21
Şekil 3.4. Thermal cycler cihazlarında DNA amplifikasyonları ve elektroforez .....	25
Şekil 4.1. OVM125, OVK094, OVK174 ve OVK046 primerlerine ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri .....	27
Şekil 4.2. OVM061, OVK101 ve OVK161 primerlerine ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri .....	28
Şekil 4.3. OVK036, OVK125 ve OVM033 primerlerine ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri .....	29
Şekil 4.4. OVK036 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü.....	31
Şekil 4.5. OVK094 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü.....	31
Şekil 4.6. OVK125 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü.....	32
Şekil 4.7. OVM033 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü .....	32
Şekil 4.8. OVK161 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü.....	33
Şekil 4.9. OVK174 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü.....	33
Şekil 4.10. OVM125 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü .....	34
Şekil 4.11. OVK046 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü.....	34
Şekil 4.12. OVK101 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü.....	35
Şekil 4.13. OVM061 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü .....	35
Şekil 4.14. Korunga aksesyonlarının SSR analizleri sonucunda genetik mesafe değerlerine göre oluşturdukları dendrogram .....	39

## **ŞİMGELER VE KISALTMALAR**

### **Şimgeler**

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
da	: Dekar
dk	: Dakika
g	: Gram
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
pmol	: Picomol
rpm	: Rounds per minute (Dakikadaki devir sayısı)
sn	: Saniye
volt	: Voltaj

## **Kısaltmalar**

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Artırılmış Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)
<i>A. tumefaciens</i>	: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Bç	: Base pair (Baz çifti)
C:I	: Chloroform Isoamylalcohol
CTAB	: Cetyl trimethylammonium bromide
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FAM	: 6-carboxyfluorescein
h	: Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik değeri
HCl	: Hidroklorik asit
I	: Shannon sabiti
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarları Arası)
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
<i>O. altissima</i>	: <i>Onobrychis altissima</i>
<i>O. arenaria</i>	: <i>Onobrychis arenaria</i>
<i>O. biebersteinii</i>	: <i>Onobrychis biebersteinii</i>
<i>O. caput-galli</i>	: <i>Onobrychis caput-galli</i>
<i>O. gracilis</i>	: <i>Onobrychis gracilis</i>
<i>O. hajastana</i>	: <i>Onobrychis hajastana</i>
<i>O. huetiana</i>	: <i>Onobrychis huetiana</i>
<i>O. hypargyrea</i>	: <i>Onobrychis hypargyrea</i>
<i>O. inermis</i>	: <i>Onobrychis inermis</i>
<i>O. tournefortii</i>	: <i>Onobrychis tournefortii</i>
<i>O. transcaucasica</i>	: <i>Onobrychis transcaucasica</i>
<i>O. viciifolia</i>	: <i>Onobrychis viciifolia</i>

PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIC	: Polymorphic Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)
PVP	: Polyvinylpyrrolidone
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış PolimorfikDNA)
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SodyumDodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektroforezi)
SSR	: Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
T.C.	: Türkiye Cumhuriyeti
TBE	: Tris-Borat-EDTA tamponu
TE Tamponu	: Tris-EDTA tamponu
uh	: Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	: Ultraviyole ışığı
vd.	: ve diğerleri

## TEŞEKKÜR

Bol ve kaliteli kaba yem üretimi hayvancılığın sürdürülebilirliği açısından son derece önemlidir. Maalesef ülkemizde kaba yem üretimi yetersiz olup, ihtiyacın ancak yaklaşık yarısını karşılayabilmektedir. Ülkemiz hayvancılığının yıllardan beri süregelen kaba yem sorunu çözüme kavuşturmanın başlıca iki yolu bulunmaktadır; 1. Ana kaba yem kaynağımız olan çayır ve meralarımızı ıslah ederek daha verimli kılmak. 2. Tarım alanlarında yem bitkilerinin ekiliş alanlarını arttırmak. Ancak, ülkemizde tarımı yapılan yem bitkisi türlerinin sayısı oldukça sınırlıdır. Ülkemiz çok farklı coğrafik özellik ve iklime sahip geniş bir tarım ülkesidir. Bu nedenle her bölge ve iklim koşuluna uygun alternatif yem bitkisi türleri belirlenmeli ve teşvik edilerek üretimleri yaygınlaştırılmalıdır.

Korunga verimi bol, protein oranı yüksek, oldukça lezzetli ve besleme değeri yüksek olan çok yıllık bir baklagil yem bitkisidir. İçerdiği tanenlerden dolayı çiftlik hayvanlarında şişkinliğe neden olmaz. Bu üstün özellikleri nedeniyle korunga hem çayır-mera karışımlarında yer almakta hemde tarla arazilerinde kaba yem üretiminde kullanılmaktadır. Tüm bunlara ek olarak bal arıları için önemli bir balözü kaynağı olması korunganın önemini arttırmaktadır.

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Metin TUNA'nın yürütücülüğünü yaptığı "Geniş Doğal Varyasyona Sahip Korunga (*Onobrychis* Miller) Genetik Kaynak Koleksiyonunun Yeni Sitogenetik Yöntemler ile Karakterizasyonu ve Trakya Bölgesine Uygun Çeşitlerin Geliştirilmesinde Kullanımı" isimli TÜBİTAK projesi kapsamında yüksek lisans tez konusu olarak önerilen bu tez çalışmasında kullandığım bitki materyalini sağlayan Prof. Dr. Metin TUNA'ya, lisans ve yüksek lisansım süresince ders ve tez çalışmalarım sırasında büyük ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve görüşlerinden yararlandığım tez danışmanım, çok değerli hocam Doç. Dr Behiye Banu BİLGİN'e içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca tezin son şeklini almasında değerli katkılarını esirgemeyen Tez Savunma Sınavı Jüri Üyesi Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ (Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü) hocama teşekkürlerimi sunarım. Yine laboratuvar çalışmalarım esnasında benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Büşra YÜRÜK'e teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca sabır ve özverilerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ocak, 2020

Tuğba SÜTÇÜ

## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun son yıllarda hızla artması gıda maddelerine olan talebin de artmasına sebep olmaktadır. Bu durum bir yandan tarımsal ürün miktarının artırılmasını bir yandan da insan tüketimine sunulan gıda maddelerinin kaliteli ve güvenli olmasını gerektirmektedir (Yağmur ve Güneş, 2010). İnsanların sağlıklı bir şekilde hayatlarını devam ettirmeleri her şeyden önce yeterli miktarda ve kalitede gıda maddelerinin temin edilmesine bağlıdır. Dengeli ve yeterli beslenme için hayvansal ve bitkisel ürünler bir bütün olarak düşünülmelidir. Ülkemizde yeterli bir şekilde beslenemeyen çiftlik hayvanlarının et ve süt verimleri düşüktür. Bu nedenle ülkemizde hayvansal ürünlerin üretimi ihtiyacı karşılamada yetersiz kalmaktadır. Bu durumda hayvansal ürün fiyatlarının yükselmesine ve vatandaşlarımızın alım gücünün üstünde gerçekleşmesine sebebiyet vermektedir. Sonuç olarak ülkemiz insanı yeterli ve dengeli beslenememektedir. Bu durumun en temel sebeplerinden birisi hayvancılığın en önemli girdilerinden biri olan kaba yem üretiminin azlığıdır. Tarla tarımı içinde yetiştirilen yem bitkileri ve doğal çayır meralar, hayvanlara ucuz, kaliteli ve bol miktarda kaba yem sağlamada önemli yem kaynakları durumundadır (Temel ve Şahin, 2011). Ruminant beslenmesinde kullanılacak kaba yemler büyük önem taşır. Kullanılacak yem kombinasyonları hayvanların yemden yararlanma derecesini artırılmasını, dolayısıyla hayvanların yemleri severek fazla miktarda tüketmelerini sağlamaktadır (Demirel, Cengiz, Çelik ve Erdoğan, 2001). Kaba yemler ucuz bir kaynak olması, geviş getiren hayvanlarda rumen mide mikroflorası için gerekli besin maddelerini içermesi, vitamin ve mineral bakımından zengin olması, hayvanların üreme gücünü artırması ve kaliteli hayvansal ürün sağlaması bakımından önemli bir yere sahiptir (Temel ve Şahin, 2011). Türkiye’de önemli bir yem kaynağı olan yem bitkileri tarımı henüz istenen seviyede değildir. Ayrıca çayır ve meralarımız yanlış ve aşırı kullanım sonucu bozulmuş ve yem verimleri oldukça düşük seviyededir. Ülkemiz doğal florası tür sayısı bakımından çok zengin olmasına karşın, kültürü yapılan yem bitkisi türlerinin sayısı son derece sınırlıdır (Gürsoy ve Macit, 2014).

*Onobrychis* cinsi, tarımsal açıdan önemli birkaç baklagil yem bitkisi türünü içermektedir. *Onobrychis viciifolia* (Korunga) ise içlerinde en yaygın olanıdır. Korunga içerdiği yüksek ham protein oranı, yüksek besin değeri ve sahip olduğu lezzetliliği ile çok yıllık önemli bir baklagil yem bitkisidir (Carbonero, Harvey, Brown ve Smith, 2011; Vasileva, Naydenova ve Stoycheva, 2019). Soğuğa ve kurağa diğer yem bitkilerine nazaran daha dayanıklı olan korunga kıraç, kireçli topraklarda iyi bir gelişme gösterir. Suyun problem olduğu birçok iklim

ve toprak şartlarında yetişebildiği için çok değerli bir münavebe bitkisidir. Korunga aynı zamanda toprak ıslahında kullanılan en önemli bitkilerden birisidir (Akçelik, 2009). Korunga dünya çapında uzun bir geçmişe sahiptir ancak batı ülkelerinde kullanımını son yıllarda azalmıştır. Yapılan son araştırmalarda korunganın tanen ve polifenol bileşimi nedeniyle antihelmintik özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Vasileva vd., 2019). Otlayan ruminantlar, rumen gazı oluşumu (şişkinlik) ve iç parazit enfeksiyonunun neden olduğu bazı hastalıklara maruz kalır. Ancak *Onobrychis* türlerinde bulunan yoğunlaşmış tanenlerin, antihelmintik özellikler sağladığı, protein kullanımını arttırdığı ve hayvanlarda şişmeyi önlediği gösterilmiştir (Piluzza, Sulas ve Bullitta, 2014; Vasileva vd., 2019).

Korunga üzerinde daha önce yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde bazı morfolojik, agronomik ve fenolojik karakterizasyon çalışmalarının değişik araştırmacılar tarafından daha önce yapıldığı fakat moleküler yöntemler ile yapılan tanımlama ve karakterizasyon çalışmalarının son derece sınırlı olduğu görülmektedir. Mikrosatellitler (SSR) genetik kaynakların moleküler karakterizasyonunda kullanılan en güvenilir ve yaygın yöntemlerden biridir. Bu tez çalışmasında 'Geniş doğal varyasyona sahip korunga (*Onobrychis* Miller) genetik kaynak koleksiyonunun yeni sitogenetik yöntemler ile karakterizasyonu ve Trakya bölgesine uygun çeşitlerin geliştirilmesinde kullanımı' isimli TÜBİTAK-1001 projesi kapsamında yapılan klonal hat denemelerinin sonuçlarına göre en iyi performans gösteren 83 hat üzerinde SSR analizleri yapılması ve hatların ilgili SSR primerleri açısından genetik yapılarının ortaya konulması, çalışılan hatların genetik parametrelerinin tahmin edilmesi ile genetik çeşitlilik düzeylerinin belirlenmesi ve korunga hatlarının moleküler filogenetik analizinin yapılması, SSR belirteçleriyle belirlenen genetik çeşitlilik düzeylerinin literatürde mevcut olan diğer çalışmalarla karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca genetik çeşitlilik düzeyi yüksek oranda bulunan hatların geliştirilme stratejilerinin belirlenmesi ve çalışma sonunda elde edilen bilgilerin korungada genetik çeşitlilik, genetik yapı, ıslah ve çeşit geliştirme üzerine olan diğer çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Korunga Bitkisi

Korunga bitkisi Baklagiller (*Fabaceae*) familyası *Papilionidae* alt familyasından olan, ülkemizde özellikle Orta ve Doğu Anadolu ile geçit bölgelerinde tarımı yapılan çok yıllık baklagil yem bitkisidir (İnce ve Filazi, 2009). Kıraç koşullarda başarılı bir gelişme gösteren korunga otlatılarak ya da biçilerek de faydalanılabilen önemli bir yem bitkisidir (İleri, 2004) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Korunga bitkisinin genel görüntüsü

Ülkemizin 3 gen merkezinin kesiştiği noktada bulunması nedeniyle tür sayısı bakımından son derece zengindir. Ülkemiz birçok korunga türüne de ev sahipliği yapmaktadır. Korunga ülkemizde “görünge” ya da “koringa” olarak da anılmaktadır (Sıralı, Deveci ve Cımbırtoğlu, 2012). Yurdumuzda Doğu Anadolu’da oldukça geniş ekim alanına sahip korunga özellikle Kars, Ardahan, Ağrı, Erzincan, Erzurum, Muş, Hakkâri, Elazığ, Van, Bitlis, Batman, Kahramanmaraş, Gümüşhane, Bayburt, Malatya ve Siirt bölgelerinde yetiştirilmektedir. Orta Anadolu’da da korungaya birçok yerde rastlanır. Kırşehir, Niğde, Sivas, Yozgat, Konya, Ankara ve Çankırı çevrelerinde bulunur. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü’nün, Malya, Polatlı, Altınova, Gözlü ve Ulaş gibi çiftliklerinde yoğun olarak korunga yetiştirilmektedir (Sıralı vd., 2012).

Dünyada korunga cinsine ait yaklaşık 160 kadar tür olduğu bilinmektedir. Bunlardan yabancı korungaların Baltık Denizi'nden, Akdeniz, Ön Asya ve Sibirya'ya kadar çok geniş bir alana yayıldığı bildirilmiştir. Özellikle Anadolu-İran-Kafkasya üçgeninde daha yaygın bulunmaktadır. Ülkemizde ise doğal olarak yetişmekte olan 70 kadar korunga türü mevcuttur. Bu bölgelerden İran'da 53 türden 32'si (%60,4), Kafkasya da 39 türden 21'i (%53,4) ve Türkiye'de 52 türden 27'si (%51,9) endemiktir. Bu bilgiler ışığında Türkiye'nin korunga bakımından önemli gen merkezlerinden biri olduğu görülmektedir (Avcı, 2010; İnce, 2007).

*Onobrychis viciifolia*, Güney Orta Asya'ya özgü olan ve on beşinci yüzyılda Orta Avrupa'da yetiştirilmeye başlanmış bir türdür (Burton ve Curley, 1968). İlk kez 1582'de Güney Fransa'da yetiştirilmiş ve ardından Avrupa'ya yayılmıştır (Carbonero, 2011). Günümüzde, *O. viciifolia* hala Doğu Avrupa, İtalya, İspanya, İran ve Türkiye'de yetiştirilmektedir. 2001 yılında Türkiye'de yaklaşık 94.000 ha alanda tarımı yapıldığı bildirilmiştir (Eken, Demirci ve Dane, 2004). Oldukça geniş tür çeşitliliğine sahip olmasına rağmen tarımsal açıdan önemli olan korunga türleri Yaygın Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.), Anadolu Korungası (*Onobrychis arenaria* Kit. Ex. Wild. D.C.), Kafkas Korungası (*Onobrychis transcaucasica* Gross H.)'dır. Bu türler içinde yaygın korunga ya da kısaca korunga olarak adlandırılan *Onobrychis viciifolia* (*O. viciifolia*) türünün yaygın yetiştirildiği bilinmektedir (Anonim, 2019a).

Korunga soğuk ve kurak şartlara uyum sağlamasının yanında diğer bitkilerin yetişemediği kireçli ve kıraç topraklarda iyi bir gelişim gösterir. Kalkerli ve sulanmayan topraklarda yoncadan daha verimlidir (Türk, 2005). Korunga otu yonca kadar besleyici olup, protein oranı oldukça yüksek ve mineral madde bakımından zengindir. Yoncanın aksine hayvanlarda şişkinlik yapmaz. Bu sebeple yeşil korunga otu hayvanlara istenildiği kadar yedirilebilir. Korunga otunun süt ineklerinde tereyağı ve süt kalitesini de arttırdığı gözlemlenmiştir (İnce, 2007). Konsantre tane içeriğinden dolayı geniş getiren hayvanların sindirim organlarında amonyak ve metan gazını azaltıp hayvanların verimi ve sağlığı üzerine katkısı büyüktür (Koç ve Akdeniz, 2017).

Hayvan beslenmesindeki önemi, kurak koşullara uyum sağlaması, köklerinde bulunan *Rhizobium* bakterileri aracılığıyla havanın serbest azotunu toprağa bağlaması, kuvvetli kök yapısıyla eğimli sahalarda toprak kaybını önlemesi sebepleriyle diğer yem bitkilerine göre tercih sebebidir (Bağcı ve Mutlu, 2011; Koç ve Akdeniz, 2017).

## 2.2. Korunga Bitkisinin Önemli Özellikleri

Korunga ülkemizin farklı ekolojik bölgelerine adapte olabilecek üstün tarımsal özellikleri, yüksek verim ve kaliteli yemi nedeniyle ülkemizde yem bitkilerinin kralı olarak tanımlanmaktadır (Okcu ve Şengül, 2014). Çok yıllık baklagil yem bitkisi olan korunga Fransızlar tarafından "sain" ve "foin" kelimeleri ile tanımlanmıştır. "Sain" sağlıklı, "foin" ise çim demektir. Türkçeye mukaddes ot veya evliya otu şeklinde çevrilmiştir. Bunun yanında sağlıklı saman, kutsal saman gibi isimlerle de anılmaktadır. Korunga, Avrupa'nın ılıman bölgelerinde, Asya'da, Akdeniz ülkelerinde ve Kuzeybatı Amerika'da geniş ölçüde yaygındır. Daha ılıman bölgelerde yerliler tarafından tarih boyunca yetiştirilmiş, 15. yüzyılda Avrupa'nın merkezi İtalya, İngiltere ve İsviçre gibi ülkelere yayılmıştır (Özbilgin ve Coşkun, 2018).

Korunganın diğer baklagil yem bitkilerine göre daha erken gelişmeye başlaması önemli bir avantajdır. Fide dönemi dışında kurağa özellikle geç ilkbahar donlarına karşı dayanıklıdır ve yaşlandıkça dayanıklılığı artar. Geçirgen, kireçli, kumlu toprakları seven bitki aynı zamanda zayıf ve çorak alanları verimli kılar. Ancak en iyi gelişmeyi derin, kireçli ve düzgün drenajlı toprakta gerçekleştirir (Özbilgin ve Coşkun, 2018). Kuvvetli kök yapısıyla rüzgar ve su erozyonunu kontrol etmede oldukça önemli bir yere sahiptir. Aynı zamanda en önemli toprak ıslahı bitkilerindendir (Stevovic, Stanisavljevic, Djukic ve Djurovic, 2012). Bitki protein ve mineraller (P, Mg ve K) bakımından zengindir ancak kalsiyum ve sodyum konsantrasyonları diğer baklagillere nazaran bir miktar düşüktür (Altındal ve Altındal, 2018).

Türkiye hayvan yemi temin etme konusunda yetersizlik göstermektedir. Korunga ise ülkemiz için oldukça önemli, lezzetli ve besleyici ayrıca bir hayvan yemi olarak şişkinliğe neden olmama avantajına sahiptir (Türk ve Çelik, 2006). Korunga otu, nitrojensiz öz maddeler, ham yağ, ham protein ve mineral oranı açısından yoncadan daha yüksektir. Hazmolmayı olumsuz yönde etkileyen tanen maddesi korunga otunda yoncadan daha azdır. İlkbaharda erken gelişmeye başlar, böylece diğer mera bitkileri otlatma olgunluğuna gelmeden önce hayvanlara iyi kalitede yem sağlar. Bu açıdan, korunga otlatma için birçok yem bitkisine göre daha çok tercih edilmektedir. Aynı zamanda korunga otu ile beslenen hayvanlarda süt ve tereyağı kalitesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Çelik, Karakaya, Avcı, Sancak ve Özcan, 2012). Ek olarak korunga tohumları sonbahar başlarında kuşlar ve kemirgenler tarafından da tüketilir (Altındal ve Altındal, 2018). Korunga hayvanlar için iyi bir yem kaynağı olmasının yanında toprak ıslahı açısından da önemli bir bitkidir. Kök yapısı oldukça kuvvetli olduğundan derinlere doğru işleyerek ana kayayı parçalar ve toprak oluşumunun hızlanmasını sağlar. Derinlere inen

kökleri sayesinde toprağın havalanmasına yardımcı olur ve besin elementlerini kullanır. Baklagil yem bitkisi olması sebebiyle köklerindeki nodoziteler aracılığıyla havadaki serbest azotu bağlayarak toprağı azotça zenginleştirmesi iyi bir münavebe bitkisi olduğunun kanıtıdır (İlgin, 2017).

### 2.3. Korunganın Arı ile İlişkisi

Arıcılık işletmeleri veya arı ile uğraşan ailelerin temel üretim kaynağı floral kaynaklardır. Bal arısı (*Apis mellifera* L.) floradan polen, nektar ve propolisi toplar ve bu maddelerin ürünlere en ekonomik şekilde dönüştürülmesini sağlar. Bal arıları birçok çiçek ve bitkiyi ziyaret ederek ürettikleri bu ürünler ile kendi beslenme, enerji ve diğer ihtiyaçlarını karşılarken, insanlar için de polen, bal, arı sütü, balmumu, propolis gibi ürünlerden faydalanmaya olanak verirler (Karaca, 2008).

Korunga, bal arılarının nektar ve polen toplamak amacıyla en çok ziyaret ettiği baklagil yem bitkilerinden biridir (Sıralı vd., 2012). Bal arıları, yan yana ekili korunga ve yonca parsellerinden genellikle korunga parselini tercih ederler. Bal özü kaynağı olarak korungayı tercih eden arıların balı verimlidir ve kendilerine özgü hoş bir aroması vardır (Anonim, 2019a). Korunga bitkisi yüksek miktarda nektar içermesi, çiçeklerinin büyük ve göz alıcı renklere sahip olması, bal özünün glikoz, fruktoz ve sakkaroz bakımından zengin olması, çiçek salkımlarının bitkinin üst kısımlarında bulunduğundan arılar tarafından kolayca ulaşabilmesi gibi sebeplerden dolayı çok iyi bir bal özü bitkisidir (Anonim, 2019b). Bal arıları korungadan polen ve nektar alırken tozlaşmayı da sağladığından tohum verimindeki artışlar da bal arıları sayesinde mümkün olmaktadır (Sıralı vd., 2012).

Korunga gibi gösterişli çiçeklere sahip ve fazla miktarda balözüne sahip bitkiler genellikle sabahları, öğleden önce yoğun bir şekilde arıların ziyaretine uğrar. Bunun en önemli sebebi, genellikle rüzgârın öğleden önce olmaması ve çiçeklerin tüm gösteriş ve tazeliğinin tozlayıcılar için hazır olmasıdır. Bal arılarının ziyaret ettiği bitkiler arasında Doğu Anadolu'da ilk sırayı korunga almaktadır. Rusya'da yapılan bir çalışmada da Kafkas arı ırkının korunga için en iyi tozlayıcı bitki olduğu gözlemlenmiştir (Sıralı vd., 2012).

Bakoğlu ve Kutlu (2005)'nin Elazığ'da yaptıkları bir çalışmada bal arısı yoğunluğu ölçümü bitki örneklerinin alındığı alanlarda saat 12'de başlanmış ve her bir alanda 5 dakika

boyunca sayılarak belirlenmiştir. Çiçek salkımlarının ve m<sup>2</sup>'de çiçek sayısının çok olduğu dönemde bal arısı sayısı da fazla olduğu tespit edilmiştir.

#### **2.4. Korunganın Türkiye'deki Ekonomik Önemi**

Korunga ülkemiz ekolojik koşullarına oldukça iyi uyum sağlamış, kireçli topraklar ve kıraç şartlarda dahi ekonomik olarak yetiştirilebilen çok nadir bitki türlerinden birisidir. Yağışı yeterli olan bölgelerde verimide artmaktadır (Sıralı vd., 2012). Korunga kültürünün ekonomik önemi özellikle hayvansal üretim maddelerinde görülmektedir. Besin değeri yüksek olan yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünlerin kalitesi yüksektir ve bu yemler ülke ekonomisi için büyük değere sahiptir. Korunga hayvanların mide mikroflorası için gerekli besin maddelerini içermektedir. Ayrıca vitamin ve mineral açısından zengin olmaları sebebiyle hayvanların verim ve üreme performansını da olumlu etkilemektedir (Anonim, 2019c). Bu özelliklerinden dolayı ülkemizde hayvan yetiştiricileri tarafından önemi ve değeri bilinmektedir (Sıralı vd., 2012).

Erozyona maruz kalan eğimli arazilerde, korunga ekimi yapılarak elde edilen ürünü hayvancılıkta değerlendirmek, birim alandan sağlanan yararı da üst seviyeye çıkarmak mümkündür. Böylece ekonomik açıdan iyi bir gelir elde edilebilir ve korunganın derinlere inebilen kök yapısıyla erozyonu önleme özelliğinden de faydalanılabilir (Sıralı vd., 2012). Özellikle baklagiller familyasından olan korunga, yonca, fiğ gibi yem bitkileri havadaki azotu bağlayarak toprağı azotça zenginleştirir ve hiçbir zararlı yan etkisi bulunmayan doğal bir gübreleme yaparlar (Anonim, 2019b). Korunga bütün bu bitkisel avantajlarına ek olarak yüksek kalitede balözü kaynağına sahip olması nedeniyle arıcılık için çok iyi bir potansiyel oluşturmaktadır. Çünkü korunganın nektar ve polen üretmesi ve bal arılarının bu kaynaklara kolayca ulaşması, göz alıcı renkte ve büyük çiçeklerinin olması bu bitkiyi arıcılık açısından mükemmel kılmaktadır (Sıralı vd., 2012).

Ülkemiz tarımında baklagil yem bitkilerinin günümüz üretim alanından çok daha geniş bir alanda üretilmesi, tarımın gelişmesi ve teknolojinin gösterdiği yolda başarıya ulaşması için zorunludur. Bu sebeple ülkemize hem tarımsal hem de ekonomik yönden büyük faydalar sağlayacak olan yem bitkileri yetiştiriciliğine önem verilmeli ve bu amaçla yapılacak çalışmalar her açıdan desteklenmelidir (Dadaşoğlu ve Tosun, 2017).

## 2.5. Korunga Bitkisinde Yapılmış Çalışmalar

Biyoteknoloji, günümüzde tüm dünyada en yaygın, en popüler ve yeniliklere açık bilimsel alanların başında gelmektedir. Moleküler belirteçler ise bu alanda kullanılan önemli biyoteknolojik araçlar olarak karşımıza çıkar. Moleküler belirteçler fiziksel haritalama, çeşitlilik, marker destekli seleksiyon, gen keşfi ve etiketleme, filogenetik çalışmalar, genetik karakterizasyon çalışmaları gibi pek çok alanda etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bitki biyoteknolojisi çalışmalarında da yaygın bir şekilde kullanılan moleküler belirteçler daha verimli ve daha hızlı sonuçlar alınmasına olanak sağlamaktadır (Filiz ve Koç, 2011). Moleküler belirteçler arasında basit dizi tekrarları (SSR) özellikle bitki ıslahında en faydalı belirteçler arasındadır (Demdoun, Muñoz, Delgado, Valderrábano ve Wünsch, 2012). Korunga bitkisinde yapılan moleküler çalışmalar incelendiğinde ise bu tür çalışmaların korungada 2000’li yıllardan sonra başladığı görülmüştür. Moleküler çalışmaların yanı sıra dünyada ve ülkemizde korunga türlerinin morfolojik ve fenolojik yapılarını, tarımsal özelliklerini ortaya çıkarmaya yönelik pek çok çalışma yürütülmüştür.

### 2.5.1. Morfolojik Çalışmalar

Ülkemizde şimdiye kadar korunganın morfolojisi ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalardan bazıları kronolojik bir sıralama ile aşağıda verilmiştir.

Tuna (1994) tarafından yapılan tez çalışmasında tesadüf blokları deneme desenine göre 4 tekrarlamalı olarak korungada kuru ot, yeşil ot, tohum verimi ve kuru madde oranı gibi özellikler araştırılmıştır. Tekirdağ koşullarında yapılan bu çalışmada en yüksek kuru ot verimi 903,16 kg/da, en yüksek yeşil ot verimi 2918,5 kg/da ve en yüksek tohum verimi 114,89 kg/da olarak saptanmıştır.

Ünal ve Fırıncıoğlu (2002) tarafından Orta Anadolu şartlarında yapılan çalışmada 16 adet korunga popülasyonu ana sap uzunluğu, ana sap kalınlığı, bitki yayılma çapı, çiçeklenme gün sayısı, meyve bağlama gün sayısı, yeşil ot verimim gibi morfolojik, fenolojik ve tarımsal özellikler bakımından incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada incelenen tüm karakterler bakımından popülasyonlar içi ve popülasyonlar arasında varyasyonun mevcut olduğu tespit edilmiştir.

Aygün, Kara ve Çakal (2007) tarafından Doğu Anadolu Bölgesindeki meralardan toplanan 16 korunga (*Onobrychis sativa* Lam.) popülasyonu üzerinde yapılan çalışmada yeni

çeşit ıslahına kaynak oluşturmak için morfolojik, fenolojik ve bazı tarımsal özellikleri üzerinde araştırma yapılmıştır. Balabanlı, Yüksel ve Karadoğan (2007) tarafından yapılan çalışmada Isparta ilinden örneklenen korunganın bazı morfolojik ve tarımsal özellikleri belirlenmiştir.

Avcı (2010) tarafından yapılan tez çalışmasında Türkiye florasında doğal olarak yetişmekte olan 40 korunga türünün fenolojik, morfolojik ve tarımsal özellikleri belirlenmiştir. Toplanan korunga türlerinde vejetatif ve generatif karakterler değerlendirilmeye alınmıştır. İncelenen karakterler seleksiyon düzeyinde karşılaştırılmıştır. Türler arasında hem fide döneminde hem de olgun dönemde çok yüksek oranda varyasyon gözlenmiştir. Bunun yanı sıra olgun dönemde elde edilen sonuçlar ile türler arasında fide döneminde elde edilen sonuçlar arasında da yüksek oranda farklılık ortaya çıktığı bildirilmiştir.

Cebeci (2011) tarafından yapılan çalışmada 20 farklı korunga popülasyonu ilk çiçeklenme ve meyve bağlama tarihi, antosiyen varlığı, bitki boyu, ana dal sayısı, yaprak ve yaprakçık büyüklüğü ve şekli, ana daldaki salkım sayısı, salkım boyu, salkımdaki çiçek sayısı, salkımdaki meyve sayısı, meyve iriliği ve şekli, bitki başına meyve verimi gibi morfolojik özellikler bakımından incelenmiştir.

Hosaininejadmir, Jafari ve Nakhjavan (2011) tohum ve kuru madde verimi, verim ve morfolojik özellikler arasındaki ilişkileri incelemek amacıyla, İran'da 34 korunga popülasyonu için tesadüf blokları deneme deseni kullanılmıştır. İncelenen karakterler arasında tohum verimi, kuru madde ve tohum verimi, bitki boyu, çiçeklenme sayısı, çiçeklenme uzunluğu, bitki yoğunluğu, çiçeklenme tarihi, bin tane ağırlığı, saman verimi ve hasat indeksi yer almıştır. Elde edilen sonuçlar üzerinde yapılan varyans analizi sonuçlarına göre, çiçeklenme sayısı, çiçeklenme uzunluğu dışındaki tüm özellikler için popülasyonlar arasında önemli farklılıklar göstermiştir.

Parlak, Gökkuş, Samıkıran ve Şenol (2014) tarafından yapılan çalışmada Çanakkale'de doğal meralardan toplanan *Onobrychis caput-galli*, *Onobrychis gracilis* ve *Onobrychis oxyodonta* türlerinin biyolojik ve morfolojik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Her türden 50 adet bitki örneği alınmıştır. 3 yabancı korunga türünde çok yıllık ve meyveleri dikensiz olan *O. oxyodonta* mera ıslahında kullanılabilecek ümit vadeden bir tür iken tek yıllık olan *O. caput-galli* türün bir yıllık olması ve meyvelerindeki dikensi çıkıntılarının varlığından dolayı mera ıslahı çalışmaları için uygun bulunmamıştır. Diğer yandan çok yıllık ve dikensi çıkıntılara sahip meyveleri olan *O. gracilis*'in yetiştiriciliğinin zor olduğu bildirilmiştir.

Amirabadizadeh, Jafari ve Mahmoodzadeh (2015) tarafından İran'ın kuzeydoğusunda yetişen altı tür, iki alt tür ve iki çeşit çok yıllık korunga bitkisinde morfolojik, anatomik ve palinolojik karakterler incelenmiştir. Çalışma sonucunda morfolojik karakterlerde çalışılan özelliklerde türler arası farklılıklar gözlenmiştir. Çevresel koşullardan en az etkilenen özellik anatomik özellikler olarak saptanmıştır. Palinolojik analizde ise, polen şekli prolate, perprolate ve tricolpate olarak bulunmuştur.

Çeçen, Öten ve Erdurmuş (2015)'un çalışmasında Antalya doğal florasında bulunan farklı lokasyonlardan toplanan korunga türüne ait 25 popülasyonun morfolojik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Gözlem değerlerine bakıldığında çiçeklenme gün sayısı 153-159 gün, fizyolojik olum gün sayısı 165-192 gün olarak belirlenmiştir. Çiçek rengi mor-pembe olarak gözlenmiştir. Bitki boyu 29-98 cm olarak bulunmuştur. Bin dane ağırlığı 20-29 g olarak bulunmuştur. Salkımda çiçek sayısı 12-38 adet arasında, meyvede tane sayısı ise 2-3 adet arasında değişmiştir. Sonuç olarak yapılan gözlemler dikkate alındığında büyük ölçüde genetik varyasyonun olduğu saptanmıştır.

Bhattarai, Coulman, Beattie ve Biligetü (2018) tarafından 21 farklı ülkeden toplanan 38 korunga aksesyonu üzerine fenotipik varyasyonu ve besin değerlerini değerlendirmek üzere bir çalışma yapılmıştır. Varyans analizi sonucunda kışın hayatta kalma, kuru madde verimi, bin tane ağırlığı, bitki boyu, büyüme hızı, çiçeklenme günleri, ham protein oranı için korunga aksesyonları arasında anlamlı farklılıklar ( $p < 0,05$ ) olduğu gözlemlenmiştir. Korunga aksesyonlarında kuru madde verimi 74 ile 239 g/bitki, bitki boyu 37 ile 70 cm, kışın hayatta kalma oranı %20 ile %94 ve tohum verimi 5 ile 64 g/bitki arasında değiştiği bildirilmiştir.

### **2.5.2. Genetik Karakterizasyon ve Çeşitlilik Çalışmaları**

Kidambi, Mahan, Matches, Burke ve Nunna (1990)'nın çalışmasında dünyanın farklı bölgelerinden toplanan 17 *Onobrychis* türünde ve *O. viciifolia'nın* üç çeşidinde esteraz enzimi için genetik polimorfizm araştırılmıştır. Test edilen tüm materyallerde sırasıyla EST1, EST2 ve EST3 olarak belirtilen bölgelerin her birinde 0 ile 3, 3 ile 14 ve 1 ile 2 bant arasında değişen bant sayısı gözlemlendiği ve çalışılan türlerde benzerlik oranının %0 ile %79 arasında değiştiği bildirilmiştir.

Çöçü (2008) tarafından yapılan tez çalışmasında korunga bitkisinde, *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımı ve böceklere dayanıklı transgenik bitkilerin elde edilmesine



yönelik bir çalışma yapılmıştır. Bakteri materyali olarak böceklere dayanıklılığı kodlayan 11 *CRY* geni ve bir tane marker genleri taşıyan *A. tumefaciens* hatları ile yapılan gen aktarım çalışmaları sonucunda kanamisin antibiyotigine dayanıklı sürgünler elde edilmiştir. Sonuçta *CRY* genlerinin aktarılmasıyla 37 adet transgenik korunga bitkisi elde edilmiştir.

Carbonero (2011)'nin çalışmasında 291 farklı korunga aksasyonu AFLP ve SSR belirteçleri kullanılarak morfolojik ve moleküler açıdan araştırılmıştır. Carbonero, Carbonero, Smith ve Brown (2012) tarafından yapılan çalışmada *Onobrychis* cinsine ait toplam 291 aksesyonda nükleer (ITS bölgesi) ve kloroplast (*trnL-trnF*) belirteçlerini kullanarak filogenetik karakterizasyon yapılmıştır.

Akçelik, Avcı, Uzun ve Sancak (2012) tarafından Türkiye'de endemik olan yayılış gösteren 4 *Onobrychis* türünde karyotip analizleri yapılmış, türlerin kromozom sayıları belirlenmiştir. *O. tournefortii*, *O. hypargyrea* ve *O. gracilis* türleri  $2n=14$  kromozom sayısına; *O. argyrea* türü ise  $2n=16$  kromozom sayısına sahip bulunmuştur.

Demdoum vd. (2012)'nin çalışmasında *Medicago truncatula* ve *Glycine max* (L.) türleri için geliştirilmiş olan primerler arasından seçilen 27 EST-SSR lokusu ile 23 korunga aksesyonda genetik benzerlik çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan 27 primerin 22'si amplifikasyonda başarılı olmuştur. Polimorfizm oranı %52 olarak tespit edilmiştir. Primerlerin polimorfik bilgi içeriği değerleri 0,45 ile 0,85 arasında bulunmuştur.

Ghanavatia, Nematpajoo, Chahli ve Chaeikar (2012) tarafından yapılan çalışmada İran'da 5 farklı *Onobrychis* türüne ait 13 popülasyon analiz edilmiştir. Temel kromozom sayıları diploid popülasyonlar için  $n=7$  ve  $n=8$ , tetraploid popülasyonlar için sadece  $n=8$  bulunmuştur. Çalışma sonucunda kromozomal varyasyonun yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Nosrati, Feizi, Tarrah ve Haghighi (2012) tarafından 5 RAPD primeri kullanılarak ekolojik olarak farklı bölgelerden seçilen 5 korunga popülasyonunda stresli ve normal ortamlarda yetişen popülasyonlar arasındaki varyasyon seviyesi karşılaştırılmıştır. Her popülasyondan 10 adet bitki seçilmiştir. Polimorfizm oranı %66,67 ile %84,62 arasında bulunmuştur. Çalışma sonucunda aynı çevresel stres koşulları altında olan 2 popülasyonun yüksek oranda genetik benzerlik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Toluei, Ranjbar, Wink ve Atri (2012)'nin çalışmasında İran'da farklı coğrafi bölgelerden toplanmış 8 *O. viciifolia* popülasyonuna ait 40 örnek seçilmiştir. Genetik çeşitliliği belirlemek için ISSR primerleri (ITS4 ve ITS5) ile PCR analizleri ve morfolojik karakterler kullanılmıştır. ANOVA kullanılarak yapılan analize göre *O. viciifolia* popülasyonları arasında morfolojik özelliklerin tümü için önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bandara, Papini, Mosti, Brown ve Smith (2013) tarafından 41 korunga türüne ait 78 korunga aksesyonunda yapılan çalışmada nüklear (ITS) ve kloroplast (matK) belirteçleri kullanılarak moleküler filogenetik analizler yapılmıştır.

Okcu, Şengül, Sunar ve Agar (2013)'in çalışmasında Erzurum'dan toplanan 5 *Onobrychis* türünde 15 RAPD belirteci kullanılarak ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) tekniği ile türler arası varyasyon incelenmiştir. Benzerlik matrisine göre en düşük genetik mesafe *O. huetiana* sub. *bornmuelleri* ve *O. huetiana* türleri arasında, en yüksek genetik mesafe ise *O. hajastana* ve *O. huetiana* türleri arasında bulunmuştur.

Rasouli, Jafari, Tabaei-Aghdaei, Shanjani ve Darvish (2013) tarafından İran'ın çeşitli bölgelerinden örneklenen 36 korunga popülasyonunda yapılan çalışmada genetik çeşitliliği belirlemek üzere 20 RAPD primeri denenmiş, polimorfik olan 5 primer çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir. Kullanılan 5 primerden en yüksek polimorfizm gösteren popülasyon Divandara (%80) iken en düşük polimorfizm gösteren popülasyon Aligodarz (%49) olmuştur.

Zarrabian, Majidi ve Ehtemam (2013)'in çalışmasında, 80 korunga aksesyonunda anatomik, morfolojik ve ISSR belirteçleri ile genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 45 ISSR primerinden 22 ISSR primeri değerlendirmeye alınmış, toplam 275 bant elde edilmiştir. Çalışma sonucunda genetik çeşitliliğin büyük çoğunluğunun aksesyonlar arasında olduğu saptanmıştır. Coğrafik gruplara bakıldığında Asya ile Doğu Avrupa'nın türün ana çeşitlilik merkezinin olabileceği rapor edilmiştir.

Avcı, İlhan, Erayman ve Sancak (2014)'in çalışmasında Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 58 *Onobrychis* taksonu arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek için SSR belirteçleri kullanılmıştır. Toplamda 95 SSR primeri denenmiş, çalışma için 18'i uygun bulunmuştur. Çalışma sonucunda 79 lokus gözlenmiş, en yüksek lokus sayısı BM175 ve MTIC84 primerlerinden elde edilmiştir. En yüksek genetik çeşitliliğin *O. argyrea* Boiss. subsp *argyrea* Boiss. türünde, en düşük genetik çeşitliliğin *O. cornuta* (L.) Desv. türünde olduğu rapor edilmiştir.

edilmiştir. Kar, Ghanavati, Naghavi, Amirabadi-zade ve Rabiee (2014), nükleer ribosomal DNA (ITS bölgesi) ve plastid *trnL-trnF* DNA belirteçleri ile 73 *Onobrychis* türünde moleküler filogenetik çalışmalar yapmıştır.

Kempf vd. (2015)'nin çalışmasında 3 korunga popülasyonunda yapay ve doğal dölleme yapılarak bireyler elde edilmiş, ilk defa moleküler tabanlı belirteçler (4 SRAP primeri ve 2 SSR primeri) kullanılarak kendine döllemenin sonuçları ve bitki morfolojisine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda SRAP belirteçleri ile kendine döllemiş veya yabancı döllemiş bireylerin ayırt edilebileceği belirlenmiş, SSR belirteçleri bu sonucu desteklemiştir.

Zarrabian ve Majidi (2015)'nin çalışmasında 102 korunga aksesyonunda 22 ISSR primeri kullanılarak türler arası ve tür içi genetik benzerlik araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerden 243 bant elde edilmiş, polimorfizm oranı %96,7 olarak bulunmuştur. Polimorfik bilgi içeriği 0,34 ile 0,47 arasında hesaplanmıştır. Benzerlik matrisine göre *O. viciifolia*'nın *O. altissima* (0,59), *O. inermis* (0,58), *O. transcaucasica* (0,56) ve *O. arenaria* (0,52) türlerinin her birine yüksek genetik benzerlik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Irani, Mirlohi, Majidi ve Talebi (2015)'nin çalışmasında, 22 farklı korunga aksesyonunda SSR belirteçleri ile analizler yapılmış, elde edilen PIC değerinin 0,20-0,43 arasında değiştiği (ortalama 0,33) tespit edilmiştir. Çalışmada yapılan AMOVA sonucunda genetik çeşitliliğin %69,5 oranında popülasyon içinde olduğu saptanmıştır. Nosrati, Feizi, Latifian ve Haghghi (2016)'nin çalışmasında dört ISSR primeri kullanılarak Doğu Azerbaycan ve İran yabani korunga popülasyonları arasındaki ekocoğrafik varyasyon incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre polimorfik ISSR lokuslarının %38,75 ile % 61,25 arasında değiştiği saptanmıştır.

Kempf, Mora-Ortiz, Smith, Kölliker ve Skot (2016) tarafından yapılan çalışmada genetik çeşitliliği belirlemek için 32 ayrı korunga bitkisi seçilmiştir. *O. viciifolia* transkriptom verisinden tasarlanan toplam 400 SSR primeri kullanılarak amplifikasyon varlığı test edilmiştir. Çalışmada kullanılan SSR belirteçleri yüksek derecede polimorfizm göstermiştir. 400 SSR primerinden 101'i korunga bireyleri arasında güvenilir bir şekilde polimorfizmi saptamak amacıyla uygun bulunmuştur. Toplamda, 101 lokusta 1154 allel bulunmuş ve SSR başına ortalama allel sayısı 11,4 olarak bildirilmiştir. 250 allel bireylere özgü (private) allel olarak bulunmuştur. Ortalama PIC değeri 0,14-0,36 arasında hesaplanmıştır. Bu 1154 allel arasında, sadece beş lokus (OVK042, OVK172, OVM031, OVM072 ve OVM100) polimorfik

bulunmamıştır. 32 bireyde sadece iki allel ile OVK042 en düşük allel sayısına sahipken, OVK158 ise 24 allel ile en yüksek allel sayısına sahip bulunmuştur.

Bhattarai, Coulman, Fu, Beattie ve Biligetu (2017) tarafından yapılan çalışmada 21 ülkeden toplanan 38 korunga popülasyonu için 5 AFLP primeri kullanılarak genetik çeşitlilik belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen verilere göre polimorfik bilgi içeriğinin (PIC) 0,129 ile 0,186 arasında değiştiği sonucuna ulaşılmıştır.

Sedeh (2017) tarafından yapılan çalışmada dünyadaki farklı bölgelerden toplanan 5 korunga popülasyonunda genetik çeşitliliği belirlemek için yüksek polimorfizm oranı içeren 22 çift SSR ve EST-SSR belirteci kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan belirteçlerin PIC (polimorfizm bilgi içeriği) değerleri 0,2 ile 0,43 arasında (ortalama 0,33) bulunmuştur.

Özkan ve Bilgen (2019) tarafından Özerbey ve Lütfübey isimli tescilli yerel 2 korunga çeşidi ve yurtdışı (Pleven popülasyonu) ve yurtiçi kaynaklı (Kırşehir-1 ve Kırşehir-2 popülasyonları) 3 farklı korunga popülasyonunda 10 SSR belirteci kullanılarak genetik karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışılan 5 korunga popülasyonu tek bir grup olarak değerlendirildiğinde 10 SSR lokusunun hepsi polimorfik olarak saptanmış varyasyonun büyük oranda (%92) popülasyonlar içerisinde olduğu, popülasyonlar arası çeşitliliğin düşük olduğu (%8) gözlenmiştir. Sonuç olarak SSR primerlerinin ortalama polimorfizm değerinin 0,210 olduğu bildirilmiştir (Özkan, 2017).

Shen vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada korunga bitkisinde genetik çeşitliliği analiz etmek için BatchPrimer3 yazılımı kullanılarak 2,469 EST-SSR primer çifti tasarlanmıştır. Toplamda 5 popülasyon, her popülasyondan ise 40 bitki analiz için seçilmiştir. Tasarlanan primerlerden rastgele 200 primer çifti seçilmiş, bunlardan 61 primer çifti nispeten yüksek derecede polimorfizm göstermiş olup genetik çeşitliliği analiz etmek üzere kullanılmıştır. Çalışmada toplamda 459 allel bulunmuş, lokus başına allel sayısı 3 ile 12 arasında değişmiştir. Sonuç olarak 61 EST-SSR belirteci başarılı bir şekilde geliştirilmiş, popülasyonlar arası genetik çalışmalar için faydalı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca kullanılan EST-SSR belirteçlerinin korunga bireylerinin ototetraploid olduğunu desteklediği rapor edilmiştir.

### 2.5.3. Korunga Islah Çalışmaları

Ülkemizde bitki ıslahı ile ilgili ilk çalışmalar 1926 yılında tohum ıslahı istasyonlarının kurulmasıyla başlamıştır. 1950 yılına kadar genellikle serin iklim tahılları üzerinde çeşit geliştirme ve tohumluk üretim çalışmalarıyla sınırlı kalmıştır. Çayır-Mera ve Yem Bitkileri Şubesi'nin kurulması ile 1952 yılında yem bitkileri tarımının geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu yıldan itibaren yem bitkileri adaptasyon çalışmaları yapılırken, diğer yandan çiftçilere ücretsiz yem bitkisi tohumları dağıtılarak üretim teşvik edilmesi sağlanmıştır. Yem bitkileri ıslahı faaliyetleri ağırlıklı olarak ülkemizdeki kamu kurumları tarafından yapılmakla birlikte, son yıllarda özel tohum şirketleri çeşitli geliştirme açısından hızlı bir ilerleme kaydetmiştir (Avcı, 2013).

Dünyada ve ülkemizde çok sayıda yem bitkisinin tarımı yapılmaktadır. Çok yıllık bitkiler çayır mera ve yem bitkileri tarımında daha önemli bir yere sahiptir. Çok yıllık kısa ömürlü bir tür olan korunga yem bitkileri içinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Ülkemiz korunga bitkisinin orjinlendiği coğrafi bölge içerisinde yer almaktadır. Bu nedenle yüksek bir çeşitliliğe sahiptir. Ülkemiz kaynaklı bu geniş doğal varyasyona sahip korunga genetik kaynakları korunga ıslahı açısından son derece büyük bir öneme sahiptir. Bu varyasyondan yararlanılarak hızlı bir şekilde farklı özellikler ve kullanım amaçları için üstün performanslı yeni korunga çeşitleri geliştirmek mümkündür. Ancak ülkemiz de yem bitkilerinin kralı olarak tanınan korunga bitkisi üzerinde bu güne kadar yeterli ıslah çalışması maalesef yapılamamıştır (Anonim, 2019b).

Islah çalışmalarının temel amacı uzun ömürlü, verim ve kalitesi yüksek, biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesidir. Bu bağlamda, Türkiye'de korunga bitkisinde ıslah edilmiş 2 çeşit bulunmaktadır. Birincisi Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından 2003 yılında tescil edilmiş olan Özerbey-03 çeşididir. 1975 yılında başlatılan korunga ıslah çalışmaları neticesinde Türkiye'nin ilk korunga çeşidi Özerbey-03 olarak tescil edilmiştir. Fide dönemi dışında soğuğa ve kurağa oldukça dayanıklı olan Özerbey-03 İç Anadolu bölgesi ve benzeri lokasyonlarda tavsiye edilir. İkinci çeşit ise Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 2005 yılında ıslah edilmiş Lütfubey isimli çeşittir. Çeşidin önemli özellikleri arasında biçimden sonraki gelişmesinin iyi olması, soğuğa ve kurağa toleransının yüksek olması, hastalık ve zararlılara dayanıklı olması sayılabilir. Doğu Anadolu Bölgesi ve benzeri lokasyonlarda önerilen bir çeşittir (Anonim, 2019d).

Yıldız (2014) tarafından yapılan ‘Farklı korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) ekotiplerinin tuza toleransının belirlenmesi ve *in vitro* mutagenesis tekniği aracılığıyla yeni korunga hatlarının geliştirilmesi’ isimli proje çalışmasında tuza tolerans yönünden aday 49 bitki belirlenmiş ve bu bitkiler üzerinde çalışmalar yürütülmüştür.

Koç ve Akdeniz (2017) tarafından yapılan çalışmada Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM) Altınova ve Gözllü tarım işletmelerinde ıslah edilen korunga çeşitlerinin diğer korunga çeşitleri (Koç 1461, Emre, Yunus, Fatih, Mehmetlibey ve Hilal) ve standart çeşitler (Özerbey ve Lütfübey) ile verim ve bazı tarımsal özellikleri açısından 2014 ve 2015 yıllarında karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışmada tesadüf blokları deneme desenine göre 4 tekrarlamalı olarak iki ayrı bölgede denemeler yürütülmüştür. Çalışma sonucunda çeşitlerin verim ve bazı tarımsal özelliklerinin yıllara ve lokasyonlara bağlı olarak değişim gösterdiği bildirilmiştir.

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Metin TUNA’nın yürütücülüğünü yaptığı “Geniş doğal varyasyona sahip korunga (*Onobrychis* Miller) genetik kaynak koleksiyonunun yeni sitogenetik yöntemler ile karakterizasyonu ve Trakya bölgesine uygun çeşitlerin geliştirilmesinde kullanımı” isimli TÜBİTAK projesi ülkemizde korunga ıslah çalışmalarına önemli katkılar sağlamış ve 2019 yılında sonuçlandırılmıştır. Bu bağlamda projeden elde edilen veriler ışığında korunga ıslahı ile ilgili çalışmalar üniversitemizde devam etmektedir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak kullanılan 83 adet korunga hattı Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılacak korunga hatlarına ait yaprak numuneleri Prof. Dr. Metin TUNA tarafından kurulan deneme alanından 2018 yılı mayıs ve haziran ayları arasında toplanmıştır. Toplanan yaprak numuneleri hat isimleri ile etiketlenmiş 2 ml santrifüj tüplerinde muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan korunga aksesyonları

Örnek kodu	Aksesyon No	Tür adı
1	205200-2	<i>O. viciifolia</i>
2	280872	Bilinmiyor
3	186520	<i>O. viciifolia</i>
4	192995	<i>O. viciifolia</i>
7	206458	<i>O. viciifolia</i> -CPI 63764-Turkey
8	206459-3	<i>O. viciifolia</i> -CPI 63765-Turkey
9	228289	<i>O. viciifolia</i>
10	236486-1	<i>O. viciifolia</i>
11	250024	<i>O. viciifolia</i>
12	273784	<i>O. viciifolia</i>
13	273785-1	<i>O. viciifolia</i>
14	273789	<i>O. viciifolia</i>
16	318606	<i>O. viciifolia</i>
17	372830	<i>O. viciifolia</i>
18	600767	<i>O. viciifolia</i>
19	312910	<i>O. arenaria</i> -SANDY 1251-Former Soviet Union
20	372803	<i>O. arenaria</i> -HIBRID 12-Central Bohemia, Czech
22	372830	<i>O. viciifolia</i>
23	372833	<i>O. viciifolia</i>
24	313053	<i>O. viciifolia</i>
25	192994	<i>O. viciifolia</i>
26	639688	<i>O. viciifolia</i>
27	258776	<i>O. viciifolia</i>
28_9	313046	<i>O. viciifolia</i>
31	171725	<i>O. viciifolia</i>
32	206459-2	<i>O. viciifolia</i>
33	228352	<i>O. viciifolia</i>
34	273788	<i>O. viciifolia</i>
35	273791	<i>O. viciifolia</i>
37	316296-1	<i>O. viciifolia</i>
38	313064	<i>O. viciifolia</i>
39	206702	<i>O. caput-galli</i> -Turkey

Çizelge 3.1. (devam)

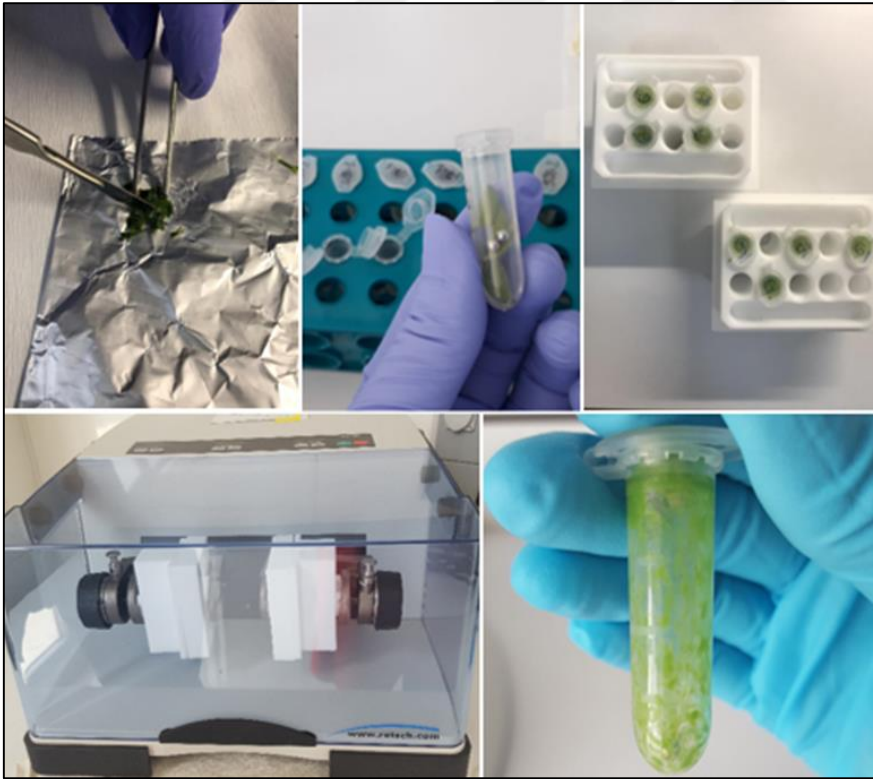
Örnek kodu	Aksesyon No	Tür adı
40		<i>O. arenaria</i>
41	312949-2	<i>O. arenaria</i> subs. <i>arenaria</i>
42	312972	<i>O. arenaria</i> subsp. <i>arenaria</i> -Former Soviet Union
43	204594	<i>O. viciifolia</i>
44	110400	<i>O. viciifolia</i> -CPI 63749-Former Soviet Union
45	167236	<i>O. viciifolia</i>
46	171726	<i>O. viciifolia</i> -Turkey
47	110404	<i>O. viciifolia</i> -Former Soviet Union
48	312907	<i>O. altissima</i>
49	312956-2	<i>O. arenaria</i> subs. <i>arenaria</i>
50	284124	<i>O. biebersteinii</i> -CPI 23313-Hungary
52	312956-1	<i>O. arenaria</i> subs. <i>arenaria</i>
53	312954	<i>O. arenaria</i> subs. <i>arenaria</i>
54	312927	<i>O. arenaria</i> -GSSYK-HULSK-Former Soviet Union
55	312960	<i>O. arenaria</i> subs. <i>arenaria</i>
57	312832-2	<i>O. caput-galli</i> -1153-Turkey
58	557460	<i>O. crista-galli</i> -WJK 19-Syria
59	312940	<i>O. inermis</i>
60	561107	<i>O. viciifolia</i>
61	372835	<i>O. viciifolia</i>
62	372834-1	<i>O. viciifolia</i>
63	372834-2	<i>O. viciifolia</i>
64	372834-3	<i>O. viciifolia</i>
65	372831	<i>O. viciifolia</i> -GERMANSKIJ-Central Bohemia, Czech
66	372829	<i>O. viciifolia</i>
67	318603-2	<i>O. viciifolia</i>
68	316296-2	<i>O. viciifolia</i>
69	313605	Bilinmiyor
70	313062	<i>O. viciifolia</i> -ARTEMOVSK-Former Soviet Union
71	313061	<i>O. viciifolia</i> -POLTAVA 553-Former Soviet Union
72	313055	<i>O. viciifolia</i> -CPI 63837-Former Soviet Union
73	273789-2	<i>O. viciifolia</i>
76	258776	<i>O. viciifolia</i>
77	236486-2	<i>O. viciifolia</i>
78	229612	<i>O. viciifolia</i>
79	206459-3	<i>O. viciifolia</i>
81	200872	<i>O. viciifolia</i>
115	205201	<i>O. viciifolia</i>
121	206459	<i>O. viciifolia</i>
122	182247	<i>O. viciifolia</i>
123	239957	<i>O. viciifolia</i>
129	273788	<i>O. viciifolia</i>
130	338651	<i>O. viciifolia</i>
Eyüp		Yabani
S1		Lokal varyete
S1_16		Lokal varyete
S4_8		Lokal varyete
S4_20		Lokal varyete
S4_21		Lokal varyete
S5_23		Lokal varyete
Y		Yabani



### 3.2. Örnek Toplama ve Genomik DNA İzolasyonu

Bitkilerden genomik DNA izolasyonunda kullanılan birçok farklı protokol mevcuttur. Ancak farklı bitkilerin kimyasal içerikleri de birbirlerinden farklı olduğu için birbirine yakın olan türler için bile özel genomik DNA izolasyon yöntemleri gerekebilmektedir. Bu tez çalışmasında DNA izolasyonu optimizasyonları sonucunda miktar ve kalite bakımından en iyi olan, PCR analizlerinde istenilen kalitede sonuç veren DNA örneği Doyle Doyle (1990) metodu kullanılarak elde edildiğinden Doyle Doyle (1990) metodu kullanılmıştır.

Araştırmada DNA ekstraksiyon kaynağı olarak her bir korunga hattından sağlıklı, genç ve taze yapraklar kullanılmıştır. Homojenizasyon işlemi için her bir 2 ml'lik tüpe kolayca ezilebilmeleri için bistüri ile parçalanmış 3-4 adet yaprak örneği yerleştirilmiş, 2 adet 2 mm'lik metal bilye ilave edilmiştir. Örnekler Retsch® MM400 model titreşimli homojenizatör cihazı yardımıyla parçalanmıştır. Homojenizasyon süresi ortalama 3 dk ve titreşim frekansı 30 olarak ayarlanmıştır. İyice parçalanmış yaprak örnekleri bilyeler alındıktan sonra DNA izolasyonuna hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Korunga yapraklarının Retsch® MM400 model vibrasyonlu homojenizatör ile parçalanması

DNA izolasyonunda yararlanılan protokol basamakları aşağıdaki gibidir:

1. İyice ezilen taze yaprak örneklerinin üzerine 700 µl önceden 65 °C ısıtılmış özütleme tamponu (200 mM TRIS-HCl, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol %2 CTAB, pH:8) ilave edilmiştir.
2. Her bir tüpe 0,025 gr PVP eklenerek iyice vorteksledikten sonra çalkalayıcı ısıtıcılı blokta 65 °C'de 1 saat 1.000 rpm'de inkübe edilmiştir.
3. Örneklerin her birine 350 µl 5 M potasyum asetat eklenmiş, hafifçe çalkalanmış, buzlu kaptan +4 °C'de 20 dk bekletilmiştir.
4. 13.000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 20 dk santrifüj edilmiştir.
5. Üstteki sıvı kısım (süpernatant) steril 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
6. Tüplerin her birine eşit hacimde Choloroform: Isoamylalcohol (24:1) eklenmiş ve 15 dk vortekslenmiştir.
7. 10.000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir.
8. Üstteki sıvı kısım steril 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
9. Tüplerin her birine Choloroform: Isoamylalcohol (24:1) eklenmiş ve 15 dk vortekslenmiştir.
10. 10.000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir.
11. Üstteki sıvı kısım steril 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmış, üzerine 12 µl sodyum asetat eklenmiştir (Şekil 3.2).



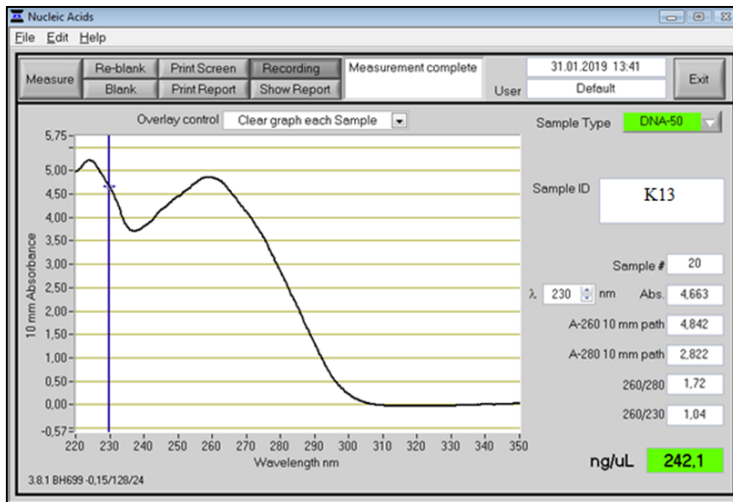
Şekil 3.2. Üstteki sıvı kısmın steril 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılması

12. Her bir örneğe 800 µl soğuk isopropanol eklenmiş -20 °C'de gece boyu bekletilmiştir.
13. 13.000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 15 dk santrifüj edilmiştir.
14. Üst kısım dökülerek pellet bir miktar kurumaya bırakılmıştır.

15. Yavaşça yerinden hareket ettirilen pellet üzerine 1.000 µl soğuk %70'lik ethanol eklenmiş, 13.000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir.
16. Üst kısım dökülerek pellet bir miktar kurumaya bırakılmıştır.
17. Yavaşça yerinden hareket ettirilen pellet üzerine 1.000 µl soğuk %70'lik ethanol eklenmiş, 13.000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edilmiştir.
18. Üst kısım dikkatlice dökülerek alkolün iyice uçması için tüpler ters çevrilerek pellet kurumaya bırakılmıştır.
19. Her bir örneğe 100 µl TE tamponu (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH:8) eklenmiş 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
20. DNA örnekleri PCR işlemleri gerçekleşinceye kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.3. İzole Edilen DNA Örneklerinde Kalite ve Miktar Tayini

Genomik DNA'nın saflığını daha kesin sayısal ifadelerle belirlemek için spektrofotometre (Nanodrop® 1000) ile absorbans (UV ışık altında A260 nm / A280 nm ve A260 nm / A230 nm) değerleri ölçülmüş, saflığı ve miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.3). DNA örneklerinin ölçümleri Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda ölçülen DNA miktarı, 41,13 ng/µl ile 3441,01 ng/µl arasında değişmekte 260/280 nm absorbans değerleri ise 1,49 ile 2,18 arasında bulunmuştur (Çizelge 3.2). DNA ölçümleri sonucunda DNA miktarı 50 ng/µl'den fazla olan örnekler dH<sub>2</sub>O ilave edilerek her bir örnek 50 ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır. DNA miktarı 50 ng/µl'den az olan örneklerde herhangi bir sulandırma yapılmamıştır.



Şekil 3.3. Nanodrop® 1000 spektrofotometre ile miktar ve kalitesi ölçülmüş DNA örneği

Çizelge 3.2. Korunga genomik DNA örneklerinin miktar ve kalite ölçüm sonuçları

Örnek kodu	DNA miktarı (ng/ul)	A <sub>260/280</sub>	Örnek kodu	DNA miktarı (ng/ul)	A <sub>260/280</sub>
1	73,64	1,86	52	57,81	1,77
2	171,37	1,84	53	405,49	2,09
3	78,41	1,9	54	106,05	1,94
4	235,04	1,9	55	131,44	2,08
7	107,93	1,84	57	144	1,8
8	144,62	1,82	58	229,3	2,05
9	615,01	1,83	59	178,61	1,87
10	224,72	1,99	60	717,98	2
11	105,16	2,07	61	157,61	1,99
12	264,66	1,89	62	83,06	1,85
13	251,59	1,72	63	317,5	1,93
14	475,55	1,49	64	127,03	1,97
16	41,13	1,81	65	92,1	2,09
17	111,17	1,93	66	708,55	2,14
18	172,96	1,74	67	133,77	2,06
19	154,78	1,9	68	122,62	2,12
20	129,77	1,88	69	105,4	1,84
22	221,12	1,77	70	593,09	1,82
23	74,85	1,91	71	118,53	2,12
24	51,1	1,95	72	201,42	1,92
25	139,86	1,84	73	131,55	1,8
26	1110,05	1,59	76	88,91	2,13
27	160,39	1,81	77	144,17	1,96
31	159,47	1,84	78	305,08	1,78
32	96,8	1,89	79	479,15	1,72
33	114,6	1,91	81	251,87	1,99
34	92,69	2,04	115	136,42	1,87
35	110,52	1,84	121	148,84	2,01
37	95,95	1,95	122	150,58	2,01
38	141,66	1,8	123	177,39	2,12
39	134,14	1,97	129	76,02	2,1
40	170,84	1,56	130	213,46	1,49
41	206,29	1,92	28_9	152,72	2,05
42	57,41	1,97	Eyüp	817,56	1,97
43	3441,01	1,61	S1	88,92	2,07
44	160,72	1,87	S1_16	77,68	1,89
45	122,76	2,04	S4_20	142,83	1,92
46	97,65	1,88	S4_21	99,36	1,78
47	189,88	1,95	S4_8	95,92	1,73
48	136,75	2,18	S5_23	163,18	1,95
49	249,19	2,08	Y	142,13	1,86
50	145,89	1,97			

### 3.4. Çalışmada Kullanılan SSR Primerleri, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri ve Elektroforez

İzole edilen korunga genomik DNA'sına özgü SSR primerleri kullanılarak SSR lokuslarının çoğaltılması sağlanmıştır. Kempf vd. (2016)'nin çalışmasında korungaya özgü geliştirilen SSR primerlerinden seçilen 101 SSR primerinin korunga bireyleri arasında güvenilir bir şekilde polimorfizmi saptadığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da 101 SSR primeri içerisinde korungaya özgü 10 SSR primer çifti çalışılmak üzere seçilmiştir. Bu tez çalışmasında maliyeti daha düşük olması nedeniyle kullanılacak SSR lokuslarının analizlerinde Schuelke (2000) tarafından tasarlanan M13 işaretleme yöntemi kullanılmıştır. Schuelke (2000) tarafından tasarlanan bu yöntem SSR'ların analizi için floresan primer etiketleme maliyeti, etiketlenmemiş bir primer sentezinden genellikle 6-7 kat daha pahalı olmasından dolayı çalışmaların daha ekonomik olması amacıyla geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan SSR lokuslarının PCR ile çoğaltılabilmesi için Çizelge 3.3'de verilen primer setleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılmak üzere belirlenen SSR primerlerine ait bilgiler

Primer Adı	Primer Dizisi (Sekansı) 5' → 3'	Tekrar Motifi
M13-FAM OVK036-F OVK036-R	5'-FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTA AACGACGGCCAGTGTGTTAAAGGGGTGAAAACAT-3' 5' CATT TTGACAAACCAGTATCC 3'	(AGGT) <sub>6</sub>
M13-VIC OVK094-F OVK094-R	5'-VIC- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5' TGTA AACGACGGCCAGTACCGATCTTAGGATAGATGGA 3' 5' ACTTTTGTTGCTTAGTCGAT 3'	(TTGCG) <sub>5</sub>
M13-NED OVK125-F OVK125-R	5'-NED- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5'TGTA AACGACGGCCAGTAAATTTAAGCACC GGAATAAC-3' 5' AAAGCAA AAGGGCTACTAAAG 3'	(CATTT) <sub>5</sub>
M13-FAM OVM033-F OVM033R	5'-FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5'TGTA AACGACGGCCAGTCAAGGCTTATTTGGTTAACAG-3' 5' ATACTATTTCCCATGCCTACC 3'	(CTC) <sub>6</sub>
M13-FAM OVK161-F OVK161-R	5'-FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5'TGTA AACGACGGCCAGTAAAGCTTTCTACACGTTGGTA-3' 5' TGGTTTTTACTCTGTGAT 3'	(TTCC) <sub>6</sub>
M13-PET OVM125-F OVM125-R	5'-PET- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5'TGTA AACGACGGCCAGTATTCTTTCAACAAGCAAGTGA-3' 5' CTGCAATTCCATCCTATTTTA 3'	(AAATT) <sub>5</sub>
M13-VIC OVK046-F OVK046-R	5'-VIC- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5'TGTA AACGACGGCCAGTTCAACCACATTATAAACCTCA-3' 5' CGCGAAATCATAGTTCACTT 3'	(AGTG) <sub>6</sub>
M13-NED OVK061-F OVM061-R	5'-NED- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5'TGTA AACGACGGCCAGTTTAAACACACGTACGTACCACA-3' 5' TTTGTCGTTGATCGTTAAGTT 3'	(GTA) <sub>6</sub>
M13-PET OVK174-F OVK174-R	5'-PET- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5'TGTA AACGACGGCCAGTACATGATCGTGAATATGAAGC-3' 5' CAGCAGCAATCAATATATCATC 3'	(GGCCC) <sub>5</sub>
M13-PET OVK101-F OVK101-R	5'-PET- TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' 5'TGTA AACGACGGCCAGTGTGAGTTTCAGACACAGAGC-3' 5' AATAGCTCCACAATAACTCC 3'	(CTAA) <sub>6</sub>

Yapılan tez çalışmasında, SSR primerleri için laboratuvar koşullarımıza uygun gerekli optimizasyonlar yapılmıştır. PCR analizi için optimize edilen reaksiyon şartları Çizelge 3.4’de gösterilmiştir. Optimize edilmiş PCR koşullarına ait bilgiler ise Çizelge 3.5’de gösterilmiştir.

PCR reaksiyonu toplam 15 µl hacimde yapılmış, 0,2 ml PCR tüplerine her bir DNA örneğinden 2 µl (yaklaşık 100 ng) koyulmuş ardından PCR için gerekli karışım (master mix) hazırlanmıştır. Hedef DNA dışında tüm maddeler reaksiyon sayısına göre yeterli olacak miktarda tek bir tüpte karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım vortekslenerek iyice karıştırıldıktan sonra her bir tüpe 13 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. DNA amplifikasyonlarında Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler ve Applied Biosystems® Proflex™ PCR System Thermal Cycler cihazları kullanılmıştır (Şekil 3.4).

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan optimize edilmiş PCR koşullarına ait bilgiler

PCR Karışımı	Son Konsantrasyon
<b>10X PCR Tamponu</b>	1X
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2 mM
<b>dNTPler</b>	0,2 mM
<b>M13 Primer</b>	3 pmol
<b>İleri (F) Primer</b>	1 pmol
<b>Geri (R) Primer</b>	3 pmol
<b>Taq DNA Polimeraz</b>	1,5 U
<b>DNA</b>	100 ng

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan optimize edilmiş PCR döngülerine ait bilgiler

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	94 °C	5 dk	1
2	94 °C	30 sn	30
	56 °C	45 sn	
	72 °C	45 sn	
3	94 °C	30 sn	10
	53 °C	45 sn	
	72 °C	45 sn	
4	72 °C	10 dk	1
5	4 °C	Bekleme	



Şekil 3.4. Thermal cyclers cihazlarında DNA amplifikasyonları ve elektroforez

PCR tekniği ile çoğaltılan DNA'lar elektroforezde görüntüleme işlemi yapılana kadar, alüminyum folyo ile kaplanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Bantların istenilen bölgede ve kalitede olup olmadığı anlamak için PCR ürünleri 6X jel yükleme boyası (2µl) ile karıştırılmış ve RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (1,8 µl) içeren %1,5'lük agaroz jelde 1X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponunda 90 voltta yaklaşık 1 saat yürütülmüştür. RedSafe ile boyanan bantlar UV ışık altında Gel Imaning System Vilber Lourmat Quantum ST5 ile görüntülenmiştir.

Elde edilen PCR ürünlerinin DNA parça (fragment) büyüklükleri hizmet alımı ile belirlenmiştir. DNA parça analizinde PCR ürünlerinin büyüklüğünü belirlemek için 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies,UK) cihazı ve büyüklük standardı olarak GeneScan 500 LIZ kullanılmıştır. Çalışılan korunga aksesyonlarına ait örneklerden fragment analizlerinin sonuçları laboratuvarımızda GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak değerlendirilmiş ve her bir SSR primerinin oluşturduğu parçaların (fragmentlerin) baz büyüklükleri belirlenmiştir.

### 3.5. Verilerin İstatiksel Analizi

Çalışılan SSR lokuslarının polimorfizm oranının belirlenmesinde kullanılan bütün örnekler birlikte değerlendirilip en az iki allel içeren mikrosatellit bölgesi polimorfik lokus olarak belirlenmiştir. Polimorfik lokuslar ikiden daha fazla allele sahip lokuslardır. İstatistiksel analizlerde polimorfik lokuslar ve polimorfizm yüzdeleri, polimorfik lokuslarda gözlenen allel sayısı (NoA), Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri (uh) ve Shannon sabiti (I) hesaplanmıştır. Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) lokusların allelik çeşitliliğini ölçen, kullanılan primerlerin polimorfizmi hakkında bilgi veren ve primerin etkinlik derecesini ifade eden bir parametredir. Bu tez çalışmasında kullanılan bireylerdeki 10 SSR lokusunun her biri için PIC

değeri Roldan-Ruiz, Dendauw, Van Bockstaele, Depicker ve De Loose (2000) 'un formülüne göre hesaplanmıştır.

Her bir örnek için DNA parça analizi sonucu büyüklükleri belirlenen allellerin gözlenmesi durumunda allel var (1) veya gözlenmemesi durumunda allel yok (0) şeklinde skorlanarak istatistiki analizler yapılmıştır.

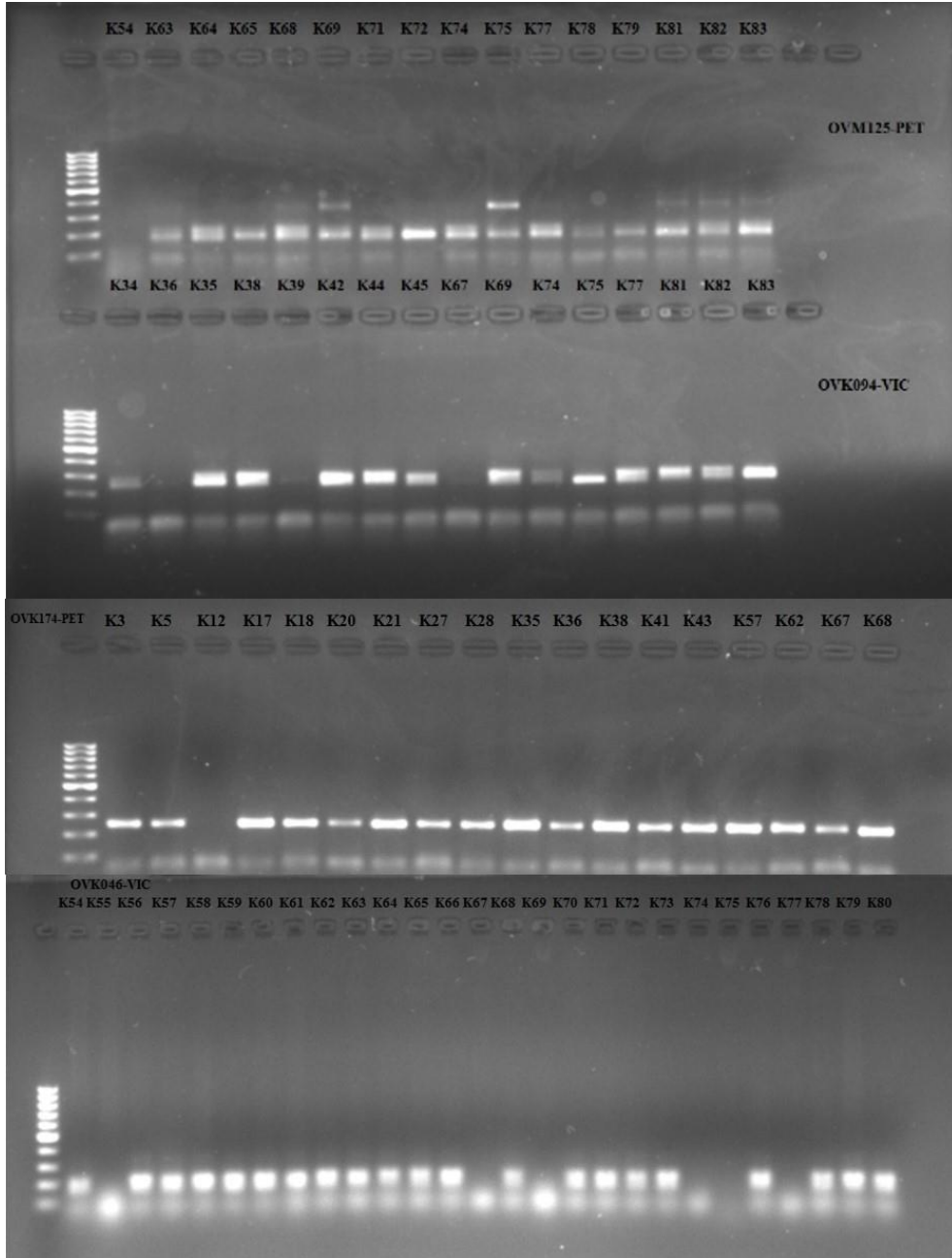
İstatistiki değerlerin hesaplanmasında ve uygun veri analizlerinin yapılmasında GenAlEx [(Version 6.5) (<http://biologyassets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>)] (Peakall ve Smouse 2006) istatistik yazılım programından yararlanılmıştır. Elde edilen sonuçların daha net bir şekilde ortaya konulabilmesi için Nei'nin genetik mesafe kat sayısı ve hatların genetik uzaklıklarını gösteren UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) kümelendirme yöntemi kullanılarak dendrogram oluşturulmuştur (Sneath ve Sokal, 1973; Işık, Semiz ve Kurt, 2005). Dendrogramın oluşturulmasında POPULATIONS 1.2.32 (Population Genetic Software) (Langella, 1999) ve TreeView 1.6.6 (Page, 1996) programından yararlanılmıştır.



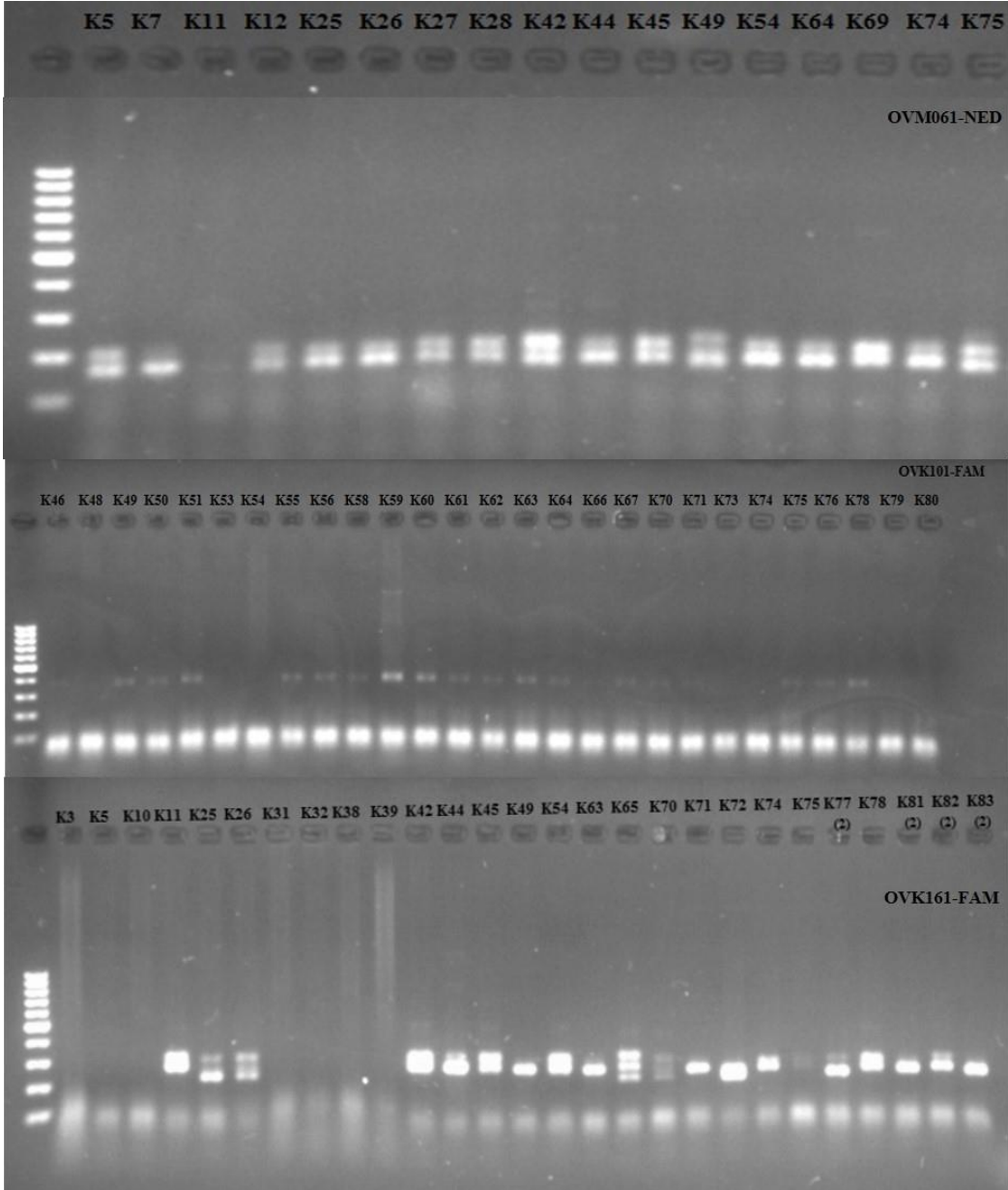
## 4. BULGULAR

### 4.1. Mikrosatellit (SSR) Primerlerine ait Allellerin Belirlenmesi

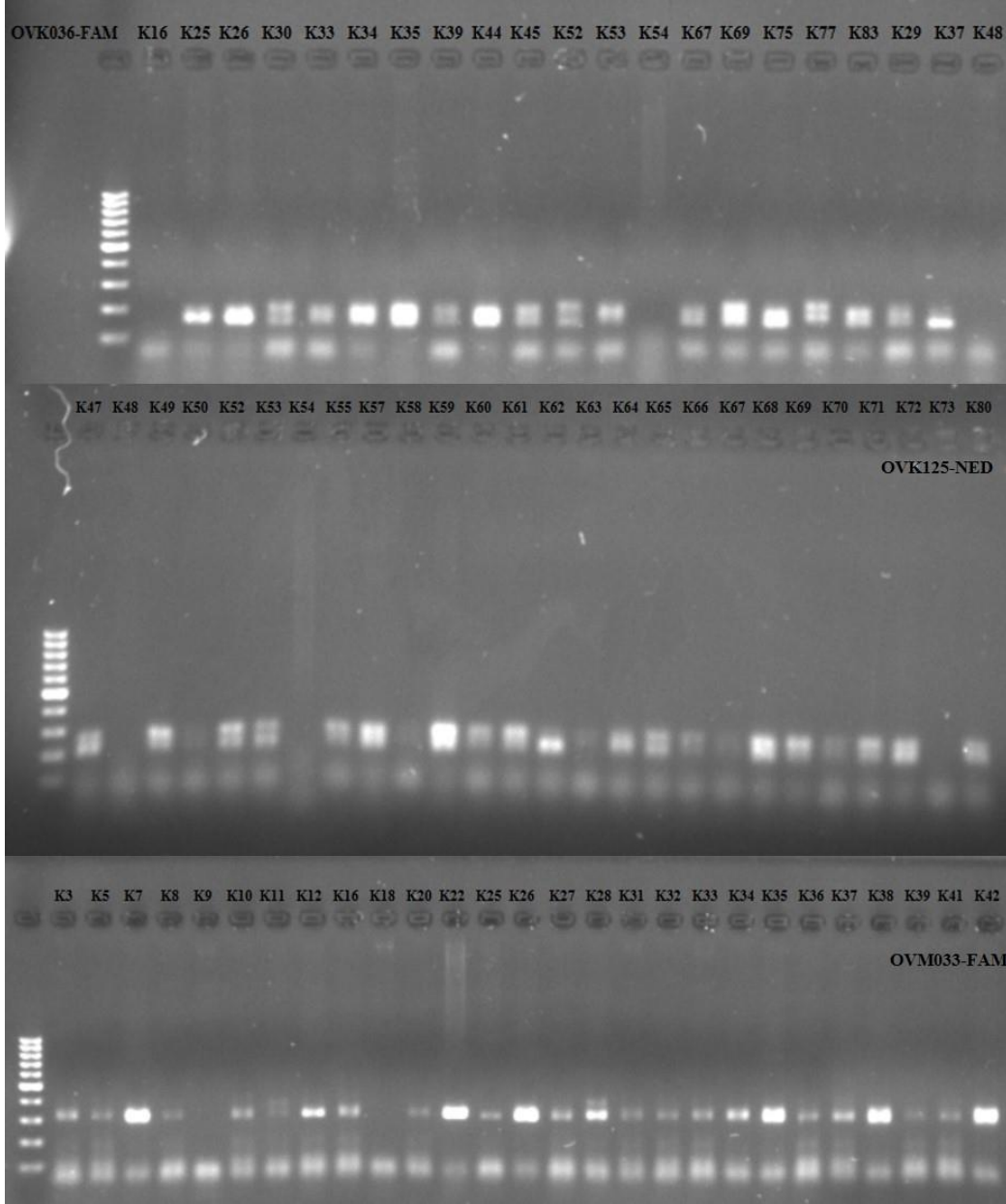
Tez çalışması kapsamında çalışılan bazı örneklere ait PCR analizleri sonucu elde edilen ürünlerin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.1. OVM125, OVK094, OVK174 ve OVK046 primerlerine ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri



Şekil 4.2. OVM061, OVK101 ve OVK161 primerlerine ait PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel görüntüleri



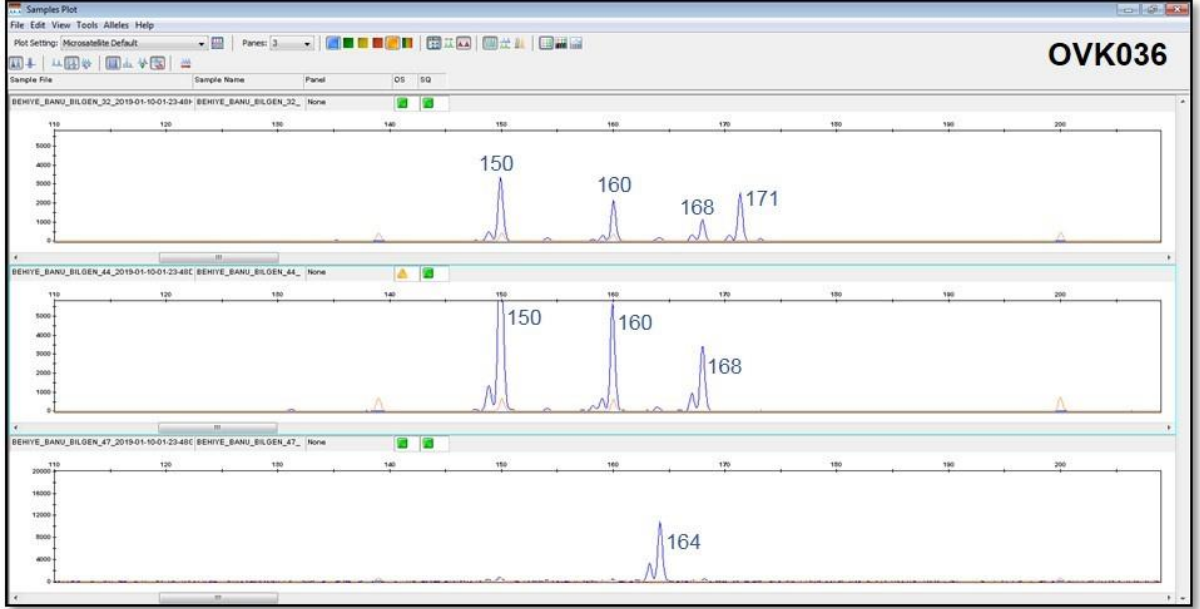
Şekil 4.3. OVK036, OVK125 ve OVM033 primerlerine ait PCR ürünlerinin %1,5'lük agaroz jel görüntüleri

Bu tez çalışmasında 83 korunga hattının her birinin çalışılan SSR lokuslarında sahip olduğu alleller belirlenmiş ve bu allellerin frekansları ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). SSR analizlerinde kullanılan her bir primer bir lokus ve her bir primerin çoğalttığı farklı nükleotid uzunluğundaki DNA parçaları tek bir allel olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.1'de çalışılan 83 korunga hattına ait 10 SSR lokusunda (OVK036, OVK046, OVK094, OVK101, OVK125, OVK161, OVK174, OVM033, OVM061 ve OVM125) belirlenen allellerin baz çifti (bc) olarak büyüklükleri ve allel frekansları gösterilmiştir. Bütün korunga hatlarını bir bütün olarak değerlendirdiğimizde 10 SSR primerinin tamamı polimorfik olarak saptanmıştır.

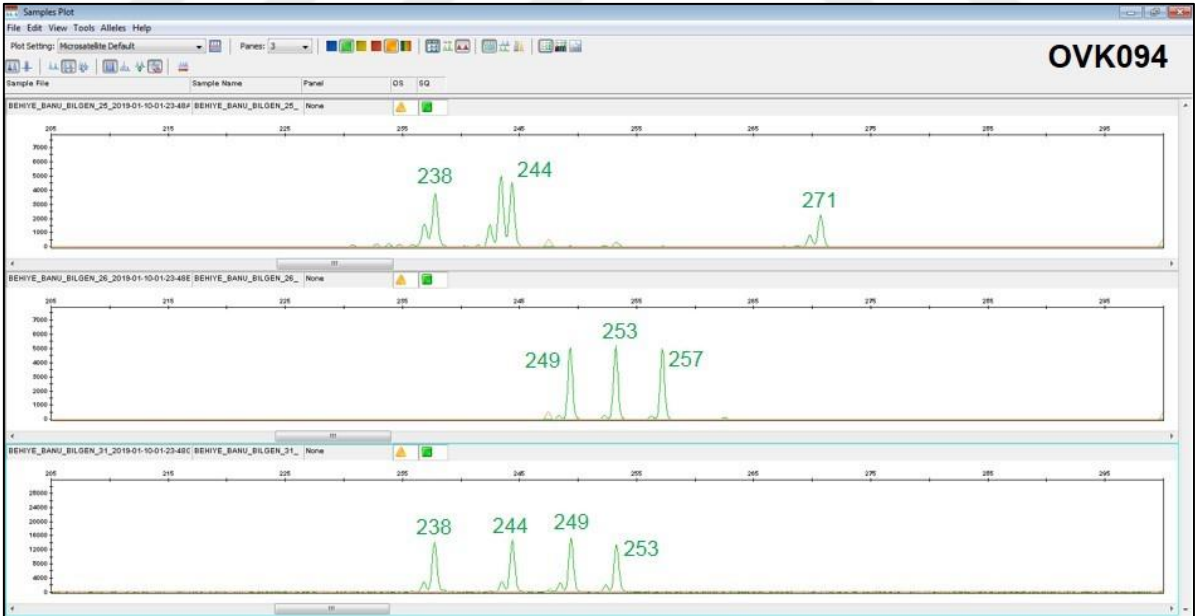
Çizelge 4.1. Çalışmada analiz edilen 10 SSR lokusuna ait allellerin frekansları

SSR Lokusu	Alleller	Allel Frekansları (f)	SSR Lokusu	Alleller	Allel Frekansları (f)
OVK094	229	0,01	OVK036	150	0,89
	234	0,21		154	0,20
	238	0,87		160	0,55
	242	0,16		164	0,37
	244	0,5		168	0,59
	249	0,19		171	0,12
	253	0,39	OVK125	196	0,15
	255	0,02		201	0,81
	257	0,32		206	0,54
	260	0,01		208	0,08
	263	0,01		212	0,45
	269	0,01		216	0,096
	271	0,01		221	0,06
	278	0,03		OVM033	306
288	0,01	309	0,14		
OVM125	163	0,02	312		0,69
	167	0,03	315		0,67
	169	0,08	318		0,73
	172	0,22	321		0,43
	174	0,03	324	0,02	
	176	0,57	OVK046	154	0,03
	181	0,59		158	0,78
	199	0,03		160	0,02
	204	0,33		162	0,57
	206	0,01		164	0,46
	209	0,18		166	0,55
	211	0,02		168	0,61
	214	0,22		170	0,19
219	0,01	172		0,06	
OVK161	218	0,14		174	0,01
	222	0,19	OVM061	142	0,33
	242	0,01		151	0,36
	252	0,04		154	0,79
	258	0,75		160	0,87
	260	0,01		162	0,06
	262	0,22		165	0,01
	266	0,3		167	0,31
	268	0,02		170	0,07
	270	0,16		174	0,01
	272	0,1	OVK101	359	0,68
274	0,02	361		0,07	
OVK174	247	0,96		363	0,86
	250	0,68		367	0,5
	255	0,01		371	0,34
	259	0,02	375	0,01	
	265	0,02	387	0,18	

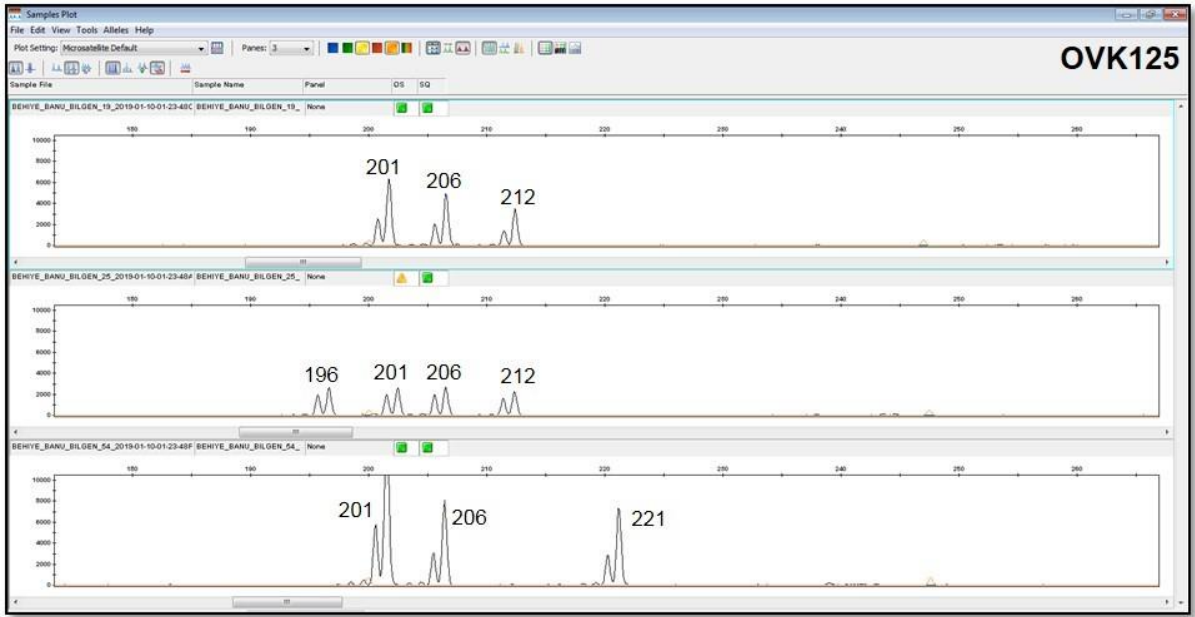
DNA fragment (parça) analizi sonucu GeneMapper Software 5.0 programı yardımıyla incelenen SSR primerlerine ait bazı allellerin büyüklükleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13).



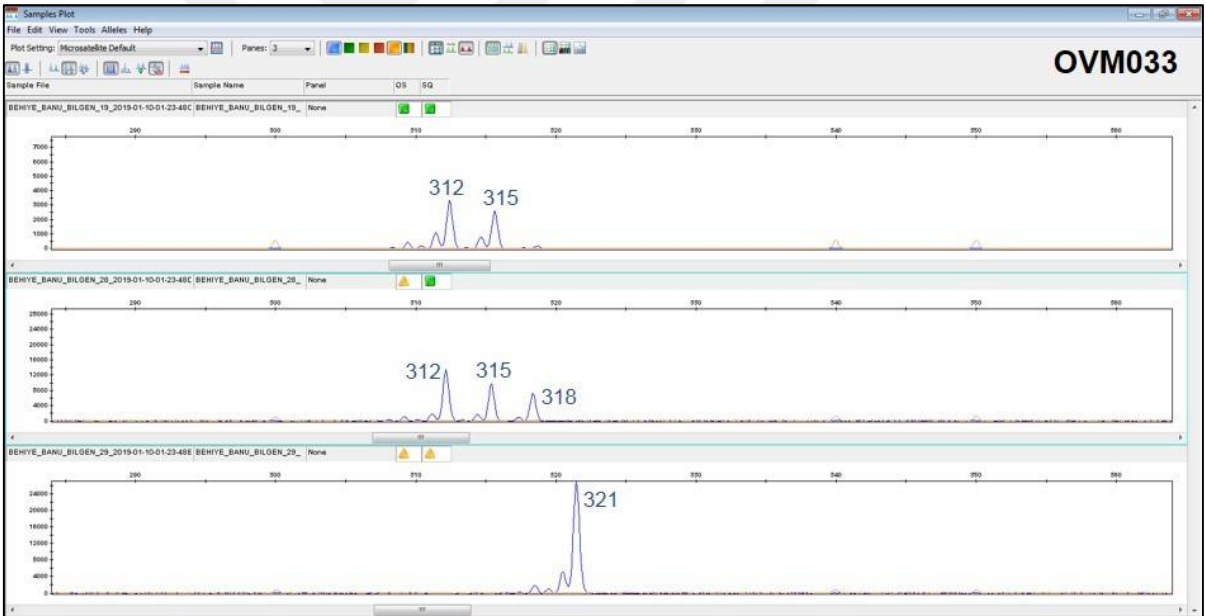
Şekil 4.4. OVK036 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.5. OVK094 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü



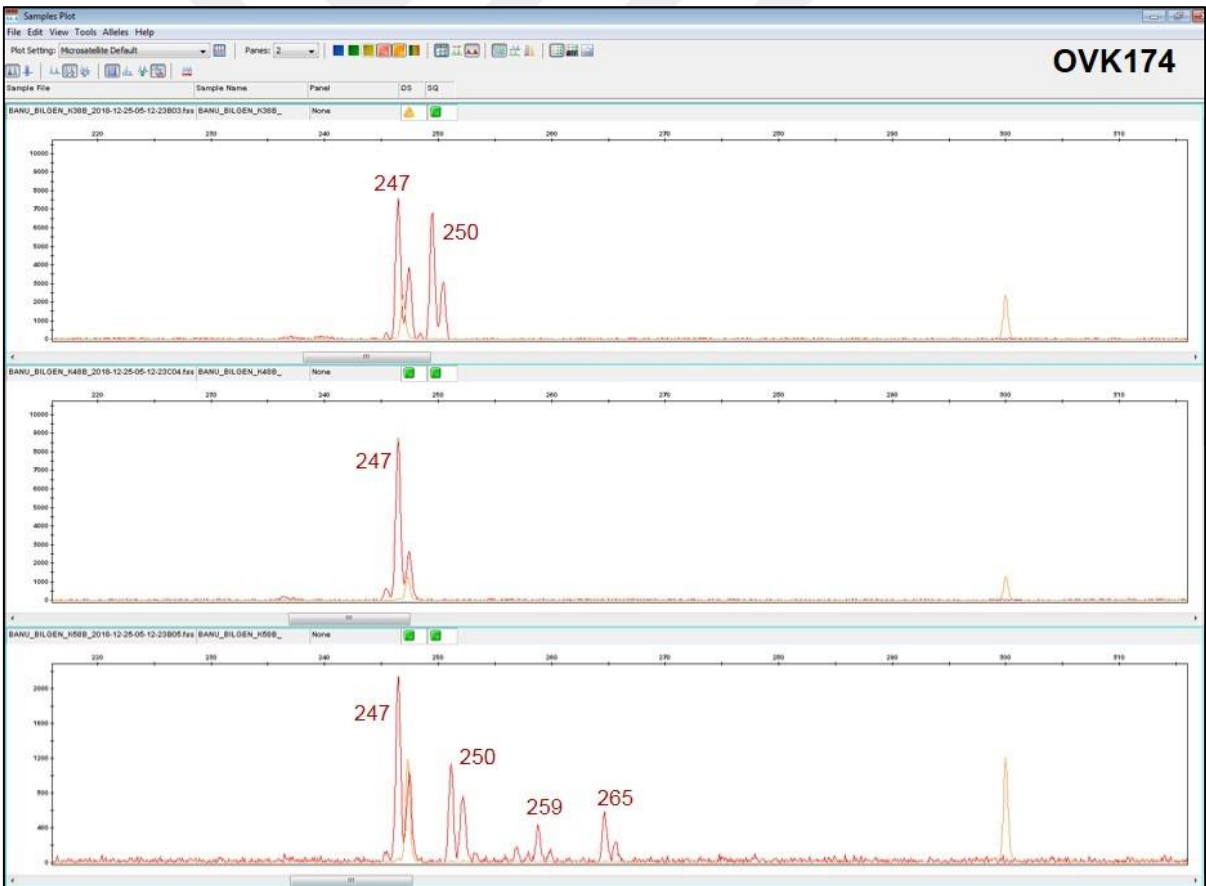
Şekil 4.6. OVK125 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.7. OVM033 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü



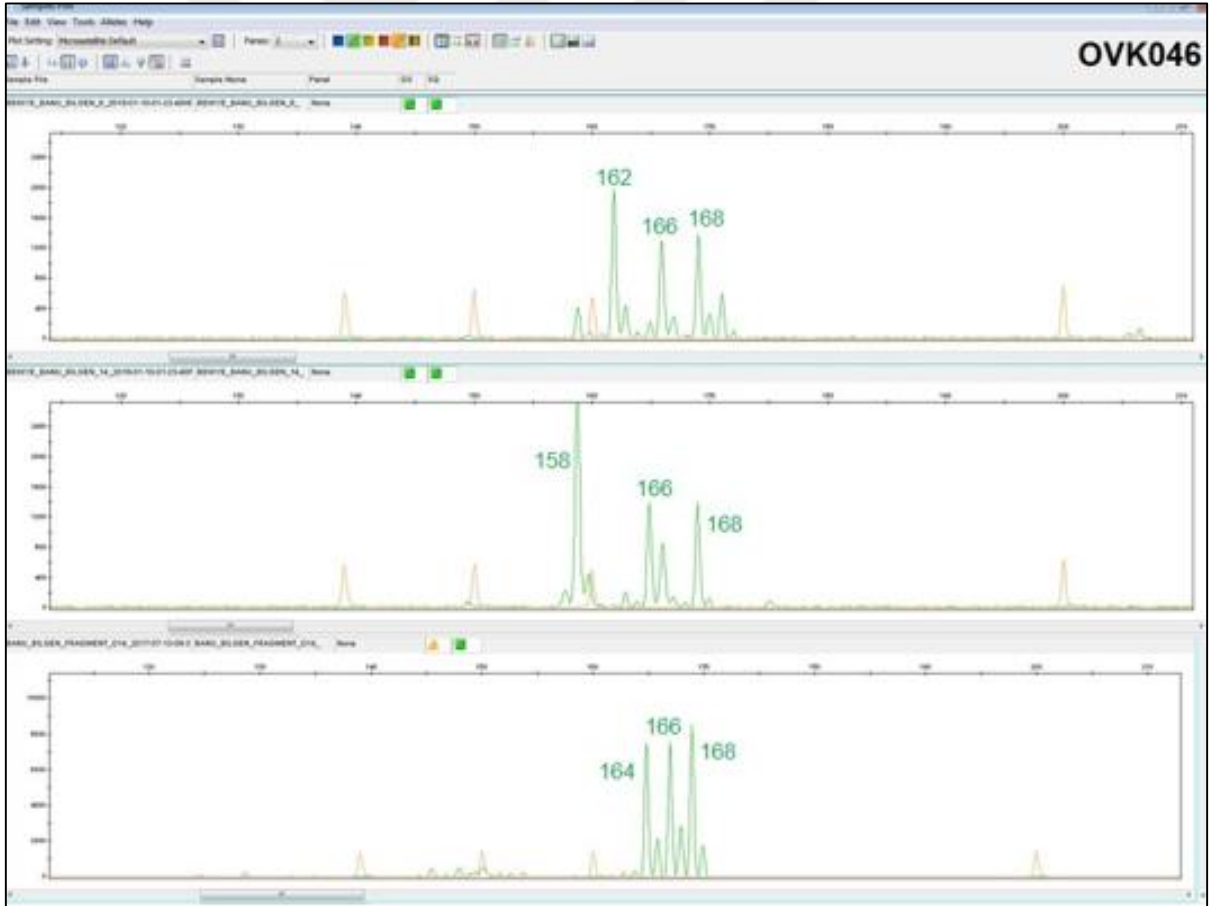
Şekil 4.8. OVK161 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.9. OVK174 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü

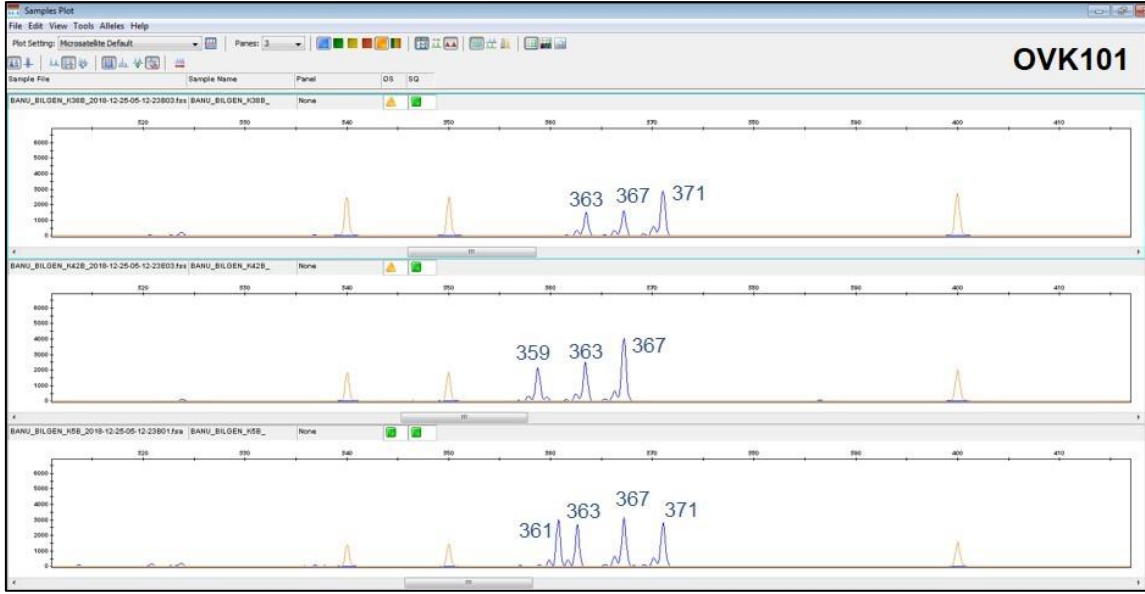


Şekil 4.10. OVM125 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.11. OVK046 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü





Şekil 4.12. OVK101 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.13. OVM061 no'lu primere ait bazı allellerin elektroferogram görüntüsü

Çalışılan *Onobrychis* aksesyonlarında kullanılan 10 SSR lokusu için toplam 92 allel tespit edilmiştir. Kullanılan SSR lokuslarından en çok allel (15) OVK094 primerinde gözlenmiştir. OVM125 primerinde 14 allel, OVK161 primerinde 12 allel, OVK046 primerinde 10 ve OVM061 primerinde 9 allel gözlenmiştir. OVK125, OVM033 ve OVK101 primerlerinde ise 7'şer allel belirlenmiştir. Kullanılan SSR lokuslarında en az alleller ise OVK036 (6 allel) ve OVK174 (5 allel) primerlerinde saptanmıştır. Çalışma için seçilen primerlere ait allellerin uzunluğu bütün SSR primerleri bir bütün olarak değerlendirildiğinde 142 bç ile 387 bç arasında değişmektedir.

OVK036 primeri için hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 150 bç, 160 bç ve 168 bç'lik alleller yüksek frekansa sahip allellerdir ( $f > 0,5$ ). OVK036 primeri için en düşük frekansa sahip allel 171 bç'lik alleldir ( $f = 0,12$ ).

OVK094 primeri için hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 238 bç'lik allel en yüksek frekansa sahip alleldir ( $f = 0,87$ ). 253 bç'lik allel ise 0,39 frekans ile ikinci yüksek frekansa sahip alleldir. OVK094 primerinin sahip olduğu allellerden 6'sının frekansı 0,1'den küçük olduğu için nadir allel olarak belirlenmiştir.

OVK125 primeri için hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 201'lik allel yüksek frekansa sahip alleldir ( $f = 0,815$ ). OVK174 primerinde 247 ve 250 bç'lik alleller en yüksek frekansa sahiptir. OVK101 primerinde ise 363 bç'lik allel en yüksek frekansa sahiptir ( $f = 0,86$ ).

OVK161 primeri için hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 258 bç'lik allel en yüksek frekansa sahip alleldir ( $f = 0,75$ ). OVK046 primeri için en yüksek frekansa sahip allel 158 bç'lik alleldir ( $f = 0,78$ ). OVM061 primerinde 160 bç'lik allel en yüksek frekansa sahiptir.

OVM033 primeri için hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 312 bç, 315 bç ve 318 bç'lik alleller yüksek frekansa sahip allellerdir ( $f > 0,5$ ). OVM033 primeri için en düşük frekansa sahip alleller 306 ve 324 bç'lik allellerdir ( $f = 0,02$ ). OVM125 primeri için hesaplanan allel frekanslarına bakıldığında 176 bç ve 181 bç'lik alleller en yüksek frekansa sahip allellerdir ( $f > 0,5$ ).

## 4.2. Genetik Çeşitlilik Parametreleri

Tez çalışmasında kullanılan SSR primerlerine ait genetik çeşitlilik parametreleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Çizelge 4.2’ye göre, hesaplanan PIC değerleri 0,019 ile 0,5 arasında değişmektedir. Ortalama PIC değeri en yüksek OVK036 primerinde (0,363), en düşük OVK174 (0,120) primerinde hesaplanmıştır. Analiz edilen tüm örnekleri bir bütün olarak ele aldığımızda ortalama PIC değeri 0,240 olarak tespit edilmiştir.

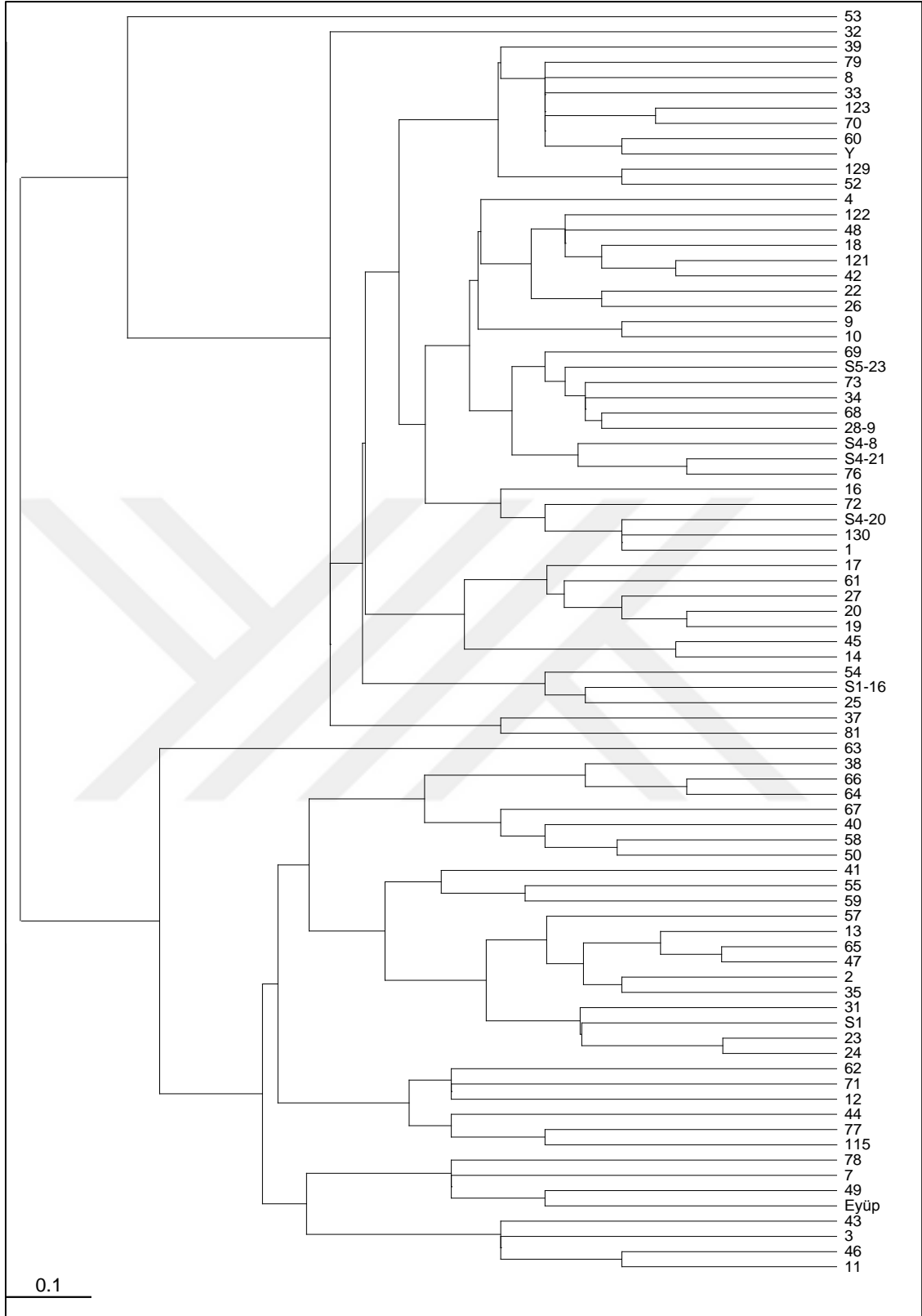
Çalışmada kullanılan korunga hatları bütün olarak değerlendirildiğinde ortalama Shannon sabiti (I) 0,375 olarak tespit edilmiştir. Shannon sabiti (I), 0,540 değeri ile en yüksek OVK036 lokusunda, 0,210 değeri ile en düşük OVK174 lokusunda hesaplanmıştır. I değerinin yüksek olması çalışılan bireyler arasında SSR lokusu bakımından önemli oranda varyasyon olduğunu göstermektedir. Nei (1987)’nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri (uh) her SSR lokusu için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Nei (1987)’nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri (uh) ortalama 0,243 olarak hesaplanmış, en yüksek değer 0,367 ile OVK036 lokusunda, en düşük değer ise 0,121 ile OVK174 lokusunda gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan 10 SSR lokusuna ait genetik parametreler

SSR Lokusları	NoA*	Bant Aralığı	Ort. PIC	Min. PIC	Maks. PIC	I*	uh*	Ort. AF	Min. AF	Maks. AF
<b>OVK036</b>	6	150-171	0,363	0,195	0,495	0,540	0,367	0,45	0,12	0,89
<b>OVK094</b>	15	229-288	0,189	0,019	0,5	0,300	0,191	0,18	0,01	0,87
<b>OVK125</b>	7	196-221	0,285	0,112	0,496	0,446	0,288	0,31	0,06	0,81
<b>OVM033</b>	7	306-324	0,297	0,039	0,490	0,449	0,301	0,38	0,02	0,73
<b>OVK161</b>	12	218-274	0,200	0,019	0,42	0,329	0,203	0,16	0,01	0,73
<b>OVM125</b>	14	163-219	0,209	0,019	0,490	0,333	0,212	0,16	0,01	0,59
<b>OVK046</b>	10	154-174	0,286	0,019	0,496	0,430	0,289	0,32	0,01	0,78
<b>OVM061</b>	9	142-174	0,241	0,019	0,460	0,379	0,244	0,31	0,01	0,87
<b>OVK174</b>	5	247-265	0,120	0,019	0,435	0,210	0,121	0,33	0,01	0,96
<b>OVK101</b>	7	359-387	0,296	0,019	0,5	0,450	0,299	0,37	0,01	0,86
<b>Ortalama</b>	9,2	-	0,240	-	-	0,375	0,243	0,29	-	

\* NoA=Gözlenen allel sayısı, PIC = Polimorfik bilgi içeriği, Ort.= Ortalama, Min.= Minimum, Maks.= Maksimum, I = Shannon sabiti, uh = Nei (1987)’nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri, AF= Allel frekansı

Tez çalışmasında kullanılan korunga aksesyonlarına ait genetik farklılaşmanın görsel bir grafik üzerinde görülmesi için Nei (1987)'nin genetik mesafe değerleri UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) kümelendirme yöntemi ile sınıflandırılmış ve dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 4.14). Dendrogramın oluşturulmasında POPULATIONS 1.2.32 (Population Genetic software) ve TreeView 1.6.6 programından yararlanılmıştır. Oluşturulan dendrograma göre, çalışılan korunga aksesyonları 2 ana gruba ayrılmıştır. Grup 1, 48 korunga genotipinden, Grup 2 ise 35 korunga genotipinden oluşmaktadır. Grup 1, 33 *O. viciifolia*, 6 *O. arenaria*, 1'er tane *O. caput-galli* ve *O. altissima* aksesyonlarını içermektedir. Grup 2 ise 24 *O. viciifolia*, 4 *O. arenaria*, 1'er tane *O. caput-galli*, *O. biebersteinii*, *O. crista-galli* ve *O. inermis* aksesyonlarını içermektedir. Grup 1 incelendiğinde kendi içinde 2 alt gruba ayrıldığı görülmektedir. Grup 1'de yer alan 53 kodlu *O. arenaria* subs. *arenaria* genotipi bir alt grubu oluştururken diğer 47 genotip ayrı bir alt grubu oluşturmuştur. Grup 1 içerisinde genetik olarak birbirine en benzer genotip çiftleri S4\_21 ile 76 (*O. viciifolia* ile Lokal varyete) ve 19 ile 20 (*O. arenaria*-SANDY 1251-Former Soviet ile *O. arenaria*-HİBRİD 12-Central Bohemia) numaralı genotiplerdir. Grup 2'de yer alan 63 kodlu *O. viciifolia* genotipi bir alt grubu oluştururken diğer 34 genotip ayrı bir alt grubu oluşturmuştur. Grup 2 içerisinde genetik olarak birbirine en benzer genotip çiftleri 47 ile 65 (*O. viciifolia*-Former Soviet Union ile *O. viciifolia*-GERMANSKIJ-Central) ve 23 ile 24 (her ikisinde *O. viciifolia*) numaralı genotiplerdir.



Şekil 4.14. Korunga aksesyonlarının SSR analizleri sonucunda genetik mesafe değerlerine göre oluşturdukları dendrogram

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, çok yıllık bir baklagil yem bitkisi olan korunga bitkisine ait 83 aksesyondan toplanan yaprak örnekleri kullanılarak moleküler analizler yapılmıştır. Toplanan yaprak örneklerinden DNA izolasyonu ve elde edilen DNA örnekleri kullanılarak 10 SSR lokusu ile (OVK036, OVK046, OVK094, OVK101, OVK125, OVK161, OVK174, OVM033, OVM061 ve OVM125) PCR analizleri başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Literatürde korunga ile ilgili daha önce yapılmış çalışmalar incelendiğinde; bitkinin morfolojik, fenolojik ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, anatomik ve palinolojik karakterlerin incelenmesi, karyotip analizi, filogenetik analiz çalışmaları, gen aktarım çalışmaları, genetik karakterizasyon ve genetik çeşitliliğin saptanması amaçlı moleküler çalışmalara rastlanmıştır. Korunga ile ilgili olarak genetik çeşitliliğin belirlenmesinde farklı araştırmacılar tarafından RAPD (Nosrati vd., 2012; Okcu vd., 2013; Rasouli vd., 2013), SSR (Avcı vd., 2014; Demdoun vd., 2012; Kempf vd., 2016; Özkan, 2017; Sedeh, 2017; Shen vd., 2019), ISSR (Toluei vd., 2012; Zarrabian ve Majidi, 2015), AFLP (Bhattarai vd., 2017) ve EST (Sedeh, 2017; Shen vd., 2019) gibi belirteçler kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan 10 SSR lokusu polimorfik olarak tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda 10 SSR lokusundan toplam 92 allel belirlenmiş, primer başına ortalama allel sayısı 9,2 olarak hesaplanmıştır. Benzer genetik çalışmalar ile kıyaslandığında; Kempf vd. (2016)'nin çalışmasında 32 korunga bitkisinde 400 SSR primerinden seçilen 101 SSR lokusunda 1159 allel tespit edilmiştir. Çalışmada primer başına ortalama allel sayısı 11,4 olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında kullanılan SSR primerleri Kempf vd. (2016)'nin çalışmasından seçilmiş ve ulaşılan sonuçların birbiriyle tutarlı olduğu gözlenmiştir. Avcı vd. (2014) tarafından ülkemizden örneklenen 58 *Onobrychis* taksonu üzerinde 18 SSR primeri kullanılarak moleküler analizler yapılmış, 79 lokusta 725 allel saptanmıştır. Lokus başına düşen allel sayısı ise 9,18 olarak bulunmuştur. Avcı vd. (2014) tarafından yapılan farklı alttürlerden germplazm örnekleri kullanılması ve kullanılan belirteç sayısının yüksek olması nedeniyle belirlenen allel sayısında yüksek olmuştur. Demdoun vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada Türkiye ve Avrupa'dan 23 korunga aksesyonunda çalışılan 27 EST-SSR lokusundan 14 tanesi polimorfik olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmada polimorfik lokuslardan 6 tanesi genetik yapının belirlenmesi için seçilmiş ve analiz sonucunda toplam 35 allel, lokus başına düşen allel sayısı ise 5,83 olarak tespit edilmiştir. Rasouli vd. (2013)'nin çalışmasında ise İran'dan toplanan 36 korunga popülasyonuna ait bitkilerde 5 RAPD belirteci ile analizler yapılmış ve 79

polimorfik bant elde edilmiştir. Hejrankesh, Haghghi, Mousavizadeh ve Rashidi (2014) tarafından Azerbaycan'da yapılan çalışmada 10 RAPD belirtecinde toplam 90 polimorfik bant tespit edilmiştir. Zarrabian vd. (2013) tarafından Dünya çapındaki korunga populasyonlarında morfolojik, anatomik ve ISSR belirteci ile genetik çeşitlilik analizi yapılmıştır. Çalışılan 80 korunga aksesyonunda 45 ISSR belirteci denenmiş, 22 polimorfik ISSR belirtecinde 275 bant gözlenmiştir. Gözlenen bantların %88 (243 tanesi) oranında polimorfik olduğu bildirilmiştir. Zarrabian ve Majidi (2015) tarafından 102 korunga aksesyonunda seçilen 47 ISSR primerinin 22'si tekrarlanabilir bantlar üretmiş, amplifiye edilen bantların 200 bp ile 1400 bp arasında değiştiği rapor edilmiştir.

Korunga gibi tetraploid türlerde her bir bireyin sahip olduğu SSR allelinin hangi oranlarda bulunduğunu (dozaj) belirlemek güçtür. Kapiller elektroforez yardımıyla DNA parça (fragment) uzunluğu belirlenen SSR allellerinin dozajlarını belirlemek eğer birey belirli bir SSR lokusunda 4 farklı allelden daha az allel taşıyorsa genellikle imkansızdır. Botstein, White, Skolnick ve Davis (1980) tarafından geliştirilen PIC hesaplama formülü diploid türler için kullanılmaktadır. Tetraploid türler için sahip olunan (1-4 allel) allellerin hangi oranlarda bulunduğu belirlenemediği için allellerin varlığından veya yokluğundan yola çıkarak allel frekansı hesaplanması güçtür. Bu nedenle, tetraploid türler için PIC değeri, her bir allelin var/yok sayımı göz önüne alınarak oluşturulmuş Roldan-Ruiz vd. (2000)'in geliştirdiği formül ile hesaplanmaktadır. Roldan-Ruiz vd. (2000)'in formülüne göre hesaplanan maksimum PIC değeri 0,5'dir, elde edilen 0,5 değeri popülasyonun %50'sinde bulunan allellere karşılık gelir. Küçük PIC değeri, ya bol bolunan allel ya da nadir allellere karşılık gelir (Kempf vd., 2016).

Kempf vd. (2016)'nin çalışmasında geliştirilen 101 SSR lokusunun PIC değerleri ve gözlenen allel sayıları incelenerek 10 SSR lokusu tezde kullanılmak üzere belirlenmiştir. Seçilen 10 SSR belirteciine ait polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerlerinin tez çalışmasında hesaplanan ortalamaları ile Özkan ve Bilgen (2019) ve Kempf vd. (2016)'nin çalışmasında bildirilen ortalama PIC değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 5.1'de verilmiştir. Kempf vd. (2016) tarafından 101 SSR lokusu kullanarak yaptıkları çalışmada ortalama PIC değerini en düşük 0,14 ile OVK141 lokusunda, en yüksek 0,36 ile OVK101 lokusunda saptanmıştır. PIC değerleri ayrıntılı incelendiğinde OVK042, OVK172, OVM031, OVM072 ve OVM100 lokuslarının PIC değerinin 0 olduğu yani bu lokusların monomorfik olduğu gözlenmiştir. En yüksek PIC değeri ise 0,5 ile 16 farklı SSR lokusunda hesaplanmıştır. Tez çalışmamızda kullanılan 10 SSR belirteciine ait ortalama PIC değeri en yüksek OVK036 lokusunda (0,363),

en düşük ise OVK174 lokusunda (0,120) gözlenmiştir. Özkan ve Bilgen (2019) tarafından yapılan çalışmada en yüksek PIC değeri OVK125 lokusunda (0,296), en düşük PIC değeri OVK161 lokusunda (0,147) olarak bildirilmiştir. Çizelge 5.1’de de görüldüğü gibi tez çalışmamız ile diğer çalışmalar arasındaki PIC değerleri birbiri ile uyumludur. PIC değerleri arasındaki ufak farklılıkların kullanılan örnek sayısının farklı olmasından ve kullanılan örneklerin orijinindeki farklılıklardan kaynaklandığı söylenebilir.

Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan 10 SSR primerine ait PIC değerlerinin diğer çalışmalarla karşılaştırılması

	<b>Tez Çalışması</b>	<b>Kempf vd. (2016)</b>	<b>Özkan ve Bilgen (2019)</b>
<b>SSR Primerleri</b>	<b>Ort. PIC</b>	<b>Ort. PIC</b>	<b>Ort. PIC</b>
<b>OVK036</b>	0,363	0,350	0,193
<b>OVK094</b>	0,189	0,240	0,194
<b>OVK125</b>	0,285	0,290	0,296
<b>OVM033</b>	0,297	0,290	0,241
<b>OVK161</b>	0,200	0,250	0,147
<b>OVM125</b>	0,209	0,260	0,293
<b>OVK046</b>	0,286	0,310	0,215
<b>OVM061</b>	0,241	0,190	0,208
<b>OVK174</b>	0,120	0,230	0,245
<b>OVK101</b>	0,296	0,360	0,154

Demdoum vd. (2012) tarafından farklı SSR lokuslarının kullanıldığı çalışmada ise PIC değerleri 0,45 ile 0,85 (ortalama değer 0,72) arasında bulunmuştur. Avcı vd. (2014) tarafından korunga da 18 SSR primerine ait PIC değerleri 0,07 ile 0,35 arasında hesaplanmıştır. Zarrabian ve Majidi (2015) tarafından yapılan çalışmada ise korungaya ait 102 aksesyonda 22 ISSR lokusunda PIC değerlerinin 0,34 ile 0,47 arasında hesaplandığı bildirilmiştir. Sedeh (2017)’in 5 korunga popülasyonunda yürüttüğü çalışmada SSR ve EST-SSR lokuslarında PIC değeri 0,2 ile 0,43 arasında hesaplanmıştır. Bhattarai (2017) tarafından yapılan tez çalışmasında farklı ülkelerden örneklenen 38 korunga aksesyonunda 5 AFLP lokusu kullanılmış, PIC değerlerinin 0,126 ile 0,196 arasında değiştiği bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan AFLP belirteçlerinin dominant özelliği nedeniyle homozigot ve heterozigot alelleri ayırt edemediği fakat yine de genetik çeşitlilik ve genotiplerin karakterizasyonu için yeterli genomik bilgi yokluğunda kullanılabileceği rapor edilmiştir. Tez çalışmamızda kullanılan 10 SSR primerlerinden hesaplanan ortalama PIC değerleri, gelecekte yapılacak olan korunga moleküler çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca yeni çalışmalara Kempf vd. (2016)’in çalışmasından



yeni SSR lokuslarının seçilip eklenmesi önerilebilir. Elde ettiğimiz sonuçlar korunga ıslah programları için genetik olarak farklı ebeveynlerin seçilmesi için önem taşımaktadır.

Tez çalışmamız sonucunda Shannon sabiti (I) OVK036 lokusunda en yüksek (0,540), OVK174 lokusunda ise en düşük (0,210) olarak hesaplanmıştır (ortalama 0,375). I değerinin yükseldikçe popülasyon içindeki varyasyonun yükselir. Çalışılan korunga örneklerini bir bütün olarak değerlendirdiğimizde varyasyonun çok fazla olmadığı gözlenmiştir. Nosrati vd. (2012)'nin çalışmasında RAPD analizi sonucunda I değeri en yüksek (0,461) Amand popülasyonunda, en düşük (0,364) Bonab popülasyonunda gözlenmiştir. Avcı vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise SSR analizi sonucunda Shannon sabiti 0,268 ile 0,536 arasında hesaplanmıştır. Nosrati vd. (2016)'nin ISSR primerleri ile yaptıkları çalışmada, Shannon sabiti 0,182 ile 0,278 arasında hesaplanmıştır. Zarrabian vd. (2013)'in 46'sı İran ve 34'ü egzotik aksesyon toplam 80 korunga aksesyonundaki çalışmalarında, I değeri 0,33 ile 0,57 arasında saptanmış, en fazla çeşitliliğin Zagros Dağlarında (0,44), ekzotik bölge aksesyonlarında ise Asya ve Doğu Avrupa'daki aksesyonlarda (0,45) olduğu rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda Avrupadaki korunga aksesyonlarının Asya ve Doğu Avrupa'daki bölgelerden geldiği hipotezinin desteklendiği bildirilmiştir.

Tez çalışmamızda Nei (1987)'nin tarafsız genetik çeşitlilik değeri (uh) ortalama 0,243 olarak hesaplanmış, en yüksek değer OVK036 lokusunda (0,367), en düşük değer ise OVK174 lokusunda (0,121) gözlenmiştir. Nosrati vd. (2012) tarafından 5 korunga popülasyonunda yapılan RAPD analizi sonucunda h değeri 0,246 ile 0,318 arasında bulunmuştur. Avcı vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada h değeri en yüksek 0,307, en düşük 0,140 olarak hesaplanmıştır. Hejrankesh vd. (2014)'in 10 İran yerel korunga çeşitlerinde 90 RAPD lokusu kullanarak yaptıkları çalışmada, h değeri en düşük 0,300, en yüksek 0,343 olarak hesaplanmıştır. Nosrati vd. (2016)'nin 5 İran popülasyonunda ISSR lokusuyla yaptıkları analizlerde, h değerinin 0,118 ile 0,179 arasında olduğu saptanmıştır. Korunga türleri ile yapılan çalışmalara bakıldığında genetik çeşitlilik değerinin (h) birbirine benzer değerlerde olduğu gözlenmiştir. Özkan ve Bilgen (2019) tarafından yapılan çalışmada ise genetik çeşitlilik değeri  $h=0,210$  olarak, tarafsız genetik çeşitlilik değeri ise  $uh=0,222$  olarak bildirilmiştir.

Nei (1987)'nin genetik mesafe değerleri kullanılarak UPGMA kümelendirme yöntemi ile sınıflandırılmış ve çalışılan tüm aksesyonları içeren dendrogram oluşturulmuştur. Elde edilen dendrograma göre tez çalışmasında kullanılan korunga hatları 2 ana kümeye ayrılmıştır. Avcı vd. (2014)'nin 58 korunga taksonunda yürütülen çalışmasında, genetik benzerlik değeri

en düşük 0,013 ve en yüksek 0,399 olarak bildirilmiştir. Nosrati vd. (2012)'nin çalışmasında en yüksek genetik mesafe değeri 0,1654 olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmalar benzer stres koşullarında yetişen bitkilerin/popülasyonların genetik olarak birbirine daha fazla benzer olduklarını rapor etmiştir. Nosrati vd. (2012) farklı bölgelerden örneklenen 5 yabancı korunga popülasyonunda genetik mesafe değerini 0,635 (Sarab-Heris) ile 0,1654 (Bonab-Heris) arasında olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmada coğrafi uzaklıklardan çok ekolojik etkenlerin genetik çeşitliliğe etki ettiği ve genetik farklılığın çevresel koşullarla ilişkisinin ya doğal seleksiyon ya da lokal gen ayrımı nedeniyle olduğu belirtilmiştir.

Korunga farklı özellikte topraklarda yetişebilen çok yıllık kuraklığa dayanıklı bir yem bitkisidir. İyi bir baklagil yem bitkisi olan korunganın ülkemizde eski yıllardan bu yana tarımı yapılmakta, besleyici, lezzetli ve değerli bir bitki olduğu belirtilmektedir. Ayrıca kurak alanlarda yoncaya alternatif olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Korunga otu hayvan besleme yönünden paha biçilemeyen bir kaba yemdir. Tüm bunlara ek geniş adaptasyon yeteneğine sahip olması, kırıç ve verimsiz topraklarda dahi yetişebilmesi, iyi bir bal özü bitkisi olması, derinlere inen kökleri ile toprak ıslahında önemli bir yeri olması bitkiyi vazgeçilmez kılmaktadır. Yapılan tez çalışmasında türün moleküler anlamda genetik yapısının bilinmesi, genetik çeşitliliğinin ortaya konulması bundan sonra yapılacak olan türün ve/veya yakın akraba türlerinin ıslahı, genetik ve çeşitli karakterizasyon araştırmalarına ışık tutacaktır. Korunga gibi özellikle marjinal alanlarda yetişebilen yem bitkilerinin genomlarında gizli kalmış bilgilerin moleküler analizler ile açığa çıkartılması, tür üzerinde yapılan ıslah çalışmalarının hız ve etkinliğini arttırarak daha üstün performanslı yeni çeşitler geliştirilmesine ve dolayısıyla türün tarımının yaygınlaşmasına önemli katkılar sağlayacaktır. Çalışmamızda kullandığımız belirteçler Kempf vd. (2016) tarafından bu türe spesifik geliştirilen ilk primerlerdir. Korungaya özgü geliştirilen SSR lokusları kullanılarak yaptığımız tez çalışması ülkemizde yapılan ilk çalışmalardan biridir ve türün genetik çeşitliliği, popülasyon/bireyler arası ve popülasyonlar içi varyasyonu belirleyerek bundan sonra yapılacak olan çalışmalara önemli kaynak sağlayacaktır, ayrıca türün genetik yapısını ortaya çıkararak sahip olduğumuz biyoçeşitlilikten faydalanmayı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Akçelik, E. (2009). *Bazı yabancı korunga (Onobrychis sp.) türlerinin kromozom sayılarının tespiti ve karyotip analizi*. (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Akçelik, E. S., Avcı, S., Uzun, S. ve Sancak, C. (2012). Karyotype analysis of some *Onobrychis* (sainfoin) species in Turkey. *Archives of Biological Sciences*, 64(2), 567-571.
- Altındal, D. ve Altındal, N. (2018). Allelopathic effects of olive oil mill wastewater (omw) on sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Germination. *International Journal Of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 2(2), 87-92.
- Amirabadizadeh, H., Jafari, A. ve Mahmoodzadeh, H. (2015). Comparative morphology, anatomy and palynological studies of perennial species of *Onobrychis* (Fabaceae) in Northeast Iran. *Nordic Journal of Botany*, 33, 159-169.
- Anonim (2019a). *Baklagil yem bitkileri*. 03 Aralık 2019, Erişim adresi <http://www.bingol.edu.tr/documents/BAKLAGİL%20YEMBİTKİLERİ.pdf>
- Anonim (2019b). *Korunga tarımı*. 23 Haziran 2019, Erişim adresi [bingol.tarim.gov.tr/Belgeler/Yem%20Bitkileri/korunga.pdf](http://bingol.tarim.gov.tr/Belgeler/Yem%20Bitkileri/korunga.pdf)
- Anonim (2019c). *Yem bitkileri yetiştiriciliği*. 11 Kasım 2019, Erişim adresi [http://www.tarimkutuphanesi.com/YEM\\_BITKILERI\\_YETISTIRICILIGI\\_00184.html](http://www.tarimkutuphanesi.com/YEM_BITKILERI_YETISTIRICILIGI_00184.html)
- Anonim (2019d). *TİGEM'de üretilen sertifikalı tohumluklar*. 11 Kasım 2019, Erişim adresi [https://www.tigem.gov.tr/WebUserFile/DosyaGaleri/2018/7/724e3fb9-48e9-4288-8e56-d090e661c3c7/dosya/sert%20toh\\_bro%20rh.pdf](https://www.tigem.gov.tr/WebUserFile/DosyaGaleri/2018/7/724e3fb9-48e9-4288-8e56-d090e661c3c7/dosya/sert%20toh_bro%20rh.pdf)
- Avcı, M. (2013). Ülkemizde yem bitkileri ıslahı ve tohumculuğu. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, 6, 32-36.
- Avcı, S. (2010). *Türkiye'de doğal olarak yetişen yabancı korunga (Onobrychis sp.) türlerinin toplanması ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi*. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Avcı, S., İlhan, E., Erayman, M. ve Sancak, C. (2014). Analysis of *Onobrychis* genetic diversity using SSR markers from related legume species. *The Journal of Animal Plant Sciences*, 24(2), 556-566.

- Aygün, C., Kara, E. ve Çakal, Ş. (2007, Haziran 25-27). *Yem Bitkileri Türlerinin Kültüre Alınma Olanakları*. Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, Erzurum.
- Bağcı, M. ve Mutlu, H. (2011). Korunga (*Onobrychis sativa* Lam.) mutasyon ıslahında kullanılabilir uygun gama ( $^{60}\text{Co}$ ) dozunun belirlenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4(2), 141-144.
- Bakoğlu, A. ve Kutlu, M. A. (2005). Korunga'nın (*Onobrychis sativa* Lam.) arıcılıktaki önemi. *Türkiye Kalkınma Vakfı Teknik Arıcılık Dergisi*, 1(87), 24-26.
- Balabanlı, C., Yüksel, O. ve Karadoğan, T. (2007, Haziran 25-27). *Korungada (Onobrychis sativa Lam.) Gelişim Seyrinin Belirlenmesi*. Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, Erzurum.
- Bandara, N. L., Papini, A., Mosti, S., Brown, T. ve Smith, L. M. J. (2013). A phylogenetic analysis of genus *Onobrychis* and its relationships within the tribe *Hedysareae* (Fabaceae). *Turkish Journal of Botany*, 37(6), 891-992.
- Bhattarai, S. (2017). *Characterization of diverse germplasm of sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) using agro-morphological traits and AFLP molecular markers* (Master's thesis), University of Saskatchewan, Department of Plant Science, Saskatoon, Canada.
- Bhattarai, S., Coulman, B., Beattie, A. D. ve Biligetü, B. (2018). Assessment of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) germplasm for agro-morphological traits and nutritive value. *Grass and Forage Science*, 73(4), 958-966.
- Bhattarai, S., Coulman, B., Fu, Y. B., Beattie, A. D. ve Biligetü, B. (2017). Genetic diversity and relationship of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) germplasm as revealed by amplified fragment length polymorphism markers. *Canadian Journal of Plant Science*, 98(3), 543-551.
- Burton, J. C. ve Curley, R. L. (1968). Nodulation and nitrogen fixation in sainfoin (*Onobrychis sativa* LAM.) as influenced by strains of rhizobia. *Sainfoin Symposium*, 3-5.
- Carbonero, C. H. (2011). *Sainfoin (Onobrychis viciifolia), a forage legume with great potential for sustainable agriculture, an insight on its morphological, agronomical, cytological and genetic characterisation*. (Doctor of Philosophy Thesis), Faculty of Life Sciences, Manchester, United Kindom.
- Carbonero, C. H., Harvey, I. M., Brown, T. A. ve Smith, L. (2011). Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): a beneficial forage legume. *Plant Genetic Resources*, 9(1), 70-85.

- Carbonero, C. H., Carbonero, F., Smith, L. M. J., Brown, T.A. (2012). Phylogenetic characterisation of *Onobrychis* species with special focus on the forage crop *Onobrychis viciifolia*. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 59, 1777-1788.
- Cebeci, H. (2011). *Farklı kökenli korunga (Onobrychis viciifolia Scop. ve Onobrychis altissima Grossh) populasyonlarının tarımsal özelliklerinin belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çeçen, S., Öten, M. ve Erdurmuş, C. (2015). Antalya doğal florasında bulunan korunga (*Onobrychis sativa* L.) popülasyonlarının toplanması ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi. *Derim*, 32 (1), 63-70.
- Çelik, A., Karakaya, A., Avcı, S., Sancak, C. ve Özcan, S. (2012). Korungada külleme hastalığına potansiyel dayanıklılık kaynakları. *Bitki Koruma Bülteni*, 52(2), 153-162.
- Çöçü, S. (2008). *Böceklerle dayanıklı transgenik korunga (Onobrychis sativa Lam.) bitkilerinin elde edilmesi*. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dadaşoğlu, E. ve Tosun, M. (2017). Bazı bitki hormonlarının korungada (*Onobrychis sativa* L.) *in vitro* özellikler üzerine etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(3), 267-278.
- Demdoum, S., Muñoz, F., Delgado, I., Valderrábano, J. ve Wunsch, A. (2012). EST-SSR cross-amplification and genetic similarity in *Onobrychis* genus. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(2), 253-260.
- Demirel, M., Cengiz, F., Çelik, S. ve Erdoğan, S. (2001). Van ekolojik koşullarında yetiştirilen mısır ve macar fiği karışımlarının silaj kaliteleri ve besin maddelerinin rumende parçalanabilirlikleri üzerine bir araştırma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 11(1), 69-78.
- Doyle, J. J. ve Doyle, J. I. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 13-15.
- Eken, C., Demirci, E. ve Dane, E. (2004). Species of *Fusarium* on sainfoin in Erzurum, Turkey. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 47, 261-263.
- Filiz, E. ve Koç, İ. (2011). Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 207-214.

- Ghanavatia, F., Nematpajoo, N., Chahli, M. K. ve Chaeikar, S. S. (2012). Cytological evaluation of annual species of the *Onobrychis* genus in İran. *Crop Breeding Journal*, 2(1), 17-24.
- Gürsoy, E. ve Macit, M. (2014). Erzurum ili meralarında doğal olarak yetişen bazı buğdaygil yem bitkilerinin *in vitro* gaz üretim değerlerinin belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(3), 218-227.
- Hejrankesh, N., Haghighi, A. R., Mousavizadeh, S. A. ve Rashidi, V. (2014). evaluation of genetic diversity of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) landraces using RAPD markers. *Journal of Current Research in Science*, 2, 739-748.
- Hosaininejadmir, F., Jafari, A. A. ve Nakhjavan, S. (2011). Seed and forage yield in populations of sainfoin (*Onobrychis sativa*) grown as swards. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(1), 404-408.
- Işık, K., Semiz, G. ve Kurt, Y. (2005, Eylül 8-10). *Farklı doğal alanların, içerdikleri türler açısından UPGMA kümelendirme yöntemine göre karşılaştırılması*. Korunan Doğal Alanlar Sempozyumu, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- İleri, O. (2004). *Türkiye'de doğal olarak yetişen Onobrychis seksiyonuna ait bazı endemik korunga türlerinin karyolojik özellikleri*. (Yüksek Lisans Tezi), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- İlgin, H. (2017). *Şanlıurfa ekolojik koşullarında farklı tohum miktarlarının ve sıra aralarının korunga (Onobrychis sativa L.)'da ot verimine etkilerinin araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi), Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- İnce, S. (2007). *Farelerde korunga bitkisinin (Onobrychis viciifolia) bağırsaklara etkisi*. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- İnce, S. ve Filazi, A. (2009). Korunga bitkisinin (*Onobrychis viciifolia*) fitokimyasal içeriği ve farelerde akut oral ÖD<sub>50</sub>'sinin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 56(4), 263-267.
- Irani, S., Mirlohi, A., Majidi, M. M. ve Talebi, M. (2015). Exploitation of medicago SSR markers in assessment of genetic diversity in cultivated sainfoin populations. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 23, 151-162.

- Kar, S. S. C., Ghanavati, F., Naghavi, M. R., Amirabadi-zade, H. ve Rabiee, R. (2014). Molecular phylogenetics of the *Onobrychis* genus (Fabaceae: Papilionoideae) Using ITS and trnL-trnF DNA Sequence Data. *Australian Journal of Botany*, 62(3), 235-250.
- Karaca, A. (2008). Aydın yöresinde bal arılarının (*Apis mellifera* L.) yararlanabileceği bitkiler ve bazı özellikleri. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(2), 39-66.
- Kempf, K., Grieder, C., Walter, A., Widmer, F., Reinhard, S. ve Kölliker, R. (2015). Evidence and consequences of self-fertilization in the predominantly outbreeding forage legume *Onobrychis viciifolia*. *BMC Genetics*, 16, 117.
- Kempf, K., Mora-Ortiz, M., Smith, M. J., Kölliker, R. ve Skot, L. (2016). Characterization of novel SSR markers in diverse sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) germplasm. *BMC Genetics*, 17(1), 124.
- Kidambi, S. P., Mahan, J. R., Matches, A. G., Burke, J. J. ve Nunna, R. R. (1990). Genetic variability for esterase enzyme in *Onobrychis* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(4), 433-436.
- Koç, A. ve Akdeniz, H. (2017). Gözlü ve Altınova tarım işletmelerinde ıslah edilen korunga çeşitlerinin verim ve bazı tarımsal özellikleri üzerine ön araştırmalar. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20, 6-12.
- Langella, O. (1999). Populations 1.2.32, Population Genetic Software. Gif-sur-Yvette, France: Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. 512 pp.
- Nosrati, H., Feizi, M. A. H., Tarrah, S. S. ve Haghghi, A. R. (2012). Population genetic variation in sainfoin (*Fabaceae*) revealed by RAPD markers. *Analele Universitatii Din Oradea, Fascicula Biologie*, 1, 11-16.
- Nosrati, H., Feizi, M. A. H., Latifian, F. ve Haghghi, A. R. (2016). Eco-geographical variations of ISSRs among populations of *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin, Fabaceae). *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie*, 2, 62-66.
- Okcu, M. ve Şengül, S. (2014). A study on the determination of the morphological, yield and quality characteristics of some sainfoin species (*Onobrychis* Spp.) native to East Anatolia. *Pakistan Journal of Botany*, 46(5), 1837-1842.

- Okcu, M., Şengul, S., Sunar, S. ve Agar, G. (2013). Molecular characterization of some *Onobrychis* species growing in the eastern Anatolia region of Turkey. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(1), 445-448.
- Özbilgin, A ve Coşkun, B. (2018). Use of sainfoin in ruminant nutrition. *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine*, 64(1), 100-105.
- Özkan, S. (2017). *Bazı korunga (Onobrychis viciifolia SCOP.) çeşit ve popülasyonlarında mikrosatellit belirteçleri kullanılarak genetik çeşitliliğin belirlenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Özkan, S. ve Bilgen, B. B. (2019). Bazı korunga (*Onobrychis viciifolia*) çeşit ve popülasyonlarının mikrosatellit belirteçleri kullanılarak genetik karakterizasyonu. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16(1), 45-54.
- Page, R. D. (1996). Tree View: An application to display phylogenetics trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*; 12, 357-358.
- Parlak, Ö. A., Gökkuş, A., Samıkıran, E. ve Şenol, Y. M. (2014). Bazı yabancı korunga türlerinin morfolojik ve agronomik özelliklerinin incelenmesi. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(2), 111-117.
- Peakall, R. ve Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in excel. population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Piluzza, G., Sulas, L. ve Bullitta, S. (2014). Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: A Review. *Grass and Forage Science*, 69(1), 32-48.
- Rasouli, M., Jafari, A. A., Tabaei-Aghdaei, S. R., Shanjani, P. S. ve Darvish, F. (2013). Assessment of genetic variability of 36 populations of sainfoin (*Onobrychis sativa*) based on RAPD markers. *International Journal of Biosciences*, 3(10), 15-26.
- Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A. ve De Loose, M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6(2), 125-134.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 233-234.



- Sedeh, M. S. (2017). Assessment genetic diversity landraces in *Onobrychis sativa* using SSR, RAPD and SRAP markers. *Journal of Agriculture Biotechnology*, 2(01), 6-10.
- Shen, S., Chai, X., Zhou, Q., Luo, D., Wang, Y. ve Liu, Z. (2019). Development of polymorphic EST-SSR markers and characterization of the autotetraploid genome of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Peerj*, 7, 1-19.
- Sıralı, R., Deveci, M. ve Cınbirtoğlu, Ş. (2012, Kasım 1-4). *Korunga yetiştiriciliğinin arıcılık açısından önemi*. Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, Muğla. Erişim adresi [https://www.researchgate.net/publication/322301113\\_Korunga\\_yetistirciliginin\\_Aricilik\\_Acisindan\\_Onemi](https://www.researchgate.net/publication/322301113_Korunga_yetistirciliginin_Aricilik_Acisindan_Onemi)
- Sneath, P. H. A. ve Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 573 pp.
- Stevovic, V., Stanisavljevic, R., Djukic, D. ve Djurovic, D. (2012). Effect of row spacing on seed and forage yield in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36(1), 35-44.
- Temel, S. ve Şahin, K. (2011). Iğdır ilinde yem bitkilerinin mevcut durumu, sorunları ve çözüm önerileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(1), 64-72.
- Toluei, Z., Ranjbar, M., Wink, M. ve Atri, M. (2012). Molecular phylogeny and ecogeography of *Onobrychis viciifolia* Scop.(Fabaceae) based on nrDNA ITS sequences and genomic ISSR fingerprinting. *Feddes Repertorium*, 123(3), 193-207.
- Tuna, C. (1994). *Tekirdağ koşullarında yetiştirilen korungada farklı sıra aralığı ve ocağa ekimin ot ve tohum verimine etkisi*. (Yüksek Lisans Tezi), Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Türk, M. (2005). Farklı ekim sıklıklarının korunganın (*Onobrychis sativa* L.) kuru ot ve ham protein verimi üzerine etkisi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 3, 292-298.
- Türk, M. ve Çelik, N. (2006). The effects of different row spaces and seeding rates on the hay and crude protein yields of sainfoin (*Onobrychis sativa* Lam.). *Tarım Bilimleri Dergisi*, 12(2), 175-181.
- Ünal, S. ve Fırıncioğlu, K. H. (2002). Bazı korunga popülasyonlarında fenolojik ve morfolojik özellikler üzerine bir inceleme. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 16, 30-41.

- Vasileva, V., Naydenova, Y. ve Stoycheva, I. (2019). Nutritive value of forage biomass from sainfoin mixtures. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(5), 942-949.
- Yağmur, C. ve Güneş, E. (2010, Ocak 11-15). *Dengeli beslenme açısından Türkiye’de gıda üretimi ve tüketiminin irdelenmesi*. Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Ankara. Erişim adresi: [http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/95f15384c2a79ce\\_ek.pdf](http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/95f15384c2a79ce_ek.pdf)
- Yıldız, M. (2014). *Farklı korunga (Onobrychis viciifolia Scop.) ekotiplerinin tuza toleransının belirlenmesi ve in vitro mutagenesis tekniği aracılığıyla yeni korunga hatlarının geliştirilmesi*. Ankara: TÜBİTAK 1002 Projesi Sonuç Raporu.
- Zarrabian, M. ve Majidi, M. M. (2015). Genetic diversity and relationships within and among *Onobrychis* species using molecular markers. *Turkish Journal of Botany*, 39(4), 681-692.
- Zarrabian, M., Majidi, M. M. ve Ehtemam, M. H. (2013). Genetic diversity in a worldwide collection of sainfoin using morphological, anatomical, and molecular markers. *Crop Science*, 53, 2483-2496.

## ÖZGEÇMİŞ

Tuğba Sütçü 1995 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'un Fatih ilçesinde tamamladı. 2013 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nü kazandı. Bu bölümden 2017 yılında mezun oldu. Eylül 2017'de Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında Bitki Biyoteknolojisi alanında yüksek lisans eğitimine başladı.

