

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**ORTA ANADOLU BÖLGESİNE AİT BAZI  
KORUNGA (*Onobrychis* L.) GEN KAYNAKLARININ  
rDNA ITS BÖLGESİ VE ISSR<sub>s</sub> MARKÖRLERİNE DAYALI  
GENETİK KARAKTERİZASYONU**

**Burcu PULLUK UĞUR**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2022**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Doktora Tezi

### ORTA ANADOLU BÖLGESİNE AİT BAZI KORUNGA (*Onobrychis* L.) GEN KAYNAKLARININ rDNA ITS BÖLGESİ ve ISSRs MARKÖRLERİNE DAYALI GENETİK KARAKTERİZASYONU

Burcu PULLUK UĞUR

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

*Onobrychis* L. (korunga) (Fam: Fabaceae), ülkemizde özellikle Orta ve Doğu Anadolu'da yetişen ve farklı ekolojik bölgelere uyum sağlamış önemli bir yem bitksidir. *Onobrychis* en önemli yem bitkilerinden biri olup, aynı zamanda farklı özellikte topraklarda yetişebilir ve kuraklığa dayanabilir. Bu çalışmanın bitki materyali, bir kısmı Eskişehir Üniversitesi öğretim elemanlarından Prof.Dr. Süleyman Avcı tarafından diğer kısmı ise TAGEM destekli olarak yürütülmüş olan "Orta Anadolu Bölgesinden Toplanan Korunga (*Onobrychis* L.) Bitkilerinin Karakterizasyonu" projesine ait olan 32 adet *Onobrychis* popülasyonlarından oluşmaktadır. Çalışmada, *Onobrychis* popülasyonlarının nrDNA ITS dizilerine dayalı olarak çizilen filogenetik ağaçta (dendogram) tüm *Onobrychis* popülasyonlarını içerecek şekilde 2 ana gruba ayrılmıştır. Grup 1'in 2 daldan (A ve B) oluştuğu ve sadece *Hymenobrychis* ve *Heliobrychis* seksiyonlarına ait 12 adet popülasyon içerdiği tespit edilmiştir. Grup 2'nin ise 3 daldan (C, D ve E) oluştuğu ve sadece *Onobrychis* seksiyonuna ait 20 adet popülasyon içerdiği görülmüştür. ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen filogenetik ağaç sonuçlarına göre, 32 *Onobrychis* popülasyonunun iki ana gruba (Grup A ve Grup B) ayrıldığı ve bunların benzerlik ayrılma noktalarının sırasıyla yaklaşık olarak; %80, %82 olduğu tespit edilmiştir. Bu da bize nrDNA ITS-PCR reaksiyonu sonuçlarının, ISSR-PCR reaksiyonları sonuçlarına göre, *Onobrychis* popülasyonlarını ayırma gücünde çok daha başarılı olduğunu gösterebilmektedir.

Bu tez çalışması, korunga yem bitksinin genetik çeşitliliği, popülasyon / bireyler arası ve popülasyon içi varyasyonu belirlemede imkan sağlaması anlamında ve de türün genetik yapısının ortaya çıkarak, biyoçeşitliliğinin geliştirilmesinde, bundan sonraki yapılacak olan çalışmalara da ışık tutma niteliği sağlamıştır.

**Haziran 2022, 142 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Korunga, *Onobrychis* L., rDNA ITS bölgesi, ISSRs, moleküler belirteç, Orta Anadolu Bölgesi

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

rDNA ITS REGION AND ISSRs MARKERS-BASED GENETIC CHARACTERIZATION  
OF SOME SAINFOIN (*Onobrychis* L.) GENETIC RESOURCES FROM CENTRAL  
ANATOLIA REGION

Burcu PULLUK UĞUR

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

*Onobrychis* L. (sainfoin) is an important forage plant that grows especially in Central and Eastern Anatolia in our country and has adapted to different ecological regions. The sainfoin is one of the most important forage crops, and it can also grow in soils with different characteristics and withstand drought. The plant material of this study consists of 32 sainfoin population, some of which was obtained from Eskişehir University Faculty Member Prof. Dr. Süleyman Avcı and the other part belonging to the "Characterization of Sainfoin (*Onobrychis* L.) Plants Collected from the Central Anatolian Region" project, which was carried out with the support of TAGEM. In the study, the nrDNA of *Onobrychis* population was divided into 2 main groups, including all *Onobrychis* population, in the phylogenetic tree (dendogram) drawn based on ITS sequences. It was determined that Group 1 consisted of 2 branches (A and B) and contained only 12 taxa belonging to the *Hymenobrychis* and *Heliobrychis* sections. It was observed that Group 2 consisted of 3 branches (C, D and E) and contained 20 taxa belonging to only *Onobrychis* section. According to the phylogenetic tree results obtained as a result of ISSR-PCR reactions, 32 *Onobrychis* population are divided into two main groups (Group A and Group B), and their similarity separation points are approximately; It was determined that 80%, 82%. This can show us that the nrDNA ITS-PCR reaction results are much more successful in discriminating *Onobrychis* populations than the ISSR-PCR reactions results.

This thesis study, has provided an opportunity to determine the genetic diversity, population/inter-individual and intra-population variation of the sainfoin forage plant, and also sheds light on the future studies in the development of biodiversity by revealing the genetic structure of the species.

**June 2022, 142 pages**

**Key Words:** Sainfoin, *Onobrychis* L. rDNA ITS locus, ISSRs, molecular marker, Central Anatolia Region

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, engin bilgi ve tecrübeleri ile bana değer katan, desteğini hiç esirgemeyip her türlü sıkıntılı anımda yanımda olan, beni anlayış ve sabır içinde hep güler yüzle karşılayan çok saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. E.Sümer ARAS'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin olgunlaşmasına ve sonlanmasına büyük katkı sağlayıp, desteklerini hiç esirgemeyen bilgi birikimiyle hocam dediğim güzel kalpli kardeşim Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e teşekkürlerimi iletiyorum.

Doktora tezimin olgunlaşmasına katkı sağlayan, tez izleme komitesi üyeleri çok değerli hocalarım Prof. Dr. N. Münevver PINAR ve Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN 'a emeklerinden dolayı yürekten şükranlarımı sunarım.

Hayatımın bugününe kadar ki her evresinde yanımda olan desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmamın tüm safhalarında maddi-manevi hep yanımda olan, değerli eşim Murat UĞUR'a fedakarlığı, sabrı ve anlayışı için sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca bu yoğun tez çalışması esnasında ilgi gösteremediğim zamanlarda anlayışlarını esirgemeyen canım oğlum Vedat ve canım kızım Ceren'e en derin duygularıyla teşekkürlerimi iletiyorum.

Burcu PULLUK UĞUR  
Ankara, Haziran 2022

## İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAYI</b>	
<b>ETİK</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Genel Bilgiler</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 <i>Onobrychis</i> L. (Korunga)</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Tanımlama</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4 Sınıflandırma ve Tanımlama</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 Morfolojik Özellikleri</b> .....	<b>9</b>
<b>1.6 Tozlaşma ve Döllenme</b> .....	<b>9</b>
<b>1.7 Tarım, Hayvancılık, Ekolojik Bakımından Önemi</b> .....	<b>11</b>
<b>1.8 Bitkinin Zararlıları</b> .....	<b>13</b>
<b>1.9 Belirteçler</b> .....	<b>14</b>
<b>1.9.1 Morfolojik belirteçler</b> .....	<b>14</b>
<b>1.9.2 Biyokimyasal belirteçler</b> .....	<b>15</b>
<b>1.9.3 Moleküler belirteçler</b> .....	<b>16</b>
<b>1.9.3.1 Moleküler belirteçlerin kullanım alanları</b> .....	<b>21</b>
<b>1.9.3.1.1 Genotip tanımlama</b> .....	<b>21</b>
<b>1.9.3.1.2 Çeşit tescili</b> .....	<b>22</b>
<b>1.9.3.1.3 Islah hatları tanımlanma ve tohum saflık testleri</b> .....	<b>24</b>
<b>1.9.3.1.4 Melez çeşit saflık testleri</b> .....	<b>25</b>
<b>1.9.3.1.5 Cinsel karakteristik belirleme</b> .....	<b>25</b>
<b>1.9.3.1.6 Kalıtsal çeşitlilik belirleme</b> .....	<b>25</b>
<b>1.9.3.1.7 Gen kaynaklarının kalıtsal kökenlerini belirleme</b> .....	<b>25</b>
<b>1.9.3.1.8 Tarımsal performans ve uyarlanma yeteneği kestirimleri</b> .....	<b>26</b>
<b>1.9.3.2 Melezleme temelli DNA belirteçleri</b> .....	<b>26</b>

1.9.3.2.1 RFLP .....	26
1.9.3.2.1.1 “Southern blot” emdirim-temelli RFLP tekniği.....	29
1.9.3.2.1.2 RFLP tekniği (PCR temelli) .....	32
1.9.3.3 PCR temelli DNA belirteçleri.....	33
1.9.3.3.1 RAPD–Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA.....	38
1.9.3.3.1.1 RAPD tekniğinin üstünlükleri ve diğer moleküler belirteçler ile karşılaştırılması.....	46
1.9.3.3.1.2 RAPD yönteminin uygulama alanları .....	46
1.9.3.3.2 AFLP: Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi .....	50
1.9.3.3.3 SSR: Basit dizge yineleme (Simple sequence repeat).....	54
1.9.3.3.3.1 SSR lokus yahtım yordamları .....	56
1.9.3.3.4 SCAR (Dizge karakterli çoğaltılmış bölge).....	56
1.9.3.3.5 SSCP (Tek zincirli uygunluk polimorfizmi) .....	57
1.9.3.3.6 CAPS tekniği .....	57
1.9.3.3.7 ISSR: Basit dizge arası yineleme yöntemi.....	58
1.9.3.4 ESTs : DNA belirteçleri .....	59
1.9.3.4.1 İfade edilmiş dizge etiketleri ve kökenli SSR lokus yahtım yordamı, cDNA derlemelerinin belirlenmesi.....	59
1.9.3.4.2 EST gen bankaları ve EST analizi.....	61
1.9.3.4.3 EST’lerden SSR belirlemek için geliştirilen çözümlenme araçları.....	63
1.9.3.5 Ribozomlar ve rDNA .....	67
1.9.3.6 DNA dizgelenmesine dayalı belirteçler .....	69
1.9.3.6.1 Nükleer belirteçler .....	69
1.9.3.7 ITS: Transkribe edilen internal ara bölgeler ve rDNA .....	70
1.9.3.7.1 Filogenetik çalışmalarda ITS bölgesinin kullanımı .....	71
1.9.3.7.2 ITS bölgesinin genel özellikleri .....	72
1.9.3.7.3 Taksonomide ITS bölgelerinin tercih edilmesinin nedenleri .....	73
1.9.3.8 nrDNA bölgeleri .....	73
1.9.3.8.1 Küçük alt birim nrDNA (18S).....	73
1.9.3.8.2 5.8S nrDNA.....	74
1.9.3.8.3 Büyük alt birim nrDNA (28S, LSU) .....	74
1.10 DNA Dizileme .....	74
1.10.1 Maxam ve Gilbert tekniğinde kimyasal kırılma tekniği.....	75
1.10.2 Sanger ve Coulson tekniği .....	76

2.10.2.1 Sanger ve Coulson zincir sonlanma tekniğinin kimyasal kullanımı.....	79
1.11 Otomatik DNA Dizileme Yöntemi .....	81
1.12 Dizgelerin Hizalanması, CLUSTALW ve MULTALIN .....	82
1.13 Kalıtsal Çeşitlilik ve Kalıtsal Nitelendirme .....	82
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	84
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	87
3.1 Biti Materyalinin Temin Edilmesi .....	87
3.2 DNA İzolasyonu.....	89
3.3 ITS-PCR Reaksiyonları.....	91
3.3.1 ITS-PCR ürünlerinin purifikasyonları .....	92
3.3.2 ITS-PCR sekans reaksiyonları ve dizileme.....	93
3.3.3 ITS-PCR sekans sonuçların değerlendirilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulması .....	94
3.4 ISSR-PCR Reaksiyonları .....	95
3.4.1 ISSR-PCR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile yürütülmesi....	98
3.4.2 ISSR-PCR reaksiyonunda kullanılan primerlerin polimorfizm oranlarının belirlenmesi.....	99
3.4.3 ISSR-PCR reaksiyonunun veri analizleri .....	99
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	101
4.1 DNA Örneklerinin Kalite ve Miktar Tayinleri .....	101
4.2 nrDNA ITS-PCR Reaksiyonları .....	103
4.3 ISSR-PCR Reaksiyonları .....	109
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	114
KAYNAKLAR .....	118
ÖZGEÇMİŞ.....	140

## SİMGELER DİZİNİ

$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{M}$	Mikromolar
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
CAPS	(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence – Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik Dizge Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik Dizge
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (Tamamlayıcı DNA)
CTAB	Cetrimonium bromide (Setrimonyum bromür)
DAF	DNA Amplification Fingerprinting (DNA Çoğaltım Parmak İzi)
DDJB	DNA Data Bank of Japan (Japon DNA Veri Bankası)
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoksiribonükleik asit)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (deoksinükleotid trifosfat)
dNTP	Dideoxyribonucleoside triphosphate (Dideoksiribonükleosid Trifosfat)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı)
ESTs	Expressed Sequence Tag(s) (İfade Edilmiş Dizge Etiket(ler)i)
G+C	Guanin ve sitozin baz sayısı toplamı
	Genetik Analizi
IGS	Intergenic Spacer (Genler-arası Ayraç)
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat (Basit Dizge_Arası Yineleme)
Kb	Kilobaz
kB	Kilobyte
LSU	Large Subunit (Büyük Alt-birim)
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Moleküler Evrimsel
$\text{MgCl}_2$	Magnezyum Klorür
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
ng	Nanogram



nrDNA	Nüklear Ribozomal DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincirleme Tepkime)
pH	Hidrojen yoğunluğu
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlayıcı Parça Uzunluk Polimorfizmi)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonükleik Asit)
SCARs	Sequence Characterised Amplified Region(s) (Dizge Karakterli Çoğaltılmış Bölge(ler)) (Belirteç)
SSCP	Single-strand Conformation Polymorphism (Tek Zincirli Uygunluk Polimorfizmi)
SSR	Simple Sequence Repeat
SSU	Small Subunit (Küçük Alt Birim)
STS	Sequence Tagged Site (Dizge Etiketli Konum) (Belirteç)
µl	Mikrolitre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Genel görünüm.....	5
Şekil 1.2 “Southern blot” emdirim yöntemiyle melezleme temelli RFLP analizi .....	31
Şekil 1.3 Kalıtsal farklılıkların PCR-RFLP tekniğiyle belirlenmesi.....	33
Şekil 1.4 PCR’nin çalışma ilkesi.....	34
Şekil 1.5 PCR sonucunda DNA miktarı.....	35
Şekil 1.6 RAPD tepkimesinin şematik gösterimi.....	39
Şekil 1.7 Tepkime 1 ve 2’nin agaroz jel görüntüsü .....	39
Şekil 1.8 Farklı kaya kekiği (Satureja) türlerine ait UBC-208 öncülünün RAPD-PZR jel fotoğrafı.....	40
Şekil 1.9 cDNA derlemelerinin oluşturulması .....	60
Şekil 1.10 EST analiz aşamaları.....	62
Şekil 1.11 Sukroz gradyanında prokaryot ve ökaryot ribozomlar .....	68
Şekil 1.12 rDNA gen kümesi .....	70
Şekil 1.13 Çekirdek ribozomal DNA’sının yinelemeli birimleri (Dow vd 1995).....	70
Şekil 1.14 ITS1 ve ITS2 bölgelerinin görünümü .....	71
Şekil 1.15 18S - 26S nükleer ribozomal DNA (nrDNA)’nın yazılan iç ayraç.....	72
Şekil 1.16 (a) dATP (b) ddATP moleküller .....	76
Şekil 1.17 Zincir sonlanma tekniğiyle baz dizgesinin saptanması.....	78
Şekil 1.18 Otomatik dizgeden alınan pikler .....	81
Şekil 3.1 Tohum örneklerinin viyollere ekilmesi.....	89
Şekil 3.2 DNA ladder .....	99
Şekil 4.1 Onobrychis popülasyonlarının nrDNA ITS dizilerine dayalı olarak çizilen filogenetik ağaç.....	106
Şekil 4.2 32 Onobrychis popülasyonlarında, ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen filogenetik ağaç.....	112

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Türkiye’de bulunan korunga türleri ve endemi durumları.....	7
Çizelge 1.2 Moleküler belirteç yöntemleri.....	20
Çizelge 1.3 Yaygın belirteçlerin mukayesesi.....	21
Çizelge 1.4 Yaygınlıkla kullanılan DNA belirteç yöntemlerinin karşılaştırılması .....	23
Çizelge 1.5 Sınırlayıcı enzimler aracılığıyla elde edilen parçacıklar.....	27
Çizelge 1.6 PCR çoğaltımı sonucundaki sayılar .....	35
Çizelge 1.7 Polimeraz enzimler ve kaynakları.....	37
Çizelge 1.8 Kimyasal kırılma tekniğinde ihtiyaç duyulan maddeler .....	75
Çizelge 3.1 Korunga ( <i>Onobrychis</i> ) türlerinin isimleri .....	87
Çizelge 3.2 ITS primer dizileri.....	92
Çizelge 3.3 ITS-PCR bileşenleri ve miktarları .....	92
Çizelge 3.4 Sekans PCR (ileri ve geri yönde) koşulları.....	93
Çizelge 3.5 ISSR primerlerinin (set #9) baz dizilimleri.....	95
Çizelge 4.1 DNA örneklerinin kalite ve miktar tayinleri.....	101
Çizelge 4.2 Mega11 yazılımı aracılığıyla Muscle hizalama yöntemi ile hizalanan 22 adet <i>Onobrychis</i> taksonuna ait 32 popülasyonun nrDNA ITS dizilerine ilişkin bir görüntü.....	103
Çizelge 4.3 24 farklı nükleotit substitusyon modelinin maksimum olabilirlik (ML) analizine uyumluluğu .....	104
Çizelge 4.4 DNA dizi analizi gerçekleştirilen <i>Onobrychis</i> popülasyonlarının tür numaraları, popülasyon adları, lokalite ve genbank aksesyon kodları.....	104
Çizelge 4.5 Diziler arasındaki evrimsel mesafe tahminleri .....	108
Çizelge 4.6 ISSR primer adları, toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı .....	109
ve polimorfizm oranları.....	109

## 1. GİRİŞ

Otlak arazilerinden çoğunlukla engebeli alanlarda bulunan milyonlarca hektar toprağımız çeşitli nedenlerle bitki örtüsünün çoğunu kaybederek erozyona için elverişli hale gelmiştir. İslah faaliyeti bitki örtüsünün aşırı derecede seyrekleştiği alanlar için gerekli olup yukarıdan yapılacak tohumlama veya tekrardan ekim marifetiyle gerçekleştirilebilir. Bu durum da bakla ve buğdaygillerden bitkilerin kullanımını zorunlu kılmaktadır. Böyle sahalarda rahatlıkla kullanılacak baklagiller türünden, yem olarak kullanılan bir bitki olan korunga, iklim değişimlerine karşı direçliliği ile diğer bitkilere karşı üstündür.

Ülkemizde de geçit bölgeleri ile Orta ve Doğu Anadolu'da çoğunlukla ekilen yem bitkilerinden biri olan korunga ıslah uygulamaları için de en elverişli bitkilerdendir. Susuzluğun hüküm sürdüğü alanlarda yetişebildiği için, ekim için yapılan planlamalarda önemli bir yer tutar. Yonca ile mukayese edildiğinde sulanamayan topraklarda verimliliği daha yüksektir. (Açıkgöz, 2001).

Baharda gelişimiyle erkenci bir bitki olan korunga ile merada bulunan diğer bitkiler yeterli olgunluğa erişinceye hadar geçen süreç boyunca, hayvanların yem ihtiyaçlarının giderilmesinde son derece yararlı bir bitkidir. Lignin, sindirim için olumsuz etkisi olan bir maddedir ve korungada yoncaya göre daha az bulunmaktadır. Hazmı bakımından korunga, şişkinliğe sebep olmamasıyla çiftlikte yetiştirilen hayvanlar için çok uygundur.

Humusun toprakta meydana gelmesi oldukça zor olup son derece değerli bir maddedir. Korunga toprakta bıraktıkları bakımından, olumsuz koşullarda bile topraktaki humus oranının artmasını sağlar. (Soya vd. 1997).

Hayvan yemi ihtiyacının karşılanması, ekilmeyen toprakların azaltılması, verimli tarım yapılabilmesi için özellikle Anadolu'nun iç bölgelerinde korunga yetiştirilmesine önem verilmesi adeta bir zorunluluktur. Yem bitkileri göz önünde bulundurulduğunda ülkemizin çok güçlü bir doğal floraya sahip olduğu söylenebilir.

Kamunun Araştırma Enstitüleri ve Üniversitelerde böyle bitkilerden ıslahta yararlanılması imkanlarına bakılması maksadıyla son yıllarda önemli projeler söz konusudur ve böylelikle yeni çeşitler oluşturulabilmektedir.

Ülkemiz için hayati bir önemi olduğuna inandığımız ve 1998 yılından itibaren kanunlarla da önemi vurgulanan Meraların ıslahı konusu korunga üzerinde yapılacak çalışmalara özel bir anlam kazandırmaktadır. Anadolu’da ki üretme potansiyelini dikkate alarak nitelikleri bakımından üstün ve verimliliğin artırıldığı sonuçlara ulaşmak son derece önemlidir.

Genotip tanımlama konusu özel genlere ait bilginin elde edilebilmesi için yapılması zorunlu faaliyetlerin temelini oluşturmaktadır. Korunga yönünden bakıldığında ise akrabalık ilişkileri ve genotip tanımı konularındaki çalışmaların, biyoteknoloji üzerinde görülen gelişmelerle mukayesesi yapıldığında yetersiz kaldığını söyleyebiliriz. Neticesinde alınacak çıktılarla bu tezden korunga genomu üzerinde özel genlerin belirlenebilmesi işlerinde istifadeye edilebilir.

## **1.1 Genel Bilgiler**

Yeryüzünde korunga cinsine ait bilinen 162 tür mevcuttur. Yeryüzünde yalnızca palearktik bölgede, özellikle de Anadolu’nun güneyinden başlayıp Asyanın ortasına uzanan bir hat üzerinde yetişir. Avrupa’nın batısından başlayıp kuzeyden Asya’nın ortası ve Sibiryaya kadar uzanan hat üzerinde yetiştiği de bilinmekle birlikte bu cinse ait türler, özellikle coğrafyamızda yoğunlaşmıştır (Aktoklu, 1995).

1753 yılında Linnaeus tarafından *Onobrychis* taksonları *Hedysarum* cinsi içersine konulmuştur. Miller (1754) ise ilk kez *Onobrychis* cinsini tanımlamıştır. Handel-Mazzetti (1909, 1910) cins için ilk kez tür teşhis anahtarı yapmıştır. Sirjaev (1925 ve 1931) “*Onobrychis* Generis Revisio Critica” adlı eserinde taksonların diognastik özellikleri ve yayılışı üzerinde durmuştur. Grossheim (1926, 1929) Kafkasya’da bulunan *Onobrychis* ve *Hymenobrychis*seksiyonlarına ait Türkiye’den yeni türler

tanımlamıştır. Hedge (1970), "Flora of Turkey and the East Aegean Islands"da ve 46 tür tanımlamıştır. Daha sonra Huber-Morath (1982), Kit-Tan ve Songer (1986), Duman ve Vural (1990) tarafından Türkiye için 7 yeni tür tanımlanmıştır. Aktoklu (1995), Türkiye’de 52 korunga türü (60 takson) olduğu bildirilmiştir. Şuan Türkiye’ de 55 tür, 8 alt tür ve 9 varyete tanımlanmıştır (<https://www.bizimbitkiler.org.tr>). 72 taksonun 33’ü endemiktir.

Adeta bir gen merkezi gibi olan, yüksek yayla bölgesiyle Doğu Anadolu’da korunganın birçok farklı türü bulunmakta olup bitki,”koringa” veya “görünge,” ismiyle de bilinmektedir (Elçi 2005).

Korunga soğuğa dayanıklı olan ve özellikleri itibarıyla değişkenlik gösteren ve birçok bitkinin yetiştirilmesi için olumsuz özellikleri olan topraklarda yetişebilen bir bitkidir (Elçi, 2005; Altın vd. 2005).

6-7.5 arasındaki asit-bazlık derecesine sahip topraklarda en iyi verimliliğin alındığı bilinmekle birlikte (Sorkun, 1995) kayalıklarda, meşeliklerde, nadasa bırakılmış tarlalarda ve yol kenarlarından makiliklere kadar geniş tanımlı arazilerde yetişebilmektedir.(Sorkun, 2008).

Türkiye’nin doğusundaki illerin tamamına yakınında yetişmekle birlikte, Türkiye’nin iç kesimlerinde de geniş bir alanda yetiştiği görülebilmektedir. Bununla beraber Tarım devlet adına birçok çiftlikte de üretiminin yapıldığı bilinmektedir (Elçi, 2005).

Bu cinsin dikenli yarı-çalılı olanları da görülmekle birlikte çoğunlukla tek veya çok yıllık otsu yapıda görülmektedir. Ekseriyetle kıvrık bedenli, tüsüz veya basit tüylüdür. Kulakçıkları birleşiktir veya serbest olabilir. Üsttekiler kısa saplı yahut nadiren de sapsız olmakla birlikte tabandakiler uzun saplıdır.

## 1.2 *Onobrychis L. (Korunga)*

Aktoklu (1995) korungayı şöyle tanımlanmıştır: Bedeni çoğunlukla dipte odunlaşmıştır ya da bedeninin yerin altındaki kısmı kalın, çoğunlukla kenarları kirpiklidir ve zarımsı tüysüz yada basit tüylü ekseriyetle kıvrık ve belirgin açık yeşil çizgilidir. Yaprakçıklar tekli, üsttekiler kısa saplı ya da ender olarak sapsız, tabandakiler çoğunlukla uzun saplı, yaprakçılar, değişen tam kenarlı yuvarlaktan şeritsi-dikdörtgenimsiye kadardır.

Çiçek durumu salkımı çağrıştıran çevreseldir. Zarımsı ve kalıcı brakteleri, 2 adet brakteelleri, zarımsı, ipliksi ve ender olarak da çiçek sapı üzerinde ve çoğunlukla çanak yaprak tüpü üzerindedir. Çanak yaprak dişleri eşit olmayan tüpün alt kısmı dışa doğru şişkin ve çoğunlukla aniden daralan mızrak biçimli ya da aniden daralan şeritsidir. Çoğunlukla koyu mor damarlı; pembe, sarı, leylak, krem ya da beyazdır. Ender olarak da uzundur, kulakçıklı ve saplıdır; kayıkçık bayrakçıktan kısa veya eşit, ender olarak uzundur.

Tohumlar 1(-2) adet, böbrek biçimli ya da dikdörtgenimsidir. Çoğunlukla biraz dairemsi, yumuşak kılsı tüylü ya da tüsüzdür. Meyve 1 (-2) tohumlu, kuruyunca açılmayan, ortada iki sıra peteksi yüzeye sahip diskten ve çeşitli genişlikteki çevre yapılarından oluşur.



Şekil 1.1 Genel görünüm

### 1.3 Tanımlama

Miller, 1753 yılında Linnaeus ile ilkkaynak bilgileri başlamakla birlikte ilk defa isimlendiren kişi Miller olmuştur.

İlk geniş bilgi 1872 yılında *Flora Orientalis* adlı yapıtta verilmiştir. İlk tür teşhis anahtarı, sonraki ilk ayrıntılı çalışmayı yapan Handel-Mazzetti'nin çalışmasında yer almıştır. Sonrasında Sirjaev tarafından 1925 ve 1931 yıllarındaki çalışmasında, tanısal karakterlerden ve türlerin yayılışından bahsedilmiş ve kısa betimlemeleri yer almıştır (Parmaksız 2004).

Ayrıca 1926-1929 yılları arasında *Hymenobrychis* ile *Onobrychis* üzerine geniş çaplı çalışmalar yapılmıştır. (Elçi, 2005).



## 1.4 Sınıflandırma ve Tanımlama

Hedge (1970) cins altı taksonlarını ve tanı anahtarlarını aşağıdaki gibi sıralamıştır.

1. ***Onobrychis***; meyve hemen hemen sapsız; çiçekler çoğunlukla pembe, ender olarak krem veya beyaz.
2. ***Sisyrosema***; meyve belirgin saplı; seyrek beyaz veya krem de görülmeyle birlikte çiçeklerin rengi ekseriyetle sarı,

***Onobrychis***;

**(Seksiyonları(S))**

**S.1. *Dendobrychis***; bitki yarı çalimsı, dikensi, çok yıllık,

**S.2. *Lophobrychis***; tek yıllık otsular,

**S.3. *Onobrychis***; çok yıllık otsular, meyvenin belirgin bir birleşme yeri ve sapı yok.

***Sisyrosema*** ;

**S.4. *Heliobrychis***; nadiren tek yıllık, genellikle de çok yıllık otsular.

**S.5. *Hymenobrychis***; çok yıllık otsular.

Türkiye’de bulunan korunga cinsleri Aktoklu’nun 1995 revizyonu esas alınarak, endemi durumları da belirtilerek tablo halinde aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 1.1 Türkiye’de bulunan korunga türleri ve endemi durumları

Sıra	<i>Onobrychis</i> türleri	Endemik olma
1	<i>O. cornuta</i> (L.) Desv.	-
2	<i>O. aequidentata</i> (Sibth. Et. Sm.) D’urv.	-
3	<i>O. caput-galli</i> (L.) Lam.	-
4	<i>O. crista-galli</i> (L.) Lam.	-
5	<i>O. altissima</i> Grossh.	-
6	<i>O. araxina</i> Schischkin.	+
7	<i>O. argaea</i> Boiss. Et Ball.	+
8	<i>O. armena</i> Boiss. Et Ball.	-
9	<i>O. beata</i> Sirj.	+
10	<i>O. carduchorum</i> C. C. Townsend.	-
11	<i>O. cilicica</i> Kit Tan Et Sorger.	+
12	<i>O. densijuga</i> Hedge Et Hub-Mor.	+
13	<i>O. elata</i> Boiss. Et Ball.	+
14	<i>O. fallax</i> var. <i>fallax</i> Freyn Et Sint.	+
15	<i>O. fallax</i> var. <i>longifolia</i> Aktoklu var. nov.	+
16	<i>O. germanicopolitana</i> Hub-Mor. Et Simon	+
17	<i>O. gracilis</i> Besser.	-
18	<i>O. hajastana</i> Grossh.	-
19	<i>O. halysensis</i> Sirj.	+
20	<i>O. kotschyana</i> Fenzl.	-
21	<i>O. lasiostachya</i> Boiss.	-
22	<i>O. lasistanica</i> Sirj.	+
23	<i>O. major</i> (Boiss.) HandMazz.	-
24	<i>O. megataphros</i> Boiss.	-
25	<i>O. montana</i> DC. subsp. <i>cadmea</i> (Boiss.) P. W. Ball.	-
26	<i>O. mutensis</i> Kit Tan Et Sorger.	+
27	<i>O. occulta</i> Hedge Et HubMor.	+
28	<i>O. oxyodonta</i> Boiss.	-
29	<i>O. paucijuga</i> Boenm.	+
30	<i>O. pisidica</i> Boiss.	+

Çizelge 1.1 Türkiye’de bulunan korunga türleri ve endemi durumları (devam)

31	<i>O. podperae</i> Sirj.	+
32	<i>O. quadrijuga</i> Hedge Et Hub-Mor.	+
33	<i>O. shahpurensis</i> Rech. Fil.	-
34	<i>O. sivasica</i> Kit Tan Et Sorger.	+
35	<i>O. stenostachya</i> Freyn subsp. <i>stenostachya</i> Freyn.	+
36	<i>O. stenostachya</i> Freyn subsp. <i>sosnowskyi</i> (Grossh.) Hedge.	+
37	<i>O. sulphurea</i> Boiss. Et Bal. var. <i>sulphurea</i> (C. Koch.) Tvetz	+
38	<i>O. sulphurea</i> Boiss. Et Bal. var. <i>pallida</i> (Boiss. Et KY Hedge.	+
39	<i>O. sulphurea</i> Boiss. Et Bal. var. <i>vanensis</i> Hedge.	+
40	<i>O. transcaucasica</i> Grossh.	-
41	<i>O. viciifolia</i> Scop.	-
42	<i>O. marashensis</i> Duman & Vural	+
43	<i>O. argyrea</i> Boiss. subsp. <i>argyrea</i> Boiss.	+
44	<i>O. argyrea</i> Boiss. subsp. <i>isaurica</i> Hedge Et hub-Mor.	+
45	<i>O. atropatana</i> var. <i>Atropatana</i>	+
46	<i>O. atropatana</i> var. <i>grandiflora</i> Aktoklu var. <i>nov.</i>	+
47	<i>O. huetiana</i> Boiss.	+
48	<i>O. ornata</i> (Willd.) Desv.	+
49	<i>O. subacaulis</i> Boiss.	-
50	<i>O. haussknechtii</i> Boiss.	-
51	<i>O. ptolemaica</i> (Del.) Dc.	-
52	<i>O. albiflora</i> Hub-Mor.	+
53	<i>O. nitida</i> Boiss.	+
54	<i>O. galegifolia</i> Boiss.	-
55	<i>O. hypargyrea</i> Boiss.	-
56	<i>O. meschetica</i> Gross.	-
57	<i>O. radiata</i> (Desf.) Bieb.	-
58	<i>O. cappadocica</i> Boiss.	+
59	<i>O. tournefortii</i> (Willd.) Desv.	+

## 1.5 Morfolojik Özellikleri

Türleri tanımlarken öncelikle düşünülen ölçütler, bunların morfolojik özellikleridir. Buna ek olarak, bu karakterlerin üstünlükleri ve çekinceleri da vardır (Aktoklu 1995; Büyükasık 2002).

Morfolojik özelliklerin üstünlükleri;

- Çoğunlukla baskındırlar. Baskın bir geni çekinik bir genden ayırmak için kullanılırlar.
- Sayıları çok azdır.
- Lokusun her birinde 2 alel vardır.
- Daha kolay analiz yapılmaktadır.
- Kolayca belirlemek için haritalama nüfusunda bir gözlem yapmak yeterlidir.

Morfolojik karakterlerin çekinceleri;

- Heterozigotları saptayamazlar.
- Mutasyon sonucu oluşabilirler.
- Ekolojik öğelerden etkilenirler.
- Epistatistik veya pleiotropik olarak etkilenirler.

## 1.6 Tozlaşma ve Döllenme

Diğer baklagillerde olduğu gibi korunga, vektörel tozlaşmaya gerek duyan bir bitki türüdür ve tozlaşma, genel olarak balarıları (*Apis mellifera* L.) ile gerçekleşir (Özbek, 1996). Yaklaşık %80 tozlaşma görevi balarıları yardımıyla gerçekleşmektedir (Tutkun 2006),

Bir literatürde de, korungada baskın tozlayıcının balarısı olduğu bildirilirken, kendini dölleme oranı %25, vektörel döllenme ise %75 olarak verilmiştir (Tutkun, 2006). Ancak

kendi kendine tozlaşmada oluşan döllerde, nitelikler yönünden körlenme tespit edilmiştir (Avcıoğlu 1977).

Arılar, çarpıcı renkli çiçeklere ve yüksek miktarda balözüne sahip bir bitki olan korungayı, genellikle yoğun bir şekilde sabah ile öğlen saatleri arasında ziyaret ederler. Öğleden önce genellikle rüzgâr olmaması ve çiçeklerin tüm canlılıklarıyla polinatörler için hazır durumda olması, bunun başlıca nedenidir. (Er, 1995).

Arı faaliyeti, birbirine yakın konumdaki yonca ve korunga tarlalarında incelendiği zaman, balarılarının daha çok korungayı seçtikleri ve çiçeklenme sürecinde faaliyetlerine kesintisiz devam ettikleri belirlenmiştir. Bu, balarısının korunga için iyi bir tozlayıcı olduğunu gösterir (Çelik, 1988). Korunganın özellikle Doğu Anadolu'da, Balarısının birinci sırada ziyaret ettiği bitki olduğu saptanmıştır (Özbek, 1996). Rusya'da yapılan incelemelerde, korunga için en iyi polinatörün Kafkas arısı olduğu belirlenmiştir (Özbek, 1992).

Korunganın (*Onobrychis viciifolia*) 32 tozlayıcı böcek türleri tarafından ziyaret edilen ve 60 bitki türünün olduğu bir alanda, 3430 ziyaretle tozlayıcıların çoğunlukla tercih ettiği bitki olduğu tespit edilmiştir (Ebeling vd. 2008).

Çevresindeki kovan sayısı ile de orantılı olarak korunga olan alanlarda bal arılarının yoğunlukla bitkiye geldikleri tespit edilmiştir (Serin ve Tan, 2001).

1970 yılındaki çalışmaya istinaden 1992 yılında Özbek tarafından, tozlaşmaya özen gösterildiği takdirde korungada ürün artışının %35–40 arasında olduğunu belirtmiş, bu düzeyde bir artışın sulama, gübreleme gibi başka tarımsal etkinliklerle gerçekleştirilemeyeceğine dikkat çekilmiştir.

## 1.7 Tarım, Hayvancılık, Ekolojik Bakımından Önemi

Doğada bulunan veya yetiştirilen Yem bitkileri, yapılarında otçul besi hayvanlarının yaşamlarını sürdürmeleri ve istenen ürünü verebilmeleri için gereken besin maddelerini içeren, belirli ölçülerde yedirildiklerinde, hayvanların sağlığına ve ürünlerinin niteliğine zararlı etkileri olmayan bitkilerdir.

Hayvanların beslenmesi için kullanılmalarının yanı sıra, sürdürülebilir tarım yönünden de yem bitkileri çok önemlidir. Öncelikle biyolojik çeşitliliği korumak ve gelecek kuşakların da doğadan yararlanabilmeleri amacıyla üretim yapılanmasında yer alır.

Korunganın ürün rotasyon sistemleri içinde yer alması, hayvancılık işletmelerinin nitelikli kaba yem gereksinimi ve tarla tarımı için de, tarım işletmelerinin sürdürülebilirliğini açısından, daha kıymetli kılar.

Korunga tarımını çekici yapan bir başka özellik de bu tarz bitkilerinin ayrışmamış gübre olarak da kullanılabilmesidir. Toprağa yaptıkları organik madde katkısına ek olarak, kimyasal gübre kullanımının biraz olsun önüne geçmesi sayesinde ekolojik bir katkı yapar.

Yem ürünlerinin önemli bir bölümü baklagiller familyasından türlerdir ve bunların toprağa azot bağlayabilmeleri ve kazık köklere sahip olmaları, toprağın verimliliğini artıran bir özelliktir.

Türkiye'nin güneyinden Asya'nın ortasına kadar yayılan korunga da baklagiller familyasından, çok yıllık bir yem bitkisi türüdür ve aşırı sıcak bölgeler dışında, tüm kıraç ve kireçli bölgelerde başarıyla yetişir. Korunganın, suyun yetersiz olduğu iklimlerde ürün nöbeti planlamada önemli bir yeri vardır (Açıkgöz, 2001). Korunga, yüksek oranlarda ham yağlar ve ham proteinler içerir. Lignin maddesi besi hayvanlarının sindiremedikleri bir maddedir ve yoncaya oranla korungada daha az bulunmaktadır (Serin ve Tan, 2001).

Birçok araştırmacı, korunda ve balarısı son derece uyumlu ilişkisinden bahsetmiş ve korunga balının yksek nitelikli olduğunu bildirmiştir (Özbek, 1996).

Yine birçok araştırmacı, yksek nitelikli balların, baklagiller familyasına ait yem bitkilerinin çiçeklerin taçyapraklarındaki (corolla) nektardan kaynaklandığını ifade etmiştir (Avcıoğlu, 1977).

Dubbs tarafından 1968 yılında yapılan çalışmada, çiçeklenme başlangıcı ile tam çiçeklenme arasındaki sürede, korunga sahasının kenarına konulan kovanlarda ağırlığın %76,2 arttığını bunun yksek miktarda baldan kaynaklandığını bildirmiştir. Dubbs, “eski” korunga çeşidinin bal üretimini belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada ortalamaların çok üzerinde bal elde edildiğini gözlemlemiştir.

Bu çalışmada bal üretmek için bir dekarlık korunga sahasına kurulan iki kovan arının yetmediği ifade edilmiştir (Dubbs, 1968).

Bir dekarlık bir korunga parseli, 9 ila 40 kg kadar üstün nitelikli bal verir (Öder 2006, Aksoy 2011). Korunga balında glikoz %41.89 ve früktoz %50.26 oranlarında bulunur. (Sorkun, 1995). Bazı türlerden de kristalize olan beyaz renkli bal elde edilir (şenocak, 1988).

İlk yapılan tarımın Anadolu’da Romalılar döneminde başladığı bilinmektedir. Avrupa’da korunga tarımının ilk olarak Güney Fransa’da, 15. Yüzyılda başladığı yönünde kanıtlar vardır. (Gençkan, 1992). “Koringa” ekiminin Anadolu topraklarında da yapıldığı kaydedilmiştir. Anadolunun doğusunda “göringen” veya “koringa,” gibi isimlerle bilinen bir bitkidir (Tosun, 1974).

Özellikle Kafkasya – İran – Anadolu üçgeninde yoğun ve çeşitlidir. Bunların arasında her üç bölge için özėün türler vardır. Türkiye’nin bu cinsin geliştiği önemli merkezlerden biri olduğu, bu verilerin ışığında apaçıktır (Aktoklu, 1995).

Türkiye genelinde korunga kuru ot elde etmek için yetiştirilse de, silaj üretimi için de çok kullanışlıdır. Bir başka yararı da balarılar için arı otlığı olarak kullanılmasıdır. Yaklaşık 4 dekarlık bir korunga parseli, iki kovan arıya yeterli nektar sağlar. Korunga nektarının %55,4 şeker oranıyla diğer yem bitkilerinin nektarlarına göre daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. (Sönmez, 1961).

### 1.8 Bitkinin Zararlıları

Bitkilerde hastalık, taçta bozulma ve kök damarlarında renk değişiklikleriyle ortaya çıkar. Taç çürüklüğü *Fusarium solani var. martii* (Appel ve Wr.) küfünden kaynaklanır. Damarlarda renk değişikliği ise çoğunlukla kıraç topraklarda yetiştirilen korungalarda göze çarpar (Açıkgöz, 1976). Türkiye'deki, bazı korunga ekimlerinde, üründe azalma olduğu belirlenmiştir. Buna bitki kökündeki öz kısmının ortasında bulunan *Bembecia scopigera* ve *Sphenoptera carcieli* böcekleri neden olmaktadır.

Bitkinin iki ya da üçüncü yılında bu böcekler, kökün orta bölümünü delerek bitkinin kökünü içten yer ve gelişimini durdurur. Bu nedenle beklenen ürün miktar ve niteliği düşer (Elçi 1997).

Korunga hastalıkları hakkında çok fazla çalışma yürütülmemiştir. Bazı bölgelerde, *Fusarium solani* ile *Sclerotinia trifoliorum* nedeniyle kökte çürümeler, *Verticillium alboatrum* nedeniyle renk solması ve yapraklarda ve gövdede *Ramularia*, *Septoria*, *Ascochyta* küflerinin neden olduğu zararlar tespit edilmektedir. Zararlıların kurtçukları, korunganın kök boğazına girerek kökün öz kısmını yıkıma uğratırlar ve kökleri böylece zarar gören bitkiler ölür. Türkiye'de 3-4 yıl yaşayabilen korunganın aslında 20 yıla kadar yaşayabilmesi mümkün olup Türkiye'deki bu kısa ortalamasının nedeni de bahsedilen zararlılardır.



## 1.9 Belirteçler

### 1.9.1 Morfolojik belirteçler

Morfolojik araştırmalar genellikle sofistike donanımlar ve uzun hazırlık işlemleri gerektirirler. Dolayısıyla düşük maliyetli yöntemler olmaları yararlıdır. Ancak normal bir dışyapıda gizli bir değişimin meydana gelip gelmediğinin garanti olmaması, başlıca çekincelerden biridir. Değişim çekinik biçimde olabilir ve neticede heterozigot formda olur. Bu çekinik değişiklikler, doğrudan bitkide döl incelemesi yapılmıncaya kadar görülmez.

Morfolojik biyo-belirteç araştırmaları nüfus kalıtsal yapısının belirlenmesi için yapılan ilk çalışmalardır. Kalıtsal yapının tümü birden morfolojide görülmediği için, morfolojik belirteçler yeterli değildir, ayrıca morfolojik nitelikler, çevre öğeleri ve diğer lokuslardan da etkilenebilirler. Bu nedenle gelişmiş teknikler kullanılarak yapılan araştırmalara göre daha az sayıda çalışma, morfolojik belirteçler kullanılarak yapılmaktadır (Khan ve Spoor, 2001).

Morfolojik Biyo-Belirteçlerin Getirileri:

- Genellikle baskındır. Ayrım sağlamak için kullanılır.
- Çaprazlamaların her birinde az sayıda görülür.
- Lokusların her biri 2 adet alel içerir.
- Analiz etmek basittir.
- Haritalama nüfusu gözlemlenerek kolayca tespit edilirler.

(Kleinhofs vd. 1993; Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Belirteçlerin Olumsuzlukları:

- Mutasyon sonucu olabilirler.
- Çevre öğelerinden etkilenmiş olabilir.
- Epistatistik etkilenmeye açıktır.

## 1.9.2 Biyokimyasal belirteçler

İzozim veya izoenzim kavramını, belirteçler ve moller üretir. Belirteç ve mol izozimleri, değişik moleküler formlardaki tüm proteinlerin aynı enzim özgülüğünde olabilecekleri biçiminde tanımlanır (Buth, 1984).

Moleküler ayrışıklığın teknik yöntemlerle çözülmesini sağlayan kapiler elektroforez ve histokimyasal boyanma birleşimi, kalıtsal alanının gelişmesinde yaygınlıkla kullanılır.

Son belirteç çalışmalarında, birden fazla türde ortaya çıkan biyolojik sorunların araştırılmasında izoenzimlerden yararlanıldığı kaydedilmiştir. Bazı çalışmalarda araştırma konusu izoenzimler olurken, diğerlerinde ise başka sorunların çözümüne yönelik araç olmuşlardır. Ayrıca şimdilik bu araçlar, sistemik sorunların çözümünde sınırlı olarak uygulanabilmektedir. Şu ana kadar bazı izoenzim kalıplarının ele alındığı birçok karşılaştırmalı çalışma gerçekleştirilmiştir, ancak bunların büyük çoğunluğu sistemik ilişkilerin ortaya çıkarılmalarından çok, taksonların biyokimyasal tanımlanması ile ilgili olmuştur. Bu, izoenzim verilerin büyük ölçekli olması ile ilgili bir dorundur ve şimdiye kadar buna yeterli bir çözüm bulunamamıştır (Tamam, 2008).

Biyokimyasal belirteçler, genler tarafından üretilen proteinlerdir. İzoenzim adı verilen bu proteinler, farklı elektrik yüküne sahiptirler. İzoenzimler birbirlerinden elektroforez yöntemiyle ayırt edilebilirler. Her enzim, belirli bir biyokimyasal tepkimeyi katalize eder. Bunların kendilerine özgü alt-katmanları ve eş-çarpanları bulunur. Bu tepkimelerin ürünleri renkli olur, renkli ürünler elektroforezden sonra jel üzerinde, kalıtsal bilgi sağlayan bantlar halinde görülür hale gelir. (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Enzim Belirteçlerinin Üstünlükleri: j

- Eş baskın belirteçler,
- Analiz çabuk, ucuz ve güvenli,
- Çevre ve diğer lokus etkilerinden bağışık,

- Sayıca morfolojik belirteçlerden fazla (<10) .

Enzim Belirteçlerinin Çekinceleri:

- Sayıca çok azdırlar.
- Bazı izoenzimler ancak belirli dokularda, örneğin esteraz ve peroksidazlarda, belirli bir gelişme sürecinde gözlemlenebilir.
- Çok küçük ölçüde de olsa, bazen epistatistik etki yaparlar.

### 1.9.3 Moleküler belirteçler

Moleküler belirteçler, bir nüfustaki bireylerin DNA'larının temel dizgedeki farklılıklarını değişik biçimlerde belirleyen belirteçlere verilen isimdir. Son yirmi yıldan beri biyolojik bilimlerde bir devrim sayılan moleküler belirteç yöntemleri, bireylerarası DNA dizgelerindeki farklılıkları belirlemede kullanılır. Yani moleküler belirteç, genom içindeki bir DNA fragmanının farklılıklarını gösterir ve bu farklılıklara eklenme, silinme, yer değiştirme, çoğaltma gibi etkenler neden olabilir. Taksonomi, fizyoloji, embriyoloji, gen mühendisliği vb. alanlarda, DNA temelli moleküler belirteçler sıklıkla kullanılan, çok yönlü aygıtlardır (Schlotterer, 2004).

Polimeraz Zincirleme Tepkimesinin (Polymerase Chain Reaction, PCR) James D. Watson ve Francis Crick'in DNA'nın çift sarmallı yapısının Watson ve Crick tarafından 1953 yılında çift sarmallı yapının keşfedilmesi sonrasında bulunması (Mullis, 1987), moleküler belirteçlerin geliştirilmesinde çok önemli adımlar olmuştur. Son yıllarda, birçok bitki türü de genomu tamamlanan organizmalar arasında görülmektedir. Moleküler belirteç bilgileri de buna koşut olarak çoğalmıştır ve kullanımının meyve ıslahında daha çok yaygınlaşacağı tahmin edilmektedir.

Moleküler belirteçlerin geliştirilmesi, morfolojik ve biyokimyasal belirteçlerden üstün, daha çabuk sonuç veren ve zaman kısıtlaması olmayan çalışmalara yön vermiştir (Kandemir, 2001). Tıpkı başka canlılarda olduğu gibi, bitkilerde de yaygınlıkla kullanılan

moleküler belirteçlerin bitki ıslahı ile entegre kullanımı, birçok yeniliğe yol açmıştır (Agarwal vd. 2008). Seçilen genlerin çeşitler ve türler arasındaki geçişinin hızlandırılması; akraba yabancı türlerden yeni genlerin aktarımına olanak sağlaması; birden çok genin denetlediği kompleks karakterlerin gen analizlerine olanak vermesi; hibridleştirme çalışmalarında, birbiriyle çaprazlanma olanağı olmayan bitkiler arasındaki kalıtsal ilişkilerin belirlenmesi, gen ikizlemenin daha kolay ve hızlı bir hale gelmesi, bu yenilik ve üstünlüklerin arasındadır (Kandemir, 2001).

İdeal Belirteçler;

- Üretim ve tatbik maliyeti az olan,
- Sakıncalı maddelerle çalışmayı gerektirmeyen,
- Güçlü polimorfizm özellikli,
- Sonuçları yinelenenir olan,
- Analizi kolay ve basit, uygulama ve sonuç süreleri kısa belirteçlerdir (Joshi vd. 1999; Kesawat ve Das, 2009).

En basit hücreli canlılar dahi karmaşık yapılara sahiptir ve çok sayıda farklı moleküllelerden oluşur. Dolayısıyla, öncelikle ele alınan grubu, planlanan çalışmaya göre arıtmak gerekir. Moleküler biyoloji araştırmaları çoğunlukla, arıtılmış moleküllele yapılan işlemlere dayanır.

Islahçılar için gerekli bir alan, nükleik asit temelli kalıtsal belirteçlerin genom analizlerinde kullanımınıdır. Bu belirteçler aracılığıyla kalıtsal çeşitlilik incelenebilir. Türlerin özellikleri belirlenerek, filojenik yakınlıkları anlaşılabilir (Lowe vd. 1996). Bunlar, bağlantı haritalamaları, soy ağacı analizleri ve seçim programlarında kullanılır. Moleküler belirteçlerde DNA polimorfizmi, standart morfolojik ya da biyokimyasal belirteçlerden daha çoktur. Bunların aracılığıyla zor çaprazlanabilen türlerin kromozom haritalamaları oluşturulabilmesi gibi ve daha birçok üstünlükleri bulunmaktadır.

Ekonomik değere sahip çeşitlere yeni, üstün nitelikler kazandırılması için doğadaki yabancı çeşitlerin derlenmesi ve moleküler düzeyde tanımlanması gereklidir (Bothmer vd. 1991). Klasik ıslah yöntemlerindeki güçlüklerin aşılmasında, bu çeşitlerin ebeveyn olarak kullanılması ve moleküler teknikler aracılığıyla istenilen tiplerin seçilebilmesi önemli bir rol oynamaktadır.

Bütün bir genom analizi için bitki dokusunu mümkün olduğunca çok tutmak gerekir. DNA yalıtımı için bitkiden alınmış herhangi örnek kullanılabilir (Botstein vd. 1980). Bütün dokularda görülebilen DNA belirteçleri istikrarlıdır ve çevre koşullarından etkilenmezler (Williams vd. 1990). Eş baskın ya da baskın olabilirler, epistatistik ve pleiotropik etkilere maruz kalmazlar, kalıtım ilkeleri basittir.

Tüm ökaryotlarda, genomlarındaki bir ya da birden fazla özelliğinin tanımlanması, DNA bantlarının belirlenmesiyle gerçekleştirilir. Değişik büyüklükte ve sayıdaki DNA bantları, her birey için özel olarak analiz edilir. Bu yöntemle her bireyin DNA belirlenmiş olur.

DNA profilleri ve özgül DNA parmak izlerinin belirlenmesi, şu sıralamayla gerçekleştirilir;

1. Bitkisel malzemenin alımı,
2. Bitkisel malzemedan DNA yalıtımı,
3. Kalıtsal malzemenin uygulanacak yönteme uygun olarak çoğaltılması (PCR),
4. Çeşitli moleküler belirteç yöntemleriyle bireylerarası kalıtsal polimorfizm etkileşiminin saptanması (AFLP, RAPD, RFLP, SCAR, SSCP, SSR, vb.),
5. Özgül bir uygulama kullanarak DNA bant profillerinin incelenmesi.

MELCHINGER (1990), önemli tarımsal niteliklerin dışyapısal seçiliminin, üretim çalışmalarında zaman alan bir yöntem olduğunu kaydetmiştir. Biçimsel belirteçlerin aracılığıyla seçim gibi geleneksel yöntemler kullanıldığı zaman; belirteçlerin az sayıda olmaları, pleiotropik ve epistatistik etkiler almaları ve ekolojik koşullarının dalgalı olması gibi sorunlar çıkmaktadır. Bu tür sorunlardan kurtulmak ya da çözümlenmek amacıyla

moleküler belirteçler aracılığıyla seçim, bir potansiyel taşıdır. İki genitörün hibridleşmesinden oluşturulmuş bitkilerden yararlanılarak yapılan araştırmalarda aranan genlerle ilgili belirteçler belirlenerek, ıslah çalışmalarında bunlardan erken seçim ölçütü olarak yararlanılmakta, ya da ilgili genleri klonlanmaktadır.

MICHELMORE vd., (1991), gene bağlı özelliğin tanımlanmasının, belirteçler aracılığıyla yapılan seçimin başarılı olması için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle ıslahçı, söz konusu gene ait “ayrılmış – segregated” bir nüfus oluşturulması gereklidir. Belirteçler ile amaçlanan gen arasındaki etkileşim, Bulk Segregant Analiz (BSA) yöntemiyle de belirlenebilir.

KNAPP (1994) ise ayrıca, niceliksel özelliklerin seçimi ve soyaçekim mekanizmasının araştırılmasında ve moleküler bağ haritalarının yaratılması ve tamamlanmasında da belirteçler yardımıyla seçimin (MAS) potansiyel vadettiğini bildirmiştir.

WILSON VE WALKER (1994)’in bildirdiğine göre, DNaz’ların yanı sıra yalıtım sürecinde uygulanan fiziksel güç gibi nedenlerle, DNA kolayca kırılabilir. DNaz’lar, DNA yalıtım sürecinde dokularda sıvı nitrojen kullanılmaması sonucunda dokuların parçalanmasıyla etkinleşerek kırılmaya sebebiyet verebilir.

Pek çok türde, moleküler belirteç yöntemlerinin kullanımının çığır açıcı özellikte olduğunu bildirilmektedir. Öte yandan bu teknolojilerin çok büyük maliyetler gerektirmesi, ancak bazı türler için dünya çapında ortak projeler aracılığıyla amaçlara erişilebilmiştir (Beaver ve Lezzoni, 1993). Çizelge 2.1’ de kategorize edilmiş olan moleküler belirteçler, Belirteçler Aracılığıyla Seçim (MAS), Niceliksel Özellik Lokus gen yalıtım yöntemleri (Vos vd. 1995), kalıtsal kaynakların nitelendirilmesi, filojenik çözümler ve kültür çeşitlerinin belirlenmesi gibi analizlerde kullanılır. Önemli olabilecek özellikler karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Yetkin Bir Moleküler Belirteç Yöntemi,

A – Polimorfik ve genomununda kullanımı olmalı,

B – Kalıtsal benzeşmemenin anlaşılmasında yeterli olmalı,

- C – Güvenilir ve bağımlı olmayan belirteçler üretmeli,  
D – Dolaysız, süratli, aynı zamanda da ekonomik olmalı,  
E – Az miktarda DNA ya da doku gerektirmelidir.  
F – Değişik fenotiplerle bağlanma özelliği de bir üstünlüktür, ama belirteç yöntemlerinden hiçbirinde tek başına bu üstünlüklerin hepsi birden bulunmaz.

Moleküler belirteç yöntemleri, aşağıdaki gibi, kullanım amacına koşut biçimde değişen ölçütlere uygun olarak gruplara ayrılabilir:

- I. Aktarım tipi için
- II. Gen etkinliği için
- III. Analiz prosedürlerine göre (Polimeraz Zincirleme Tepkime (PCR) ve Polimeraz Zincirleme Tepkimesiz (non-PCR) belirteçler) (Kesawat ve Das, 2009).

Çizelge 1.2 Moleküler belirteç yöntemleri (Mohan vd 1997)

<b>Teknikler</b>	<b>Açık Adı</b>
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
ALP	Amplikon Uzunluk Polimorfizmi
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
AS-PCR	Alele-özümlü PCR
CAPS	Polimorfik Dizge (Kesilmiş ve Çoğaltılmış)
ISSR	Inter-SSR (Inter-SSR Amplification)
RAPD	Polimorfik DNA'nın Rastgele Amplifikasyonu
RFLP	Sınırlayıcı Piece Length Polymorphism
SAP	Özgül Amplikon Polimorfizmi (Specific Amplicon Polymorphism)
SCAR	Dizge Karakterli Sayıca Artan Bölgeler
SSCP	Tek Zincirli Uygunluk Polimorfizmi (Single-strand Conformation Polymorphism)
SSLP	Mikro- ve Mini-uydu Basit Dizge Uzunluk Polimorfizmi
SSR	Basit Dizge Yinelemeleri
STS	Dizge Etiketli Konum

Polimeraz Zincirleme Tepkime (PCR – Polymerase Chain Reaction) temelli olup olmadıklarına, polimorfik niteliklerine, baskın ya da eş-baskın belirteçlere izin verip vermemelerine, ayrıca verimlilik, otomasyon ve giderlerine göre, farklı birçok belirteç yöntemi bulunur. En yaygın belirteç yöntemleri aşağıda sunulmuştur (Staub vd. 1996; Ridout ve Donini 1999).

Çizelge 1.3 Yaygın belirteçlerin mukayesesi

Adı	Masraf	Baskınlık Durumu	Otomasyon	Polimorfizm Durumu	PCR Temelli Olup Olmaması	Verimlilik Durumu
STS	Az	Eşit	Vasat / Çok	Çok	+	Çok
RFLP	Çok	Eşit	Az	Az/Orta	-	Çok
SSR	Az	Eşit	Vasat/ Çok	Çok	+	Çok
RAPD	Az	Dominant	Vasat	Vasat/ Çok	+	Düşük
AFLP	Orta	Dominant	Vasat/ Çok	Çok	+	Çok
SCARS	Orta	Eşit	Vasat	Çok	+	Çok
ISSR	Az	Dominant	Vasat/ Çok	Çok	+	Çok

Bitkilerde yararlanılan moleküler belirteçler üretilme biçimlerine göre, polimeraz zincirleme tepkime temelli olanlar (RAPD, AFLP, SSR vb.) ve olmayanlar (RFLP) olarak iki gruba ayrılır (Meksem ve Kahl 2005). Ayrıca moleküler belirteçler, hesaplanabilirlik ve kalıtsal yapılarına göre de, baskın belirteçler ve eş baskın belirteçler olarak da ayrılabilir (Devran, 2003). Günümüze kadar birçok moleküler belirteç geliştirilmiştir ve sayıları artmaya devam etmektedir.

### 1.9.3.1 Moleküler belirteçlerin kullanım alanları

#### 1.9.3.1.1 Genotip tanımlama

Genotipik tanımlama için standart morfolojik belirteçler kullanılabilir. Morfolojik belirteçler her ne kadar kolay elde edilebilseler ve bazen mutlaka kullanılmaları gerekse



de, ekolojik etmenlerden etkilenebilir ve hatalı sonuçlar verebilirler. Bitki ıslahçılarının daha hızlı ve isabetli sonuçlara varmak amacıyla başka belirteç sistemlerine yönelten diğer sınırlayıcı etkenler, genotipik tanımlamada dışyapısal niteliklerin kalıtsal denetimsel işleyişinin tam bilinmemesi, çeşitlemenin yetersiz olması ve istenen dışyapısal niteliklerin büyümenin uygun basamağında belirmesinin uzun sürmesidir.

Moleküler belirteçler, morfolojik belirteçlere göre şu üstünlükleri taşır:

- Dokudan bağımsız yüksek polimorfizm,
- Ekolojik etmenlerden asgari etkilenme,
- Yalın kalıtımsal yapı

Birçok türde DNA belirteç yöntemleri, aşağıdaki gibi çeşitleri belirlemek için kullanılır:

- Tahıllar, tahılımsılar [Arpa (*Hordeum*), Buğday (*Triticum*), Çavdar (*Secale cereale*), Darı (*Echinochloa*), Mısır (*Zea mays*), Pirinç (*Oryza*)],
- Yağlı tohumlar [Hardal (*Brassica*), Soya (*Glycine*), Yerfıstığı (*Arachis*)],  
Baklagiller [Bezelye (*Pisum sativum*), Fasulye (*Phaseolus*), Maş (*Vigna*),  
Mercimek (*Lens culinaris*), Nohut (*Cicer*)],
- Şekerler [Pancar (*Beta*), Şeker kamışı (*Saccharum*)],
- Sebzeler [Biber (*Capsicum*), Domates (*Solanum lycopersicum*), Hıyar (*Cucumis sativus*), Turp (*Raphanus*)],
- Meyveler (Kaju, Turunç, Mango, Elma, Muz, Erik vb., Armut, Böğürtlen vb., Asma).

Weising vd. (1995) bu kapsamda kalıtsal yöntemlere dair oldukça detaylı veriler aktarmışlardır.

### **1.9.3.1.2 Çeşit tescili**

Yeni bitki çeşitleri tanımlamada ek bir sicil sistemi olarak DNA belirteç yöntemlerinin kullanılması, bir başka önemli uygulama alanıdır. Tescil edilmesi önerilen bir çeşidin

diğer çeşitlerden farklı, yeknesak ve durulmuş olmaları anlamında tanımlanmaları gerekmektedir. Morfolojik doneler bu ölçütlerin test edilebilmesinin temelini oluştururlar. İslah çalışmalarında kendi çeşitlerini korumak için, hâlihazırda DNA belirteç yöntemleri çeşitlerin tescilinde bağımsız bir belirleme aracı değilse de, bunları destek amacıyla kullanılmaktadırlar.

Tohum ticaretinde ve ıslah işlerinde karşılaşılan bazı sorunların da kesin bir biçimde çözümlenmesinde de DNA belirteç yöntemleri yaygınlıkla kullanılır. Bu moleküler belirteç yöntemlerinin üstünlüklerini ve çekincelerini, Budak vd (2004) Tablo 2.3'te karşılaştırmalı olarak vermişlerdir.

Çizelge 1.4 Yaygınlıkla kullanılan DNA belirteç yöntemlerinin karşılaştırılması

Belirteç	Üstünlükleri	Çekinceleri
<b>Sınırlayıcı Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek miktarda kalıtsal veri</li> <li>2. Eş-baskın belirteç</li> <li>3. Yüksek yinelenebilirlik</li> <li>4. Çok kez kullanılabilir filtreler</li> <li>5. Genom iyi ifade edilir</li> <li>6. Tüm türlerde kullanılabilir</li> <li>7. DNA dizge verileri gerekmez</li> <li>8. Güvenlidir</li> <li>9. Harita tabanlı ikizleme için gereklidir</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Özellikli gereksinim ve Otomasyonda güçlükler</li> <li>2. Sondaların ikizlenmesine ihtiyaç duyar</li> </ol>
<b>Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek miktarda kalıtsal veri</li> <li>2. Genom iyi ifade edilir</li> <li>3. DNA dizge bilgisi gerekmez</li> <li>4. Otomasyona uygundur</li> <li>5. Sıradan çok nitelikli olmayan girdilerle çalışılabilir.</li> <li>6. Nisbi olarak zorluğu daha azdır.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Baskın belirteç</li> <li>2. Düşük yinelenebilirlik</li> <li>3. Bütün türlere uygun değildir</li> </ol>
<b>Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek miktarda kalıtsal bilgi</li> <li>2. Küçük parçacıklar yeterlidir</li> <li>3. Dizge verilerine ihtiyaç göstermez</li> <li>4. Tüm türlerde kullanılabilir</li> <li>5. Polimorfizm yönüyle güçlü</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aşırı duyarlı, bant desenleri etkilenebilir</li> <li>2. Kesin haritalar oluşmaz</li> <li>3. İyi öncül seçimi gerekir</li> </ol>

Çizelge 1.4 Yaygınlıkla kullanılan DNA belirteç yöntemlerinin karşılaştırılması (devam)

<b>Dizge Etiketli Konum (STS)</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Radyoaktif işaretleme gerekmez</li><li>2. Filtrelerden birden daha fazla kez istifade edilebilir</li><li>3. Başarılı bir genom tanımı</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Zahmetli bir yöntemdir</li><li>2. Amaçlanan alanlardaki mutasyon belirlenemez</li><li>3. DNA dizge verileri gerekir</li><li>4. Öncülün ikizlenmesi ve tanımlanması gerekir.</li></ol>
<b>Izo Enzimler</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Evrim araştırmalarına uygun</li><li>2. Yalıtımı, DNA yalıtımından daha kolaydır</li><li>3. Tüm türlerde kullanılabilir</li><li>4. Radyoaktif işaretleme gerekmez</li><li>5. DNA dizge verileri gerekmez</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Zahmetli bir yöntemdir</li><li>2. Sınırlı polimorfizm</li><li>3. Doku konumu bilgileri gerekir</li><li>4. Otomasyon pahalı ve zahmetlidir</li></ol>

### 1.9.3.1.3 Islah hatları tanımlanma ve tohum saflık testleri

Islah çalışmaları sırasında karşılaşılan birçok durumdan dolayı, hibridizasyon hatlarının belirlenmesi gerekir (Henry, 1997). Büyük ölçülerde ıslah hattı, çalışmalarda etiketlemeden kaynaklanan karışıklıklardan dolayı kaybedilebilmektedir. Tohum örneklerinin karışması ya da arazide ortaya çıkan sorunlar, ıslah hatlarının ve ticari çeşitlerin saflıklarının bozulmasına neden olabilir.

Stockton ve Gepts (1994), fasulyede iki F6 geri hibridine ait hatları ayırmak için insan minisatelit sondalarından 33.15 ve M13 tekrar dizgelerinden yararlanılmıştır. Kaemmer *vd* (1995), domates ıslah hatlarına uygulanan saflık analizlerinde, SSR belirteçlerinin uygulanabileceğini kanıtlamışlardır. Tivang *vd* (1996), RAPD yöntemiyle enginar nüfuslarında, kendi içlerinde ve nüfuslar arasında çeşitlenmeler belirlemişlerdir. Roose ve Stone (1996), kuşkonmaz ıslahında F2 tohumlarını F1'lerden ayırmak için RAPD ve RFLP belirteçleri uygulanabileceğini bildirmişlerdir. Phippen *vd* (1997), dışyapısal olarak ayırt edilemeyen "Golden Acre" türü lahana nüfuslarına ait hatları moleküler belirteçler uygulayarak belirlemişlerdir.

#### **1.9.3.1.4 Melez çeşit saflık testleri**

Birçok ticari üründe F1 melez çeşit üretimi başarıyla gerçekleştirilmektedir. İstenmeyen polen bulaşmaları ve dişi hatların kendini tozlaması gibi nedenlerle, ıslah aşamalarında saflıkları bozulabilir. Bir melezin yetiştirilmesi için yapılan hibridizasyon çalışmasının başarısını ve melez saflığını ortaya çıkarmak için, moleküler belirteçler kullanılır. Erken fide aşamasındaki gerçek melezlerle katışık hatlar birçok çeşitte, erkek ebeveyne özel moleküler belirteçler aracılığıyla ayrılabilir (Hashizume *vd* 1993, Crockett *vd* 2000).

#### **1.9.3.1.5 Cinsel karakteristik belirleme**

İkievcikli türlerin ıslah çalışmalarının başarıyla gerçekleştirilmesi için bitkilerde eril ve dişil cinsiyetlerin erkenden belirlenmesi önem taşır. Jiang ve Sink (1997) kuşkonmaz bitkisiyle ilgili çalışmalarında, eş-baskın bir STS belirteci elde etmişlerdir.

#### **1.9.3.1.6 Kalıtsal çeşitlilik belirleme**

Moleküler belirteçler çeşitliliklerin belirlenmesinde uygun bir tekniktir (Karp *vd.* 1998). Bitki ıslahçıları tarımsal değer, uyarılma ve performans belirleme açısından gen kaynaklarında belirteç yöntemlerinin kullanarak dolaysız ve yararlı bilgiler edinirler.

#### **1.9.3.1.7 Gen kaynaklarının kalıtsal kökenlerini belirleme**

Gen kaynaklarının kalıtsal kökenleriyle ilgili son derece kullanışlı veriler, moleküler belirteçler aracılığıyla sağlanabilir. Bu verilerden ıslah çalışması yapanlar tarafından istifade edilir. Vasquez tarafından bu tür tatbik yapılmak suretiyle bantların ekseriyetle tüm hatlarda benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Horejsi ve Staub (1996), çalışmalarında kullandıkları RAPD yöntemleriyle, hıyar elit hatları yanı sıra 118 ayrı çeşitte, kısıtlı kalıtsal çeşitlilik bulmuşlardır. Shim tarafında gerçekleştirilen analizlerle bazı sebzelerde yapılan çalışmalarda yeni geliştirilen çeşitlerin yabancılarla F1 melez çeşitliliği bakımından daha ayrışık bir yapıda oldukları bildirilmiştir.

### **1.9.3.1.8 Tarımsal performans ve uyarlanma yeteneği kestirimleri**

Kimi yaygın tarımsal ve fizyolojik özelliklere ilişkin önemli bilgilere erişebilmek için, moleküler çeşitlilik analizleriyle geliştirilen çeşitlerle ilgili sınıflandırmalardan yararlanır. Çeşitlerin uyarlanma yeteneklerini belirlemek amacıyla, bazen bazı özellikler için tarama uygulanmadan da kalıtsal çeşitlilik analizleri kullanılabilir. Al Zahim *vd.* (1997), RAPD analizleri aracılığıyla 27 sarımsak çeşidini erkenci ve erkenci olmayan gruplarına ayırmışlardır. D' La Thierry *vd.* (1997), yine RAPD yöntemiyle soğan çeşitlerini coğrafi menşelerine göre sınıflandırmışlardır. Dubreuil ve Charcosset (1999), RFLP tekniğinin mısırdaki hibridizasyon amacıyla ebeveyn seçiminde yararlı olduğunu kanıtlamışlardır. Skot *vd.* (2002) gerçekleştirdikleri AFLP analizleriyle, soğuğa dayanıklı *Lolium perenne* nüfusunu başka nüfuslardan belirgin biçimde ayırmışlardır.

### **1.9.3.2 Melezleme temelli DNA belirteçleri**

#### **1.9.3.2.1 RFLP**

Bu yöntem, molekülde iki zincirin birbirini tamamlama özelliği sayesinde DNA/DNA ya da DNA/RNA arasında melez moleküller oluşturma temeline dayanır ve seçilen DNA parçalarının genomdaki konumlarını belirlemenin yanı sıra, bunların nükleotid dizgelerini incelemek için de kullanılır. Ayrıca moleküler düzeyde organizmaların benzerlik ölçülerini belirlemek amacıyla, türdeşlik ölçüsüne göre bu değişik yapısal gruplardaki genlerin veya DNA parçacıklarının nükleotid dizgelerindeki benzerlikleri araştırılabilir.

Sınırlayıcı endonükleazlardan bakteriyel olanların ikili sarmal DNA molekülünü belli nükleotid konumlardan kestiğinin balirlenmesi, önemli gelişmelere yol açmıştır. Bakteriyofaj virüslere karşı bakteriler tarafında savunma amaçlı enzimler üretilmiştir. Bakteriyofajlar bir bakteriye saldırdıkları zaman, bakterilerin endonükleazları bakteriyofajların DNA'larını birçok yerlerinden keserek bakteride çoğalmasını önlerler (Griffiths *vd.* 1996).

Sınırlayıcı enzimler DNA molekülünü DNA dizgelerinden tanır ve buralardan keserler. (Çizelge 1.5).

Çizelge 1.5 Sınırlayıcı enzimler aracılığıyla elde edilen parçacıklar

Enzim	Tanıma bölgesi	Kesim sonrası elde edilen DNA parçacıkları		
EcoRI	5'...G <sup>↓</sup> AATTC...3' 3'...CTTAA <sup>↑</sup> G...5'	5'...G 3'...CTTAA	AATTC...3' G...5'	Yapışkan uçlu
HaeIII	5'...GG <sup>↓</sup> CC...3' 3'...CC <sup>↑</sup> GG...5'	5'...GG 3'...CC	CC...3' GG...5'	Küt uçlu

Sınırlayıcı enzimler, evrim ve nüfus genetiği araştırmalarında çok önemli farklılıklar belirlenmesine yardımcı olmuşlardır. Gerek çekirdek, gerekse de mitokondriyel genomla ilgili son derece nemli bilgiler, RFLP analizleri kullanılarak belirlenmiştir.

Botstein *vd.* (1980) RFLP belirteçlerini genomik DNA'nın sınırlayıcı enzimler aracılığıyla özgül bölgelerden kesmek ve çok sayıda DNA bandı elde etmek amacıyla kullanmıştır. DNA bantları "Southern blot" emdirim yöntemiyle oluşturulduktan sonra elektroforez tekniğiyle ayrılır ve nitrosellüloz ve naylon zara iletilir. Burada filtrelenen DNA sabitleşir ve radyoaktif olarak etiketlenmiş sonda, DNA ile melezleşme için hazırlanmış olur.

Tanksley *vd.* (1989), uygulanan ilk moleküler yöntem olarak RFLP'lerin kullanımı birçok biyolojik konuda oldukça yaygındır.

Aynı şekilde Bretting ve Widrlechner (1995) tarafından radyoaktivite ve yüksek miktarda DNA gereksinimi, uzun işlem süreçleri ve zahmetli uygulama gibi çekincelerinin bulunduğu da bildirmiştir.

Bark ve Havey (1995) RFLP belirteçlerinin eş baskın belirteçler olduklarını ifade etmişlerdir. Her bir lokusta çok sayıda alel bulunmaktadır. Sayıları morfolojik ve enzim belirteçlere göre daha yüksektir (genellikle <100). Yaygın olarak kullanılan bir belirteç olmakla birlikte oluşan haritalarda boşluklar görülebilmektedir. RFLP belirteçleri özellikle yabancı türlerde ve nüfuslarda ve *Allium* (soğan) türlerinde kullanılmaktadır. RFLP uygulamalarının üstünlükleri ve çekinceleri aşağıdaki gibidir:

#### RFLP Yönteminin Üstünlükleri:

- Türler, cinsler ve hatta familyalar arasında geçiş olanağı bulunur. Bu sayede RFLP belirteci bir bitki türünde bir kez haritalanmışsa, potansiyel bir belirteç var demektir.
- RFLP yöntemi güvenlidir. Farklı araştırmacılar, farklı laboratuvarlarda aynı sonuçlara ulaşılabilir.
- RFLP belirteçleri eş baskın özellikleri sayesinde heterozigotların tanımlanma ve nitelendirmelerinde kullanılırlar. Orta düzeyde polimorfizm gösterirler.

#### RFLP Yönteminin Çekinceleri:

- Analizler yüksek maliyetli ve zaman alıcı oldukları gibi, aşırı iş gücü de gerektirirler.
  - Çoğunlukla radyoaktif etiketleme tekniği kullanılır.
  - Yüksek nitelikli DNA gerekir (10-20 µM).
- RFLP belirteçleri, genom üzerinde rastgele dağılım göstermezler, çünkü az kopyalanan dizgeler genomlarda belli noktalarda kümelenirler. Bu da haritalama açısından olumsuzdur.

RFLP yöntemiyle, kesim enzimleri tarafından tanınan konumdaki tek nükleik asit/baz değişikliği bile belirlenebilir. Farklı genotipler arasında polimorfizm olmasının nedeni, tanınan konumlardaki baz dizge farklılaşması olabilir. Yine de polimorfizm çoğunlukla kesici enzimler tarafından tanınan kesim bölgesi arasına parça eklenmesi (insertion) ya da çıkarılmasından (deletion) kaynaklanır.

Sınırlayıcı parça uzunluk polimorfizm yöntemi, kesici enzimlerle çeşitli biçimlerde kesilerek etiketlenen DNA parçacıklarının (sonda), incelenen DNA örneğindeki benzer ya da eşit dizgedeki DNA melezlemesini temel alır. Kesilen DNA parçacıkları elektroforez tekniğiyle yönlendirilerek ayrıştırılır ve zara emdirilip filtrelenerek sonda – DNA hibridizasyonu gerçekleştirilir.

#### **1.9.3.2.1.1 “Southern blot” emdirim-temelli RFLP tekniği**

DNA düzeyindeki çeşitlemelerin belirlenmesi amacıyla çok kullanılan bir işlem, “Southern blot” emdirim yöntemiyle uygulanan RFLP tekniğidir. Bu yolla, kesim enzimlerinin DNA molekülü ile işlenmelerinin ardından ortaya çıkan DNA parçalarının kesim kalıplarındaki farklılıklar aracılığıyla, DNA’da polimorfizmler belirlenebilir (Botstein *vd.* 1980).

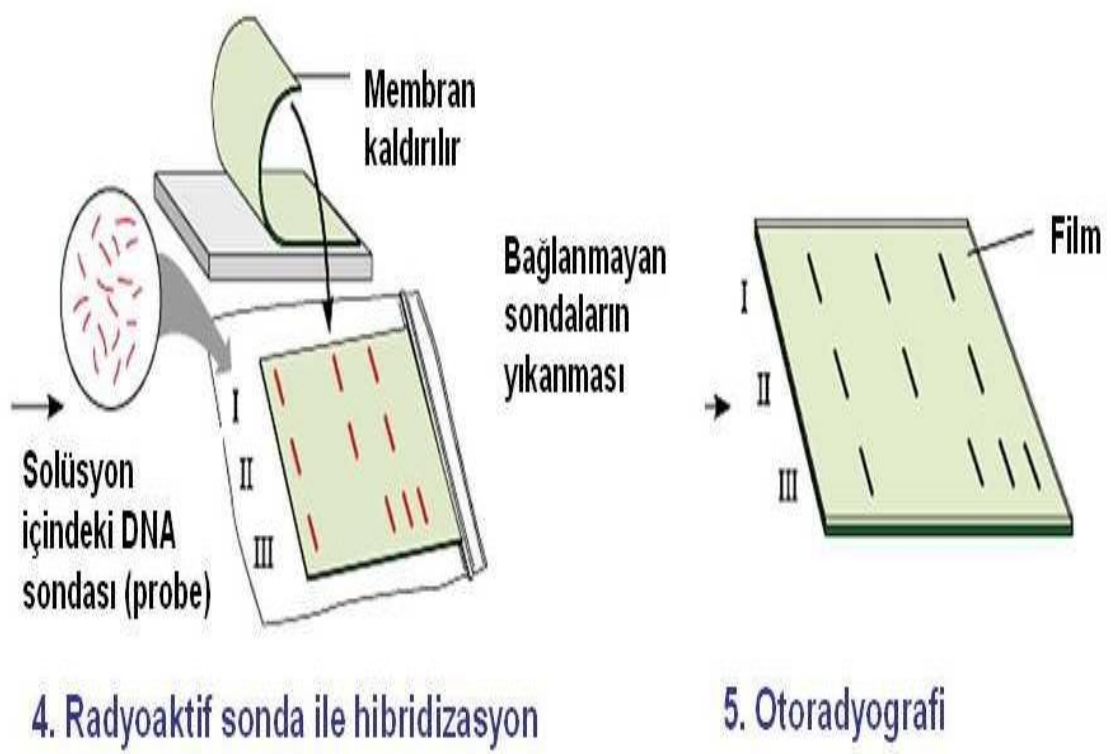
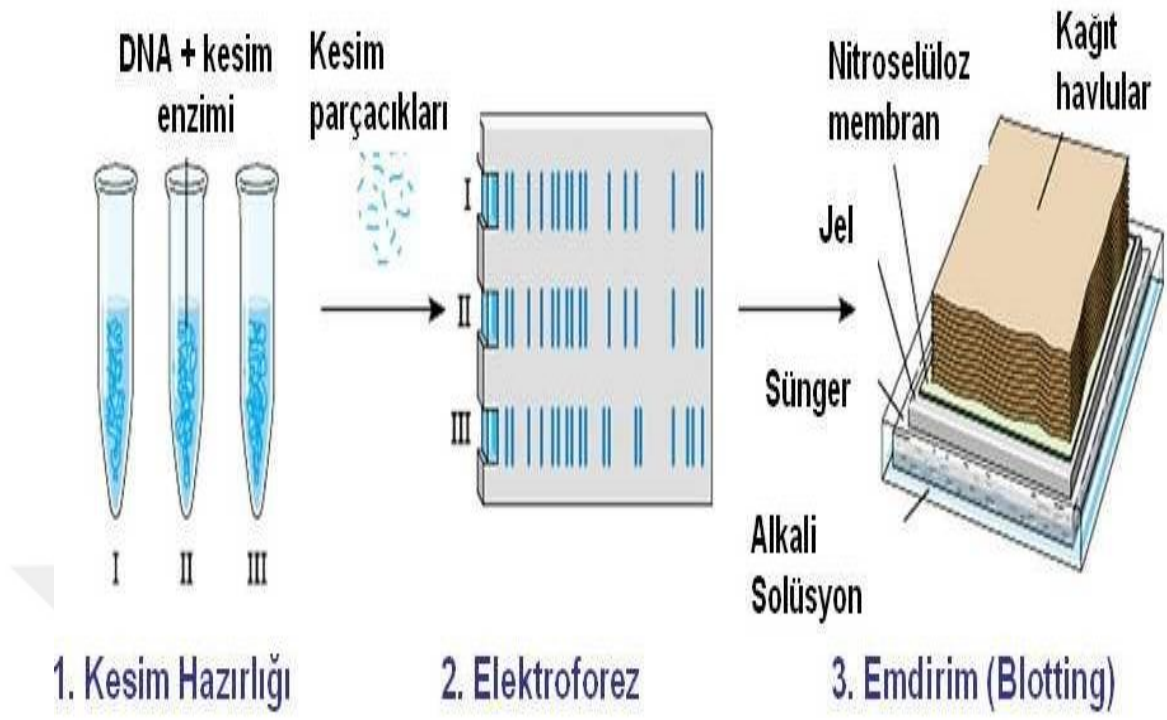
Nokta mutasyonlarının, DNA molekülüne farklı şekillerde etki etmesi sonucunda farklı uzunluklara sahip DNA parçacıkları oluşur. Elektroforez, melezleme ve görüntüleme gibi işlemlerinden sonra da bu uzunluk farkları belirlenebilir (Southern 1975).

RFLP tekniğinde, önce saflaştırılan DNA molekülü, özel enzimlerle kesilir. Bu enzimler DNA molekülündeki belirli dizgeleri tanır ve o noktadan keser, böylece farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilir. Ortaya çıkan çok sayıdaki parçacık genellikle agaroz jel elektroforez tekniğiyle ayrıştırılır. Amaçlanan parçacıklarının belirlenebilmesi için melezlemeye de ihtiyaç duyulabilir. Jeldeki bazı sorunlardan dolayı melezlemenin başka bir yerde yapılması gerekebilir. Bu amaçla, agaroz jeldeki parçacıklar, daha istikrarlı olan, nitroselüloz veya naylon bir destek ortamına aktarılır.



Southern (1975) isimli araştırmacının bulguladığı ve kendi adıyla anılan DNA aktarım tekniğinde (Şekil 2.1) nce agaroz jel bir zeltide denatüre edilir ve böylelikle tek eksene sahip bir parçacık seti elde edilir. Tamponlayıcı zeltinin etkisi sayesinde jeldeki tüm parçacıklar tek eksenli olarak zara aktarılması ve oluşan bant kalıpları zara geçmesini sağlayacak ilave unsurlar kullanılır.

Sonraki aşamada, hedeflenen parçacıkları taşıyan zara, bu parçacıklarla tamamlayıcı niteliğe sahip, kısa, tek eksenli bir DNA molekülü olan bir sonda (probe) aracılığıyla iŐleme alınır. Değişik türlerden alınan DNA moleküllerinin parçalanmıŐ halini içeren vektörlerden oluşan derlemeler yardımıyla sondalar hazırlanabilir. Bunlar çeşitli bakterilere aktarılır ve içerdikleri DNA parçacıkları çoğaltılır. DNA sondaları ayrıca, melezleme sonrasında görüntüleme yapabilmek amacıyla, tek eksenli hale dönüŐtürülerek herhangi bir etiketleme tekniğiyle (rneğin radyoaktif izotop) etiketlenebilir.



Şekil 1.2 “Southern blot” emdirim yöntemiyle melezleme temelli RFLP analizi

Sonda sırasında DNA parçacıklarına, genellikle [<sup>32</sup>P] nükleozidleriyle uç etiketlenmesi işlemi uygulanır. DNA sondaları aşağıdaki kaynaklardan elde edilebilir:

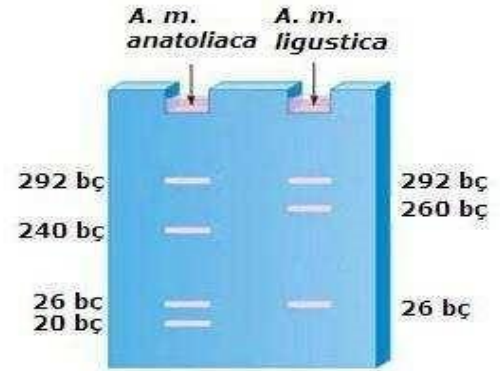
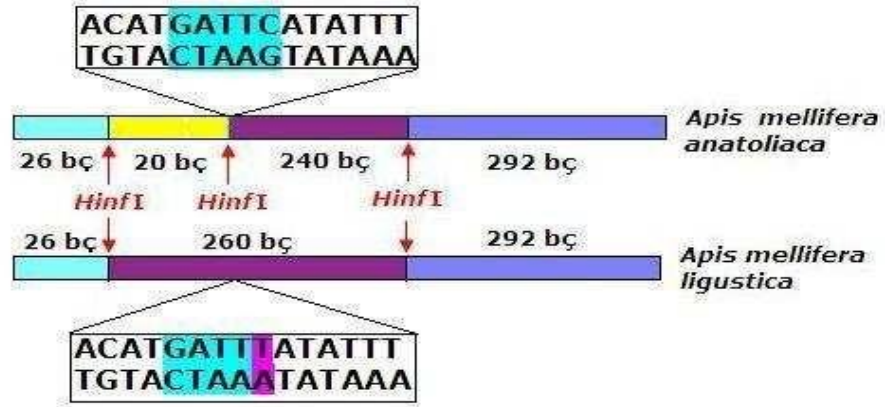
Genomik derlemeler: Genomik DNA özel enzimlerle kesilir ve her parçacık kopyalanır. Yapılan derlemelerden uygun olduğu tespit edilenler sonda olarak belirlenir.

- a) Sonda seçiminde sitoplazmik DNA derlemelerinden yararlanılabilir.
- b) Tamamlayıcı derlemeler: Yalıtım yapılarak enzim yardımıyla katalizlenme yapılır. Elde edilen molekülden sonda olarak yararlanılabilir.

Çift eksenli DNA parçacıkları elde edilmek üzere nitroselüloz veya naylon taşıyıcılara alınmış olan zardaki tek eksenli parçacıklar, sondalarla tamamlayıcı oldukları durumda hibridlenir ve radyoaktif olarak etiketlenir. (Beckman 1983).

#### **1.9.3.2.1.2 RFLP tekniği (PCR temelli)**

PCR temelli RFLP tekniğinde, olağan PCR işlemi aracılığıyla üzerindeki lokus çoğaltılır ve çeşitli özel enzimler kullanarak elde edilen PCR parçacığı kesilir. Bireyler arasındaki farklılıklar, kesim sonucunda ortaya çıkan parçacık kalıplarına ve kesim noktasının varlığı veya yokluğuna göre belirlenir (Şekil 2.2). Bu teknikte, bireyler arasında saptanan polimorfizmin nedeni, enzim tanıma konumunda oluşan bir nükleotidin eklenmesi, eksilmesi ya da değişmesi olarak beliren nokta mutasyonlardır.



Şekil 1.3 Kalıtsal farklılıkların PCR-RFLP tekniğiyle belirlenmesi

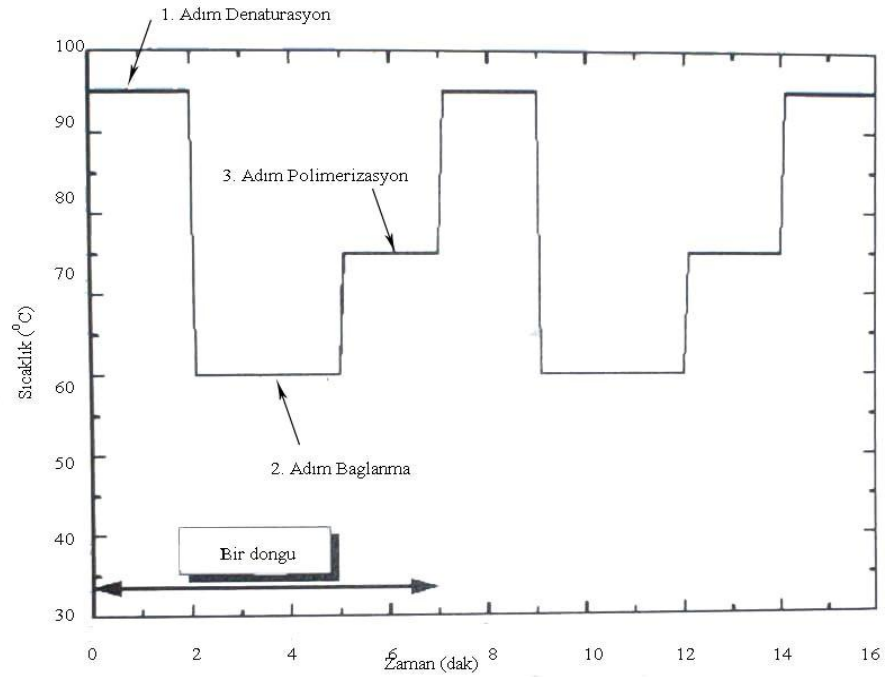
PCR RFLP tekniği eş baskın kalıtım kalıbına uygun belirteçler verir ve olağan PCR tepkimesindeki gibi uzun oligonükleotid öncüller kullanılması nedeniyle, hayli güvenilir bir biçimde çoğaltılabilir. Tekniğin eksik bir yönünün, çoğaltılmakta olan lokus ya da genle ilgili önceden bilgi edinmenin gerekliliği olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu lokuslar için özgül öncüllerin hazırlanması da, zaman ve masraf gerektirir. Yine maliyeti arttıracak öğeler, kullanılacak olan kesim enzimleridir (Botstein *vd.* 1980; Hall 1998; Vicente ve Fulton 2004).

### 1.9.3.3 PCR temelli DNA belirteçleri

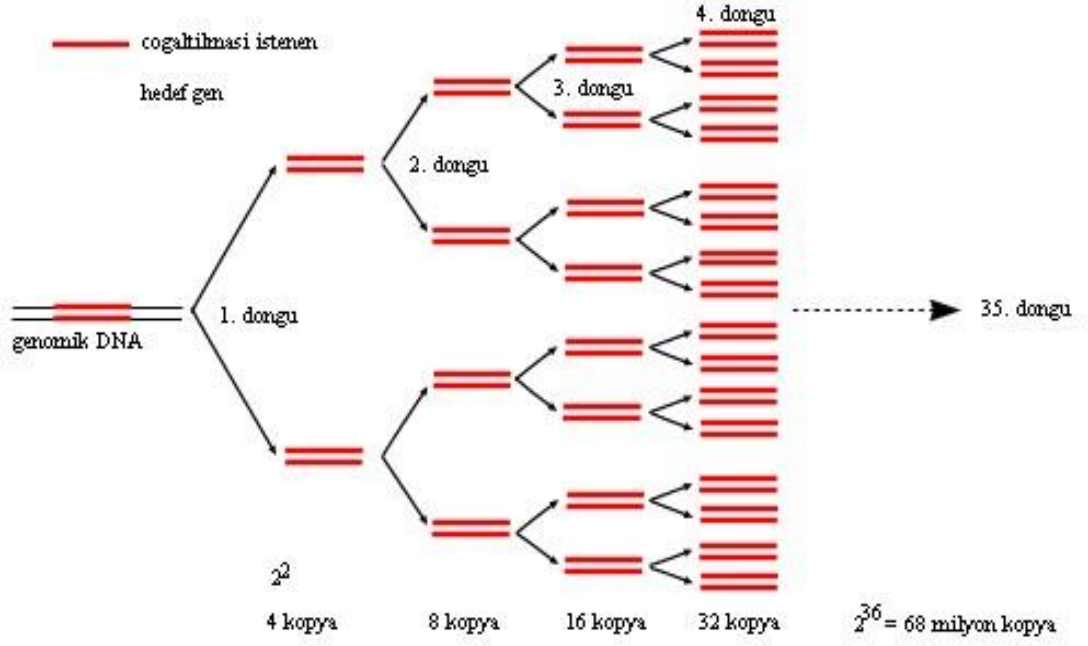
PCR (Polimeraz Zincirleme Tepkime), hücrede normal koşullarda gerçekleşebilen doğal DNA kopyalamanın, laboratuvar ortamında, ısıl döngüleyici özel aparatlar aracılığıyla gerçekleşmesini sağlar. Kalıp DNA'yla uyumlu olarak çoğalan nükleik asit dizgelerinde

eşleme ve çoğaltmanın hızlı olması nedeniyle çok az miktardaki bir parçadan bile çok sayıda parça elde edilebilmektedir. (Şekil 2.3, Şekil 2.4, Tablo 2.5).

Son derece süratli, basit ve yalın bir metod olması sebebiyle geniş spektrumlu olarak birçok dalda uygulanan PCR tekniği, moleküler biyolojinin hızla gelişmesinde önemli rol oynamıştır (Kumar 1989).



Şekil 1.4 PCR'nin çalışma ilkesi



Şekil 1.5 PCR sonucunda DNA miktarı

Çizelge 1.6 PCR çoğaltımı sonucundaki sayılar (Watson vd, 1992)

Döngü	Molekülü Sayısı	Döngü	Molekülü Sayısı	Döngü	Molekülü Sayısı
1	2	11	2048	21	2. 97152
2	4	12	4096	22	4. 94304
3	8	13	8192	23	8.388608
4	16	14	16384	24	16.777.216
5	32	15	32768	25	33.544.432
6	64	16	65536	26	67.108.864
7	128	17	131072	27	134.217.728
8	256	18	262144	28	268.435.456
9	512	19	524288	29	536.870.912
10	1024	20	1.048576	30	1.073.741.824

PCR tekniği küçük miktarlardaki kalıp olarak alınan DNA'nın laboratuvar şartlarında belirli bölgelerinin çok fazla çoaltılabilmesi ile jel geçirildikten sonra boyanarak görüntülenebilmesidir. PCR tekniğinde kalıp DNA ile beraber kullanılan nükleotid karışım (dNTPs), bir veya iki adet oligonükleotid öncül, DNA polimeraz enzim, tampon

çözültüsü ve MgCl<sub>2</sub> içerir. Uygulamada kullanılacak kalıp DNA, araştırma konusu organizmalardan alınır. *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı günümüzde PCR yönteminde yaygınlıkla kullanılan enzimdir.

DNA çoğaltımında hedef yoğunluğu, öncül, polimeraz miktarı, nitelik ve tavlama ısısı ve benzer ısı döngüleyici koşulları etkin rol oynar. Bu nedenle, moleküler yöntemlerden herhangi birisiyle çalışmaya başlamadan önce, kritik koşullar en uygun hale getirilmelidir.

PCR işlemleri peş peşe yinelenen üç aşamadan oluşur;

- Çoğaltılması planlanan DNA'nın yüksek ısılarda denatürasyonu, işlem sonucu olarak tek iplikçikli polinükleotid zincirinin elde edilmesi,
- Öncüllerin ;
- Elde edilen tek zincirli DNA molekülündeki hedeflenen bölgelere eklenmesi,
- Enzim marifetiyle yeniden çift zincirli DNA elde edilecek şekilde uzatılması,

Bu üç aşama döngünün unsurlarıdır ve bu döngü 2560 defa tekrarlanır

Tatbik Sahası:

1. DNA baz dizgelerinin belirlenmesi,
2. Kalıtsal ilişkilerin belirlenmesi,
3. Kalıtsal yapı değişikliklerinin belirlenmesi,
4. DNA klonlama,
5. Adli tıp.

*Thermus aquaticus* bakterisinden yalıtılarak arıtılan "Taq" polimerazı ilk ısı dengeli DNA polimerazıdır. Bu enzim yaklaşık 40 dakika civarındaki yarı ömrüyle G + C'ler bakımından zengin bazlara sahip hedef DNA'ların çoğaltımında etkindir. Bu enzim, aynı tepkime tüpünde farklı birkaç hedef dizgede eş zamanlı olarak çoğaltma sağlama özelliği bakımından oldukça kıymetlidir.

Son yıllarda yalıtılan birçok ısı dengeli enzim denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. *Thermococcus litoralis* adı verilen ve hidrotermal menfezlerde bulunan mikroorganizmadan menfez (vent) polimerazı, *Thermus thermophilus* öbakterisinden rTth DNA polimeraz ve enzimleri elde edilmiştir (Tablo 2.6). Bu ısı dengeli enzimlerin birbirine ve Taq polimerazına göre bazı üstünlükleri vardır. İşlem sırasında görülebilen yanlış dizge sorunu, ortama eklenen baz sayısını ve MgCl<sub>2</sub> iyon derişimini azaltarak çözülmeye çalışılmıştır. Vent polimerazın hataları düzeltme özelliği vardır ve ortamda çok dNTP ve MgCl<sub>2</sub> iyonu bulunduğu durumlarda, Taq polimerazdan daha iyi sonuç verir.

Çizelge 1.7 Polimeraz enzimler ve kaynakları

Polimeraz	Kaynağı	Doğallık Durumu
Taq	<i>T. aquaticus</i>	+
Amplitaq®	<i>T. aquaticus</i>	-
Amplitaq (Stoffel parçacık)®	<i>T. aquaticus</i>	-
Hot Tub™	<i>T. flavis</i>	+
Pyrostase™	<i>T. flavis</i>	-
Vent™	<i>T. litoralis</i>	-
Deep Vent™	<i>Pyrococcus GB-D</i>	-
Tth	<i>T. thermophilus</i>	-
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	+
ULTma™	<i>T. maritima</i>	-

TM: Ticari Marka R: Kayıtlı ve Tescilli Marka

Laboratuvarlarda PCR işlemlerinde polimeraz enziminin kullanılmaya başlanmasıyla, teknolojik olarak deneylere son derece katkı sağlanmıştır. Daha önce kullanılan *Escherichia coli* bakterisinin DNA polimeraz I enzimi aracılığıyla ürettiği Klenow parçacığının ısıya dayanıklı olmaması nedeniyle, her yeni döngüde enzim eklemek gerekli oluyordu. Oysa günümüzde kullanılan ısı dengeli DNA polimerazlar sayesinde



bu sorun giderilmiş olduğu için, çoğaltımın başlarında enzimin tüplere koyulması yeterlidir.

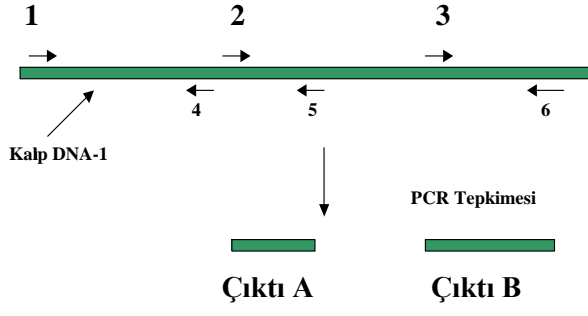
Polimeraz zincirleme tepkimesiyle istenen genler veya DNA dizgelerinin yaklaşık 30 döngünün sonucunda milyarlarca kez yinelenmiş olur. PCR tekniği DNA'ya dayalı belirteçleri geliştirmenin temelini oluşturur (Mullis *vd.* 1986). Bugün uygulama ve temel ilkeleri açısından çok farklı PCR belirteçler bitki ıslah araştırmalarında yaygınlıkla kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibidir:

- CAPS – Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
- AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism
- SSR – Simple Sequence Repeats (Basit Dizge Yinelemeleri)
- SCAR – Sequence Characterized Amplified Region
- RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

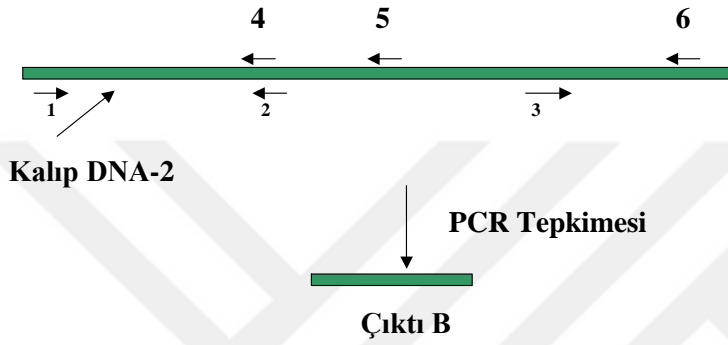
#### **1.9.3.3.1 RAPD–Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA**

RAPD, Polimeraz Zincirleme Tepkime (PCR) üstünde temellenen, rastgele seçilmiş öncüllerin kullanıldığı bir teknik olarak 1990 yılında tasarlanmıştır (Williams *vd.* 1990). Aynı yıllarda aynı yöntemi uygulayan başka bir ekip buna AP-PCR (İsteğe Bağlı Öncülenmiş PCR – Arbitrarily Primed PCR) ismini vermiştir (Welsh ve McClelland, 1990).

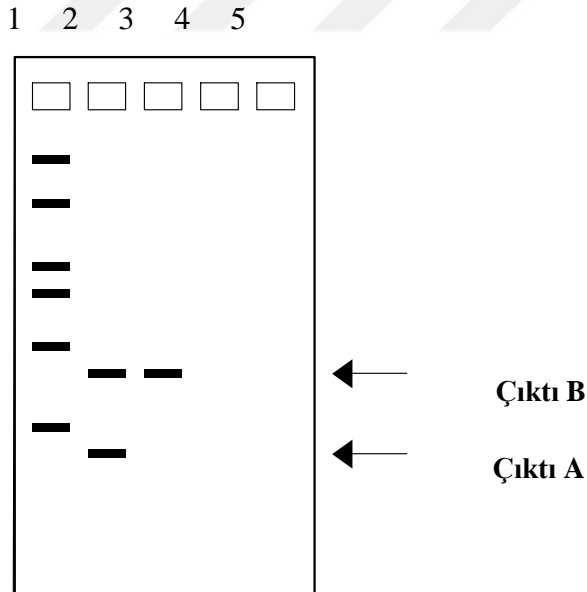
### Tepkime 1



### Tepkime 2



Şekil 1.6 RAPD tepkimesinin şematik gösterimi



1. DNA Standardı
2. Tepkime 1
3. Tepkime 2
4. ve 5. Örnek yüklenmemiş kuyular

Şekil 1.7 Tepkime 1 ve 2'nin agaroz jel görüntüsü

Tepkimelerde, öncül olarak bir ve kalıp olarak iki adetten istifade edilmiştir.

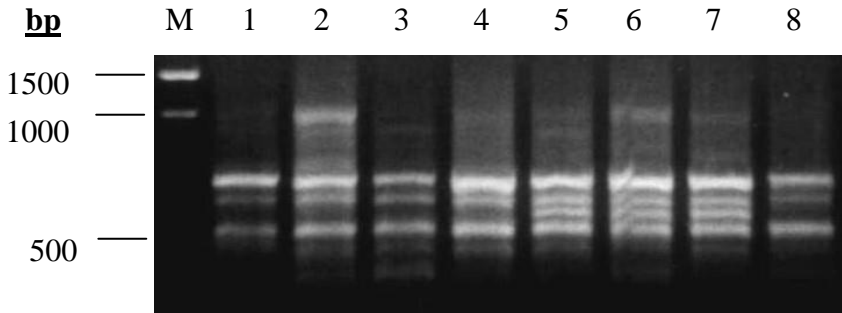
- İşaretler, tepkimeye katılan dizgeye ilişkin öncülün çoğaltımıdır.
- İşaretin istikamet, bireşim istikametini belirler.
- Öncüllerin bağlanma bölgelerini göstermek üzere sayılardan yararlanılmıştır.

1. Tepkimelerde, 2 ile 5'e bağlanan öncüller arasındaki DNA dizgesinin çoğaltımıyla çıktı A; 3 ve 6 konumlarına irtibatlandırılan öncüller arasındaki DNA dizgesinin çoğaltımıyla çıktı B elde edilmektedir.

2. 3 ile 6 arasındaki bölgedeki DNA dizgesinin çoğaltımıyla çıktı B elde edilmektedir.

Tepkime bir ile ikiye bağlanan öncüllerin hepsinden bant elde edilemeyebilir. Oluşturabilen bantlar, agaroz jelde görüntülenir.

RAPD yöntemiyle elde edilen çoğaltılmış ürün, radyoaktif olmayan standart jel elektroforeze alınır, ardından bantlar halindeki çoğaltma ürünleri gözlemlenerek incelenir. Sonuçlar bantların varlık ya da yokluğuna göre değerlendirilir (Williams *vd.* 1990; Welsh ve McClelland 1990). Şekil 1.8'deki fotoğrafta örnek bir agaroz jelde görülen RAPD bant profilleri bulunmaktadır.



Şekil 1.8 Farklı kaya kekiği (Satureja) türlerine ait UBC-208 öncülünün RAPD-PZR jel fotoğrafı (M: DNA Standardı) (Öz Aydın 2004)

İlk başlarda PCR temelli belirteçler, çift öncül kullanarak dizgesi bilinen DNA bölgelerini çoğaltmaya dayanıyordu. Sonraları dizilerin belirlenmesinde bazı sorunların ortaya çıkmasıyla, genom boyunca sınırlı bölgelerin dizgelerinin bilinmesi gibi çekinceler nedeniyle, oligonükleotid öncüllerden daha elverişli bir biçimde yararlanmak amacıyla RAPD yöntemi geliştirilmiştir (Williams *vd.* 1990).

Bu yöntemde rastgele seçilen öncül oligonükleotidlerin genomik DNA üzerinde, birbirine karşıt noktadaki tamamlayıcı bölgeleri belirlenir. Bu ayraç çoğaltılır ve bireyler arasındaki polimorfizm durumu incelenir. Diğer PCR uygulamalarında genellikle iki öncül uygulanırken, RAPD’de tek öncül kullanılır. PCR ürünlerine agaroz jel elektroforezi uygulanır (Welsh 1990).

RFLP’ye oranla daha ucuz ve hızlı bir teknik olmasının yanı sıra radyoaktivite gerekmeden ve asgari ölçüde DNA kullanarak uygulanabilmesi nedeniyle gen haritası oluşturma işlemlerinde de yaygınlıkla uygulanır (Grattapaglia *vd.* 1992; Paran ve Michelmore 1993, Hemmat *vd.* 1994; Malyshev ve Kartel 1997).

RAPD analizlerinin aşağıdaki üstünlükleri ve çekinceleri vardır:

RAPD Yönteminin Üstünlükleri:

- Süratli, ucuz ve az iş gücü gerektirir,
- Asgari ölçüde DNA yeterlidir,
- Polimorfizm oranı yüksek olduğu için otomasyona olanak verir.

RAPD Yönteminin Çekinceleri:

- Kısıtlı güvenilirliği,
- Farklı laboratuvarlarda farklı neticelere ulaşılabilir,
- Baskın belirteç verir ve böyle elde edilen belirteçler diğer haritalara transfer edilemez.

Yöntemin temel ilkeleri:

- PCR optimizasyonu sağlamak,
- Uygun öncül seçimi,
- Agaroz jelinde görüntülenen bantlar arasında güçlü olanları değerlendirmektir. Bu yöntem birçok farklı bitki örneğinde denenmiştir (Waugh ve Powell 1992; Ergül vd. 2002; Aras 2003).

Tekniğin üstünlükleri sayesinde birçok bitkinin kalıtsal yakınlıkları incelenmiştir, örneğin domates (Williams ve Clair, 1993), arpa (De Bustos *vd.* 1998), üzüm (Ergül *vd.* 2002), kuşburnu (Aras 2003) ve güllerde kalıtsal haritalama (Debener ve Mattiesch 1999), ladin (Arcade *vd.* 2000), çam (Costa *vd.* 2000).

RAPD yöntemi, DNA yalıtımı (özütleme) ve PCR olmak üzere başlıca iki aşama halinde uygulanır: DNA yalıtım (özütleme) aşaması; DNA belirteçleri ile yapılan her türlü işlemde olumlu bir sonuca ulaşabilmek için, malzemeden uygun nitelik ve nicelikte DNA yalıtım (özütleme) gerekir. Her birey için gereken özütleme tekniğinin özenle seçilmesi gerekir, çünkü malzemenin saflık derecesi bireyden bireye değişebilir. Örneğin malzeme polifenolik bileşikler ve polisakkaridler yönünden zenginse, saflaştırılmak daha zordur. Yeterince saf olarak özütlenememiş olan DNA, zamanla kaybolacaktır.

Murray ve Thompson (1980), Dellaporta *vd.* (1983), Doyle ve Doyle (1987), Lodhi *vd.* (1994), Kim *et al.*, (1997) ve Lefort *vd.* (1998) bitki DNA'sının özütlenmesi için en çok kullanılan yöntemleri sunmuşlardır.

PCR aşaması ; Genomik DNA, PCR tekniğinde tüpte çoğaltılır. Bu çoğaltma işlemi için PCR yöntemiyle, öncül, DNA polimeraz enzimi, dNTP karışımı, MgCl<sub>2</sub> ve uygun bir tampon çözelti aracılığıyla genomik DNA çoğaltılır. Öncülün genomik DNA üzerindeki tamamlayıcı bölgeyi bulabilmesi için, elverişli bir bağlanma sıcaklığı gerekir. Bir sonraki öncülün bağlandığı noktaya kadar DNA bireşimi sürer. Bu yolla, öncüllerin bağlandığı genomik DNA parçası çoğaltılmış olur. Polimorfizmler; çoğaltma bantlarının varlığı ya da yokluğuna göre belirlenir, bunun anlamı, RAPD bantlarının baskın olmasıdır. DNA

sondaları ya da dizgesin bilinmesi, öncüllerin seçiminde ya da tasarımında gerekli değildir. Çoğaltım rastgele olur. Melezleme olmadığı için herhangi bir emdirim işlemi, ayrıca radyoaktif madde kullanımı da gerekmez. Hızlı ve pratik bir yöntemdir, ancak RAPD yönteminin rastgeleliği, yöntemin yinelenbilmesini zorlaştırır. Bu nedenle olabildiği ölçüde koşulları değiştirmeden yinelemek gerekir.

RAPD belirteçlerle polimorfizmi gösteren bantların belirlenmesi amacıyla PCR uygulamak için gerekli her parametre, çok iyi optimize edilmelidir. Optimizasyon işlemleri, bitki türüne göre büyük farklar gösterebilir.

Öncül ağlanma bölgelerinde moleküler yapı; RAPD'de kullanılan öncül, kullanılan bazı PCR uygulamalarının tersine, yalnızca bir tek tiptir. Bu öncül genellikle 9 ila 10 baz uzunluğundadır ve rastgele seçilir. PCR sırasında öncülün genomik DNA'da karşıt iplikçiklerde yaklaşık 200 bp uzaklıktaki iki noktada tamamlayıcısını bulması ile gerçekleşir (Tingey *vd.* 1992).

Uygun PCR döngülerinin oluşturulması; bir PCR döngüsü, şu aşamalardan geçer: DNA çift sarmalının ayrılması (denatürasyon), öncüllerin bağlanması (annealing, primer binding), yeni DNA iplikçığının biresimi (extension). Öncüller rastgele olduğu için bağlanma sıcaklığının ( $T_m$ ) belirlenmesi son derece kritiktir. Bu sıcaklığı, öncülün uzunluğu, GC içeriği ve enzimle bir arada uygulanan tampon çözeltinin tuz yoğunluğu etkiler (Yu *vd.* 1993).

Çoğaltım koşullarının belirlenmesi; tekniğin bu en önemli aşamasında, diğer belirteçlerin uygulanması açısından da PCR yönteminin anlaşılması önemlidir. Bu da, çoğaltımın gerçekleştiği kalıp DNA başta olmak üzere, kullanılan öğelerden her birinin (DNA polimeraz (Taq polimeraz ve tampon çözelti oranları, deoksिनुकлеотид trifosfat (dNTP), magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ), öncül) bitki türü ve çalışma koşullarına göre en uygun değerlerde belirlenmeli ve PCR uygulamalarında sıklıkla ortaya çıkan bulaşma sorununun önlenmesi için, her uygulamada denetim (negatif denetim) gerçekleştirilmelidir (Ergül 2000).

Yüksek yoğunluklarda DNA, çoğaltım ürünlerinde bantların birbiri üzerinde denk gelerek “smear” adı verilen bulanık bir görüntü vermelerine neden olurken, düşük yoğunluklar da sonuçların yinelenebilirliğini engeller.

Öncül yoğunluğu da DNA yoğunluğuna benzer bir etki yapar; yüksek yoğunluklarda “smear” olmuş bantlar görünür, düşük yoğunluklarda ise bantların çoğaltım oranı azalır. En uygun değerlerin üzerindeki yoğunluklarda  $MgCl_2$  bantlar arasında farklı çoğaltım düzeylerine neden olur, dNTP ise özellikle düşük yoğunluklarda bant parlaklıklarını düşürür. DNA polimeraz uygulaması ise, diğer bileşen oranlarına uygun biçimde belirlenmelidir (Welsh ve McClelland 1990; Weeden *vd.* 1992; Ellsworth *vd.* 1993; Levi *vd.* 1993, Muralidharan ve Wakeland 1993).

Öncül dizgelerinin belirlenmesi; RAPD yöntemi, öncül dizgelerinin belirlenmesi yönünden diğer PCR belirteçlere göre daha duyarlıdır. Uygulanan öncüllerin uzunluğu 9 ila 10 baz olmakla beraber, polimorfizm oranını çoğaltmak amacıyla kullanılan ve RAPD ile aynı prosedür aşamalarında gerçekleştirilen belirteçlerde, 5 ila 8 baz uzunluğunda kısa öncüllerin (Caetano-Anolles *vd.* 1991), ya da değişik haritalama ve parmak izi analizlerinde, 17 ila 24 baz uzunluğunda (Ye *vd.* 1996) öncüllerin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Bu yöntemde G+C içeriğinin %50 ila 80 olması, 6 bazdan daha uzun palindromik dizge içermemeleri ve öncülün ucunun tamamlayıcı olmaması en önemli öğelerdir (Williams *vd.* 1993).

Genom büyüklüğü ve çoğaltım ürünlerinin oranı; bir öncülün bağlanma bölgeleri ve bunların çoğaltımı, “genom tümleşigi” olarak adlandırılan genom büyüklüğü ve yinelenme bölgelerinin çokluğuyla doğru orantılı düşünülür ve daha karmaşık genomların, daha çok sayıda RAPD parçacığı oluşturması beklenir. Ancak araştırmalarda elde edilen sonuçlar, çoğaltılan parçacık adedini, genom büyüklüğünden bağımsız bir biçimde, öncül bağlanma bölgelerinin PCR tepkimesinde birbiri ile yarıştığını göstermektedir (Grattapaglia *vd.* 1992).

RAPD belirteçlerinin yinelenebilirliği; RAPD yönteminin en önemli üstünlüğü, genom analizlerinde rastgele öncüllerin kullanılmasıdır. Ancak hem rastgele öncül kullanılması,

hem de PCR aşamalarının fazlasıyla duyarlı olması, yöntem sonuçlarının yinelenebilirliği konusunda araştırmaları öne çıkarır. Birçok araştırmacı farklı ögeleri hem bir arada, hem de tek başına değerlendirmiş, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası çalışmalar aracılığıyla bu teknik bu açıdan araştırılmıştır. Yöntemin uygulanmasındaki asıl ilke; uygun bir optimizasyon koşulunun belirlenip, buna uygun öncülleri seçmek ve sonuç değerlendirmelerinde çoğaltımı iyi gerçekleşen bantları değerlendirmektir (güçlü bantları seçip zayıf bantları değerlendirme dışı bırakarak).

Sonuçların yinelenebilirliğiyle ilgili çalışmalarda, bu temel ilke hesaba katılır ve araştırmacıların tümü optimizasyonlarında, RAPD sonuçlarının yinelenebilirliğini çok iyi ya da kusursuz olarak değerlendirirler (Levi *vd.* 1993, Meunier ve Griment 1993, Colins ve Symons 1993, Ye *vd.* 1998). Optimizasyonda yapılan değişikliğin sonuçları, yinelenebilirliğinin araştırma konularını oluşturur. Bunlar da genellikle aşağıdaki 3 gruba ayrılır:

- Tepkime karışımları,
- Farklı polimeraz zincir tepkimesi aygıtları,
- Bant okumalarının yapıldığı ve değerlendirildiği jel ortamlar.

Tepkime karışımlarında, DNA özütlemenin yinelenmesi ve değişik ölçülerdeki etkisinin yanı sıra, farklı ticari DNA polimerazların etkileri de araştırılmıştır. Weeden *vd.* (1992), Ye *vd.* (1998) ve Vidal *vd.* (1999), özütlemenin yinelenmesini ve değişik DNA miktarlarının etkilerinin sonuçlar üzerinde önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Meunier ve Griment'in (1993) aynı optimizasyon koşullarında, kullanılan aygıtların da yinelenebilirliği büyük ölçüde etkilediğini bildirmelerine karşılık, Ye *vd.* (1998) öncül/genotip birleşimlerinin farklı aygıtlarda aynı çoğaltım ürünlerini verdiğini belirtmişlerdir.

Bant okuma ve jel ortamlarının yinelenebilirlik üzerindeki etkisi birçok yönüyle incelenmiştir. Weeden *vd.* (1992), bant okumalarında hata oranının %2 ila 7 olduğunu ve



zayıf bantlar değerlendirmeye alındığı takdirde, bu oranın yükselebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca agaroz jel elektroforezi yerine, daha yüksek çözünürlüklü DGGE

– Denatüre Gradyan Jel Elektroforezi (Denatured Gradient Gel Electrophoresis) ya da TSGE – Isı Taramalı Jel Elektroforezi (Temperature Sweep Gel Electrophoresis) kullanıldığında, bant okumalarının kolaylaşacağı bildirilmiştir (Penner *vd.* 1996).

#### **1.9.3.3.1.1 RAPD tekniğinin üstünlükleri ve diğer moleküler belirteçler ile karşılaştırılması**

RAPD, basit ve hızlı bir yöntemdir, çünkü ön bilgi gerektirmez, küçük ölçülerde DNA ile çalışabilir ve değerlendirme aşamasında radyoaktif madde kullanımı gerektirmez. Başka yöntemlere göre üst düzeyde polimorfizm göstermesine karşın, ekonomik yönden de üstündür (Robinson ve Harris 1999).

RAPD tekniğinde karşılaşılan sorunlardan biri, bazı durumlarda öncülün yanlış bağlanması sonucunda istenmeyen bantlar oluşmasıdır (Andersen, 2000). RAPD uygulamalarının hatasız bir biçimde yapılabilmesi için, DNA'nın saf olması, MgCl<sub>2</sub> yoğunluğu, bağlanma ısısı, öncül seçimi, kullanılan DNA polimerazlar ve uygun koşullarının sağlanması PCR için son derece önemlidir, çünkü bunların sağlanması sırasında oluşabilecek karışıklıklar, istenmeyen bantların ortaya çıkmasına neden olabilir. Bazen RAPD sonuçlarında kalıp DNA ve öncülün hatalı eşleşmesine karşın bantlar görülebilmektedir. Bazen de, bireyden DNA yalıtılması sırasında bitkide bulunan simbiyotik organizmalardan ve parazitlerden DNA bulaşması nedeniyle normal olmayan RAPD bantları görülebilir (Wolfe ve Liston, 1998), RAPD belirteçleri uzaktan akraba olan bireylerin arasındaki kalıtsal uzaklıklar da eksik değerlendirilebilir.

#### **1.9.3.3.1.2 RAPD yönteminin uygulama alanları**

RAPD yöntemi ucuz ve bir ölçüde basit olduğu için biyolojinin birçok alanında yaygınlıkla kullanılmaktadır.

Genotipik tanımlama; Wolfe ve Liston, (1997), konu üzerinde çalışanlarca, ondört adet dekamerlik RAPD yardımıyla polimorfizm düzeyi yüksek 14 adet dekamerlik, daha evvelden belirlenen desenler kullanılarak tanımlanamayan türve çeşirlerin ayrıştırılmasında başarılı olunmuştur. Bunu gözlemlemek üzere *Paeoniaia (p.)*'lar üzerine yapılan bir çalışmayla dört adet iki paeonia türünden alınan melez ile bir adet *p.lactiflora* 3 adet *p.lutea* ve 13 adet *p. Sufuticoza* kullanılarak RAPD uygulamaları yapılmıştır. Elde edilen bulgularla aynı anne babadan alınan üç adet melezden birinin diğer ikisinden ayrıştığı ve belirtilen ikisinin anne baba özelliklerine daha çok sahip oldukları anlaşılmıştır.

Hodkinson *vd.* (2000), kaltsal yapıları birbirine çok yakın bitkilerde genomu takip ederek tekrarlanma ile düzenlendiği yerlerde tanımlamaların yapılmasının mümkün olduğu belirtilmiştir.

Ulrich *vd.* (1998), rDNA ve SSR farklılıklarını kullanarak tanımlamalar çalışmalarda bulunmuşlardır. Ancak birçok bilim adamınca, AFLP ve RAPD bitki farklılıklarını belirlemede en fazla kullanılan tekniklerin olmuştur.

Çeşitlerin kesin olarak tanımlanması amacıyla kısa bir süre önce, DNA analizleri geliştirilmiştir. Polimeraz Zincirleme Tepkimede (PCR) kullanılan (Williams *vd.* 1990) RAPD analizlerinde, morfolojik karakterlerle ancak bir ölçüde tanımlama yapılabilmesine karşın, tanımlamalar bakımından son derece başarılı uygulanmıştır. (Goodier ve Davidson, 1993).

Gen haritaları oluşturma; kalıtsal haritalama çalışmalarında yaygınlıkla RFLP yöntemi kullanılır (Botstein *vd.* 1980). RFLP yönteminin uygulamasındaki uzun vakit alması radyoaktif ihtiyaçların karşılanmasındaki zorluklar, nitelik ve nicelik olarak iyi durumda DNA ihtiyacı gibi nedenlerden dolayı, nanogram ölçeklerde DNA gerektiren ve üretilen parçacıkların doğrudan görüntülenebildiği PCR yöntemlerine ağırlık verilmiştir. PCR her ne kadar minisatelitler, makrosatelitler ve STS (Dizge Etiketli Konum – Sequence Tagged Site) lokusları aracılığıyla, kalıtsal haritalamaya olanak verse de, seçici öncül tasarımı için başlangıç baz dizgesi bilgisi gerektirmesi, çok miktarda yapılabilmesinde

kısıtlayıcı etkisi vardır. (Mori *vd.* 1993, Wolff ve Van-Rijin 1993, Villordon ve LaBonte, 1995).

PCR analizlerinde başlangıç DNA dizgesi bilgisinin gereksinimi, DNA parçalarını çoğaltmada kullanılan rasgele dizgeler, yani RAPD aracılığıyla iptal edilmiştir. Birçok bitkide RAPD ile, süratle haritalama yapılabilmiştir. Haritalama çalışmalarının çekincelerinden birisi, RAPD belirteçlerinin baskın karakterli olmasıdır.

Tekniğin bir başka üstünlüğü, jel üzerindeki bantlarının yalıtılmasıyla, melezleme sondalarının elde edilebilmesidir. Ancak bazı polimorfik RAPD bantlarının yinelenen DNA sıralarıyla eşleşmeleri (hibridizasyonu) nedeniyle RFLP sondası olarak kullanımı elverişli değildir (Williams *vd.* 1990, 1993).

Bir özelliğe ilişkin kalıtsal belirteçlerin geliştirilmesi; genomda haritala oluşturma gereği olmadan, istenen bir özelliğe (morfolojik, fizyolojik ya da biyokimyasal) ilişkin belirteçlerin tanımlanması, RAPD yönteminin en yaygın uygulamalarından biridir. Martin *vd.* (1991), bir özelliğe ilişkin olan DNA bölümlerinin yalıtılmasına kullanılabilen, yöntemi esas alan bir prosedür geliştirmişlerdir.

Çok sayıda melezlemeyle yapılmasıyla uzun zaman alması bu yöntemin en önemli sınırlayıcısı özelliğidir. Doğal olarak bir takım belirteçler ilgilenilen bölgeye ilişkin değildir ama donörün bölgeleri istenen bölgelerle alakalı olabilir. (Michelmore *vd.* 1991)

RAPD-temelli bir başka yöntem, Michelmore *vd.* (1991) tarafından tanımlanan Bulk Segregant (Toplu Ayırma) analizidir. Bu analiz ile tam bağı bulunmayan belirteçler için bir havuz oluşturulmuştur. Birleştirilmiş DNA'ların aranan özellikleri taşıyanlarla taşımayanlar arasında yapılan mukayeseye istinat ettirilen yöntemle kalıtsal bağdan yararlanılarak yepyeni bir havuz oluşturulur.

Belirteçlerin kalıtsal bağından yararlanarak yeni bir gen havuzu oluşturulur. Bu yöntem, hastalık dayanım genleriyle bağlı RAPD belirteçlerini tanımlamak amacıyla marul (Tingey ve del Tufo, 1993). ve arpada (Barua *vd.* 1993) başarıyla kullanılmıştır.

Havuz stratejisi ayrıca fcinsiyete bağlı RAPD belirteçlerinin tanımlanmasında da yararlı olmuştur. Genlerin izlenebilme etkinliğini, yakın izogenik hatların DNA havuzundaki RAPD analizleri çok arttırmıştır (Barua vd. 1993).

Nüfus ve evrim genetiği; DNA yöntemlerinin üstünlükleri, biyolojinin birçok sorununu çözmekte büyük etkiye sahiptirler. Genotip sıklığının ve alellerin tam bir değerlendirmesi yapılabilmesi için çok sayıda örnek gerekmesi, DNA yöntemlerinin nüfus genetiği çalışmalarında uygulanmasını kısıtlamaktadır. Nispeten yüksek giderlerin yanı sıra karmaşık aygıtlar, eğitilmiş personel ve uzun zaman gereksinimi, nüfus genetiği çalışmalarını kısıtlayan diğer öğelerdir. Nüfus genetiği çalışmalarında RAPD yönteminin dolaysızlığı ve DNA düzeyindeki kalıtsal farklılıkları ortaya çıkarma hızı büyük önem taşır (Hedrick, 1992).

Alloenzim ve RFLP gibi eş-baskın belirteçlerle elde edilebilen gen sıklığına nazaran RAPD belirteçlerinde nüfus genetiği çalışmalarında daha az bilgi elde edilebilir, çünkü ıslah edilmiş çeşitlerin baskın karakterlidir. Bu da RAPD belirteçlerinin kullanımındaki en önemli çekincedir. Alloenzim ve RFLP gibi eş-baskın belirteçlerle aynı düzeyde istatistik derece elde edebilmeleri nedeniyle RAPD belirteçlerinin için 2-10 kat daha çok örnekle çalışılması gerektiğini bildirmişlerdir. Lynch ve Milligan (1994), uyumlu bantlar arasındaki benzerlikler büyük bir önemi haiz olmakla birlikte değişik türler ya da kalıtsal yelpazesi geniş nüfuslardan edinilen örneklerde elde edilecek bilgilerin güvenilirliği azalır. (Arnold vd. 1991).

Cinsel yolla çoğalanlara göre kopyalanarak çoğaltılan organizmalarda RAPD belirteçlerinin kullanımı daha elverişlidir. Polimorfik bant desenleri cinsiyetsiz çoğalan bireyler arasındaki, klon tanımlamada kullanılır (Williams vd. 1990). Aynı şekilde melez nüfusların tanımlanmasında nüfusa özgü belirteçler kullanılır (Smith ve Williams, 1994; Allegrucci vd. 1995) AP-PCR aracılığıyla, hatlatı farklı olan mısır bitkisinde, başarılı bir biçimde tanımlanmışlardır (Welsh vd. 1991).

RFLP'ye dayanan yöntemlere nazaran; yeterli sayıda kalıtsal belirteç oluşturulmasına imkan vermesi sebebiyle, RAPD yöntemi haritalama için genomları karmaşık bitkiler

için daha faydalıdır. Çeşitli özelliklerin değişik genler tarafından idare ediliyor oluşu, iç-dış faktörlerden etkilenmesi nedeniyle maddi olarak engel oluşturmaktadır. Niceliksel özellikler olarak adlandırılan kimi özellikler, Niceliksel Özellik Lokuslarının (QTL – Quantitative Trait Locus), ifade edilmesi sonucunda ortaya çıkarlar. Uyarlama ve seçim programları çerçevesinde bu lokusların gözlenmesi için RAPD belirteçleri kullanılır. Türler arasındaki kalıtsal çeşitlemeyi belirleme yeteneği dikkate alınarak bitki türlerindeki melezleme ölçüsünü belirlemek amacıyla istemediğimiz nüfus içinde bulunan resesif alellerin görülme frekansını azaltmak üzere bu yöntemden faydalanılabilir. Bu belirteçler, maddi değeri olan direnç geliştirme v.b. gibi, sadece bir genle yapılabilen hususiyetlere ilişkindir.

Polimorfik RAPD belirteçleri, ticari hibridizasyon programlarında daha üstün olan SCAR (Dizge Karakterli Çoğaltılmış Bölge) belirteçlerine de dönüştürülebilir (Zabeau ve Vos 1993, Vos *vd.* 1995).

#### **1.9.3.3.2 AFLP: Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi**

AFL uygulamasında, iki endonükleaz enziminin tatbikiyle, sınırlama parçacıklarının özel bir alt grubunun çoğaltılmasıdır tekniğinin esas uygulama alanıdır Russel *vd.* (1997), Genoma ilişkin ön bilgi olmaksızın uygulanabilen ve aynı zamanda polimorfizm alabilme ihtimali bayağı çok olan bir yöntemdir. Alınan belirteçler gayet güvenilir ve bilgi verici özelliktedir. Bu yöntemle 50 ila 100 gibi büyük sayılarda çıktı elde edilmesi nedeniyle bunların analizlerinin bilgisayarlar yardımıyla yapılması gerekir. Ancak bu yöntemin en mühim zafiyeti, dominant belirteçler oluşturmasıdır. Kalıtsal haritalar elde edilirken belirteçler çoğunlukla kromozomların uç bölgelerinde toplanır. Bu da farklı alanlardaki analizleri zorlaştırır (Avisé, 2004).

AFLP tekniği, sınırlama enzimleriyle alınan parçacıklarının seçilerek artırılması prensibine dayanır. Random alanlarda belirteçler içeren artırım reaksiyonundan meydana gelir. Analizler, her örnekten çok sayıda çıktı alınacak şekilde sonlandırılır. AFLP analizleriyle saf ve saf olmayanların farklılıklarını ortaya koymaktadır.

Hodkinson vd. (2000), 18 arpa çeşidi üzerinde çeşitlemenin tesbiti için çeşitli yöntemler denemişlerdir. Polimorfizm belirlemek için her tip belirtecin başka etkisi tespit edilmiştir. RAPD ile en az, SSR ile az sonuçlara ulaşılmakla birlikte AFLP ve RFLP ile paralel neticeler alınmıştır.

Carolan (2002), kalıtsal benzeşim üzerine değişik gen havuzlarında adzuki fasulyesi ile yaptıkları bir denemede, 213 adet AFLP ve 56 adet RAPD bandının kalıtsal farklılığı belirlenmiştir. Polimorfik bantta her reaksiyonda ortalama değer olarak RAPD ile 3,1, AFLP 11,2 sayısına ulaşılmıştır. AFLP ile, RAPD'den daha nitelikli neticeler elde edilmiştir.

Ergül (2001) Bu usulde iki enzim ile DNA kesilir. Kesilen parçaların ucuna sentetik bir DNA eklenir. Eklenenin nükleotid dizilişi bilinmelidir. başlatıcı DNA'ların kullanımıyla Bu DNA'nın nükleotid dizilişini de taşıyan bir ölçüde özgül olan DNA'nın artırılması sağlanır. AFLP ile, RAPD'nin eksikliklerinin üstesinden gelmek amaçlanmıştır. İki aşamada gerçekleştirilir:

- I. Ön üretimde, dizgeden seçimle çoğaltma gerçekleştirilir.
- II. Asıl üretim aşamasında, elde edilen parçalar müteakip ikinci ve üçüncü nükleotidleri hedefleyen üretim yapılır.

AFLP aşamaları (Ergül 2001):

- Sınırlama enzimleriyle kesim yapılır,
- Uyarlayıcılara öncülle sınırlama parçacıklarının ön,-çoğaltımı gerçekleştirilir,
- Bu parçacıkların özel olarak oluşturulmuş ve radyoaktif işaret verilmiş öncüllerle asıl çoğaltımı ve poliakrilamid jel elektroforezde (PAGE) yürütülür.

Hodkinson vd. (2000), izlerin çoğaltılacak biçimde yapılması gerektiğini bildirmiştir. Yinelenebilir ve her yerde kullanılabilen bilişsel belirteçler sağlanır.

Carolan (2002), AFLP kullanarak kalıtsal çeşitlemeler araştırmıştır. Yenilenen bitkiler, morfolojik ve fitokimyasal anlamda ana bitkilerden farklar göstermişlerdir. Olgunlaşmış hatlardan gelişen bitkilerin kapsüllerinde *Papaver bracteatum*'daki baskın alkaloidlerden *tebain* bulunamamıştır. Bu nedenle kalıtsal tekdüzelik bozulmuştur. Onun yerine bulunan izotebain olağanlıkla *Papaver pseudoorientale*'de bulunur. Ancak laboratuvar ortamında yetiştirilen bitkiler *pseudoorientale*'e benzemektedirler. Fitokimya ve laboratuvar çalışmaları, kalıtsal tekdüzelik bozulmasının somaklonal çeşitlemeden değil, tohumdan kaynaklandığını göstermektedir. Bir yöntem olarak AFLP parmak izi çözümlemesinin, *oxytona* türlerini derlemek ve alloploidiyi belirlemeyi kolaylaştırdığı belirtilmiştir. AFLP, tahıllar ve diğer ürünlerde klonal çeşitlemeyi belirlemek için yaygınlıkla uygulanmaktadır (Mackill vd. 1996; Paul vd. 1997; Waugh vd. 1997; Hodgkinson vd. 2002). AFLP usulü Asya bambusunda uygulanmış (Liu, 1999), AFLP yönteminde kullanılan öncüllerin birleşimi aracılığıyla 253 polimorfik belirteç elde edilmiş ve bunlardan 145 adedinden netice alınmıştır. Analizde, bağlantı derecesinden kalıtsal yakınlıklar belirlenmiştir. Laboratuvar ortamında yetiştirilen bitkilerde, *p.pseudoorientale* hatlarıyla benzerlik görülmüştür. Her öncül setinden öncüller arasındaki yakınlık derecesi tespit edilmiştir. Bu yöntem, sınırlayıcı parçacıkların seçmeli çoğaltımı ilkesine dayanır. AFLP yöntemi aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. DNA'nın sınırlama enzimleriyle kesimi yapılır. Sonuç olarak sayıca çok parçacık ortaya çıkar ve uyarlayıcılar (25 ila 30 bp spesifik ds oligonükleotid uyarlayıcılar) kesilen DNA parçacıklarına bağlanır.
2. Sınırlama parçacığı grupları çoğaltılır.
3. Çoğaltılmış parçacıkların jel analizi yapılır.

Seçmeli çoğaltım, sınırlama parçacıklarına eklenerek uzayabilen ve yalnızca bu parçacıkları çoğaltabilen öncüller kullanarak gerçekleştirilir. Bu teknik, çok sayıda parçacığın özgül çoğaltımına olanak verir. Tipik olarak 50 ila 100 adet sınırlama parçacığının çoğaltılması ve denatüre poliakrilamid jelde belirlenmesi sağlanabilir (Vos vd. 1995; Liscum ve Oeller; 1995; Mohan vd. 1997).

Uyarlayıcılar genel olarak kısa segmanlı, sınırlama bölgesine tamamlayıcı iplikçiklidir. Sınırlama farklı uyarlayıcılar ve farklı parçacıklara bağlanabilecek farklı öncüller gerekir. Öncüller uyarlayıcı dizgelerine özgüdür (Liu, 1999).

AFLP belirteç yönteminde PCR ürünleri, floresan boya ya da radyoaktif maddelerle işaretlenerek belirlenebilir. Floresan boyalarla belirleme, radyoaktivite belirlemesine oranla göre daha duyarlıdır, bu nedenle DNA daha fazla seyreltilmelidir (Robinson ve Harris, 1999).

Bu tekniğin, bazı üstünlükleri vardır. Bu prosedürle çok sayıda polimorfizm alınabilir. Nitekim, akasya bitkisiyle yapılan çalışmada 20 adet RAPD öncülüyle 170 polimorfizm bulmuşlar, 3 adet öncülle 644 adet bant yapılmıştır. Ddizge bilgisine ihtiyaç duymaması ise AFLP tekniğinin diğer bir üstünlüğüdür (Meksem ve Kahl 2005; Lörz ve Wenzel 2004).

AFLP tekniği yüksek çözünürlükte haritalama niteliği sunar. Örneğin, Harushima v.d., 1998'de gerçekleştirdikleri araştırmada 2275 belirteç kullanarak 1521,6 cM'lik bir kalıtsal bağlantı haritası oluşturmuşlardır (Harushima vd. 1998). Bu yöntemde zaman ve maliyet verimliliği, yinelenebilirlik ve çözünürlük, başka belirteçlerle (allozimler, RAPD, RFLP, mikrosatelit) eşit ya da üstün düzeydedir. Ancak bu teknikte eş baskın belirteçler elde edilemez, elde edilen belirteçler baskın olur. AFLP'den sistematik, nüfus genetiği, DNA parmak izi faaliyetlerinde kullanılır (Rangwen vd. 1995; Ridout ve Donini, 1999).

AFLP Yönteminin Üstünlükleri:

- Eş zamanlı çok sayıda taramayı etkili bir biçimde gerçekleştirebildiği için kriminal analize çok uygundur,
- Sayıları diğer analiz çeşitlerine göre daha fazladır.
- DNA malumatına ihtiyaç göstermez,
- Oransal olarak poliformizmde iyidir.

Otomasyona da elverişlidir.



Çekinceleri:

- Dominant belirteçler üretir, ancak eş baskın belirteçler de verdiği bildirilmiştir.
- Farklı kalıtsal haritalar arası aktarımı güçtür.

#### **1.9.3.3.3 SSR: Basit dizge yineleme (Simple sequence repeat)**

Mikrosatelit ya da SSR'ler (Simple Sequence Repeat), kısa yineleme dizgeleridirler ve bazı canlılarda genoma göre değişkenlik gösterirler (Rangwen *vd.* 1995). Kalıtsal kimlik çalışmalarında, aralarındaki alel çeşitlemelerinin tekrarlama mutasyonları gibi husuları temel alan belirteçlere (Ridout ve Donini, 1999) göre önemli üstünlükler sağlarlar. Canlıların genomunda çok sık ve belirli sayılarda yinelenen DNA dizgeleri bulunur. Dizgelerin genomun neresinde bulunacağı ve kaç kez yinleneceği, türden türe farklılık gösterir. SSR yöntemi, aynı tür içerisindeki bireyler arasında da bu dizgelerin bulunup bulunmadığını temel alır. Yinelenen bölgelere özgü öncüller geliştirilir ve bu öncüller aracılığıyla PCR uygulanır. PCR ürünleri, elektroforez sonrasında etidyum bromür ya da gümüş nitrat kullanarak boyandıktan sonra polimorfizm aranır. Yöntemin en önemli üstünlüğü eş baskın yapı göstermesi ve yinelenebilir olması, çekincesi ise genom bilgisi ve dizge analizi gerektirmesidir (Litt ve Luty 1989; Weber ve May 1989) SSR öncüllerinin üretiminde çoğunlukla 3 değişik yaklaşım bulunur:

1. Derlemelerin oligonükleotidlerin melezlenmesi aracılığıyla tanımlanması,
2. SSR'lerin incelenmesi,
3. Spesifik öncüllerin yakınlardan seçilerek kullanılması,

Tekrarlanan bir dizge kopyalanır, bu yinelen dizgeyi saran nükleotidler belirlenir ve buna uygun öncüller üretilir. 11 ila 60 bazlık yinelemelere VNTR (Variable Number Tandem Repeat – Değişken Sayıda Ardışık Yineleme) adı da verilir. Basit dizi yinelemeleri eş baskın belirteçlerdir ve her lokusta çok sayıda alel vardır.

SSR yöntemiyle bitkilerde birçok tür için önem taşıyan belirteçlerin başarıyla yalıtılması ve uygulanması başlamıştır.

SSR'lerin nitelendirmesi, yakın zamanda üzüm (Thomas ve Scott 1993) gibi bahçe bitkileri türlerinde ve meşe (Dow *vd.* 1995), okaliptüs (Byrne *vd.* 1996) ve benzeri orman ağaçlarında yapılmıştır.

Belirteçler 1-4 kez yinelenen ögeleri içerir (Weber ve Wong, 1993). Belirtilen alanlara mikrosatelit adı verilir (Weising *vd.* 1996) ve ferdi şekilde artarlar.

Yamamoto *vd.* (2001) SSR analizi kullanarak, *P.vaginatam*'un 46 ekotürüyle polimorfizmleri belirlemişlerdir. Mikrosatelit lokusunda oluşan değişik bir alelin, yinelenen nükleotid sayısında ve yinelenen bölgenin uzunluğunda değişimin farklı alelleri netice vermiştir.

Lui *vd.* (1995), lokusların özellikle tek bir lokusu temsil edecek biçimde düzenlenmiş olmasından dolayı, analitik yönden basit olduğunu bildirmiştir. Genom boyunca homojen olarak dağılmıştır. Bu belirteçler, PCR-temelli belirteçler oldukları için, az miktarda DNA yeterli olur. Her SSR lokusunu bir çift öncül tanımlar, bu sayede laboratuvarlar arasında öncül değişimi basittir (Gianfranceschi *vd.* 1998). Bu öncüller, tür içinde ve türler arasında uygulanabilir. Örneğin, bazı bitkilerde türler arası çoğaltım başarıyla gerçekleştirilmiştir. Belirteçler, genotipleri ferdi olarak türlerde belirler (Braaten *v. d.*).

Yineleme tiplerine göre sınıflandırıldığında SSR yinelemeleri, örge dizilişlerine göre 4 farklı gruba ayrılır.

- 1- Hatasız yineleme
- 2- Bileşik yineleme
- 3- Hatalı yineleme
- 4- Karmaşık yineleme

Mikrosatelit kalıtsal farklılıklar, farklı yinelemelerle alelleri şart koşar. Mikrosatelit oranının, her kuşakta  $10^{-2}$  -  $10^{-4}$  arasında arttığını ve mikrosatelit yinelenmelerinde gözlemlendiği bildirilmiştir. (Braaten *vd.* 1988, Vergnoud 1989). Kalıtsal farklılıklar sınırdaş öncüller tasarlanarak tanımlanır ve bu bölgeler tür içi korunma eğiliminde olmalarının yanı sıra, taksonomik olarak daha üst seviyede korunabilir. Nüfus içerisinde

dizge yinelemelerindeki değişimler mikrosatelit alellerinin sayısında farklılaşmaya neden olur. Mikrosatelitler, kalıtsal çeşitliliği belirlemede sundukları kolaylık nedeniyle, son zamanlarda en çok uygulanan gen tekniklerinden olmuştur.

#### **1.9.3.3.1 SSR lokus yalıtım yordamları**

Mikrosatelit yalıtımı temelde, standart derlemelerinin yapılması, bu derlemelerin sondalarla araştırılması, dizgelerin öncül tasarımı ve kalıtım farklarının tanımlanması biçiminde gerçekleşir. Yalıtım verimlilik ve giderler dikkate alınarak farklı yordamlar geliştirilmiştir. SSR yalıtım yordamları aşağıdaki gibidir:

1. Standart derlemeler yapma,
2. Zenginleştirilmiş derlemeler yapma,
3. Veri tabanları marifetiyle SSR oluşturma.

SSR Yönteminin Üstünlükleri:

- Yüksek polimorfizm gösterir. Bu nedenle bitkilerde çok miktarda veri üretilir.
- Bitki genomunda çok miktarda ve düzenli bir dağılımda bulunur.

Çekinceleri:

- Belirteç geliştirebilmek üzere, kopyaların yinelenen sondalarla melezleme marifetiyle elde edilmesi,
- Dizgelerinin yinelenen yerlerinden başlatıcı oluşturulması şarttır ki özel başlatıcı DNA'ların geliştirilmesi gerekir, ki yüksek maliyetli ve daha çok iş gücü gerektiren bir işlemdir.

#### **1.9.3.3.4 SCAR (Dizge karakterli çoğaltılmış bölge)**

Bir polimorfik RFLP ya da RAPD kopyalanır ve dizge çözümlemesi gerçekleştirilir. Bu özgül parçacığa göre 2 ila 24 nükleotidlik PCR öncülü bireştirilir. PCR ile çoğaltılmış özgül öncüller enzimlerle kesilir. Sonuç olarak DNA'daki büyüklük değişimi belirlenir.

SCAR Yönteminin Üstünlükleri:

- Çok sayıda eş-baskın belirteçler olur,
- Her lokusta çok sayıda alel bulunur.
- SCAR'lar RAPD'ye göre daha iyi üretilebilir,
- Bu belirteçler RFLP'ye göre daha kolay ve süratle belirlenebilir.

SCAR Yönteminin Çekinceleri:

- RAPD bantlarının yinelenen DNA dizgeleriyle melezlenme olasılığı nedeniyle, özgül bir klon elde etmek olanaksız olabilir,
- Çok zaman ve işçilik gerektirir.

#### **1.9.3.3.5 SSCP (Tek zincirli uygunluk polimorfizmi)**

Herbir zincirin değişik biçimde katlanmasıyla farklı uygunlukların oluşması ve buna uygun şekilde değişen hızlarda hareketini temel alan bir tekniktir. Mutasyonu olan DNA molekülü, tek baz farkıyla dahi normal dizgede farklı bir yapı oluşturacağı için, farklı konumlarda bantlanma gözlenir. İncelenen örnekle normal olan arasında fark oluşması, mutasyonun varlığını gösterir.

Nokta mutasyonlar her ne kadar DNA dizge çözümüyle kesin biçimde tanımlanabilse de, zaman ve masraflar normal olarak taranacak alan arttıkça artacaktır. Engellemek üzere mutasyonlu genler, 200 bp'liklerin sayısı artırılır ve teknikle taranarak aranan kısım bulunur. Böylece, bütünü üzerinde çalışmak yerine, yalnızca ilgili parçanın incelenmesi, süreci kısaltmanın yanı sıra, masrafı da azaltır.

#### **1.9.3.3.6 CAPS tekniği**

Yöntem, tepkimeyle kuvvetlenenlerin sınırlanarak elektroforez aracılığıyla parçacıkların belirlenmesini öngörür (Zabeau ve Vos, 1993).

Her iki teknikte de öncülleri geliştirmek için zincir malumatına ihtiyaç duyduğundan ve diğer belirteç sistemlerinin varlığı sebebiyle, bu iki tekniğin kullanımı çok popüler değildir ve ancak düşük zėllėe sahip belirteçlerin zėllėn arttırmak için kullanılır.

#### **1.9.3.3.7 ISSR: Basit dizge arası yineleme yöntemi**

ISSR yönteminde, yinelenen nükleotidler içeren öncüller kullanılır ve bu öncüller aracılığıyla mikrosatelitler arası çoğaltılabilir, çıktılar jelle uygulanarak belirlenebilir (Joshi *vd.* 2000). ncller aracılığıyla değişen hacimlerde çoğaltılır, mikrosatelite ulaşan yozlaşmış nükleotidler içerir ve uzunlukları 15 ila 30 nükleotid arasında değişir. ncllerdeki GC oranının çokluğu, bağlanma sıcaklığının yüksek olmasına neden olur, ancak bu, kararlı bağlanmayı sağlar ve böylelikle her öncüle göre ihtiyaç duyulan ısı baz bileşimine göre belirlenir.

ISSR, baskın bir belirteçtir ve üstünlüklerinden biri, dizge bilgisine gerek olmadan öncül tasarımı yapılabilmesidir (Adams *vd.* 1991). Kalıtsal değişkenlik ve ürünler bakımından st seviyede mütalaa edilebileceğinden taksonomi, kalıtsal yakınlık, ve haritalamada kullanılabilir (Kesawat ve Das, 2009).

Yöntemin çekinceleri ise, RAPD belirteç sisteminde olduğu gibi, bu sistemde de yinelenebilirliğinin az olmasındır (Gupta *vd.* 1994; Zietkiewicz *vd.* 1994).

Bu yöntem, öncüllerin kısa olmasını, ürünlerin büyüklüklerine göre ayrılmasını ve jelle belirlenmesini içerir. Sabitleştirici DNA'ların farklı birleşimleri, bir tepkimede yinelenen zincirin aynı kalması koşuluyla, öncül olarak aynı tepkimede kullanılır ve böylelikle bir jelde üzerinde uygulanacak bant ya da belirteç sayı olarak artar. Bu, diğer metotlarla oluşturulabilen rakanlar söz konusu olduğunda üstünlük getirir. (Gülşen ve Mutlu, 2005).

#### 1.9.3.4 ESTs : DNA belirteçleri

300-500 baz çiftliktir. Büyüme standartlarına ilişkin çözümlenmelere yarar. Kodlanamayan bölgeler sebebiyle insanda gen tanımlaması oldukça zordur. mRNA yalıtımı yoluyla bunu belirleme imkanı olur. mRNA'nın hücre dışındaki dengesizliği yüzünden, tamamlayıcı DNA bireşimlenir. (Adams vd 1991).

Kodlamanın yapıldığı alanlar, iletilen RNA'ya açıklanarak kalıp vazifesi yapar. Artık ters transkriptaz enzimi aracılığıyla RNA'dan tamamlayıcı da elde edilebilmektedir. cDNA, kararlı bir yapıdır ve ifade edilen bir genin dizgelenmesiyle İfade Edilmiş Dizge Etiketleri olarak ifade edilirler (Kantety vd. 2002). Artık zamanımızda EST belirlenmesi çok daha pratik olarak yapılabilmektedir. 6,5 milyon EST'den ihtiyaç durumunda istifade edilebileceği belirtilmektedir. Bahse konu dizgelerde, gen açılımının belirlenmesi, gen bulunması, gen tarifi ve organize edilmesinde, dizge belirlenmesinde ve önemli moleküler belirteç sistemlerinin geliştirilmesine yarar. İlave olarak, mikro-dizilimde fadelerin karşılaştırılmasında, sondada, haritalarda belirtilen EST dizgeleri kullanılabilir (Nagaraj vd. 2006). EST-SSR'lar yazılmayan bölgelere oranla bölgeleri, daha korunaklı olan yazılma (transcription) bölgelerinde bulunur ve yakın türlere aktarımı akılcı görünür. İlgili bölgenin EST dizilerinden elde edilen öncüller aracılığıyla (SNP) ortaya çıkarabilir. Temelde EST belirteçleri, ilgilenilen özgül genlerin kopyalanmasında, tam genom dizgelenmesinde, yaygın olarak kullanılırlar (Nagaraj vd. 2006).

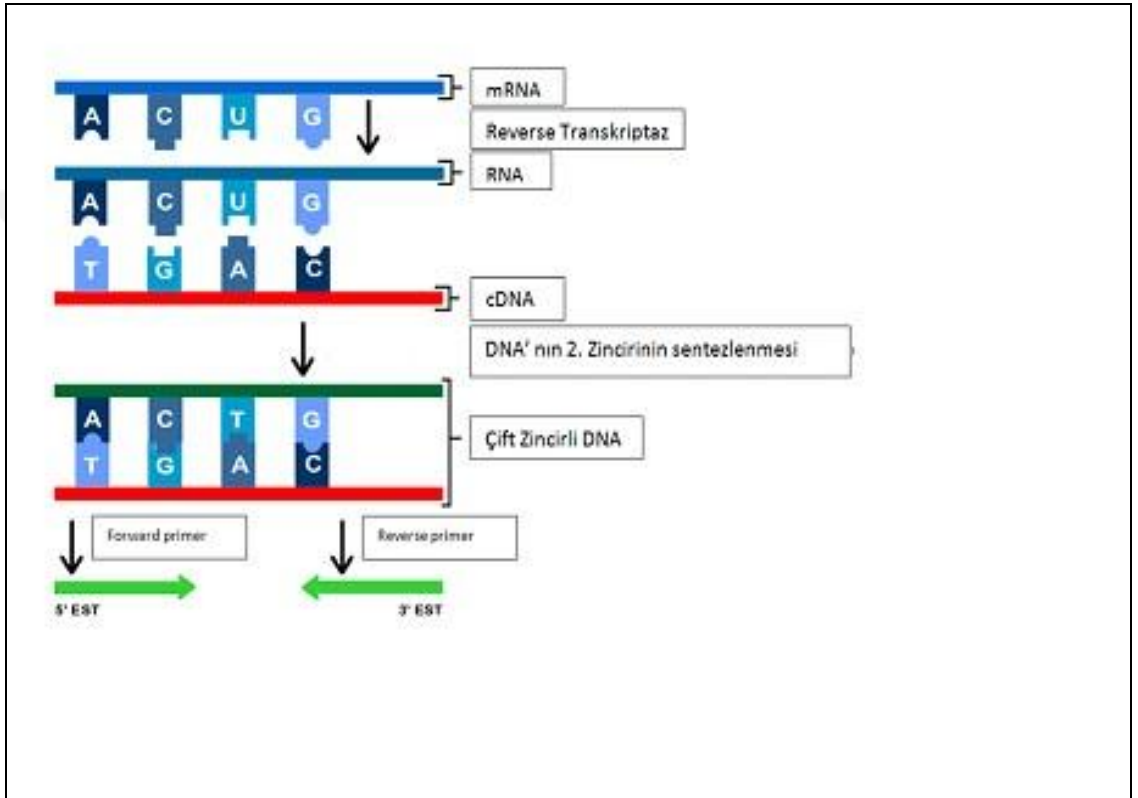
##### 1.9.3.4.1 İfade edilmiş dizge etiketleri ve kökenli SSR lokus yalıtım yordamı, cDNA derlemelerinin belirlenmesi

cDNA derlemeleri organizma, doku ya da organa ait çok sayıda cDNA kopyasından oluşur. Derlemelerden, gen işlevlerine ulaşmak amacıyla istifade edilir. Bu derlemelerden dizge çözümlenmeleri sonucunda meydana gelen İfade Edilmiş Dizge Etiketleri (EST – Expressed Sequence Tags), işlevsel gen dizgeleri ve parçaları olarak bilgisayar ortamına aktarılır analizler için kullanılır. (Oruç, 2009).

Günümüzde EST'lerin sayısı, hızla artmış ve bir veri tabanı oluşmuştur. EST veri tabanlarındaki bilgilerin uygulanması, bilinen genlerin homolojisi ve birçok genin olası

işlevlerinin kestirimine olanak vermektedir. cDNA derlemelerinin oluşturulması ve EST dizgelerinin belirlenmesi amacıyla izlenen çalışma aşamaları Şekil 1.9'daki gibidir.

Günümüzde birçok türe ait genom tamamen dizgelenmiş durumdadır. Ancak birçok türün tıbbi ya da tarımsal önemi bulunmadığı için, henüz genomik dizgelenmesine öncelik verilmemiştir ve cDNA'lar bunların temel gen dizge kaynağını sağlamaktadır.



Şekil 1.9 cDNA derlemelerinin oluşturulması

Çok sayıda organizma için dizgelenmenin belirlenmesine ilişkin dizgeleme çalışmaları halen sürmektedir. Otomasyonlardan istifade ederek bu verilerden yararlanılabilir (Kesawat ve Das, 2009).

Bir dizgeleme çalışmasının ana hedefi genomik dizge oluşturmak ve genlerin bütünü tanımlamaktır, ancak asıl amaçlanan, gen tanımlaması adı verilen işlemin ne suretle gene dönüşümünün yapılmasıdır. Teknolojideki süratli gelişmeler sayesinde genler için

yapılan tanımlamalarda harcanan zamanı oldukça azaltmaktadır. Genlerde, tanımlama ve organize etme ve girdi sağlama işleri için en pratik yöntem olarak EST öne çıkmaktadır.

#### **1.9.3.4.2 EST gen bankaları ve EST analizi**

Çeşitli çalışmalarda, elverişli olmaları, süratle oluşturulabilmeleri ve gelişen teknoloji sayesinde ucuza mal olmaları nedeniyle, kamuya açık EST derlemeleri oluşturulmaktadır. Geliştiriciler yeni bir EST oluşturdukları zaman bunu öncelikle Gen Bankasına (GenBank) aktarırlar. Bunların en önemlilerinden birisi, 1992’de ABD’de kurulan dbEST veri tabanıdır. Araştırmacılar bu veri tabanı aracılığıyla EST verilerini saklayabilir, düzenleyebilir ve var olan verilere erişebilirler.

İnsan EST verilerinin yanı sıra 300 başka organizmaya ait EST verilerinin bulunduğu dbEST veri tabanında, BLAST gibi analiz araçları aracılığıyla, EST dizgeleri bilinen gen dizgeleriyle karşılaştırılabilir ve bu sayede dizgeler arası benzerlikler ve işlevler belirlenebilir.

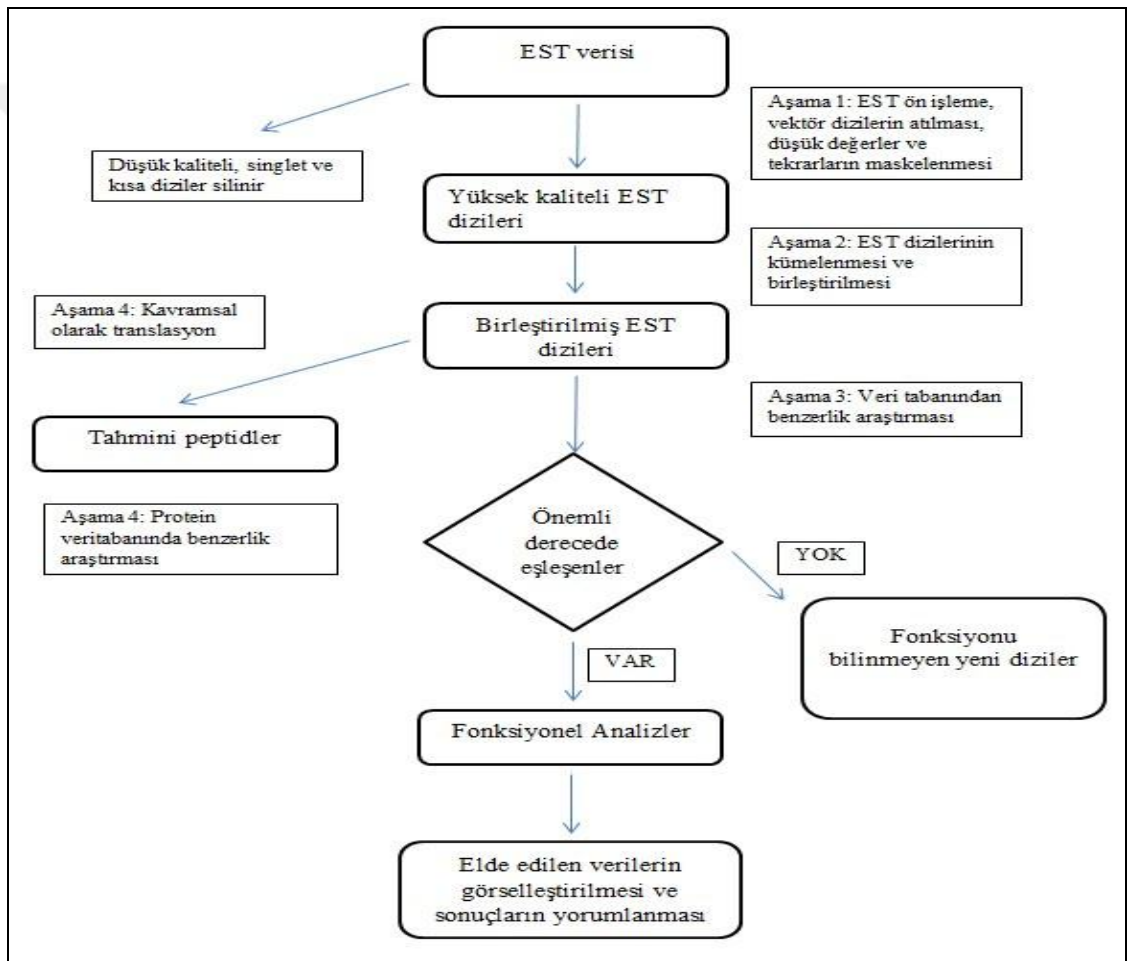
GenBank dizge veri tabanı, nükleotid dizgeleri ve bu dizgelerin protein translasyonlarının derlemesinin bulunduğu bir veri tabanı özelliğine sahiptir ve yine NCBI bünyesinde ve aynı anda Avrupa Biyoenformatik Enstitüsü (EBI – European Bioinformatics Institute) bünyesinde bulunan Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı derlemesi için ve Japonya Veri Bankası işbirliği yapmaktadır. Veri tabanları bir arada 100.000’in üstünde farklı organizmadan üretilmiş dizgeleri içerir ve hızla büyüyen bir oranda genişlemekte ve dizge verişleri her 10 ayda ikiye katlanmaktadır. 2003 Şubat ayında yaklaşık 24 milyon dizge 30 milyar baz içermekteyken, 2011 Mayıs ayında bu sayı 198,1 milyonun üstünde dizgede yaklaşık 317,9 milyar baza ulaşmıştır. İfade Edilmiş Dizge Etiketleri (EST – Expressed Sequence Tag) derlemeleri çoğunlukla büyük dizgeleme merkezleri tarafından GenBank’a aktarılmaktadır. Hariçten girdi olarak veriler GenBank’a ulaştığı zaman bu dizgelere bir numara verilir ve nitelik denetimlerinden sonra, serbest istifadeye açılır.

Aynı EST’nin birden çok kopyası oluşabilir. Bu tip fazla EST’lerin varlığı ve dizgelerin üst üste binmeleri nedeniyle, belli bir EST arandığında benzeşen dizgeler arasında arama



yapmak zorunda kalınır ve tüm EST dizgelerini taramak araştırmacılara zaman kaybettirir. Bu fazlalıkların ve dizge çakışmaları sorunlarının çözümü, NCBI bünyesinde oluşturulan “Unigene” veri tabanı aracılığıyla sağlanır. Veri tabanı, GenBank dizgelerini otomatik olarak tarar ve bunları gen olma olasılığı yüksek olan, aynı veri tabanında parçası bulunmayan bir veriye, yani unigene dönüştürür, bu da karşılaştırmayı kolaylaştırır (Oruç, 2009).

EST analiz aşamaları Şekil 1.10’da gösterilmiştir.



Şekil 1.10 EST analiz aşamaları

Şekil 1.10’da da görüldüğü gibi;

1. Dizgelerin kirlenmesi, alçak değeriğe sahip dizgeler ve yinelenme denetlenmesiyle alçak nitelikli, tekli (singleton) ve kısa dizgelerin iptal edilmesi,
2. EST'lerden birleştirilmiş dizge yapılması,
3. DNA veri tabanında benzerlik taraması yapılması,
4. Tahmini peptidlerin dizgelerin translasyonu ile belirlenmesi,
5. Tahmini işlevlerin belirlenmesi amacıyla protein veri tabanında benzerlik aranması, sonuçların görüntülenmesi ve yorumuyla işlevsel anlamlandırma yapılabilmesi amacıyla analizin genişletilmesi aşamalarından geçirilmesi (Nagaraj *vd.* 2006).

#### 1.9.3.4.3 EST'lerden SSR belirlemek için geliştirilen çözümleme araçları

EST veri tabanlarında bulunan farklı türlere ait EST derlemelerinden SSR belirlemek için, çeşitli platformlarda hazırlanmış farklı veri türlerini analiz edebilen SSR belirleme amaçlı birçok uygulama geliştirilmiştir (Sharma *vd.* 2007). Her uygulama özgün üstünlük ve çekincelere sahiptir. EST'lerden SSR belirlemek için uygulanan önemli veri tabanları ve yazılımlara yönelik çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Abajian'ın 1994'te geliştirdiği “**SPUTNIK**”, SSR belirlemek için pratik bir yazılımdır. Sonuç olarak tablo formatında SSR dosyası üreten bu uygulamanın çeşitli sürümleri, Unix, Linux ve Windows ortamlarında çalışabilir. “SPUTNIK” arabidopsis ve arpa (Cardle *vd.* 2000) gibi birçok türde SSR belirlemek amacıyla uygulanmıştır.

Agarwal *vd.* (1994), **RPT** kullanarak 7000'den fazla yineleme dizgesi tanımlamış, analiz edilen dizgelerin yaklaşık %12,3'ünün yineleme bölgelerine sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Kurtz *vd.* (2001), Linux platformunda çalışan ve SSR belirleyebilen **TRF** aracılığıyla, insan hücresinde alıcı lokus dizgesini analiz etmişlerdir. Uygulamayla, belirlenen SSR'ler vasıtasıyla üzerinde istatistiksel analizler yapılabilir.

Benson vd. (1999), her türlü sürümü olan ve off-line sürümü geniş bir kütüphaneye sahip, istatistiki analiz yapılabilen bir uygulama yaratmışlardır.

Castelo vd. (2002), **SSRIT** ile pirinçte bulunan dizge grubunda değişik SSR dağılımlarını incelemişlerdir. 12 ila 20 baz ve 20 bazdan uzun olmak üzere, yinelenme örgelerine göre iki gruba ayırmışlardır. SSRIT, dizgedeki düzenli SSR'leri belirlemek amacıyla PerlScript kullanarak tek nükleotid yinelenmelerini eler ve 2 ila 10 baz uzunluğunda yinelenmeleri bulur. On-line ve off-line sürümleri olan **SSRIT**, tablo formatında SSR dosyaları üretir.

Temnykh vd. (2001) tarafından geliştirilen “**Tandem Repeats Occurrence Locator (TROLL)**”, açık kaynak kodlu, on-line ve off-line sürümleri olan ve yinelenmeleri belirleyebilen, öncül tasarım da yapılabilecek bir uygulamadır.

Sreenu vd. (2003), sadece düzenli yinelenmeleri belirleyebilen, on-line “**Microsatellite Analysis Server (MICAS)**” uygulamasını yaratmışlardır.

Thiel vd. (2003), düzenli, düzensiz ve birleşmiş SSR'leri tanımlayan ve FASTA formatında veri gerektiren “**MISA**” yazılımını geliştirmişlerdir. PerlScript kullanarak yinelenmeleri ve özet bilgileri içeren bir dosya veren bu uygulama, öncül belirleme uygulaması “Primer3” ile öncül tasarlayabilme yeteneğini de sunar. Bu yazılımın yardımıyla EST dizgesi içeren bir arpa EST derlemesi analiz edilmiş ve 1856 SSR tanımlanmış, azami 3 baz yinelenme örgesi belirlenmiştir. Stackelberg v. d. (2006), MISA ile *Physcomitrella* yosun türüne ait EST derlemesinden 3723 adet SSR tanımlamış ve 2951 SSR için öncül tasarlamışlar, Aggarwal v. d. (2006) ise 2553 adet dizgeye sahip kahve EST derlemesinden SSR'lar belirlenmiş, yaygın örgenin AG ve AAG olduğunu bulgulamışlardır.

Parisi vd. (2003) tarafından geliştirilen “**mreps**”, on-line ve off-line sürümleri olan, her türlü SSR yinelenmeleri belirleyebilen ve eş zamanlı öncül tasarımı da yapabilen bir uygulamadır.

Kolpakov vd. (2003), on-line ve off-line sürümleri olan, düzenli, düzensiz ve birleşmiş SSR yinelemeleri belirleyebilen, “**STRING**” uygulamasını yaratmışlardır.

Platform bağımsız çalışan, indirilebilir Python formatında tasarlanmış, istatistik analiz yazılımı “**Poly**”, Bizzaro vd. (2003) tarafından geliştirmiştir.

Gao vd. (2003), “**SSRFinder**” uygulamasını kullanarak 4 adet bitkinin derlemesindeki 1-6 baz uzunluğundaki örgeleri araştırmayı amaçlamışlardır ve buğdayda 17.42 kb, mısırdada 28.32 kb, pirinçte 11.81 kb ve soya fasulyesinde 23.80 kb EST-SSR sıklığı belirlemiştirlerdir. En yaygın SSR tipi trinükleotid yinelemeleri belirlenmiş, buğdayda belirlenen 597 SSR tasarlanan öncüllerden 497 adediyle çalışılmış ve öncüllerden 255 adedi de diğer bitkilerde kullanılabilmiştir. Buradan da kopyalama işlerinde, öncüllerin akraba bitki türleri arasında yüksek oranda geçişkenliği bulunduğunu ortaya çıkarmıştır.

Delgrange vd. (2004), on-line ve off-line sürümleri olan, “**STAR**” uygulamasını geliştirmişlerdir.

Jewell vd. (2006) tarafından geliştirilen on-line yazılım **ACMES** ise, 3-1000 baz uzunluğunda dizgelerde yinelemeleri bulmak amacıyla yaratılmıştır ve çapraz türler arasında korunmuş yineleme dizgelerini bulgulamak amacıyla da kullanılabilme özelliğine sahiptir.

Chen vd. (2006) Buğday derlemelerinden SSR’lar belirlenerek, bunların %74’ü için öncül tasarlayabilmiş ve %70’inden ürün elde edilmiştir.

“**SSRPrimer**” ise Robinson vd. (2004) ve Reneker vd. (2004) tarafından geliştirilmiştir ve SSR belirlemek ve öncül tasarlamak amacıyla Sputnik ile Primer3’ün birleşiminden oluşur. Bu yazılım çıktı olarak tablo halinde SSR listesi ve öncülleri verir. Çilek (Keniry vd. 2006), *Eragrostis curvula* (Cervigni vd.2008), nane (Lindqvist vd. 2006), *Sclerotinia* (Winton vd. 2007) ve turunçgiller Nicot vd. (2004) gibi türlerde SSR belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

Jayashree vd. (2005) tarafından yerfıstığında SSR belirlemek amacıyla kullanılan “**RepeatFinder**”, SSR belirleme işlevini dört aşamada gerçekleştirir. Unix ya da Linux platformlarında çalışan bu uygulamaya girdi olarak tüm genom veya dizge seti yüklenir. Çıktısı, her sınıfta birleştirilmiş yinelemelerin sayısı ve yineleme sınıflarıdır. SSR'nin yanı sıra her uzunluktaki yinelemeleri belirlemek üzere tasarlanmıştır.

Perez vd. (2006), **TRF** yazılımı kullanarak EST derlemesinden SSR belirlemiş ve bunlardan SSR'lar bulmuşlardır. 205 tanesine yönelik öncül bireşimlenmiş, 112 öncülden ürün elde edilmiştir.

Singan vd. (2005) tarafından geliştirilen ve yalnızca off-line sürümü bulunan “**MicrosatDesign**”, PerlScript olarak hazırlanmıştır ve Phred-Phrap ve Primer3 ile birleşim sağlayarak düzensiz ve birleşmiş yinelemeleri belirleyebilir.

Karaca v.d. (2005), on-line ve off-line sürümleri bulunan, çoklu veri formatı kabul eden ve istatistik analiz sağlayan “**E-TRA**” (Exact Tandem Repeats Analyzer) uygulamasını geliştirmişlerdir. Bu uygulama, düzenli, düzensiz ve birleşmiş yinelemeleri belirleyebilir.

Faircloth (2008) tarafından geliştirilen “**msatminer**” yazılımı on-line ve off-line sürümlere sahiptir. Çoklu veri formatını kabul edebilen ve ek betikle istatistik analiz sağlayabilen, PerlScript kullanan bu uygulama, düzensiz ve birleşmiş yinelemeleri belirleyebilir.

Thurston vd. (2005), Python formatında tasarlanmış, her çeşit yinelemeleri belirleyebilen, öncül tasarımı imkanı olan “**msatcommander**” uygulamasını yaratmıştır.

Kofler vd. (2007), yalnızca off-line sürümü olan, düzenli, düzensiz ve birleşmiş yinelemeleri belirleyebilen ve istatistiki “**SciRoko**”m uygulamasını ortaya çıkarmışlardır.

Singan vd. (2005), yalnızca off-line sürümü olan, düzenli, düzensiz ve birleşmiş yinelemeleri belirleyebilen, öncül tasarımı yapabilen ve istatistik analiz sağlayan “**IMEx**” (Imperfect Microsatellite Extraction) uygulamasını geliştirmişlerdir.

### 1.9.3.5 Ribozomlar ve rDNA

Kalıtsal düzlemde oynadıkları rol nedeniyle ribozomlar gayet önemli unsurlardır. Prokaryot hücrelerde 10.000 adet civarındadır. Ökaryot hücrelerde ise çok üstünde sayılarda ribozom bulunur. Elektron mikroskobu aracılığıyla bakteride çapın 250µm olduğu ve iki alt-birimden oluştuğu belirlenmiştir. İki alt-birim de, bir ya da daha çok rRNA ve çeşitli ribozomal proteinler içerir. Birleşmeleri sonucunda tek bir ribozom oluşturduğu yapılara bazen monozom adı verilir. Monozom prokaryotlarda 70S'lik, ökaryotlarda 80S ölçüsündedir. (Şekil 1.11).

Prokaryotlarda, büyük alt-birimde 1 23S rRNA ve 1 5S rRNA molekülleri ve 31 değişik ribozomal protein bulunur. Ökaryotların büyük alt-birimlerindeyse, 1 28S rRNA, 5.8S ve 5S rRNA molekülü ve yaklaşık 50 değişik proteinden oluşur. Küçük prokaryot alt-birimler, 1 adet 16S rRNA ve 21 protein içerir. Ökaryot ribozomun küçük alt-biriminde, 1 18S rRNA ve 33 protein vardır.

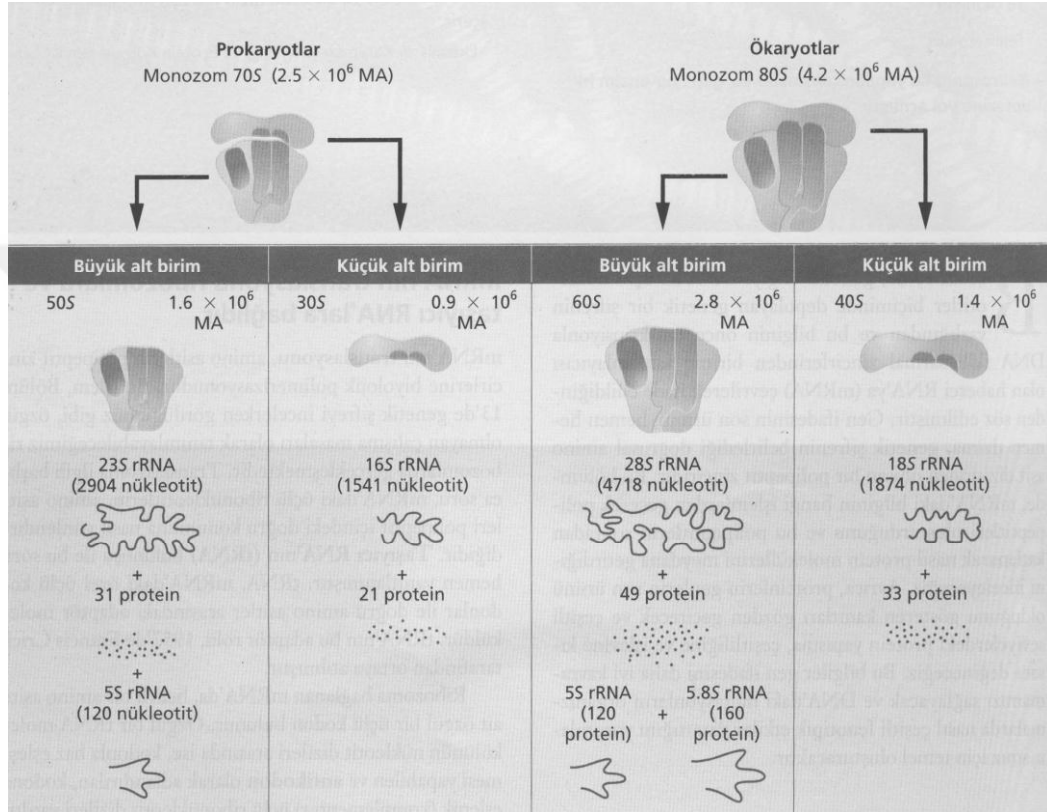
Ribozom bileşenlerine bakıldığında, taşımayı sağlayan RNA moleküllerinin olduğu bilinmektedir. Hücrenin bir ribozom bileşeni olan ribozomal RNA'ya ne kadar gereksinimi olduğu, metabolik olarak ne kadar etkin olduğuna bağlıdır. rRNA kodlayan genin bir kopyasının birçok hücrede bulunması yetersiz kalabilir.

rRNA bileşenlerini kodlayan genlerin kopya adedi, moleküler melezleme çalışmaları sonucunda bulgulanmıştır. Bu teknikle, özgül RNA dizgelerini şifreleyen genom yüzdesi belirlenir. *E.coli* genomunda, üç bileşeni kodlayan bir dizge vardır. Yazılma (transcription) ürünü sonrasında üç ufak parçaya ayrılır.. Bunların kodlanmasına ait kalıtsal veriler bir araya geldiğinde, çeşitli yazılma olaylarından sonra, ribozomal yapı oluşturulduğunda bu üçünün eşit ölçülerde ortamda bulunması sağlanır.

Ökaryotlarda, 28S ve 18S rRNA şifreleyen DNA dizgesinin kopya sayısı, çok daha fazladır. Sirke sineklerinde (*Drosophila*) her haploit genomda 120 kopya vardır ve 34S RNA molekülü ilk transkriptleridir. Afrika pençeli kurbağasında (*Xenopus laevis*),

genom başına düşen kopya sayısı 500'den fazladır. 45S RNA memeli hücrelerinde meydana gelen ilk transkripttir (Klug, 2002).

Şifreleyen genler, rDNA üzerindedir. DNA dizgelerinin makul yinelenen bir grubudur ve çeşitli kromozom bölgelerinde bulunur.



Şekil 1.11 Sukroz gradyanında prokaryot ve ökaryot ribozomlar (Hwang, 1999)

Taksonomik basamaklardaki filogenetik yakınlıkların incelenmesinde Ribozomal RNA genlerinin karşılaştırmalı nükleotid dizge araştırmaları, fırsatlar sunmuştur. 16S gibi dizgelerin enrimlermesi ağır olur ve filogeni araştırmalarında kullanılabılırler. Öte yandan mitokondriyel rRNA genlerinde bu işlem hızlıdır ve takım veya aile düzeyinde yararlı olabilir. Nükleer rRNA yinleme birimlerinin İç Ayraçları (ITS – Internal Transcribed Spacers) ve Genler-arası Ayraçlarında (IGS – Intergenic Spacer) süratle olur.

Belli kopyalanmış genlerin yalıtımı ve dizge analizi yoluyla birçok rRNA dizgesi elde edilmiştir. Doğrudan rRNA dizge analizi için çok miktarda RNA gerektirmesi nedeniyle, hatalara yakın olmasına rağmen bilgi edinmek amacıyla tek zincir kullanılmıştır. Direkt dizge analizinde PCRIn klonlamaya göre üstünlüğü vardır. Bu yordam, DNA hamdır ve minimal ölçülerde gerekir. Dizge öncülleri, ya da deoksinükleotid trifosfataz enziminden yararlanan otomatik DNA dizge analizi araçlarıyla kullanılabilir (Baldwin 1992). 50 yıla kadar saklanmış, otuz beş kuru mantar örneğinin 5 ila 30mg öğütülmüş dokularından DNA yalıtımıyla mitokondriyel özgül bir parça çoğaltılmış ve dizge analizi yapılabilmektedir (Innis vd 1989)

Kalıp genlerin çoğaltımında, öncüller mükemmel ölçüde özgüdür. Çalışılacak organizmaların alanı, bağlanma ısısını değiştirme yoluyla, bazı ölçülerde arttırılabilir ya da sınırlanabilir (Bruns vd 1990).

ITS alanları uç birleştirme yöntemiyle uzaklaştırılan bölgelerdir. Dizileri rDNA şifreler. Genler ve araçlar, yinelenen dizgelerde (Ardışık Yinelemeler – Tandem Repeats) bulunur.

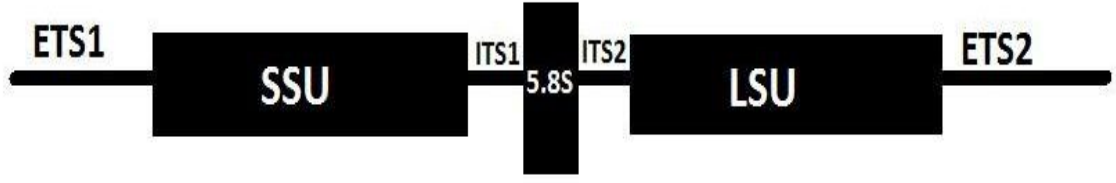
### **1.9.3.6 DNA dizgelenmesine dayalı belirteçler**

#### **1.9.3.6.1 Nükleer belirteçler**

Herhangi bir bölgenin şifreleme yapıp yapmaması durumu, çoğaltılarak dizgelenmesine bağlıdır. Ribozomal alt-birimlerin nedeniyle, filogenetik analiz çalışmalarında yaygınlıkla nükleer kalıtsal belirteç olarak kullanılır.

Genellikle filogenetik analizde, rRNA'ları şifreleyen çekirdek rDNA genleri kullanılır. Yinelenen birimler; küçük küçük ve büyük alt birimler ve 5.8S rDNA olmak üzere üç parçadan oluşur. (Klug ve Cummings, 2002) (Şekil 1.12) .





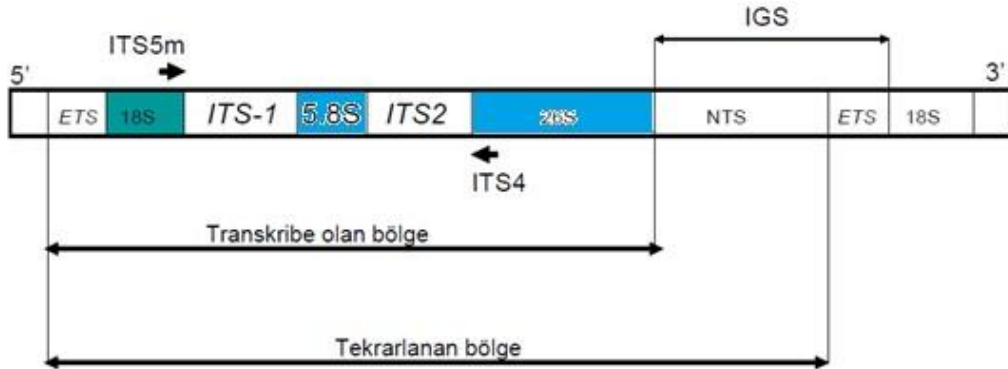
Şekil 1.12 rDNA gen kümesi

### 1.9.3.7 ITS: Transkribe edilen internal ara bölgeler ve rDNA

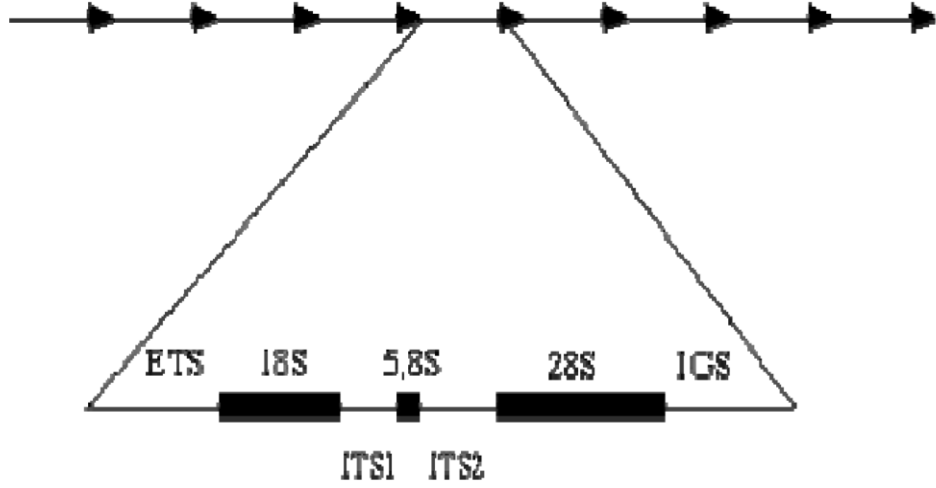
Bitki türlerinin doğal ortamlarda tanımı ve tanımlanmasında bazı nedenlerden dolayı güçlükler sebep vermektedir. Gerçekleştirilen birçok çalışma sonucunda, bazı bitkilerin tanımı ve tanımlanmasında hatalar olduğu belirlenmiştir.

Türlerin özgün alanlarının bulunması moleküler biyoloji dalında yapılan en son araştırmalarda, türlerinin tanımlanmasında yararlı olmuştur. Bu nedenle rDNA'nın ITS alanları, sıklıkla başvurulan tekniklerdir (White, 1990). ITS, iki iç ayraç ITS1 ve ITS-2, 5,8S, 18S ve 26S nükleer ribozomal RNA (nrRNA) alt-birimlerini şifreleyen genlerin arasına yerleşmiştir. ITS-1 ve ITS-2 uzunluğu yaklaşık 300 bp'dir. 5,8S alt-birimi de 164 bp uzunluğundadır (Baldwin 1992).

ITS bölgesinin her iki tarafında korunmuş dizgeler bulunur, bu nedenle evrensel öncül olarak kullanılır. Ayrıca PCR çalışmalarında da kolayca elde edilebilir (Baldwin 1992). Evrensel ITS öncüllerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri şekildeki gibidir. rDNA genleri, Genler-arası ayraç ve ITS bölgeleriyle ayrılmıştır. IGS'ler, komşu rDNA yineleme birimleri arasında bulunur. (White, 1990) (Şekil 1.13 ve Şekil 1.14).



Şekil 1.13 Çekirdek ribozomal DNA'sının yinelemeli birimleri (Dow vd 1995)

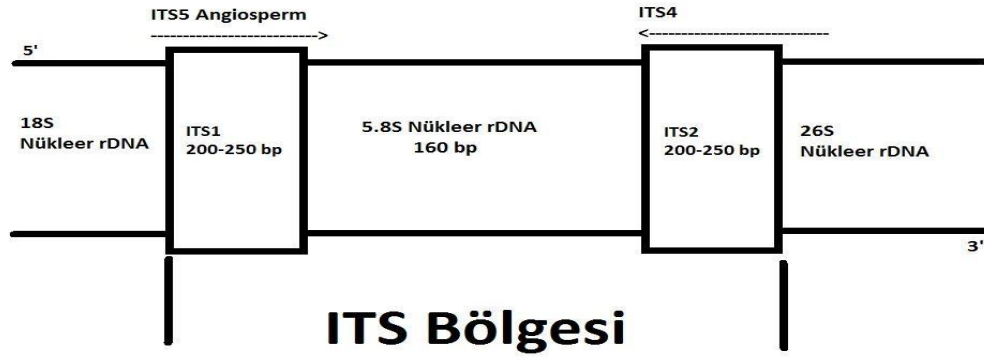


Şekil 1.14 ITS1 ve ITS2 bölgelerinin görünümü (Bruns vd 1990)

#### 1.9.3.7.1 Filogenetik çalışmalarda ITS bölgesinin kullanımı

Filogenetik ve biyocoğrafik araştırmalarda ITS bölgeleri yoğun bir biçimde kullanılır. Bunun başlıca nedeni, bu bölgelerin filogenetik araştırmalar için doyurucu veri verebilecek boyutlarda olmalarıdır. rDNA bölgelerine cins ve tür düzeyindeki araştırmalar için ITS bölgeleri, son derece yakındır. Bitkilerin bazılarında ayraçlarda çok miktarda çeşitlemeler oluşur. Bazılarında. ITS dizgelerinde, baz dizgelerine göre çok daha büyük değişkenlikler görüldüğü, verimliliğinin daha çok olduğu tespit edilmiştir. Kopyalar homolog değilse, türün bireyleri arasında küçük çeşitlemelere neden olabilirler. Ayrıca ITS bölgelerinin boyutları çok fazla büyük olmadığından, kolayca çoğaltılabilir. (White, 1990).

rDNA genleri, kopya edilemeyen bölgeler (IGS – Genler-arası Ayraç –Intergenic Spacer) ve ITS bölgeleriyle birbirinden ayrılmıştır. rDNA yinelenmelerinin ökaryot organizmalardaki bu gen yapılarını içeren kopya sayısı, 2000 ila 30.000 arasında değişir (Baldwin 1992)



Şekil 1.15 18S - 26S nükleer ribozomal DNA (nrDNA)'nın yazılan iç ayraç (ITS) bölgesi (White vd 1990)

### 1.9.3.7.2 ITS bölgesinin genel özellikleri

ITS bölgesi yaklaşık toplam 700 bp uzunluğundadır. Ökaryot organizmalarda genellikle 5.8S gen bölgesiyle ITS bölgesi bir arada ele alınır. ITS bölgesi, diğer korunmuş rDNA bölgelerinden daha fazla değişkenlik gösterir. Filogenetik açıdan sağladıkları veriler bakımından değişiklikler vardır. ITS1 verileri analizlerde daha çok filogenetik çözümler sunarlar, nükleotid içerik ITS2'ye oranla %29 daha fazla değişkenlik gösterir. (White, 1990).

DNA dizge analiz çalışmaları, 1970'lerden itibaren artmıştır rRNA'lar ve komşu bölgeleri üzerindeki ikincil yapı araştırmalarında çoğalma yaşanmıştır. (Baldwin ve Markos, 1999).

Birinci ve ikinci bölgeler yazılma (transcription) ürününüyle birlikte olmakla birlikte olgun ribozomal alt-birimlerin yapısına alınmazlar. Ama rRNA'ların olgunlaşma süreçlerine katkı verirler (Markos, 1999). ITS bölgelerinin, baz değişimi kısıtlamalarından göreceli olarak yakın olmadığı düşünülmektedir. Anjiyospermlerden elde edilen analiz sonuçları, bu durumu desteklemektedir (Ozad, 2000).

ITS1'de oluşabilecek delesyon – insersiyon ya da nokta mutasyon, olgun Ssu ve LSU rDNA'ların üretimini engelleyebilir. ITS2 sahasında ortaya çıkabilecek böyle

mutasyonlarla, büyük alt-birim rRNA'ların ortaya çıkmasında problemlere neden olabilir (Ozad, 2000).

### **1.9.3.7.3 Taksonomide ITS bölgelerinin tercih edilmesinin nedenleri**

Moleküler ve sistematik açıdan ayırt edici özellikler taşıyan, nrDNA üzerinde yer alan ITS bölgeleri, filogenetik analiz araştırmalarında çoğunlukla tercih edilir. Bu bölgelerin özellikleri aşağıdaki gibidir;

- Filogenetiğın yeniden yapılanmasında yeterli veri sunabilecek büyüklüktedir (600 ila 700 bç),
- rDNA gen bölgelerine komşudurlar,
- Büyüklükleri karşılaştırma için idealdir,
- Daha hızlı değışimler baz değışimlerde bulunurlar,
- Cins ve tür düzeyinde açıklayıcı veriler sağılar,
- Çok sayıda kopyaya sahiptirler.

Çeşitleme oranlarından dolayı sistematikte çok sık kullanılır (Maxam, 1977).

### **1.9.3.8 nrDNA bölgeleri**

#### **1.9.3.8.1 Küçük alt birim nrDNA (18S)**

Fazlaca korunmuş bölgelerindendir. Bu özellikten dolayı, araştırmalarda çok sık kullanılır. Küçük alt-birim nrDNA'sı günümüze kadar 4000 farklı tür için dizgelenmiştir.

Küçük alt-birim dizgeleri, kapalı tohumlular gibi farklı taksonomik düzeylerde, yapılanmasına fırsat verir (Baldwin ve Markos, 1999).

### **1.9.3.8.2 5.8S nrDNA**

Tekrar birimlerinde en kısıtı 5.8S nrDNA'dır ve rRNA'nın büyük alt-birimine ait bir parçasıdır. Lokus uzunluğu ve nükleotid yoğunlukla muhafaza edilmiştir. Tek başına boyu yeterli olmadığından tek başına kullanılması tercih edilmez ve bu sebeple ITS bölgeleriyle birlikte kullanılarak yararlanır (Baldwin ve Markos, 1999).

### **1.9.3.8.3 Büyük alt birim nrDNA (28S, LSU)**

Büyük alt birim nrDNA, küçükle mukayesesinde daha uzun olduğundan içeriğinde daha çok çeşitlilik görünür. Her ikisinde de, değişebilir bölgeler ya da yaygın segmanlar adı verilen alanlar bulunur. Ancak bu alanlardaki genişlemeler; yeterli veri sunmazlar. Bu nedenle çeşitlilikten familya ve daha üst düzeylerde yararlanır (Baldwin ve Markos, 1999).

Yüksek oranda çeşitlilik göstermeleri açısından rDNA yinlemelerinin ITS ve IGS bölgeleri, cinler arasında, tür düzeyinde ve nüfus çalışmalarında karşılaşılan taksonomik sorunları çözmek amacıyla yoğunlukla tercih edilirler. Ancak IGS (4 ila 5 kb) bölgeleri, ITS bölgelerine oranla çok uzundur. ITS genellikle filogenetik çalışmalarda dizge analizindeki zorluk nedeniyle tercih edilir (Baldwin ve Markos 1999).

## **1.10 DNA Dizileme**

DNA dizilemesinde, gen yapısı ve kalıtsal denetim düzeneklerine dair çok sayıda bilgi edinmemize olanak vermiştir. 1960'lı yıllarda başlayan DNA dizilemesinin gelişimi süreklilik arz ederek bugünlere kadar gelmiştir (Zülal 2001)

Günümüzde, DNA dizi analizi sırasında aşağıdaki gibi, birbirinden farklı iki teknik kullanılmaktadır:

- 1- Maxam ve Gilbert kimyasal kırılma tekniği,
- 2- Sanger ve Coulson zincir sonlanma tekniği.

Günümüzde bunlardan Sanger ve Coulson tekniği daha yaygınlıkla kullanılmaktadır. Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilen tekniğin ilkesi, DNA’da bulunan bazları, hidrazin, dimetil sülfat, ya da formik asit aracılığıyla değiştirilmesini ve sonradan eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotidlerin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasını temel alır (Klug vd 2000). Bu teknikte, DNA’nın iki iplikçığı birbirinden ayrılarak, ya da DNA uygun bir sınırlama enzimiyle kesilerek, DNA yalnızca bir ucundan işaretlenir. İkinci aşamada, DNA molekülleri dört tüpe ayrılır ve A, C, G ya da T nükleotidlerinin başkalaşımı için ihtiyaç duyulan reaksiyon için mahdut bir zaman zarfında müsaade edilir ve tüplerin her birinde amaçlanan nükleotidlerden, kırılmış DNA parçaları elde edilir. Sonuçta kırılmanın gerçekleştiği konuma göre, hepsi 5’- konumlarından işaretli, fakat uzunlukları değişken parçacıklar alınır. Uzunlukları azalan dizgeler, jel elektroforezi uygulanarak uzunlukları dikkate alınarak ayrıştırılır neticede de bantlar otoradyografiyle görünür olurlar. (Sambrook vd 1989).

### 1.10.1 Maxam ve Gilbert tekniğinde kimyasal kırılma tekniği

Bahse konu teknikte, özgül bazlar aracılığıyla zincirlerin kırılması için ihtiyaç duyulan maddeler aşağıda sunulmuştur. (Sanger vd 1977)

Çizelge 1.8 Kimyasal kırılma tekniğinde ihtiyaç duyulan maddeler

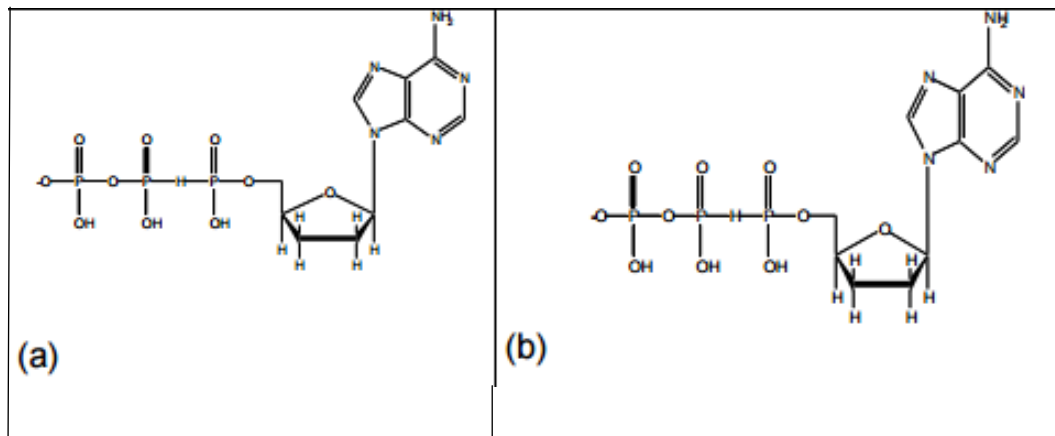
Özgül Baz	Baza özgül	Baz ayırma amaçlı	Zincir kırma amaçlı
G	Dimetil sülfat	Piperidin	Piperidin
A+G	Asit	Asit	Piperidin
C+T	Hidrazin	Piperidin	Piperidin
C	Hidrazin+Baz	Piperidin	Piperidin
A>C	Baz	Piperidin	Piperidin

Pürinleri kırmak için dimetil sülfat kullanılır. Dimetil sülfat ile N<sub>7</sub> sayılı konumundan metillenen DNA’ya, baz ortamda piperidin uygulandığında, DNA guanin bazından kırılır.

Baz yerine asidik ortam seçilirse, bu kez DNA guanin değil, adenin bazından kırılır. Pirimidin bazları ise hidrazin aracılığıyla kırılır. Hidrazin DNA'yı hem sitozin, hem de timin bazından kırar. Bazları ayırmak üzere gerçekleştirilen tepkimelerden alınan parçacıkların elektroforezde beraber hareket ettirilir. DNA parçacıkları, en kısası en önde olacak biçimde yürürler. (Thompson vd 1994)

### 1.10.2 Sanger ve Coulson tekniği

Maxam ve Gilbert kimyasal kırılma tekniğine göre bu teknik hızlı olması ve toksik madde içermemesi nedeniyle tercih sebebidir. Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği zincir sonlanma yöntemi, enzimatik DNA bireşimine istinat eder ve zamanımızda en popüler usuldür (Sambrook vd 1989). Belirtilen teknikte dizgei saptanması amaçlanan DNA iplikçığı, yeni bireşimlenecek iplikçik için kalıp olarak kullanılır. Bu teknik, DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanı sıra, deoksiribozun 3' konumunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) altkatman olarak kullanabilmesini temel alır (Şekil 1.16). Bir adet ddNTP'nin sentezlenen DNA'ya dahil, 3' konumunda OH grubu olmadığı için nedeniyle bireşimin durmasına neden olur. Dizge analizi yapmak için dört farklı tepkime karışımı hazırlanır. Bu karışımlardan her biri, kalıp DNA zinciri, bir öncül, dNTP'lerden dördü ve ddNTP'lerden birinden az miktarda içerir. Özgül zincir sonlanması amacıyla her tepkimede ayrı bir ddNTP olur. Tepkimelerin hepsinde minimal ölçüde değişik nükleotid kullanılmasıyla, yeni zincir bireşimi rastgele sonlanır ve bir dizi DNA parçacığı oluşur (Klug vd 2000).



Şekil 1.16 (a) dATP (b) ddATP moleküller

Bu teknik için gerekenler aşağıdaki gibidir:

- Tek iplikçikli kalıp DNA
- dNTP'ler,
- ddNTP'ler,
- DNA Polimeraz,
- Serbest OH grubu içeren öncül

ddNTP'ler, dideoksiribonükleozit trifosfat OH grubu taşımayan, değişik nükleotid alt-katmanlarıdır. Bunlar riboz monosakkaritinin ikinci karbon atomunun yanı sıra, üçüncü karbon atomunda da deoksi- halinde olması nedeniyle, fosfodiester bağlarının oluşumuna engel olur. Yeni nükleotidler bundan dolayı yapıya katılmaz, böylelikle DNA zincir uzaması sonlanmış olur.

Analizde kullanılacak olan kalıbın çoğaltımı asimetrik yollardan olur, böylece çok daha yüksek sayıda yapılır. Buna yönelik olarak, dizge analizinin yapılacağı kolun öncül derişiminin, tamamlayıcı kola göre daha yüksek tutulması gerekir. Döngünün daha ileri aşamalarında, sınırlayıcı öncülün bittiği anda, yalnızca uzama kolu çoğalır. Çoğaltım bittiği zaman elde edilen ürün, ortamdaki maddelerden ayrıştırılır.

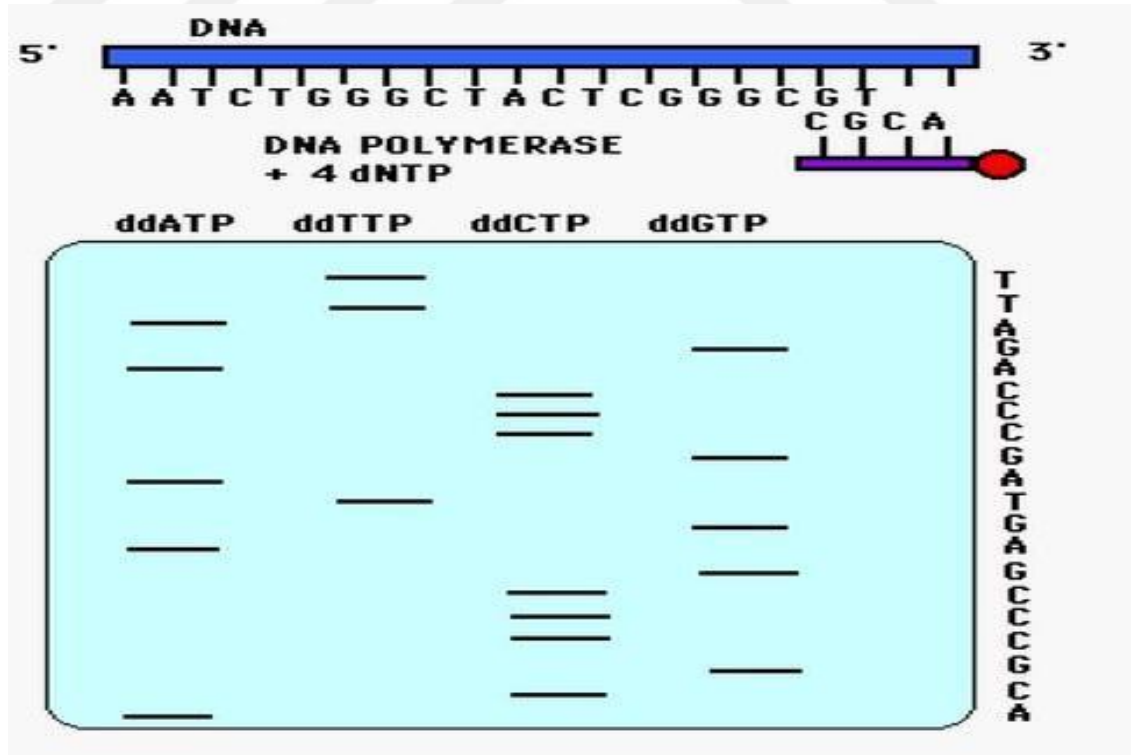
DNA molekülünün işaretlenmesi tepkime sonucunda ortaya çıkacak olan ürünlerin iyi görüntülenebilmesi için gereklidir. İşaretleme için genelde <sup>35</sup>S, ve P33/ P32 izotopları kullanılır ve gama konumunda yapısındaki nükleotidlerden istifade ederek veya alfa konumundaki markalı dNTP'ler aracılığıyla icra edilir. İşaretli nükleotidlerin yapıya katılımı DNA polimeraz, öncül, kalıp DNA ve dNTP'lerin ortama eklenmesiyle gerçekleştirilir. Kullanılan ddNTP'lerin derişiminin diğer maddelerden daha düşük olması gerekir. Markalama öncüle de uygulanabilir. İşaretlemenin ardından tepkimeler başlatılır. Karışım dörde ayrılırarak tüplere aktarılır. Tüplere düşük derişimli, farklı ddNTP'ler gerekli enzim öğeleriyle birlikte koyulur ve inkübe edilir. Aynı karışıma koyulan ddNTP'ler ile dNTP'lerin aralarında bir çekişme olur. dNTP'ler alt-katman olarak kullanıldığı sürece uzama olur ancak ddNTP kullanılırsa reaksiyon biter ve



sonlanma gerçekleşir. Aynı anda tüplerde bağımsız tepkimeler oluşur. Neticede birbirinden farklı uzunlukta DNA parçacıkları elde edilmiş olur.

Reaksiyonlardan alınan parçalar elektroforezde, jelde beraberce işletilir. DNA parçacıkları jel üzerinde, oluşan elektriksel alanın etkisiyle, kısıdan başlayarak arkaya arkaya dizilirler. Belirlenen parçacıklar jelden, tepkime karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okunur (Klug *vd.* 2000). Enzimatik zincir sonlanma tekniğiyle gerçekleştirilen tepkimelerin elektroforez sonrası görüntüsü ve okuma sonucu şöyledir: GGGCTG

Ortaya çıkan ürünleri ayırt etmek amacıyla denatürasyon etkili poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır ve ardından otoradyografi ile görüntülenir. Otoradyogramda görülen, kısıdan başlayarak arka arkaya gelen bantlar, radyoaktif izotop taşıyan tek zincirli DNA moleküllerine aittir. Jelde bulunan küçük parçalar, tepkime karışımına konulan ddNTP'lerin tipine istinaden ve markalama usulü dikkate alınarak okunur (Thompson *vd.* 1994). Böylece Şekil 2.16' da görüldüğü gibi, 5' ila 3' yönünde baz dizgesi belirlenmiş olur. (Klug *vd.* 2000)



Şekil 1.17 Zincir sonlanma tekniğiyle baz dizgesinin saptanması (Klug 1989)

### 2.10.2.1 Sanger ve Coulson zincir sonlanma tekniğinin kimyasal kullanımı

**Öncüller;** Sanger-Coulson zincir sonlanma tekniğinde, aranan DNA kalıbının çoğaltımı ve dizge analizi için öncül olarak özgül oligonükleotidler gerekir. Öncül ikililerin elde edilmesinde ve çoğaltılmasında uygulanır. Öncüller aynı zamanda bu tekniğin son aşamasındaki sonlanma tepkimesinde, geçerli ucu sağlarlar. Her birinde öncül çifti aynı oligonükleotidlerden oluşabilir, fakat başka öncüller de kullanmak olasıdır. Alanın kazanılmasında kullanılan öncül çifti, dizgeyi dışarıdan belirlemek; dizge analizi tepkimesinde kullanılan öncülü ise bu öncüllerin arasında ve dizgenin analiz uygulanacak bölgesine daha yakın konumlanmalıdır. Dizgeleme tepkimesinde bir tek öncül uygulanır ve böylelikle tepkime yönü belirlenmiş olur (Sambrook vd 1989).

**Kalıp DNA;** Sanger-Coulson tekniğinde, tek ve iki zincirli DNA kullanılabilir. Tekniğin başlangıcında kalıp DNA olarak adlandırılan DNA parçacığı, PCR (Polimeraz Zincir Tepkimesi – Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle elde edilir ve çoğaltılır. PCR sonucunda elde edilen kalıp DNA'nın önce tepkime artıklarından arındırılması gerekir ki üzerinde titiz davranmayı gerektiren bir safhadır. Yeterince temizlenememiş bir model DNA ile, müteakip tepkimeye eklenecek maddeler ve öncül kalıntıları, tepkimenin duyarlılığını bozacaktır (Sambrook vd 1989).

**Enzimler;** birçok tipte DNA polimeraz enzimi Sanger-Coulson zincir sonlanma tekniğinde kullanılabilir. Bunların ortak özellikleri, özgül ve duyarlı enzimler olmalarıdır. Kullanılan enzim örnekleri aşağıdaki gibidir (Sambrook vd 1989):

**E. coli Klenow Parçacığı DNA Polimeraz I;** Bu enzim, başlangıçtaki teknikte kullanılmıştır, ancak iki önemli çekincesi bulunmaktadır. Bunların ilki, enzimin denetimsiz bir biçimde çoğaltma tepkimelerini yarıda kesmesidir. Bu sorun, özellikle uzun okumalarda, iyice belirginleşir. İkinci çekince ise enzimden homopolimerik ve ikincil yapısı güçlü alanlarda aranan verimin sağlanamamasıdır (Sambrook vd 1989).

**Ters Transkriptaz;** Her ne kadar çok yaygınlıkla kullanılmasa da, ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi, homopolimerik alanlarda etkindir. Klenow parçacığından daha etkili ve elverişlidir (Sambrook vd 1989).

**Sekuenaz Enzimleri;** T7 bakteriofajından alınan Sekuenaz (Sequenas<sup>TM</sup>) enzimlerinin 3'-5' ekzonükleaz etkenlikleri engellenmiştir ve bu özellikleri nedeniyle tek yönlü ve süratli çalışırlar. Yüksek özgül etkenliği ve dayanıklılığı kalıp DNA'nın uzun olduğu deneylerde tercih nedenidir (Sambrook vd 1989).

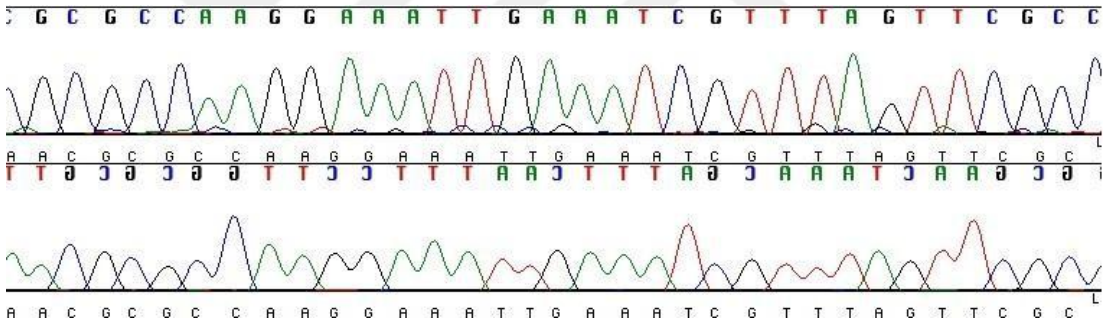
**Taq DNA Polimeraz;** bu enzim türü sıcağa dayanıklı olması nedeniyle yaygınlıkla kullanılır ve tek zincirli DNA dizgesi belirlemek için tercih sebebidir. Özellikle 95 °C'da etken olması sayesinde her bölgede çok kullanışlıdır (Sambrook vd 1989).

**Elektroforez;** fosfat grubu taşımaları nedeniyle DNA molekülleri eksi (-) yüklüdür ve anot yönünde (+ kutba), DNA'nın yapısına ve uzunluğuna bağlı olarak hareket ederler. Kısa DNA parçacıkları jel boyunca daha süratli yol alırken, uzunluk arttıkça bunların sürati azalır. Her iki dizge analiz tekniğinde DNA'nın bu özelliği kullanılarak, elde edilen değişik uzunluklardaki parçacıklar birbirlerinden ayrılır ve tanımlanır. Değişik sonlanmaları olan tepkime ürünleri söz konusu jel matrisine dört ayrı bölümde yüklenir. Oluşturulan elektriksel alanda, DNA parçacıkları boylarıyla sıralanırlar ve böylelikle okunabilirler. Tekniklerin ikisinde de Poliakrilamid jeller kullanılır. Bu jeller, tek nükleotidi bile ayırt edebilir. DNA dizge analiz tepkimesi sonucunda ortaya çıkan parçacıklar, radyoaktif, veya floresan boyalarla markalanarak yahut gümüş boyama yoluyla tespit edilebilir. Poliakrilamid jellerin yerine, otomatik DNA aygıtlarının gelişmesiyle polimerler geçmiştir. Yoğunluklarla değişen yüksek bir ayırım gücüne sahiptirler. Özel aygıtlarda çapları milimetreden küçük olan cam kapillerler içine yüklenen polimer sayesinde daha önce karşılaşılan sorunlar minimum seviyeye çekilir (Hillis vd 1996).

## 1.11 Otomatik DNA Dizileme Yöntemi

İnsan dahil projelerin çoğunda genom, DNA dizge analizi öngörmektedir. Analiz sayıları çoğaldıkça, bunlar çok zaman almakta, daha da çok iş gücü gerektirmektedir. Bu nedenlerle otomasyon gereksinimi doğmuştur. Otomatik DNA dizge analizleri, araştırmacılara zaman kazandırmanın yanı sıra, çalışma koşulları standartları ve ulaşılan sonuçların değerlendirilmesinde de yararlı olmuştur.

Bu yöntem, Sanger ve Coulson zincir sonlanma tekniğinin ilkelerini temel alır. Tek fark, işaretleme sürecinde floresan boyaların radyoaktifin yerine kullanılmasıdır. Dört adet boyadan yararlanılır ve dizgenin sonuç vermesini sağlayan ve her rengin bir nükleotidi simgelediği dört farklı renkte pik oluşur: Guanin siyah, Adenin yeşil, Timin kırmızı ve Sitozin mavi renklerle markalanır. Neticede alınan pikler aşağıda sunulmuştur.



Otomatik DNA dizge analiz aygıtları, sabit olarak bilgisayara bağlı uygulamalar ve bu uygulamaların yürüttüğü elektroforez sistemlerini içerir. Elektroforez biriminde, lazer ışık kaynağı aracılığıyla monokromatik bir ışık oluşturulur. Dizgesi elde edilmek istenen DNA'nın bulunduğu jel, bu monokromatik ışıkla taranır, böylece elektroforez sürecinde DNA'ya bağlanmış olan floresan boya, cinsine göre, kendi karakteristik dalga boyunda ışımaya verir. Bu ışımaya sistemdeki bir detektör tarafından kaydedilir ve monitörde görüntülenir.

## 1.12 Dizgelerin Hizalanması, CLUSTALW ve MULTALIN

Biyoformatik alanının temel araçlarından biri de, çoklu dizge hizalamadır. Özellikle dizge ve filogenetik ağaç oluşturma, moleküler kalıplama çalışmalarında uygulanır. Çoklu dizge ve ikili dizi hizalama yöntemlerine oranla yüksek oranda veri üretir. Mevcut çoklu hizalama teknikleri, optimum hizalamayı ancak dizge sayısı ile üstsel ilişkili bir sürede hesaplayabilir, bu nedenle de günümüz hesaplama yöntemleriyle büyük boyutlu verilerle hesaplamayı olanaksız kılar. Farklı ve iyi hizalama sağlayacak yazılımlar bu yüzden büyük önem kazanmıştır.

Bu teknikle çok sayıda uygulama bulunmaktadır. Biri olan CLUSTALW (Corpet 1988) tarafından sunulan metodun dayandığı ilke, ikili benzerliklerin kullanılmasıyla kuramsal filogenetik ağaçların oluşturulmasıdır. Bu bilgiler daha sonra dizgeleri aşamalı olarak hizalamak için kullanılır.

Kalıtsal algoritmalar, çoklu hizalama sorunlarını çözmek için kullanılan bir başka yöntemdir. MULTALIN bu algoritmalarla geliştirilen ve mikrobilgisayarlar da kolayca kullanılabilen uygulamalardandır (Sambrook vd 1989); bu algoritma aracılığıyla hem proteinler, hem de nükleik asitler hizalanabilir. Uygulamanın ilkesi, aşamalı hizalamanın dinamik programlanması tekniğine dayanır. Başlangıçta dizgeler hiyerarşik biçimde gruplara ayrılır, ardından yakın dizgeler hizalanarak gruplanır (Hillis vd 1996)

## 1.13 Kalıtsal Çeşitlilik ve Kalıtsal Nitelendirme

Belli bir coğrafyaya uyum sağlamış, o bölgede yaygın tür ve ırkların kalıtsal nitelikleri ve birbirleriyle olan ilişkilerinin niteliği anlamına gelen kalıtsal çeşitlilik, hayvansal üretim ve ıslah programlarının temelidir. Evcil hayvanlarda, ırk-ıç i ve ırklar-arası olmak üzere iki tip kalıtsal çeşitlilik söz konusudur.

Bu iki çeşitliliğin saptanması ve nitelendirme çalışmaları Dünyada ve Türkiye’de önemli bir yere sahiptir. 1980’lerde, kan ve süt protein polimorfizmi kullanılarak yerli ırkların kalıtsal yapıları ve bazı verim özellikleriyle olan ilişkileri incelenmiş, son gelişmelerle de

mikrosatelit belirteçler ve SNP'ler yaygınlaşmıştır (Ceriotti vd 2003; Ibeagha-Awemu ve Erhardt, 2005)

Mikrosatelitler yanı sıra başka biyokimyasal belirteç sistemleri de kalıtsal nitelendirme çalışmalarında kullanılmıştır (Moazami-Goudarzi vd 1997; Kantanen vd 1999) Ağırlıklı olarak AFLP (Negrini vd 2007), mtDNA (Loftus vd 1994; Bradley vd 1996; Finnilä vd 2001; Mannen vd 2004) ve Y kromozomuna özgün mikrosatelitlerden yararlanılsa da, SNP belirteçleri de kullanılmaya başlanmıştır (Li vd 2006; McKay vd 2008). Ayrıca, belirteç sistemleri dışında, aile ağacı kayıtları da kalıtsal nitelendirme çalışmalarında kullanılır (Trinderup vd 1999; Honda vd 2006).

Mikrosatelit belirteçler kullanılarak sığır ırkları üzerinde yapılan analizlerde, Taurin ve Zebu sığır karışımı bulunmamışsa da, Y kromozomu ve mtDNA gibi başka belirteç sistemleriyle yapılan çalışmalar bir arada değerlendirildiğinde, Y kromozomu belirtecinin verilerinde, bu ırklarda Zebu karışımının bulunduğu bulgulanmıştır (Lirón vd2006).

Bitkiler, deniz ürünleri ve çeşitli hayvan türleriyle gerçekleştirilen moleküler araştırmalarda, SNP'ler çokca ve beraberce kullanılmaktadır (Trinderup vd 1999; Honda vd 2006).

Sonuç olarak; daha önce birçok belirteç sistemi kullanılmışken, PCR sonrasında onunla birlikte mikrosatelitler ağırlık kazanmışlardır. Özellikle son yıllarda da, SNP belirteç çalışmaları artmış ve SNP çipleri oluşturulmaya başlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çalışmalarında ISSR kullanan araştırmacılar genellikle ISSR'in öncül bir sekans bilgisi gerektirmemesi, basit ve çabuk operasyonu, laboratuvar seviyesinde çalışılabilmesi ve güvenilir olması, dengeli olması, radyoaktivite gerektirmemesi gibi nedenlerden dolayı tercih etmektedirler. Korunga bitkisi üzerinde yapılan çalışmalar ise genel olarak Yunanistan bölgesinde yoğunlaşmış, araştırmacılar buralardaki genetik çeşitlilik ve fenotipik özellikleri ISSR yoluyla analiz ederek yorumlamışlardır.

Abraham vd. (2015) çalışması Yunanistan'da bir bölgede korunga bitkisinin ortamı, çeşitliliği ve etrafındaki türlere göre genetik çeşitliliğini haritalamak amacıyla yapılmış ve ISSR moleküler belirteçleriyle sonuç almaya çalışmıştır. ISSR analizlerini sağlayabilmek ve sekansları basitleştirmek için yedi oligonükleotid PCR yükseltmesi ISSR belirteçleriyle belirtilmiştir. ISSR'ların dominant belirteçler olduğu deneyde her bir belirtecin bir fenotipi belirtmesi amaçlanmıştır ve sadece kararlı bir şekilde tespiti sağlanan belirteçler analiz edilmiştir. Bu şekilde belirteçlerin varlığı ve yokluğu ile sayısal veriler atanarak oluşturulan niteliksel veritabanı Hardy-Weinberg eşitliğini kullanan POP-GENE 1.32 versiyonuna yüklenmiştir. Ayrıca Shannon endeksi  $H = -\sum p_i \log_2 p_i$  olarak hesaplanmıştır ki "pi" ISSR belirteçlerinin belirlenmiş bir grup ya da bölgedeki varlığı ve yokluğunun sıklığını belirtmektedir. Toplamda toplanan 7 seçilmiş ISSR belirteci ile 92 bölgenin analizine ulaşılmıştır. Bunlardan %78.26'sı polimorfik %21.74'ü ise türler içi ve arasında monomorfik çıkmıştır. Shannon endeksi HW eşitliğine dayanmadığı için daha güvenilir olduğundan daha az tarafsız olduğu için hesaplanmıştır. ISSR belirteçleri aracılığıyla hesaplanan genetik çeşitlilik analizinde, araştırmanın yapıldığı bölgedeki korunga çeşitliliği hakkında bilgilere ulaşılmıştır. Bilgilere göre Shannon Endeksi 0.269 ila 0.340 arasında belirlenmiştir. AMOVA analizine göre ise genetik çeşitliliğin %91'lik bölümü popülasyonlar içerisindeki farklılıklara, kalan %9'u ise popülasyonlar arasındaki farklılıklara atfedilmiştir. ISSR belirteçleri ile bulunan genetik çeşitlilik sonuçları ise çalışmanın bölgesel sınırlılıklarına bağlı olarak önemli bir sonuç ortaya koymamış, çevresel faktörlerin etkisi yorumlamasından öteye geçilmemiştir. Yine de genetik çeşitlilik çevresel faktörler dışında coğrafi uzaklıkla genetik çeşitlilik arasında bir korelasyon olduğu iddia edilmiş, aralarında uzaklık bulunan

türler arası gen aktarımının güç olması belirtilmiştir. Sonuç olarak açık alan ve ormanlık alandaki bitkilerin fenotipik özellikleri farklı bulunmuş, açık alanda yapılan otlama faaliyetleri ile bitkilerin adaptasyonu gözlemlenmiş, bu da çevrenin ekolojiye olan etkisini göstermiştir. Ormanlık alanda sayıca daha fazla bitki bulunması da daha az otlamaya yorumlanmıştır. Türlerin genetik çeşitliliği de böylece korunga bitkisinin genetik çeşitliliğinden çok çevresel etmenlere sağladığı uyuma yorumlanmıştır.

Bitkinin bölgedeki yaygınlığı sebebiyle Merkouropoulos vd. (2016) yine Yunanistan'da 3 farklı bölgede yapılan genotip ve genetik çeşitlilik araştırmasında da sırasıyla alçak (Drama), orta yükseklikte (Kilkis), ve yüksek alanda (Chalkidiki) yapılan veritabanı çalışması ile çiçek döneminde (Haziran 2013) alınan örnekler Atina Üniversitesine götürülerek muhafaza altında incelemeye alınmış, çalışmada yine ISSR tekniği ile moleküler belirteçler vasıtasıyla tespit ve analiz yapılmıştır. İlk başta elde edilen 14 ISSR belirtecinden 9'u analizde kullanılmak üzere seçilmiş ve sonuçlar popgene 1.32 programına yüklenerek ANOVA analizi GenAlEx ver.6.5b5 ile yorumlanmıştır. İstatistiksel önem testleri 9999 permütasyon ile sağlanmış ve sıralı Bonferroni doğrulaması yapılmıştır. ISSR primerleri arasındaki genetik çeşitlilik Nei'nin genetik uzaklığına göre hesaplanmıştır (Nei, 1973). Araştırma sonucundaki bulgularda ise alçak ve orta yükseklikten alınan bitkiler arasında önemli bir farklılık gözlemlenmemiş, yüksek bölgeden alınan bitkilerde ise yaprak boyutlarında önemi yüksek olmayan küçük farklılıklar gözlemlenmiştir. Genelde alçak alandan alınan örnekler uzun bitkiler olmuşken, yüksek alandan alınan bitkilerde de alanda yapılan otlama faaliyetleri dolayısıyla daha kısa bitkiler olmuştur. Genetik analizde ise çevresel etmenlerden tamamen bağımsız olacak şekilde toplamda 105 örnek 9 ISSR primeri ile birlikte yekünde 450-3500 bp arasında değişen 721 DNA bandı oluşturmuştur. Genetik varyasyon ( $H_E$ ) 0.073 ile 0.055 arasında değişirken Shannon endeksi ise 0.085 ile 0.123 arasında bulunmuştur. Yüksek alandan alınan örneklerde bu değerler yükseltisi nispeten daha düşük olan alanlara göre daha yüksek bulunmuştur. AMOVA'ya göre de genetik çeşitliliğin %85'i popülasyonlar içindeki farklılıklara, %15'i ise popülasyonlar arasındaki farklılıklara atfedilmiştir. Popülasyonlar içerisindeki değişikliğin bu yüksek oranı *L. corniculatus* gibi yaygın, coğrafi olarak geniş çapta bulunabilen, birden fazla polen temin etme şekline sahip bir bitki için normal karşılanmıştır. Sonuç olarak sadece yüksek



bölgedeki bitkilerin genetik fenotipine ilişkin adaptasyonu ile çevresel etmenlerden ekolojik dengenin etkilenmesine ilişkin yorumlar yapılmıştır. Korunga bitkisinin popülasyonlar içindeki genetik çeşitliliği ise yükseklik ve iklimsel özelliklerle yorumlanmıştır. Bu yolla iklim değişikliklerinden nispeten daha az etkilenebilecek bu gibi bitkilerin arazi restorasyonlarında kullanılabileceği açıklanmıştır.

Kramina vd. (2016) Lotus türünde yaptığı filogeniye yönelik çalışmada nrITS ve nrETS ve plastid belirteçlerin kısmi farklılıkları ve biocoğrafik sonuçları araştırılmıştır. Lotus türü yaklaşık 130 tür bitkiyi barındırdığından eski nrITS tabanlı filogenilerin bitki çeşidinin taksonomik özellikleriyle farklılıklar göstermesi, özellikle *Dorycnium* türünün beklenmedik bir şekilde *Lotus* türünün L bölümüne yakın konumlandırılması hem yetersiz taksonomik örnekleme hem de tek bir DNA belirteci kullanımından oluştuğu belirtilmiştir. *Lotus* filogenisinin kökü, benzer veya aynı soydan gelen bitkiler ve coğrafi şablonları da özellikle tartışılmıştır. Bu çalışma Lotus türü üzerinde hem plastid hem de atomik belirteçler kullanılarak yapılan ilk çalışmadır. Araştırmadaki nrITS bölgeleri 98 Lotus türünü temsil eden 155 örnekten oluşmuştur. Sıralama yapılan nrITS, nrETS, psbA-trnH ayraç ve rps16 intronu için 54 cinsi temsil eden 70 örnek kullanılmıştır. Farklı türler olan *Dorycnium* ve *Tetragonolobus* Lotus türüne yakın konumlandırılması kanıtlanmıştır.

Plastid verilerinin analizleri Lotusun iki ayrı türe ayrımını desteklemiş, bu türler de Lotus türündeki çeşitlilik ve aynı zamanda geleneksel olarak *Dorycnium* türü altında incelenen örneklerden de oluşmuştur. Ortak atalı türlerden öncekinin tür çeşitliliği Avrupa ve Kuzey Asya'da iken, sonraki Makaronezya, Afrika ve Güney Asya'dadır. Sadece güneyli olan bitki nrITS ve nrETS verileri içerisinde çözümlenebilmiştir. Plastid, nrITS ve nrETS verilerinden elde edilen soyağaçları birden fazla küçük çaplı ortak atalı altcinslere denk gelmiş, aynı zamanda geleneksel taksonomik konseptlerden uzak bazı yerleşik türlere de denk gelmiştir. Atomik ve plastid belirteçler arasında birden fazla farklılık gözlemlenmiş ve belgelenmiştir ki sebep olarak ağ şeklinde evrim gösterilebilir. Lotus türünün mevcut coğrafi tercihleri ise muhtemel olarak hem Akdeniz bölgesindeki ekolojik değişimlerin fazla olması hem de genişlemeye yönelik türlerin artması olarak değerlendirilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Biti Materyalinin Temin Edilmesi

Bu çalışmanın bitkisel materyalinin Osmangazi Üniversitesi Öğretim Elemanlarından Prof. Dr. Süleyman Avcı tarafından diğer kısmı ise TAGEM destekli olarak yürütülmüş olan “Orta Anadolu Bölgesinden Toplanan Korunga (*Onobrychis* L.) Bitkilerinin Karakterizasyonu” projesine ait korungalardan oluşmaktadır.

Çizelge 3.1 Korunga (*Onobrychis*) türlerinin isimleri

<i>Sıra No</i>	<i>Tür No</i>	<i>Tür Adı</i>
1	4	<i>Onobrychis lasiostachya</i> Boiss. (Eskişehir)
2	5	<i>Onobrychis gracilis</i> Besser. (Adana)
3	6	<i>Onobrychis fallax</i> var. <i>longifolia</i> Aktoklu var. nov. (Malatya)
4	7	<i>Onobrychis argyrea</i> Boiss. subsp. <i>argyrea</i> Boiss. (Sivas)
5	9	<i>Onobrychis huetiana</i> Boiss. (Sivas)
6	10	<i>Onobrychis ornata</i> (Willd.) Desv. (Ankara)
7	13	<i>Onobrychis tournefortii</i> (Willd.) Desv.
8	15	<i>Onobrychis cilicica</i> Kit Tan Et Sorger
9	17	<i>Onobrychis hypargyrea</i> Boiss. (Ankara)
10	20	<i>Onobrychis armena</i> Boiss. Et Huet. (Erzincan)
11	22	<i>Onobrychis meschetica</i> Grossh (Kars)
12	33	<i>Onobrychis radiata</i> (Desf.) Bieb.(Kars)
13	34	<i>Onobrychis atropatana</i> var. <i>grandiflora</i> Aktoklu var.nov. (Kars)
14	35	<i>Onobrychis stenostachya</i> Freyn. subsp. <i>sosnowskyi</i> (Grossh.) Hedge.(Kars)
15	44	<i>Onobrychis elata</i> Boiss. Et Bal. (Nevşehir)
16	45	<i>Onobrychis armena</i> Boiss. Et Huet. (Kütahya)
17	46	<i>Onobrychis hypargyrea</i> Boiss. (Kütahya)
18	48	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop. (Kütahya)
19	51	<i>Onobrychis gracilis</i> Besser. (Kütahya)
20	54	<i>Onobrychis fallax</i> var <i>fallax</i> Freyn Et. Sint. (Malatya)
21	55	<i>Onobrychis galegifolia</i> Boiss. (Adıyaman)
22	57	<i>Onobrychis galegifolia</i> Boiss. (Antep)

Çizelge 3.1 Korunga (*Onobrychis*) türlerinin isimleri (devam)

23	60	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop. (Erzurum)
24	68	<i>Onobrychis kotschyana</i> Fenzl. (Gaziantep)
25	70	<i>Onobrychis altissima</i> Grossh. (Kars)
26	71	<i>Onobrychis hajastana</i> Grossh. (Erzurum)
27	75	<i>Onobrychis ornata</i> (Willd.) Desv. (Çankırı)
28	87	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop. (Bolu)
29	88	<i>Onobrychis pisdica</i> Boiss. (Isparta)
30	K-027	<i>Onobrychis oxyodonta</i> Boiss. (Ankara)
31	Lütfibey	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop. (Lütfibey-Ankara)
32	Özerbey- 03	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop. (Özerbey-Ankara)

Ekim işlemleri için Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde bulunan merkezlerden biri olan Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nde bulunan kontrollü seralar kullanılmıştır. Bu seralarda torf:perlit (2v/1v) karışımı harç kullanılmıştır. Her bir materyalden 11 tekerrür olacak şekilde viyollere ekim yapılmıştır. Her bir viyole 3-5 tohum yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Periyodik olarak kontrolü yapılarak sulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 15 gün sonra DNA izolasyonu için iki-üç yapraklı genç fidelerden yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri alüminyum folyaya sarılarak sıvı azota (-196°C) daldırılmıştır. Sonrasında laboratuvar ortamında sıvı azottan alınan yaprak örnekleri izolasyon çalışması için -80 C de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 Tohum örneklerinin viyollere ekilmesi

### 3.2 DNA İzolasyonu

Silika jelde kurutulmuş, taze veya herbaryum bitki materyali DNA izolasyonu aşamasına kadar  $-80^{\circ}\text{C}$  dolabında saklandı. Genomik DNA izolasyonu Lefort vd. (1998) göre gerçekleştirildi. DNA izolasyonunun aşamaları;

1. 100 mg yaprak dokusuna, 1 ml DNA ekstraksiyon solüsyonu eklendi (örnek başına 10  $\mu\text{l}$  olup, 2-merkaptanoethanol içerir).
2. Örnekler  $65^{\circ}\text{C}$ -15 dakika su banyosunda ara sıra çalkalanarak bekletildi. Sonrasında oda koşullarında soğutuldu.
3. Soğutulan örneklerin üzerine 0.7 ml kloroform/isoamil alkol (24:1) eklenerek, 20-25 defa sallanarak, karıştırılması sağlandı. Sonrasında 30 dakika buz üzerinde bekletildi.
4. 10 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Üst sıvı (süpernatant) yeni bir tüpe (yaklaşık 0.7 ml) aktarıldı.
6. Üzerine yaklaşık 0.8 ml isopropanol eklendi.
7. 15-20 dakika buz üzerinde bekletilir (ya da tercihen  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyu).
8. Bekletilen örnekler 3 dakika 14000 rpm de santrifüj edildi.
9. Ardından üst sıvı (süpernatant) atıldı.

10. Alt katı (pellete) üzerine 1 ml (%70'lik) ethanol eklendi ve 2 dakika 14000 rpm de santrifüj edildi.
11. Etanol uzaklaştırılarak pellet kurutuldu ve 50-100 µl TE (ph 8) veya H<sub>2</sub>O (nuclease free) da çözülerek pipetajla pellet oynatıldı ve gece boyu 4<sup>0</sup>C'de tutularak DNA'nın çözülmesi sağlandı.
12. 100 µl DNA için 3µ l RNase eklendi.
13. 37<sup>0</sup>C'de 20 dakika bekletilecektir. DNA miktarı ve saflığı ve PCR'da kullanılacak sulandırım oranlarının hesaplanması Nanodrop Spektrofotometre Cihazı kullanılarak tayin edildi. OD260/OD280 oranı DNA kontaminasyon oranını vermektedir. Bu oranın 1.8 ile 2.0 arasında olması temiz bir DNA izolasyonun yapıldığı anlamına gelmektedir.
14. DNA örneklerinin % 1'lik agaroz jele yüklene işlemi gerçekleştirildi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nunda (PZR) kullanılmak üzere sulandırılarak -20°C'ye kaldırılmıştır.

CTAB (Ekstrasyon Solusyonu)	%4w/v
NaCl	1.4 M
2-Mercaptoethanol	%2w/v
EDTA	20 mM
Trisma Base	100 mM
PVP-40	%3w/v

Son hacim 100 ml olacak şekilde tamamlanarak pH 8.0'a ayarlanır.

İkinci olarak, CTAB yöntemine alternatif olarak 'Qiagen DNeasy Plant Mini Kit Protokolü' kullanılmıştır. Yöntemin aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. Yaprak örnekleri (100 mg genç yaprak, 20 mg kuru yaprak) sıvı azotla birlikte havanda ezilerek, 2 ml'lik tüplere aktarıldı.
2. Tüplere 400 µl AP1 tamponu ve 4 µl RNaz eklenerek, sertçe vortexlendi. Vortexlenen karışım 10 dakika 65°C de inkübe edildi (inkübasyon süresince tüpler 2-3 kere ters çevrilerek karıştırılması sağlandı).
3. Karışıma 130 µl buffer P3 tamponu lizata eklendi ve karıştırıldı. Sonrasında buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi ve 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edildi. Lizat

- (özellikle süpernatant kısmı) pipetleme yoluyla pembe tüplere aktarılarak, 2 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi.
4. Altta toplanan fraksiyon pelete dokunmadan yeni bir tüpe aktarıldı. Hacmin toplamının 1,5 katı kadar AW1 tamponu lizata eklendi ve sonrasında pipetleyerek iyice karıştırılması sağlandı.
  5. Karışımın 650 µl’si pipetle beyaz spin kolumn tüpüne alındı (kalıntı parçacıklar da dahil olmak üzere). 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edilerek, altta kalan sıvı döküldü. Aynı işlem tekrarlandı ve süzülen sıvı alttaki tüple beraber atıldı.
  6. Spin kolumn yeni bir toplama tüpüne (2 ml’lik) yerleştirildi. 500 µl AW2 tamponu eklendi ve 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen sıvı döküldü ve toplama tüpü bir sonraki aşamada yeniden kullanıldı.
  7. Spin kolumna 500 µl AW2 tamponu eklendi ve 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolumn hiçbir yere değdirilmeden dikkatlice 2 ml’lik tüpe aktarıldı. Membran üzerine direk olarak 100 µl AE tamponu eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek (ağız açık şekilde, 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi.
  8. DNA miktarı ve saflığı işlemi ilk yöntemde kullanmış olduğumuz Nanodrop Spektrofotometre Cihazı kullanılarak tayin edildi

Her iki yöntemdeki DNA miktar ve kontaminasyon oranları karşılaştırıldığında CTAB yöntemine göre Qiagen DNeasy Plant Mini Kit Protokolü’nde çok daha yüksek oranda sonuçlar elde edilmiştir. Bu sebepten ikinci yöntem olan ‘Qiagen DNeasy Plant Mini Kit Protokolü’nden elde edilen DNA’lar kullanılmıştır.

### **3.3 ITS-PCR Reaksiyonları**

Moleküler filogenetik analiz için kullanılacak genlerin ITS-PCR aracılığıyla çoğaltılmasında kullanılan ITS primer dizileri Çizelge 3.2’de, ITS-PCR bileşenleri ve miktarları da Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 ITS primer dizileri

Genler	İleri Primer	Geri Primer	Referans
ITS	TCCTCCGCTTATTGATATGC	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Schmidt ve Schilling, 2000

Çizelge 3.3 ITS-PCR bileşenleri ve miktarları

DNA	200 ng
dNTP (2,5 mM)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µl
Primer F (10 pkmol)	1 µl
Primer R (10 pkmol)	1 µl
Buffer (5x)	5 µl
Taq Polimeraz	0,5 µl
Su	Değişken
<b>Toplam</b>	50 µl

50 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilen PCR uygulamasını takiben elde edilen PCR ürünleri 2%'lik agaroz jelde 80 V'da 40 dakika elektroforez işlemine tabii tutuldu.

### 3.3.1 ITS-PCR ürünlerinin purifikasyonları

ITS-PCR ürünlerinin purifikasyon uygulamasına, agaroz jel elektroforezi işlemi sonunda PCR ürünlerinin tek bant oluşturmasının gözlenmesiyle geçildi. Agaroz jel elektroforezini takiben elde edilen tek bantlar jelden UV altında dikkatli bir şekilde kesilerek 1.5 ml'lik tüpe alınarak tartıldı. Bant ağırlıkları bulunduktan sonra aşağıdaki protokol izlendi:

1. Jel ile 1/1 oranında olacak şekilde membran binding solusyonu eklendi ve 65 °C’de eritildi.
2. Kolon temiz tüpe takılır ve üzerine örnek yüklendi (örneğin kolonun tam ortasına bırakılmasına dikkat edildi).
3. 14000 rpm’de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi ve alt solusyon döküldü.
4. Kolona 700 µl ‘membran wash’ solusyonu eklendi. 14000 rpm’de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi ve alt solusyon döküldü.
5. ‘Membran wash’ solusyonundan 500 µl eklenerek işlem tekrarlandı. 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Kolon temiz bir tüpe takıldı (1.5 ml eppendorf tüp).
7. 25 µl ‘Nukleaz free’ su membrana değmeden ortaya bırakıldı ve 1 dakika beklendi.
8. 14000 rpm’de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj yapıldı.
9. Kolon atıldı ve tüp +4 °C’de saklandı.
10. Safılık ve miktar tayini yapıldı.

### 3.3.2 ITS-PCR sekans reaksiyonları ve dizileme

Purikasyon işlemi sonrasında agaroz jelden alınan DNA (yaklaşık 60 ng’lik) PCR tüpüne konularak, 4 dakika 94 °C’de denature edilerek buza alındı ve Çizelge 3.4’deki protokole uygun olarak hem ileri hem de geri yönde sekans PCR’ı gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4 Sekans PCR (ileri ve geri yönde) koşulları

DNA	60 ng
Premix	5 µl
Primer (1.6 pmol)	2 µl
Su	Değişken
Toplam	20 µl



Sekans PCR'ı sonrası elde edilen PCR ürünü Ageancourt ile aşağıdaki gibi temizlendi ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında yer alan Beckman CQ 8000 Genetic Analysis System aracılığı ile sekans reaksiyonu gerçekleştirildi.

1. 20µ l PCR ürününe 20 µl Ageancourt eklenerek 15000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
2. Ürün AB Gene plate alındı, üzerine %85'lik etanolden 62 µl eklendi ve 7-8 kez pipetaj edildi. 10 dakika süresinde SPRI plate üzerinde bastırıldı.
3. SPRI plate üzerindeyken alkol uzaklaştırıldı, kenarlara değmeden alkol pipet ile çekildi.
4. 100 µl %85'lik alkolden eklendive 3 dakika SPRI plate üzerinde bastırıldı.
5. Alkolün pipetle çekilmesi tekrarlandı.
6. AB Gene plate SPRI plate'den alındı ve ters şekilde 10 dakika süresinde oda koşullarında kurutuldu.
7. 40 µl SLS (her zaman taze olmasına özen gösterilir) eklendi.
8. Kuyuların içi pipetajla iyice kazındı ve örnek SLS'te iyice çözdürüldü.
9. Örnek bu plate'den alındı. Beckman sample plate'e aktarıldı (40 µl SLS+kahverengi kazıntı)
10. Buffer plate hazırlandı (Kuyuların 2/3'ü kadar mineral yağ konur).
11. Beckman'a yüklenerek sekans reaksiyonu başlatıldı.

### **3.3.3 ITS-PCR sekans sonuçların değerlendirilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulması**

Sekanslama sonucunda elde edilen ham dizilerin hizalanması MEGA 6 yazılımı kullanılarak MUSCLE algoritmasına uygun olarak gerçekleştirilecektirildi (Edgar 2004, Tamura et al. 2011). Diziler arasındaki boşluklar ileri ve geri dizilerin karşılaştırılmasıyla birlikte minimum seviyeye indirildi. Hizalama sonucunda eşit uzunlukta diziler elde etmek amacıyla trimleme işlemi yapıldı. Hizalanmış eşit uzunluktaki dizilerin eldesini

takiben çalışılan çeşitlerin evrimsel geçmişi ve moleküler filogenisi MEGA 6 yazılımı aracılığıyla Tamura-Nei modeli üzerinden ‘Maximum Likelihood’ metodu kullanılarak analiz edildi. Filogenetik ağaçların çiziminde bootstrap değerleri göz önünde bulunduruldu ve bootstrap testleri 1000 replike üzerinden yapıldı (Felsenstein 1985). Evrimsel mesafeler (pairwise distances) ‘maximum composite likelihood modeli’ kullanılarak hesaplandı.

### 3.4 ISSR-PCR Reaksiyonları

PCR reaksiyon solüsyonu toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı. İçerisinde 1X PCR tamponu, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs, 0.5 U *Taq* polimeraz, 10µM primer, distile su ve 10 ng DNA örneği bulunmaktadır (Touil ve ark. 2008).

ISSR-PCR reaksiyonu için kullanılan program:

1. 94 °C’ de 6 dakika,
2. 94 °C’ de 30 sn
3. 48 – 58 °C’ de 1 dakika
4. 72 °C’ de 45 sn

olmak üzere toplam 35 döngü olarak uygulandı (Touil ve ark. 2008).

ISSR primeri olarak ‘University of British Columbia’ tarafından üretilen ISSR primerleri (set #9) kullanıldı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 ISSR primerlerinin (set #9) baz dizilimleri

No	Primer (UBC)	Baz dizilimi (5’-3’)
1	801	3(ATA)+2(TAT)+TT
2	802	3(ATA)+2(TAT)+TG
3	803	3(ATA)+2(TAT)+TC
4	804	3(TAT)+2(ATA)+AA
5	805	3(TAT)+2(ATA)+AC
6	806	3(TAT)+2(ATA)+AG
7	807	3(AGA)+2(GAG)+GT

Çizelge 3.5 ISSR primerlerinin (set #9) baz dizilimleri (devam)

8	808	3(AGA)+2(GAG)+GC
9	809	3(AGA)+2(GAG)+GG
10	810	3(GAG)+2(AGA)+AT
11	811	3(GAG)+2(AGA)+AC
12	812	3(GAG)+2(AGA)+AC
13	813	3(CTC)+2(TCT)+TT
14	814	3(CTC)+2(TCT)+TA
15	815	3(CTC)+2(TCT)+TG
16	816	3(CAC)+2(ACA)+AT
17	817	3(CAC)+2(ACA)+AA
18	818	3(CAC)+2(ACA)+AG
19	819	3(GTG)+2(TGT)+TA
20	820	3(GTG)+2(TGT)+TC
21	821	3(GTG)+2(TGT)+TT
22	822	3(TCT)+2(CTC)+CA
23	823	3(TCT)+2(CTC)+CC
24	824	3(TCT)+2(CTC)+CG
25	825	3(ACA)+2(CAC)+CT
26	826	3(ACA)+2(CAC)+CC
27	827	3(ACA)+2(CAC)+CG
28	828	3(TGT)+2(GTG)+GA
29	829	3(TGT)+2(GTG)+GC
30	830	3(TGT)+2(GTG)+GG
31	831	3(ATA)+2(TAT)+TYA
32	832	3(ATA)+2(TAT)+TYC
33	833	3(ATA)+2(TAT)+TYG
34	834	3(AGA)+2(GAG)+GYT
35	835	3(AGA)+2(GAG)+GYC
36	836	3(AGA)+2(GAG)+GYA
37	837	3(TAT)+2(ATA)+ART
38	838	3(TAT)+2(ATA)+ARC
39	839	3(TAT)+2(ATA)+ARG
40	840	3(GAG)+2(AGA)+AYT

Çizelge 3.5 ISSR primerlerinin (set #9) baz dizilimleri (devam)

41	841	3(GAG)+2(AGA)+AYC
42	842	3(GAG)+2(AGA)+AT
43	843	3(CTC)+2(TCT)+TRA
44	844	3(CTC)+2(TCT)+TRC
45	845	3(CTC)+2(TCT)+TRG
46	846	3(CAC)+2(ACA)+ART
47	847	3(CAC)+2(ACA)+ARC
48	848	3(CAC)+2(ACA)+ARG
49	849	3(GTG)+2(TGT)+TYA
50	850	3(GTG)+2(TGT)+TYC
51	851	3(GTG)+2(TGT)+TYG
52	852	3(TCT)+2(CTC)+CRA
53	853	3(TCT)+2(CTC)+CRT
54	854	3(TCT)+2(CTC)+CRG
55	855	3(ACA)+2(CAC)+CYT
56	856	3(ACA)+2(CAC)+CYA
57	857	3(ACA)+2(CAC)+CYG
58	858	3(TGT)+2(GTG)+GRT
59	859	3(TGT)+2(GTG)+GRC
60	860	3(TGT)+2(GTG)+GRA
61	861	6(ACC)
62	862	6(AGC)
63	863	6(AGT)
64	864	6(ATG)
65	865	6(CCG)
66	866	6(CTC)
67	867	6(GGC)
68	868	6(GAA)
69	869	6(GTT)
70	870	6(TGC)
71	871	6(TAT)
72	872	2(GAT)+AGA+TAG+ATA+A
73	873	2(GAC)+AGA+CAG+ACA+A

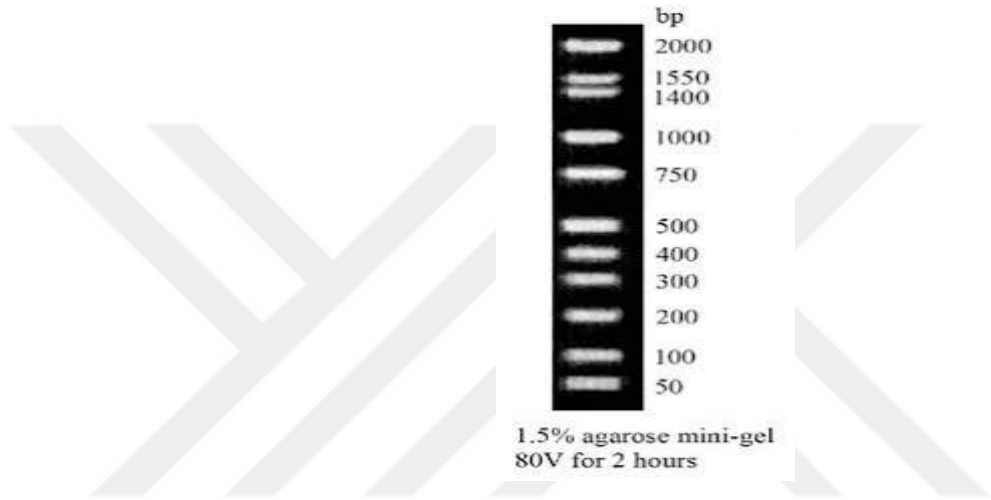
Çizelge 3.5 ISSR primerlerinin (set #9) baz dizilimleri (devam)

74	874	2(CCC)+TCC+CTC+CCT+T
75	875	2(CTA)+GCT+AGC+TAG+G
76	876	2(GAT)+AGA+TAG+ACA+A
77	877	2(TGC)+ATG+CAT+GCA+A
78	878	2(GGA)+TGG+ATG+GAT+T
79	879	CTT+CAC+TTC+ACT+TCA
80	880	GGA+2(GAG)+AGG+AGA
81	881	2(GGG)+TGG+GGT+GTG
82	882	VBV+2(ATA)+2(TAT)+AT
83	883	BVB+2(TAT)+2(ATA)+TA
84	884	HBH+2(AGA)+2(GAG)+AG
85	885	BHB+2(GAG)+2(AGA)+GA
86	886	VDV+2(CTC)+2(TCT)+CT
87	887	DVD+2(TCT)+2(CTC)+TC
88	888	BDB+2(CAC)+2(ACA)+CA
89	889	DBD+2(ACA)+2(CAC)+AC
90	890	VHV+2(GTG)+2(TGT)+GT
91	891	HVH+2(TGT)+2(GTG)+TG
92	892	TAG+ATC+TGA+TAT+CTG+AAT
93	894	TGG+TAG+CTC+TTG+ATC+ANN
94	895	AGA+GTT+GGT+AGC+TCT+TGA
95	896	AGG+TCG+CGG+CCG+CNN+NNN
96	897	CCG+ACT+CGA+GNN+NNN+NAT
97	898	GAT+CAA+GCT+TNN+NNN+NAT
98	899	2(CAT)+2(GGT)+GTT+TGT
99	900	ACT+TCC+CCA+CAG+GTT+AAC

### 3.4.1 ISSR-PCR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile yürütülmesi

ISSR-PCR reaksiyon ürünleri yatay jel elektroforezinde (Thermo, Midicell Promo) yürütülmüştür. % 1.2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Bu agaroz jel, 5XTBE stok tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. Erlen

içinde 0.5X TBE tampon ile birlikte kaynatılan % 1.2'lik agaroz jelin katılaşmamasına hususu dikkate alınarak 10X'lik 7 µl etidyum bromid ilave edilerek karıştırılmış ve yatay jel elektroforez tablasına dökülmüştür. Sonrasında ISSR-PCR reaksiyon ürünleri 9 µl örnek 1 µl yükleme tamponu her bir kuyucuğa 10 µl olmak üzere yüklenmiş olup, 90 V'ta 70 dakika süre ile yürütülmüştür. Oluşan bant profilleri BioRad Molecular Imager DocXR cihazı ile görüntülenmiştir. Her bir jelde bant büyüklüklerinin değerlendirilmesi amacıyla ilk ve son kuyucuklara 100 bç'lik DNA ladder (Thermo Scientific GeneRuler) yüklenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 DNA ladder (100 bç/Thermo Scientific GeneRuler)

#### 3.4.2 ISSR-PCR reaksiyonunda kullanılan primerlerin polimorfizm oranlarının belirlenmesi

ISSR bantlarının her biri için jel fotoğrafları üzerindeki Phoretix1DPro Software (Non-linearDynamics) programı yardımı ile veriler ikili matrisleri var (1) ya da yok (0) olarak skorlanmıştır. Çalışmış olduğumuz her bir primer için toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve polimorfizm oranları belirlenmiş olup, polimorfizm oranı ise polimorfik bant sayısının toplam bant sayısına bölündükten sonra 100 ile çarpımının sonucunda edilen değer olarak hesaplanmıştır.

#### 3.4.3 ISSR-PCR reaksiyonunun veri analizleri

Polimorfizm oranlarında elde edilen değerler kullanılarak, popülasyonlar arasındaki genetik benzerlik değerleri Jaccard indeksi ile belirlenmiştir. UPGMA programıyla

popülasyonlar arasındaki genetik ilişkileri gösteren filogenetik ağaç (denogram) çizilmiş olup, Phoretix1DPro programı kullanılarak elde edilen ikili data, UPGMA yöntemi kullanılarak Jaccard benzerlik ve mesafe verilerine ulaşılmıştır. Bu verilerle oluşturulan Newick formatındaki bilgi ile de MEGA 6.0 programıyla filogenetik ağaç (dendogram) elde edilmiştir.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 DNA Örneklerinin Kalite ve Miktar Tayinleri

DNA örneklerinin saflığı ve miktarı, spektrofotometre (Nanodrop ® 1000) cihazı yardımıyla (UV ışık altında A260 nm / A280 nm) belirlenmiştir (Çizelge 4.1). DNA örneklerinin kalite ve miktar tayinleri analizleri Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde bulunan merkezlerden biri olan Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nde bulunan Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1 DNA örneklerinin kalite ve miktar tayinleri

Sıra No	Pop. No/Çeşit Adı	Türü	DNA Miktarı ( ng/µl)	OD2 60/ OD2 80
1	4	<i>Onobrychis lasiostachya</i> Boiss.	129.7	1.84
2	5	<i>Onobrychis gracilis</i> Besser	212.2	1.89
3	6	<i>Onobrychis fallax</i> var <i>longifolia</i> Aktoklu var nov.	221.2	1.82
4	7	<i>Onobrychis argyrea</i> BOISS subsp. <i>argyrea</i> BOISS	182.0	1.89
5	9	<i>Onobrychis huetiana</i> BOISS	220.2	1.82
6	10	<i>Onobrychis ornata</i> (WILLD.) DESV	186.5	1.89
7	13	<i>Onobrychis tournefortii</i> (WILLD.) DESV	112.0	1.80
8	15	<i>Onobrychis cilicica</i> Kit Tan Et Sorger	201.6	1.81
9	17	<i>Onobrychis hypargyrea</i> BOISS	214.0	1.85
10	20	<i>Onobrychis armena</i> BOISS. ET HUET	248.5	1.86
11	22	<i>Onobrychis meschetica</i> Grossh	221.8	1.92



Çizelge 4.1 DNA örneklerinin kalite ve miktar tayinleri (devam)

12	33	<i>Onobrychis radiata</i> (DESF.) BIEB	193.4	1.87
13	34	<i>Onobrychis atropatana</i> var <i>grandiflora</i>	224.7	1.88
14	35	<i>Onobrychis stenostachya</i> FREYN subsp. <i>sosnowskyi</i> (GROSSH.) HEDGE	178.3	1.90
15	44	<i>Onobrychis elata</i> BOISS ET BAL	173.8	1.92
16	45	<i>Onobrychis armena</i> BOISS. ET HUET	196.3	1.80
17	46	<i>Onobrychis hypargyrea</i> BOISS	221.8	1.91
18	48	<i>Onobrychis viciifolia</i> SCOP	198.6	1.94
19	51	<i>Onobrychis gracilis</i> BESSER	203.7	1.98
20	54	<i>Onobrychis fallax</i> var <i>fallax</i> FREYN SINT	182.0	1.97
21	55	<i>Onobrychis galegifolia</i> BOISS	164.3	1.96
22	57	<i>Onobrychis galegifolia</i> BOISS	255.0	1.90
23	60	<i>Onobrychis viciifolia</i> SCOP	202.6	1.95
24	68	<i>Onobrychis kotschyana</i> FENZL	200.0	1.94
25	70	<i>Onobrychis altissima</i> GROSSH	151.1	1.92
26	71	<i>Onobrychis hajastana</i> GROSSH	185.5	1.82
27	75	<i>Onobrychis ornata</i> (WILLD.) DESV	246.3	1.96
28	87	<i>Onobrychis viciifolia</i> SCOP	271.6	1.89
29	88	<i>Onobrychis pisidica</i> BOISS	169.9	1.85
30	K-020	<i>Onobrychis oxydonta</i> BOISS	185.5	1.88
31	Lütfibey	<i>Onobrychis viciifolia</i> SCOP	197.9	1.99
32	Özerbey	<i>Onobrychis viciifolia</i> SCOP	195.6	1.97

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında 32 adet *Onobrychis* popülasyonunun nrDNA ITS ve ISSR dizileri aracılığıyla filogenetik ilişkileri araştırılmıştır.

## 4.2 nrDNA ITS-PCR Reaksiyonları

İlk olarak çalışılan tüm popülasyonlar için, ITS dizileri MEGA11 yazılımı aracılığıyla MUSCLE hizalama yöntemi ile hizalanmıştır (Çizelge 4.2, Tamura vd. 2021).

Çizelge 4.2 Mega11 yazılımı aracılığıyla Muscle hizalama yöntemi ile hizalanan 22 adet *Onobrychis* taksonuna ait 32 popülasyonun nrDNA ITS dizilerine ilişkin bir görüntü

Species/Abbrev	Sequence
1. O. oxyodonta Boiss (K-027)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
2. O. altissima Grossh (70)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
3. Caragana arborescens	GGTTGAGTGATGCACGAGACCATATCATGTG-AGACTC-TACCAAGCTTGGCCCTGTGACCCACATGCCTCTTTGAACGCTCATGAC
4. Caragana microphylla	GGTTGAGTGATGCACGAGACCATATCATGTG-AGACTC-TACCAAGCTTGGCCCTGTGACCCACATGCCTCTTTGAACGCTCATGAC
5. Caragana korshinskii	GGTTGAGTGATGCACGAGACCATATCATGTG-AGACTC-TACCAAGCTTGGCCCTGTGACCCACATGCCTCTTTGAACGCTCATGAC
6. O. argyrea Boiss. subsp. argyrea Boiss (7)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
7. O. armena Boiss. et Huet (20)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
8. O. armena Boiss. et Huet (45)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
9. O. atropatana var. grandiflora (34)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
10. O. cilicica Kil Tan et Sorger (15)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
11. O. elata Boiss. et Bal (44)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
12. O. fallax Freyn and Sint. var. fallax (54)	GGATGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTATGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
13. O. fallax var. longifolia Aktokku var. Nov. (6)	GGATGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTATGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
14. O. galegifolia Boiss (55)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
15. O. galegifolia Boiss (57)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
16. O. gracilis Besser (5)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
17. O. gracilis Besser (51)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
18. O. hajastana Grossh (71)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
19. O. huetiana Boiss (9)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
20. O. hypargyrea Boiss (17)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
21. O. hypargyrea Boiss (46)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
22. O. kotschyana FENZL (68)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
23. O. lasiostachya Boiss (4)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
24. O. meschelicica Grossh (22)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
25. O. ornata (Willd.) Desv (10)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
26. O. ornata (Willd.) Desv (75)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
27. O. pisidica Boiss (88)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
28. O. radiata (Desf.) Bieb (33)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
29. O. sibirica Freyn subsp. sosnowskyi (Grossh.) (30)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
30. O. tuzumeforti (Willd.) Desv (13)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGA-TCATGTG-CGGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
31. O. vicifolia Scop (48)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
32. O. vicifolia Scop (60)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
33. O. vicifolia Scop (87)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
34. O. vicifolia Scop. (Lutfibey)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC
35. O. vicifolia Scop. (Ozerbey-03)	GGTTGTGTGACCCACGAGACCGT-TCATGTG-CAGGCTC-TACCAAGATTTGGCCCTACGACCCACTTGCCTCCTTGGATGCTCATGAC

Dizilerin hizalanmasının ardından 539 baz çiftlik bir bölgesi kullanılarak yine MEGA11 yazılımı aracılığıyla ağaç çiziminde kullanılacak en iyi modele karar verebilmek amacıyla ‘Find Best DNA/Protein Models (ML)’ analizi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.3). Sonuç olarak ağaçta kullanılacak maksimum olabilirlik analizi (ML) için en uygun modelin K2+G (Kimura 2-parameter + Gamma distribution) olduğu tespit edilmiştir. Bu kararı verirken tablodaki BIC (Bayesian Information Criterion) değerlerine bakılmaktadır ve en küçük BIC değerini veren model en uygun model olarak değerlendirilir (Nei ve Kumar 2000).

Çizelge 4.3 24 farklı nükleotit substitusyon modelinin maksimum olabilirlik (ML) analizine uyumluluğu

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
K2+G	69	5049.284	4501.104	-2181.321	n/a	0.35	1.58	0.250	0.250	0.250	0.250	0.049	0.049	0.153	0.049	0.153	0.049	0.049	0.153	0.049	0.153	0.049	0.049
K2+G+I	70	5059.746	4503.629	-2181.577	0.00	0.35	1.58	0.250	0.250	0.250	0.250	0.049	0.049	0.153	0.049	0.153	0.049	0.049	0.153	0.049	0.153	0.049	0.049
T92+G	70	5060.443	4504.325	-2181.925	n/a	0.36	1.56	0.232	0.232	0.268	0.268	0.045	0.052	0.164	0.045	0.164	0.052	0.045	0.142	0.052	0.142	0.045	0.052
K2+I	69	5070.648	4522.468	-2192.003	0.38	n/a	1.49	0.250	0.250	0.250	0.250	0.050	0.050	0.149	0.050	0.149	0.050	0.050	0.149	0.050	0.149	0.050	0.050
T92+G+I	71	5071.482	4507.427	-2182.469	0.00	0.36	1.56	0.232	0.232	0.268	0.268	0.045	0.052	0.164	0.045	0.164	0.052	0.045	0.142	0.052	0.142	0.045	0.052
HKY+G	72	5076.464	4504.471	-2179.984	n/a	0.36	1.56	0.211	0.252	0.259	0.277	0.049	0.050	0.170	0.041	0.159	0.054	0.041	0.154	0.054	0.129	0.049	0.050
TN93+G	73	5078.753	4498.823	-2176.153	n/a	0.39	1.55	0.211	0.252	0.259	0.277	0.049	0.051	0.120	0.041	0.201	0.054	0.041	0.195	0.054	0.092	0.049	0.051
T92+I	70	5079.878	4523.761	-2191.643	0.38	n/a	1.48	0.232	0.232	0.268	0.268	0.047	0.054	0.160	0.047	0.160	0.054	0.047	0.138	0.054	0.138	0.047	0.054
HKY+G+I	73	5086.938	4507.008	-2180.246	0.00	0.36	1.56	0.211	0.252	0.259	0.277	0.049	0.050	0.170	0.041	0.159	0.054	0.041	0.154	0.054	0.129	0.049	0.050
TN93+G+I	74	5089.154	4501.287	-2176.378	0.52	3.65	1.55	0.211	0.252	0.259	0.277	0.050	0.051	0.121	0.041	0.200	0.054	0.041	0.194	0.054	0.092	0.050	0.051
TN93+I	73	5096.347	4516.417	-2184.950	0.38	n/a	1.48	0.211	0.252	0.259	0.277	0.051	0.052	0.113	0.043	0.202	0.056	0.043	0.196	0.056	0.086	0.051	0.052
HKY+I	72	5096.805	4524.813	-2190.155	0.38	n/a	1.48	0.211	0.252	0.259	0.277	0.051	0.052	0.166	0.042	0.155	0.056	0.042	0.151	0.056	0.126	0.051	0.052
GTR+G	76	5096.940	4493.200	-2170.320	n/a	0.40	1.56	0.211	0.252	0.259	0.277	0.082	0.058	0.119	0.068	0.199	0.044	0.047	0.194	0.030	0.090	0.040	0.028
JC+G	68	5103.709	4563.468	-2213.509	n/a	0.37	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
GTR+G+I	77	5107.995	4496.318	-2170.872	0.00	0.40	1.56	0.211	0.252	0.259	0.277	0.082	0.058	0.119	0.068	0.199	0.044	0.047	0.194	0.030	0.090	0.040	0.028
K2	68	5109.638	4569.397	-2216.474	n/a	n/a	1.43	0.250	0.250	0.250	0.250	0.051	0.051	0.147	0.051	0.147	0.051	0.051	0.147	0.051	0.147	0.051	0.051
JC+G+I	69	5114.048	4565.869	-2213.704	0.55	5.45	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
GTR+I	76	5118.149	4514.408	-2180.924	0.38	n/a	1.25	0.211	0.252	0.259	0.277	0.084	0.060	0.114	0.071	0.178	0.045	0.049	0.173	0.051	0.087	0.041	0.048
T92	69	5119.296	4571.116	-2216.327	n/a	n/a	1.43	0.232	0.232	0.268	0.268	0.048	0.055	0.158	0.048	0.158	0.055	0.048	0.137	0.055	0.137	0.048	0.055
JC+I	68	5122.632	4582.390	-2222.971	0.38	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
TN93	72	5132.977	4560.984	-2208.241	n/a	n/a	1.44	0.211	0.252	0.259	0.277	0.052	0.053	0.111	0.043	0.199	0.057	0.043	0.194	0.057	0.085	0.052	0.053
HKY	71	5135.464	4571.409	-2214.460	n/a	n/a	1.43	0.211	0.252	0.259	0.277	0.052	0.053	0.164	0.043	0.153	0.057	0.043	0.149	0.057	0.125	0.052	0.053
GTR	75	5155.234	4559.430	-2204.442	n/a	n/a	1.20	0.211	0.252	0.259	0.277	0.085	0.060	0.110	0.071	0.176	0.048	0.049	0.171	0.053	0.084	0.044	0.050
JC	67	5159.215	4626.912	-2246.238	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083

Maksimum olabilirlik analizi (ML) için en uygun modelin K2+G olduğuna karar verildikten sonra yine MEGA11 yazılımı ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur ve dizilenen *Onobrychis* popülasyonlarına ilişkin nrDNA ITS dizileri NCBI GenBank'a sunularak aksesyon kodları alınmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.1).

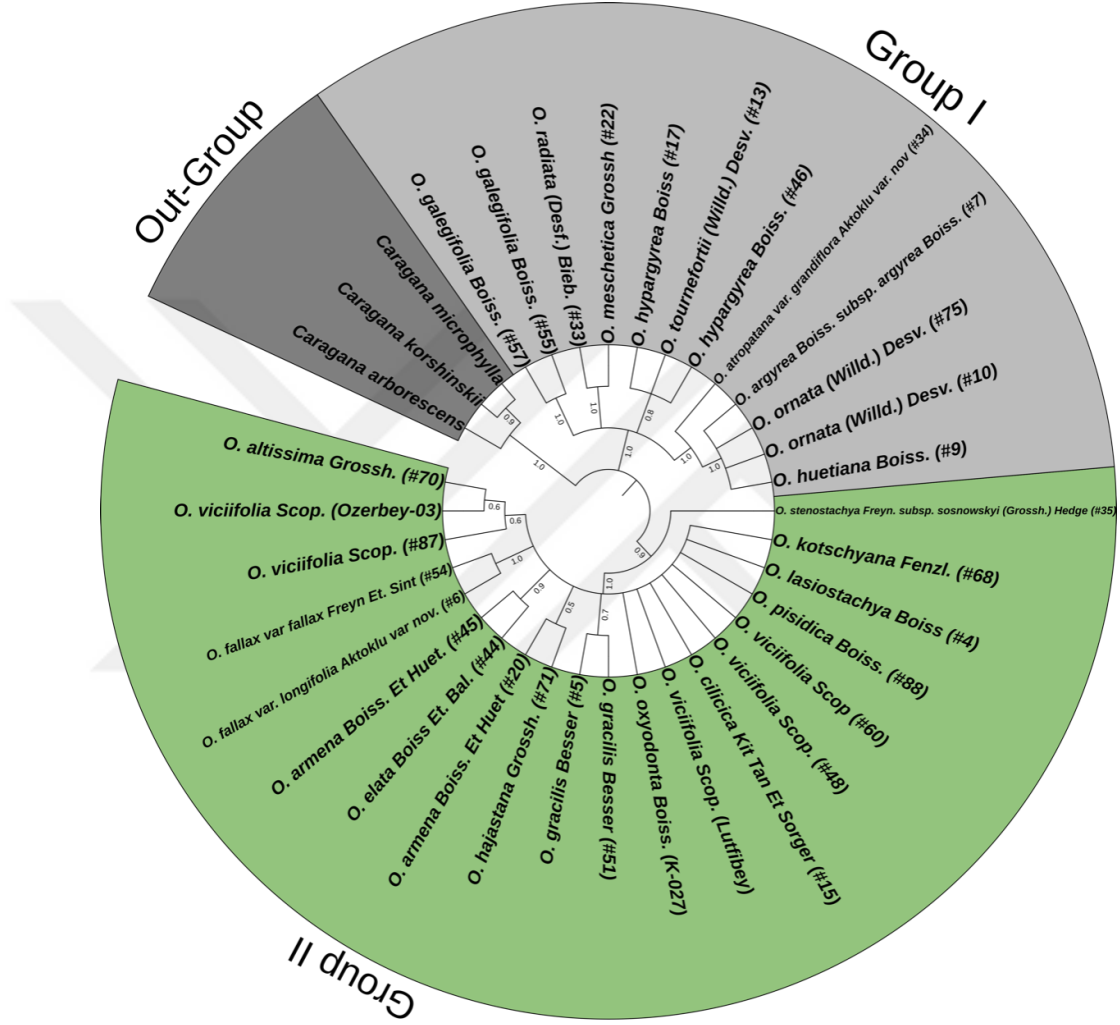
Çizelge 4.4 DNA dizi analizi gerçekleştirilen *Onobrychis* popülasyonlarının tür numaraları, popülasyon adları, lokalite ve genbank aksesyon kodları

Sıra No	Tür No	PopülasyonAdı	Lokalite	GenBank Aksesyon Kodu
1	4	<i>O. lasiostachya</i> Boiss.	Eskişehir	ON660897
2	5	<i>O. gracilis</i> Besser	Adana	ON660898
3	6	<i>O. fallax</i> var. <i>longifolia</i> Aktoklu var. nov.	Malatya	ON660899
4	7	<i>O. argyrea</i> Boiss. subsp. <i>argyrea</i> Boiss.	Sivas	ON660900
5	9	<i>Onobrychis huetiana</i> Boiss.	Sivas	ON660901
6	10	<i>Onobrychis ornata</i> (Willd.) Desv.	Ankara	ON660902

Çizelge 4.4 DNA dizi analizi gerçekleştirilen *Onobrychis* popülasyonlarının tür numaraları, popülasyon adları, lokalite ve genbank aksesyon kodları (devam)

7	13	<i>Onobrychis tournefortii</i> (Willd.) Desv.	Sivas	ON660903
8	15	<i>Onobrychis cilicica</i> Kit Tan Et Sorger	Mersin	ON660904
9	17	<i>Onobrychis hypargyrea</i> Boiss.	Ankara	ON660905
10	20	<i>Onobrychis armena</i> Boiss. Et Huet.	Erzincan	ON660906
11	22	<i>Onobrychis meschetica</i> Grossh	Kars	ON660907
12	33	<i>Onobrychis radiata</i> (Desf.) Bieb.	Kars	ON660908
13	34	<i>Onobrychis atropatana</i> var. <i>grandiflora</i> Aktoklu var. <i>nov</i>	Kars	ON660909
14	35	<i>Onobrychis stenostachya</i> Freyn. subsp. <i>sosnowskyi</i> (Grossh.) Hedge.	Kars	ON660910
15	44	<i>Onobrychis elata</i> Boiss. Et Bal.	Nevşehir	ON660911
16	45	<i>Onobrychis armena</i> Boiss. Et Huet	Kütahya	ON660912
17	46	<i>Onobrychis hypargyrea</i> Boiss.	Kütahya	ON660913
18	48	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop.	Kütahya	ON660914
19	51	<i>Onobrychis gracilis</i> Besser.	Kütahya	ON660915
20	54	<i>Onobrychis fallax</i> var <i>fallax</i> Freyn Et. Sint.	Malatya	ON660916
21	55	<i>Onobrychis galegifolia</i> Boiss.	Adıyaman	ON660917
22	57	<i>Onobrychis galegifolia</i> Boiss.	Antep	ON660918
23	60	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop.	Erzurum	ON660919
24	68	<i>Onobrychis kotschyana</i> Fenzl.	Gaziantep	ON660920
25	70	<i>Onobrychis altissima</i> Grossh.	Kars	ON660921
26	71	<i>Onobrychis hajastana</i> Grossh.	Erzurum	ON660922
27	75	<i>Onobrychis ornata</i> (Willd.) Desv.	Çankırı	ON660923
28	87	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop.	Bolu	ON660924
29	88	<i>Onobrychis pisidica</i> Boiss.	Isparta	ON660925
30	K-027	<i>Onobrychis oxyodonta</i> Boiss.	Ankara	ON660926
31	Lütfibey	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop. (Lütfibey)	Ankara	ON660927
32	Özerbey-03	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop. (Özerbey)	Ankara	ON660928

Maximum likelihood analizine göre oluşturulan ağaç tüm *Onobrychis* popülasyonlarını içerecek şekilde 2 ana gruba ayrılmıştır. Ayrıca çalışmada dış grup örnekleri olarak kullanılan üç adet *Caragana* popülasyonu da beklenildiği şekilde ayrı bir dış grup oluşturmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *Onobrychis* popülasyonlarının nrDNA ITS dizilerine dayalı olarak çizilen filogenetik ağaç (dendrogram)

Filogeni Bootsrap (1000 tekrar) metodu ile test edilmiştir ve bootsrap değerleri 0-1 arasında belirlenmiştir. Filogenetik ağaçta Grup 1'in 2 daldan (A ve B) oluştuğu ve sadece *Hymenobrychis* ve *Heliobrychis* seksiyonlarına ait 12 adet popülasyon içerdiği görülmektedir. Bu popülasyonlar *Hymenobrychis* seksiyonundan (A ve B) *O. galegolifolia* Boiss. (#55), *O. galegolifolia* Boiss. (#57), *O. radiata* (Desf.) Bieb. (#33), *O. meschetica* Grossh. (#22) *O. hypargyrea* Boiss. (#17) ve *O. tournefortii* (Willd.)

Desv. (#13) iken *Heliobrychis* seksiyonundan ise *O. atropatana* var. *grandiflora* Aktoklu var. nov. (#13), *O. argyrea* Boiss. subsp. *argyrea* Boiss. (#7), *O. ornata* (Willd.) Desv. (#75), *O. ornata* (Willd.) Desv. (#10), ve *O. huetina* Boiss. (#9) popülasyonlarıdır (Şekil 4.1).

Bu grupta *O. galegolifolia* Boiss (#55) ile *O. galegolifolia* Boiss (#57); *O. argyrea* Boiss. subsp. *argyrea* Boiss (#7), *O. ornata* (Willd.) Desv. (#75), *O. ornata* (Willd.) Desv. (#10) ile *O. Huetina* Boiss (#9) %100 bootstrap değeri ile benzer popülasyonlar olarak tespit edilmiştir. Diğer bir ifade ile bu taksonlardan elde edilen nrDNA ITS dizileri %100 benzerlik göstermişlerdir (Şekil 4.1, Çizelge 4.5).

Grup 2'nin ise 3 daldan (C, D ve E) oluştuğu ve sadece *Onobrychis* seksiyonuna ait 20 adet popülasyon içerdiği görülmektedir. C dalı sadece *O. stenostachya* Freyn. subsp. *sosnowskyi* (Grossh.) (#35) Hedge taksonundan oluşurken, D dalı ise 16 popülasyon içermektedir. Grup 2'deki diğer dal olan E ise sadece *O. vicifolia* Scop (Özerbey-03), *O. vicifolia* Scop (#87) ve *O. altissima* Grossh. (#70) popülasyonlarından oluşmaktadır (Şekil 4.1).

Grup 2'de *O. armena* Boiss et al. Huet. (#45) ile *O. elata* Boiss. et Bal. (#44) % 90 bootstrap değeri ile; *O. vicifolia* Scop (#87), *O. vicifolia* Scop (Özerbey-03) ile *O. altissima* Grossh (#70) % 60 bootstrap değeri ile benzer popülasyonlar olarak tespit edilmiştir. Yine bu grupta *O. vicifolia* Scop (#48), *O. vicifolia* Scop (#60) ile *O. vicifolia* Scop (Lütfibey) popülasyonları da benzer popülasyonlar olarak saptanmasına rağmen bootstrap değeri %50'nin altında düşük olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1, Çizelge 4.5).

Filogenetik analiz için dış grup örnekleri olarak Avcı vd. (2016)' de olduğu üzere *Caraganakorshinskii* (AY626914.3), *Caraganamicrophylla* (AY626915.2) ve *Caraganaarborescens* (DQ311963) kullanılmıştır. Beklenildiği üzere dış grup örneklerinin çalışılan *Onobrychis* popülasyonlarından uzakta ve ayrı bir grupta kümelenildiği görülmektedir (Şekil 4.1).



Çizelge 4.5 Diziler arasındaki evrimsel mesafe tahminleri (popülasyonlar için tür numaraları verilmiştir)

TÜR NO	#K-027	#70	#7	#20	#45	#34	#15	#44	#54	O#6	#55	#57	#5	#51	#71	#9	#17	#46	#68	#4	#22	#10	#75	#88	#33	#35	#13	#48	#60	#87	#Lutfibey	#Ozerbey-03
#K-027																																
#70	0,0025																															
#7	0,0628	0,0657																														
#20	0,0128	0,0110	0,0668																													
#45	0,0059	0,0042	0,0665	0,0110																												
#34	0,0640	0,0668	0,0074	0,0710	0,0676																											
#15	0,0033	0,0017	0,0664	0,0110	0,0042	0,0675																										
#44	0,0059	0,0042	0,0668	0,0110	0,0000	0,0679	0,0042																									
#54	0,0076	0,0067	0,0653	0,0153	0,0075	0,0664	0,0067	0,0076																								
O#6	0,0084	0,0076	0,0673	0,0162	0,0084	0,0685	0,0075	0,0084	0,0008																							
#55	0,0555	0,0573	0,0195	0,0614	0,0582	0,0196	0,0581	0,0584	0,0580	0,0600																						
#57	0,0554	0,0572	0,0195	0,0613	0,0581	0,0196	0,0580	0,0583	0,0579	0,0599	0,0000																					
#5	0,0050	0,0033	0,0675	0,0127	0,0058	0,0687	0,0033	0,0059	0,0084	0,0092	0,0592	0,0591																				
#51	0,0033	0,0017	0,0664	0,0110	0,0042	0,0676	0,0017	0,0042	0,0067	0,0075	0,0581	0,0580	0,0017																			
#71	0,0059	0,0059	0,0655	0,0101	0,0067	0,0666	0,0058	0,0067	0,0093	0,0101	0,0572	0,0571	0,0075	0,0058																		
#9	0,0620	0,0648	0,0000	0,0659	0,0656	0,0066	0,0655	0,0659	0,0644	0,0665	0,0187	0,0187	0,0667	0,0656	0,0646																	
#17	0,0565	0,0583	0,0178	0,0624	0,0592	0,0195	0,0591	0,0594	0,0590	0,0610	0,0050	0,0049	0,0602	0,0591	0,0582	0,0178																
#46	0,0554	0,0573	0,0169	0,0613	0,0581	0,0186	0,0580	0,0583	0,0579	0,0599	0,0041	0,0041	0,0591	0,0581	0,0571	0,0169	0,0008															
#68	0,0102	0,0093	0,0700	0,0188	0,0118	0,0712	0,0092	0,0119	0,0093	0,0102	0,0574	0,0573	0,0101	0,0093	0,0119	0,0692	0,0584	0,0573														
#4	0,0094	0,0093	0,0658	0,0136	0,0050	0,0669	0,0093	0,0050	0,0110	0,0119	0,0594	0,0593	0,0110	0,0093	0,0102	0,0649	0,0604	0,0593	0,0172													
#22	0,0616	0,0635	0,0240	0,0676	0,0623	0,0240	0,0642	0,0625	0,0620	0,0641	0,0092	0,0091	0,0653	0,0642	0,0633	0,0232	0,0092	0,0083	0,0635	0,0635												
#10	0,0619	0,0647	0,0000	0,0658	0,0655	0,0065	0,0654	0,0658	0,0643	0,0664	0,0187	0,0186	0,0666	0,0655	0,0645	0,0000	0,0169	0,0160	0,0691	0,0648	0,0231											
#75	0,0628	0,0657	0,0000	0,0668	0,0665	0,0074	0,0664	0,0668	0,0653	0,0673	0,0195	0,0195	0,0675	0,0664	0,0655	0,0000	0,0178	0,0169	0,0700	0,0658	0,0240	0,0000										
#88	0,0085	0,0067	0,0668	0,0119	0,0042	0,0680	0,0067	0,0042	0,0084	0,0093	0,0585	0,0584	0,0084	0,0067	0,0093	0,0659	0,0594	0,0584	0,0145	0,0076	0,0625	0,0658	0,0668									
#33	0,0627	0,0645	0,0249	0,0686	0,0633	0,0249	0,0652	0,0635	0,0631	0,0651	0,0100	0,0100	0,0664	0,0653	0,0643	0,0240	0,0100	0,0092	0,0646	0,0645	0,0008	0,0240	0,0249	0,0636								
#35	0,0366	0,0384	0,0573	0,0403	0,0383	0,0595	0,0392	0,0384	0,0364	0,0374	0,0481	0,0481	0,0412	0,0392	0,0393	0,0564	0,0501	0,0490	0,0395	0,0403	0,0542	0,0573	0,0573	0,0385	0,0553							
#13	0,0575	0,0594	0,0186	0,0634	0,0602	0,0204	0,0601	0,0604	0,0600	0,0620	0,0058	0,0058	0,0612	0,0601	0,0592	0,0187	0,0025	0,0016	0,0594	0,0614	0,0083	0,0178	0,0186	0,0605	0,0092	0,0511						
#48	0,0025	0,0008	0,0637	0,0102	0,0033	0,0648	0,0008	0,0033	0,0059	0,0067	0,0554	0,0553	0,0025	0,0008	0,0050	0,0628	0,0564	0,0553	0,0084	0,0085	0,0615	0,0627	0,0637	0,0059	0,0625	0,0385	0,0574					
#60	0,0033	0,0025	0,0635	0,0110	0,0042	0,0647	0,0025	0,0042	0,0058	0,0067	0,0553	0,0552	0,0042	0,0025	0,0042	0,0627	0,0562	0,0552	0,0084	0,0093	0,0613	0,0626	0,0635	0,0067	0,0624	0,0383	0,0573	0,0008				
#87	0,0025	0,0008	0,0635	0,0110	0,0042	0,0646	0,0017	0,0042	0,0050	0,0059	0,0552	0,0551	0,0033	0,0017	0,0042	0,0626	0,0562	0,0551	0,0076	0,0093	0,0613	0,0625	0,0635	0,0067	0,0623	0,0364	0,0572	0,0008	0,0008			
#Lutfibey	0,0025	0,0008	0,0636	0,0101	0,0033	0,0648	0,0008	0,0033	0,0050	0,0059	0,0554	0,0553	0,0025	0,0008	0,0042	0,0628	0,0563	0,0553	0,0076	0,0085	0,0615	0,0627	0,0636	0,0059	0,0625	0,0374	0,0574	0,0000	0,0000	0,0000		
#Ozerbey-03	0,0008	0,0000	0,0645	0,0111	0,0042	0,0657	0,0017	0,0042	0,0068	0,0076	0,0571	0,0570	0,0034	0,0017	0,0059	0,0637	0,0581	0,0570	0,0094	0,0068	0,0633	0,0636	0,0645	0,0068	0,0643	0,0379	0,0591	0,0008	0,0025	0,0008	0,0008	0,0000

Analizler maksimum olabilirlik modeli-ML kullanılarak yapılmıştır ve son veri setinde toplamda 645 nükleotit pozisyonu için analiz gerçekleştirilmiştir. Her dizi seti için (32) ‘Pairwise Deletion Option’ kullanılmıştır.

### 4.3 ISSR-PCR Reaksiyonları

ISSR-PCR analizi ile tez çalışması kapsamında yer alan 32 *Onobrychis* taksonunda toplam 99 adet University of British Colombia set#9 primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Bu ISSR primerlerinden 53 adetinin yüksek oranda polimorfik bant verdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.6 ISSR primer adları, toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve polimorfizm oranları

Sıra No	Primer Adı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Oranı (%)
1	UBC 807	26	25	96.15
2	UBC 808	28	26	92.85
3	UBC 809	16	14	87.50
4	UBC 810	29	29	100
5	UBC 811	25	24	96
6	UBC 812	21	21	100
7	UBC 813	13	10	76.92
8	UBC 814	27	25	92.59
9	UBC 815	28	27	96.43
10	UBC 816	23	23	100
11	UBC 817	18	16	88.89
12	UBC 818	28	26	92.86
13	UBC 822	26	23	88.46
14	UBC 823	24	22	91.67
15	UBC 824	19	16	84.21
16	UBC 825	25	22	88
17	UBC 826	26	25	96.15
18	UBC 827	21	19	90.48
19	UBC 834	27	26	96.30
20	UBC 835	28	28	100
21	UBC 836	18	17	94,44
22	UBC 840	28	26	92.86



Çizelge 4.6 ISSR primer adları, toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve polimorfizm oranları (devam)

Sıra No	Primer Adı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Oranı (%)
23	UBC 842	26	23	88.46
24	UBC 843	24	22	91.67
25	UBC 844	19	17	89.47
26	UBC 845	25	23	92
27	UBC 846	26	24	92.31
28	UBC 847	21	19	90.48
29	UBC 848	26	24	92.31
30	UBC 849	28	26	92.86
31	UBC 850	16	15	93.75
32	UBC 851	29	27	93.10
33	UBC 852	25	23	92
34	UBC 853	21	19	90.48
35	UBC 854	13	11	84.62
36	UBC 855	27	26	96.30
37	UBC 856	28	27	96.43
38	UBC 857	23	23	100
39	UBC 861	18	16	88.89
40	UBC 862	28	26	92.86
41	UBC 863	26	25	96.15
42	UBC 866	24	22	91.67
43	UBC 868	19	16	84.21
44	UBC 872	25	23	92
45	UBC 873	26	26	100
46	UBC 876	16	13	81.25
47	UBC 879	22	21	95.45
48	UBC 895	27	26	96.30
49	UBC 896	25	25	100
50	UBC 898	21	19	90.48
51	UBC 899	18	16	88.89

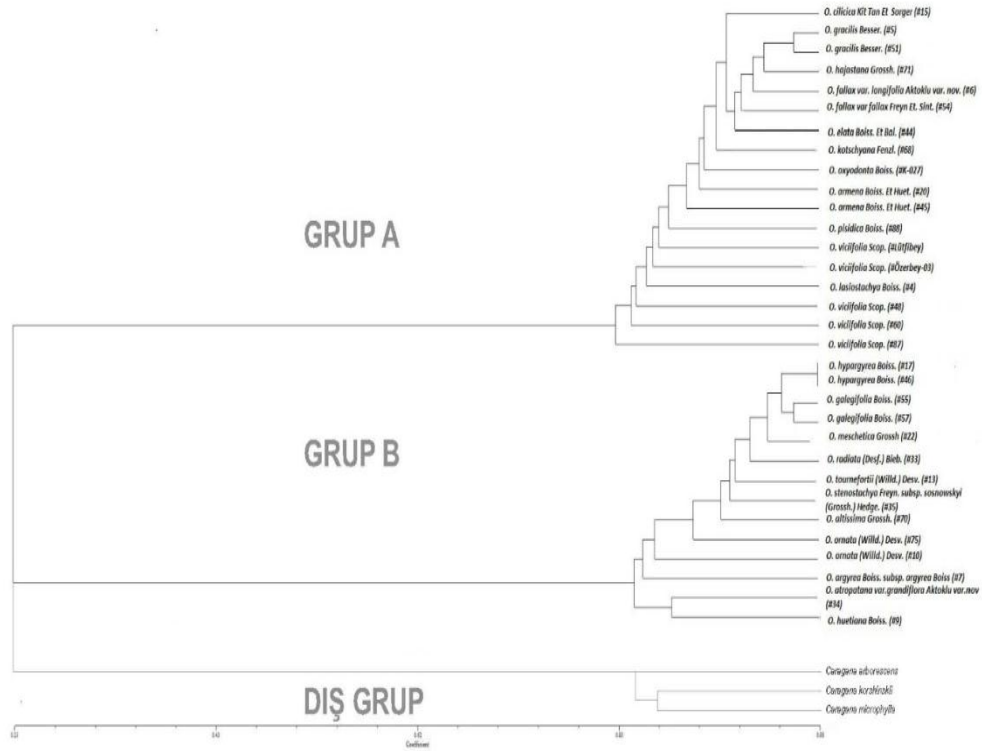
<b>Toplam Bant Sayısı</b>	<b>Polimorfik Bant Sayısı</b>	<b>Polimorfizm Oranı (%)</b>
<b>Ortalama</b>	22.92	90.88
<b>Toplam</b>	1215	1132

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında; primerlere göre toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve polimorfizm oranları tespit edilmiştir. Kullanılan bant veren 53 adet ISSR primerinden toplamda 1215 adet bant vermiş olup, bu bantların 1132 adetinin polimorfik bant sonucuna varılmıştır. Her bir primerden elde edilen bant sayısı 13 ile 29 arasında değişiklik gösterirken primer başına saptanan ortalama bant sayısı 22.92 olarak bulunmuştur. Primerlerin ortalama polimorfik bant sayısı ise 22.35 olarak saptanmıştır.

53 adet ISSR primeri arasından en fazla bant UBC 810 ve UBC 851 kodlu primerlerinden (29 adet) elde edilmiştir. En az bant ise 813 ve 854 kodlu primerlerden (13 adet) elde edilmiştir. En yüksek polimorfizm oranı UBC 812, UBC 857, UBC 873, UBC 896 ve UBC 900 kodlu primerlerden % 100 olarak elde edilmişken, en düşük polimorfizm oranı ise % 76.92 ile UBC 813 kodlu primerden elde edilmiştir. 53 adet ISSR primerlerinden elde edilen bantların polimorfizm oranlarının ortalaması ise % 90.88 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Bu tez çalışmasında; kümeleme analizi (Cluster Analysis-UPGMA) için; biyoçeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntem olan ISSR-PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen bant profillerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Her bir bantın genotiplerdeki durumuna göre excelde var-yok diğer bir ifadeyle 1-0 şeklinde veriler oluşturulmuştur ve bu veriler programa girilmiştir ve filogenetik ağaç (dendrogram) materyal ve yöntem kısmında belirtildiği üzere çizilmiştir.

ISSR-PCR reaksiyonunda kullanılan 53 adet ISSR primerinin PCR sonuçlarından elde edilen bant görünüşleri analiz edildiğinde oluşan filogenetik ağaç (dendrogram) incelendiğinde; iki ana gruba ayrıldığı (Grup A - Grup B) ve bu iki ana grubunda kendi içerisinde gruplara ayrıldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.2 32 *Onobrychis* popülasyonlarında, ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen filogenetik ağaç (dendogram)

Dış grup örneklerinin de *Onobrychis popülasyonlarından* uzakta ve ayrı bir grupta kümelandığı görülmektedir. ISSR-PCR reaksiyonunda kullanılan 53 adet ISSR primerinin PCR sonuçlarından elde edilen bant görünüşleri analiz edilmiş ve oluşan filogenetik ağaç (dendogram) incelenmiştir (Şekil 4.2). Sonuç olarak Şekil 4.2'deki *Onobrychis* popülasyonlarında, ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen filogenetik ağaç (dendogram) incelendiğinde, *Onobrychis* popülasyonlarının Grup A ve Grup B olmak üzere iki ana gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. A grubunun sırasıyla *Onobrychis* seksiyonuna ait olan; *O. cilicica* Kit Tan Et Sorger (#15), *O. gracilis* Besser. (#5), *O. gracilis* Besser. (#51), *O. hajastana* Grossh. (#71), *O. fallax* var. *longifolia* Aktoklu var. nov. (#6), *O. fallax* var. *fallax* Freyn Et. Sint. (#54), *O. elata* Boiss. Et Bal. (#44), *O. kotschyana* Fenzl. (#68), *O. oxyodonta* Boiss. (#K-027), *O. armena* Boiss. Et Huet. (#20), *O. armena* Boiss. Et Huet. (#45), *O. pisidica* Boiss. (#88), *O. viciifolia* Scop. (#Lütfibey), *O. viciifolia* Scop. (#Özerbey-03), *O. lasiostachya* Boiss. (#4), *O. viciifolia* Scop. (#48), *O. viciifolia* Scop. (#60), *O. viciifolia* Scop. (#87) popülasyonlarından

oluştugu, B grubunun ise sırasıyla; *Hymenobrychis* seksiyonuna ait olan, *O. hypargyrea* Boiss. (#17), *O. hypargyrea* Boiss. (#46), *O. galegifolia* Boiss. (#55), *O. galegifolia* Boiss. (#57), *O. meschetica* Grossh (#22), *O. radiata* (Desf.) Bieb. (#33), *O. tournefortii* (Willd.) Desv. (#13), *Onobrychis* seksiyonuna ait olan, *O. stenostachya* Freyn. subsp. *sosnowskyi* (Grossh.) Hedge. (#35), *O. altissima* Grossh. (#70), *Heliobrychis* seksiyonuna ait olan *O. ornata* (Willd.) Desv. (#75), *O. ornata* (Willd.) Desv. (#10), *O. argyrea* Boiss. subsp. *argyrea* Boiss (#7), *O. atropatana* var. *grandiflora* Aktoklu var. *nov* (#34), *O. huetiana* Boiss. (#9), popülasyonlarından oluştuğu gözlemlenmiştir.

ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen filogenetik ağacı (dendogram) detaylı bir şekilde inceleyecek olursak, 32 *Onobrychis* popülasyonunun oluşturduğu iki ana grubuna (Grup A ve Grup B) ayrıldığı ve bunların benzerlik ayrılma noktalarının sırasıyla yaklaşık olarak; %80, %82 olduğu tespit edilmiştir. En fazla benzerlik gösteren diğer iki popülasyonunda B grubunda bulunan *Hymenobrychis* seksiyonuna ait olan %98 ile *O. hypargyrea* Boiss. (#17) ve *O. hypargyrea* Boiss. (#46) olduğu tespit edilmiştir. Bunu takip eden diğer en fazla benzerlik gösteren diğer iki popülasyonunda B grubunda bulunan ve *Hymenobrychis* seksiyonuna ait olan yaklaşık olarak %96 ile *O. galegifolia* Boiss. (#55), *O. galegifolia* Boiss. (#57) popülasyonları olduğu belirlenmiştir.

A grubunda en fazla benzerlik gösteren iki popülasyonun yaklaşık %95 ile *Onobrychis* seksiyonuna ait *O. gracilis* Besser. (#5), *O. gracilis* Besser. (#51) popülasyonları olduğu bulunmuştur. *O. stenostachya* Freyn. subsp. *sosnowskyi* (Grossh.) Hedge. (#35) ve *O. altissima* Grossh. (#70) popülasyonları nrDNA ITS dizilerine dayalı olarak çizilen filogenetik ağaçta beklenildiği üzere olması gereken yerde yani *Onobrychis* seksiyonlarının olduğu grupta yer alırken ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen filogenetik ağaçta, *Hymenobrychis* ve *Heliobrychis* seksiyonlarının yer aldığı B grubunda konumlanmıştır. Bu filogenetik çalışmalarda karşılaşılabilen bir durumdur. Fakat bu sonuç bize nrDNA ITS dizilerine dayalı olarak çizilen filogenetik ağacın, ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen filogenetik ağaca göre *Onobrychis* popülasyonlarını ayırma gücünde çok daha başarılı olduğunu gösterebilir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Korunga en önemli yem bitkilerinden biri olup, aynı zamanda farklı özellikte topraklarda yetişebilir ve kuraklığa dayanabilir. Hayvan besleme yönünden paha biçilemeyen bir bitki olması, çok çeşitli uyum yeteneğine sahip olması, ürün vermeyen ve çorak topraklarda dahi yetişebilmesi, toprak ıslahında önemli bir yeri olmasını sağlamaktadır (Açıkgöz, 2001).

Lewke Bandara vd. (2013) nukleer (ITS) ve kloroplast (matK) markörleri sistemleriyle 41 farklı *Onobrychis* türünde moleküler analizler yapmışlardır. Bu markörlerin bazı *Onobrychis* türleri arasında ayırım yapma anlamında yetersiz kaldığını göstermişlerdir.

Amirahmadi vd. (2016) tarafından *Onobrychis* türlerinde altcins ve seksiyonlar için monofili ve aralarındaki ilişkiyi değerlendirebilmek için yapılan çalışmada ITS ve 3 farklı kloroplast bölgesiyle (trnL-F,rpl32rpl32-trnL(UAG) ve ndhF- rpl32) filogeni analizleri gerçekleştirmişlerdir. Bu analizler sonucunda *Onobrychis* cinsinin monofiletik olarak 2 ayrı gruptan oluştuğu ve bunun yanında mevcut olan taksonomik sınıflandırmasına yeni seksiyonlar olan *Lipskyanae* ve *Litvinovianae* seksiyonları, *Onobrychis* cinsinin altcinslerinden olan *Sisyrosema* altcinsine eklenerek revize edildiği ortaya konmuştur. Buradan da *Onobrychis* cinsi ile ilgili daha fazla tür ve DNA markörleri ile analizin gerekli olduğu vurgulanmıştır.

Kaveh vd. (2018) *Onobrychis* cinsi içerisinde yer alan bazı türlerde nukleer (ITS) ve 3 farklı kloroplast sekansı ile (trnL-F, rpl32-trnL (UAG) ve ndhF-rpl32) moleküler filogenetik analizler yapmışlardır. Filogeni sonuçlarından *Heliobrychis* seksiyonunun monofiletik olduğu ve 2 ayrı gruptan oluştuğunu tespit etmişlerdir ve bunun yanı sıra bazı karakterler (yaşam döngüsü, tohum sayısı vb.) analiz edilmiş ve türlerin çoğunun çok yıllık olduğunu vurgulamışlardır.

Çalışmalarında ISSR kullanan araştırmacılar genellikle ISSR'ın öncül bir sekans bilgisi gerektirmemesi, basit ve çabuk operasyonu, laboratuvar seviyesinde çalışılabilmesi ve güvenilir olması, dengeli olması, radyoaktivite gerektirmemesi gibi nedenlerden dolayı

tercih etmektedirler. Korunga bitkisi üzerinde yapılan çalışmalar ise genel olarak Yunanistan bölgesinde yoğunlaşmış, araştırmacılar buralardaki genetik çeşitlilik ve fenotipik özellikleri ISSR yoluyla analiz ederek yorumlamışlardır (Abraham vd. 2015, Merouropoulos vd. 2016).

Abraham vd. (2015) çalışması Yunanistan'da bir bölgede korunga bitkisinin ortamı, çeşitliliği ve etrafındaki türlere göre genetik çeşitliliğini haritalamak amacıyla çalışma gerçekleştirilmiş ve ISSR moleküler belirteçleriyle sonuç almaya çalışmıştır. Toplamda 7 adet seçilmiş ISSR belirteci ile 92 adet bölgenin populasyon analizleri yapılmıştır. Bunlardan %78.26'sının polimorfik %21.74'ü ise türler içi ve arasında monomorfik olduğu tespit edilmiştir.

Merkouropoulos vd. (2016) yine Yunanistan'da 3 farklı bölgede yapılan genotip ve genetik çeşitlilik araştırmasında da sırasıyla alçak (Drama), orta yükseklikte (Kilkis), ve yüksek alanda (Chalkidiki) yapılan veritabanı çalışması ile çiçek döneminde (Haziran 2013) alınan örnekler Atina Üniversitesine götürülerek muhafaza altında incelemeye alınmış, çalışmada yine ISSR tekniği ile moleküler belirteçler vasıtasıyla tespit ve analiz yapılmıştır. İlk başta elde edilen 14 ISSR belirtecinden 9'u analizde kullanılmak üzere seçilmiş ve sonuçlar popgene 1.32 programına yüklenerek ANOVA analizi GenAlEx ver.6.5b5 ile yorumlanmıştır. İstatistiksel önem testleri 9999 permütasyon ile sağlanmış ve sıralı Bonferroni doğrulaması yapılmıştır. ISSR primerleri arasındaki genetik çeşitlilik Nei'nin genetik uzaklığına göre hesaplanmıştır (Nei, 1973). Araştırma sonucundaki bulgularda ise alçak ve orta yükseklikten alınan bitkiler arasında önemli bir farklılık gözlemlenmemiş, yüksek bölgeden alınan bitkilerde ise yaprak boyutlarında önemi yüksek olmayan küçük farklılıklar gözlemlenmiştir. Genelde alçak alandan alınan örnekler uzun bitkiler olmuşken, yüksek alandan alınan bitkilerde de alanda yapılan otlama faaliyetleri dolayısıyla daha kısa bitkiler olmuştur. Genetik analizde ise çevresel etmenlerden tamamen bağımsız olacak şekilde toplamda 105 örnek 9 ISSR primeri ile birlikte yekünde 450-3500 bp arasında değişen 721 DNA bandı oluşturmuştur. Genetik varyasyon ( $H_E$ ) 0.073 ile 0.055 arasında değişirken Shannon endeksi ise 0.085 ile 0.123 arasında bulunmuştur. Yüksek alandan alınan örneklerde bu değerler yükseltisi nispeten daha düşük olan alanlara göre daha yüksek bulunmuştur. AMOVA'ya göre de genetik

çeşitliliğin %85'i popülasyonlar içindeki farklılıklara, %15'i ise popülasyonlar arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı sonucuna varmışlardır.

Morfolojik karakterler incelenerek gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasında, Avcı (2010) farklı lokasyonlardan toplanmış bazı yabancı korunga türleri için morfolojik ve fenolojik (yaprakçık eni, yaprakçık boyu, dal uzunluğu, dal kalınlığı, çiçek boyu, anter boyu, filament boyu gibi özellikler) gözlemler tespit edilmiştir. Analizler sonucunda 27 türün arasında yüksek oranda varyasyon ortaya konmuştur. Bunun yanında tür içi popülasyonlarda bazı türlere ait popülasyonlar arasında önemli oranda farklılıklar gözlemlenmiştir.

Avcı vd. (2016) Türkiye'de doğal olarak yetişen *Onobrychis* ve *SisYROSEMA* alt cinsine ait 5 adet seksiyon (*Dendobrychis*, *Lophobrychis*, *Onobrychis*, *Heliobrychis* ve *Hymenobrychis*) 36 adet *Onobrychis* taksonundan 49 popülasyonun filogenetik ilişkileri nrDNA ITS dizileri yardımıyla belirlendi. Tüm popülasyonlar için, filogenetik bir ağaç oluşturmak için ITS dizilerininin 577-bp'lik bir bölgesi kullanıldı.

nrDNA ITS dizilerine dayalı olarak çizilen filogenetik ağacın ve ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen filogenetik ağacı birlikte değerlendirecek olursak, çok büyük oranda uyumun sağlandığını görmekteyiz. Her iki filogenetik ağaçta da 2 büyük ana grubun oluştuğunu, bu iki büyük ana grubunda seksiyonlarının aynı popülasyonlardan meydana geldiği gözlemlenmiştir. Filogenetik analiz için kullanılan dış grup örnekleri olan *Caraganakorshinskii* (AY626914.3), *Caraganamicrophylla* (AY626915.2) ve *Caraganaarborescens* (DQ311963) beklenildiği üzere her iki yöntemle çizilen filogenetik ağaçta da *Onobrychis* popülasyonlarından uzakta ve ayrı bir grupta kümelendiği tespit edilmiştir. Yalnızca. *O. stenostachya* Freyn. subsp. *sosnowskyi* (Grossh.) Hedge. (#35) ve *O. altissima* Grossh. (#70) popülasyonları nrDNA ITS dizilerine dayalı olarak çizilen filogenetik ağaçta beklenildiği üzere olması gereken yerde yani *Onobrychis* seksiyonlarının olduğu grupta yer alırken ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen filogenetik ağaçta, *Hymenobrychis* ve *Heliobrychis* seksiyonlarının yer aldığı B grubunda yer almıştır. Bu da bize nrDNA ITS-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen sonuçların ISSR-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen

sonuçlara göre *Onobrychis* popülasyonlarını ayırma gücünde çok daha başarılı olduğunu gösterebilmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması, önemli bir yem bitkisi olan korunganın, moleküler olarak genetik çeşitliliğin ve gen yapısının ortaya çıkartılması ve böylece yapılacak olan diğer çalışmalara türün kendisinin veya yakın akraba türlerinin ıslahı, genetik ve morfolojik karakterizasyon çalışmalarına olanak sağlama anlamında etkili bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle sıradışı alanlarda yetişen korunga gibi yem bitkilerinin genomlarının moleküler analizlerle ortaya çıkarılması, bu tür üzerinde yapılan ıslah çalışmalarının hızlanarak, daha üstün özellikli yeni korunga popülasyonların geliştirilmesine ve böylece bu türün tarımının yaygınlaşmasının sağlanmasında da önemli rollere sahip olacaktır.

Aynı zamanda bu tez çalışması, korunga yem bitksinin genetik çeşitliliği, popülasyon ve popülasyonlar arası varyasyonu belirlemede imkan sağlaması anlamında ve de türün genetik yapısının ortaya çıkarılarak, biyoçeşitliliğinin geliştirilmesinde, bundan sonraki yapılacak olan çalışmalara ışık tutma niteliği sağlayacaktır.



## KAYNAKLAR

- A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: The Near East. *Mol Ecol.* 8: 2015–2022.
- Abajian, C. (1994) SPUTNIK: <http://espressosoftware.com/sputnik/index.html>.
- Açıkgöz, E. 2001. Yem Bitkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. 3. Baskı.
- Adam-Blondon, A.F., Seignac, M., Bannerot, H. and Dron, M. 1994. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 88; 865-870.
- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropolous, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R. and Venter, J.C. 1991. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651-1656.
- Agarwal M, Shrivastava N, Padh H, 2008. Advances in Molecular Marker Techniques and Their Applications in Plant Sciences. *Plant Cell Reports* 27(4): 617-631.
- Agarwal, P. and States, D.J. 1994. The repeat pattern toolkit (RPT): analyzing the structure and evolution of *C. elegans*. *Proc. Int. Conf. Intell. Sys. Mol. Biol.* 2: 1–9.
- Aggarwal, R.K., Hendre, P.S., Varshney, R.K., Bhat, P.R., Krishnakumar, V., Singh, L. 2006. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 359-372.
- Akçelik, E., Avcı, S., Uzun, S., Sancak, C. (2012). Karyotype analysis of some *Onobrychis* (Sainfoin) species in Turkey, *Arch. Boil. Sci., Belgrade*, 64(2), 567571.
- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Cregan, P. B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean, *Genetics*, 134; 1131-1139.
- Aksoy, F., 2011. Ballı Bitkiler II. Arıcılık Araştırma Dergisi. Sayı 5, sayfa 32–33. Ordu.
- Aktoklu (1995). Web Sitesi: <https://www.bizimbitkiler.org.tr/>
- Aktoklu E (2001) Two New Varieties and a New Record in *Onobrychis* from Turkey. *Turk J Bot.* 25 (5):359-363.
- Aktoklu, E. 1995. Türkiye’de yetişen *Onobrychis* Miller (Fabaceae) türlerinin revizyonu. T.C. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Al Zahim, M., Newbury, H.J. and Ford Lloyd, B.V. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. *Hort. Sci.* 32; 1102- 1104.
- Allegrucci, G., Caccone, A., Cataudella, S., Powell, J.R. and Sbordoni, V. 1995. Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Marine Biology* 121; 591-559.
- Altın, M., Gökkuş, A., Koç, A., 2005. Çayır Mera Islahı. Tarım ve Köyişleri Bak. Çayır-Mera Yem Bitkileri ve Havza Geliştirme Daire Başkanlığı. Mart Matbaası. Sayfa 40-41. Ankara.

- Amirahmadi A, Kazempour-Osaloo S, Kaveh A, Maassoumi AA, Naderi R 2016. The Phylogeny and New Classification of the Genus *Onobrychis* (*Fabaceae-Hedysareae*): Evidence from Molecular Data. *Plant Syst. Evol.* 302:1445–1456
- Aranguren-Méndez J, Jordana J, Gomez M. 2002 Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. *J Anim Breed Genet.* 119(4): 256–263.
- Aras, S. 2003. Molecular discrimination of some Dogrose (*Rosa* sp.) growing around Tokat region in Turkey by RAPD markers. *Biotech. and Biotech. Eq.* 17: 27- 34.
- Arcade, A., Anselin, F., Faivre Rampant P., Lesage M.C., Laurans F., Paques, L.E. and Prat. D. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European larch and Japanese larch. *Theor Appl Genet* 100: 299-307.
- Arı, Ş. 1999. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. In :Temizkan, G., Arda, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. (ed.)İstanbul Üniv. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Uygulama Merkezi (BIYOGEN). Yayın No: 1 Sayfa 57-67, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Arnold, M.L., Buckner, C.M. and Robinson, J.J. 1991. Pollen mediated introgression and hybrid speciation in *Louisiana irises*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88; 13981402.
- Aruna, M., Austin, A. and Ozias-Akins, P. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for identifying rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120; 710-713.
- Avcı S, Tekin N, Sancak C, Özcan S, Maraghi AO. 2016. Phylogenetic Relationship of Some *Onobrychis* Taxa Naturally Grown in Turkey Based on Morphology and Nuclear Ribosomal DNA ITS Sequences. *Legume Research*, 39(5): 665-673.
- Avcı S., 2010. Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Yabani Korunga (*Onobrychis* sp.) Türlerinin Toplanması ve Morfoloji Özelliklerinin Belirlenmesi.Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Avcıoğlu, R., 1977. Baklagil Yem bitkisi Tohumluğu Üretiminde Arıcılığın Önemi. Batı Anadolu 1.Arıcılık Semineri (26–27 Aralık1977). Ege Bölge Zirai Araştırma Enstitüsü-Tarımsal Araştırma Genel Müdürlüğü Yayın No:13/19. Sayfa 73–82. Menemen-İzmir.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2<sup>nd</sup> Ed., Chapman and Hall, 684 p., New York.
- Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A. and Rao, V.R. 1997. *Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources*. IPGRI, Rome.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter J. M., Wolciechowski, M. F., Campell, C.S. Donoghue, M. J., (1995) The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 250-272.
- Baldwin, B.G., (1992) "Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: An Example from the Compositae", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1/1, 3.
- Baldwin, B.G., and Markos, S., (1999). 'Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S-26S rDNA. Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae)', *Molecular Phylogeny evolution*, 10, 449-463
- Banke, S., Frisvad, J.C. and Rosendahl, S. 1997. Taxonomy of *Penicillium chryogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. *Mycol. Res.*, 101; 617-624.

- Bark, O. H., and Havey, M.J. 1995. Similarities and relationship among population of the bulb onion as estimated by RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 90:407-414.
- Barua, U.M., Chalmers, K.J., Hackett, C.A., Thomas, W.T.B., Powell, W. and Waugh, R. 1993. Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. *Heredity* 71; 177-184.
- Beaver, J.A. and Lezzoni, A.F., 1993. Allozyme inheritance in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*L.). *Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118; 873-877.
- Beckmann, J.S. and Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*, 67; 35-43.
- Beckmann, J.S. and Soller, M., 1986. Restriction Fragment Length Polymorphism and Genetic Improvement of Agricultural Species. *Euphyt*, 35; 111-124.
- Behl R, Sheoran N, Behl J, Vijn RK. Genetic analysis of Ankamali pigs of India using microsatellite markers and their comparison with other domesticated Indian pig types. *J Anim Breed Genet.* 123(2): 131–135, 2006.
- Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27: 573–580.
- Bizzaro, J.W. and Marx, K.A. 2003. Poly: a quantitative analysis tool for simple sequence repeat (SSR) tracts in DNA. *BMC Bioinformatics* 4: 22.
- Bogoyavlensky, G. S., 1975. The multiplicity of visits to sainfoin by honey bees and its importance for the yield of seeds. *Proc.3rd Int. Sym. Pollination* (May 15th-18th, 1979). *Suppl. Apic.* 2: 121–127. Prague.
- Boisser, B.E, 1843. *Diagnose Series.* 1(2), 91-98.
- Boissier, P.E. 1872. *Flora Orientalis. Enumeratio Plantarum in Oriente, A Graecia et Aegypto ad Indiae Fines Hucusque Observatorum.* Vol.2, Genevae et Basileae Apud H. Georg, Biplipolam Lugduni Apud Eundem, 65, Rue de Lyon, p. 535-553.
- Boskovic, R. and Tobutt, K. R., 1996. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90: 245-250.
- Bothmer, R., Van., Jacobsen, N., Baden, C., Linde-Laursen, I. and Jorgensen, R.B. 1991. An ekogeographical study of the genus *Hordeum*. *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genopools.* 7. Int. Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. and Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32; 314-331.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Of Human Genet.*, 32; 314-331.
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature.* 368(6470): 455–457.
- Boyko AR, Boyko RH, Boyko CM, Parker HG, Castelhana M, Corey L, Degenhardt JD, Auton A, Hedimbi M, Kityo R, Ostrander EA, Schoenebeck J, Todhunter RJ, Jones P, Bustamante CD. 2009. Complex population structure in African village dogs and its

- implications for inferring dog domestication history. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(33): 13903–13908.
- Braaten, D.C., Thomas, J.R., Little, R. D., Dickson, K. R., Goldberg, I., Schessiner, D., Ciccodiola, A. and Durso, M. 1988. Locations and contexts of sequences that hybridize to poly (dG-dT). (dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. *Nucl. Acids Res.*, 16; 865-881. Breeding of perennial fruit crops. in: J. Janick (ed) *Plant Breeding Reviews*. John Wiley Sons, Inc: NY Vol; 397-401.
- Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P, Loftus RT. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(10): 5131–5135.
- Bradley, K.F., Rieger, M.A. and Collins, G.G. 1996. Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 36; 613-618.
- Bretting, P. K. and Widrlechner, M. P. 1995. Genetic markers and horticultural germplasm management. *Hort. Sci.*, 30 (7); 1349-1356.
- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet*. 4(11): 900–910.
- Bruns, T. D., Fogel, R. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and Sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia*, 82(2); 175-184.
- Budak, H., Bölek, Y., Dokuyucu, T. and Akkaya, A. 2004. Potential uses of molecular markers in crop improvement. *KSU Journal of Science and Engineering* 7(1); 75–79.
- Buth, D.G., (1984). 'The Application of Electrophoretic Data in Systematic Studies', *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 15, 501-522.
- Büyükasık, Y. 2002. Hatay'ın bir yıllık *Onobrychis* Miller. (Fabaceae) türlerinin morfolojik, anatomik özellikleri ve kromozom sayıları bakımından araştırılması. *Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Antakya/Hatay.*
- Byrne, M., Marquez-Garcia M. I., Üren, T., Smith, D.S. and Moran, G.F. 1996. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci the genus *Eucalyptus*. *Aust. J. Bot.*, 44; 331-341.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9; 553-557.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M., (1991). "High Resolution DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers", *Biotechnology* 9: 553-557.
- Cai X, Chen H, Wang S, Xue K, Lei C. 2006. Polymorphisms of two Y chromosome microsatellites in Chinese cattle. *Genet Sel Evol*. 38: 525–534.
- Canon J, Alexandrino P, Bessa I, Carleos C, Carretero Y, Dunner S, Ferran N, Garcia D, Jordana J, Laloë D, Pereira A, Sanchez A, Moazami-Goudarzi K. 2001. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genet Sel Evol*. 33(3): 311–332.
- Cantini, C., Iezzoni, A.F., Lamboy, W.F., Boritzki, M. and Struss, D. 2001. DNA Fingerprinting of Tetraploid Cherry Germplasm Using Simple Sequence Repeats. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1266 (2); 205-209.

- Cardle, L., Ramsey, L., Milbourne, D., Macaulay, M., Marshall, D., Waugh, R. 2000. Computational and experimental experimental characterisation of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics* 156: 847-854.
- Carolan, J. C., Hook, I. L. I., Walsh, J. J. and Hodkinson, T. R. 2002. Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of in vitro-cultured *Papaver bracteatum* (Section oxytona). *In vitro Cell. Dev. Biol.Plant.* 38; 300-307.
- Castelo, A.T., Martins W., Gao, G.R. 2002. TROLL – tandem repeat occurrence locator. *Bioinformatics* 18: 634–636.
- Cerioti G, Caroli A, Rizzi R, Crimella C. 2003.Genetic relationships among taurine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) populations as revealed by blood groups and blood proteins. *J Anim Breed Genet.* 120: 57–67.
- Cervigni, G.D.L., Paniego, N., Pessino, S., Selva, J.P., Diaz, M., Spangenberg, G., Echenique, V. 2008. Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels. *Plant Molecular Biology* 67: 11–23.
- Chen, C., Zhou, P., Choi, Y.A., Huang, S., Gmitter, F.G. 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 12481257.
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W.G., Marrazzo, M.T., Peterlunger, E. and Testoline, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach *Prunus persica* (L) Batsch] isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.*, 99; 65-72.
- Colins, G.G. and Symons, R.H. 1993. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol. Biol. Rept.* 11 (2): 105-112.
- Corpet, F., (1988). 'Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering', *Nucleic Acids Res.*, 16, 10881-10890.
- Cosse M, González S, Maldonado JE. 2007. Cross amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Genet Mol Res.* 6(4): 1118–1122.
- Costa, P., Pot, D., Dubos, C., Frigerio, J-M., Pionneau, C., Bodénès, C., Bertocchi, E., Cervera, M., Remington, D.L. and Plomion, C. 2000. A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. *Theor Appl Genet* 100: 39-48.
- Crockett, P.A., Bhalla, P.L., Lee, C.K. and Singh, M.B. 2000. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar. *Genome* 43; 317-332.
- Cymbron T, Freeman AR, Isabel Malheiro M, Vigne JD, Bradley DG. 2005. Microsatellite diversity suggests different histories for Mediterranean and Northern European cattle populations. *Proc Biol Sci.* 272(1574): 1837–1843.
- Çelik, N., 1988. Yem Bitkileri Tohum Üretiminde Arıcılığın Yeri ve Önemi. Marmara Bölgesi 1. Arıcılık Semineri Bildirileri (10–11 Şubat 1988). Sayfa 14–20. Bursa.
- Davis, G.L., M.D. McMullen, C. Baysdorfer, T. Musket, D. Grant ve ark., 1999. A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points, and 932 expressed sequence tagged sites (ESTs) in a 1736 locus map. *Genetics*, 152, 1137–1172.
- Davis, P.H. 1965-1985. Flora of Turkey and East Aegean Island. Vol. 1-9, Univ. Pres, Edinburg.

- Davis, P.H. 1988. Flora of Turkey and East Aegean Island. Vol. 10 (Supplement), Univ. Pres, Edinburg, pp. 129-131.
- De Bustos, A.C., Casanova, C., Soler, C. and Jouve, N. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 96;101-111.
- Debener, T. and Mattiesch, L. 1999. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theoret. Appl. Genet.*5; 891-899.
- Deka R, Jin L, Shriver MD, Yu LM, DeCoo S, Hundrieser J, Bunker CH, Ferrell RE, 1995. Chakraborty R. Population genetics of dinucleotide (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms in world populations. *Am J Hum Genet.* 56(2): 461-474.
- Delgrange, O. and Rivals, E. 2004. STAR: an algorithm to search for tandem approximate repeats. *Bioinformatics* 20: 2812-2820.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA mini preparation : version II. *Plant Mol. Bio. Repr*, 1; 19-21.
- Devran Z, 2003. Moleküler İşaretleyicilerin (Markörlerin) Dayanıklık Islahında Kullanılması. *Derim* 20:1-6.
- Dice L.R., 1945. Measures of The Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology*, 26, 297--302.
- Dow, B. D., Asley, M.V. and Howe, H.F. 1995 Characterization of highly variable (GA/CT)<sub>n</sub> microsatellites in the bur oak ( *Quercus macrocarpa*). *Theor. Appl. Genet.* 91:137-141.
- Downey, S.L. and Iezzoni, A.F. 2000. Polymorphic DNA markers in Black Cherry (*Prunus serotind*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 125(1); 76-80.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19; 11-15.
- Dubbs, A. L., 1968. Sainfoin as a Honey Crop. Sainfoin Symposium (December 12th-13th). Montana State University. USA.
- Dubreuil, P. and Charcosset, A. 1999. Relationships among maize inbred lines and populations from European and North-American origins as estimated using RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99; 473-480.
- Duman, H. ve Vural M. 1990. *New taxa from South Anatolia1*, Doğa TU Botanik Dergisi 14(1): 45-48.
- Ebeling, A., Klein, A. M., Schumacher, J., Weisser, W. W., Tschardtke, T., 2008. How does plant richness affect pollinator richness and temporal stability of flower visits?. *Oikos* 117: 1808-1815.
- Edwards CJ, Gaillard C, Bradley DG, MacHugh DE. Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Anim Genet.* 31: 127-130, 2000.
- Elçi, Ş., 2005. Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Sayfa 223-258. Ankara.
- Ellsworth, D.D., Rittenhouse , K.D. and Honeycutt, R.L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Bio Techniques* 14; 214-217.

- Er, C., 1995. Tarla Bitkileri Üretiminde Arıların Rolü. "Türkiye II. Teknik Arıcılık Kongresi (8-9 Şubat 1994). Ankara".T.C.Ziraat Bankası Kültür Yayınları No:28. Sayfa 159-164. Ankara.
- Ergül, A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs) Genomik DNA parmak izi analizi ile moleküler karakterizasyon. A.Ü. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi ss. 86. Ankara
- Ergül, A., Aras, S., Söylemezoğlu, G. ve Ağaoğlu, Y.S. 2002. Kalecik Karası üzüm çeşidi klonlarında AFLP ( Amplified Fragment Length Polymorphism) Tekniği ile polimorfizmin belirlenmesi. Türkiye V. Bağcılık ve şarapçılık sempozyumu. 5-9 Ekim 2002. Kapadokya- Nevşehir.Evolution 46; 337-350.
- Fabbri, A., Hormaza J.I. and Polito V.S. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120; 538542.
- Faircloth, B.C. 2008. Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. Mol. Ecol. Resources 8: 92-94.
- Finnilä S, Lehtonen MS, Majamaa K. , 2001. Phylogenetic Network for European mtDNA. *Am J Hum Genet.* 68: 1475-1484.
- Flamand JRB, Vankan D, Gairhe KP, Duong H, Barker JSF. 2003.Genetic identification of wild Asian water Buffalo in Nepal. *Anim Cons.* 6: 265- 270.
- Gao, H. and Kong, J. 2005. The microsatellite and minisatellites in the genome of *Fenneropenaeus chinensis*. DNA Sequence 16: 426-436.
- Gao, L., Tang, J., Li, H., Jia, J. 2003. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. Mol. Breed. 12: 245-261.
- Gençkan, M. 1992, Yem Bitkileri Tarımı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları no: 487, Bornova, İzmir.
- Gianfi-Anceschl, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. and Gessler, C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theor. Appl. Genet., 96; 1069-1076.
- Goodier, J.L. and Davidson, W.S. 1993. Gene mapping in fish. In: Hochachka and Mommsen (eds) Biochemistry and Molecular Biology of Fishes 2; 93-112, Elsevier Science Publishers B.V.
- Grattapaglia, D., Chapparro J., Wilcox, P., McCord, S., Werner, D., Amerson, H., McKeand, S., Bridgewater, F., Whetten, R., O' Malley, D. and Sederoff, R. 1992. Mapping in woody plants with RAPD markers: Application of RAPD technology and plant breeding. Plant Sci. Soc. Of Am. Madison, WI, pp: 37-40.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. 1996. An introduction to genetic analysis. 6th Ed., W.H. Freeman and Company, p. 916, New York.
- Grossheim, A.A. 1926. *Die Esparsetten des Kaukasus, I. Uebersicht der Arten Subsektion Macroptera* Hand-Mazz. *der Sektion Eubrychis* DC. (p.p.), Scientific Papers of the Applied Sections of the Tiflis Botanical Garden, 5:149167.
- Grossheim, A.A. 1929. *Die Esparsetten des Kaukasus, II. Uebersicht der Arten Subsektion Vulgate* Hand Mazz. *der Sektion Eubrychis* DC. (p.p.), Scientific Papers of the Applied Sections of the Tiflis Botanical Garden, 6:113-151.
- Gupta, M, Y.S. Chyi, J. Romero-Severson, J.L. Owen, 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. Theor. Appl. Genet., 89, 998-1006.

- Gülşen, O. and Mutlu, M. 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markerlar ve kullanım alanları. *Alatarım* 4(2); 27-37.
- Hall, H.G. 1998. PCR amplification of a locus with RFLP alleles specific to African honeybees. *Biochemical Genetics*, 36; 351-361.
- Handel-Mazzetti, H. 1909. *Revision der balkanischen und vorderasiatischen Onobrychis-Arten aus der Sektion Eubrychis*, *Öst. Bot. Zeitschr.*, 59:369-378.
- Hashizume, T., Sato, T. and Hirai, M. 1993. Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Japanese J. of Breeding* 43; 367- 375.
- Hedge, I.C. 1970. *Onobrychis Adans.* in Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Island*, Vol. 3, s. 560-589, Edinburg Univ. Pres, UK.
- Hedrick, P. 1992. Shooting the RAPDs. *Nature* 355; 679-680.
- Hemmat, A.M., Weeden, N.F., Manganaris, A.G. and Lawson, D.M. 1994. Molecular marker linkage map for apple. *J. Hered.* v 85:4-11.
- Hemmat, M., Weeden, N.F., Manganaris, A.G. and Lawson, D.M. 1994. Molecular marker linkage map for apple. *J. Heredity* 85; 4-11.
- Henry, R.J. 1997. *Practical applications of plant molecular biology*. Chapman & Hall, London.
- Henry, R.J. 2001. *Plant genotyping- The DNA fingerprinting of plants*. CABI Publishing, UK.
- Hiendleder S, Kaupe B, Wassmuth R, Janke A. 2002. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proc Biol Sci.* 269(1494): 893–904.
- Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B. K., (1996). *Molecular Systematics*, Massachusetts: USA: Sunderland.
- Hodkinson, T. R., Chase, M. W. and Renvoize, S. A. 2002. Characterisation of a genetic resource collection of *Miscanthus* using AFLP and ISSR PCR. *Ann. Bot.* (in press).
- Honda T, Fujii T, Nomura T, Mukai F. , 2006. Evaluation of genetic diversity in Japanese Brown cattle population by pedigree analysis. *J Anim Breed Genet.* 123: 172–179.
- Horejsi, T. and Staub, J.E. 1996. Genetic variation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) as assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genetic Resources and Crop Huber-Morath, A.* 1982. *Bauhinia*, 7(3): 178-179.
- Hormaza, J.L., Dollo, L. and Polito, V.S. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 89; 9-13.
- Hwang, M.Y., Yu, H S., Kim, T O., Yun, H C., Kim, T H., Kong, H H. and Chung, D., (1999). Phylogenetic Relationships Among *Acanthamoeba* spp. Based on PCR-RFLP Analyses of Mitochondrial Small Subunit rRNA Gene', *The Korean Society for Parasitology*, 37(3), 181-188.
- Ibeagha-Awemu EM, Erhardt G. 2005. Genetic structure and differentiation of 12 African *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds, inferred from protein and microsatellite polymorphisms. *J Anim Breed Genet.* 122(1): 12–20.
- Innis, M. A., Gelfand D. H., Sninsky, J. J. and White T. J. 1989. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Pres, 315p, NY.



- Iqbal, M.J., Paden, D.W. and Rayburn, A.L. 1995. Assessment of genetic relationships among rhododendron species, varieties and hybrids by RAPD analysis. *Sci. Hort.* 63; 215-223.
- Jayashree, B., Ferguson, M., Ilut, D., Doyle, J., Crouch, J.H. 2005. Analysis of genomic sequences from peanut (*Arachis hypogaea*) *Electronic Journal of Biotechnology* 8: 1-12.
- Jewell, E., Robinson A., Savage D., Erwin, T., Love, C.G., Lim, G.A.C., Li, X., Batley, J., Spangenberg, G.C., Edwards D. 2006. SSR Primer and SSR Taxonomy Tree: Biome SSR discovery. *Nucleic Acids Research* 34: 656–659.
- Jiang, C. and Sink, K.C. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. *Euphytica* 94; 329-333.
- Johansson, M., Ellegren, H. and Andersson, L. 1992. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *J. Hered.*, 83;196-198.
- Jongeneel, C.V., 2000. Searching the expressed sequence tag (EST) databases: panning for genes. *Brief Bioinform* 1: 76–92.
- Joshi SP, Prabhakar K, Ranjekar PK, Gupta VS, 1999. Molecular Markers in Plant Genome Analysis. *Current Science* Vol. 77, No:2.
- Joshi, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar, D.S. Brar, 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as -revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 1311–1320.
- Kaemmer, D., Weising, K., Beyermann, B., Borner, T., Epplen, J.T. and Kahl, G. 1995. Oligonucleotide fingerprinting of tomato DNA. *Plant Breeding* 114; 12-17.
- Kang BT, Kim KS, Min MS, Chae YJ, Kang JW, Yoon J, Choi J, Seong JK, Park HC, An J, Lee MH, Park HM, Lee H. 2009. Microsatellite loci analysis for the genetic variability and the parentage test of five dog breeds in South Korea. *Genes Genet Syst.* 84(3): 245–251.
- Kantanen J, Edwards CJ, Bradley DG, Viinalass H, Thessler S, Ivanova Z, Kiselyova T, Cinkulov M, Popov R, Stojanović S, Ammosov I, Vilkki J, 2009. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity.* 103(5): 404–415.
- Kantanen J, Olsaker I, Adalsteinsson S, Sandberg K, Eythorsdottir E, Pirhonen K, Holm LE, 1999. Temporal changes in genetic variation of north European cattle breeds. *Anim Genet.* 30(1): 16– 27.
- Kantanen J, Olsaker I, Holm LE, Lien S, Vilkki J, Brusgaard K, Eythorsdottir E, Danell B, Adalsteinsson S. 2000. Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *J Hered.* 91(6): 446–457.
- Kantety, R.V., M.L Rota., D.E. Matthews, M.E. Sorrells, 2002. Data mining for simple-sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum, and wheat. *Plant Mol. Biol.*, 48, 501–510.
- Karaca, M., Bilgen, M., Onus, A.N., İnce A.G., Elmasulu S.Y. 2005. Exact tandem repeats analyzer: A new program for DNA sequence mining. *J. Genet.* 84: 49–54.
- Karavaeva, R. P., Kazakbaeva, B. K., Fil'chenko, A. P., Mandychева, L. T., 1975 Pollinators of cultivated sainfoin in the cis-Issyk- Kul' area. *Entomological investigations in Kirgizia. Volume 10.: Entomologicheskies issledovaniyav Kirgizii.*
- Karp, A. and Edwards, K.J. 1997. Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. In Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A. and Rao

- V.R. (Eds.), Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of anIPGRI Workshop, 9-11 October 1995, Rome, pp. 11-38. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Karp, A., Issar, P.G. and Ingram, D.S. 1998. Molecular tools for screening biodiversity. Chapman & Hall, London.
- Kaveh A, Kazempour-Osaloo S, Amirahmadi A, Maassoumi A, Schneeweiss GM 2018. Systematics of *Onobrychis* sect. *Heliobrychis* (*Fabaceae*): Morphology and Molecular Phylogeny Revisited. *Plant Systematics and Evolution*. 305,33-48.
- Kemp, S.J., Brezinsky, L. and Teale, A. J. 1993. A panel of bovin, ovine and caprine polymorphic microsatellites. *Animal Genet.*, 24; 363-365.
- Keniry, A., Hopkins, C.J., Jewell, E., Morrison, B., Spangenberg, G.C., Edwards, D., Batley, J. 2006. Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers from *Fragaria* × *ananassa* expressed sequences. *Molecular Ecology Notes* 6: 319–322.
- Kesawat MS, Das BK, 2009. Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 12 (4),169 -181.
- Kesawat, M.S. ve B.K Das, 2009. Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. *J. Crop Sci. Biotech.*, 12 (4),169 -181.
- Khan, S. and Spoor, W., 'Use of Molecular and Morphological Markers as a Quality Control in Plant Tissue Culture', *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(4), 479-482, (2001).
- Kim, C.S., Lee, G.H., Shin, J.S., Chung, Y.S. and Hyung, N.I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nuc. Acid. Reserach*, 25(5); 1085-1086.
- Kiss, G.B., Csanadi, G., Kalman, K., Kalo, P. and Okresz, L. 1993. Construction of a basic linkage map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol. Genet.* 238; 129-137.
- Kit Tan and Sorger. 1986. New taxa from Turkey. *Plant System. and Evol.* 154: 117-120. t. 2A, 2B, 2C.
- Kleinhofs, A., Kilian, A. and Saghai-Marooof, M.A. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 705-712.
- Klein-Lankhorst, R.M., Vermut, A., Weide, R., Liharska, T. and Zabel, P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83; 108-114.
- Klug, S.W., Cummings, W.R., 2000 *Concept of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey 745 p.
- Klug, S.W., Cummings, W.R., *Concept of Genetics*, New Jersey: Prentice Hall. 745, (1989).
- Klug, W.S. and Cummings, R. M. 2002. *Genetik*. Öner, C. (eds.), Palme Yayıncılık, 381-383, Ankara
- Knapp, S. J. 1994. Selection using molecular markers indexes, p1-11. In: *Proceedings of the Second Symposium of the American Society for Horticultural Science and Crop Science of America: Analysis of Molecular Marker Data* (Corvallis, Oregon). Amer. Soc. Hort. Sci. Alexandria, Va.
- Kobayashi, N., Takeuchi, R., Handa, T. and Takayanagi. K. 1995. Cultivar identification of evergreen azalea with RAPD method. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64; 611-616.

- Kofler, R., Schlötterer C., Lelley, T. 2007. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics* 23: 1683–1685.
- Kolpakov, R., Bana G., Kucherov G. 2003. Efficient and flexible detection of tandem repeats in DNA. *Nucleic Acids Res.* 31: 3672–3678.
- Krahi, K.H., Dirr, M.A. Halward, T.M., Kochart, G.D. and Randle, W.M. 1993. Use of single-primer DNA for the identification red maple (*Acer rubrum* L.) cultivars. *J. Environ. Hort.* 11; 89-92.
- Kumar, R., 1989, The technique of polymerase chain reaction, *A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology*, 1,133-152.
- Kurata, N., Y. Umehara, H. Tanoue, T. Sasaki, 1997. Physical mapping of the rice genome with YAC clones. *Plant Mol. Biol.*, 35, 101–113.
- Kurtz, S., Choudhuri, J.V., Ohlebusch E., Schleiermacher, C., Stoye, J., Giegerich R. 2001.
- Las Heras Vazquez, F.J., Jimenez, J.M.C. and Vico, F.R. 1996. RAPD fingerprinting of pepper (*Capsicum annuum* L.) breeding lines. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 15; 37-40.
- Lawson Handley L-J, Byrne K, Santucci F, Townsend S, Taylor M, Bruford MW, Hewitt GM. 2007. Genetic structure of European sheep breeds. *Heredity*. 99: 620–631.
- Lefort, F., Lally, M., Thompon, D. and Douglas, G.C. 1998. Morphological traits microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite Oaks (*Q. Robur* L.) AT Tullynally. *Silvae Genetica*, 47; 5-6. Ireland.
- Levi, A., Rowland, J. and Hartung, J.S. 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA woody plants. *Hort Science* 28; 1188-1190.
- Lewke Bandara N, Papini A, Mosti S, Brown T, Smith LMJ 2013. A phylogenetic Analysis of Genus *Onobrychis* and Its Relationships within the Tribe *Hedysareae* (*Fabaceae*). *Turk J Bot.* 37, 981-992.
- Li J, Wang G, Bai Z. 2009. Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*. 287: 286– 291.
- Li MH, Adamowicz T, Switonski M, Ammosov I, Ivanova Z, Kiselyova T, Popov R, Kantanen J. 2006. Analysis of population differentiation in North Eurasian cattle (*Bos taurus*) using single nucleotide polymorphisms in three genes associated with production traits. *Anim Genet.* 37(4): 390–392.
- Li MH, Zerabruk M, Vangen O, Olsaker I, Kantanen J. 2007.Reduced genetic structure of north Ethiopian cattle revealed by Ychromosome analysis. *Heredity*. 98: 214–221.
- Lindqvist, C., Scheen, A.C., Yoo, M.J., Grey, P., Oppenheimer, D.G., Leebens-Mack, J.H., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Albert, V.A. 2006. An expressed sequence tag (EST) library from developing fruits of an Hawaiian endemic mint (*Stenogyne rugosa*, Lamiaceae): characterization and microsatellite markers. *BMC Plant Biology* 6: 16.
- Linneus, C. 1753. *Species Plantarum*. p.p.: 750-751.
- Lirón JP, Peral-Garcia P, Giovambattista G. 2006. Genetic characterization of Argentine and Bolivian Creole cattle breeds assessed through microsatellites. *J Hered.* 97(4): 331–339.
- Liscum, M., and Oeller, P., 1995, AFLP: not only fingerprinting, but for positional cloning, Department of Plant Biology, Carnegie Institution of Washington, Standford, CA, 94305.

- Litt, M. and Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet.* 44: 397-401.
- Liu, B.H., 1999, Introduction to Genomics, Statistical Genomics (Linkage, Mapping and QTL Analysis), CRC Press, USA, 611 p.
- Lodhi, M.A., Ye G-N., Weeden, F. and Reisch, B.I. 1994. A Simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Repr.* 12(1); 6-13.
- Loftus RT, Ertugrul O, Harba MH, ElBarody AA, MacHugh DE, Park SDE, Bradley DG. 1999.
- Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(7): 2757–2761.
- Love, J.M., Knight A.M., Mcaleer, M.A. and Todd, J.A., 1990. Towards construction of a high-resolution map of the mouse genome using PCR analysed microsatellites. *Nucleic Acids Res.*, 21; 1111-1115.
- Lowe, A. J., Hanotte, O. and Guarino, L. 1996. Standardization of Molecular Genetic Techniques for the Characterization of Germplasm Collections: The Case of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter.* 107: 50-54.
- Lörz, H., and Wenzel, G., 2004, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement, Springer, Germany, 476 p.
- Lui, Z.W., Jarret, R.L., Kresovich, S. and Duncan, R.R. 1995. Characterization and Analysis of Simple Sequence Repeat (SSR) Loci in Seashore *Paspalum* (*Paspalum vaginatum* Swartz). *Theor. Appl. Genet.*, 91; 47-52.
- Luikart G, Gielly L, Excoffier L, Vigne JD, Bouvet J, Taberlet P. 2001. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(10): 5927–5932.
- Luís C, Juras R, Oom MM, Cothran EG. 2007. Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation. *Anim Genet.* 38(1): 20–27.
- Luo, Z.R., Yonemori, K. and Sugiura, A. 1995. Evaluation of RAPD analysis for cultivar identification of persimmons. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64; 535-541.
- Lynch, M. and Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3; 91-99.
- MacHugh DE, Shriver MD, Loftus RT, Cunningham P, Bradley DG. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics.* 146(3): 1071–1086, 1997.
- Mackill, D. J., Zhang, Z. Redona, E. D. and Colowit, P. M. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977.
- Malyshev, S.V. and Kartel, N.A. 1997. Molecular markers in mapping plant genomes, *Molecular Biology*, 31(2); 163-171.
- Mannen H, Kohno M, Nagata Y, Tsuji S, Bradley DG, Yeo JS, Nyamsamba D, Zagdsuren Y, Yokohama M, Nomura K, Amano T. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Mol Phylogenet Evol.* 32(2): 539–544, 2004.

- Martin, G.B., Williams, J.G.K. and Tanksley, S.D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88; 2336-2340.
- Matukumalli LK, Lawley CT, Schnabel RD, Taylor JF, Allan MF, Heaton MP, O'Connell J, Moore SS, Smith TPL, Sonstegard TS, Van Tassell CP. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS One.* 4(4): e5350, 2009.
- Maudet C, Miller C, Bassano B, BreitenmoserWürsten C, Gauthier D, Obexer-Ruff G, Michallet J, Taberlet P, Luikart G. 2002. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: Applications in Alpine ibex [*Capra ibex(ibex)*]. *Mol Ecol.* 11(3): 421–436.
- Maughan, P.J., Maroof, M.A.S. and Buss, G. R. 1996. Molecular-marker Analysis of Seed-Weight: Genomic Locations, Gene Action, and Evidence for Orthologous Evolution Among Three Legume Species. *Theor. Appl. Genet.*, 93; 574-579.
- Maxam, A., Gilbert, W. 1977, A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-4.
- McKay SD, Schnabel RD, Murdoch BM, Matukumalli LK, Aerts J, Coppieters W, Crews D, Dias Neto E, Gill CA, Gao C, Mannen H, Wang Z, Van Tassell CP, Williams JL, Taylor JF, Moore SS. An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. *BMC Genetics.* 9: 37. 2008 from <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/9/37>.
- Meksem, K., and Kahl, G., 2005, *The Handbook of Plant Genome Mapping, Genetic and Physical Mapping*, Wiley-VCH, Weinheim, 380 p.
- Meksem, K., and Kahl, G., 2005, *The Handbook of Plant Genome Mapping, Genetic and Physical Mapping*, Wiley-VCH, Weinheim, 380 p.
- Melchinger, A.E. 1990. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding*, 104; 1-19.
- Meunier, J.R and Griment, P.A.D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144:373-379.
- Michelmore, R.W., Paran, I. and Keselsi, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci*, 88 (21): 9828–9832.
- Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9828-9832.
- Moazami-Goudarzi K, Laloë D, Furet JP, Grosclaude F. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim Genet.* 28(5): 338–345, 1997.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R., and Sasaki, T., 1997, Genome mapping molecular marker and marker-assisted selection in crop plants, *Molecular Breeding*, 3: 87-103.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R., and Sasaki, T., 1997, Genome mapping molecular marker and marker-assisted selection in crop plants, *Molecular Breeding*, 3: 87-103.

- Molae V, Osfoori R, Eskandari Nasab MP, Qanbari S. 2009. Genetic relationships among six Iranian indigenous sheep populations based on microsatellite analysis. *Small Rum Res.* 84: 121–124.
- Morgante, M. and Olivieri, A.M. 1993. PCR-Amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, 3(1); 175-182.
- Mori, M., Hosaka, K., Uemura, Y. and Kaneda, C. 1993. Rapid identification of potato cultivars by RAPDs. *Japan J. Genet.* 68; 167-174.
- Mudunuri, S.B. and Nagarajaram, H.A. 2007. IMEx: Imperfect microsatellite extractor. *Bioinformatics* 23: 1181–1187.
- Muir WM, Wong GKS, Zhang Y, Wang J, Groenen MAM, Crooijmans RPMA, Megens HJ, Zhang H, Okimoto R, Vereijken A, Jungerius A, Albers GAA, Lawley CT, Delany ME, MacEachern S, Cheng HH. 2008. Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(45): 17312-17317.
- Mukesh M, Sodhi M, Bhatia S. Microsatellite-based diversity analysis and genetic relationships of three Indian sheep breeds. *J Anim Breed Genet.* 123(4): 258–264, 2006.
- Mulcahy, D.L., Weeden, N.F., Kesseli, R. and Carroll, S.B. 1992. DNA probes for the Y chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sex Plant Report.* 5; 86-88.
- Mullis KB, 1987. Process for Amplifying Nucleic Acid Sequences. U.S. Patent No: 4,683,202.
- Mullis, K.B, Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. and Erlick, H.A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51; 263-273.
- Muralidharan, K. and Wakeland, E.K. 1993. Concentration of primer and template qualitatively effects products in random amplified polymorphic DNA PCR. *Bio Techniques* 14; 362-363.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8(19); 4321-4325.
- Nagaraj, S.H., Gasser, R.B., Ranganathan S. 2006. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Briefings In Bioinformatics.* 8: 6-21.
- Negrini R, Nijman IJ, Milanese E, MoazamiGoudarzi K, Williams JL, Erhardt G, Dunner S, Rodellar C, Valentini A, Bradley DG, Olsaker I, Kantanen J, Ajmone-Marsan P, Lenstra JA, European Cattle Genetic Diversity Consortium. Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. *Anim Genet.* 38(1): 60–66, 2007.
- Nei M. and Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press, New York.
- Nicot, N., Chiquet, V., Gandon, B., Amilhat, L., Legeai, F., Leroy, P., Bernard, M., Sourdille, P. 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.* 109: 800–805.
- O'Hanlon, P.C., Peakall, R. and Briese, D.T. 2000. A review of new PCR based genetic markers and their utility to weed ecology. *Weed Res.* 40; 239–254.
- Oruç, F. 2009. *Olea Europaea Cv Gemlik (Zeytin) Bitkisine Ait Cdna Kütüphanesinin Hazırlanması Ve Sonuçların Bioenformatik Analiz Yöntemleri İle Değerlendirilmesi.* Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Türkiye.

- Ozad, A., 'Bazı Scorzonera L. (Asteraceae) Taksonlarının nrDNA ITS Bölgelerinin Karşılaştırılması', Yüksek lisans tezi, Rize Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Rize, (2000).
- Ozaki, T., Shimada, T., Nakanishi, T., Yamamoto, J. and Yoshida, M. 1995. RAPD analysis for parentage determination in *Prunus mume*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64; 235-242.
- Öder, E. 2006. Uygulamalı Arıcılık. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri. Sayfa 165–169. Bornova-İzmir.
- Öz Aydın S. (2004) Bazı *Satureja* Türlerinin Morfolojik, Moleküler ve Sistematik Yönden Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Balıkesir
- Özbek, H., 1992. Balarısı (*Apis mellifera* L.)'nın Bitkilerin Tozlaşmasında Kullanılması. Doğu Anadolu Bölgesi 1. Arıcılık Semineri (3–4 Haziran 1992). Atatürk Üniv. Zir. Fak. Ofset Tesisleri. Sayfa 30–47. Erzurum.
- Özbek, H., 1996. Korunga (*Onobrychis sativa* Lam.) Tohumu Üretiminde Arıların Yeri ve Önemi. Türkiye 3. Çayır-Mer'a Yem Bitkileri Kongresi (17–19 Haziran 1996). Sayfa 429–433. Erzurum.
- Özbek, H., Yıldırım, E., 1996. Korungayı Ziyaret Eden Arı (Hymenoptera: Apoidea) Türleri. Türkiye 3. Entomoloji Kongresi (24–28 Eylül 1996). Sayfa 10. Ankara.
- Paran, I. Kesseli, R. and Michelmore, R. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near isogenic lines. Genome, 34; 1021-1027.
- Parisi, V., Fonzo V.D., Aluffi-Pentini, F. 2003. STRING: finding tandem repeats in DNA sequences. Bioinformatics 19: 1733–1738.
- Parmaksız, İ. 2004. *Papaver* cinsi *Oxytona* seksiyonunun Türkiye'de yetisen türlerinde genetik çeşitliliğin RAPD markörlerle analizi. Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Paul, S., Wachira, F. I. S., Powell, W. and Waugh, R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* L.) revealed by AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 94: 255-263.
- Penner, G.A., Lee, S.J., Bezte, L.J. and Elgali, E. 1996. Rapid RAPD screening of plant DNA using dot blot hybridization. Mol. Breeding 2; 7-10.
- Perez, F., Ortiz, J., Zhinaula, M., Gonzabay, C., Calderon, J., Volckaert, F.A.M.J. 2006. Development of EST-SSR Markers by Data Mining in Three Species of Shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. Marine Biotechnology 7: 554–569.
- Phippen, W.B., Kresovich, S., Candelas, F.G. and McFerson, J.R. 1997. Molecular characterisation can quantify and partition variation among genebank holdings; a case study with phenotypically similar accessions of *Brassica oleracea* var *capitata* L. (cabbage) 'Golden Acre'. Theoretical and Applied Genetics 94; 227-234.
- Powell W., Macharay G.C. and Provan. J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Genet., 1; 215-222.
- Rangwen, R., M.S. Akkaya, A.A. Bhagwar, U:Lavi, and P.B.Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor. Appl. Genet. 90:43-48.

- Reamon Buttner, S.M. and Jung, C. 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theoretical and Applied Genetics* 100; 432-438.
- Reneker, J., Shyu, C.R., Zeng, P., Pocallo, J.C., Gassmann, W. 2004. ACMES: fast multiple-genome searches for short repeat sequences with concurrent cross-species information retrieval. *Nucleic Acids Res.* 32: 649–653.
- Ridout CR, Donini P, 1999. Use of AFLP in Cereals Research. *Trends in Plant Science.* 4:76-79.
- Ridout, C.R. and P.Donini. 1999. Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant Science.* 4:76-79.
- Robinson, A.J., Love, C.G., Batley, J., Barker, G., Edwards, D. 2004. Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer. *Bioinformatics* 20: 1475-1476.
- Robinson, J. P. and Harris, S.A., 1999, Amplified fragment length polymorphisms and microsatellites: A phylogenetic perspective, *Molecular Tools for Biodiversity*, <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/which marker/ index.htm>.
- Robinson, J.P. and Haris, S.A. 1999. Amplified lenght polymorphisms and microsatellites phenetic perspective <http://www.vebdock.sub>.
- Roder, M.S., Plaschke, J., Konig, S.U., Borner, A., Sorrels, M.E., Tanksley, S.D. and Ganal, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.*, 246; 327-333.
- Rohlf F.J., 2000. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.11. New York, Exeter, Setauket.
- Roose, M.L. and Stone, N.K. 1996. Development of genetic markers to identify two asparagus cultivars. *Acta Hort.* 415; 129-135.
- Russel, J.R., Fuller, J.D., Macaulary, M., Hatz, B.G., Jahoor, A, and Waugh, R. 1997. Direct Comparison of Levels of Genetic Variation Among Barley Accessions Detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 95; 714722.
- Saghai-Marooof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zang, Q., Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1994. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239; 937-945.
- Sağlamtimur, T. , Gülcan, H. , Tükel, T. , Tansı, V., Anlarsal, A. E. ve Hatipoğlu, V,1986. Çukurova Koşullarında Yem Bitkileri Adaptasyon Denemeleri.Çukurova Üniversitesi Ziraat, Fakültesi, Dergisi, Cilt:1, Sayı:3.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 937-945.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anamia. *Science* 230; 1350-1354.
- Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989 *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory Press New York.
- Sanger, f., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.



- Sanger, f., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.
- Schlotterer, C. and Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20: 211-215.
- Schlotterer, C., 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.*, 5, 63-69.
- Scribner, K.T. and Pearce, J.M. 2000. Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. In; Baker, A. (ed): *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell, London, pp. 235–271.
- Seifert, K. A., Louis-Seize, G. and Savard, M. E. 1997. The phylogenetic relationships of two trichothecene-producing hyphomycetes, *Spicellum roseum* and *Trichothecium roseum*. *Mycologia*, 88; 250-257.
- Serin, Y. ve Tan, M. 2001. Baklagil Yem Bitkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, yayın no: 190, 49-66 s., Erzurum.
- Sharma, P.C., Grover, A., Kahl, G. 2007. Mining microsatellites in eukaryotic Genomes. *Trends in Biotechnology* 25: 490-498.
- Shim, S.I. and Jorgensen, R.B. 2000. Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 101; 227-233.
- Singan, V. and Colbourne, J.K. 2005. MicrosatDesign is a pipeline for transforming sequencer trace files into DNA markers. CGB Technical Report 2005–01. The Center for Genomics and Bioinformatics, Indiana University, Bloomington.
- Sirjaev, G. 1925. *Onobrychis Generis Revisio Critica*, Pub. Fac. Sci. Üniv. Masaryk (Brno) 56:96-97, t. 13, f. 1, 2.
- Sirjaev, G. 1925. *Onobrychis Generis Revisio Critica*, Pub. Fac. Sci. Üniv. Masaryk (Brno) 56:120-122, t. 7, f. 1,
- Sirjaev, G. 1931. *Supplementum ad Monographiam Onobrychis Generis Revisio Critica*, Bull. Soc. Bot. Bulg, 4: 7-24.
- Skot, L., Hamilton, N.R.S., Mizen, S., Chorlton, K.H. and Thomas, I.D. 2002. Molecular genecology of temperature response in *Lolium perenne*; 2. Association of AFLP markers with ecogeography. *Molecular Ecology* 11; 1865-1876.
- Smith, J.S.C. and Williams, J.G.K. 1994. Arbitrary primer mediated fingerprinting in plants: case studies in plant breeding, taxonomy and phylogeny. In: Schierwater, B., Streit, B, Wagner, G.P. and DeSalle, R. (eds): *Molecular Ecolog and Evolution: Approaches and Applications*, pp. 5-15. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland.
- Sollera BP, Paiva SR, Faria DA, Guimarães SEF, Castro STR, Egito AA, Albuquerque MSM, Piovezan U, Bertani GR, Mariante AD. 2009. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. *Livest Sci.* 123: 8–15.
- Sorkun, K., 2008. Türkiye'nin Nektarlı Bitkileri, Polenleri ve Balları. Palme Yayınları: 462. Sayfa 208–210. Ankara.
- Sorkun, K., 1995. Türkiye'nin Önemli Nektar Kaynağı Olan Kültür Bitkileri ve Bal Potansiyelleri. Türkiye II. Teknik Arıcılık Kongresi (8–9 Şubat 1994). T.C.Ziraat Bankası Kültür Yayınları No:28. Sayfa 134–145. Ankara.

- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98; 503-517.
- Soya, H., Avcioğlu, R., Geren, 1997. *Yem Bitkileri, Hasad yayıncılık* 223:5.
- Sreenu, V.B., Ranjithkumar, G., Swaminathan, S., Priya, S., Bose, B., Pavan, M.N., Thanu, G., Nagaraju, J., Nagarajaram, H.A. 2003. MICAS: A fully automated web server for microsatellite extraction and analysis from prokaryote and viral genomic sequences. *Appl. Bioinformatics* 2: 165–168.
- Stackelberg, M., Rensing S.A., Reski, R. 2006. Identification of genic moss SSR markers and a comparative analysis of twenty-four algal and plant gene indices reveal species-specific rather than group-specific characteristics of microsatellites *BMC Plant Biology* 6: 9.
- Staub JE, Serquen FC, Gubta M, 1996. Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. *HortScience* 31: 729-740.
- Steffan, R.J. and Atlas, R. M., 1991, Polymerase Chain reaction: Applications in Environmental Microbiology, *Annu. Rev. Microbiol.*, 15, 137-161.
- Stockton, T. and Gepts, P. 1994. Identification of DNA probes that reveal polymorphisms among closely related *Phaseolus vulgaris* lines. *Euphytica* 76; 177-183.
- Szewc-McFadden, A.K., Kresovic, S., Bliet, S.M., Mitchell, S.E. and McFerson, J.R. 1996. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated Brassica species. *Theor. Appl. Genet.*, 93; 534-538.
- Şenocak, K., 1988. *Modern Arıcılık*. 222 sayfa. İstanbul.
- Takashi, H., Kimura, D., Hasegawa, R., Nagasako, T., Nishimoto, K., Ohta, K., Sugiyama, M. and Haruki, K. 1997. Comparative study of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 66 (2); 393-400.
- Tamam, A., 'Bazı Avokado (*Persea americana* Mill.) Çeşitlerinin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu', Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana, (2008).
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H. and Bonierbale, M. W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science, *Biotechnology*, 47, 257-264.
- Temnykh, S., DeClerk, G., Lukashova, A. *et al.* 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.* 11: 1441– 1452.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., Graner, A. 2003. Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 411–422.
- Thomas, M.R. and Scott, N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 86; 985-990.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G, and Gibson, T.J., 'CLUSTALW, 1994. Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting,

- Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choic', *Nucleic Acid Research*, 22, 4673.
- Thurston, M. and Field, D. 2005. Msatminer: detection and characterization of microsatellites. Distributed by the authors at <http://www.genomics.ceh.ac.uk/msatfinder>.
- Tingey, S.V. and del Tufo, J.P. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.* 101; 394-352.
- Tingey, S.V., Rafalski, J.A. and Williams, J.G.K. 1992. Gene analysis with RAPD markers. Application to breeding in Forestry and Horticulture. In: Joint Plant Breeding Symposia Series: Applications of RAPD technology plant breeding. P3-8, Crop Sci. Soc. Amer., Madison, Wisconsin, USA.
- Tivang, J., Skroch, P.W., Nienhuis, J. and De Vos, N. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among and within artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and breeding populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121; 783-788.
- Torres, A.M., Millian, T. and Cubero, J.I. 1993b. Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. *HortScience* 28; 333-334.
- Torres, A.M., Weeden, N.F. and Martin, A. 1993a. Linkage among isozyme, RFLP, and RAPD markers. *Plant physiol.* 101; 394-352.
- Tosun, F. 1974. Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri Kültürü Atatürk Üniv. Yay. No:242, Ziraat Fak. Yay. No: 123, Ders Kitapları Seri No: 8, Erzurum.
- Trinderup M, Jørgensen JN, Hansen M. Conservation considerations on Danish Shorthorn Cattle using pedigree analysis. *AGRI.* 26: 27–33, 1999.
- Tutkun, E., 2006. Arıcılık Tekniği. Önder Matbaacılık Ltd. Şti. 320 sayfa. Kızılay-Ankara.
- Ulrich, G., Mueller, and Wolfenbarger, L.L., 1999, AFLP genotyping and fingerprinting, *Tree*, Vol. 14, 389-394.
- Vardar-Kanlıtepe Ç, Aras S, Cansaran-Duman, D. 2010. Bitki Islahında Moleküler Belirteçlerin Kullanımı ve Gen Aktarımı. *Türk Hijyen ve De-neysel Biyoloji Dergisi*, 33.
- Vardar-Kanlıtepe Ç, Aras S, Cansaran-Duman, D. 2010. Bitki Islahında Moleküler Belirteçlerin Kullanımı ve Gen Aktarımı. *Türk Hijyen ve De-neysel Biyoloji Dergisi*, 33.
- Vergnoud, G. 1989. Polymers of Random Short Oligonucleotides Detect Polymorphic Loci in The Human Genome. *Nuc. Acid. Res.*, 17; 7623-7630.
- Vicente, M.C. and Fulton, T. 2004. Molecular marker learning modules-Vol 1. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. International Plant Genetic Resources Institute Publications. CD-Rom.
- Vijh RK, Tania MS, Mishra B, Kumar ST. 2007. Genetic diversity and differentiation of dromedarian camel of India. *Anim Biotechnol.* 18(2): 81–90.
- Villand, J., Skroch, P.W., Lai, T., Hanson, P., Kuo, C.G. and Nienhuis, J. 1998. Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crop Science* 38; 1339-1347.
- Villordon, A.Q. and LaBonte, D.R. 1995. Variation in randomly amplified DNA markers and storage root yield in 'Jewel' sweet potato clones. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120; 734-740.

- Vorster, B.J., Kunert, K.J. and Cullis, C.A. 2002. Use of representational difference analysis for the characterization of sequence differences between date palm varieties. *Plant Cell Rep.* 21; 271–275.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M. van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21); 4407-4414.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucl. Acids Res.*, 23; 4407-4414.
- Watson JD , Crick, FCH, 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids; A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid . *Nature* 171.
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkoski, J. and Zoller, M. 1992. *Recombinant DNA* 2nd Ed. Scientific American Books, New York, p: 626.
- Waugh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Focus*, 10, p. 186-191.
- Waycott, W. and Fort, S.B. 1994. Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphologic analyses. *Genome* 37; 577-583.
- Weber, J.L. and May, P.E. 1989. Abundant Class of Human DNA Polymorphism Which can be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44; 388-396.
- Weber, J.L. and Wong, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1123-1128.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Keen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: *Joint Plant Breeding Symposia Series: Applications of RAPD technology to plant breeding*, p.12-17 Crop Sci Soc. Amer. Madison Wisconsin USA.
- Weising, K., Fung, R.W.M., Keeling, D.J., Atkinson, R.G. and Gardner, R.C. 1996. Characterization of Microsatellites from *Actinidia chinensis*. *Molecular Breeding*, 2; 117-131.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Mayer, W. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Press, Boca Raton.
- Welsh, J. and Mc Clelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18(24); 7213-7218.
- White, G., Powell, W. 1997. Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in *Smetenia humilis* (Meliaceae); an Endangered Tropical Hardwood Species. *Mol. Eco.*, 16; 851-860.
- White, R. and Lalouel, J.M. 1988. Chromosome mapping with DNA markers. *Scientific American* 258; 20-28.
- White, R., Leppert, M., Bishop, D.T., Barker, D., Berkowitz, J., Brown, C., Callahan, P., Holm, T. and Jerominski, L. 1985. Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* 313; 101-105.
- White, T. J., Bruns, T. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T.J. White, eds): 315-322. San Diego: Academic Press.

- Williams, C.E and Clair, D.A. 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersico esculentum* Genome, 36; 619-630.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified by arbitrary primers are useful markers. In: Wu, R. (eds): Methods in Enzymology, Recombinant DNA, Part I, Vol. 218, p.704-740. Academic Pers, San Diego.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucl. Acids Res., 18, 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18; 6531-6535.
- Wilson, K., and Walker, J. M. 1994. Principles and techniques of practical biochemistry. Cambridge University Press, Cambridge, New York, p 17-125.
- Winton, L.M., Krohn, A.L., Leiner, R.H. 2007. Microsatellite markers for *Sclerotinia subarctica* nom. prov., a new vegetable pathogen of the High North. Molecular Ecology Notes 7: 1077–1079.
- Wolfe, A.D. and Liston, D. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In Plant Molecular Systematics II Solits, D.E., Solits, Pres.
- Wolff, K. and Peters-Van Rijn, J. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflwa* Tzvelev.) using random primers.
- Wu, K. S., Tanksley, S. D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Mol. Gen. Genet. 241: 225-235.
- Xiao, H., Merrill, C.R., Wu, Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R. and Venter, J.C. 1991. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. Science 252: 1651-1656.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Kotobuki, K., Ban, Y., Hayashi, T. and Matsuta, N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theor Appl. Genet., 102; 865-870.
- Yan J, Shah T, Warburton ML, Buckler ES, McMullen MD, Crouch J. Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *PLoS One*. 4(12): e8451, 2009.
- Ye, G.-N., Hemmat, M.A. Lodhi, M.A., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1996. Lpng primers for RAPD mapping fingerprinting of grape and pear. Bio Techniques 20 (3); 368-371.
- Ye, G.-N., Söylemezoğlu, G., Weeden, N.F., Lamboy, W.F., Pool, R.M. and Reisch, B.I. 1998. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis* 37(1); 3338.
- Yee, E., Kidwell, K.K., Silis, G.R. and Lumpkin, T.A. 1999. Diversity Among Selected *Vigna angitlaris* (Azuki) Accessions on The Basis of RAPD and AFLP Markers. *Crop Science*, 39: 268-275.
- Yıldırım A, Kandemir N, 2001. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. (Ed: Özcan S, Gürel E, Babaoğlu M,) Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Selçuk Üniversitesi, Vakıf Yayınları, Konya.

- Yıldırım, A. ve Kandemir, N. 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bölüm 23. In : Özcan, S. Gürel, E., Babaoğlu, M. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. (ed.). Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Sayfa 112-159. ISBN 975-6652-05-5. Konya.
- Yu, K.F., Deynze, A.V. and Pauls, K.P. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. In: Glick, B.R. and Thompson, J.E. (eds): Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. P. 287-301. CRC press.
- Yüksek, T., Sarıyıldız, T., Tüfekçioğlu, A. ve Kalay, H. Z., 2002, Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) bitkisinin Gümüşhane Tarım ve Hayvancılığı açısından irdelenmesi. Gümüşhane ve Yöresinin Kalkınması Sempozyumu, Bildiriler Kitabı, 23-25 Ekim, Gümüşhane, 616-626.
- Zabeau, M and Vos, P., (1993) 'Selective Restriction Fragment Amplification: A General Method for DNA Fingerprints', *European Patent Application. Publ.*
- Zhao, X. and Kochert, G. 1993. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)<sub>n</sub> microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.*, 21; 607614.
- Zhu C, Cheng L, Tong J, Yu X. 2012. Development and Characterization of New Single Nucleotide Polymorphism Markers from Expressed Sequence Tags in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Int J Mol Sci.* 13(6): 7343-7353.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, D. Labuda, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored PCR amplification. *Genomics*, 20, 176183.
- Zülal, A., 2001, İnsan Genomu, kalıtım şifresinin peşinde 136 yıl, Tübitak Yayınları, Mart; 5-11.