

**KÜLTÜRÜ YAPILAN KORUNGA
(*Onobrychis* Mill., BAKLAGİLLER)
TAKSONLARI VE BAZI YABANI
AKRABALARININ MOLEKÜLER
SİTOGENETİK YÖNTEMLER İLE
KARAKTERİZASYONU**

Gülru YÜCEL

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Evren CABİ

II. Danışman: Prof. Dr. Metin TUNA

2019

T.C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KÜLTÜRÜ YAPILAN KORUNGA (*Onobrychis* Mill., BAKLAGİLLER)
TAKSONLARI VE BAZI YABANI AKRABALARININ MOLEKÜLER
SİTOGENETİK YÖNTEMLER İLE KARAKTERİZASYONU**

Gülru YÜCEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Evren CABI

II. DANIŞMAN: Prof. Dr. Metin TUNA

TEKİRDAĞ-2019

Her Hakkı Saklıdır.

Prof. Dr. Evren CABİ danışmanlığında ve Prof. Dr. Metin TUNA II. danışmanlığında, Gülru YÜCEL tarafından hazırlanan “Kültürü Yapılan Korunga (*Onobrychis* Mill., Baklagiller) Taksonları ve Bazı Yabani Akrabalarının Moleküler Sitogenetik Yöntemler ile Karakterizasyonu.” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Prof. Dr. Evren CABİ

İmza :

Üye: Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

İmza :

Üye: Prof. Dr. Murat DEVECİ

İmza :

Üye: Doç. Dr. Bozena KOLANA

İmza :

Üye: Doç. Dr. İlker NİZAM

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

KÜLTÜRÜ YAPILAN KORUNGA (*Onobrychis* Mill., Baklagiller) TAKSONLARI VE BAZI YABANI AKRABALARININ MOLEKÜLER SİTOGENETİK YÖNTEMLER İLE KARAKTERİZASYONU

Gülru YÜCEL

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Evren CABİ

II. Danışman: Prof. Dr. Metin TUNA

Sunulmuş olan bu tez çalışmasında kültürü yapılan *Onobrychis* (*O. viciifolia*, *O. arenaria*, *O. transcaucasica*) türleri ile bazı yabancı türlerin genom yapı ve organizasyonları nispeten yeni moleküler sitogenetik yöntemler ile incelenmiştir. Çalışmada kullanılmış olan *Onobrychis* aksesyonları USDA-NPGS koleksiyonundan tedarik edilmiştir. Çalışmada 35 farklı *Onobrychis* türünün kromozom sayıları tespit edilmiştir. Türlerin $x = 7$ ve $x = 8$ olmak üzere 2 farklı temel kromozom sayısına sahip olduğu belirlenmiştir. Diploid türlerde kromozom sayısı $2n = 2x = 14$ ve $2n = 2x = 16$ olarak değişiklik gösterirken, poliploid türlerde *O. subacaulis* ($2n = 4x = 32$) türü hariç $2n = 4x = 28$ olarak saptanmıştır. *O. pallasi* ($2n = 14$), *O. sternohiza* ($2n = 14$) ve *O. vaginalis* ($2n = 16$) türlerine ait kromozom sayıları ilk defa bu çalışmada saptanmıştır. *Onobrychis* genomları fluorasan *in situ* hibridizasyon ve genomik *in situ* hibridizasyon metodu ile ilk defa bu çalışmada analiz edilmiştir. Yapılan FISH analizlerinde prob olarak 35S ve 5S rDNA kullanılmış ve 33 farklı *Onobrychis* türünün mitotik kromozomları üzerindeki rDNA lokuslarının sayı ve fiziki lokasyonları belirlenmiştir. Diploid türlerde, 35S rDNA lokusu sayısı 1 ile 4 çift arasında değişiklik gösterirken, 5S rDNA lokus sayısının 1 ile 2 çift arasında değiştiği gözlenmiştir. Analiz edilmiş diploid türlerde 35S rDNA lokusunda 5S rDNA lokusuna nazaran daha fazla varyasyon olduğu gözlemlenmiştir. Poliploid türlerde *O. subacaulis* hariç 2 çift 35S rDNA lokusu ve 4 çift 5S rDNA lokusu saptanmıştır. *O. subacaulis* türünde her iki lokus içinde eliminasyon gözlemlenmiştir. Flow sitometri metodu ile FISH analizlerinde kullanılan spesifik genotipler üzerinde çekirdek DNA içeriği analizi yapılmış ve 2C çekirdek DNA içeriğinin diploid *Onobrychis* türlerinde yaklaşık 2.5 misli farklılık göstererek 0,65 pg ile 1,47 pg arasında değişim gösterdiği saptanmıştır. Poliploid *Onobrychis* türlerinde ise 2C çekirdek DNA içeriği 2,43 pg ile 2,83 pg arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca 30 farklı aksesyonda nrITS bölgesi kullanılarak moleküler filogeni analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre poliploid türlerin çoğunlukla aynı kladda yer aldığı gözlemlenirken, diploid türler arasında önemli bir varyasyon olduğu ve her 3 kladda da yer aldıkları saptanmıştır. *Onobrychis* türlerinin çalışma kapsamında belirlenmiş olan kromozom sayıları, 35S ve 5S rDNA lokus sayıları ve çekirdek DNA içeriklerine ait değerler ayrı ayrı analiz edilerek filogenetik ağaç üzerinde haritalanmıştır. Yapılan bu analiz sonuçlarına göre *Onobrychis* cinsinde aneustör temel kromozom sayısının $x = 8$ olduğu saptanmıştır. Bir çift homolog 5S rDNA lokusu aneustör olarak belirlenmiştir. Çekirdek DNA içeriğinin diploid

türlerde poliploid türlere nazaran daha dinamik olduğu saptanmıştır. Tüm bunlara ek olarak çalışmada en yaygın şekilde kültürü yapılan tür olan *O. viciifolia*'nın progenitörleri hakkında ön bilgi edinebilmek amacıyla Genomik *in situ* hibridizasyon analizi de yapılmış ve *O. kachetica* diploid türünün genomu ile *O. viciifolia* genomu arasında oldukça yüksek derecede benzerlik olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre diploid *O. kachetica* türünün *O. viciifolia*'nın progenitörü veya progenitrlerinden birisi olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak kesin sonuç için daha çok sayıda analizin yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Korunga*, FISH, GISH, nrITS, Flow sitometri

2019, 141 Sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

CHARACTERIZATION OF CULTIVATED SAINFOIN (*Onobrychis* Mill., Fabaceae) TAXA AND SOME OF THEIR WILD RELATIVES BY USING MOLECULAR CYTOGENETIC METHODS

Gülru YÜCEL

Tekirdağ Namık Kemal University

Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Evren CABI

II. Supervisor: Prof. Metin TUNA

In this presented thesis study, cultivated species (*O. viciifolia*, *O. arenaria*, *O. transcaucasica*) and some of wild species of *Onobrychis* genus were analysed in details to obtain information about their genom structure and organisation using molecular cytogenetic methods. Accessions of *Onobrychis* species used in this study were obtained from USDA-NPGS collection. Chromosome numbers of 35 different *Onobrychis* species were determined. Two different basic chromosome numbers, $x = 7$ ve $x = 8$, were determined. Diploid species have $2n = 2x = 14$ and $2n = 2x = 16$, while poliploid species (except *O. subacaulis* $2n = 4x = 32$) have $2n = 4x = 28$ chromosome number. Chromosome numbers were found for *O. pallasii* ($2n = 14$), *O. sternohiza* ($2n = 14$) and *O. vaginalis* ($2n = 16$) species presented here for the first time. The genom structure of *Onobrychis* genus is presented here using fluorescence *in situ* hybridisation and genomic *in situ* hybridisation methods for the first time. The number and localization of rDNA loci were determined using fluorescence *in situ* hybridisation with 35S and 5S rDNA probes along somatic chromosomes of 33 *Onobrychis* species. In diploid species, 35S rDNA loci ranged from 1 to 4 per, 5S rDNA loci was determined 1 or 2 per along somatic chromosomes of *Onobrychis* species. In analysed diploid species, 35S rDNA loci was more variable than 5S rDNA loci. Except *O. subacaulis*, 4 per 5S and 2 per 35S rDNA loci were determined in all polyploid species. Elimination of both rDNA loci was observed in *O. subacaulis*. The genome size of genotypes which were analysed with FISH was estimated using flow cytometry and 2C nuclear DNA content in diploid species studied ranged from 0,65 pg to 1,47 pg shown almost 2,5 fold difference. Genome sizes of poliploid species changed from 2,43 pg to 2,83 pg. Phylogenetic relationship inferred using nrITS sequences of 30 *onobrychis* species. In the phylogenetic tree resulting from data set, polyploid species mostly (except *O. subacaulis*) were placed in same clad whereas diploid species were place in different clades. The nuclear genome size, number of rDNA loci and basic chromosome number were mapped onto the phylogenetic tree seperately. Ancestral basic chromosome number was identified as $x = 8$. The interpretation of the rDNA locus patterns in a phylogenetic context revealed that the ancestral state was 1 per locus for 5S rDNA. To obtain information about the origin of the most well known cultivated species which is *O. viciifolia* was tested using GISH. Due the high genome similarity, *O. kachetica* was suggested one of the putative progenitors or progenitor diploid species. However, more experiments are required to be precise about the progenitor of *O. viciifolia*.

Anahtar Kelimeler: *Onobrychis*, FISH, GISH, nrITS, flow cytometry

2019, 141 Pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ŞEKİL DİZİNİ	vii
ÇİZELGE DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR	xiv
TEŞEKKÜR	xv
1. GİRİŞ	1
1. 1. <i>Onobrychis</i> Miller	1
1.2 Cinsin Tanımı ve Taksonomisi.....	2
1.3. Korunga Cinsinin Tarım Açısından Önemi.....	6
1.4. <i>O. viciifolia</i> (Korunga)	7
1.5. Korunganın Tarımsal Özellikleri ve Yetiştiriciliği.....	10
1.6. Problem İfadesi.....	10
1.7. Amaç.....	11
1.8. Moleküler Sitogenetik Yöntemler	11
1.8.1. Flow Sitometri Yöntemi ile Çekirdek DNA Analizi	11
1.8.2. Florasan <i>In Situ</i> Hibridizasyon Yöntemi	13
1.8.3. Genomik <i>In Situ</i> Hibridizasyon Yöntemi	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1. Bitki Materyali ve Orijinleri	28
3.2. Florasan <i>In Situ</i> Hibridizasyon Yöntemi	29
3.2.1. Materyal Olarak Kullanılacak Bitki Kök Uçlarının Elde Edilmesi.....	30
3.2.2. Mitotik Kromozom Preperatlarının Hazırlanması	31
3.2.3. Prob Olarak Kullanılacak DNA'ların Hazırlanması	31

3.2.4. FISH Prosedürü	34
3.3. Genomik DNA İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu	36
3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu	36
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	36
3.3.3. Biyoinformatik Analiz	38
3.4. Çekirdek DNA Analizi	38
3.5. DOT BLOT Analizi	40
3.6. Genomik <i>In Situ</i> Hibridizasyonu	43
3.7. Temel Kromozom Sayısı, Çekirdek DNA İçeriği ve rDNA Lokuslarının Sayısında Gözlemlenen Varyasyonun İncelenmesi	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	47
4.1. Kromozom Sayımı	47
4.2. Çekirdek DNA İçeriği	58
4.3. <i>Onobrychis</i> Türlerine Ait Mitotik Kromozomlar Üzerinde 5S ve 35S rDNA Lokuslarının Sayı ve Dağılımı	65
4.3.1. <i>O. pallasi</i> (W621877)	67
4.3.2. <i>O. hyarygyea</i> (PI383719)	68
4.3.3. <i>O. gracilis</i> (W619496)	69
4.3.4. <i>O. humilis</i> (PI319054)	70
4.3.5. <i>O. grandis</i> (PI440568)	71
4.3.6. <i>O. supina</i> (PI383721)	72
4.3.7. <i>O. caput-galli</i> (PI 205304)	73
4.3.8. <i>O. ptolemaica</i> (PI 215344)	74
4.3.9. <i>O. stenorhiza</i> (PI 319056)	75
4.3.10. <i>O. alba</i> subsp. <i>locanica</i> (W6 19337)	76
4.3.11. <i>O. megataphros</i> (PI 301107)	77
4.3.12. <i>O. crista-galli</i> (PI 227040)	78
4.3.13. <i>O. gaubae</i> (PI 380931)	79

4.3.14. <i>O. kachetica</i> (PI 314469).....	80
4.3.15. <i>O. persica</i> (PI 380946)	81
4.3.16. <i>O. radiata</i> (W6 24111)	82
4.3.17. <i>Michauxii</i> (PI380945)	83
4.3.18. <i>O. vassilczenkoi</i> (PI 378913).....	84
4.3.19. <i>O. sintensii</i> (PI 314100).....	85
4.3.20. <i>O. chorossanica</i>	86
4.3.21. <i>O. vaginalis</i> (PI325444)	88
4.3.22. <i>O. ibercia</i> (PI 219602).....	89
4.3.23. Poliploid Türler	90
4.4 Moleküler Filogenetik Analizler	98
4.4.1. Filogenetik İlişki.....	98
4.4.2. Temel Kromozom Sayısının Evrimi.....	102
4.4.3. Çekirdek DNA içeriğindeki varyasyon	105
4.4.4. 5S rDNA lokuslarındaki varyasyon.....	107
4.4.5. 35S rDNA lokuslarındaki varyasyon.....	109
4.5. DOT Blot Analizi	112
4.6. GISH Analizi Sonuçları.....	114
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	120
6. KAYNAKLAR	122
7. EKLER	133

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Onobrychis</i> Mill. bitkisi, <i>O. viciifolia</i> Scop., Sainfoin.....	1
Şekil 1.2. <i>O. viciifolia</i>	7
Şekil 1.3. Flow cytometry	12
Şekil 1.4. FISH yönteminin temel aşamaları. (1) Prob DNA'nın işaretlenmesi (2) Somatik kromozom preparatlarının hazırlanması (3) Denatürasyon-hibridizasyon (4) Bağlayıcı yıkama (5) Antibadi uygulaması (6) Florasan mikroskop ile sinyallerin analizi.	13
Şekil 1.5. Bitkilerde rDNA lokusunun şematik olarak görünüşü (a) rDNA bölgesinin kromozom üzerinde lokalizasyonu. (b) Tekrarlı gen blokları (18S-5.8S-25S)	15
Şekil 1.6. Bitkilerde 35S rRNA genlerinin organizasyonu	16
Şekil 1.7. GISH yönteminin temel aşamaları	18
Şekil 3.1. FISH prosedürüne ait özet diagram.....	30
Şekil 3.2. Nick translasyonu programı	32
Şekil 3.3. Nick translasyonunun temel aşamaları.....	33
Şekil 3.4. Kullanılmış olan PZR aşamaları	37
Şekil 3.5. Dot Blot analizlerinde kullanılan düzenek	41
Şekil 4.1. <i>O. pallasi</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. hypargyrea</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$	48
Şekil 4.2. <i>O. gracilis</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. humilis</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$	48
Şekil 4.3. <i>O. grandis</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. caput-galli</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$	48
Şekil 4.4. <i>O. supina</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. alba</i> subsp. <i>laconica</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$	49
Şekil 4.5. <i>O. ptolemaica</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. stenorrhiza</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$	49
Şekil 4.6. <i>O. megataphros</i> mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$	49
Şekil 4.7. <i>O. crista-galli</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. gaubea</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$	50
Şekil 4.8. <i>O. kachetica</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. chorossanica</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$	50

Şekil 4.9. <i>O.radiata</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. michauxii</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$	50
Şekil 4.10. <i>O.vassilczenkoi</i> (soldaki karyotip) ve <i>O.sintenisii</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$	51
Şekil 4.11. <i>O.vaginalis</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. iberica</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$	51
Şekil 4.12. <i>O. argyreae</i> (soldaki karyotip) ve <i>O.persica</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$	51
Şekil 4.13. <i>O. viciifolia</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. arenaria</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 4x = 28$	52
Şekil 4.14. <i>O. transcaucasica</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. cyri</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 4x = 28$	52
Şekil 4.15. <i>O. altissima</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. biebersteinii</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 4x = 28$	52
Şekil 4.16. <i>O. inermis</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. conferta</i> subsp. <i>argentae</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n=4x=28$	53
Şekil 4.17. <i>O. hajstana</i> (soldaki karyotip) ve <i>O. kemulariae</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n=4x=28$	53
Şekil 4.18. <i>O. petrae</i> $2n = 4x = 28$ (soldaki karyotip) ve <i>O.subacaulis</i> (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n=4x=32$	53
Şekil 4.19. <i>O.pallasi</i> ($2n = 4x = 14$) türüne ait flow sitometri histogramı	60
Şekil 4.20. <i>O.kachetica</i> ($2n = 4x = 16$) türüne ait flow sitometri histogramı	60
Şekil 4.21. <i>O. viciifolia</i> ($2n = 4x = 28$) türüne ait flow sitometri histogramı	61
Şekil 4.22. <i>O. subacaulis</i> ($2n = 4x = 32$) türüne ait flow sitometri histogramı	61
Şekil 4.23. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası W621877 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) <i>O. pallasi</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir	67
Şekil 4.24. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası PI 383719 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) <i>O. hypargyrea</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir. Siyah ok homolog kromozomdan birinin daha küçük lokusa sahip olduğunu belirtmektedir.....	68
Şekil 4.25. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon analizi sonrası W619496 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) <i>O. gracilis</i> aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının	

kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir. Siyah ok homolog kromozomlardan birinin daha küçük lokusa sahip olduğunu belirtmektedir 69

Şekil 4.26. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 319054 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. humilis* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir. Siyah ok homolog kromozomlardan birinin daha küçük lokusa sahip olduğunu belirtmektedir 70

Şekil 4.27. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI440568 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. grandis* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir 71

Şekil 4.28. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 383721 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. supina* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir 72

Şekil 4.29. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 205304 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. caput-galli* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir 73

Şekil 4.30. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 215344 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. ptoleimaca* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir 74

Şekil 4.31. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 319056 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. stenorhiza* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir .75

Şekil 4.32. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W6 19337 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. alba* subsp. *locanica* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir .76

Şekil 4.33. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 301107 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. megataphros* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir .77

Şekil 4.34. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 227040 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O. crista-galli* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir .78

Şekil 4.35. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 380931 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O. gaubae* aksesyona ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının

- kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 79
- Şekil 4.36. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 314469 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.kachetica* aksiyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 80
- Şekil 4.37. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 380946 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.persica* aksiyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 81
- Şekil 4.38. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W624111 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.radiata* aksiyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 82
- Şekil 4. 39. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 380945 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.michauxii* aksiyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 83
- Şekil 4. 40. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 378913 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.vassilczenkoi* aksiyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir .84
- Şekil 4. 41. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 314100 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.sintenisii* aksiyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 85
- Şekil 4. 42. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 314160 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.chorossanica* aksiyon ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 86
- Şekil 4. 43. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W6 24358 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.chorossanica* aksiyon ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 87
- Şekil 4.44. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 325444 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.vaginalis* aksiyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 88
- Şekil 4. 45. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 219602 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.iberica* aksiyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir 89

- Şekil 4.46. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 140853, PI 200872 nolu ($2n = 4x = 28$) *O.viciifolia* (soldaki karyotip) ve W6 17800 nolu *O. cyri* (sağdaki karyotip) aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir 90
- Şekil 4.47. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 273743 nolu ($2n = 4x = 28$) *O. arenaria* (soldaki karyotip) ve PI 273771 nolu *O.transcaucasica* (sağdaki karyotip) aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir 91
- Şekil 4.48. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 325448 nolu *O. altissima* ($2n = 4x = 28$) (soldaki karyotip) ve PI 642146 nolu *O. petrae* (sağdaki karyotip) aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir 91
- Şekil 4.49. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W6 17870 nolu ($2n = 4x = 28$) *O.inermis* (soldaki karyotip) ve PI 227377 nolu *O.biebersteinii* (sağdaki karyotip) aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir 92
- Şekil 4.50. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 312933 nolu ($2n = 4x = 28$) *O.hajastana* ve PI 516990 nolu *O. conferta subsp.argentea* aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir 92
- Şekil 4.51. $2n = 28$ kromozom sayısına (*O. viciifolia*, *O. arenaria*, *O.transcaucasica*, *O. inermis*, *O.cyri*, *O.petrae*, *O. altissima*, *O. biebersteinii*, *O. hajastana* ve *O.conferta subsp.argentea*) sahip poliploid türler için oluşturulmuş genel idiogram..... 93
- Şekil 4.52. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 219930 nolu ($2n = 4x = 32$) *O.subacaulis* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir 94
- Şekil 4.53. 5S ve 35S rDNA lokuslarının *O. subacaulis* ($2n = 32$) mitotik kromozomları üzerindeki lokasyonlarını gösteren idiogram..... 94
- Şekil 4.54. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türleri arasındaki filogenetik ilişkin belirlenmesi amacıyla nrITS bölgeleri kullanılarak yapılan analiz sonucu elde edilen filogram (ML methodu kullanıldı). Dış grup *Hedysarum candidissimum* 98
- Şekil 4.55. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türleri arasındaki filogenetik ilişkiyi (nrITS) gösteren ağaç üzerinde türlere ait temel kromozom sayılarının ve ploidy düzeylerinin belirtilmesi. Poliploidler 4X şeklinde gösterilmiştir..... 100

Şekil 4.56. Diploid ve poliploid <i>Onobrychis</i> türlerinin temel kromozom sayılarının filogenetik filogram kullanılarak MP yöntemi ile analizi. Mavi ok poliploidizasyonu göstermektedir. Siyah küreler $x=8$, beyaz küreler $x=7$ göstermektedir.....	102
Şekil 4.57. Diploid ve poliploid <i>Onobrychis</i> türlerine ait 1Cx çekirdek DNA içeriklerinin filogenetik filogram kullanılarak MP methodu ile analizi.....	105
Şekil 4.58. Diploid <i>Onobrychis</i> türlerinde 5S rDNA homolog lokus sayılarının filogram kullanılarak MP methodu ile analizi.....	107
Şekil 4.59. Diploid ve poliploid <i>Onobrychis</i> türlerinde 5S rDNA homolog lokus sayılarının filogram kullanılarak MP methodu ile analizi. Mavi oklar poliploidizasyonu gösterir.	108
Şekil 4.60. Diploid <i>Onobrychis</i> türlerinde 35S rDNA homolog lokus sayılarının filogenetik filogram kullanılarak MP methodu ile analizi.....	109
Şekil 4.61. Diploid ve poliploid <i>Onobrychis</i> türlerinde 35S rDNA homolog lokus sayılarının filogenetik filogram kullanılarak MP analizi.....	110
Şekil 4.62. DOT blot analizi sonrası membranların görüntüsü.....	112
Şekil 4.63. GISH yöntemi ile <i>O. pallasi</i> genomik DNA' sının <i>O. pallasi</i> kromozomları üzerinde hibridizasyonunu gösteren karyotip.....	114
Şekil 4.64. GISH yöntemi ile <i>O. pallasi</i> genomik DNA' sının <i>O. viciifolia</i> kromozomları üzerinde hibridizasyonu gösteren karyotip (sol image DAPI ve FITC, sağ image sadece FITC görüntüsü).....	114
Şekil 4.65. GISH yöntemi ile <i>O. hypargyrea</i> genomik DNA' sının <i>O. hypargyrea</i> kromozomları üzerinde hibridizasyonunu gösteren karyotip.....	115
Şekil 4.66. GISH yöntemi ile <i>O. hypargyrea</i> genomik DNA' sının <i>O. viciifolia</i> kromozomları üzerinde hibridizasyonu (sol image DAPI ve FITC, sağ image sadece FITC görüntüsü).....	115
Şekil 4.67. FISH yöntemi ile <i>O. viciifolia</i> kromozomları üzerinde 25S rDNA problemlerinin lokalizasyonunu gösteren karyotip.....	116
Şekil 4.68. GISH yöntemi ile <i>O. gracilis</i> genomik DNA' sının <i>O. gracilis</i> kromozomları üzerinde hibridizasyonunu gösteren karyotip.....	116
Şekil 4.69. GISH yöntemi ile <i>O. gracilis</i> genomik DNA' sının <i>O. viciifolia</i> kromozomları üzerinde hibridizasyonu (sol image DAPI ve FITC, sağ image sadece FITC görüntüsü).....	117
Şekil 4.70. GISH yöntemi ile <i>O. kachetica</i> genomik DNA' sının <i>O. kachetica</i> kromozomları üzerinde hibridizasyonunu gösteren karyotip.....	118
Şekil 4.71. GISH yöntemi ile <i>O. kachetica</i> genomik DNA' sının <i>O. viciifolia</i> kromozomları üzerinde hibridizasyonu (sol image DAPI ve FITC, sağ image sadece FITC görüntüsü).....	118

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>Onobrychis</i> cinsinin taksonomik açıdan sınıflandırılması	3
Çizelge 1.2. Bazı <i>Onobrychis</i> türlerine ait alt cins, seksiyon ve ömür uzunluklarını gösteren bilgiler.....	3
Çizelge 1.3. Ülkemizde yetişen <i>Onobrychis</i> türlerine ait altcins, seksiyon, ömür uzunlukları ve endemik olma durumlarını gösteren bilgiler.....	5
Çizelge 3.1. İncelenen korunga türleri ile ilgili bilgiler	28
Çizelge 3.2. Prob DNA'ların nick translasyonu ile işaretlenmesinde kullanılan bileşenler	31
Çizelge 3.3. Hibridizasyon solüsyonu bileşenleri.	34
Çizelge 3.4. Kullanılan primer dizileri	37
Çizelge 3.5. PZR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	37
Çizelge 3.6. Hibridizasyon solüsyonu bileşenleri	44
Çizelge 3.7. Formamid kullanılmadan hazırlanan hibridizasyon miksinin bileşenleri	46
Çizelge 4.1. Mitotik kromozom sayımı yapılmış olan <i>Onobrychis</i> türleri ve kromozom sayıları	47
Çizelge 4.2. <i>Onobrychis</i> türlerinin önceki çalışmalar ile bu çalışmada belirlenmiş olan kromozom sayıları ve referansları.	55
Çizelge 4.3. <i>Onobrychis</i> türlerinin belirlenmiş olan çekirdek DNA içerikleri.....	58
Çizelge 4.4. <i>Onobrychis</i> türlerinin 35 ve 5S rDNA lokus sayıları	65

KISALTMALAR

%	: Yüzde oranı
dk	: Dakika
μm	: Mikrometre
μl	: Mikrolitre
FISH	: Florasan <i>in situ</i> Hibridizasyonu
GISH	: Genomik <i>in situ</i> Hibridizasyonu
SSC	: Salin Sodyum Sitrat
Sn	: Saniye
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate- Buffered Saline)

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde bana rehberlik eden danışman hocalarım Prof. Dr. Evren CABİ ve Prof. Dr. Metin Tuna'ya göstermiş oldukları destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Polonya Silesia Üniversitesi, Biyoloji ve Çevre Koruma Fakültesi, Bitki Anatomi ve Sitoloji Bölümü Başkanı Prof. Dr. Robert Hasterok'a bölümlerinde tez çalışmamı gerçekleştirmem için sağladıkları destek, imkan ve yardımdan dolayı teşekkür ederim. Polonya'da kaldığım süre içerisinde doktora tez çalışmalarımı gerçekleştirmemde bana liderlik eden, her zaman yardımcı ve destek olan sayın Doç. Dr. Bozena Kolano'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca yardımlarından dolayı Dr. Alexander Betekhtin'e teşekkür ediyorum. Her zaman yanımda olan kıymetli aileme çok teşekkür ederim.

TÜİBİTAK'a (214O077 ve 215O526 nolu projeler kapsamında) maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Haziran, 2019

Gülru YÜCEL

1. GİRİŞ

1.1. *Onobrychis* Miller

Onobrychis Miller (korunga) cinsi Baklagiller (Fabaceae) familyasının önemli bir üyesidir. Cins tek yıllık ve çok yıllık olmak üzere yaklaşık 162 tür (taxon) içermektedir. Ülkemizde yaklaşık 52 türü bulunmak ile birlikte 27 tanesi endemiktir. Özellikle Akdeniz bölgesinden başlayarak Kafkasya ve Zagros dağları boyunca Orta Asya'ya kadar geniş bir alanda yayılış gösterdiği belirtilmektedir. Batı Avrupa'da ise İspanya ve Portekiz'den Orta Asya ve Sibirya'ya kadar uzanan *Onobrychis* cinsi türlerinin bilhassa Kafkasya-İran-Anadolu üçgeninde yoğun olarak bulunduğu bildirilmektedir. Afganistan-Türkmenistan-Tacikistan üçgeni, Balkanlar-Alpler ve Kafkasya-İran-Anadolu üçgeninde türlere sıkça rastlanması sebebi ile bu bölgelerin cinsin gelişim merkezleri olarak görüldüğü belirtilmektedir. Ayrıca Kafkasya, İran ve Anadolu bölgelerinde gözlemlenmiş olan türlerin çeşitlilik ve yoğunluklarının önemli derecede fazla olması sebebi ile cinsin gen merkezi olma ihtimali olduğu belirtilmiş olan önemli bilgiler arasında yer almaktadır (Aktoklu 1995). *Onobrychis* Mill.' in bitki alemindeki yeri ve cinsin en bilidik türü olan *O. viciifolia* Scop. aşağıda şekil 1.1.'de gösterilmektedir.



- Alem** : Plantae - Plants
Şube : Magnoliophyta - Flowering plants
Sınıf : Magnoliopsida - Dicotyledons
Takım : Fabales
Familya : Fabaceae
Cins : *Onobrychis* Mill.

Şekil 1.1. *Onobrychis* Mill. bitkisi, *O. viciifolia* Scop., Sainfoin (USDA plant guide)

1.2 Cinsin Tanımı ve Taksonomisi

Onobrychis cinsi tek veya çok yıllık (türlerin büyük bir kısmı çok yıllıktır) otsu türler ile az sayıda dikenli yarıçalı türlerden oluşmaktadır. Gövdeleri tabanda odunlaşmış şekilde yada kalın toprak altı yapı, genel olarak kıvrık, belirgin açık yeşil çizgili, tüysüz veya basit tüylü yapıdadır. Kulakçıklar birleşik veya serbest, çoğunlukla zarsı ve kenarı kirpikli yapıdadır. Yaprakların yaprakçıkları tekli, genellikle taban kısmındakiler uzun saplı, üst kısımdakiler kısa saplı yada nadiren sapsızdır. Yaprakçıklar tam kenarlı, yuvarlaktan şeritsi dikdörtgenimsiye kadar olmak üzere, tepesi küçük sert bir uçla sonlanan yapıdadır. Çiçek durumu eksensel salkımsıdır. Brakteler zarsı ve brakteoller 2 adet, ipliksi, zarsı genel olarak çanak yaprak tüpü üzerinde veya nadiren çiçek sapı üzerinde yer almaktadır. Çanak yaprak çan şeklinde ve tüpün alt bölgesi dışa doğru şişkin olmakla beraber dişler eşit değildir, genel olarak mızraksı aniden daralmış yada şeritsi aniden daralmış durumdadır. Taç yaprak leylak, pembe, krem, sarı veya beyaz, çoğunlukla koyu mor damarlı; bayrakçık, ters yumurtamsı, dairemsi, eliptik veya dikdörtgenimsi eliptik, kanatçıklar genel olarak çanak yapraktan daha kısa, nadir olarak uzun, kulakçıklı ve saplı; kayıkçık bayrakçık ile eşit veya daha kısa, nadiren uzun durumdadır. Erkek organlar diyadelf yapıdadır. Yumurtalık 1-2 (-3) ovüllü sapsız veya bazen çok kısa saplı, uçta yumuşak kılsı tüylü veya nadiren tüysüz yapıdadır. Meyve kuruyunca açılmaz, 1 (-2) tohumlu ve genel olarak hafif dairemsidir. Meyve yapısı kılsı tüylü veya tüysüz, nadir olarak ince yumuşak tüylü, yünlü veya kaba tüylü yapıda, orta kısımda 2 sıra olmak üzere peteğimsi yüzeyli disk ve değişen genişlikte kenar kısmından oluşmaktadır. Disk ve kenar düz dikensi yada kanca şeklinde dişliden kabarcıklı yada tam kenarlıya kadar değişebilmektedir. Tohumlar 1 (-2) adet dikdörtgenimsi veya böbreksi şekildedir (Aktoklu 1995).

Onobrychis cinsi oldukça önemli düzeyde tür zenginliğine sahip olmasına rağmen sadece *O. viciifolia* (Adi korunga), *O. arenaria* (Kit.) DC. (Anadolu korungası), *O. transcaucasica* Grossh. (Kafkas korungası) tarımsal açıdan önem taşımaktadır. Bu türler arasında adi korunga olarak da bilinen *Onobrychis viciifolia* en bilindik ve en yaygın tarımı yapılan türdür (Açıkgöz 1991). Taksonomik açıdan hala problemlili olduğu öne sürülen *Onobrychis* cinsine ait genellikle kabul edilen sınıflandırma Çizelge 1.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. *Onobrychis* cinsinin taksonomik açıdan sınıflandırılması

<i>Onobrychis</i> Mill.	
Subgenus <i>Onobrychis</i>	Subgenus <i>Sisyrosema</i>
<i>Dendrobrychis</i>	<i>Anthyllium</i>
<i>Lophobrychis</i>	<i>Afghanicae</i>
<i>Hemicyclobrychis</i>	<i>Heliobrychis</i>
<i>Onobrychis</i>	<i>Hymenobrychis</i>

Kaynak: Sirjaev, 1925

Bazı *Onobrychis* türleri için derlenmiş alt cins, seksiyon ve ömür uzunluklarını gösteren bilgiler Çizelge 1.2.'de gösterilmektedir (Flora of Turkey (1970,1988,2000 vol 3-10-11), Grossheim 1948 Flora of the U.S.S.R., Boissie 1872 Flora Orientalis, Flora Iberica, Sirjaev 1925, Hesamzadeh Hejazı ve Nasab 2010, Ranjbar ve ark. 2012, Lewke Bandara ve ark. 2013, Carbonero ve ark. 2012, Zarabbian ve Majidi 2015).

Çizelge 1.2. Bazı *Onobrychis* türlerine ait alt cins, seksiyon ve ömür uzunluklarını gösteren bilgiler

Tür İsimleri	Alt Cins	Seksiyon	Ömür Uzunlukları
<i>O. cornuta</i> (L.) Desv.	<i>Onobrychis</i>	<i>Dendrobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. echidna</i> Lipsky	<i>Onobrychis</i>	<i>Dendrobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. darwasica</i> Vassilcz.	<i>Onobrychis</i>	<i>Dendrobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. caput-galli</i> (L.) Lam.	<i>Onobrychis</i>	<i>Lophobrychis</i>	Tek yıllık
<i>O. micrantha</i> Schrenk	<i>Onobrychis</i>	<i>Lophobrychis</i>	Tek yıllık
<i>O. pulchella</i> Schrenk	<i>Onobrychis</i>	<i>Lophobrychis</i>	Tek yıllık
<i>O. aequidentata</i> (Sm.) d'Urv.	<i>Onobrychis</i>	<i>Lophobrychis</i>	Tek yıllık
<i>O. crista-galli</i> (L.) Lam.	<i>Onobrychis</i>	<i>Lophobrychis</i>	Tek yıllık
<i>O. oxytropoides</i> Bunge	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. petraea</i> (Willd.) Fisch.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. ruprechtii</i> Grossh.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. gontscharovii</i> Vassilcz.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. gracilis</i> Besser	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. daghestanica</i> Grossh.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. biebersteinii</i> Sirj.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. hamata</i> Vassilcz.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. major</i> (Boiss.) Hand.-Mazz.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. armena</i> Boiss. & A.Huet	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. bungei</i> Boiss.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. cyri</i> Grossh.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. dielsii</i> (Sirj.) Vassilcz.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. novopokrovskii</i> Vassilcz.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. viciifolia</i> Scop.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. transcaspica</i> V.V.Nikitin	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık

Bazı *Onobrychis* türlerine ait alt cins, seksiyon ve ömür uzunluklarını gösteren bilgiler (Devam)

<i>O. oxyodonta</i> Boiss.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. hajastana</i> Grossh.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. transcaucasica</i> Grossh.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. altissima</i> Grossh.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. inermis</i> Steven	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. iberica</i> Grossh.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. nemecii</i> Sirj.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. arenaria</i> (Kit.) DC.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. ferganica</i> (Sirj.) Grossh.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. persica</i> Sirj. & Rech.f.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. stenostachya</i> Freyn	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. araxina</i> Schischk.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. densijuga</i> Hedge & Hub.-Mor.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. argaea</i> Boiss. & Balansa	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. fallax</i> Freyn & Sint.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. carduchorum</i> C.C.Towns.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. halysensis</i> Širj.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. podperae</i> Širj.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. elata</i> Boiss. & Balansa	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. kotschyana</i> Fenzl	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. sulphurea</i> Boiss. & Balansa	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. pisidica</i> Boiss.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. beata</i> Širj.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. montana</i> DC.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. lasistanica</i> Širj.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. major</i> (Boiss.) Hand.-Mazz.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. quadrijuga</i> Hedge & Hub.-Mor.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. paucijuga</i> Bornm.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. occulta</i> Hedge & Hub.-Mor.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. mutensis</i> Kit Tan & Sorger	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. sivistica</i> Kit Tan & Sorger	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. clicica</i> Kit Tan & Sorger	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. germanicopolitana</i> Hub.-Mor. & C. Simon	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. ebenoides</i> Boiss. & Spruner	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. humilis</i> (Loefl.) G. Lopez	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. alba</i> (Waldst. & Kit.) Desv.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. supina</i> (Vill.) DC.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. stenorhiza</i> DC.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. megataphros</i> Boiss.	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. grandis</i> Lipsky	<i>Sisyrosema</i>	<i>Anthyllium</i>	Çok yıllık
<i>O. argyrea</i> Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. atropatana</i> Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. buhseana</i> Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. heterophylla</i> C.A.Mey.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. subacaulis</i> Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Tek yıllık
<i>O. gaubae</i> Bornm.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. huetiana</i> Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. haussknechtii</i> Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. pallasii</i> (Willd.) M. Bieb.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. sintenisii</i> Bornm	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. amoena</i> Popov & Vved.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık

Bazı *Onobrychis* türlerine ait alt cins, seksiyon ve ömür uzunluklarını gösteren bilgiler (Devam)

<i>O. chorassanica</i> Bunge ex Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. seravschanica</i> B. Fedtsch.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. vassilczenkoi</i> Grossh.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. vaginalis</i> C.A. Mey.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. kachetica</i> Boiss. & Buhse	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. majorovii</i> Grossh.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. bobrovii</i> Grossh.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. meschetica</i> Grossh.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. radiata</i> (Desf.) M.Bieb.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. tournefortii</i> (Willd.) Desv.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. michauxii</i> DC.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. hohenackeriana</i> C.A.Mey.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. komarovii</i> Grossh.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Tek yıllık
<i>O. ptolemaica</i> (Delile) DC.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. hypargyrea</i> Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. galegifolia</i> Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. cappadocica</i> Boiss.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. albiflora</i> Hub.-Mor.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. kemulariae</i> Chinth.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık
<i>O. subnitens</i> Bornm.	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık

Ülkemizde yetişmekte olan *Onobrychis* türlerine ait alt cins, seksiyon bilgileri, ömür uzunlukları ile endemik olma durumları Çizelge 1. 3.'de gösterilmektedir .

Çizelge 1.3. Ülkemizde yetişen *Onobrychis* türlerine ait altcins, seksiyon, ömür uzunlukları ve endemik olma durumlarını gösteren bilgiler

Tür İsimleri	Alt Cins	Seksiyon	Ömür Uzunlukları	Endemizm
<i>O. cornuta</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Dendrobrychis</i>	-	-
<i>O. caput-galli</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Lophobrychis</i>	Tek yıllık	-
<i>O. aequidentata</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Lophobrychis</i>	Tek yıllık	-
<i>O. crista-galli</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Lophobrychis</i>	Tek yıllık	-
<i>O. stenostachya</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. araxina</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. densijuga</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. argaea</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. fallax</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. carduchorum</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. gracilis</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. halysensis</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. podperae</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. elata</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. kotschyana</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. sulphurea</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. pisidica</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. beata</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+

Ülkemizde yetişen *Onobrychis* türlerine ait altcins, seksiyon, ömür uzunlukları ve endemik olma durumlarını gösteren bilgiler (Devam)

<i>O. montana</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. lasistanica</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. major</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. viciifolia</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. oxyodonta</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. hajastana</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. altissima</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. transcaucasica</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. megataphros</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. quadrijuga</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. paucijuga</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. occulta</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. mutensis</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. sivisica</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. clicica</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. germanicopolitana</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. ebenoides</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. alba</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. marashensis</i>	<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. argyrea</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. atropatana</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. huetiana</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. haussknechtii</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. subacaulis</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Heliobrychis</i>	Tek yıllık	-
<i>O. ptolemaica</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. hypargyrea</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. tournefortii</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. galegifolia</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. radiata</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık	-
<i>O. cappadocica</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık	+
<i>O. albiflora</i>	<i>Sisyrosema</i>	<i>Hymenobrychis</i>	Çok yıllık	+

Kaynak: Davis, 1970,1988,2000 (Flora of Turkey vol 3-10-11)

1.3. Korunga Cinsinin Tarım Açısından Önemi

Korunga, *Onobrychis* cinsi türlerine verilen genel isimdir. Kurağa ve soğuğa oldukça dayanıklı olan *Onobrychis* türleri, diğer bitki türlerinin yetişemediği kıraç ve kireçli alanlarda da gelişim gösterebilmektedir. Bu sebeple oldukça önemli toprak ıslahı bitkilerinden birisidir (Akçelik 2009).

Onobrychis cinsi türleri hayvanların severek yediği bir bitki olup, otu hayvanlar için son derece besleyici ve mineralce zengindir. Yonca gibi bazı baklagil yem bitkilerinin neden olduğu şişkinlik problemine yol açmamaktadır (Akçelik 2009). Arılar için çok iyi bir bal özü bitkisidir. Her türlü toprakta yetiştirilebildiği gibi çok miktarda kök kalıntısını toprakta bırakarak toprağın organik maddece zenginleşmesini sağlamaktadır.

Baklagiller havanın serbest azotunu toprağa bağlayarak verimliliği arttırmaktadır. Köklerinde havadaki serbest azotu toprağa bağlamalarına imkan sağlayan yumrucuk bakterileri yaşamaktadır. Kök içerisinde bulunan bakteriler havanın serbest azotunu amonyağa dönüştürürler. Yaşamlarını bu şekilde sürdüren bakterilerden dışarıya aminoasit salgıyanır. Bitkiler bu maddelerden azot kaynağı olarak faydalanır (Anonim 2019).

Baklagiller familyasında yer alan korunga da havadaki serbest azotu fikse etmektedir. Bu nedenle korunga ekim zamanı dışında azotlu gübreye ihtiyaç duymamaktadır.

1.4. *O. viciifolia* (Korunga)

O.viciifolia cinsin en bilindik ve yaygın olarak yetiştirilen türüdür. Bu tür için birçok araştırma (ıslah çalışmaları, morfoloji analizi, marker çalışmaları ve temel sitogenetik analizler) bilgileri mevcut iken diğer kültürü yapılan türler (*O. arenaria*, *O. transcaucasica* -) ve yabani türler ile ilgili henüz kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmemiş olup, mevcut bilgiler oldukça sınırlıdır. *O. viciifolia*, İtalyanca'dan köken alan ve sağlıklı ot (Healthy Hay) anlamına gelen İngilizce "Sainfoin" ismi ile bilinmektedir. Tarımsal açıdan "Common Sainfoin" ve Giant Sainfoin" olmak üzere iki farklı tipi mevcuttur (Carbonero 2011). *O.viciifolia* türü Şekil 1.2' de gösterilmektedir.



Şekil 1.2. *O. viciifolia* (www.biolib.de)

Uzun bir süre Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika gibi dünyanın çeşitli yerlerinde tarımı yapılmıştır (Frame ve ark. 1998, Carbonero 2011). *O. viciifolia*'nın Güney Merkez Asya'ya özgün olduğu ve Avrupa'ya 15. yy'da yayıldığı bazı çalışmalarda belirtilmektedir (Burton ve Curley 1968, Carbonero 2011). Kültür çalışmaları ile ilgili yaklaşık 400 yıl öncesine dayanan bir tarihi olduğu belirtilmektedir. İlk olarak Fransa'da 1582 de ıslah çalışmaları yapıldığı sonrasında Avrupa'da devam ettiği rapor edilmiştir (Piper 1924).

O. viciifolia çoğunlukla geniş getiren hayvanların beslenmesinde yeşil veya kuru ot, silaj ve otlatılarak değerlendirilmektedir (Kempf 2016, Huyen ve ark. 2016). Genellikle yabancı döllendiği ancak nadiren de olsa kendine döllendiği varsayılmaktadır. Yakın zamanda gerçekleştirilmiş olan bir çalışmada korungada yapay yolla tozlama yapılmış, kendi kendine döllenme uygun koşullar içerisinde gerçekleştirilmiş ve yüksek oranda başarı sağlanmıştır. Fakat kendileme sonucu bitki boyu tohum verimi gibi bazı özelliklerinde azalmalar olduğu belirtilmiştir (Kempf 2016).

De Vicente ve Arus (1996) tarafından gerçekleştirilmiş çalışmada *O. viciifolia* türünde tetrasomik gen segregasyonunun baskın olduğu ve autopoliploid olabileceği önerilirken, Zarrabian ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilmiş bir başka çalışmada ise disomik segregasyon nedeniyle allotetraploid olabileceği açıklanmıştır. Buna rağmen progenitörler ve tetraploid korunganın genomik yapısı ile ilgili kesin bir bilgi yoktur (Kempf 2016).

O. viciifolia oldukça farklı iklim koşullarına, farklı toprak tiplerine (alkalin ve nötral, pH 6 ve üzeri) ayrıca kuru ve sulak alanlara adapte olabilmesini sağlayan üstün yapıya sahiptir. Sekonder metabolit olarak bilinen tanince zengin olduğu bilinmektedir. Birincil metabolitler bitkilerin büyüme ve gelişimlerinden sorumlu iken, ikincil (sekonder) metabolitler bitkinin savunmasında sorumlu olduğu bilinmektedir (Heil ve ark. 2002, Volf ve ark. 2015, Kempf 2016). Taninler, phlorotanın, condensed tanin (CTs), hydrolysable tanin (HTs) ve complex tanin olmak üzere 4 farklı grup halinde bulunmaktadır (Serrano ve ark. 2009). Condensed tanin formunda korunganın içeriğinde bulunmaktadır ve hayvan beslenmesine birçok katkısı olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Proteinin kullanımını olumlu yönde etkilediği, büyümeyi hızlandırdığı, süt miktarı ve kalitesini arttırdığı açıklanmıştır (Girard ve ark. 2016, Kempf 2016). Şişkinlik probleminin engellenmesinde de condensed taninlerin önemli bir etkisi olduğu belirtilmiştir (Kempf 2016). Tanince zengin olması sayesinde antiparazitik etkisinin olduğu belirtilmiştir. Diğer yem bitkilerine nazaran

Haemonchus contortus (parazit) için kontrol stratejisi geliştirilmesinde umut vaat eden bir potansiyeli olduğu belirtilmiştir (Heckendorn ve ark. 2007).

O. viciifolia'nın iki farklı simbiyosiz geliştirebildiği bazı çalışmalarda belirtilmiştir. Birinci tip, nodül adı verilen özel yapıların gelişmesi ve *Rhizobium* sp. ile havada gaz halindeki nitrojenin inorganik moleküle fiksasyonudur. İkinci tip ise mikoriza olarak bilinmekte olup, farklı fungus türleri ile oluşmaktadır ve bazı besin maddelerini özellikle fosforu bitkiye kazandırmaktadır (Carbonero 2011).

Bazı araştırmacılar tarafından önemli bir arı bitkisi veya bal bitkisi olma özelliğine sahip olduğu ve kaliks borucuğunun 2-3 mm derinlikte bulunması sebebi ile birçok arı türlerinin korunganın çiçeklerinden polen ve nektar almalarını kolaylaştırdığı belirtilmektedir (Özbek 2011). Korunganın kendine kısır olduğu ve tohum bağlamanın gerçekleşebilmesi için yabancı tozlaşma gerektiği, tozlaşmanın arılar tarafından sağlandığı bununla beraber 52 böcek türünün korunga bitkisini ziyaret ettiği ve bunların arasından 41 türün Hymenoptera (arı) takımı içerisinde yer aldığı bildirilmektedir. Özellikle bal arısının (*Apis mellifera* L) korunga için iyi bir tozlayıcı olduğu ve sonrasında yabancı arıların korunga çiçeklerini ziyaret ettiği belirtilmektedir (Knuth 1906-1909, Özbek 2011).

O. viciifolia sahip olduğu üstün özelliklerinden dolayı çok eskilerden beri bilinen ve 1960 yılına kadar dünyanın bir çok yerinde tarımı yapılmakta olan bir bitkidir (Carbonero 2011). Ancak, bu tarihten itibaren değişen şartlar ve devletlerin artan gıda talebine cevap vermek adına kimyevi gübre kullanımını teşvik etmeleri sonucu ekim sistemlerinde azotlu gübrelere tepkisi iyi olan tahıllar dominant duruma gelmiş ve yem bitkisi korunga ekim alanları diğer tüm baklagiller ile birlikte azalmıştır (Hill 1998, Rochon ve ark. 2004, Carbonero 2011).

O. viciifolia'nın bugün Doğu Avrupa, İspanya, İtalya, İran ve özellikle ülkemizde tarımı yapıldığı belirtilmektedir (Mora-Ortiz ve Smith 2016). Çok yakın bir geçmişte Avrupa birliği çok sayıda ülkeden araştırmacıların katıldığı konsorsiyumlar tarafından hazırlanan ve korunganın her yönüyle incelendiği (moleküler sitogenetik yöntemler hariç) Healthy Hay, FP6-2005 ve Legume Plus, FP6 2012-2016, PITN-GA-2011-289377 adlı 2 araştırma projesini desteklemiştir (Anonim 2019a,b). Tüm bunlar dünyada korunganın öneminin yeniden artmaya başladığının bir göstergesidir. Değişen iklim şartları ve dünyanın daha kurak bir hale

dönüşme olasılığı da göz önüne alındığında özellikle ülkemiz için korunganın çok daha önemli bir tür olacağı açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır.

1.5. Korunganın Tarımsal Özellikleri ve Yetiştiriciliği

Korunga yabancı tozlanan çok yıllık bir yem bitkisidir. Ülkemizde özellikle Orta ve Doğu Anadolu ile Geçit bölgelerinde tarımı yapılmaktadır. *O. viciifolia*'nın orta derecede nemli bölgelerde, ılıman kuşakta iyi gelişim gösterdiği belirtilmektedir. Diğer bitkilerin yetişemediği kireçli ve kıraç topraklarda gelişebildiği, kurağa ve soğuğa oldukça dayanıklı olduğu, fakat ıslak, killi ve asitli toprakları sevmediği diğer araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Sulama imkanı olmayan bölgelerde ve kalkerli topraklarda yoncadan daha yüksek verime sahip olduğu belirtilmektedir. Derinlere kadar inebilen (8-10m) bir kök yapısına sahip olduğu ve bu sebeple toprağın alt katmanlarından bitki besin maddelerini ve suyu alabildiği, bu sebeple kurak alanlar için oldukça önemli olduğu bilinen en dikkat çekici özellikleri arasında yer almaktadır (Açıkgöz 2001).

Korunganın ekim zamanı ılıman iklime sahip bölgelerde sonbahar, kışın sert geçtiği bölgelerde ilkbahar olarak belirtilmektedir. Tohum yatağı bastırılmış, düzeltilmiş, kesekleri kırılmış ve yabancı otlardan arındırılmış olmalıdır. Ekim derinliği olarak ise 2-2.5 cm belirtilmektedir. Yalnız ekilmekle beraber korunganın buğdaygillerle (otlak ayrığı, kılçıksız brom vb.) karışık olarak da ekilebileceği belirtilmektedir. Korunganın en önemli özelliklerinden birisinin fakir topraklarda yetişebilmesi olmakla beraber, sadece ilk yıl köklerindeki bakteriler faaliyete geçene kadar azotlu gübre verilmesi gerektiği belirtilmektedir. Oldukça kaliteli özellikleri olan korunga bitkisinin yetiştiriciliği sırasında kök kurtları sorun yaratmak ile beraber kök, taç ve gövde çürüklüğü, solgunluk, gövde ve yaprak lekeli gibi diğer hastalıklara da rastlandığı belirtilen problemler arasında yer almaktadır (Tan ve Sancak 2009).

1.6. Problem İfadesi

Onobrychis cinsine dahil türler üzerinde yapılan çalışmaların sayısı son derece sınırlıdır. Son 60 yıldır korunga bitkisi ihmal edilmiş olan bitkiler arasında olduğundan cinsin içerisinde yer alan türler ve genomları yeni teknikler ile henüz analiz edilmemiştir. Bu nedenle de ıslah programlarında ihtiyaç duyulan birçok temel bilgi [kromozom sayısı, ploidi düzeyi, ne tür poliploid oldukları (auto/allo) genom yapı ve organizasyonu, genom ilişkileri

vb.] korunga türleri için mevcut değildir. Buna karşılık ülkemizde tarımsal açıdan başarı şansı yüksek korunganın daha iyi rekabet edilebilmesi için modern ıslah teknikleri kullanılarak bazı zayıf yönlerinin iyileştirilmesi gereği vardır. Islah projelerinin iyi bir şekilde planlanabilmesi ve en doğru ıslah stratejilerinin belirlenebilmesi için korunga ve yakın akrabaları ile ilgili bu temel bilgilerin elde edilmesi zorunluluğu vardır.

Yabani türlerin yetiştikleri bölgenin kuraklık, yağış, sıcaklık, tuzluluk, hastalık ve zararlılar gibi çeşitli çevresel koşullarına uyum sağladıkları ve oldukça fazla çeşitlilik gösterdikleri belirtilmiştir (Akçelik 2009). Genetik kaynak koleksiyonları içerisindeki genetik çeşitliliğin incelenmesi ıslah çalışmalarında uygun stratejilerin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Türkiye'nin *Onobrychis* cinsi kapsamındaki türlerin ıslahında kullanılacak yabani türleri açısından oldukça zengin olduğu fakat bu genetik materyallerin bu güne kadar yeterince incelenmediği ıslah çalışması gerçekleştirilmediği belirtilmektedir (Akçelik 2009).

1.7. Amaç

Gerçekleştirilmiş olan bu doktora tez çalışması ile;

Yeni moleküler sitogenetik yöntemler ile [FISH, GISH, filogenetik analizler (nrITS)] korunganın değişik ülkelerde kültürü yapılan türleri (*O. viciifolia*, *O. transcaucasia* ve *O. arenaria*) ile bazı yabani akrabalarına ait genomların ilk defa analiz edilmesi, genom yapıları ilişkileri, ve progenitörleri ile ilgili yeni bilgilerin elde edilmesi amaçlanmaktadır.

1.8. Moleküler Sitogenetik Yöntemler

1.8.1. Flow Sitometri Yöntemi ile Çekirdek DNA Analizi

Çekirdek DNA içeriği, replike olmamış haploid nükleusun içerdiği DNA miktarıdır. Çekirdek DNA'sı tek veya düşük kopya kodlayan sekanslar, promotor, intron, düzenleyici DNA elementleri ve genomda yüzlerce veya binlerce miktarda bulunan çeşitli tekrarlı DNA motiflerinden oluşmaktadır (Heslop-Harrison ve Schmidt 1998).

Çekirdek DNA içeriği tüm yaşayan organizmaların temel biyolojik karakteridir ve hücre, doku ve organizma düzeyinde birçok diğer karakteri de etkilemektedir. Çekirdek DNA

miktarının türlere özgü olması sitotaksonomi ve evrim çalışmaları için vazgeçilmez bir karakter olmasını sağlar. Çekirdek DNA içeriği bitki türleri arasında büyük bir varvasyona sahip olmakla birlikte 63-64 Mb (*G. margaretae* Hutch. yaklaşık $2n = 40$, *Genlisea aurea* A. St. - Hil. yaklaşık $2n = 52$) ile 149.000 Mb (*Paris japonica* (Franch. & Sav.) Franch., $2n = 8x = 40$) aralığında değişmektedir (Greilhuber ve ark. 2006, Pellicer ve ark. 2010, Bennett. ve Leitch 2011, Heslop-Harrison ve Schwarzacher 2011). Türler arasında genom boyutundaki değişimin kromozom sayısından bağımsız olduğu belirtilmektedir (Greilhuber ve ark. 2006; Pellicer ve ark. 2010; Leitch ve Leitch 2013). Soya, ayçiçeği ve mısır gibi bazı türlerde %32'ye kadar çıkabilen tür içi varvasyon gözlemlenirken *Cistus*, *Capsicum* ve *Sesleria albicans* gibi bazı türlerde herhangi bir değişim olmadığı belirtilmiştir (Graham ve ark. 1994; Rayburn ve ark. 1997; Michaelson ve ark. 1991; Rayburn ve ark. 1989; Ellul ve ark. 2002; Moscone ve ark. 2003; Lysak ve ark. 2000). Çekirdek DNA içeriğindeki değişimin sebebi olarak birçok kromozomal ve moleküler düzeyde mekanizmanın (retrotranspozonlar, tekrarlı DNA bölgeleri vb. faktörler) rol aldığı saptanmıştır (Vitte ve Panaud 2005; Hu ve ark. 2010). Genom yapısı, organizasyonu ve değişiminin anlaşılmasında çekirdek DNA içeriği oldukça önemli bir faktördür.

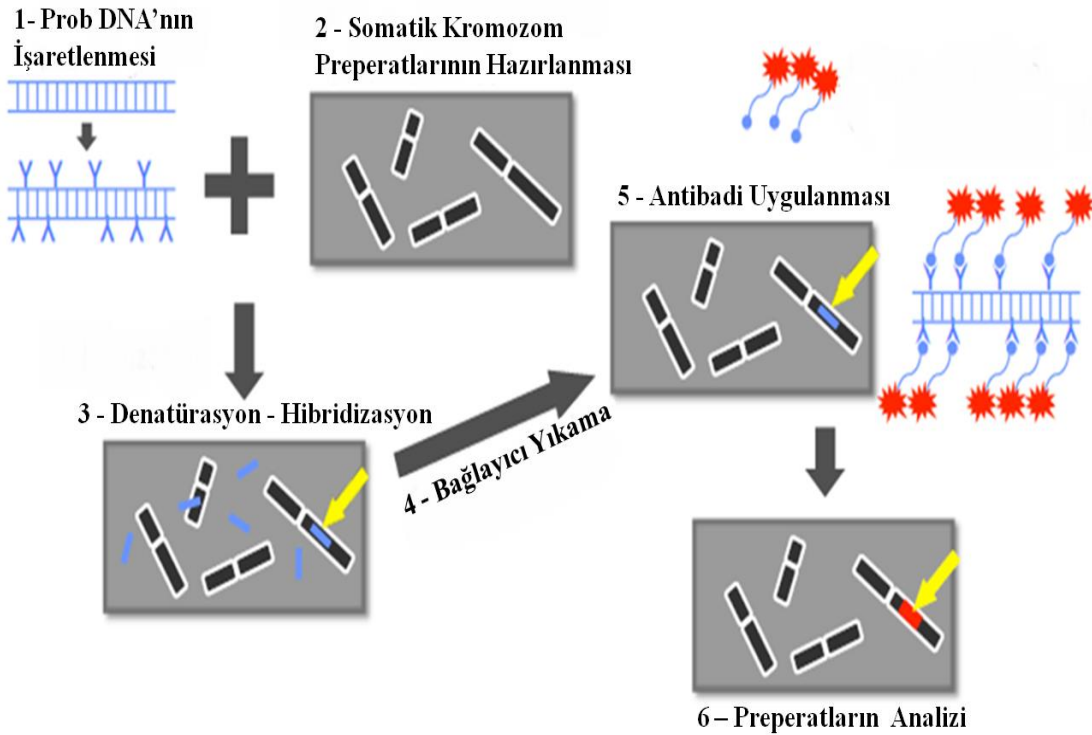
Uzun süre önce çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesinde feulgen densitometri yöntemi kullanılmaktaydı. Fakat son zamanlarda çekirdek DNA içeriğinin saptanması ve ploidi düzeyinin belirlenmesinde güvenilirliği, kolaylığı ve hızından dolayı flow sitometri yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemin gerçekleşmesinde kullanılan Flow Cytometry cihazı Şekil 1.3' de gösterilmektedir.



Şekil 1.3. Flow cytometry

1.8.2. Florasan *In Situ* Hibridizasyon Yöntemi

FISH, DNA: DNA hibridizasyonu esasına dayanan en bilindik moleküler sitogenetik yöntemlerden birisidir. Prob adı verilen sentetik spesifik nükleik asit dizilerinin kromozomal DNA'ya hibridizasyonu prensibi ile gerçekleşen bir tekniktir. Prob olarak kullanılacak DNA bölgesi PCR, nick translasyonu ya da random primer labelling gibi yöntemler ile işaretlenir. Analiz edilmesi planlanan bitki materyalinin kök uçlarından somatik kromozom preparatları hazırlanır. Kromozomal DNA ve prob DNA denatürasyonu gerçekleştirilir. Preparatlardaki kromozomlara prob DNA'nın hibridizasyonu sağlanır. Antibadi ile muamele ve bir dizi yıkama işleminden sonra kromozomlar DAPI florosan boya ile boyanarak mikroskop altında incelenirler. Böylelikle kromozomlar üzerinde problemlerin fiziksel olarak lokasyonlarının belirlenmesini sağlamaktadır. Yöntemin temel aşamaları Şekil 1.4.' de gösterilmektedir (Mao 2014).

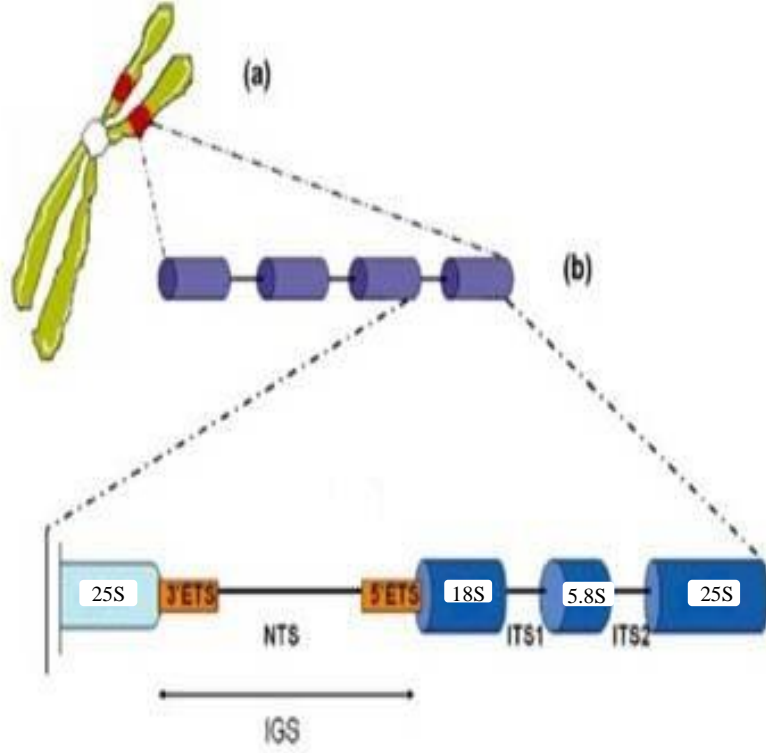


Şekil 1.4. FISH yönteminin temel aşamaları. (1) Prob DNA'nın işaretlenmesi (2) Somatik kromozom preparatlarının hazırlanması (3) Denatürasyon-hibridizasyon (4) Bağlayıcı yıkama (5) Antibadi uygulaması (6) Florosan mikroskop ile sinyallerin analizi (Mao 2014).

FISH analizlerinde sentromerik ve telomerik tekrarlı bölgeler, 5S ve 35S rDNA, çeşitli cins veya tür spesifik DNA dizileri gibi kodlanan veya kodlanamayan DNA bölgeleri prob olarak kullanılmaktadır ve kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları FISH yöntemi ile belirlenmektedir (Cuadrado ve Schwarzacher 1998, Harper ve Zacheus Cande 2000, Hasterok ve Maluszynska 2000, Harrison ve Heslop-Harrison 1995, Vershinin ve ark. 1996). Bu sayede kromozomların teşhisi ve homologları ile eşleştirilmesi son derece hassas bir şekilde yapılabilmekte, genom analizi ve ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılacak karyogramların elde edilmesi mümkün olabilmektedir (Hasterok ve ark. 2001, Lim ve ark. 2000).

Fiber FISH, Multicolor FISH ve Cobra FISH olmak üzere farklı amaçlar ile kullanılan modifiye edilmiş farklı çeşitleri de vardır (Çimen 2010).

Ribosomal DNA bitkilerde yaygın olarak kullanılan prob DNA bölgelerinden birisidir. Ribosomal DNA (rDNA) çoğunlukla transkribe olan ve ribozom için gerekli olan komponentleri içerir. 18S - 5.8S - 25S rRNA (35S öncü RNA olarak birlikte transkribe edilirler) ve 5S rRNA kodlayan rRNA gen bölgeleri; korunmuş DNA bölgeleri + transkribe olan + transkribe olmayan (NTS) ara bölgelerden oluşmaktadır (Alvarez ve Wendel 2003; Volkov ve ark. 2004). Ribosomal DNA' lar nükleer genom içerisinde bir veya daha fazla lokusta ardışık tekrarlı diziler halinde bulunmaktadır. 18S - 5.8S - 25S rRNA ve 5S rRNA kodlayan DNA bölgeleri evrimsel olarak korunmuş bölgeler olmakla birlikte NTSs ve ITS bölgeleri varvasyon gösterebilmektedir. 35S rDNA bölgeleri genellikle kromozomların NOR bölgeleri üzerinde lokalize olur iken, 5S rDNA bölgeleri genellikle bağımsız lokalizasyon göstermektedirler (Heslop-Harrison 2000, Volkov ve ark. 2004). Genom içerisinde yaygın olarak bulunmaları ve korunmuş yapıya sahip olmaları sebebiyle, kromozomlar üzerinde FISH tekniği ile fiziksel haritalanma çalışmaları ve karşılaştırmalı sitogenetik çalışmaları için ideal marker oldukları belirtilmektedir (Kulak ve ark. 2002, Ksiazczyk ve ark. 2010, Kolano ve ark. 2015). Şekil 1.5'de rDNA lokusu şematik olarak gösterilmektedir (Pocjai ve Hyvönen 2010).

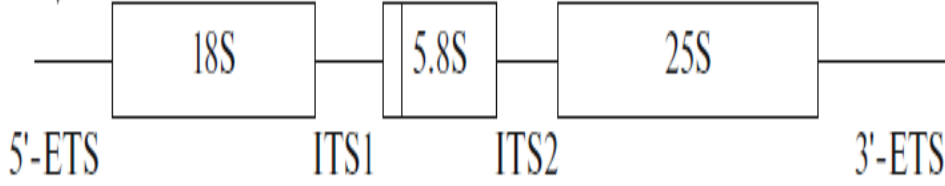


Şekil 1.5. Bitkilerde rDNA lokusunun şematik olarak görünüşü (a) rDNA bölgesinin kromozom üzerinde lokalizasyonu. (b) Tekrarlı gen blokları (18S-5.8S-25S) (Poczai ve Hyvönen 2010)

Ribosomal rRNA genleri ve ara bölgeleri (ITS, ETS, IGS) filogenetik bilginin kaynağı olarak oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. 35S rDNA'in, ITS1 - ITS2, ETS (transkripsiyonu yapılan dış ara bölgeler) ve IGS (intergenik ara bölge) bölgeleri ve 5S rDNA'in NTS (transkribe edilmeyen ara bölge) bölgeleri filogenetik markör olarak kullanılmaktadır (Alvarez ve Wendel 2003, Morgan ve ark. 2009, Kolano ve ark. 2015). Bahsedilen DNA bölgeleri şekil 1.6. da gösterilmektedir. Filogenetik markör olarak kullanılmalılarının yanısıra filogenetik bağlam içinde sitolojik bilginin daha doğru yorumlanmasına imkan sağlamaktadırlar (Kolano ve ark. 2015).

ITS (Internal Transcribed Spacer - Transkripsiyonu Yapılan İç Ara Bölgeler)

Ribozomal DNA'nın bir parçası olan ITS, 18S-5,8-25S rDNA unitesinin içerisinde 5.8S rDNA'in iki yanında lokalize olmaktadır. ITS bölgesi; ITS1, ITS2 ve oldukça yüksek düzeyde korunmuş 5.8S rDNA olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır.



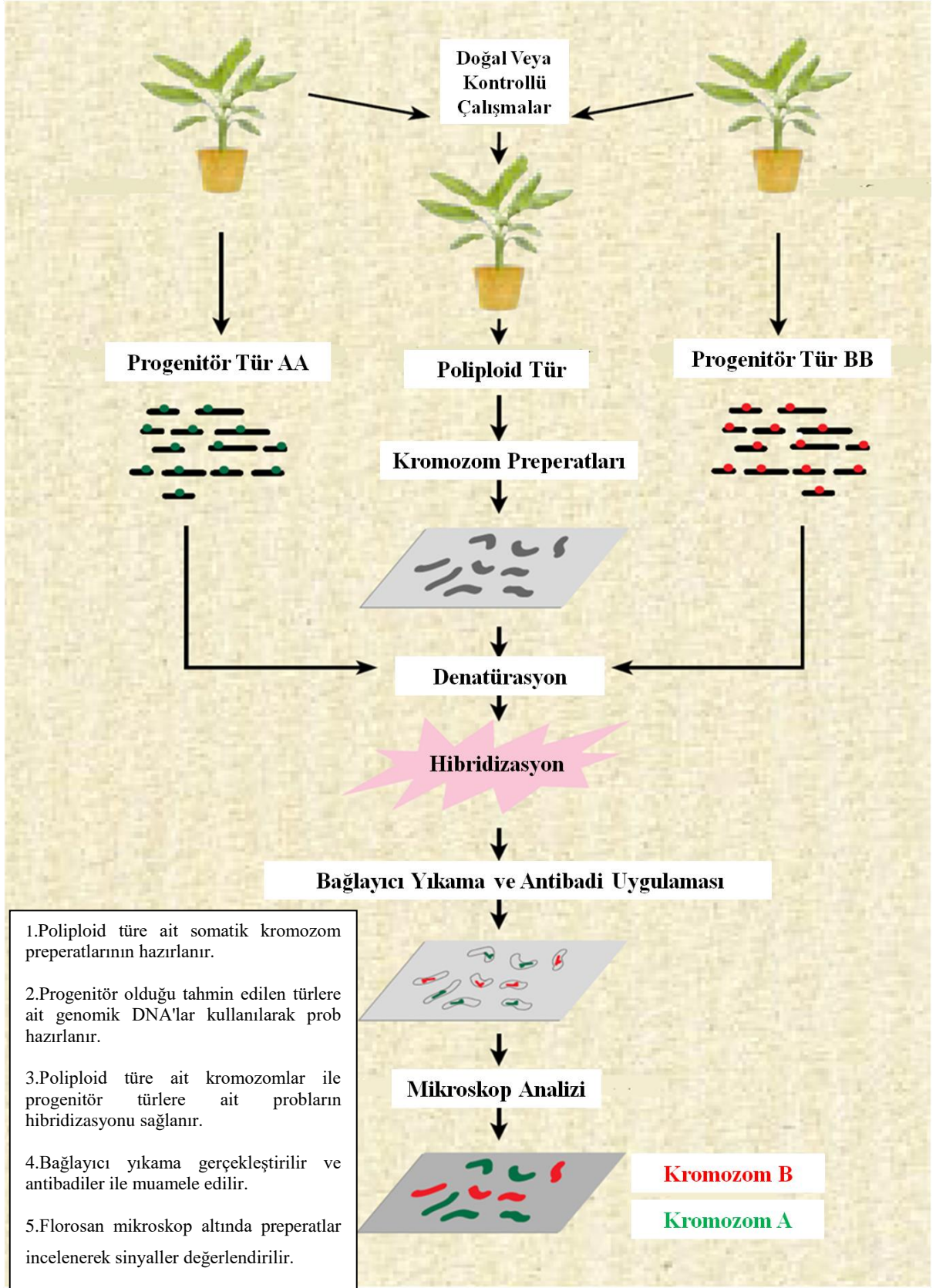
Şekil 1.6. Bitkilerde 35S rRNA genlerinin organizasyonu (Henres ve ark. 2008, Rodionov ve ark. 2017, modifiye edilmiştir)

Kapalı tohumlu bitkilerde ITS dizilerinin baz uzunlukları 500 bp - 750 bp aralığında değişirken, açık tohumlu bitkilerde daha uzun olmakla birlikte 1.500 bp-3.500 bp aralığında değişmektedir (Baldwin ve ark. 1995, Maggini ve ark. 1998, Liston ve ark. 1996). Kodlayan (5.8S rDNA) DNA bölgesinin aksine ara bölgeler hızlı bir şekilde evrilmektedirler (Poczai ve Hyvönen 2010). Bu ara bölgelerden olan ITS filogenetik analizlerde oldukça yaygın kullanılmaktadır. ITS bölgesinin sahip olduğu avantajlar; (1) biparental kalımları (2) PCR çoğaltımının problemlili olmaması (3) çoklu kopya (multicopy) yapısına sahip olmaları (3) sekans analizi için uygun bp uzunluğuna sahip olmaları (4) yayınlanmış olan birçok çalışmada ITS dizilerinin sahip olduğu varvasyonunun tür ve cins bazında evrimsel çalışmaların gerçekleştirilmesine imkan sağladıklarının belirtilmesidir (Baldwin ve ark. 1995, Liston ve ark. 1996). Transkribe olan veya olmayan ara bölgelerdeki DNA sekans varvasyonu tür, cins ve familya bazında filogenetik analizler için kullanılmaktadır (Baldwin ve ark. 1995, Alvarez ve Wendel 2003, Feliner ve Rossello 2007). ITS bölgelerinde gözlemlenen varvasyonun dizi içerisinde meydana gelen tek nükleotit polimorfizmi (SNP) veya insersiyon/delesyondan kaynaklandığını belirtmişlerdir (Poczai ve Hyvönen 2010).

1.8.3. Genomik *In Situ* Hibridizasyon Yöntemi

GISH, doğal poliploidlerin, hibrit bitkilerin ve onların döllerinde orjinlerinin, genomik kompozisyonlarının ve genomlar arası düzenlenmelerinin incelenbilmesinde ve ayrıca genomda yabancı kromozomların saptanmasında kullanılan bir tekniktir (Bennett ve ark. 1992, Mukai ve ark. 1993a, Mukai ve ark. 1993b, Wetzel ve Rayburn 2000). Bu method, total genomik DNA'ların prob olarak kullanılarak hibrit veya allopoliploid türlerin parental orjinlerinin belirlenmesini sağlamaktadır. GISH tekniği farklılıklar olmak ile birlikte genel olarak FISH tekniği aşamaları ile benzerlik göstermektedir. FISH tekniğinde çeşitli tekrarlı DNA bölgeleri prob olarak kullanılırken, GISH tekniğinde progenitor olduğu düşünülen

türlere ait yaprak dokularından izole edilmiş ve etiketlenmiş genomik DNA prob olarak kullanılmaktadır. Genel olarak hibrit veya poliploid bitkinin kök ucu meristem dokularından preparat hazırlığı, preparatların RNase ile muamele edilmesi, prob DNA ların PCR veya NICK translasyonu yöntemleri ile işaretlenmesi, denatürasyon-hibridizasyon aşamaları, preparatların antibadi ile muamele edilmesi, preparatların DAPI ile boyanması, mikroskop ile kromozomlar ve üzerinde lokalize olmuş sinyallerin görüntülerinin elde edilmesi ve analizi aşamalarından oluşmaktadır. GISH metodunun temel aşamaları Şekil 1.7'de şekilde gösterilmektedir.



Şekil 1.7. GISH yönteminin temel aşamaları (Courtesy of CIRAD, Heslop- Harrison ve ark. 1998,1999).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Korunga üzerinde bu güne kadar yapılmış olan sitogenetik çalışmalar oldukça sınırlı sayıda olup, kromozom sayımı ve klasik yöntemler (feulgen, aseto-carmin gibi) ile yapılmış olan karyotip analizlerinden ibarettir. Bu çalışmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Hoşgören (2006) feulgen boyama yöntemini kullanarak gerçekleştirdiği çalışmasında güneydoğu Anadolu bölgesinden toplanmış olan 3 farklı *Onobrychis* türünü incelemiştir. Araştırmacı yaptığı çalışmasında incelenen türlerden *O. carduchorum* C. C. Towns. ve *O. kotschyana* Fenzl $2n = 14$ kromozoma; *O. megataphros* Boiss. ise $2n = 32$ kromozoma sahip olduğunu belirlemiştir. Bununla birlikte araştırmacı kromozom boyutlarının küçük olması, hücre membranının kalın olması ve boyama işleminin sorunlu olması gibi nedenlerden dolayı *Onobrychis* cinsi de dahil olmak üzere fabaceae ailesi içerisinde yer alan cinsler üzerinde sitogenetik çalışma yapmanın zor olduğunu belirtmiştir.

Akçelik (2009) çalışmasında 4 farklı yabancı *Onobrychis* türü için temel sitogenetik yöntemlerden biri olan feulgen yöntemi ile karyolojik incelemeler yapmıştır. Çalışmalar sonucunda *O. hypargyrea* Boiss., *O. gracilis* Besser, *O. tournefortii* (Willd.) Desv. türlerinin $2n = 14$ kromozoma; *O. argyrea* Boiss subsp. *argyrea* türü $2n = 16$ kromozoma sahip olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilmiş analizler sonucunda kromozom boyları, *O. gracilis*, *O. hypargyrea*, *O. tournefortii* ve *O. argyrea* türleri için sırasıyla 1,46 - 2,34 μm , 0,80 - 1,83 μm , 1,40 - 2,19 μm , 1,39 - 2,94 μm olarak belirtmiştir.

Hesamzadeh Hejazi ve Nasab (2010) *Onobrychis* cinsi içerisinde yer alan 20 farklı türe ait 45 populasyon üzerinde hematoxylin-iron boyama yöntemini kullanarak mitotik kromozom sayımı ve karyogram analizi yapmışlardır. Yapılan bu çalışmada *Onobrychis* cinsinin 2 farklı temel kromozom sayısına ($x = 7$ ve $x = 8$) sahip olduğu, bununla birlikte $x = 7$ temel kromozom sayısının daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Çalışmada yer alan diploid populasyonlarda temel kromozom sayısı $x = 7$ ve $x = 8$, tetraploid populasyonların tümünde ise temel kromozom sayısı $x = 7$ olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada *Onobrychis* kromozom uzunluklarının 2,33- 4,02 μm aralığında ve morfolojilerinin çoğunlukla metasentrik, submetasentrik ve nadiren subtelosentrik olarak belirlemişlerdir.

Arslan ve ark. (2012) aseto-orcein boyası kullanarak yaptıkları çalışmalarında *O. altissima* Grossh., *O. oxyodonta* Boiss., *O. hajastana* Grossh., *O. tournefortii* türlerinin $2n = 14$ kromozoma; *O. subacaulis* Boiss. ve *O. galegifolia* Boiss türlerinin ise $2n = 16$ kromozoma sahip olduğunu saptamışlardır. Ayrıca *Onobrychis* türlerinin 2 farklı temel kromozom sayısına ($x = 7$ ve $x = 8$) sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Ranjbar ve ark. (2012) *Onobrychis* türleri için kromozom sayılarının belirlenmesi ve mayotik düzenlenmeleri ile ilgili 10 türe ait 25 populasyonu kapsayan bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Analiz edilmiş olan populasyonların çoğunluğunun $2n = 14$ kromozomdan oluşmasına rağmen bazı türlerin $2n = 16$ kromozom sayısına sahip olduğunu belirtmişlerdir. İncelenen seksiyonlardan biri olan *Hymenobrychis* seksiyonunda gözlemlenen tür içi ve türler arası farklılıkların aneuploidi ve poliploididen kaynaklanabileceğini belirtilmiştir. Gözlemlenen sonuçlara göre; taksonların çoğunluğunda mayoz bölünme süresince düzenli bivalent eşleşme ve kromozom ayrılmaları görüldüğü fakat bazı farklı taksonlarda B- kromozomlarının saptandığı belirtilmiştir.

Abuş (2013) Türkiye'de doğal olarak yetişen 6 farklı *Onobrychis* türünün (*O. hyparygera*, *O. tournefortii*, *O. galegifolia*, *O. meschetica* Grossh., *O. albiflora* Hub.-Mor., *O. radiata*) kromozom sayılarını ve morfolojilerini feulgen ve hematoxylin-iron metodları ile incelemiştir. Yapılan çalışmada türlerin tümünde $2n = 14$ kromozom sayısı tesbit edilmiş olup, kromozomların sahip oldukları sentromer pozisyonlarına göre median'dan submedia'na değiştiğini ve *O. meschetica* türü dışındaki türlerin bazı kromozomları üzerinde ise satelit gözlenmiştir.

İleri (2014) gerçekleştirdiği tez çalışmasında Türkiye'de doğal olarak yetişen *Onobrychis* cinsi *Onobrychis* seksiyonunda yer alan 7 farklı endemik korunga (*O. lasistanica* Širj., *O. fallax* Freyn & Sint., *O. beata* Širj., *O. cilicica* Kit Tan & Sorger, *O. podperae* Širj., *O. sulphurea* Boiss. & Balansa., *O. pisidica* Boiss.) türünün kromozom sayılarını ve morfolojilerini feulgen ve hematoxylin-iron yöntemlerini kullanarak incelemiştir. Gerçekleştirmiş olduğu analizlere göre *O. lasistanica* Širj. $2n = 28$ kromozoma sahipken, diğer türlerin $2n = 14$ kromozom sayısına sahip olduğunu ve kromozomlarının median'dan submedian'a kadar değişim gösterdiğini belirtmiştir.

Mora-Ortiz ve Smith (2018) *O.viciifolia* ile ilgili hazırlamış oldukları kapsamlı derleme çalışmasında tür ile ilgili birçok dikkat çekici bilgileri paylaşmışlardır. Kurak yada yağış oranının düşük olduğu bölgelerde sahip olduğu kök yapısı sayesinde *O.viciifolia'* nın yetişebildiği, birçok hastalığa dayanıklı olduğu ve önemli bir polen ve nektar kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Moleküler genetik çalışmaların sınırlı olduğu için *O.viciifolia'*nın genetik yapısı ile ilgili bilgilerin sınırlı olduğu rapor edilmiştir.

Lorenz (2011) geviş getiren hayvanlarda rumen içerisinde protein kullanımını arttırmada potansiyeli olduğunu ve bu özelliklerinin *O.viciifolia'*nın tanin kompozisyonu sayesinde olduğunu belirtmiştir.

*O.viciifolia'*nın polifenolca ve tanince zengin olduğu ve bu bileşiklerin DNA ve RNA ekstraksiyonunda kontaminasyon-degradasyon gibi problemlere yol açtığı saptanmıştır (Carbonero ve ark. 2012). İki farklı kromozom sayısının olduğu ($2n = 2x = 14$ ve $2n = 4x = 28$), diploid türlerin literatürde nadir olduğu, fakat tetraploid türlerin oldukça yaygın olduğu belirtilmiştir (Carbonero ve ark. 2011).

Moleküler sitogenetik yöntemler bitkilerin genom yapısı ile ilgili moleküler düzeyde ve detaylı bilgiler elde edilmesinde kullanılmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla bugüne kadar yeni moleküler sitogenetik (florasan *in situ* hibridizasyon (FISH) ve genomik *in situ* hibridizasyon (GISH) yöntemleri korunga genomlarının analizinde kullanılmamıştır. FISH, GISH ve Flow Sitometri teknikleri kullanılarak bazı bitkiler üzerinde yapılmış olan çalışmalardan bir kısmı aşağıda sunulmuştur.

Lysak ve Dolezel (1998) gerçekleştirdikleri çalışmalarında flow sitometri yöntemi ile *Sesleria* türlerinin çekirdek DNA içeriğini analiz etmişler ve tetraploid türlerde Çekirdek DNA içeriğinin 9,097 pg (*S. caerulea* (L.) Ard.) ile 9,585 pg (*S. heufleriana* Schur) aralığında, oktaploid türlerde ise yaklaşık 2 kat daha fazla olduğunu ve 17,729 pg (*S. sadleriana* Janka) ile 18,278 pg (*S. tatrae*) aralığında değiştiğini saptamışlardır.

Bisht ve Mukai (2001) gerçekleştirdikleri çalışmada GISH tekniğini kullanarak *Eleusine coracana* ($2n = 4x = 36$) türünün progenitörlerini belirleyebilmek için progenitör olma ihtimali olan *E. tristachya* ($2n = 2x = 18$), *E. indica* ($2n = 2x = 18$), *E. floccifolia* ($2n = 2x = 18$), *E. intermedia* ($2n = 2x = 18$), *E. jaegeri* ($2n = 2x = 20$) ve *E. multiflora* ($2n = 2x =$

16) türleri ile analizler gerçekleştirmişlerdir. *E. indica* ($2n = 2x = 18$) ve *E. floccifolia* ($2n = 2x = 18$) türlerinin genomik DNA'larının *E. coracana* ($2n = 4x = 36$) kromozomlarına hibridize olduğu ve bu türlerin progenitör olma ihtimallerinin olabileceğini önermişlerdir.

Hajdera ve ark. (2003) *Lupinus angustifolius* L. ve *L. consentinii* Walp. (acı bakla) türleri üzerinde gerçekleştirdikleri flow sitometri ve FISH analizleri ile türlerin çekirdek DNA içerikleri ve rRNA gen bölgelerinin dağılımını incelemişlerdir. Yapılan çalışmada *L. angustifolius* türünün çekirdek DNA içeriği 2,07 pg olarak belirlenirken *L. consentinii* türünün ise 1,54 pg çekirdek DNA içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilmiş olan FISH analizi sonuçlarına göre rRNA gen ailesinin dağılımının iki tür arasında farklılık gösterdiğini (*L. angustifolius* 4 homolog 5S rDNA + 1 homolog 25S ; *L. consentinii* 1 homolog 25S + 3 homolog 5S) saptanmış ve böylece türlerin genom yapıları hakkında daha önce bilinmeyen yeni bilgiler elde edilmiştir.

Matyasek ve ark. (2003) GISH yöntemini kullanarak *Nicotiana rustica* L. ($2n = 4x = 48$) türünün bir allotetraploid olduğunu ve progenitörlerinin (veya yakın olan türlerin) *N. paniculata* L. ($2n = 2x = 24$, maternal P-genom) ve *N. undulata* Ruiz & Pav. ($2n = 2x = 24$, paternal U-genom) olduğunu doğrulamışlardır. Bununla beraber FISH analizi ile 5S ve 35S rDNA lokuslarını incelemişler ve progenitörlerdeki tüm 5S ve 35S rDNA lokuslarının aritmetik olarak toplamının allotetraploid türde mevcut olduğunu belirlemişlerdir.

Hasterok ve ark. (2005) Brassicaceae (turpgiller) cinsi içerisinde yer alan diploid türlerde (*Brassica nigra* (L.) K.Koch, *B. oleracea* L., *B. campestris*.) tekrarlı DNA bölgelerinin kromozomlar üzerindeki lokasyonlarını tespit etmek ve allotetraploid (*Brassica carinata* A.Braun, *Brassica juncea* (L.) Czern., *Brassica napus* L.) türlerde atasal genomları tespit etmek amacı ile FISH ve GISH analizleri gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada elde edilen GISH sonuçlarına göre; genomik DNA problemleri ile *B. juncea* ve *B. carinata* türlerinin orjinlendiği genomların kesin bir şekilde belirlenebilmesine olanak sağlar iken, *B. napus* için kısmi bir sonuç alınabilmiştir.

Hasterok ve ark. (2005) Brassicaceae (turpgiller) türleri üzerinde yapmış oldukları FISH analizleri sonucunda 5S rRNA ve 35S rRNA gen bölgelerinde, sayı ve kromozomal lokasyonları bakımından türler arası farklılıklar gösterdiklerini ve farklılıkların genoma göre değişkenlik gösterdiğini saptamışlardır.

Leitch ve Benneth (2004) hazırlamış olduğu raporda poliploidizasyondan sonra türlerin çekirdek DNA içeriklerinde 3 farklı olasılığın (artış-azalış-sabit kalma) gerçekleşebilme ihtimali olduğunu belirtmişlerdir. Popliploidizasyonla beraber türlerde özellikle genom boyutunda azalmanın geniş çapta gözlemlenen bir fenomen olduğunu belirtmişlerdir.

Breda ve ark. (2012) FISH yöntemiyle 2 farklı *Brachypodium* (*B. sylvaticum* ve *B. pinnatum* (L.) P.Beauv.) türünün genomlarında rDNA (35S rDNA ve 5S rDNA) sayısı ve lokasyonlarını belirlemişler ve $2n = 18$ kromozoma sahip *B. pinnatum* aksesyonlarında 5S rDNA sinyal sayısı 2 iken, 35S rDNA sinyal sayısının ise sabit olmayıp 2 ile 3 arasında değiştiğini saptamışlardır. $2n = 28$ kromozoma sahip *B. pinnatum* aksesyonlarında ise her iki rDNA bölgesi için de 4 sinyal gözlemişlerdir. *B. sylvaticum* ($2n = 18$) aksesyonlarında ise 5S rDNA sinyal sayısının sabit (2 bölgede sinyal) iken, 35S rDNA sinyal sayısının 2 ile 6 arasında değişkenlik gösterdiğini gözlemişlerdir. Çalışmanın sonunda araştırmacılar, çalışmada incelenen *Brachypodium* türlerinde rDNA bölgelerinin sayısı bakımından tür içi ve türler arası polimorfizm bulunduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte 35S rDNA bölgelerinin, 5S rDNA bölgelerine oranla daha fazla varyasyon gösterdiğini bildirilmiştir. Araştırmacılar rDNA bölgelerinde gözlenen bu varyasyonun kaynağının kromozomların yeniden düzenlenmesi, gen dönüşümü, eşit olmayan rekombinasyon veya transposable elementlerin olabileceğini belirtmişlerdir (Lim ve ark. 2000, Raskina ve ark. 2004).

Pellicer ve ark. (2013) gerçekleştirdikleri çalışmada farklı *Artemisia* türlerinde FISH yöntemi ile 35S ve 5S rDNA bölgelerinin dağılımını, rDNA bölgelerinin farklı poliploidi düzeylerindeki evrimlerini ve genom boyutu ile ilişkisini incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada *Artemisia* türlerinin ploidi düzeyinin diploid ile decaploid ($2n = 2x = 18$, $2n = 4x = 36$, $2n = 6x = 54$ ve $2n = 10x = 90$) arasında, 2C çekirdek DNA içeriğinin ise 4,20 pg ile 24,32 pg aralığında değiştiği saptanmıştır. Çalışmada diploid türler arasında farklı sayıda rDNA lokusunun bulunduğu saptanmıştır (*A. dracunculus* L. kompleksi türleri için çoğunlukla 2 rDNA lokusu, Avrasya bölgesi türleri için 3-5 lokus). Poliploidlerde ise 2 temel farklılaşma olduğu gözlenmiş ve *A. dracunculus* kompleksinde artan poliploidi düzeyi ile rDNA lokusu sayısının doğru orantılı olduğu saptanmıştır. Monoploid genom boyutunda ise azalma olduğu belirtilmiştir. Bununla beraber Avrasya poliploidleri için rDNA lokuslarında

azalma olduğu ve bunun poliploidi oluşumu süresinde bazı tekrarlı DNA bölgelerinin eliminasyonu ile ilgili olabileceği önerilmiştir.

Kolano ve ark. (2015) diploid *Chenopodium* türleri üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada genom boyutu, rDNA lokuslarının evrimi, ve aynı zamanda nükleer ITS bölgesi ve 4 farklı plastid bölgesini (*rpl32-trnL*, *rps16-trnK*, *petLpsbE* ve *psbD-trnT*) inceleyerek türler arası filogenetik ilişkiyi incelemişlerdir. Çalışmada *Chenopodium* türlerinin karyotip ve genom boyutu filogenetik bağlamda incelenerek aneestör genomların boyutları ve rDNA sayı ve lokalizasyonları ile ilgili yeni bilgiler elde edilmiştir. Genom boyutu, rDNA lokus sayısı ve lokalizasyonu bakımından bazı türler arasında benzerlikler, diğer bazıları arasında ise farklılıklar gözlenmiştir. Analizler sonucunda her iki farklı rDNA bölgesi (5S ve 35S) için farklı kromozomlar üzerinde lokalize olmuş 1 çift subterminal pozisyonadaki lokusun aneestör olduğu saptanmıştır. Çalışmada analiz edilmiş olan 23 diploid türün $2n = 2x = 18$ kromozoma sahip olduğu, artış ve azalışların gözlemlendiği çekirdek DNA içeriğinin ise 0,734 pg ile 2,721 pg aralığında değiştirdiği ve aneestör genom boyutunun 1,39 pg/2C olduğu belirtilmiştir. Genom boyutu ve rDNA lokus sayısı arasında herhangi bir korelasyonun olmadığı ve genom boyutunda gözlemlenen birçok artışın ve azalışın farklılaşma ve türleşme ile ilişkilendirilebileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmaların yanısıra moleküler filogeni analizleride standart gen bölgeleri (spesifik gen bölgesi) kullanarak cins ve tür düzeyinde bilgilerin elde edilmesi ve filogenetik ilişkilerin belirlenebilmesi açısından önemlidir. Böylelikle organizmaların genomlarının küçük parçalarındaki DNA dizisi farklılıkları türlerin tanımlanmasını sağlar. Bu amaçla plastid genomundaki bazı bölgeler (*rbcL*, *psbA-trnH*, *trnL*, *rpoC1*) ve nükleer genomuna özgü transkribe edilen internal ara bölgesi (nrITS) bitkilerde kullanılan dikkat çeken bölgelerdir.

Yaygın olmamakla birlikte son zamanlarda *Onobrychis* cinsi içerisinde yer alan bazı türler üzerinde moleküler markör yöntemlerinden yararlanılarak veya plastid genomundaki yada nükleer genomdaki bazı gen bölgeleri kullanılarak moleküler filogeni analizleri gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta yapılan çalışmalara göre *Onobrychis* cinsi *Onobrychis* ve *Sisyrosema* olmak üzere 2 alt cinsten oluşmakta ve *Onobrychis* altcinsi *Onobrychis*, *Dendrobrychis*, *Lophobrychis*, *Hemicyclobrychis* olmak üzere 4 seksiyon ve *Sisyrosema* altcinsi de *Anthyllium*, *Afghanicae*, *Heliobrychis*, *Hymenobrychis* olmak üzere 4 farklı seksiyondan oluşmaktadır (Sirjaev, 1925).

Daha sonradan yapılan çalışmalardan bazılarında ise bu alt cinslerin sınıflandırılması *Onobrychis* altcinsi için *Onobrychis*, *Dendrobrychis*, *Lophobrychis*, *Laxiflorae* seksiyonları *Sisyrosema* altcinsi için ise *Anthyllium*, *Afghanicae*, *Heliobrychis*, *Hymenobrychis* ve *Insignes* seksiyonları şeklinde düzenlenmiştir (Rechinger, 1984).

Carbonero (2011) tarafından gerçekleştirilmiş bir çalışmada kültürü yapılan *O. viciifolia* tri için agronomik, morfolojik ve sitolojik analizler (genom içeriği ve feulgen boyama yöntemi ile kromozom sayımı), genetik karakterizasyon ve filogeni analizleri gerçekleştirilmiştir ve sonuç olarak türün morfolojik ve agronomik özellikleri açısında büyük varvasyon gösterdiği, tetraploid kromozom sayısına sahip olduğu ($2n = 28$) ve ekirdek DNA içeriğinin propidium ioide florasan boya kullanılarak 2,5 pg ve DAPI florasan boya ile analizinde 4 pg olarak saptandığı belirtilmiştir. *O. viciifolia* türünde genetik çeşitliliği saptayabilmek için AFLP ve SSR analizleri yapılmıştır. Çalışmada belli bir polimorfizim saptanmış fakat daha detaylı analizler yapılması gerektiği belirtilmiştir. Bununla birlikte ITS ve *psbA-trnH* ve *trnT-trnL* (kloroplast gen bölgeleri) kullanılarak gerçekleştirilen filogeni analizlerinde, *O. viciifolia* aksesyonları arasında önemli derecede genetik çeşitlilik saptanırken, türler arası analizlerde ise seksiyonların ayırımında hala soru işaretleri olduğu ve bazı türlerin sinonim olabileceği belirtilmiştir.

Lewke Bandara ve ark. (2013) nukleer (ITS) ve kloroplast (*matK*) markörleri kullanılarak 41 farklı *Onobrychis* türünde filogenetik analizler gerçekleştirmişlerdir. Fakat bu markörlerin bazı *Onobrychis* türleri arasında tam olarak ayırım yapılmasında yetersiz kaldığını belirtmişlerdir.

Amirahmadi ve ark. (2016) tarafından yapılmış olan bir çalışmada *Onobrychis* türlerinde altcins ve seksiyonlar için monofili ve aralarındaki ilişkiyi değerlendirebilmek için ITS ve 3 farklı kloroplast bölgesi (*trnL-F*, *rpl32rpl32-trnL_(UAG)* ve *ndhF-rpl32*) kullanarak filogeni analizleri gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak *Onobrychis* cinsinin monofiletik ve 2 ayrı kladdan oluştuğu ve mevcut olan taksonomik sınıflandırmasına yeni seksiyonlar olan *Lipskyanae* ve *Litvinoviana* seksiyonları, *Onobrychis* cinsinin altcinslerinden olan *Sisyrosema* altcinsine eklenerek revize edildiği belirtilmiştir. Zengin bir cins olan *Onobrychis* ile ilgili daha fazla tür ve DNA markörleri ile analizin gerekli olduğu bildirilmiştir.

Kempf ve ark. (2016) gerçekleştirmiş oldukları çalışmada *O. viciifolia* transkriptom datasından elde ettikleri verilerden yararlanarak 400 farklı SSR primeri dizayn etmiş ve 29 farklı aksesyonu temsilen 32 adet bireye ait DNA'yı kullanarak PCR amplifikasyonunu gerçekleştirmişler. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada *O. viciifolia* aksesyonları arasında büyük bir polimorfizm saptamışlardır. 1154 allel arasında sadece 5 tanesinin (SSR OVK042, OVK172, OVM031, OVM072 and OVM100) polimorfik olmadığını ve SSR fragmentlerinin 91 bç ile 511 bç aralığında değiştiğini belirtmişlerdir. *O. viciifolia* aksesyonları arasında 101 adet karakterize edilmiş yüksek polimorfizm gösteren SSR markörü ve farklı orjinli bireylerde farklılıklar gözlemlediklerini saptamışlardır. Bu markörlerin gelecekte gerçekleştirilebilecek genetik temelli çalışmalar ve ıslah çalışmalarında faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.

Kaveh ve ark., (2018) *Onobrychis* cinsi içerisinde yer alan bazı türlerde nukleer (ITS) ve 3 farklı kloroplast sekansını (trnL-F, rpl32-trnL (UAG) ve ndhF-rpl32) kullanarak moleküler filogenetik analizler gerçekleştirmişlerdir. Kombine edilmiş filogeni sonuçlarından *Heliobrychis* seksiyonunun monofiletik olduğu ve 2 ayrı kladdan oluştuğunu belirtmişlerdir. Bununla beraber bazı karakterler (yaşam döngüsü, tohum sayısı vb.) analiz edilmiş ve türlerin çoğunlukla çok yıllık olduğunu saptamışlardır. Ancak, çok yıllık türler ile ilgili ayrıntılı bir ayırımın sağlanabilmesi için tüm plastid genom sekansı veya tek kopya genlerinin kullanımının gerekli olduğuna işaret etmişlerdir.

Gerçekleştirilmiş olan bu çalışmalardan yeni bilgiler elde edilmiş ve bu bilgiler doğrultusunda cinsin sınıflandırılması yeniden revize edilmiştir. Ancak buna rağmen önceden de belirtildiği gibi *Onobrychis* taksonomisi hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Bugüne kadar gerçekleştirilmiş çalışmalardan görülmektedir ki, *Onobrychis* türlerinin genom yapılarını anlayabilmek, aydınlatabilmek için daha detaylı analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Morfolojik karakterler incelenerek gerçekleştirilmiş çalışmaların da kısıtlı olduğu görülmektedir ve bu çalışmalardan bazıları aşağıda kısaca açıklanmıştır.

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 gerçekleştirmiştir. Analizler

sonucunda türler arasında yüksek oranda varyasyon tespit etmiştir. Ayrıca, tür içi popülasyonlarda bazı türlere ait popülasyonlar arasında önemli oranda farklılık saptanmışken, bazı türlerdeki popülasyonlarda ise benzerlikler gözlemlendiğini belirtmiştir.

Çeçen ve ark (2015), Antalya doğal florasında bulunan korunga türlerine ait tohumları saptadıkları lokasyonlardan toplamış ve ekimlerini gerçekleştirerek morfolojik gözlemlerini (çiçeklenme gün sayısı, fizyolojik gün olum sayısı, çiçek rengi, bitki boyu, çiçek sayısı gibi) gerçekleştirmişlerdir. Elde etmiş oldukları morfolojik gözlemlerin sonuçlarına göre Antalya doğal florasında yetişen korunga genetik varyasyonunun önemli düzeyde olduğu ve toplanmış olan genetik materyalin gelecekte yapılacak ıslah çalışmaları için değerlendirilebileceğini, yararlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Onobrychis cinsinin tıbbi açıdan yada tıbbi bitki olarak çok fazla çalışılmadığı görülmektedir. Fakat aşağıda açıklanmış olan çalışmalar incelendiğinde *Onobrychis* bitkisinin gelecekte farklı alanlarda da önemli bir yeri olma ihtimalinin olduğu görülmektedir.

Karataş (2013) araştırma kapsamında *O. armena* türünde yağ asitleri, uçucu bileşenleri ve antioksidan gibi özelliklerini analiz etmiştir. Yapılan bu çalışmada farklı ekstraktların antioksidan özelliklerini ölçmüş ve aynı zamanda toplam flavonoid ile fenolik içeriklerini de hesaplamıştır. Gerçekleştirmiş olduğu analiz sonuçlarına göre *O. armena* türünün doymamış yağ asitlerinin ve doğal antioksidanların bir kaynağı olarak farmasötik ve gıda endüstrilerinde değerlendirilebileceğini belirtmiştir.

Aliyazıcıoğlu ve ark., (2017) gerçekleştirdikleri çalışmada *O. oxydonta* türünden elde edilmiş olan metanolik ekstrenin fenolik asit bileşenlerini, antimikrobiyal, antioksidan ve tirozinaz inhibitör aktivitesini araştırmışlardır. Analizleri sonucunda zengin fenolik bileşenler (benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, p-kumarik asit, sinapik asit gibi) içerdiğini, ayrıca güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu sebeple yararlı farmasötik ajan olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali ve Orijinleri

Gerçekleştirilmiş olan çalışmada 35 farklı *Onobrychis* türü analiz edilmiştir. Türlerin tohumları USDA-NPGS'den tedarik edilmiştir. Bitki materyallerinin orijinlerine ait detaylı bilgi Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. İncelenen korunga türleri ile ilgili bilgiler

Tür Adı	Aksesyon no.	Orijin	Ömür Uzunlukları	Kaynak
<i>O. hyparygera</i>	PI 383719	Türkiye	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. pallasi</i>	W6 21877 PI 325448	Ukrayna	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. grandis</i>	PI 440568	Kazakistan	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. caput- galli</i>	PI 205304	Türkiye	Tek yıllık	USDA-NPGS
<i>O. alba</i> subsp. <i>laconica</i>	W6 19337	Bulgaristan	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. supina</i>	PI 383721	Türkiye	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. megataphros</i>	PI 301107	Türkiye	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. gracilis</i>	W6 19496	Bulgaristan	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. humilis</i>	PI 319054	İspanya	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. vaginalis</i>	PI 325444	Rusya Federasyonu	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. michauxii</i>	PI 380945	İran	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. gaubae</i>	PI 380931	İran	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. ptolemaica</i>	PI 215344	İrak	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. sternorhiza</i>	PI 319056	İspanya	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. kachetica</i>	PI 314469	FSU	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. chorossanica.</i>	PI314160 W6 24358	FSU Türkmenistan	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. vassilzenkoi</i>	PI 678913	Rusya Federasyonu	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. crista- galli</i>	PI 227040	İran	Tek yıllık	USDA-NPGS
<i>O. radiata</i>	W6 24111	Armenia	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. iberica</i>	PI 219602	Pakistan	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. sintenisii</i>	PI 314100	FSU	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. persica</i>	PI 380946	İran	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. argyrea</i>	PI 288255		Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. viciifolia</i>	PI 170583 PI 200872	Türkiye	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. arenaria</i>	PI 273743	Ukrayna	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. transcaucasica</i>	PI 273771	Rusya Federasyonu	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. cyri</i>	W6 17800	Rusya Federasyonu	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. altissima</i>	PI 325448	Rusya Federasyonu	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. biebersteinii</i>	PI 227377	İran	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. inermis</i>	W6 17870	Rusya Federasyonu	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. conferta</i> subsp. <i>argentea</i>	PI 516990	Fas	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. petrae</i>	PI 642146	Rusya Federasyonu	Çok yıllık	USDA-NPGS

İncelenen korunga türleri ile ilgili bilgiler (Devam)

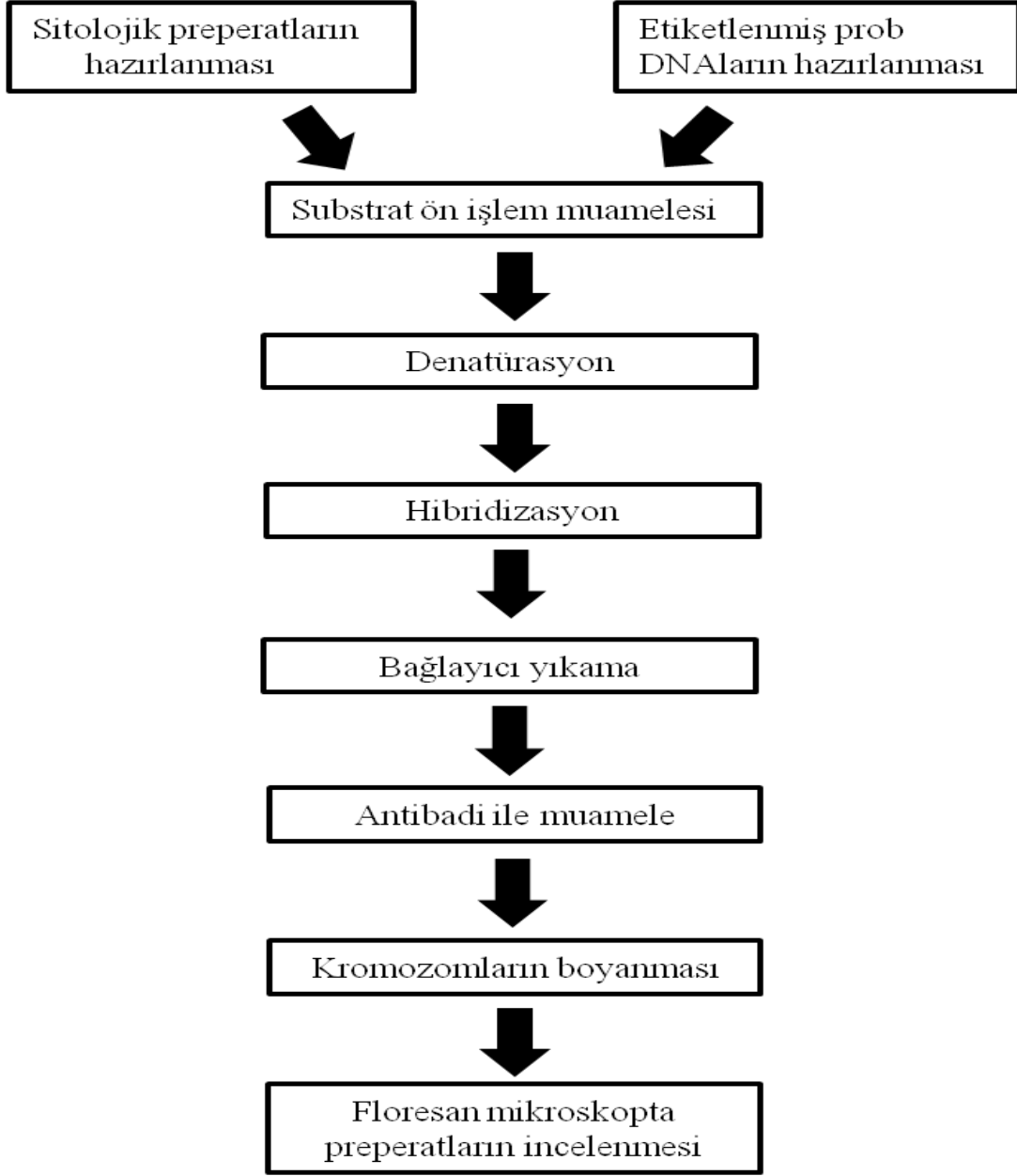
<i>O.kemualariea</i>	PI 312464	FSU	Çok yıllık	USDA-NPGS
O. hajastana	PI 312933	FSU	Çok yıllık	USDA-NPGS
<i>O. subacaulis</i>	PI 219930	Afganistan	Tek yıllık	USDA-NPGS

İncelenmiş türlere ait bitki örnekleri Silesia Üniversitesi'nin (Katowice-Polonya) herbaryumunda muhafaza edilmektedir.

3.2. Florasan *İn Situ* Hibridizasyon Yöntemi

Sunulan bu tez çalışmasında prob olarak korunmuş ve ardarda tekrar eden dizilere sahip rDNA (5S rDNA ve 35S rDNA) bölgeleri kullanılmıştır. *Arabidopsis thaliana* 'nın 25S rDNA kondlayan bölgesi- 2.3 kb *ClaI* subclone- (Unfried ve Gruendler 1990) ile 5S rDNA için pTa974 (Gerlach ve Dyer 1980) prob olarak kullanılmıştır. 25S rDNA probu 35S rDNA bölgesini saptamak için kullanılmıştır. Sunulan tez çalışmasında takip edilecek olan protokol ayrıntılı olarak aşağıda açıklanmaktadır (Jenkins ve Hasterok 2007).

Örneklerin genom organizasyonu hakkında bilgi edinmemizi sağlayacak olan FISH tekniği somatik kromozom preparatlarının hazırlığı, prob DNAların işaretlenmesi, preparatların RNase ile muamelesi, denatürasyon - hibridizasyon, bağlayıcı yıkama, antibadi uygulanması, ve mikroskop altında inceleme aşamalarından oluşmaktadır. Bahsedilen aşamalar Şekil 3.1' de gösterilmiş ve ayrıntılı bilgiler devamında açıklanmıştır.



Şekil 3.1. FISH prosedürüne ait özet diagram (Hasterok 2009)

3.2.1. Materyal Olarak Kullanılacak Bitki Kök Uçlarının Elde Edilmesi

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) analizlerinde kullanılmak üzere analiz edilmesi planlanan her bir türün farklı aksiyonlarına ait tohumlar steril su ile ıslatılmış kurutma kağıtlarının bulunduğu petri kaplarında sırasıyla, bir gün oda koşullarında, 20-24 saat aralığında +4 C de ve sonrasında inkübatör ya da karanlık oda koşullarında yeteri miktarda kök oluşumu (1-2 cm) gerçekleşinceye kadar muhafaza edilmişlerdir. Hasat edilen kökler, materyale ait kromozomların iğ ipliklerini tahrip ederek mitoz bölünmenin metafaz safhasında

kalmasını sağlayacak olan soğuk su içerisinde 1 gece +4 °C de muhafaza edildikten sonra fiksatif (3 etil alkol-1asetik asit) içerisine transfer edilmişlerdir.

3.2.2. Mitotik Kromozom Preperatlarının Hazırlanması

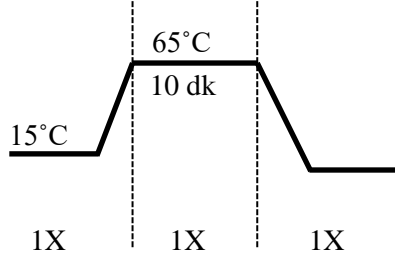
Fikse edilmiş kök uçlarını alkol ve asetik asitten arındırmak için seyreltilmiş citrate buffer (1X) solüsyonu ile 5x4 dakika yıkandı. Selülaz, pektinaz ve citrat bufferdan (10X) oluşan enzim solüsyonu ile kök uçları 37 °C' de yeterli süre (yaklaşık 2 saat) inkübe edilerek hücre duvarı tahrip edildi ve sonrasında kök uçları tekrar seyreltilmiş citrate bufferda (1X) yıkılarak enzim uzaklaştırıldı. Kök uçları %45 asetik asit içerisine transfer edildi, özel iğneler ile meristem kısmı stereo mikroskop altında dışarı çıkarıldı. Meristem pipet yardımı ile alındı lam üzerine aktarıldı ve lamel ile kapatıldı. Preperatlar yaklaşık 1-2 saat - 80 °C' de bekletildikten sonra jilet yardımı ile lameller kaldırıldı. Preperatlar oda koşulları altında kurumaya bırakıldı. Preperatlar rDNA lokuslarının analizi için FISH prosedüründe ve ayrıca DAPI eklenerek kromozom sayımı gerçekleştirilmesinde kullanıldı.

3.2.3. Prob Olarak Kullanılacak DNA'ların Hazırlanması

Prob DNA olarak kullanılmış olan korunmuş rDNA bölgeleri, (5S rDNA ve 25S rDNA) Çizelge 3.2' de gösterilen bileşenler ile birlikte son hacim 25 µl olacak şekilde tamamlandı ve nick translasyonu metodu ile Şekil 3.2' de gösterilen program aracılığıyla 15°C X 110 dakika + 65°C X 10 dakika +4°C X ∞) işaretlendi.

Çizelge 3.2. Prob DNA'ların nick translasyonu ile işaretlenmesinde kullanılan bileşenler

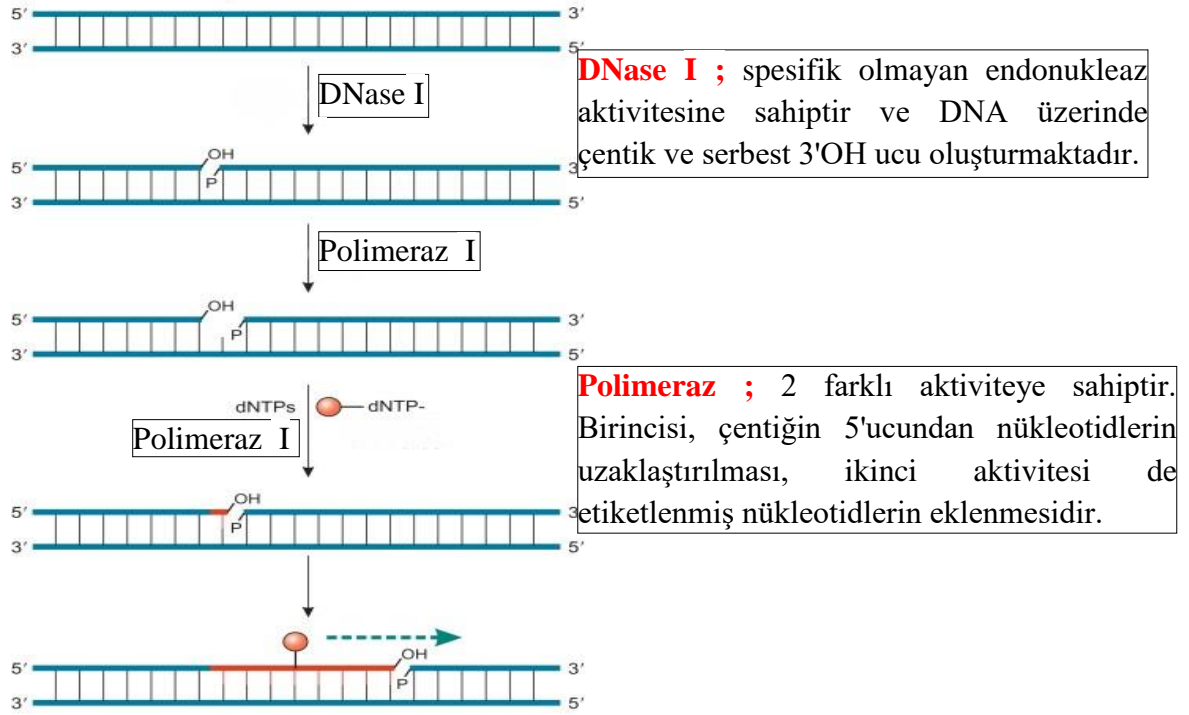
Bileşenler	Hacim µl
NT Buffer	2.5 µl
2 mM dNTP mix	2.5 µl
0.1 M mercaptoethanol	2.5 µl
Digoxigenin-dUTP / Cy3	2 µl
DNA polymerase	2 µl
DNase 1	1.5 µl
DNA (5S rDNA/25S rDNA)	8 µl
ddH ₂ O	6 µl



Şekil 3.2. Nick translasyonu programı

Nick translasyon yöntemi prob olarak kullanılacak olan DNA bölgesinin modifiye edilmiş nükleotidler ile işaretlenmesini sağlamak için kullanılan bir yöntemdir. Nükleotidlerin modifiye edilmesinde iki grup modifikatör kullanılabilir. Birinci grup; digoxigenin (steroid) ya da biotin (hapten) gibi DNA'ya katılabilen nükleotid modifikatörleridir. Bu modifikatörler görünür hale gelebilmek için FISH prosesi süresince antibadiye (floroforlu) ihtiyaç duymaktadırlar (immunodetection).

İkinci grup; rhodamine, TAMRA, AMCA, Cy3 ve Cy5 gibi florofor özelliği olan ve FISH prosesinden sonra direk gözlemlenebilen nükleotid modifikatörleridir. Şekil 3.3' de problemlerin hazırlanmasında kullanılan nick translasyonu ile ilgili temel aşamalar gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Nick translasyonunun temel aşamaları (Hermanson 2013)

Nick translasyonu sonrası prob DNA'ların üzerine son volümün 1/10'u kadar 3M sodyum asetat ve volümün 2.5 katı kadar %100 etanol eklendi ve 1 gece -20°C veya 1-2 saat -80 °C de muhafaza edildi. Ertesi gün probolar 14000 rpm +4°C 'de santrifüj edildi ve etanol uzaklaştırıldı. Probların üzerine 2.5 katı %70 etanol eklendi ve 14.000 rpm 4C'de santrifüj edildi (bu aşama 2 defa tekrar edildi). Tüplerin içerisindeki etanol uzaklaştırıldı ve prob DNA'lar kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra 10 µl EB eklendi ve probolar kullanılmaya kadar -20°C de muhafaza edildi.

3.2.4. FISH Prosedürü

1. gün preparatlara ön işlem uygulanması ve denatürasyon- hibridizasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Ön İşlem

1. Enzim yöntemi kullanılarak hazırlanmış olan somatik kromozom preparatları yaklaşık 1- 1.5 saat 37 °C' de RNase ile muamele edildi. Sonrasında 2xSSC solüsyonunda (Saline - Sodium Citrate) 3x5 dk, formaldehide 1xPBS solüsyonunda 10 dk ve tekrar 2xSSC solüsyonunda 3x5 dk yıkandı.

2. Preparatlar %70, %90 ve %100 alkol serisinde 3'er dakika yıkandı ve kurumaya bırakıldı.

Denatürasyon Hibridizasyon Aşaması

3. Hibridizasyon solüsyonu Çizelge 3.3' de gösterilen solüsyonlar kullanılarak hazırlandı.

Çizelge 3.3. Hibridizasyon solüsyonu bileşenleri.

Reagent	µl/slide
% 100 deiyonize formamid	20
%50 dextran sülfat	8
20x SSC	4
% 10 SDS	2
DNA prob 1 (25S rDNA- rhodamine yada CY3 ile işaretlenir)	1
DNA prob 2 (5S rDNA- digoxigenin ile işaretlenir)	1,2
Distil steril su	2,8
Son hacim	40

4. Çizelge 3.3'de gösterilmiş olan bileşenler kullanılarak hazırlanmış olan hibridizasyon karışımı 75°C'de 10 dakika boyunca termal bloklar içerisinde denatüre edildi ve hemen sonrasında buz dolu kutuya daldırılarak denatürasyon durduruldu.

5. Hazırlanmış preparatlarda materyalin bulunduğu bölge üzerine hibridizasyon karışımından 40 µl konuldu, otoklavlanmış plastik lamel ile preparatlar kapatıldı. 75°C de 4 dk+30 sn muamele edilerek materyalin denatürasyonu sağlandı. Preparatlar 37°C de 1 (veya 2) gece bırakılarak materyale ait DNA ve prob DNA hibridizasyonu gerçekleştirildi.

2. gün prob DNA ve materyal DNA'sı arasında %85-90 aralığında sekans homolojisinin sağlanması, zayıf bağların ya da homolog olmayan bağların uzaklaştırılması için bağlayıcı yıkama aşamalarının gerçekleştirilmesinden oluşmaktadır.

6. Preparatlar 42°C sıcak su banyosunda 2xSSC solüsyonunda 2-3 dk, %10 formamide 0,1xSSC solüsyonunda 2x5 dk, 2xSSC solüsyonunda 3x3 dk yıkandı. Sonrasında 2xSSC solüsyonunda 3x3 dk oda sıcaklığında yıkandı.

7. CY3 (veya Rhodamine) ile etiketlenmiş olan prob rDNA'lar direk gözlemlenebilirken, digoxigenin florasan etkisi gösterebilmesi için antibadilerle muamele edilmesi gerekmektedir. Bu aşamada öncelikli olarak slaytlar tween/4xSSC solüsyonunda 5 dk yıkandı ve sonrasında blocking reagent (her bir preparat için 200 µl blocking reagent) ile 30 dk oda koşullarında muamele edildi.

8. Preparatlara FITC-conjugated+blocking reagent (1:11 oranında) solüsyonundan eklendi, 37°C de 1-2 saat aralığında bekletildi. Sonrasında tween/4xSSC solüsyonlarında 37 °C sıcak su banyosunda 3x8 dk yıkanarak antibadilerin etki etmesi sağlandı.

9. Preparatlar %70, %90, %100 alkol serisinde yıkandı ve kurumaya bırakıldı.

10. Preparatlar kuruduktan sonra 10 µl DAPI eklenerek üzerine lamel kapatıldı ve preparatlar gece boyunca soğuk ve karanlık ortamda bekletildikten sonra ertesi gün floresan mikroskop ile incelendi.

3.3. Genomik DNA İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Farklı *Onobrychis* türlerine ait yaprak dokuları kullanılarak gerçekleştirilen genomik DNA izolasyonu, modifiye edilmiş CTAB (Tel-zur ve ark. 1999) yöntemiyle gerçekleştirildi. DNA izolasyonunda 5-6 adet sağlıklı yaprak dokusunun üzerine 1 ml CTAB solüsyonu konularak kısa sürede havan içerisinde ezilerek parçalanması sağlandı ve 2.2 ml tüplere transfer edildi. Tüpler 60°C de 30 dk bekletildi ve her 10 dk da 5-6 kez alt-üst edilerek karıştırıldı. Bu süre sonunda örneklerin üzerine 38,5 µl sarcosly eklendi, 60°C de 30dk bekletildi ve her 10dk da 5-6 kez alt-üst edilerek karıştırıldı. Örneklerin üzerine 700 µl CIA fenol (ultra pure phenol: chloroform: isoamyl alcohol 25:24:1) solüsyonundan eklendi alt-üst edilerek 20 dk oda koşullarında bekletildi ve bu süre sonunda 10 dk 14000rpm 4°C' de santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra üst faz üst faz temiz bir tüp içerisine transfer edildi ve üzerine chloroform:isoamyl alcohol (24:1) eklendi alt-üst edildi ve 20 dk oda koşullarında bekletildi. Bu süre sonunda 10 dk 14000rpm 4°C' de santrifüj edildi (bu aşama 2-3 defa tekrar edildi). Santrifüj edildikten sonra üst faz temiz bir tüp içerisine transfer edildi ve örnek miktarının iki katı kadar %100 etanol eklendi - 20°C' de 1 saat bırakılarak DNA' nın presipitasyonu sağlandı. DNA örnekleri 13,000rpm +4°C' de 30 dakika santrifüj edildi ve % 75'lik etanol ile yıkama aşaması gerçekleştirildi. % 75'lik etanol ile yıkama aşaması en az 8-10 defa gerçekleştirdi. Sadece DNA' nın elde edilmesi diğer metabolitlerden arındırılması sağlandı. DNA örnekleri kurumaya bırakıldı ve sonrasında distil steril su ile çözdürüldü ve 1 µl RNase eklendi. 37°C' de yaklaşık 1 saat inkübe edildi. Son olarak DNA miktarı, saflığı ve PZR'de kullanılacak sulandırım oranlarının hesaplanması için Nanodrop kullanılarak ölçüldü. DNA örnekleri % 1'lik agaroz jele yüklenerek görüntülendi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılmak üzere sulandırıldı.

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

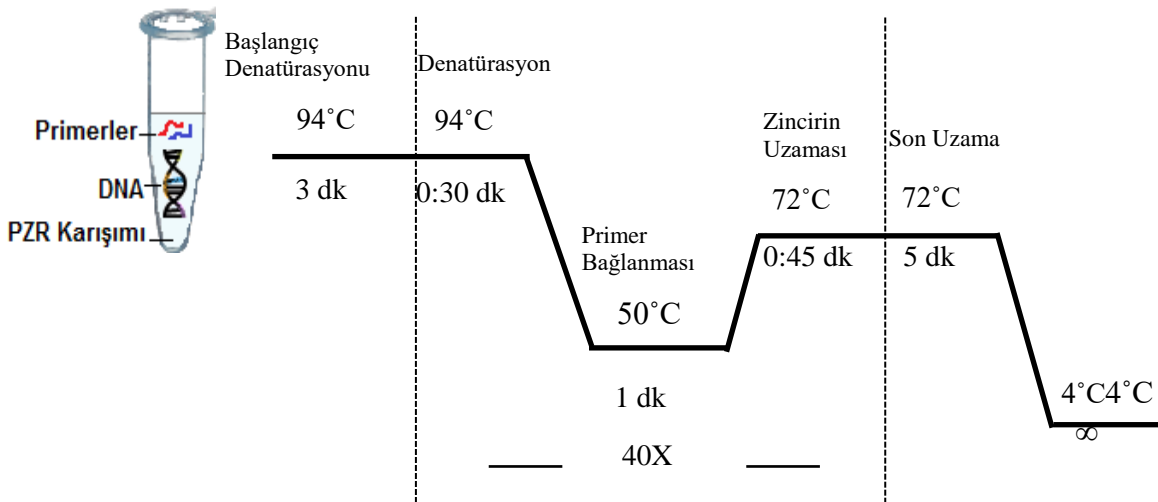
İzole edilmiş olan DNA'ların çoğaltımı için gerekli olan PZR aşaması, “termal cycler” cihazında 15 µl son hacimde olacak şekilde gerçekleştirildi. Çizelge 3.5' de PCR bileşenlerinin konsantrasyonları ve tüpteki miktarları, Şekil 3.4' de PZR aşamaları gösterilmektedir. PZR karışımında kullanılmış olan primer dizileri Çizelge 3.4' de gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. Kullanılan primer dizileri

Primer adı	Primer Dizileri	Referans
ITS	18S DIR 5' – CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3',	Venora ve ark. 2000.
	25S COM 5' - AGCGGGTAGTCCCGCCTGA-3'	

Çizelge 3.5. PZR bileşenleri ve konsantrasyonları

PZR Bileşenleri	Konsantrasyon	Hacim (µl)
dH ₂ O	X	9.15 µl
Buffer (10X+MgCl ₂)	10X	1.5 µl
dATP 100mM	2.5 mM	0.6 µl
dGTP 100mM	2.5 mM	0.6 µl
dCTP 100mM	2.5 mM	0.6 µl
dTTP 100mM	2.5 mM	0.6 µl
25S com	10 µM	0.6 µl
18S dir	10 µM	0.6 µl
DNA	50 ng/ µl	0.6 µl
Taq Polymerase	5 U/ µl	0.15 µl
Son hacim		15 µl



Şekil 3.4. Kullanılmış olan PZR aşamaları

PZR karışımı hazırlandıktan sonra başlangıç denatürasyonu 94°C' de 3 dakika, denatürasyon 94°C'de 0:30 dakika, primer bağlanması 50°C'de 1 dakika, zincirin uzaması 72°C'de 0:45 dakika ve son uzama 72°C'de 5 dakika olacak şekilde PZR koşulları ayarlanarak PZR uygulandı. PZR sonrasında örnekler % 1'lik agaroz jele yüklenerek görüntülendi. PZR ürünleri 0,5 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak 3.5 µl hacimde jel kuyularına yüklendi. PZR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için 100 bp 'lik DNA ladder kullanıldı. Jele yüklenen PZR ürünleri 70 Volt'ta 1 saat süre ile elektroforez işlemine tabi tutuldu. PCR ürünleri DNA dizi analizine gönderilmeden önce exonuclease 1 ve FastAP kullanılarak purifikasyon işlemi gerçekleştirildi (37°C 45 dakika + 85°C 15 dakika). DNA dizi analizi özel firma aracılığı ile gerçekleştirildi.

3.3.3. Biyoinformatik Analiz

Dizi analizinden sonra elde edilen sekanslar DNA Baser programı kullanılarak düzenlendi ve sonrasında "BioEdit Sequence Alignment Editor" programı kullanılarak hizalandı. Elde edilmiş olan dataların çoklu sekans analizleri "webPRANK" programı kullanılarak ve konsensus dizi eldesi "MergeAlign" programı kullanılarak gerçekleştirildi. Türler arası ilişkinin değerlendirilebilmesi için "IQTREE" (maximum likelihood temelli) programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu ve bootstap analizi 1000 defa olarak seçildi.

3.4. Çekirdek DNA Analizi

Onobrychis türlerine ait çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi flow sitometri (Partec CyFlow^R Space) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çekirdek DNA analizleri sera koşullarında yetiştirilmiş olan bitkilerden elde edilen taze yaprak dokuları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taze yaprak dokularına sahip bitki materyallerinin analizleri her tür için üç farklı birey ve her birey için iki tekrar olacak şekilde her örnek için 10.000 çekirdeğin analizi gerçekleştirilerek saptandı. Analizlerde internal standart olarak *Lycopersicon esculentum* Mill. (2C = 1.96 pg), *Solanum pseudocapsium* L. (2C = 2.58 pg), *B. distachyon* (2C = 0,63 pg), *Vicia sativa* L. (2C = 3.65 pg), *Hordeum vulgare* L. (2C = 10,65 pg) türleri kullanıldı. Analizler için Partec firmasına ait nuclei extraction ve DNA staining solüsyonlarından oluşan ticari kitler (CyStain PI absolute P) kullanıldı ve üretici firmanın

önerdiği protokol takip edildi. *Onobrychis* türleri yüksek düzeyde sekonder metabolit içerdiği için B mercaptoethanol boyama solüsyonunun içerisine eklendi

.

Bitki materyallerinin çekirdek DNA analizinde kullanılan protokol kısaca;

1. Analizi yapılacak olan bitki materyali ve standart bitkiye ait yaprak dokularının uygun miktarda petri kabına konuldu ve 500µl çekirdek ekstraksiyon solüsyonun ilave edildi.
2. Çekirdek ekstraksiyon solüsyonu ile birlikte yaprak dokuları petri kabı içerisinde jilet ile küçük parçalara ayrılana kadar parçalandı. Bu parçalama işlemi bittikten sonra küçük parçalara ayrılmış ve solüsyonlar ile muamele olmuş dokular petri kabı içerisinde yaklaşık 15-20 saniye hafif bir şekilde çalkalandı.
3. Çalkalama işlemi gerçekleştirildikten sonra örnekler 30 µl Cell Tris filtreler ile cam tüplere transfer edildi.
4. Filtreler aracılığı ile tüplere aktarılan örneklere 2 ml boyama solüsyonu ilave edildi ve hazırlanan bu örnekler 30-60 dakika aralığında ışıksız bir ortamda muhafaza edildi. Bu süre tamamlandıktan sonra flow sitometri cihazı ile örneklere ait çekirdek DNA analizleri gerçekleştirildi.

Staining-Boyama solüsyonunu hazırlanması;

Her bir örnek için 2000 µl staining buffer, 12 µl PI (propidium ioide), 30 µl RNase ve 20 µl B mercaptoethanol kullanılarak DNA'nın bağlanıp ölçülmesini sağlayacak olan boyama solüsyonu hazırlandı.

Çekirdek DNA içeriğinin hesaplanması;

Analizi yapılan bitkinin çekirdek DNA içeriğinin hesaplanabilmesi için çekirdek DNA içeriği bilinen bir standart bitki ile örneğin DNA çekirdek içeriği kıyaslanır. Bu sebepten dolayı standart bitki ve analizi yapılacak bitkinin dokuları birlikte hazırlandı. Cihazda okutulan örneklere ait histogramlarda G1 ve G2 pikleri görülür ve bu pikler hem standart bitki hem de analizi yapılan bitki için ayrı ayrı görülür. Histogramda görülen piklerin hangilerinin bitkiye hangilerinin standartta ait olduğunu anlayabilmek için önce standart bitki ve analiz

edilen bitki dokularından ayrı ayrı örnekler hazırlandı, analiz edildi ve histogramda piklerin yerleri gözlemlendi. Örneklerle ait çekirdek DNA içeriklerinin hesaplanmasında bitkinin ve standartın G1 piklerine ait florasan yoğunluğu kullanıldı.

Çekirdek DNA içeriği

(Örneğin G1 piki florasan yoğunluğu / Standartın G1 piki florasan yoğunluğu) X Standartın DNA içeriği (pg)

Bu çalışmada kullanılan korunga genetik kaynakları bölümümüzde yürütülen iki yüksek lisans tezi kapsamında daha önce flow sitometri ile analiz edilmiş ve türlere ait tüm aksesyonların (yaklaşık 500) ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri belirlenmiştir. Gerçekleştirilmiş olan bu çalışmada ise flow sitometri ile FISH, GISH ve filogenetik analizlerde kullanılan orijinal *Onobrychis* genotiplerinin (çalışılmış olan türlere ait aksesyonlar) analizleri yapılmış ve 2C çekirdek DNA içerikleri belirlenmiştir.

3.5. DOT BLOT Analizi

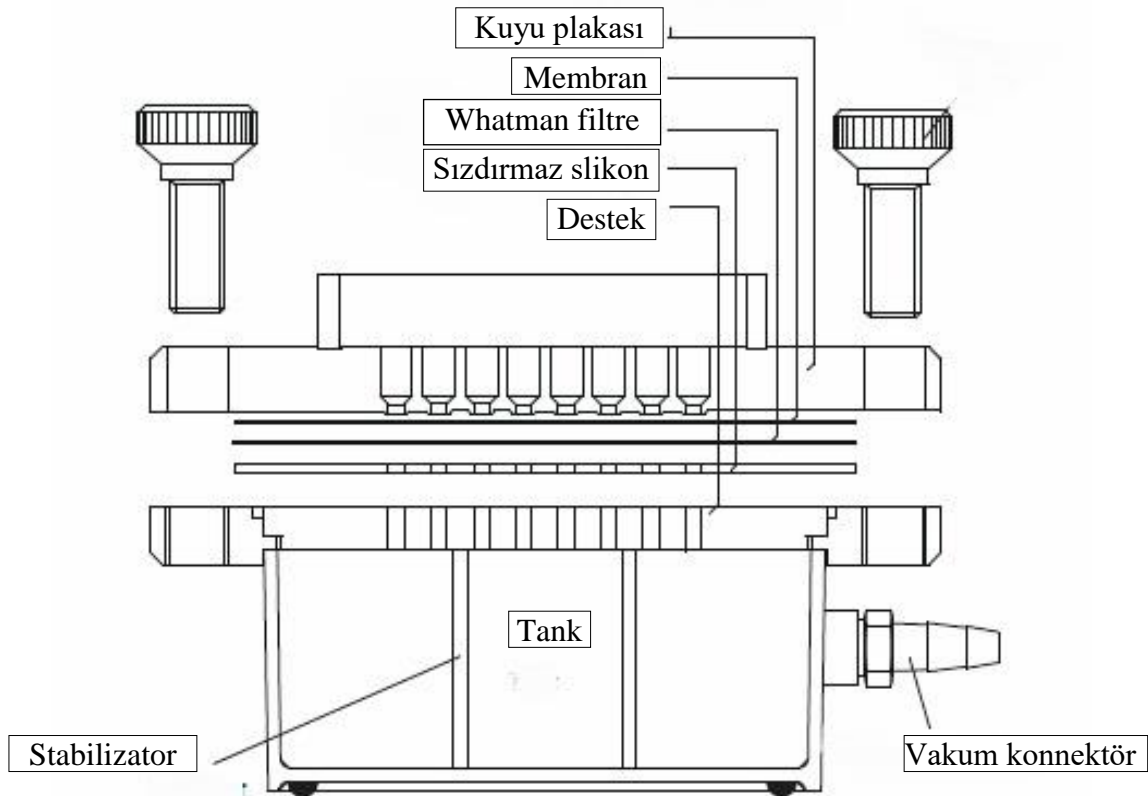
Dot blot analizi ile *O. viciifolia'* nın (poliploid kültürü yapılan korunga türü) diploid türlerden hangileri ile benzer genom yapısına sahip olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Çok sayıda diploid tür olduğu için bu teknik ile analiz edilecek olan diploid türlerin sayısı, diploid-poliploid türler arası genom benzerlikleri dikkate alınarak azaltılmaya çalışıldı. Bu sebeple diploid türlerin genomik DNA'ları membran üzerine transfer edildi ve prob olarak hazırlanmış olan poliploid türün genomik DNAsı ile hibridizasyonu sağlandı. Sonrasında benzerlik olduğu saptanan diploid türlerin progenitor olma ihtimalleri GISH yöntemi gerçekleştirilerek analiz edildi.

DOT Blot yönteminin aşamaları aşağıda açıklanmaktadır (Analizlerin gerçekleştirilmesinde DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kiti (1) kullanıldı).

1. Poliploid türden (*O. viciifolia*) izole edilmiş olan genomik DNA, Digoxigenin (DIG)-dUTP kullanılarak Çizelge 3.2'de gösterilen bileşenler ve Şekil 3.2' de belirtilen programa göre nick translasyon yöntemi ile işaretlendi.

2. Diploid türlerden izole edilmiş genomik DNA'ların konsantrasyonları 1000 nanogram ve son volüm 100 µl olacak şekilde hazırlandı, 95 °C 10 dakikada denatüre edildi ve sonrasında buz dolu kutuya daldırılarak denatürasyon durduruldu.

3. Whatmann filtre kağıdı ve DNAların transferi için kullanılacak olan membran 6xSSC içerisinde 1 dakika yıkandı ve tankın üzerine yerleştirildi. Diploid türlerden izole edilmiş olan genomik DNAlar 100 µl olacak şekilde pipet ile kuyulara yüklendi ve vakum sayesinde membran üzerine transferi sağlandı. Bu aşamada kullanılan düzenek Şekil 14' de gösterilmektedir.



Şekil 3.5. Dot Blot analizlerinde kullanılan düzenek

4. Membran UV Crosslinker'da kısa süre tutularak DNAların fiksasyonu sağlandı ve sonrasında oda koşullarında kurumaya bırakıldı.

5. Membran 2xSSC ile 50 ml lik tüp içerisinde ve DNA içeren kısmı içte kalacak şekilde 2 dakika yıkandı. Sonrasında 2xSSC uzaklaştırıldı ve yerine 6.5 ml prehibridizasyon (**DIG Easy Hyb** buffer) solüsyonu + 40 µl SSS eklendi.

6. Membran 37°C hybridization oven içerisinde uygun rpmde 30 dakika bekletildi. Bu süre içerisinde prob DNA 95 °C 10 dakika denatüre edildi ve sonrasında buz dolu kutuya daldırılarak denatürasyon durduruldu.
7. Tüp içerisindeki solüsyon uzaklaştırıldı, 3.5 ml prehibridizasyon + 10 µl prob içeren solüsyon tüpün içerisine yavaşca transfer edildi. Prehibridizasyon solüsyonu, prob ve membranın içerisinde olduğu tüp 37°C' hybridization oven içerisinde uygun rpm ayarlanarak 1 gece bekletildi.
8. Ertesi gün membran dikkatlice içerisinde 2xSSC, 0.1SDS olan cam petriye transfer edildi ve 2x5 dakika 100 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcıda (shaker) bekletildi.
9. Membran dikkatlice içerisinde 1xSSC, 0.1SDS (yaklaşık 100 ml) olan cam tüp içerisine transfer edildi ve 37°C ' e ayarlanmış hybridization oven içerisinde uygun rpm ayarlanarak 2x15 dakika olacak şekilde 30 dakika bekletildi.
10. Membran dikkatlice içerisinde yıkama solüsyonu (maleic buffer + tween) olan cam petriye transfer edildi ve 5 dakika 100 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcıda bekletildi.
11. Membran dikkatlice içerisinde blocking solüsyon olan cam tüpe transfer edildi ve 37°C ' e ayarlanmış hybridization oven içerisinde uygun rpm ayarlanarak 30 dakika bekletildi.
12. Tüp içerisindeki solüsyon uzaklaştırıldı, membran dikkatlice içerisinde blocking solüsyon (20ml) + antibadi (2 µl) olan 50 ml tüpe transfer edildi ve 37°C'e ayarlanmış hybridization oven içerisinde uygun rpm ayarlanarak 30 dakika bekletildi. Antibadi kullanılmadan önce 4°C 10000 rpm de 5 dk santirifüj edildi.
13. Membran dikkatlice içerisinde yıkama solüsyonu (maleic buffer + tween) olan cam petriye transfer edildi ve 2x 15dk 100 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcıda bekletildi.
14. Membran dikkatlice içerisinde detection buffer olan cam petriye transfer edildi ve yaklaşık 5 dakika 100 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcıda bekletildi.
15. Buffer içerisinden alınan membran üzerine 1 ml CSPD high prime pipet ile transfer edildi, membran plastic bag ile baloncuk oluşturmadan kapatıldı ve 5 dakika bekletildi. Sonrasında ısı yardımı ile kenarlarından kapatıldı.
16. Membran 37°C' e ayarlanmış inkübatörede 10 dakika bekletildi, sonrasında membran 20 dakika ışığa maruz bırakılarak görüntüsünün alınması sağlandı.

Membranın Yıkama Aşaması ve Stok Edilmesi

1. Membran dikkatlice içerisinde distil steril su bulunan cam petriye transfer edildi ve 1-2 dakika yıkandı.
2. Membran dikkatlice içerisinde NaOH solüsyonu olan 50 ml'lik tüpe transfer edildi ve 37°C hybridization oven içerisinde uygun rpm ayarlanarak 2x15 dakika olacak şekilde 30 dakika bekletildi.
3. Membran dikkatlice içerisinde 2xSSC olan cam petriye transfer edildi ve 5 dakika 100 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcıda bekletildi.
4. Membran içerisinde 2xSSC olan 50ml tüpe dikkatlice transfer edildi ve +4°C de stok edildi (tekrar 1-2 defa daha kullanılabilir).

3.6. Genomik *In Situ* Hibridizasyonu

1. Poliploid tür olan *O. viciifolia*'nın fikse edilmiş kök uçlarından somatik kromozom preparatları hazırlandı.
2. Seçilmiş ve progenitör olma ihtimali olan diploid türe veya türlere ait yaprak dokularından genomik DNA'lar izole edildi.
3. DNA veya DNA'lar Çizelge 3.2'de gösterilen bileşenler ve Şekil 3.2' de gösterilen programa göre nick transasyonu ile işaretlendi (bu aşamada diploid türe ait olan DNA konsantrasyonu 1000 ng olacak şekilde ayarlandı ve nick transasyonu ile etiketlenmesi için kullanıldı).
4. Somatik kromozom preparatları yaklaşık 1-1.5 saat 37 °C' de RNase ile muamele edildi. Sonrasında 2xSSC solüsyonunda (Saline - Sodium Citrate) 3x5 dakika, formaldehide 1xPBS solüsyonunda 10 dk ve tekrar 2XSSC ile 3x5 dk yıkandı.
5. Preparatlar %70, %90 ve %100 alkol serisinde 3'er dakika yıkandı ve kurumaya bırakıldı.
6. Hibridizasyon solüsyonu Çizelge 3.6 'da gösterilen solüsyonlar kullanılarak hazırlandı. Gösterilmiş olan tabloda tek bir diploid tür kullanılarak gerçekleştirilmiş hesaplamalar gösterilmektedir. İki farklı diploid türe ait genomik DNA'lar prob olarak kullanıldığında son konsantrasyon aynı olacak şekilde ikinci prob miksin içerisinde eklendi

Çizelge 3.6. Hibridizasyon solüsyonu bileşenleri

Reagent	µl/slide
%100 deiyonize formamid	7.5
%50 dextran sülfat	3
20x SSC	1.5
SSS	0.5
DNA prob 1 (Biotin yada digoxigenin ile işaretlenir)	1
DNA prob 1 (Biotin yada digoxigenin ile işaretlenir)	X
Distil steril su	1.5
Total volüm	15 µl

7. Hazırlanan hibridizasyon solüsyonu 75°C'de 10 dakika boyunca denatüre edildi ve hemen sonrasında buz dolu kutuya daldırılarak denatürasyon durduruldu.

8. Hazırlanmış preparatlarda materyalin bulunduğu bölge üzerine hibridizasyonda solüsyonu 15 µl konuldu, otoklavlanmış plastik lamel ile preparatlar kapatıldı. 75°C de 4dk+30sn muamele edilerek materyalin denatürasyonu sağlandı ve 37°C de 2 gece bırakılarak poliploid türün DNA'sı ve prob DNA (diploid türe ait DNA) hibridizasyonu gerçekleştirildi.

9. Preparatlar 42°C sıcak su banyosunda 2xSSC solüsyonunda 3dk, % 10 formamide 0,1xSSC solüsyonunda 2x5 dakika, 2xSSC solüsyonunda 3x3 dakika yıkandı. Son olarak tekrar 2xSSC solüsyonunda 3x3 dakika oda sıcaklığında yıkandı.

Modifikasyonlar; Formamide 0,1xSSC solüsyonu bağlayıcı yıkamanın gerçekleştiği aşamadır ve bu aşama formamid kullanılarak aynı zamanda formamid kullanılmadan gerçekleştirildi. Ayrıca formamid kullanılmadan 37°C su banyosunda da yıkama gerçekleştirildi. Bununla beraber hibridizasyon solüsyonuna eklenen SSS miktarlarında değiştirilerek optimizasyon sağlandı.

10. Preparatlar tween/4xSSC solüsyonunda 5 dakika yıkandı ve sonrasında blocking reagent (her bir preparat için 200 µl blocking reagent) ile 30 dk oda koşullarında muamele edildi.

11. Biotin ve digoxigenin ile etiketlenmiş olan prob DNA'lar ilk olarak birincil antibadilerle (Texas Red + I.FITC) muamele edildi, 1 saat 37°C de bekletildi ve tween/4xSSC

solüsyonlarında 37 °C sıcak su banyosunda 3x8 dakika yıkanarak antibodilerin penatürasyonu sağlandı. Sonrasında preparatlar ikincil antibadilerle (Texas Red conjugated ikincil antibadi+ II FITC) muamele edildi, 1 saat 37°C de bekletildi ve tween/4xSSC solüsyonlarında 37 °C sıcak su banyosunda 3x8 dakika yıkandı.

12. Preparatlar %70, %90, %100 alkol serisinde yıkandı ve kurumaya bırakıldı.

13. Preparatlar kuruduktan sonra 10 µl DAPI eklenerek kromozomlar boyandı ve floresan mikroskop ile incelendi.

Takip edilmiş olan prosedür hariç formamid-free GISH prosedürü de denendi (Jang ve Schneeweiss 2015).

Formamid free yönteminde formamid kullanılmadan ilk deneme olarak Çizelge 3.7' de gösterilen hibridizasyon solüsyonu hazırlandı ve bağlayıcı yıkama aşaması 42°C de formamid kullanılmadan sadece 2xSSC ile 3x3 dakika yıkanarak gerçekleştirildi. Kalan tüm aşamalar yukarıda açıklanan prosedür ile aynıdır.

İkinci deneme olarak Çizelge 3.7' de gösterilen hibridizasyon karışımı hazırlandı. 98 °C de 5 dakika denatürasyon gerçekleştirildi. Hibridizasyon karışımı preparatların üzerinde eklendi 72°C 4 dk + 65 °C 1 dk + 55 °C 1 dk + 45 °C 1 dk ve 37 °C 'e düşürülerek preparatların denatürasyonu sağlandı. 2 gece 37°C de muhafaza edilerek hibridizasyon sağlandı. Sonrasında bağlayıcı yıkama aşaması 42°C de formamid kullanılmadan sadece 2xSSC ile 3x3 dakika yıkanarak gerçekleştirildi. Kalan tüm aşamalar yukarıda açıklanan prosedür ile aynıdır.

Çizelge 3.7. Formamid kullanılmadan hazırlanan hibridizasyon miksinin bileşenleri

Reagent	µl/slide
%50 dextran sülfat	3
0.2 SSC	1.5
SSS	0.5
DNA prob 1 (Biotin yada digoxigenin ile işaretlenir)	1
DNA prob 2 (Biotin yada digoxigenin ile işaretlenir)	x
Distil steril su	8
Total volüm	15 µl

3.7. Temel Kromozom Sayısı, Çekirdek DNA İçeriği ve rDNA Lokuslarının Sayısında Gözlemlenen Varyasyonun İncelenmesi

Nükleer ITS bölgeleri kullanılarak elde edilmiş olan filogenetik ağaç (filogram) temel kromozom sayısı, çekirdek DNA içeriği ve rDNA lokuslarının sayısındaki varyasyonun incelenmesinde kullanıldı.

Mesquite programı kullanılarak türlere ait temel kromozom sayısı ve rDNA lokuslarının sayısındaki farklılıklar maximum likelihood ve maximum parsimony yöntemi ile analizleri (standart categorical data) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ChromEvol.programı kullanılarak da temel kromozom sayısı analiz edildi.

Mesquite programı kullanılarak türlere ait çekirdek DNA içerikleri maximum parsimony yöntemi ile analiz edilerek DNA içeriğindeki değişimler (continious data) saptandı.

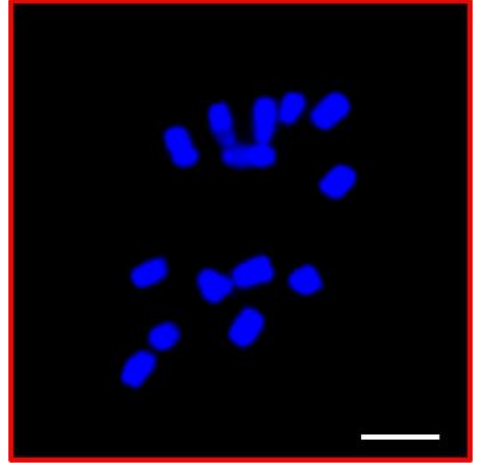
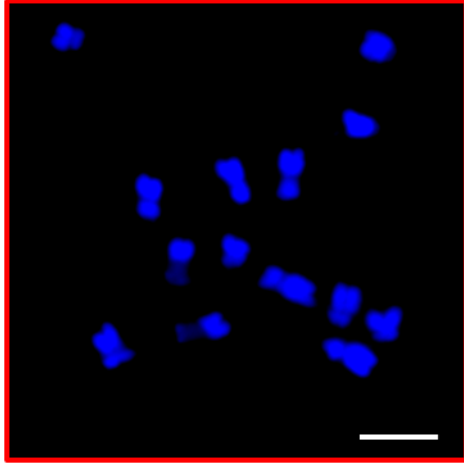
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kromozom Sayımı

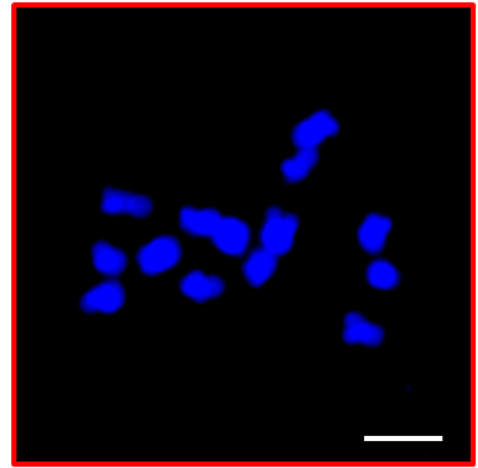
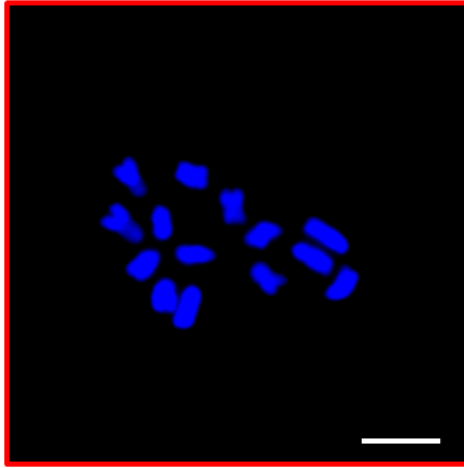
Yürütülen bu tez çalışması kapsamında 35 *Onobrychis* türünde mitotik kromozom sayımı yapılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız enzim yöntemi ile bol miktarda bölünen hücreye sahip kök uçları kullanılarak kromozomları iyi dağılmış, morfolojisi oldukça yüksek kaliteli preparatlar hazırlamak mümkün olmuştur. Bu nedenle kromozom sayımları son derece hassas bir şekilde yapılabilmektedir. Çalışmada türlerin belirlenmiş olan kromozom sayıları Çizelge 4.1'de ve ilgili mitotik kromozom resimleri şekil 4.1 ile 4.18 arasında sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Mitotik kromozom sayımı yapılmış olan *Onobrychis* türleri ve kromozom sayıları

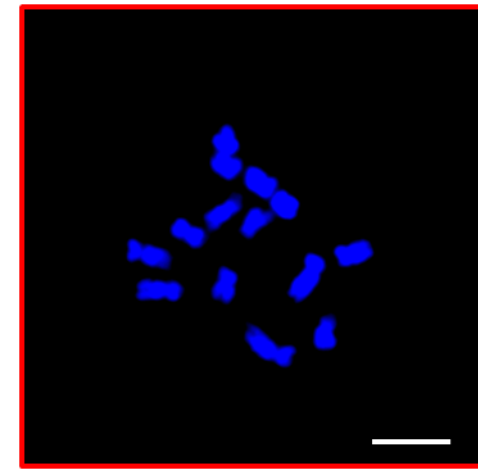
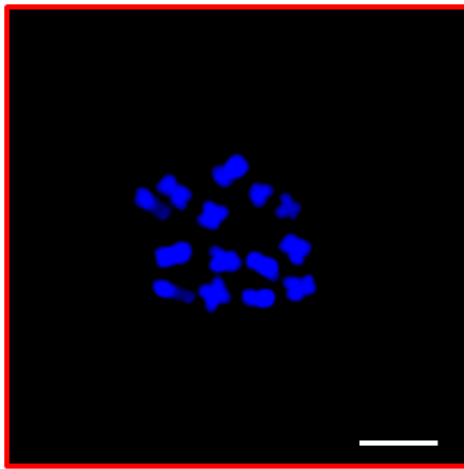
Tür İsimleri	Kromozom sayısı	Temel kromozom sayısı	Ömür uzunlukları
<i>O. hyparygera</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. pallasi</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. grandis</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. caput-galli</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Tek yıllık
<i>O. alba</i> subsp. <i>laconica</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. supina</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. megataphros</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. gracilis</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. humilis</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. ptolemaica</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. sternorhiza</i>	$2n = 2x = 14$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. kachetica</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. gaubae</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. vaginalis</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. michauxii</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. chorossanica</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. vassilczenkoi</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. crista-galli</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Tek yıllık
<i>O. radiata</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. iberica</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. sintenisii</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. persica</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. argyrae</i>	$2n = 2x = 16$	$x = 8$	Çok yıllık
<i>O. viciifolia</i>	$2n = 2x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. arenaria</i>	$2n = 2x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. transcaucasica</i>	$2n = 4x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. cyri</i>	$2n = 4x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. altissima</i>	$2n = 4x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. biebersteinii</i>	$2n = 4x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. inermis</i>	$2n = 4x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. conferta</i> subsp. <i>argentea</i>	$2n = 4x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. petrae</i>	$2n = 4x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. kemulariea</i>	$2n = 4x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. hajastana</i>	$2n = 4x = 28$	$x = 7$	Çok yıllık
<i>O. subacaulis</i>	$2n = 4x = 32$	$x = 8$	Tek yıllık



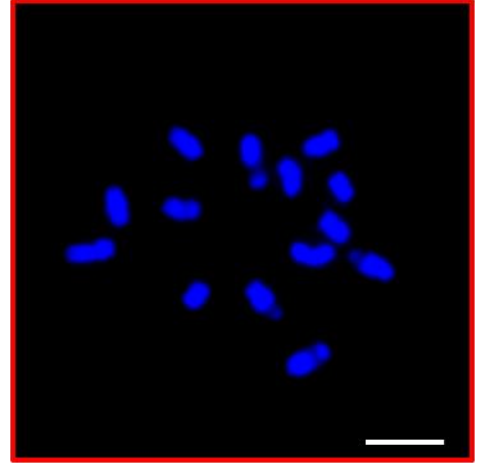
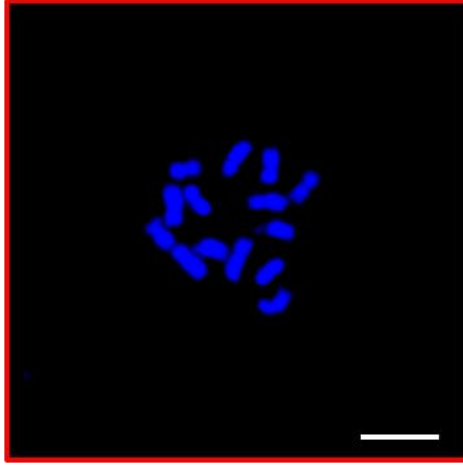
Şekil 4.1. *O. pallasi* (soldaki karyotip) ve *O. hypargyrea* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$



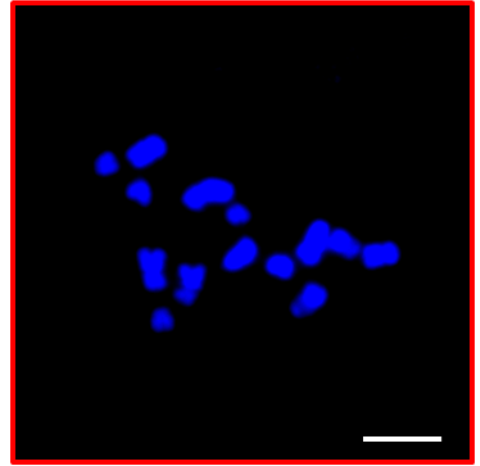
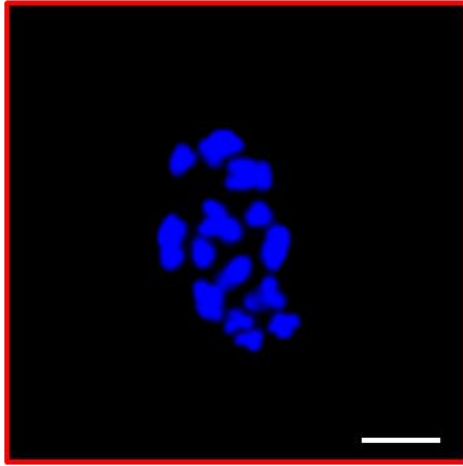
Şekil 4.2. *O. gracilis* (soldaki karyotip) ve *O. humilis* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$



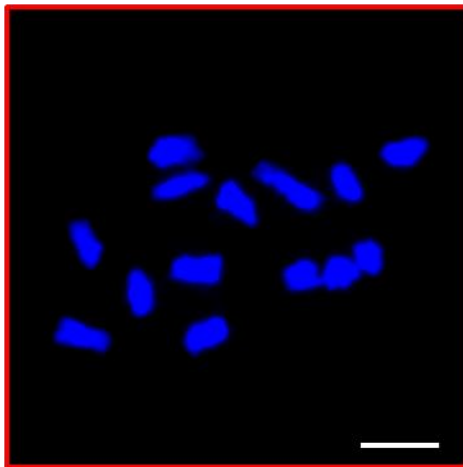
Şekil 4.3. *O. grandis* (soldaki karyotip) ve *O. caput-galli* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$



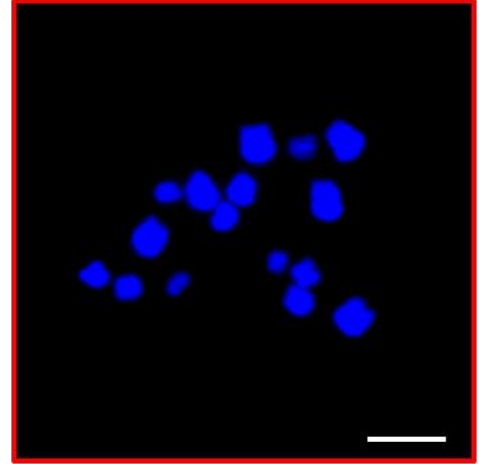
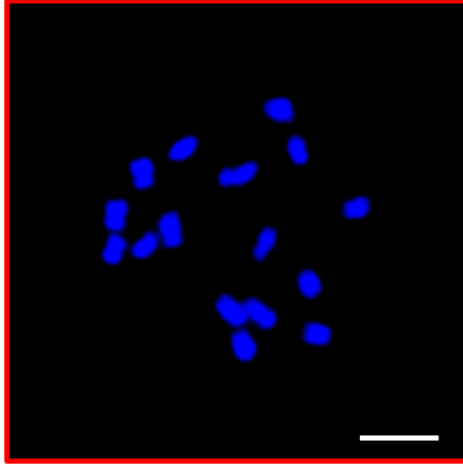
Şekil 4.4. *O. supina* (soldaki karyotip) ve *O. alba* subsp. *laconica* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$



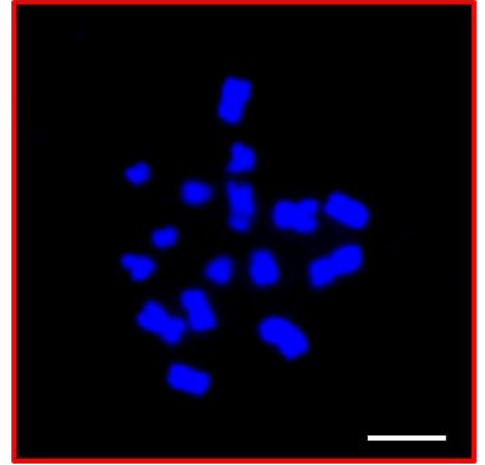
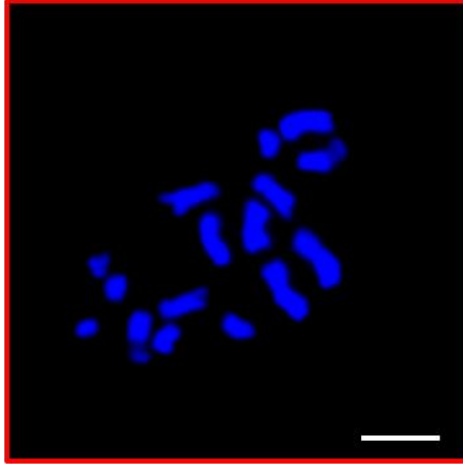
Şekil 4.5. *O. ptolemaica* (soldaki karyotip) ve *O. stenorrhiza* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$



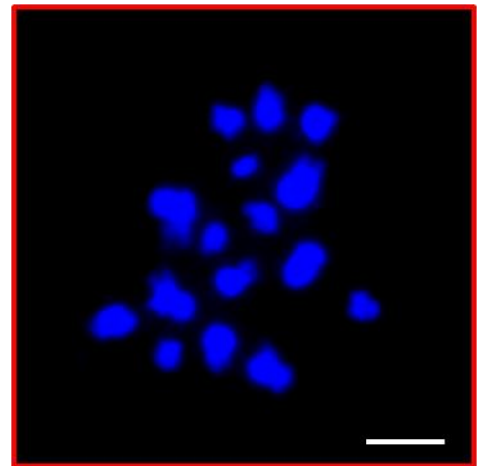
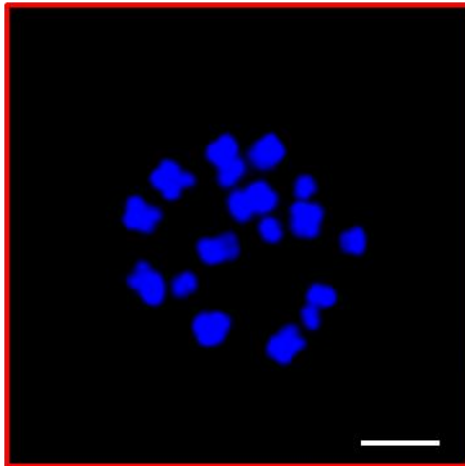
Şekil 4.6. *O. megataphros* mitotik kromozomları, $2n = 2x = 14$



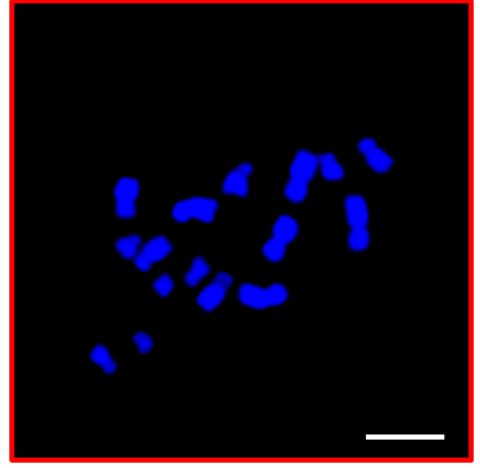
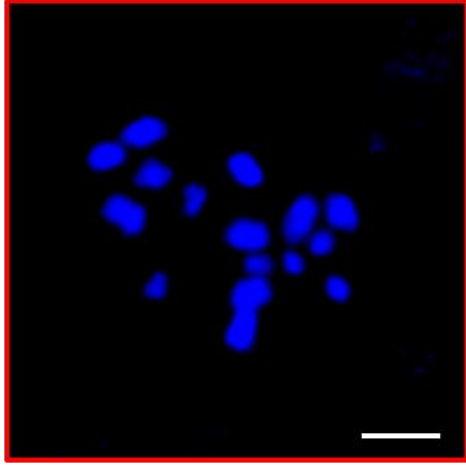
Şekil 4.7. *O.crista-galli* (soldaki karyotip) ve *O. gaubea* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$



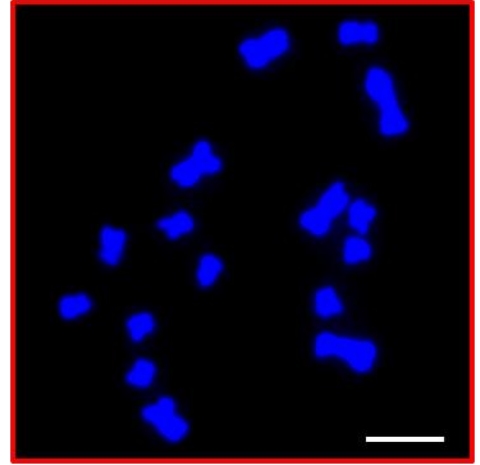
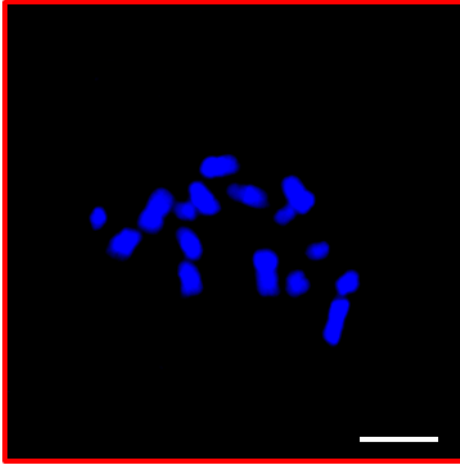
Şekil 4.8. *O.kachetica* (soldaki karyotip) ve *O. chorossanica* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$



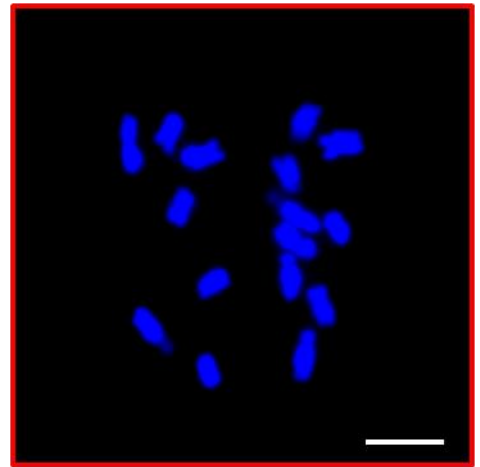
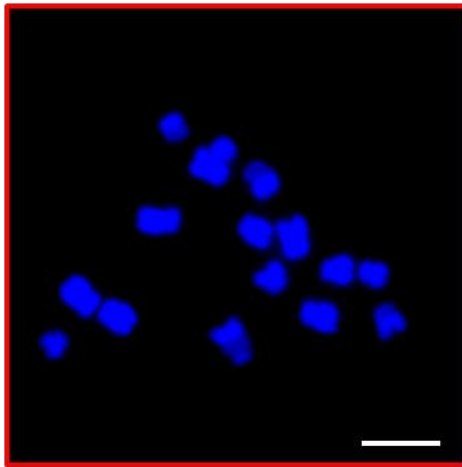
Şekil 4.9. *O.radiata* (soldaki karyotip) ve *O. michauxii* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$



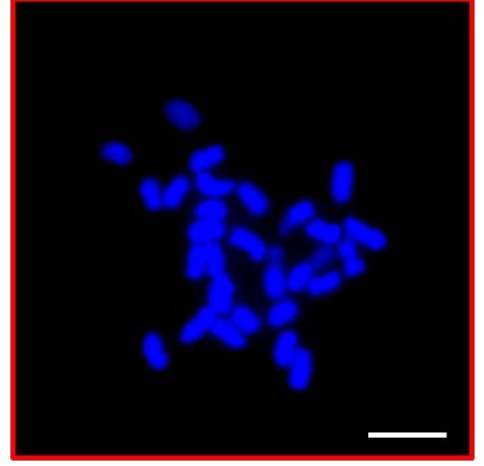
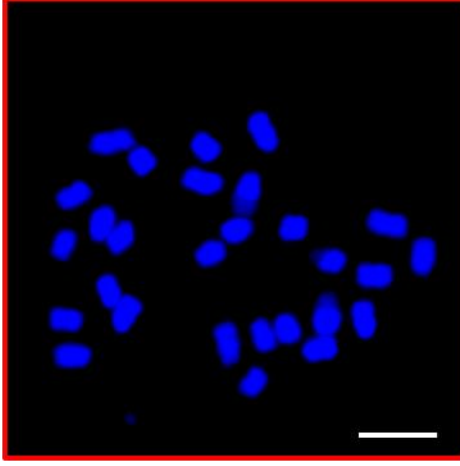
Şekil 4.10. *O.vassilczenkoi* (soldaki karyotip) ve *O.sintenisii* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$



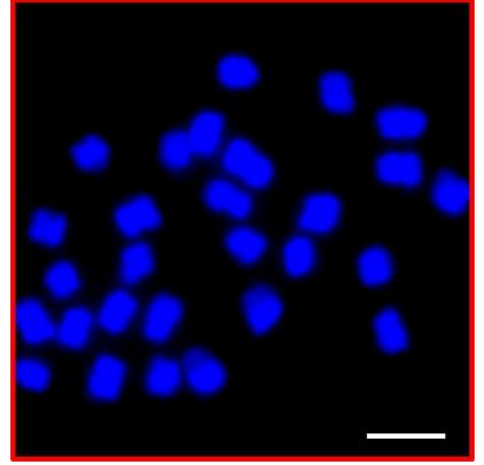
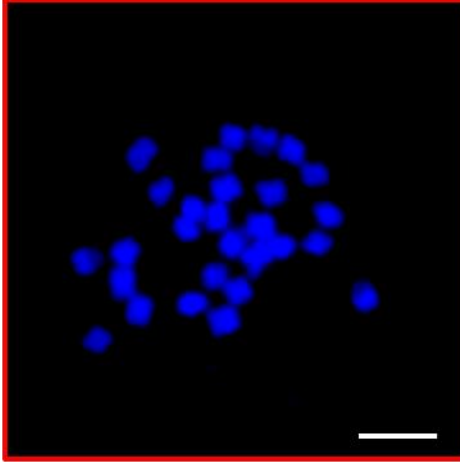
Şekil 4.11. *O.vaginalis* (soldaki karyotip) ve *O. iberica* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$



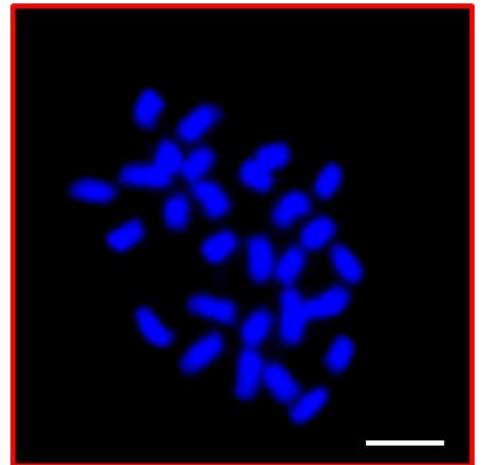
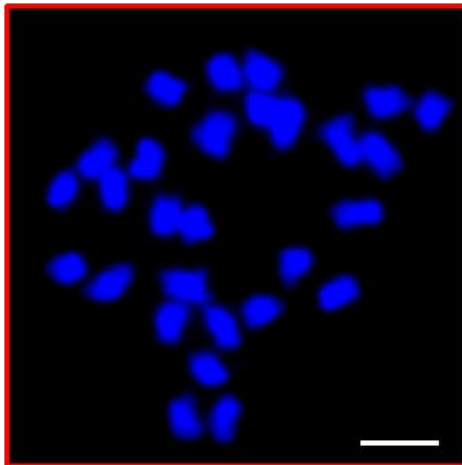
Şekil 4.12. *O. argyreae* (soldaki karyotip) ve *O.persica* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 2x = 16$



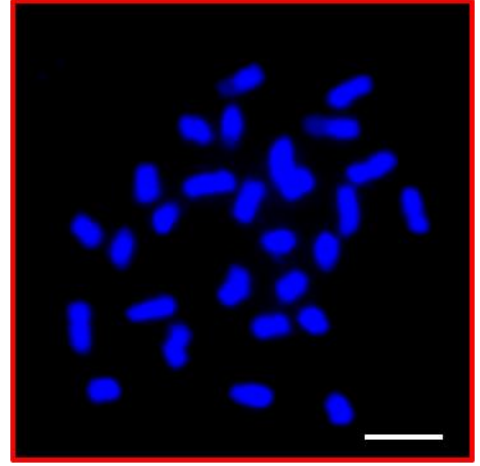
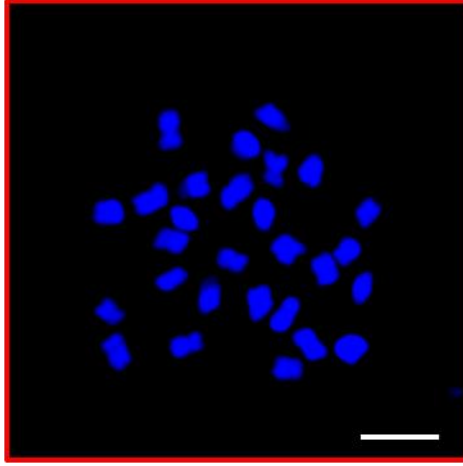
Şekil 4.13. *O. vicifolia* (soldaki karyotip) ve *O. arenaria* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 4x = 28$



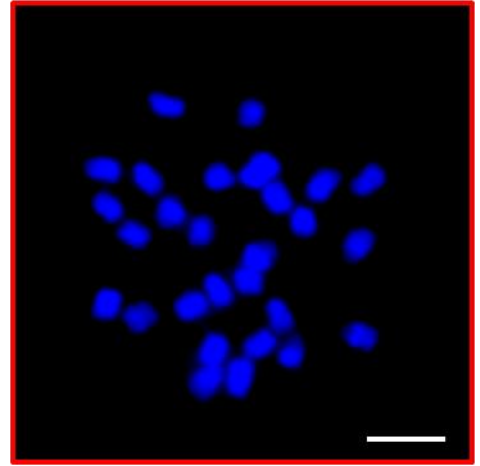
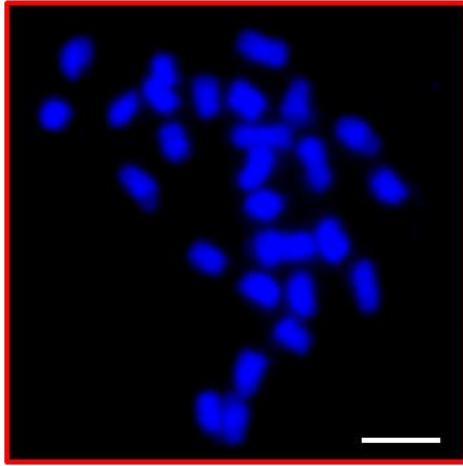
Şekil 4.14. *O. transcaucasica* (soldaki karyotip) ve *O. cyri* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 4x = 28$



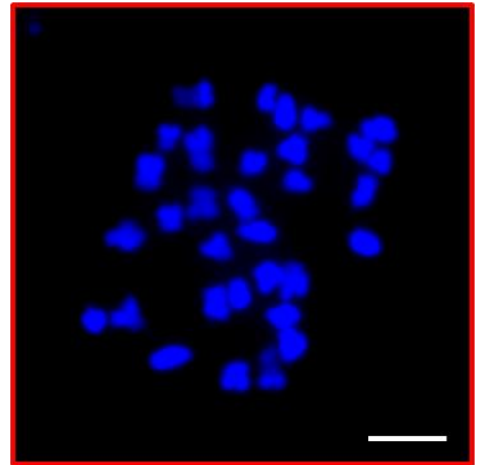
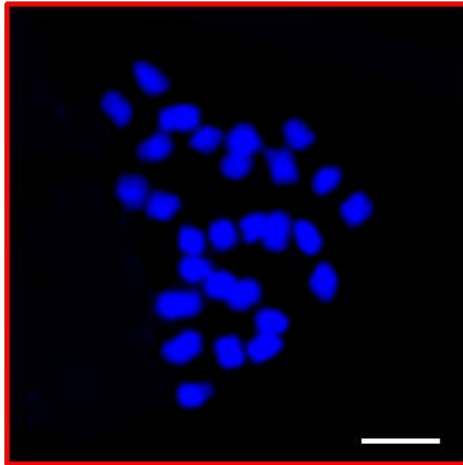
Şekil 4.15. *O. altissima* (soldaki karyotip) ve *O. biebersteinii* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 4x = 28$



Şekil 4.16. *O. inermis* (soldaki karyotip) ve *O. conferta* subsp. *argentae* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 4x = 28$



Şekil 4.17. *O. hajstana* (soldaki karyotip) ve *O. kemulariae* (sağdaki karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 4x = 28$



Şekil 4.18. *O. petrae* $2n = 4x = 28$ (soldaki karyotip) ve *O. subacaulis* (sağdaki, karyotip) mitotik kromozomları, $2n = 4x = 32$

Çizelge 4.1 den de görüleceği üzere çalışma kapsamında mitotik kromozomları sayılmış olan 35 farklı *Onobrychis* türünden elde edilen sonuçlara göre *Onobrychis* cinsi $x = 7$ ve $x = 8$ olmak üzere 2 farklı temel kromozom sayısına sahip olduğu belirlenmiştir. Diploid türlerin 12 tanesinde kromozom sayısı $2n = 2x = 16$, geri kalan 11 tanesinde ise $2n = 2x = 14$ olarak belirlenmiştir. Poliploid türlerin ise *O. subacaulis* hariç tümünün $2n = 4x = 28$ kromozom sayısına sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda *O. subacaulis*'in kromozom sayısı $2n = 4x = 32$ olarak belirlenmiştir.

Onobrychis cinsinin 2 farklı temel kromozom sayısına ($x = 7$ ve $x = 8$) sahip olduğu daha önce gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda da rapor edilmiştir (Ranjbar ve ark., 2012; Hesamzadeh Hejazı ve Nasab 2010). Bu yönden sunulmuş olan bu tez çalışmasında elde edilmiş olan sonuçlar ile daha önce yapılmış olan çalışmalardan elde edilmiş olan sonuçlar paralellik göstermektedir.

Onobrychis türleri için daha önce rapor edilmiş kromozom sayıları ve bu çalışmada belirlenmiş olan kromozom sayıları çizelge 4.2 de birlikte sunulmuştur.

Çizelge 4.2. *Onobrychis* türlerinin önceki çalışmalar ile bu çalışmada belirlenmiş olan kromozom sayıları ve referansları.

Tür İsimleri	Önceki çalışmalarda belirlenen kromozom sayısı	Tez çalışmasında belirlenen kromozom sayıları	Referanslar
<i>O. hyparygera</i>	2n = 14	2n = 14	Somay Akçelik ve ark. 2012.
<i>O. grandis</i>	2n = 14	2n = 14	Baykabilov 1977 (Chromosome count database)
<i>O. caput-galli</i>	2n = 14,28	2n = 14	Sepet ve ark. 2011, Abou-El-Enain 2002.
<i>O. alba</i>	2n = 14	2n = 14	Kozuharov ve ark. 1972
<i>O. supina</i>	2n = 14	2n = 14	Garnatje ve Cardona 1988
<i>O. megataphros</i>	2n = 32	2n = 14	Hoşgören 2006
<i>O. gracilis</i>	2n = 14	2n = 14	Somay Akçelik ve ark. 2012.
<i>O. humilis</i>	2n = 14	2n = 14	Lifante ve Martin 1992.
<i>O. ptolemaica</i>	2n = 14,16	2n = 14	Ranjbar ve ark. 2012, Abou-El-Enain 2002
<i>O. kachetica</i>	2n = 16	2n = 16	Baltisberger ve Baltisberger 2015
<i>O. gaubae</i>	2n = 16	2n = 16	Hesamzadeh Hejazi ve Nasab 2010.
<i>O. michauxii</i>	2n = 14, 16	2n = 16	Ranjbar ve ark. 2012.
<i>O. chorossanica</i>	2n = 14	2n = 16	Ranjbar ve ark. 2012.
<i>O. vassilczenkoi</i>	2n = 14	2n = 16	Magulaev 1995.
<i>O. crista-galli</i>	2n = 16,32	2n = 16	Hesamzadeh Hejazi ve Nasab 2010, Abou-El-Enain 2002.
<i>O. radiata</i>	2n = 14	2n = 16	Hesamzadeh Hejazi. ve Nasab 2010.
<i>O. iberica</i>	2n = 28	2n = 16	Anonim 2019c
<i>O. sintenisii</i>	2n = 14	2n = 16	Hesamzadeh Hejazi ve ark. Nasab2010.
<i>O. argyrea</i>	2n = 16	2n = 16	Öztürk ve ark. 2009, Somay Akçelik E ve ark. 2012.
<i>O. persica</i>	2n = 28	2n = 16	Hesamzadeh Hejazi ve Nasab.2010.
<i>O. viciifolia</i>	2n = 28	2n = 28	Hesamzadeh Hejazi ve Nasab 2010.
<i>O. arenaria</i>	2n = 14, 28	2n = 28	Anonim 2019d
<i>O. transcaucasica</i>	2n = 28	2n = 28	Elena 2006.
<i>O. cyri</i>	2n = 28	2n = 28	Anonim 2019e
<i>O. altissima</i>	2n = 14, 28	2n = 28	Arslan ve ark. 2012, Hejazi ve Nasab. 2010
<i>O. biebersteinii</i>	2n = 28	2n = 28	Anonim 2019f
<i>O. inermis</i>	2n = 28	2n = 28	Magulaev 1989 (Chromosome count database)
<i>O. conferta</i>	2n = 16	2n = 28	Sacristan 1996 (Chromosome count database)
<i>O. petrae</i>	2n = 14	2n = 28	Magulaev 1989 (Chromosome count database)
<i>O.kemulariea</i>	2n = 28	2n = 28	Zakharyeva 1985(Chromosome count database)
<i>O. hajastana</i>	2n = 14	2n = 28	Arslan ve ark. 2012
<i>O. subacaulis</i>	2n = 16	2n = 32	Arslan ve ark. 2012

Çalışmamızda kromozom sayımı yapılan 35 türden 15'i için elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile bire bir uyumaktadır. Bu türlerden diploid olan *O. hyparygera*, *O. grandis*, *O. alba* subsp. *laconica*, *O. supina*, *O. gracilis*, *O. humilis* türlerinin kromozom sayısı 2n = 14, *O. argyrea*, *O. kachetica*, *O. gaubae* türlerinin kromozom sayısı ise 2n = 16 olarak belirlenmiştir. *O. viciifolia*, *O. transcaucasica*, *O. cyri*, *O. biebersteinii*, *O. inermis*, *O. kemulariea* türlerinin ise 2n = 28 kromozoma sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çalışmamızda $2n = 14$ kromozom ile diploid olduğu belirlenmiş olan *O. caput-galli* türü için daha önce yapılmış çalışmalarda $2n = 14$ kromozom sayısı yanında, $2n = 28$ kromozoma sahip formların varlığı da rapor edilmiştir. Çalışmamızda kromozom sayısı $2n = 14$ olarak belirlenmiş olan *O. megataphros*' un kromozom sayısı önceki çalışmalarda $2n = 32$ olarak rapor edilmiştir. Yine çalışmamızda $2n = 14$ kromozoma sahip olarak belirlenmiş olan *O. ptolemaica* türü için ise literatürde rapor edilmiş olan kromozom sayıları $2n = 14$ ve $2n = 16$ dır. (Çizelge 4.2).

Çalışmamızda kromozom sayısı $2n = 16$ olarak belirlenen *O. michauxii* türü için 16 kromozomlu form yanında $2n = 14$ kromozomlu formların da bulunduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda kromozom sayısı $2n = 16$ olarak belirlenmiş olan *O. chorossanica*, *O. vassilczenkoi*, *O. radiata*, *O. sintenisii* gibi türler için ise önceki çalışmalarda belirtilmiş olan kromozom sayısı $2n=14$ tür. Yine çalışmamızda $2n=16$ kromozom ile diploid oldukları belirlenmiş olan *O.crista-galli*, *O. iberica* ve *O. persica* türlerinin ise daha önceki çalışmalarda poliploid oldukları rapor edilmiştir. Bu türlerden ilki için rapor edilen kromozom sayısı $2n =16$ ve 32 iken, son iki türün kromozom sayısı $2n = 28$ olarak rapor edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çalışmamızda $2n=28$ kromozom ile tetraploid olarak belirlenmiş olan *O. arenaria* ve *O. altissima* türleri için önceki çalışmalarda $2n = 28$ kromozomlu tiplerin yanı sıra $2n=14$ kromozomlu diploid formlar da rapor edilmiştir (Çizelge 4.2).

Yine çalışmamızda $2n = 28$ kromozom ile tetraploid oldukları belirlenmiş olan *O. conferta*, *O. petrae*, *O. hajastana* türlerinin ise daha önceki çalışmalarda diploid oldukları rapor edilmiştir. Bu türlerden ilkinin $2n = 16$ kromozoma sahip iken diğer ikisinin $2n = 14$ kromozoma sahip olduğu rapor edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çalışmamızda $2n = 32$ kromozoma sahip tek türü olan *O. subacaulis* türü için ise literatürde rapor edilen kromozom sayısı $2n = 16$ dır (Çizelge 4.2).

O. pallasi, *O. stenorhiza* ve *O. vaginalis* türlerinin kromozom sayısı ise ilk defa tarafımızdan yürütmüş olduğumuz bu tez çalışmasında belirlenmiştir. Türlerin üçünün de diploid olduğu saptanırken, ilk iki türün kromozom sayısı $2n = 14$, sonuncu türün kromozom sayısı $2n = 16$ olarak saptanmıştır. Bu türlere ait kromozom sayıları ile ilgili olarak literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Gerçekleştirmiş olduğumuz tez çalışmamızda *Onobrychis* türleri için belirlemiş olduğumuz kromozom sayıları ile daha önce yapılmış çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında gözlenen farklılıklar cinsin kompleks yapısından kaynaklanıyor olabileceği gibi kullanılan materyallerin karışık olması, yanlış teşhis edilmiş olmaları ya da kromozomların küçük olmasından dolayı yanlış sayılmasından kaynaklanmış olabilir (Ranjbar ve ark. 2012.)

Diğer araştırmacılar tarafından daha önce gerçekleştirilmiş olan çalışmalara bakıldığında preparatların hematoxylin iron, feulgen, aseto-orsein gibi klasik boyama yöntemleri kullanılarak hazırlandığı görülmektedir. Ancak bu yöntemler ile hazırlanan preparatlarda sitoplazma kalıntılarının fazla olmasının yanısıra, kromozomları düzgün bir şekilde dağıtmaktada sorunlar yaşanmaktadır (Hoşgören 2006). Bu durumda özellikle küçük kromozumlu bitkilerde kromozom sayısının yanlış belirlenmesine sebep olabilmektedir. Yürütülen tez çalışmamızda ise *Onobrychis* türleri için preparatların hazırlanmasında ilk defa pektinaz ve selülaz enzimleri kullanılmış ve sitoplazma kalıntısı olmayan, kromozom morfolojisi ve dağılımı iyi olan çok sayıda hücreye sahip yüksek kaliteli preparatlar elde edilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada yapılmış olan kromozom analizleri önceki çalışmalardan daha hassas bir şekilde yapılmıştır. Bu çalışmada FISH analizinde kullanılmış olan türlerin ve ayrıca *O. argyrea* ve *O. kemulariae* türlerinin kromozomları sayılmıştır

4.2. Çekirdek DNA İçeriği

Sunulan bu tez çalışmasında 22 diploid ve 10 poliploid *Onobrychis* türü için flow sitometri yöntemi ile belirlenmiş olan 2C çekirdek DNA içerikleri Çizelge 4.3 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. *Onobrychis* türlerinin belirlenmiş olan çekirdek DNA içerikleri

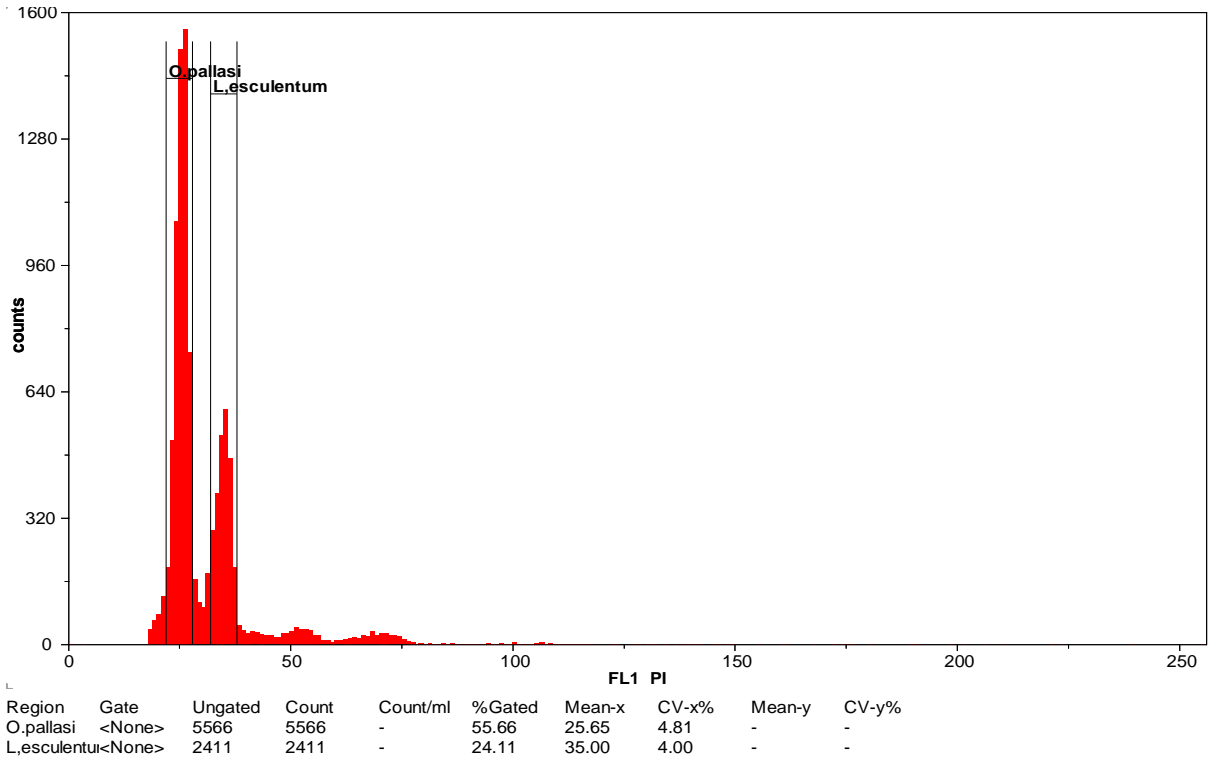
Türler	Kromozom sayısı	2C DNA İçeriği	Standart Sapma	1Cx
<i>O. pallasi</i>	2n = 14	1,47 pg	0,03	0,74
<i>O. grandis</i>	2n = 14	1,26 pg	0,04	0,63
<i>O. hypargyrea</i>	2n = 14	1,45 pg	0,04	0,73
<i>O. caput-galli</i>	2n = 14	0,65 pg	0,08	0,33
<i>O. alba subsp. laconica</i>	2n = 14	1,15 pg	0,02	0,58
<i>O. supina</i>	2n = 14	0,96 pg	0,03	0,48
<i>O. megataphros</i>	2n = 14	1,17 pg	0,02	0,59
<i>O. gracilis</i>	2n = 14	1,09 pg	0	0,55
<i>O. humilis</i>	2n = 14	1,33 pg	0,11	0,67
<i>O. ptolemaica</i>	2n = 14	1,37 pg	0,03	0,69
<i>O. sternorhiza</i>	2n = 14	1,2 pg	0,05	0,6
<i>O. kachetica</i>	2n = 16	1,26 pg	0,04	0,63
<i>O. gaubae</i>	2n = 16	0,71 pg	0,01	0,36
<i>O. vaginalis</i>	2n = 16	1,23 pg	0,03	0,62
<i>O. michauxii</i>	2n = 16	1,42 pg	0,03	0,71
<i>O. chorossanica</i>	2n = 16	1,31 pg	0,03	0,66
<i>O. vassilczenkoi</i>	2n = 16	1,38 pg	0,01	0,69
<i>O. crista-galli</i>	2n = 16	0,86 pg	0,20	0,43
<i>O. radiata</i>	2n = 16	1,38 pg	0,01	0,69
<i>O. iberica</i>	2n = 16	1,20 pg	0	0,60
<i>O. sintenisii</i>	2n = 16	1,2 pg	0,03	0,6
<i>O. persica</i>	2n = 16	1,01 pg	0,07	0,51
<i>O. viciifolia</i>	2n = 28	2,59 pg	0,05	0,65
<i>O. viciifolia</i>	2n = 28	2,65 pg	0,05	0,66
<i>O. transcaucasica</i>	2n = 28	2,74 pg	0,01	0,69
<i>O. cyri</i>	2n = 28	2,65 pg	0	0,66
<i>O. altissima</i>	2n = 28	2,65 pg	0	0,66
<i>O. biebersteinii</i>	2n = 28	2,51 pg	0,05	0,63
<i>O. inermis</i>	2n = 28	2,54 pg	0,06	0,64
<i>O. conferta</i>	2n = 28	2,83 pg	0,08	0,7
<i>O. petrae</i>	2n = 28	2,60 pg	0,78	0,66
<i>O. hajastana</i>	2n = 28	2,61 pg	0,01	0,66
<i>O. subacaulis</i>	2n = 32	2,43 pg	0,02	0,60

Çizelge 4.3'den de görüleceği üzere çalışma kapsamında analiz edilmiş olan *Onobrychis* türlerinin çekirdek DNA içerikleri 0.65 pg ile 2.83 pg (min ve max) arasında değişim göstermiştir.

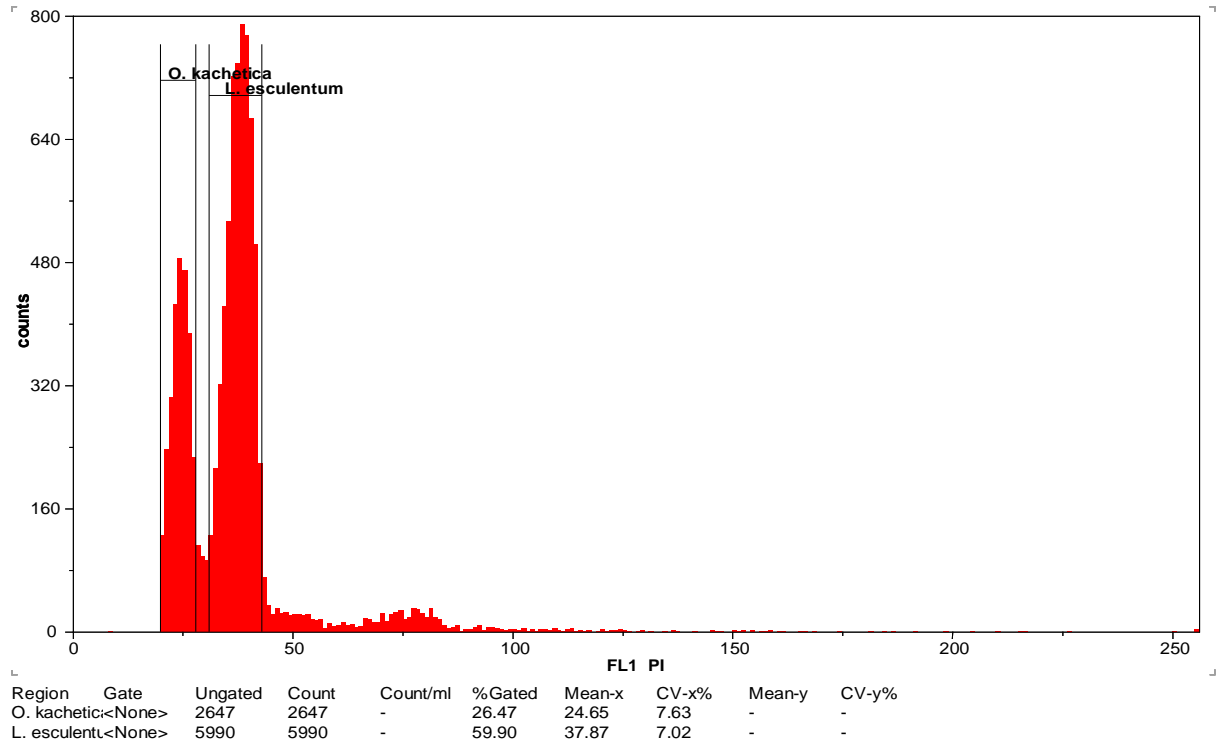
$2n = 2x = 14$ kromozom sayısına sahip olan diploid *Onobrychis* türlerinde 2C çekirdek DNA içeriği değerlerinin 0,65 pg (*O. caput-galli*) ile 1,47 pg (*O.pallasi*) aralığında değiştiği gözlenmiştir. Kromozom sayısı daha fazla olmasına rağmen $2n = 2x = 16$ kromozoma sahip olan diploid türlerin hemen hemen aynı miktarda çekirdek DNA içeriğine (0,71 pg - 1,42 pg) sahip oldukları dikkat çekmiştir. Diploid türlerde dikkat çeken diğer bir husus ise türlerin çekirdek DNA içerikleri arasında yaklaşık 2 misliden daha fazla bir farkın gözlenmiş olmasıdır. Diploid *Onobrychis* türlerinin çekirdek DNA miktarları arasında gözlenen bu geniş varyasyon, çekirdek DNA içeriği bilgisini özellikle diploid *Onobrychis* türlerinin teşhisi, sınıflandırılması ve genomlarının tanımlanmasında çok yararlı olabileceğini göstermektedir. $2n = 4x = 28$ kromozoma sahip poliploid türlerde ise çekirdek DNA içeriği diploidlerden farklı olarak birbirine daha benzer olup, 2,59 pg ile 2,83 pg arasında değişim göstermiştir. Çalışmamızda incelenen ve $2n = 4x = 32$ kromozom sayısına sahip tek tür olan *O. subacaulis*' in çekirdek DNA içeriği ise 2,43 pg olarak saptanmıştır. Bu türün diğer $2n = 28$ kromozomlu poliploid türlere göre fazladan sahip olduğu 4 extra kromozom diploid türlerin bazılarında gözlenmekte olan fazladan 2 kromozomda olduğu gibi çekirdek DNA içeriğinde bir artışa sebep olmaz iken, tam tersine türün çekirdek DNA içeriğinin diğer tüm $2n = 28$ kromozomlu poliploidlerden daha düşük olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3' ün incelenmesinden de anlaşılacağı üzere *Onobrychis* cinsinde çekirdek DNA içeriği ile ploidy düzeyi arasında doğru bir orantının bulunduğu ve artan ploidy düzeyi ile çekirdek DNA içeriğinin artış gösterdiği gözlenmektedir.

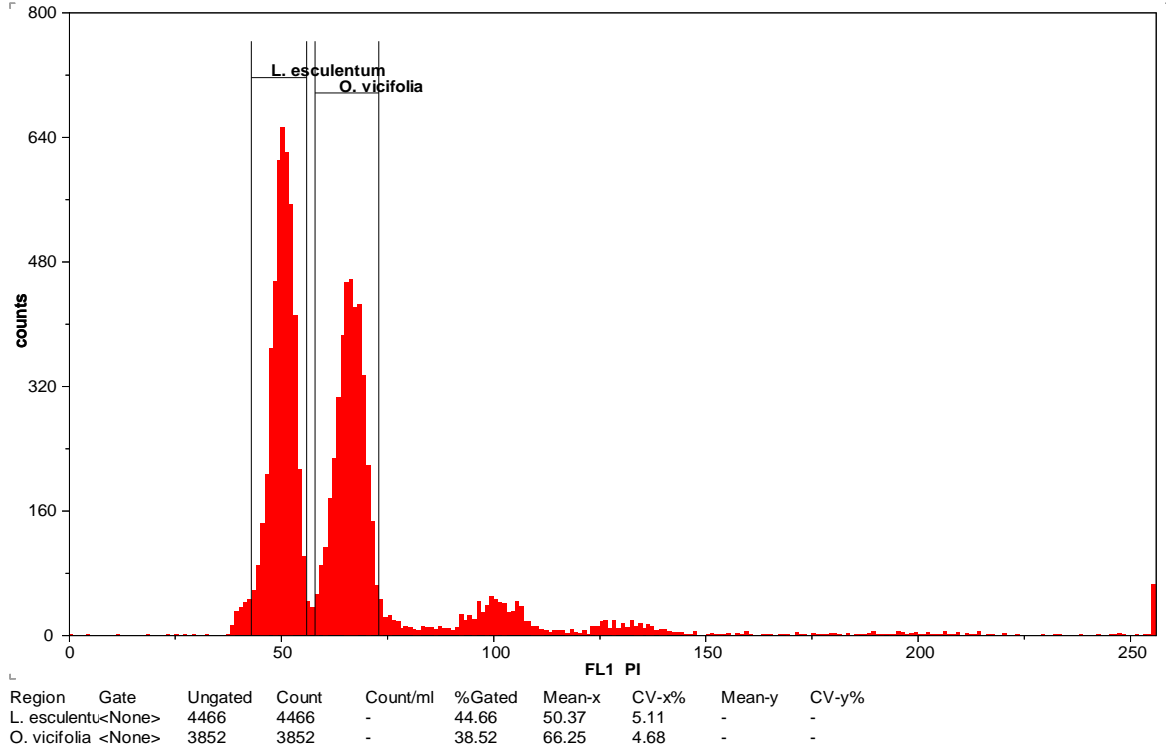
Onobrychis türlerinin bazıları için elde edilmiş olan flow histogramları Şekil 4.19 ile 4.22 arasında sunulmuştur.



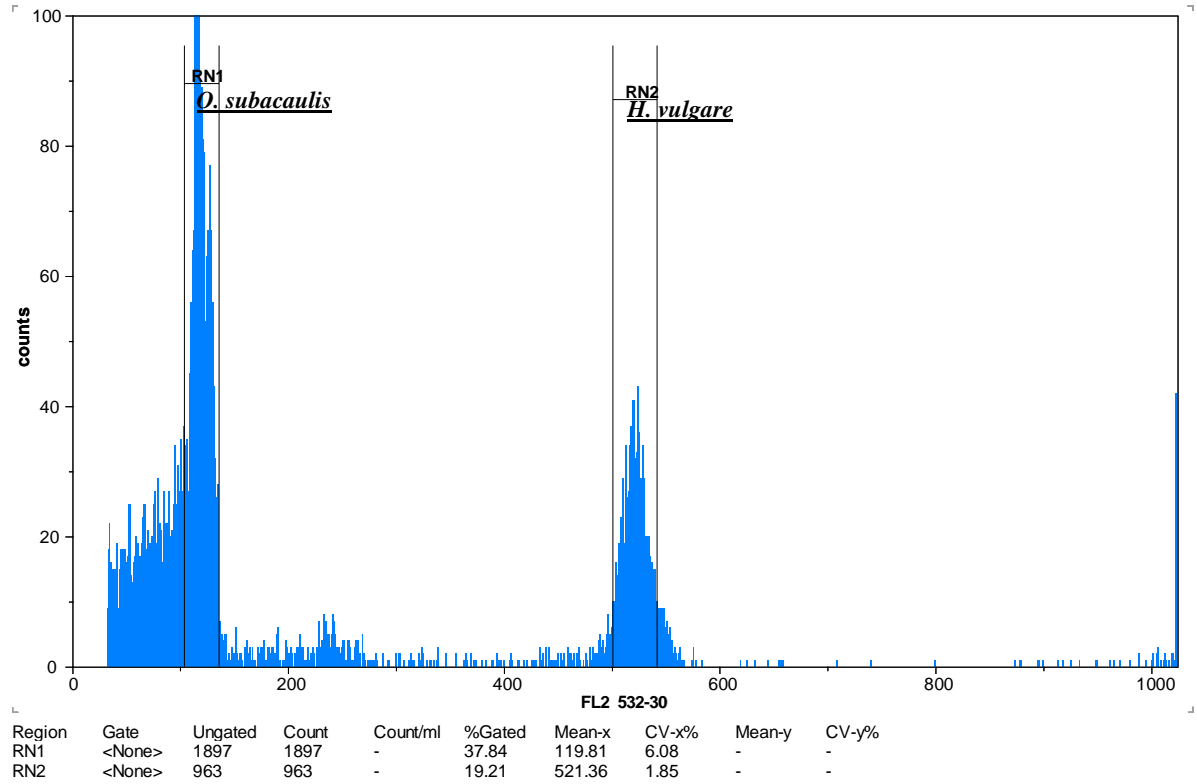
Şekil 4.19. *O. pallasi* ($2n = 4x = 14$) türüne ait flow sitometri histogramı



Şekil 4.20. *O. kachetica* ($2n = 4x = 16$) türüne ait flow sitometri histogramı



Şekil 4.21. *O. viciifolia* ($2n = 4x = 28$) türüne ait flow sitometri histogramı



Şekil 4.22. *O. subacaulis* ($2n = 4x = 32$) türüne ait flow sitometri histogramı

Şu ana kadar *Onobrychis* cinsi üzerinde çekirdek DNA içeriği analizi yapılmış olan tek çalışmada Carbonero (2011) *O. viciifolia* türünün çekirdek DNA içeriğini 2,5 pg olarak belirlemiştir. Çalışmamızda ise *O. viciifolia* türünün çekirdek DNA içeriği 2,65 ve 2,59 pg olarak belirlenmiştir. Yürütülmüş olan bu çalışma ile çalışmamızda elde edilen veriler arasında benzer sonuçlar saptanmıştır..

Çekirdek DNA içeriği genel olarak bir türün tüm bireyleri ve bir bireyin tüm hücrelerinde sabittir ve değişmez. Bununla birlikte şu ana kadar yapılmış olan çalışmalara göre çekirdek DNA içeriğinin (angiosperm) türler arasında yaklaşık 1000 kat değişim gösterdiği bilinmektedir (Benneth ve ark. 2000). Bu durum bu bilgiyi genom yada diğer bir ifade ile tür spesifik yapmaktadır. Bu nedenle çekirdek DNA içeriği bilgisi türlerin teşhisi, sınıflandırılması ve evrimi gibi bir çok alanda çok yararlı olmaktadır (Ohri 1998).

Yan ve ark. (2016) *Avena* türleri üzerinde gerçekleştirmiş oldukları bir çalışmada *A. damascena*, *A. longiglumis* Durieu, *A. ventricosa* Balansa, *A. abyssinica* Hochst., *A. murphyi* Ladiz., ve *A. sativa* L. türlerinin çekirdek DNA içeriklerini sırasıyla 8,43, 9,23, 10,29, 16,73, 18,70, 25,70 pg olarak belirlemiştir. Araştırmacılar yapmış oldukları bu çalışmada *Avena* türlerinin çekirdek DNA içerikleri bakımından bariz bir şekilde farklılık gösterdiğini ve çekirdek DNA içeriğinin artan ploidy düzeyi ile doğru orantılı bir şekilde artış gösterdiğini saptamışlardır.

Tuna ve ark. (2001) Brom cinsi üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında çekirdek DNA içeriğinin türlere bağlı olarak 6,14 ile 26,64 pg arasında değişim gösterdiğini ve çekirdek DNA içeriğinin artan ploidy düzeyi ile doğru orantılı bir şekilde artış gösterdiğini saptamışlardır. Ancak poliploidlerin çekirdek DNA içeriğinin progenitor türlerin çekirdek DNA içeriklerinin aritmetik toplamından daha düşük olduğunu dolayısıyla poliploidleşme esnasında çekirdek DNA miktarında azalmaların meydana geldiğini gözlemişlerdir.

Kolano ve ark. (2015) gerçekleştirdikleri çalışmada farklı diploid *Chenopodium* türlerinin çekirdek DNA içeriğini analiz ederek filogenetik ağaç üzerinde haritalamışlardır. Yapılan bu çalışmada diploid *Chenopodium* ($2n = 18$) türlerinde çekirdek DNA içeriğinin yaklaşık 4 misli bir değişim gösterdiğini ve aneuploid genom boyutunun 1,39 pg olduğunu saptamışlardır. Genom boyutunda gözlenen artış ve azalmaları takson farklılaşması ve türleşme ile ilişkilendirmişlerdir. Yaşam döngüsünün (tek yıllık- çok yıllık) ve transposable

elementlerin farklılık gösteren proliferasyonunun diploid *Chenopodium* türlerinin genom boyutundaki değişimde etkili olmuş olabileceğini belirtmişlerdir.

Leitch ve Benneth (2004) poliploidi sonrası biyolojik tepki olarak genom boyutunda azalma olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca genom boyutunun progenitor türlerin sahip olduğu çekirdek DNA içeriklerinin toplamından genellikle daha az veya nadiren de olsa daha fazla olabileceğini de belirtmişlerdir. Bununla birlikte Ozkan ve ark. (2006) autopoliploid *Arabidopsis*'in çekirdek DNA içeriğinin progenitor türün tam olarak aritmetik toplamına sahip olduğunu saptamışlardır.

Leitch ve ark. (2008) poliploid *Nicotiana* türlerinde çekirdek DNA içeriğinde hem artma hem de azalma (progenitor türlerin sahip olduğu çekirdek DNA içeriklerinin (1C) toplamına kıyasla) olduğunu açıklamışlardır. Poliplodi *N. tabacum* türünde %3.7, *N. rustica* türünde %1.9-5.4 oranında azalma belirtilmişken, *N. clevelandii* A.Gray türünde %2.5 oranında artış gözlemlendiği belirtilmiştir. Bazı *Hordeum* türlerinde de progenitorlarının DNA içeriklerinin toplamına kıyasla artış olabileceği bildirilmiştir (Jakob ve ark. 2004).

Retrotransposonların ve tekrarlı dizilerin bitki genomunda oldukça yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir. Bitki genomu ve genom boyutunun evriminde önemli etkilerinin olduğu ve genom boyutunun artışında (upsizing) retrotransposonların amplifikasyonu ve tekrarlı DNA dizilerin dinamik evrimlerinin etkisi olduğu belirtilmiştir (Ambrozova ve ark. 2011, Estep ve ark. 2013, Long ve ark. 2013). Genom boyutundaki azalma ve DNA dizilerinin eliminasyonunun ise şu zamana kadar daha az anlaşılabilirdiği, eşit olmayan homolog rekombinasyon ve hatalı rekombinasyonun ise genom boyutunun azalmasına etkili olabilecek önerilmiş olan en önemli mekanizmalar olduğu belirtilmiştir (Bennetzen ve Wang 2014, Kolano ve ark. 2015).

Diğer araştırmacılar tarafından yukarıda belirtilmiş olan çeşitli mekanizmalar yani tekrarlı DNA bölgelerinin proliferasyonu veya eliminasyonu *Onobrychis* türlerinin çekirdek DNA içeriklerinin değişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bununla beraber *O. caput-galli* ($2C = 0,65\text{pg}$) en küçük genom boyutuna sahip olan tür ve *O. crista-galli* ($2C = 0,86\text{pg}$) ile *O. gaubae* ($2C = 0,71\text{pg}$) küçük genom boyutuna sahip olan türlerden olduğu görülmektedir. *O. caput-galli*, *O. crista-galli* türleri tek yıllık ve *O. gaubae* türü ise çok yıllık olarak bilinmektedir. Gerçekleştirilmiş olan bazı çalışmalarda çekirdek DNA içeriği ile yaşam döngüsü arasında bir ilişki olabileceği ve tek yıllık bitkilerin

çok yıllık bitkilere oranla daha küçük genom boyutuna sahip olabilecekleri iddia edilmiştir (Bennet 1972).

Tek yıllık bitkilerin düşük DNA miktarı ile karakterize edilebileceği, çünkü DNA miktarının çekirdek ve hücre boyutu ayrıca hücre döngüsü süresi ile pozitif korelasyona sahip olabileceği belirtilmiştir. Kısa mitoz ve mayoz bölünme döngülerinin tek yıllık yaşam süresi ile pozitif korelasyona sahip olduğu ve tek yıllık yaşam döngüsünde daha az miktarda DNA içeriği ile korelasyona sahip olabileceği bildirilmiştir (Bennet 1972).

Albach ve Greillhuber (2004) çalışmalarında tek yıllık *Veronica* türleri olan *V. peregrina* L., *V. verna* L., *V. agrestis* L. ve *V. syriaca* Roem. & Schult. için çekirdek DNA içeriğini sırasıyla 0.32, 0.54, 0.37, 0.70 pg; çok yıllık türler olan *V. anagallis-aquatica* L., *V. vindobonensis* (M.A.Fisch.) M.A.Fisch./*V. chamaedrys* L., *V. filiformis* SM., *V. serpyllifolia* L./*V. gentianoides* Vahl türlerinde ise sırasıyla 0.54, 0.90-0.74, 0.36, 0.44-0.62 pg olarak belirlemişlerdir. Tek yıllık bitkilerin genellikle daha düşük genom boyutuna sahip olabileceğini belirtmişlerdir. Tek yıllık yaşam döngüsü ve düşük DNA içeriğindeki ilişki ile ilgili gerçekleştirdikleri istatistiki çalışmalarında ise LSM testinde pozitif korrelasyon elde ederken, SST ve IC testlerinde negatif korelasyonlar saptadıklarını belirtmişlerdir.

Başka bir araştırmada ise, diploid *Hordeum* türlerinin çekirdek DNA içeriklerinin 6.85 pg ile 10.67 pg aralığında değiştiği ve heksaploid türlerde 29.85 pg'a kadar yükseldiği belirlenmiştir. Çok yıllık türlerin 2C çekirdek DNA içeriklerinin 8.51 pg (*H. flexuosum* Steud.) ile 9.69 pg (*H. roshevitzii* Bowden) arasında değiştiği ve 1.14 katlık bir fark olduğu, tek yıllık türlerde ise 6.85 pg (*H. euclaston* Steud.) ile, 10.67 pg (*H. vulgare*) aralığında 1.55 katlık değişim gözlemlendiği belirtilmiştir. En yüksek (*H. murinum* subsp. *leporinum* (Link) Arcang.) ve en düşük (*H. euclaston* Steud.) miktar ise tek yıllık *Hordeum* türlerinde gözlemlenmiştir. Poliploid türlerde genom boyutunun progenitörlerin aritmetik toplamından biraz fazla ya da daha az (1% to 5%) olarak belirtilmiştir. Tek ve çok yıllık olmak üzere bu iki grubun az ve çok DNA miktarına sahip türlerden oluştuğu ve az DNA miktarının tek yıllık bitkiler için bir ön koşul olmadığı belirtilmiştir (Jakob ve ark. 2004).

Yukarıda bahsedilmiş olan çalışmalara bakıldığında her iki grubun da (tek yıllık ve çok yıllık) düşük veya yüksek DNA içeriğine sahip olabileceği görülmektedir. Yürütmüş olduğumuz tez çalışmamızda *O. caput-galli*, *O. crista-galli* ve *O. gaubae* türleri için elde edilmiş olan çekirdek DNA içeriği verilerinde de benzer sonuçlar görülmüştür

4.3. *Onobrychis* Türlerine Ait Mitotik Kromozomlar Üzerinde 5S ve 35S rDNA Lokuslarının Sayı ve Dağılımı

22 diploid ve 11 poliploid olmak üzere toplam 33 farklı *Onobrychis* türünün kromozomları üzerinde bulunan olan 5S ve 35S rDNA lokuslarının sayısı Çizelge 4.4 ' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. *Onobrychis* türlerinin 35 ve 5S rDNA lokus sayıları

Tür İsimleri	Kromozom Sayısı	35S rDNA homolog lokuslarının sayısı	5S rDNA homolog lokuslarının sayısı
<i>O. hyparygera</i>	2n = 14	4	1
<i>O. pallasi</i>	2n = 14	2	1
<i>O. grandis</i>	2n = 14	1	1
<i>O. caput-galli</i>	2n = 14	1	1
<i>O. alba subsp. laconica</i>	2n = 14	2	2
<i>O. supina</i>	2n = 14	1	2
<i>O. megataphros</i>	2n = 14	2	2
<i>O. gracilis</i>	2n = 14	1	2
<i>O. humilis</i>	2n = 14	1	2
<i>O. ptolemaica</i>	2n = 14	1	1
<i>O. sternorhiza</i>	2n = 14	1	2
<i>O. kachetica</i>	2n = 16	3	2
<i>O. gaubae</i>	2n = 16	2	1
<i>O. michauxii</i>	2n = 16	4	1
<i>O. vaginalis</i>	2n = 16	4	1
<i>O. chorossanica</i>	2n = 16	4	2
<i>O. vassilczenkoi</i>	2n = 16	1	1
<i>O. crista-galli</i>	2n = 16	3	2
<i>O. radiata</i>	2n = 16	3	1
<i>O. iberica</i>	2n = 16	3	1
<i>O. sintenisii</i>	2n = 16	1	1
<i>O. persica</i>	2n = 16	2	2
<i>O. viciifolia</i>	2n = 28	2	4
<i>O. arenaria</i>	2n = 28	2	4
<i>O. transcaucasica</i>	2n = 28	2	4
<i>O. cyri</i>	2n = 28	2	4
<i>O. altissima</i>	2n = 28	2	4
<i>O. biebersteinii</i>	2n = 28	2	4
<i>O. inermis</i>	2n = 28	2	4
<i>O. conferta subsp. argentea</i>	2n = 28	2	4
<i>O. petrae</i>	2n = 28	2	4
<i>O. hajastana</i>	2n = 28	2	4
<i>O. subacaulis</i>	2n = 32	1	3

5S ve 35S rDNA lokuslarının 33 farklı *Onobrychis* türüne ait mitotik kromozomları üzerinde dağılımı ve sayısı FISH yöntemi ile belirlenmiştir. Florasan mikroskop analizleri sonrasında her tür için elde edilmiş olan karyotipler, rDNA lokuslarının somatik kromozomlar üzerinde lokalizasyonunu gösteren idiogramlar ve açıklamalar aşağıda ayrı ayrı sunulmuştur.

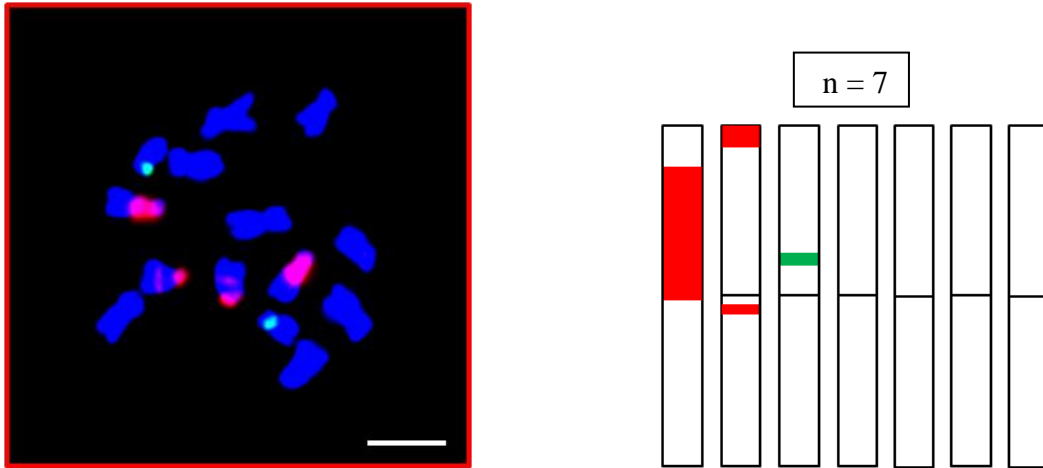
Onobrychis kromozomlarının boyutlarının küçük olması rDNA lokuslarının kesin lokalizasyonunun saptanmasını zorlaştırmakla beraber, türler için oluşturulmuş olan idiogramlar üzerinde rDNA lokuslarının lokalizasyonu yaklaşık olarak gösterilmiştir. Somatik kromozomlar boyunca 5S rDNA lokuslarına ait sinyaller yeşil, 35S rDNA lokuslarına ait sinyaller kırmızı renkte görülmektedir. Şekiller üzerindeki ölçek 5µm dir.

Türlerin kök uçları kullanılarak kromozom morfolojisi ve dağılımı iyi olan çok sayıda hücreye sahip preparatlar hazırlamak mümkün olmuştur. Preparatlar üzerinde FISH protokolü başarılı bir şekilde uygulanmış ve kolayca görülebilecek büyüklük ve yoğunlukta sinyaller elde edilmiştir. Bu nedenle sinyallerin sayısı ve desenleri net bir şekilde analiz edilebilmiştir.

4.3.1. *O. pallasi* (W621877)

Çalışmamızda *O. pallasi* türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısına ve ortalama 1,47 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan W6 21877 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.23' de gösterilmiştir.

Şekil 4.23'den görüleceği üzere *O. pallasi* türünün 3 çift mitotik kromozomu toplam olarak 8 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6'sı 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2' si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftlerinden birinde telomere yakın bölge ile sentromer çevresinde olmak üzere iki tane, diğer kromozom çiftinde ise telomer ile sentromer arasında nerede ise kromozom kolunun tamamını kapsayan büyük bir sinyal olarak görülmektedir. Sentromerik sinyal diğer sinyallere nazaran oldukça küçük olmakla birlikte kolayca görülebilecek büyüklüktedir. 5S rDNA sinyalleri 1çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer aldığı belirlenmiştir. PI315440 nolu aksesyonda gerçekleştirilmiş FISH analizi sonrası aynı sonuçlar saptanmıştır.

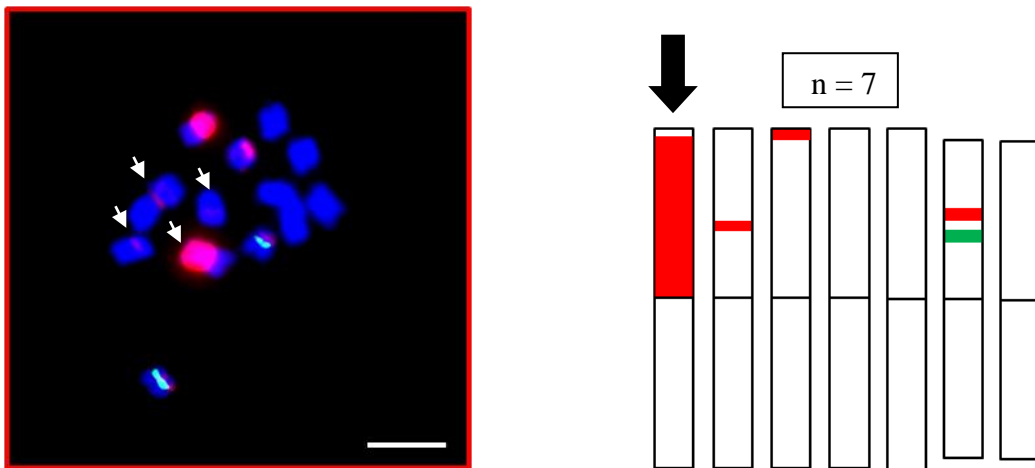


Şekil 4.23. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W621877 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. pallasi* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir

4.3.2. *O. hypargyrea* (PI383719)

O. hypargyrea türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama 1,45 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 383719 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.24' de gösterilmiştir.

Şekil 4.24'den görüleceği üzere *O. hypargyrea* türünün 4 çift mitotik kromozomu toplam olarak 10 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8'i 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2' si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftlerinden ikisinde telomere yakın bölgede iken diğer 2 kromozom çiftinde ise sentromer ile telomer arasında kalan bölgede (intercalar) yer almaktadır. Telomerik sinyallerden bir çifti nerede ise kromozom kolunun tamamını kaplayacak büyüklüktedir. 5S rDNA sinyalleri 1çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer almaktadır. 5S rDNA lokusları ile intercalar bölgede lokalize olmuş olan 35S rDNA lokusları ile aynı kromozomun aynı kolu üzerinde görülmektedir. 5S rDNA sinyallerinin nispeten daha küçük boyuta sahip kromozom çifti üzerinde yer aldığı belirlenmiştir. Büyük 35S rDNA sinyallerinin büyüklükleri eşit olmayıp eşlerden birinde diğerine göre belirgin bir şekilde daha büyük olduğu dikkati çekmektedir.

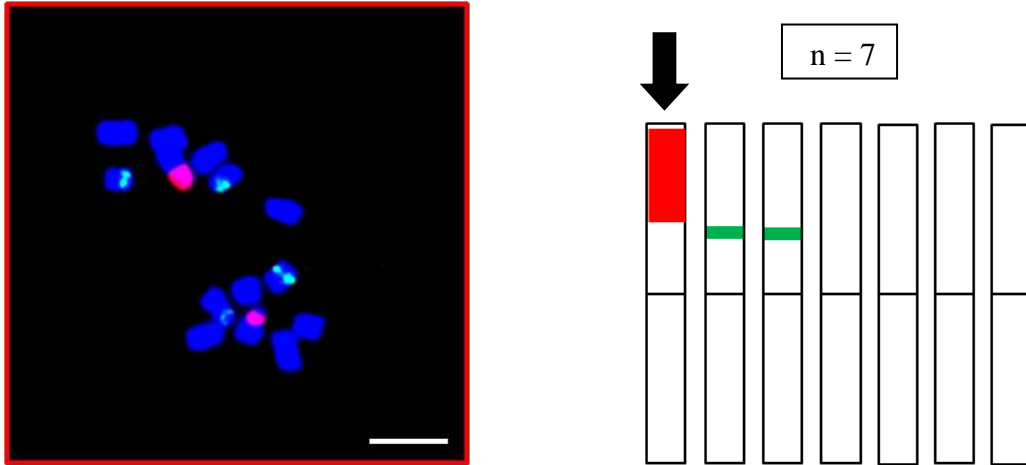


Şekil 4.24. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 383719 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. hypargyrea* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir. Siyah ok homolog kromozomdan birinin daha küçük lokusa sahip olduğunu belirtmektedir

4.3.3. *O. gracilis* (W619496)

O. gracilis türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama $1,09 \text{ pg}/2C$ çekirdek DNA içeriğine sahip olan W61946 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.25' de gösterilmiştir.

Şekil 4.25'den görüleceği üzere *O. gracilis* ürünün 3 çift mitotik kromozomu toplam olarak 6 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftinin telomer ile sentromer bölgesi arasında fakat sinyallerden bir tanesinin daha küçük olduğu ve büyük olan sinyalin telomer bölgesine doğru uzandığı tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyallerinin ise kromozomların sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu görülmektedir.

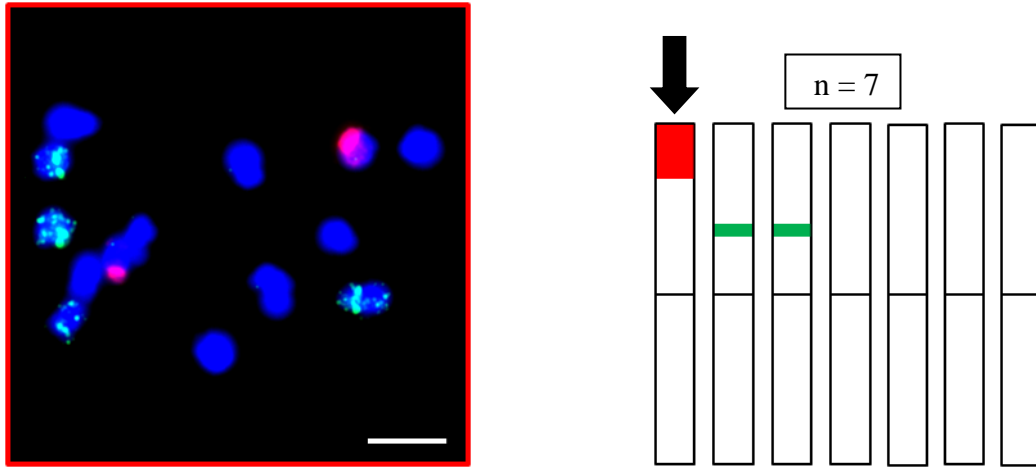


Şekil 4.25. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W619496 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. gracilis* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek $5 \mu\text{m}$ 'dir. Siyah ok homolog kromozomlardan birinin daha küçük lokusa sahip olduğunu belirtmektedir

4.3.4. *O. humilis* (PI319054)

O. humilis türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama $1,33 \text{ pg}/2C$ çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 319054 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.26' de gösterilmiştir.

Şekil 4.26'dan görüleceği üzere *O. humilis* türünün 3 çift mitotik kromozomu toplam olarak 6 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozomun telomerine yakın (subtelomerik) lokalize olduğu ve bir tanesinin daha küçük olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri 2 çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu görülmektedir.

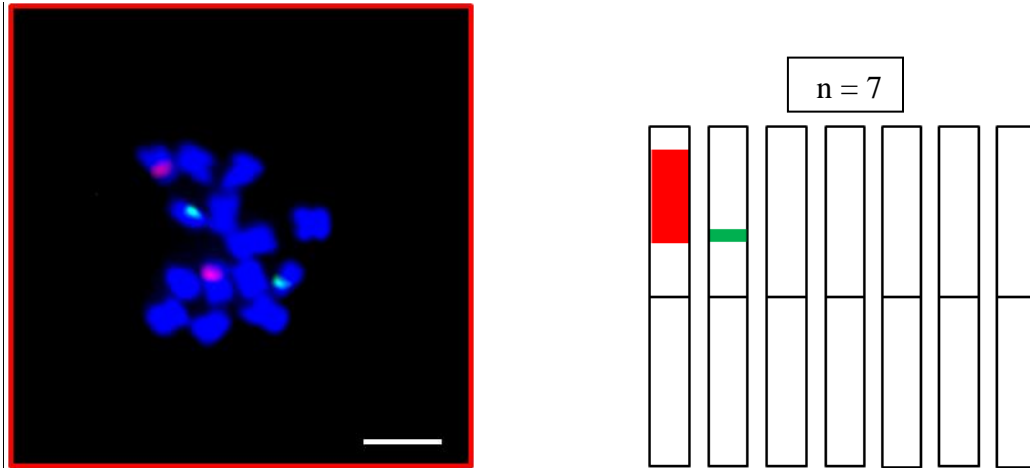


Şekil 4.26. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 319054 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. humilis* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek $5 \mu\text{m}$ 'dir. Siyah ok homolog kromozomlardan birinin daha küçük lokusa sahip olduğunu belirtmektedir

4.3.5. *O. grandis* (PI440568)

O. grandis türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama 1,26 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 440568 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.27' da gösterilmiştir.

Şekil 4.27'den görüleceği üzere *O. grandis* türünün 2 çift mitotik kromozomu toplam olarak 4 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, diğer ikisi ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. Her iki rDNA lokusu (35S rDNA+ 5S rDNA) kromozomların sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu görülmektedir.

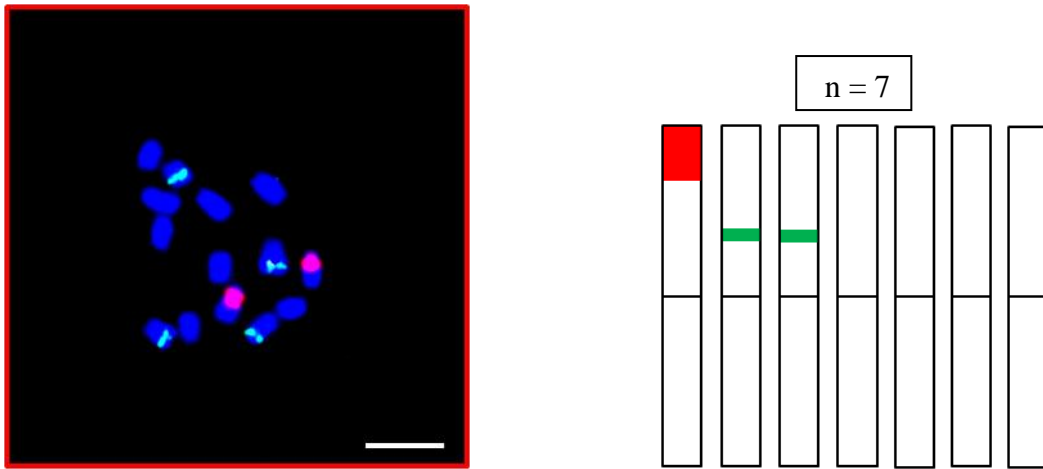


Şekil 4.27. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI440568 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. grandis* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir

4.3.6. *O. supina* (PI383721)

O. supina türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama 0,96 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 383721 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.28' de gösterilmiştir.

Şekil 4.28'den görüleceği üzere *O. supina* türünün 3 çift mitotik kromozomu toplam olarak 6 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyallerinin kromozomun telomerine yakın (subtelomerik) lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyallerinin ise her iki kromozom çiftinde de sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu saptanmıştır

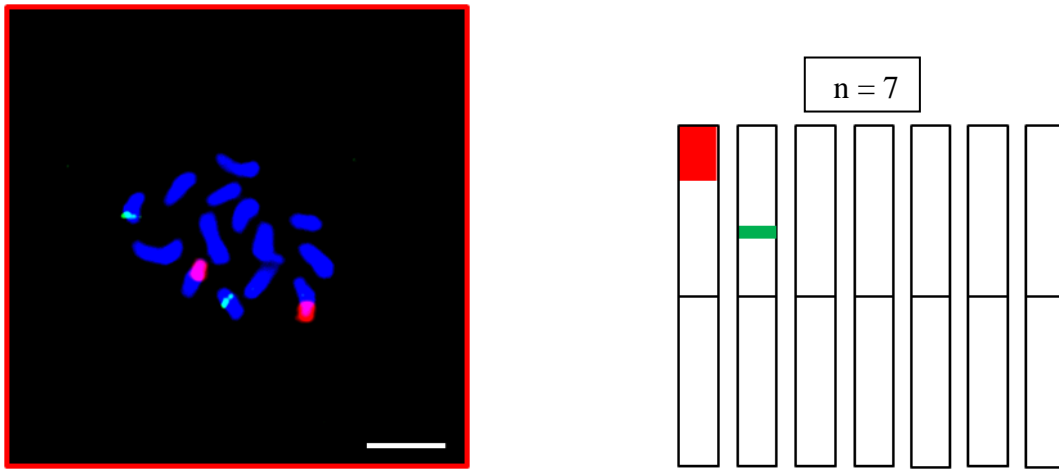


Şekil 4.28. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 383721 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. supina* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir

4.3.7. *O. caput-galli* (PI 205304)

O. caput-galli türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama $0,65 \text{ pg}/2C$ çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 205304 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.29' de gösterilmiştir.

Şekil 4.29'dan görüleceği üzere *O. caput-galli* türünün 2 çift mitotik kromozomu toplam olarak 4 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, diğer ikisi ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozomun telomerine yakın (subtelomerik) bölgelerinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri ise kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu saptanmıştır.

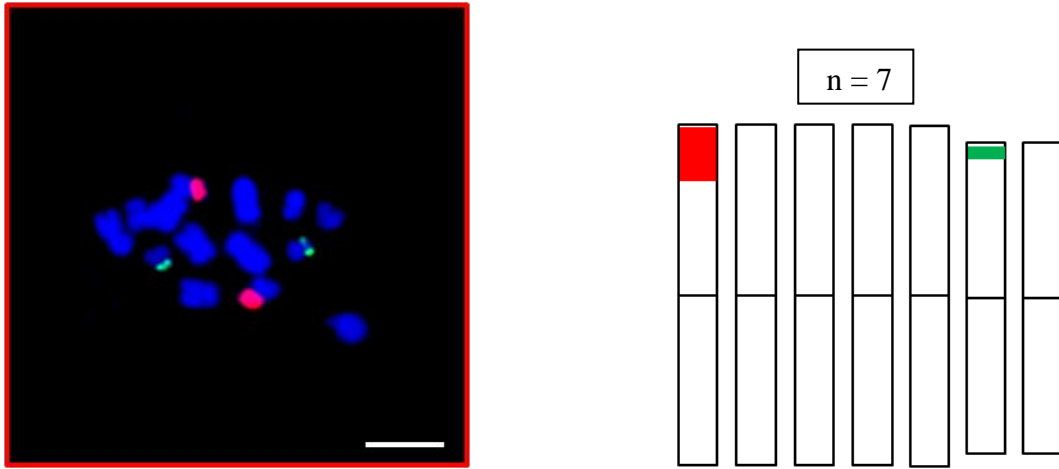


Şekil 4.29. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 205304 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. caput-galli* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek $5 \mu\text{m}$ 'dir

4.3.8. *O. ptolemaica* (PI 215344)

O. ptolemaica türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama 1,37 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 215344 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.30' da gösterilmiştir.

Şekil 4.30'dan görüleceği üzere *O. ptolemaica* türünün 2 çift mitotik kromozomu toplam olarak 4 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, diğer ikisi ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. rDNA sinyallerinin her iki tipinde telomere yakın (subtelomerik) lokalize olduğu belirlenmiştir. 5S rDNA lokuslarının nispeten daha küçük homolog kromozom çifti üzerinde lokalize olduğu gözlemlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu saptanmıştır.

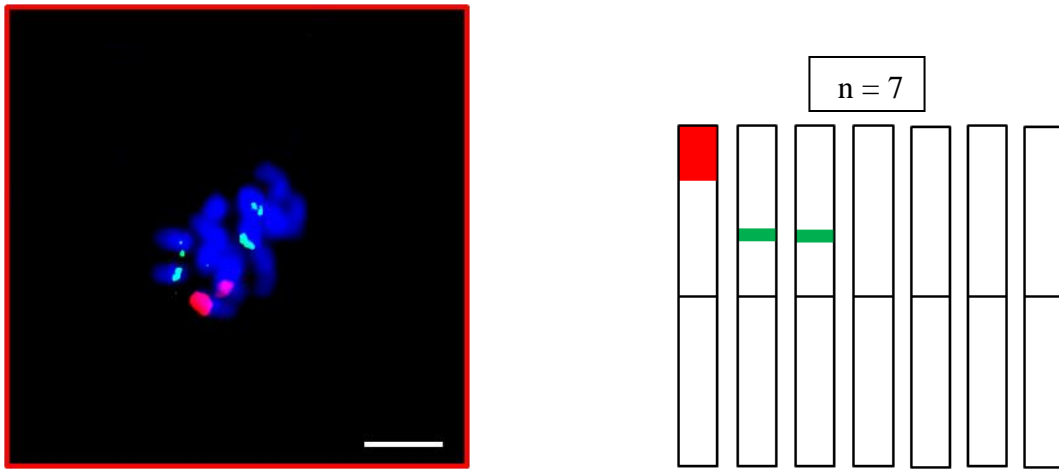


Şekil 4.30. Floresan in situ hibridizasyon analizi sonrası PI 215344 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O.ptoleimaca* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir

4.3.9. *O. stenorhiza* (PI 319056)

O. stenorhiza türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama 1,2 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 319056 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.31' de gösterilmiştir.

Şekil 4.31'den görüleceği üzere *O. stenorhiza* türünün 3 çift mitotik kromozomu toplam olarak 6 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozomun telomerine yakın (subtelomerik) lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri 2 çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu FISH sinyalleri sonucu saptanmıştır.

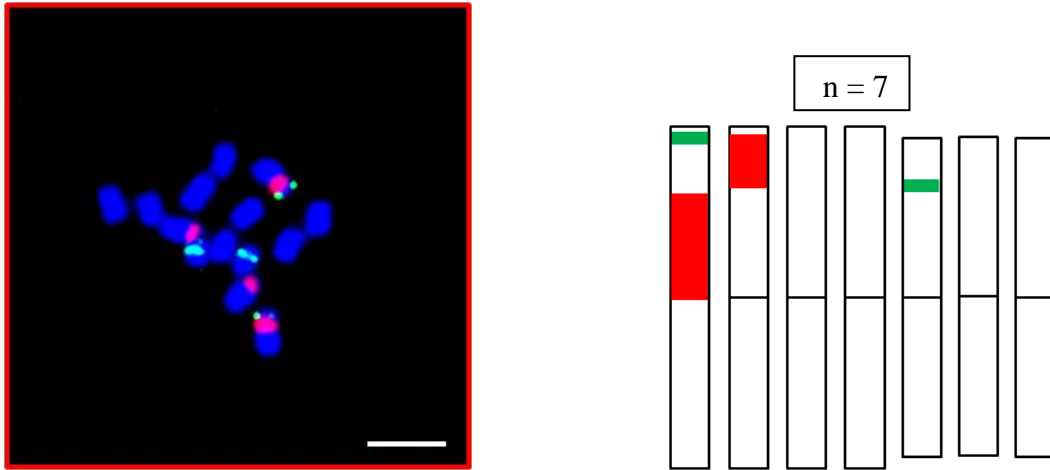


Şekil 4.31. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 319056 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O.stenorhiza* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir

4.3.10. *O. alba* subsp. *locanica* (W6 19337)

O. alba subsp. *locanica* türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama 1,15 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan W6 19337 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.32' de gösterilmiştir.

Şekil 4.32'den görüleceği üzere *O. alba* subsp. *locanica* türünün 3 çift mitotik kromozomu toplam olarak 8 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 4'ü 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyallerinin 1 çifti sentromer çevresinde, diğer çifti ise telomere yakın (subtelomerik) bölgede lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri bir çift homolog kromozomun telomere yakın bölgesinde, diğer çifti ise nispeten daha küçük homolog kromozomun sentromer ile telomer bölgesi (intercalar) arasında yer aldığı belirlenmiştir. Sentromer çevresinde lokalize olmuş olan 35S rDNA sinyali ile telomere yakın lokalize olmuş olan 5S rDNA sinyalleri aynı homolog kromozom çifti üzerinde yer aldığı gözlemlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmıştır.

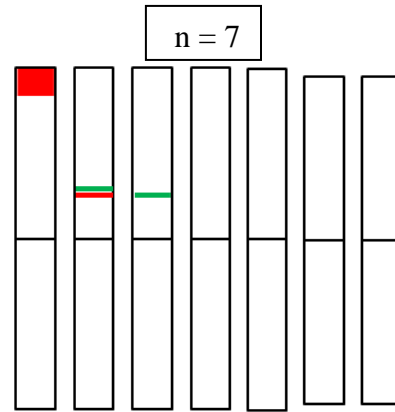
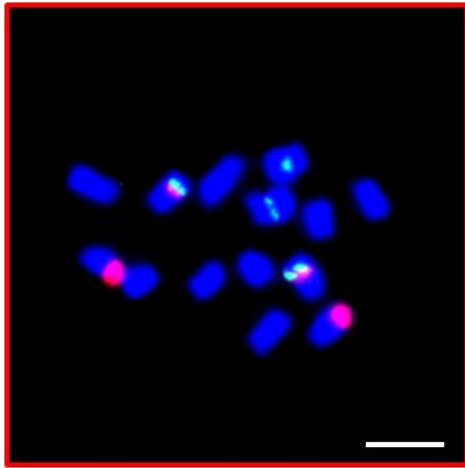


Şekil 4.32. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W6 19337 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. alba* subsp. *locanica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir

4.3.11. *O. megataphros* (PI 301107)

O. megataphros türünü temsilen $2n = 14$ kromozom sayısı ve ortalama $1,17 \text{ pg}/2C$ çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 301107 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.33' de gösterilmiştir.

Şekil 4.33'den görüleceği üzere *O. megataphros* türünün 3 çift mitotik kromozomu toplam olarak 8 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 4'ü 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyallerinin 1 çifti sentromer ile telomer arasında, diğer 1 çifti ise telomere yakın (subtelomerik) bölgede yer aldığı tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri homolog kromozomların sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar), lokalize olduğu tespit edilmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA sinyali ile telomer ile sentromer arasında lokalize olmuş olan 5S rDNA sinyalleri aynı homolog kromozom çifti üzerinde yer aldığı gözlemlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA lokuslarının diğer 35S ve 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmıştır.

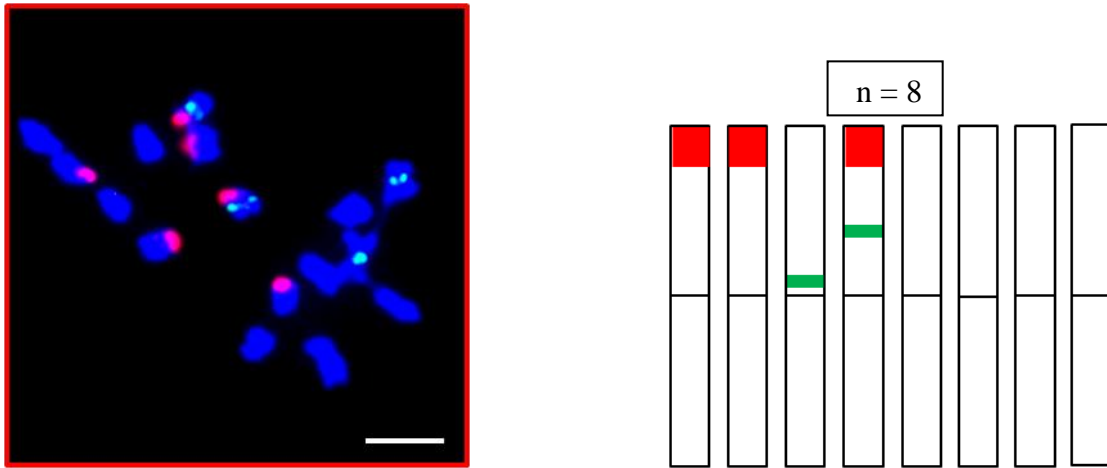


Şekil 4.33. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 301107 nolu diploid ($2n = 2x = 14$) *O. megataphros* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek $5 \mu\text{m}$ 'dir

4.3.12. *O. crista-galli* (PI 227040)

O. crista-galli türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama $0,86 \text{ pg}/2C$ çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 227040 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.34' de gösterilmiştir

Şekil 4.34'den görüleceği üzere *O. crista-galli* türünün 4 çift mitotik kromozomu toplam olarak 10 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6'sı 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyallerinin telomere yakın bölgede (subtelomerik) lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyallerinin 1 çifti sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar), diğer 1 çifti ise sentromere yakın bölgede yer aldığı belirlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA sinyali ile telomer ile sentromer arasında lokalize olmuş olan 5S rDNA sinyalleri aynı homolog kromozom çifti üzerinde yer aldığı gözlemlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu saptanmıştır.

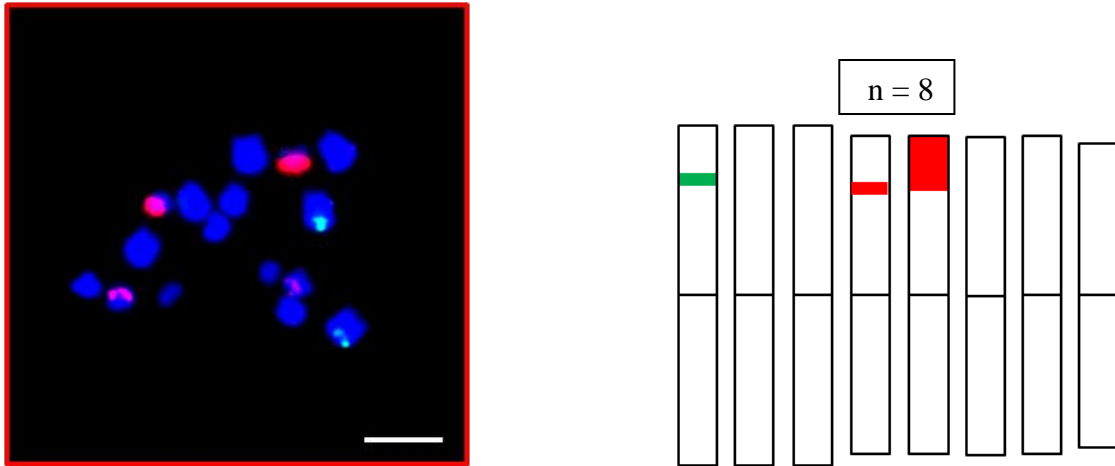


Şekil 4.34. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 227040 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.crista-galli* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek $5 \mu\text{m}$ 'dir

4.3.13. *O. gaubae* (PI 380931)

O. gaubae türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama $0,71 \text{ pg}/2C$ çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 380931 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.35' de gösterilmiştir.

Şekil 4.35'den görüleceği üzere *O. gaubae* türünün 3 çift mitotik kromozomu toplam olarak 6 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 4'ü 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2'si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftlerinde birinde telomere yakın (subtelomerik), diğer kromozom çiftinde ise telomer ile sentromer arasında kalan bölgede (intercalar) lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri 1çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının lokalize olduğu kromozomların 5S rDNA lokuslarının lokalize olduğu kromozomlara göre nispeten daha küçük olduğu gözlemlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA lokuslarının diğer 35S ve 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmıştır.

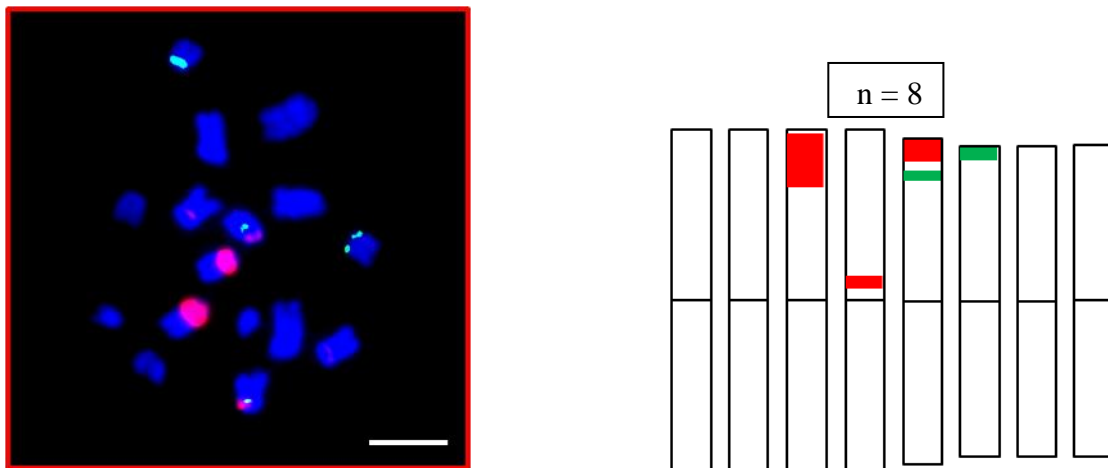


Şekil 4.35. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 380931 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.gaubae* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek $5 \mu\text{m}$ 'dir

4.3.14. *O. kachetica* (PI 314469)

O. kachetica türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama 1,26 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 314469 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.36' da gösterilmiştir.

Şekil 4.36'dan görüleceği üzere *O. kachetica* türünün 4 çift mitotik kromozomu toplam olarak 10 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6'sı 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftlerinden ikisinde telomere yakın (subtelomerik) bölgede diğer 1 kromozom çiftinde ise sentromer çevresinde yer almaktadır. 5S rDNA sinyallerinin 1 çifti sentromer ile telomer arasında kalan bölgede (intercalar), diğer 1 çifti ise telomere yakın bölgede yer aldığı belirlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 5S rDNA lokuslarını taşıyan kromozom çiftinin diğer homolog kromozomlara nispeten daha küçük olduğu saptanmıştır. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA sinyali ile telomer ile sentromer arasında lokalize olmuş olan 5S rDNA sinyalleri aynı homolog kromozom çifti üzerinde yer aldığı gözlemlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA lokuslarının diğer 35S ve 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmıştır.

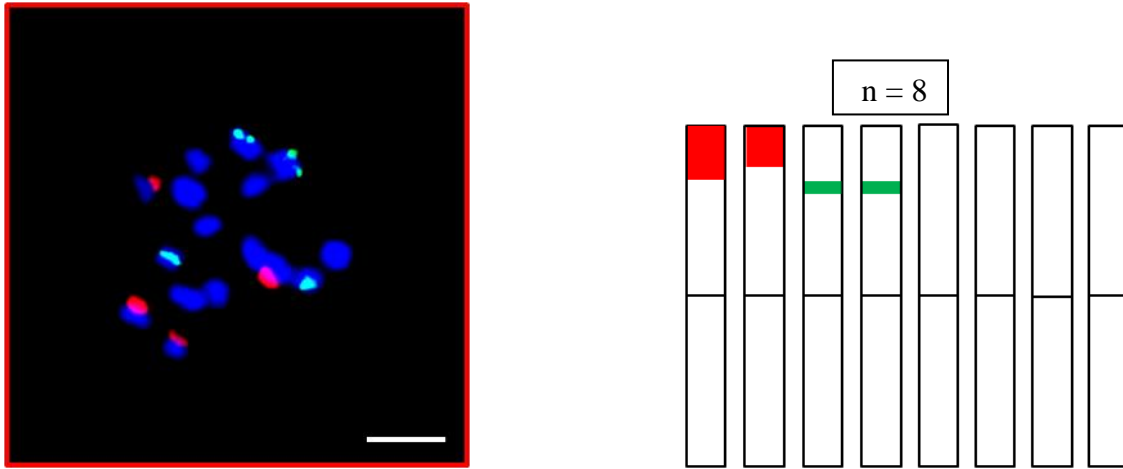


Şekil 4.36. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 314469 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.kachetica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir

4.3.15. *O. persica* (PI 380946)

O. persica türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama 1,01 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 380946 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.37' de gösterilmiştir.

Şekil 4.37'den görüleceği üzere *O. persica* türünün 4 çift mitotik kromozomu toplam olarak 8 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 4'ü 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri homolog kromozomun çiftlerinin telomerine yakın (subtelomerik) bölgede yer aldığı tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri 2 çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) lokalize olduğu belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu saptanmıştır.

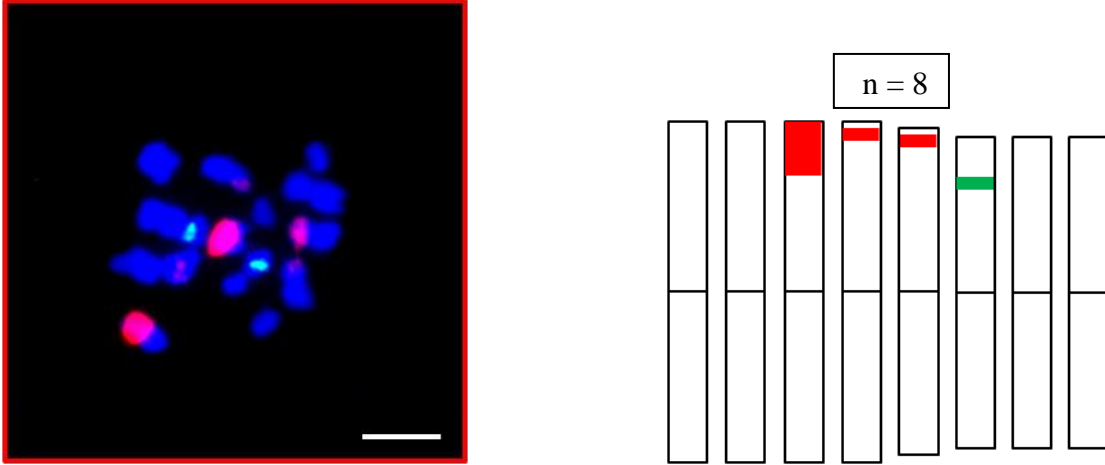


Şekil 4.37. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 380946 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.persica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir

4.3.16. *O.radiata* (W6 24111)

O. radiata türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama $1,38 \text{ pg}/2C$ çekirdek DNA içeriğine sahip olan W6 24111 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.38' de gösterilmiştir.

Şekil 4.38'den görüleceği üzere *O.radiata* türünün 4 çift mitotik kromozomu toplam olarak 8 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6'sı 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2'si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyallerinin kromozom çiftlerinin telomerine yakın (subtelomerik) bölgesinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri nispeten daha küçük olan homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer aldığı belirlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA lokuslarının diğer 35S ve 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmıştır.

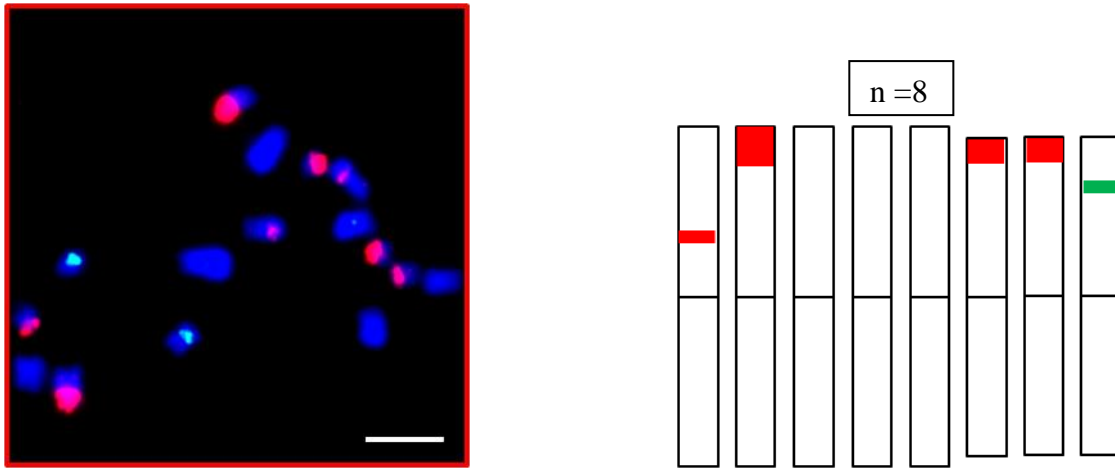


Şekil 4.38. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W624111 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.radiata* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek $5 \mu\text{m}$ 'dir

4.3.17. *michauxii* (PI380945)

O. michauxii türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama 1,42 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 380945 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.39' de gösterilmiştir.

Şekil 4.39'den görüleceği üzere *O. michauxii* türünün 5 çift mitotik kromozomu toplam olarak 10 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8'i 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2'si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftlerinde 3 tanesinde telomere yakın (subtelomerik) iken diğer 1 kromozom çiftinde telomer ile sentromer arasında kalan bölgede (intercalar) lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri en küçük homolog kromozom çiftlerinden birinin sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde yer aldığı belirlenmiştir. Nispeten daha büyük homolog kromozomun telomere yakın bölgesinde yer alan 35S rDNA lokuslarının diğer 35S ve 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmıştır.

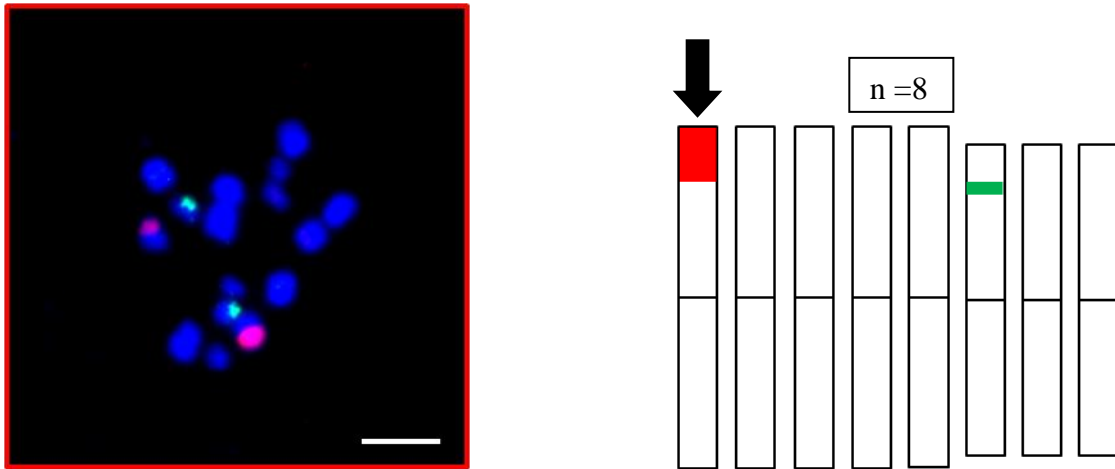


Şekil 4. 39. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 380945 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.michauxii* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir

4.3.18. *O. vassilczenkoi* (PI 378913)

O. vassilczenkoi türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama 1,38 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 378913 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.40' da gösterilmiştir.

Şekil 4.40'dan görüleceği üzere *O. vassilczenkoi* türünün 2 çift mitotik kromozomu toplam olarak 4 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2'si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftinin telomer ile sentromer bölgesi arasında (intercalar) fakat sinyallerden bir tanesinin daha küçük olduğu tespit edilmiştir 5S rDNA sinyallerinin ise nispeten daha küçük kromozom çiftinin sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu saptanmıştır

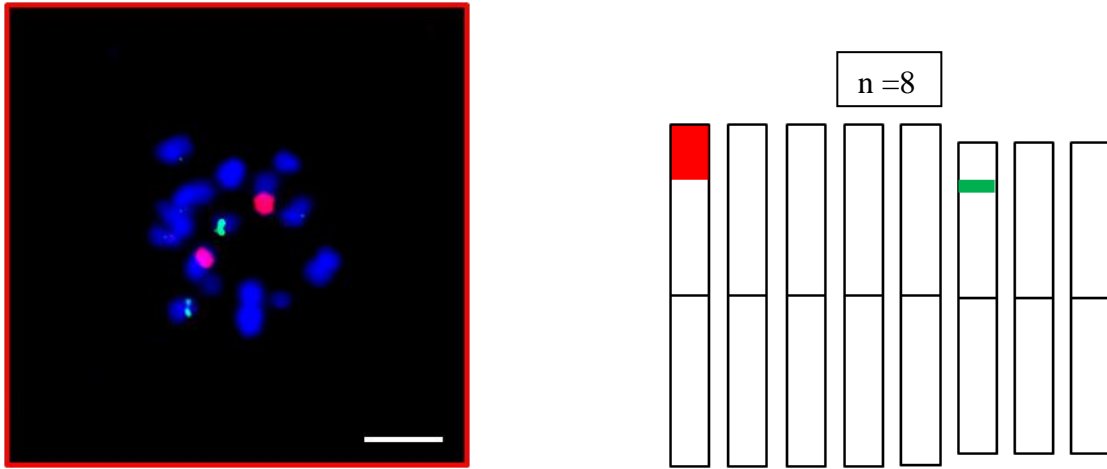


Şekil 4. 40. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 378913 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.vassilczenkoi* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir

4.3.19. *O. sintensisii* (PI 314100)

O. sintensisii türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama 1,2 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 314100 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.41' de gösterilmiştir.

Şekil 4.41'den görüleceği üzere *O. sintensisii* türünün 2 çift mitotik kromozomu toplam olarak 4 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2'si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyallerinin kromozomun telomerine yakın (subtelomerik) lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyallerinin ise nispeten daha küçük kromozom çiftinin sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu saptanmıştır

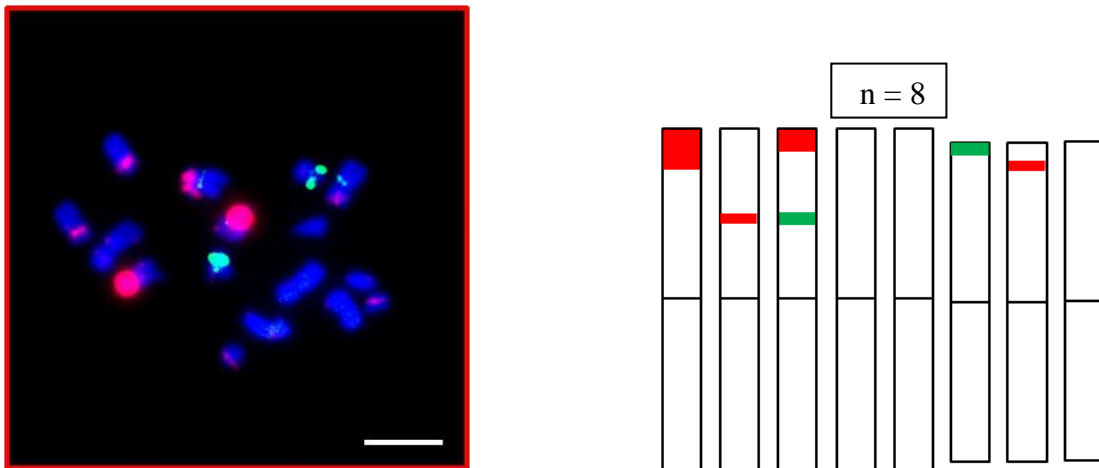


Şekil 4. 41. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 314100 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O. sintensisii* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir

4.3.20. *O. chorossanica*

O. chorossanica türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama 1,31 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 314160 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.42' de gösterilmiştir.

Şekil 4.42'den görüleceği üzere *O. chorossanica* türünün 5 çift mitotik kromozomu toplam olarak 12 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8'i 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 4'ü ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftlerinin ikisinde telomere yakın bölgede (subtelomerik), diğer 2 kromozom çiftinde ise telomer ile sentromer arasında kalan bölgede (intercalar) ve telomer bölgesine daha yakın olan sinyalleri taşıyan homolog çiftinin nispeten daha küçük olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyallerinin 1 çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde, diğer 1 çifti ise telomere yakın bölgede yer aldığı belirlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 5S rDNA lokuslarının bulunduğu kromozom çiftinin diğer homolog kromozomlara nispeten daha küçük olduğu gözlemlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA sinyali ile telomer ile sentromer arasında lokalize olmuş olan 5S rDNA sinyalinin aynı homolog kromozom çifti üzerinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA lokuslarının diğer 35S ve 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmıştır

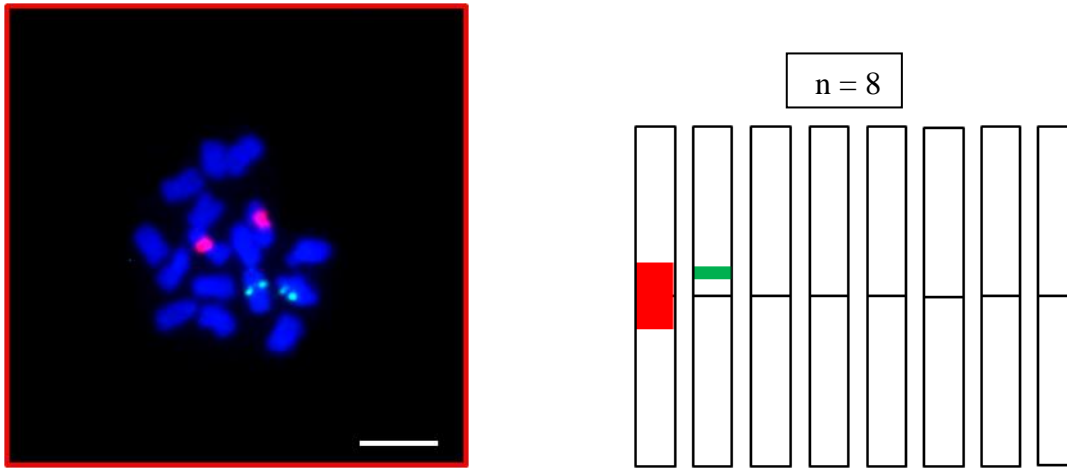


Şekil 4. 42. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 314160 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.chorossanica* aksesyon ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir

O. chorossanica türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısına sahip olan W6 24358 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.43' de gösterilmiştir.

Şekil 4.43'den görüleceği üzere *O. chorossanica* türünün 2 çift mitotik kromozomu toplam olarak 4 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 2'si 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2'si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftinin sentromer çevresinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri ile çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (sentromere yakın) yer aldığı belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından çok daha büyük olduğu saptanmıştır.

O. chorossanica türlerine ait 2 farklı aksesyon (PI314160 ve W624358) morfolojik olarak farklılık gösterdiği için FISH yöntemi ile rDNA lokuslarının somatik kromozomlar üzerinde sayı ve lokalizasyonları tespit edilmiştir.



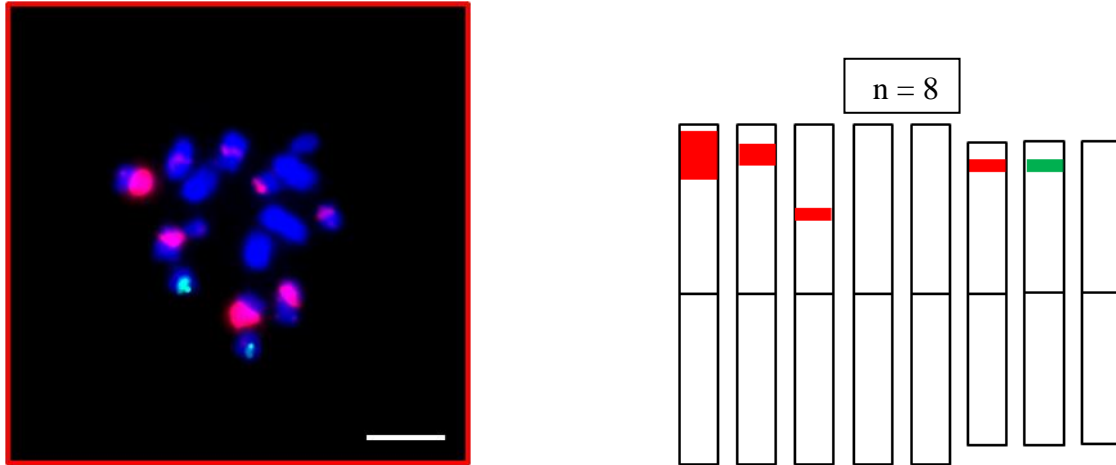
Şekil 4. 43. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W6 24358 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.chorossanica* aksesyon ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir

O. chorossanica türüne ait 2 farklı aksesyonun FISH yöntemi ile analizi sonucu aksesyonlar arası farklılıklar gözlemlenebileceği anlaşılmıştır.

4.3.21. *O. vaginalis* (PI325444)

O. vaginalis türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama 1.23 pg/2C çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 325444 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.44' de gösterilmiştir

Şekil 4.44'den görüleceği üzere *O. vaginalis* türünün 5 çift mitotik kromozomu toplam olarak 10 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 8'i 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2'si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftlerinde birinde telomere yakın (subtelomerik), diğer 3 kromozom çiftinde ise telomer ile sentromer arasında kalan bölgede (intercalar) lokalize olduğu tespit edilmiştir. 5S rDNA sinyalleri 1 çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde yer aldığı belirlenmiştir. Telomer ile sentromer arasında kalan bölgede lokalize olmuş olan 35S rDNA sinyalleri ve 5S rDNA sinyalleri nispeten daha küçük kromozom üzerinde lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA lokuslarının diğer 35S ve 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmıştır.

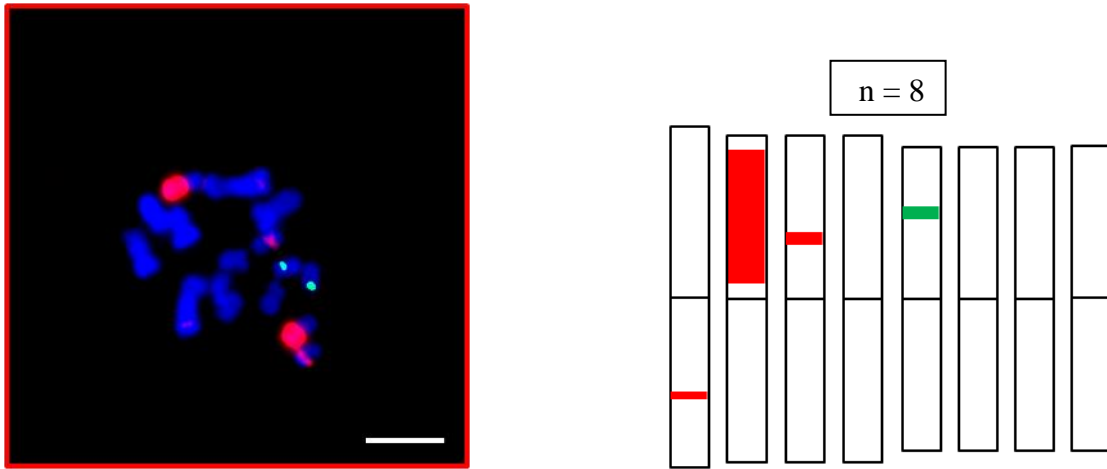


Şekil 4.44. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 325444 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.vaginalis* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 µm'dir

4.3.22. *O. iberica* (PI 219602)

O. iberica türünü temsilen $2n = 16$ kromozom sayısı ve ortalama $1.20 \text{ pg}/2C$ çekirdek DNA içeriğine sahip olan PI 219602 nolu aksesyon analiz edilmiştir. FISH sonrası türün mitotik kromozomlarının görünüşü ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.45' de gösterilmiştir.

Şekil 4.45'den görüleceği üzere *O. vaginalis* türünün 4 çift mitotik kromozomu toplam olarak 8 adet FISH sinyali taşımaktadır. FISH sinyallerinin 6'sı 35S rDNA (kırmızı) lokuslarının bulunduğu lokasyonları, 2'si ise 5S rDNA (yeşil) lokuslarının bulunduğu lokasyonları göstermektedir. 35S rDNA sinyalleri kromozom çiftlerinde birinde telomere yakın ve intercalar bölgede de kalan oldukça büyük iken diğer 2 kromozom çiftinde telomer ile sentromer arasında kalan bölgede lokalize olduğu tespit edilmiştir 5S rDNA sinyalleri 1 çift homolog kromozomun sentromer ile telomer arasında kalan bölgesinde (intercalar) lokalize olduğu belirlenmiştir. 5SrDNA lokuslarını taşıyan kromozom çiftinin nispeten daha küçük olduğu gözlemlenmiştir. Telomere yakın lokalize olmuş olan 35S rDNA lokuslarının diğer 35S ve 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmıştır.

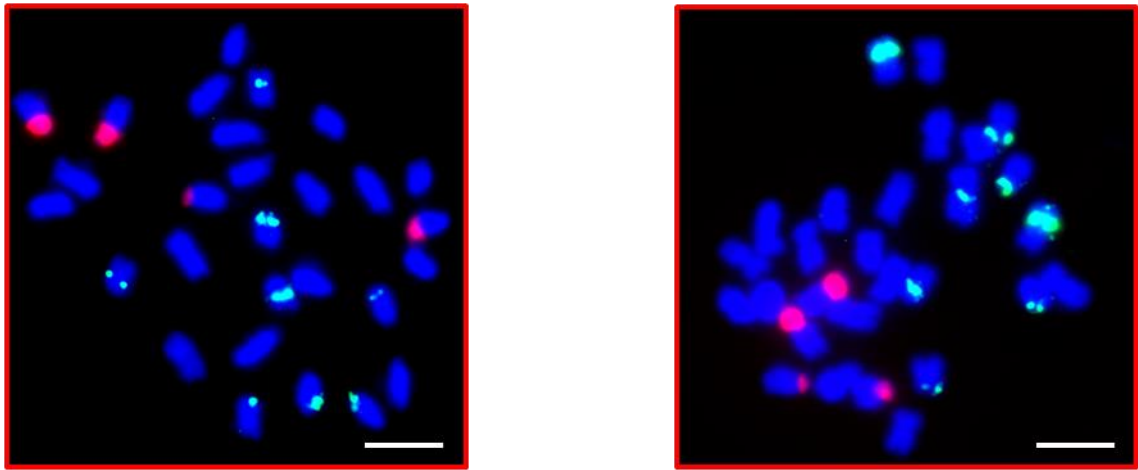


Şekil 4. 45. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 219602 nolu diploid ($2n = 2x = 16$) *O.iberica* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek $5 \mu\text{m}$ 'dir

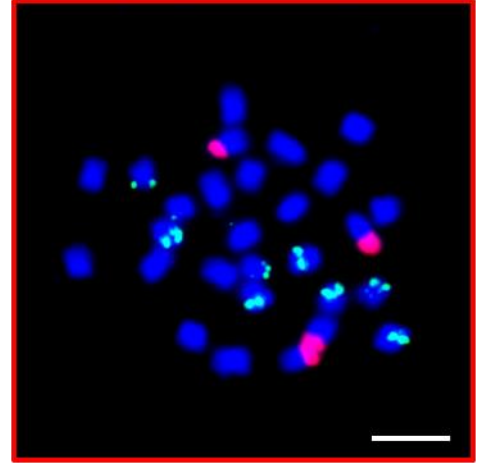
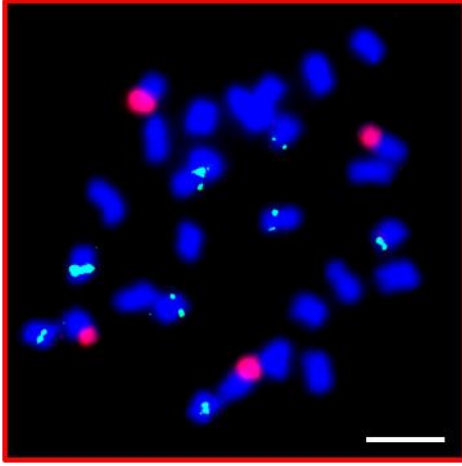
4.3.23. Poliploid Türler

Çalışmamızda poliploid türleri temsilen PI 140583 ve PI 200872 nolu *O.viciifolia*, PI 273743 nolu *O. arenaria*, PI273771 nolu *O. transcaucasica*, W6 17870 nolu *O. inermis*, W6 17800 nolu *O.cyri*, PI 642146 nolu *O. petrae*, PI 325448 nolu *O. altissima*, PI 277377 nolu *O. biebersteinii*, PI 312933 nolu *O. hajastana*, PI 516990 nolu *O. conferta* subsp.*argentea* ve PI219930 nolu *O.subacaulis* aksesyonları analiz edilmiştir. PI 219930 nolu *O.subacaulis* aksesyonu hariç diğer tüm poliploid aksesyonların mitotik kromozomlarının FISH sonrası görünüşü Şekil 4.46 ile 50 ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.51 de gösterilmiştir. Poiploid türlerin diploid türlere nazaran çok daha benzer karyotip, sinyal sayısı ve desenine sahip olması nedenleriyle poliploid türler için genel bir idiogram oluşturulmuştur.

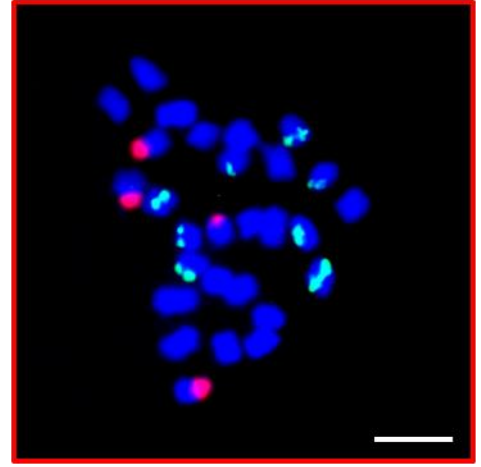
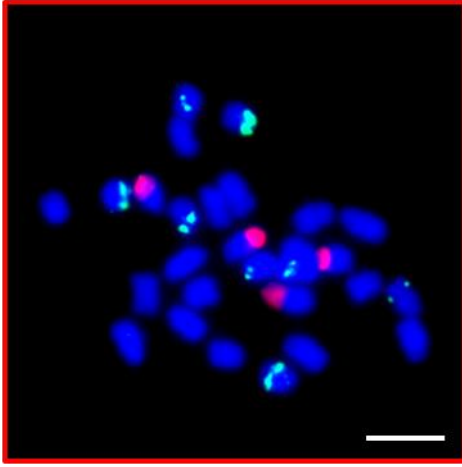
Şekillerden de görüleceği üzere *O. viciifolia*, *O. arenaria*, *O.transcaucasica*, *O. altissima*, *O.cyri*, *O.biebersteinii*, *O.inermis*, *O.petrae*, *O.hajastana* ve *O. conferta* subsp. *argentea* türlerine ait mitotik kromozomların 2 çifti 35S rDNA lokusu taşırken, farklı 4 çift kromozom 5S rDNA lokusu taşımaktadır. 35S rDNA lokusları kromozomların telomere yakın bölgelerinde bulunurken, 5S rDNA lokuslarından 2 çifti telomer ile sentromer arası (intercalar) bölgede, diğer 2 çifti ise telomere yakın bölgede bulunmaktadır.



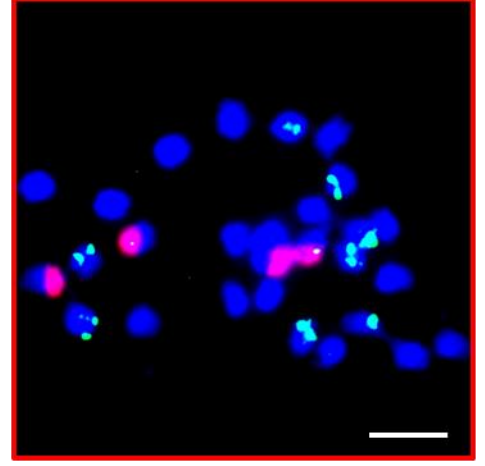
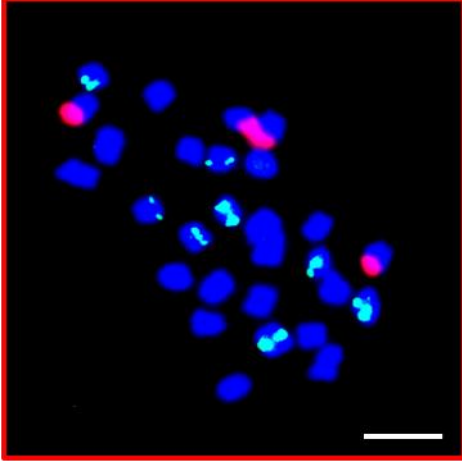
Şekil 4.46. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 140853, PI 200872 nolu ($2n = 4x = 28$) *O.viciifolia* (soldaki karyotip) ve W6 17800 nolu *O. cyri* (sağdaki karyotip) aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü verDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μ m'dir



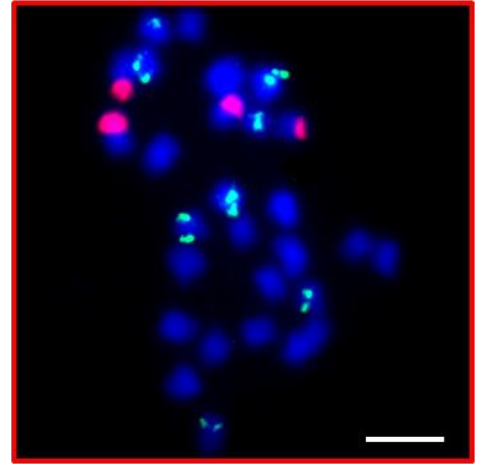
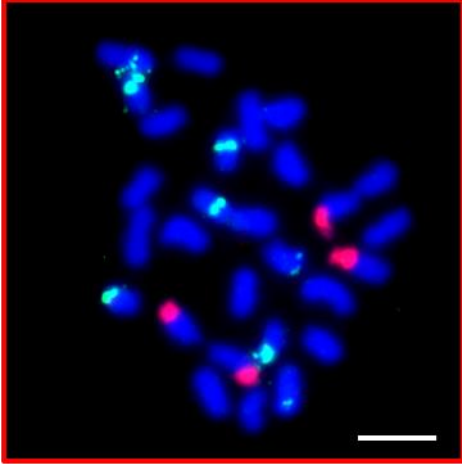
Şekil 4.47. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 273743 nolu ($2n = 4x = 28$) *O. arenaria* (soldaki karyotip) ve PI 273771 nolu *O. transcaucasica* (sağdaki karyotip) aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir



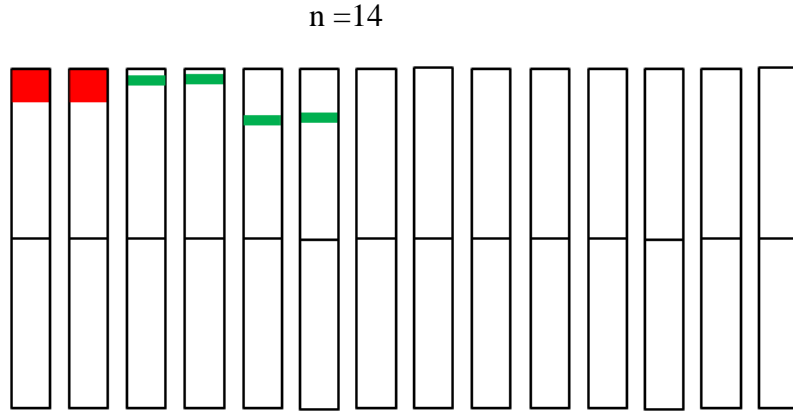
Şekil 4.48. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 325448 nolu *O. altissima* ($2n = 4x = 28$) (soldaki karyotip) ve PI 642146 nolu *O. petrae* (sağdaki karyotip) aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir



Şekil 4.49. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası W6 17870 nolu ($2n = 4x = 28$) *O.inermis* (soldaki karyotip) ve PI 227377 nolu *O.biebersteinii* (sağdaki karyotip) aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir



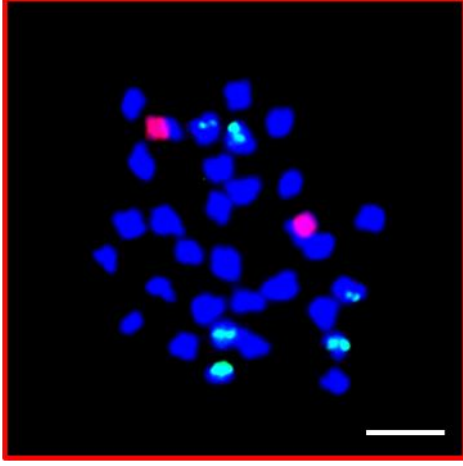
Şekil 4.50. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 312933 nolu ($2n = 4x = 28$) *O.hajastana* ve PI 516990 nolu *O. conferta subsp.argentea* aksesyonlarına ait mitotik kromozomların görünüşü ve rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir



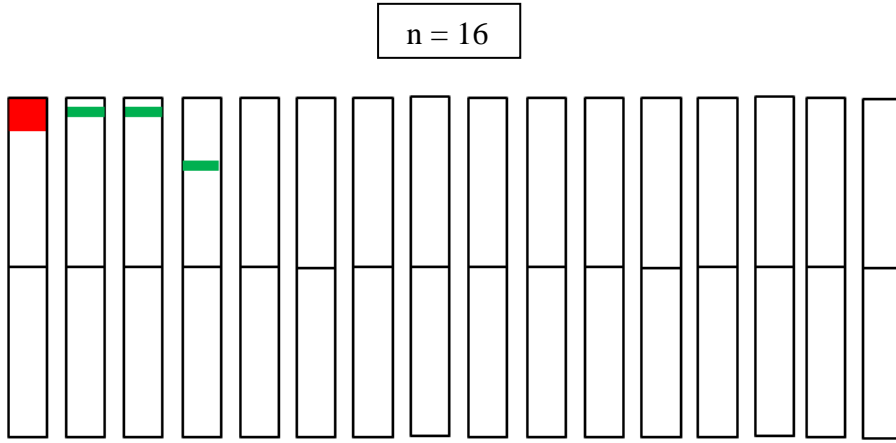
Şekil 4.51. $2n = 28$ kromozom sayısına (*O. viciifolia*, *O. arenaria*, *O.transcaucasica*, *O. inermis*, *O.cyri*, *O.petrae*, *O. altissima*, *O. biebersteinii*, *O. hajastana* ve *O.conferta subsp.argentea*) sahip poliploid türler için oluşturulmuş genel idiogram.

Çalışmamızda incelenen poliploid türlerden *O. subacaulis* türünün ise diğer tüm poliploid türlerden farklı olarak daha az sayıda rDNA lokusuna sahip olduğu saptanmıştır. *O. subacaulis* aksesyonunun mitotik kromozomlarının FISH sonrası görünüşü Şekil 4.52 ve sinyallerin lokalizasyonunu gösteren idiogram (n) Şekil 4.53 de gösterilmiştir. Şekil 4.52 ve 4.53' den görüleceği üzere *O. subacaulis* türünün sadece bir çift mitotik kromozomu 35S rDNA lokusu taşırken, 3 çift kromozomu 5S rDNA lokusu taşımaktadır. Bununla birlikte rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki lokasyonları diğer poliploid türler ile aynı olduğu gözlenmiştir. Türün sahip olduğu 2 35S rDNA lokusu bir çift kromozomun telomerik bölgelerinde bulunurken, toplam sayısı 6 olan 5S rDNA lokuslarının 2 tanesi bir çift kromozomun sentromeri ile telomer arasındaki bir bölgede ve geri kalan 4'ü ise iki çift kromozomun nispeten telomere daha yakın bölgelerinde bulunduğu tespit edilmiştir.

Poliploid türlerin tümünde 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarından daha büyük olduğu saptanmaktadır.



Şekil 4.52. Floresan *in situ* hibridizasyon analizi sonrası PI 219930 nolu ($2n = 4x = 32$) *O.subacaulis* aksesyonuna ait mitotik kromozomların görünüşü, rDNA lokuslarının kromozomlar üzerindeki fiziki lokasyonları ve idiogramı (Kırmızı sinyaller 35S, yeşil sinyaller 5S rDNA bölgelerini göstermektedir). Ölçek 5 μm 'dir



Şekil 4.53. 5S ve 35S rDNA lokuslarının *O. subacaulis* ($2n = 32$) mitotik kromozomları üzerindeki lokasyonlarını gösteren idiogram

Çalışmamızda incelenen diploid korunga türlerinin rDNA lokus sayı ve desenleri bakımından büyük bir varyasyon gösterdiği saptanmıştır. Diploidlerde 35S rDNA lokusu sayısı 2 ile 8 arasında değişirken, 5S rDNA lokusu sayısının 2 ile 4 arasında değiştiği belirlenmiştir. 35S rDNA lokuslarının çoğunlukla kromozomların terminal bölgelerine yakın (subterminal) lokalize olduğu gözlemlenirken, nadiren de olsa terminal bölge ile sentromer arası (interstitial) veya sentromer çevresinde de buldukları gözlenmiştir. 5S rDNA lokuslarının genellikle sentromer ile telomer arasında kalan kromozom bölgesinde lokalize olduğu gözlemlenirken nadiren de olsa bazı türler de kromozomların terminal bölgelerine yakın yada sentromer çevresinde de lokalize olduğu gözlenmiştir.

O. hypargyrea, *O. megataphros*, *O. alba* subsp. *laconica*, *O.kachetica* ve *O. chorossanica* türleri hariç diğer tüm türlerde 5S ve 35S rDNA lokuslarının farklı kromozomlar üzerinde lokalize olduğu belirlenmiştir. Bu beş tür için 5S ve 35S rDNA lokuslarının aynı homolog kromozom üzerinde lokalize olduğu saptanırken, kalan rDNA lokuslarının birbirinden farklı kromozomlar üzerinde lokalize olduğu gözlemlenmiştir.

Benzer şekilde rDNA varyasyonu da *Oryza*, *Brassica*, *Silene*, *Artemisia* ve *Chenopodium* gibi bitki gruplarında da belirlenmiştir (Fukui ve ark. 1994, Hasterok ve ark. 2006, Siroky ve ark. 2001, Pellice ve ark. 2013, Kolano ve ark. 2015). Bu bakımdan çalışmamızda elde edilmiş olan sonuçlar ile önceki çalışmaların sonuçları paralellik göstermektedir.

Bununla birlikte *Glycine* ve *Setaria* gibi bazı bitki gruplarında rDNA lokuslarının oldukça korunmuş yapıda oldukları saptanmıştır (Singh ve ark. 2001, Benabdelmouna ve ark. 2001).

Çalışmamızda 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarına nazaran daha fazla değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Benzer durum *Brachypodium* türlerinde de gözlenmiştir. Breda ve ark. (2012) yaptıkları çalışmalarında *Brachypodium* türlerinde 35S rDNA lokuslarının 5S rDNA lokuslarına göre daha fazla varyasyon gösterdiğini saptamışlardır. Bununla beraber diğer bazı türlerde örneğin; *Chenopodium* türlerinde 5S rDNA lokuslarında 35S rDNA lokuslarına kıyasla daha fazla varyasyon olduğu saptanmıştır (Kolano ve ark. 2015).

Birçok farklı türde rDNA lokuslarının kromozomlar üzerinde lokalizasyonuna bakıldığında 35S rDNA lokuslarının genellikle subtelomerik, 5S rDNA lokuslarının ise intercalar yada sentromer çevresinde lokalize olduğu görülmekle beraber lokalizasyonlarında farklılıklar görülmüştür. Farklı *Silene* türleri ile gerçekleştirilmiş araştırmaya bakıldığında *S.vulgaris* (Moench) Garcke, *S. latifolia* Poir., *S. pendua* L. türlerinde 35S rDNA lokuslarının subtelomerik bölgelerde lokalize olduğu, 5S rDNA lokuslarının ise *S. vulgaris* türünde intercalar bölgede lokalize olurken *S. latifolia* Poir., *S. pendua* türlerinde intercalar ve subtelocentrik bölgede lokalize oldukları saptanmıştır. Ayrıca *S. pendula* ve *S.chalcedonica* (L.) E.H.L.Krause türlerinde aynı kromozom üzerinde lokalize oldukları, *S. pendula* türü için subtelocentrik, *S.chalcedonica* türünde ise intercalar pozisyonda lokalize oldukları belirtilmiştir (Siroky ve ark. 2001). *B. pinnatum* ve *B. sylvaticum* türlerinde 35S rDNA lokuslarının çoğunlukla kromozomların terminal bölgesinde lokalize olduğu, 5S rDNA

lokuslarının ise sentromer çevresi veya telomer ile sentromer arasında kalan bölgede lokalize olduğu bildirilmiştir (Breda ve ark. 2012).

Falisticco (2019), diploid *Medicago constricta* Durieu ($2n = 14$), *M. murex* Willd., *M. polymorpha* L. ($2n = 14$), *M. praecox* DC. ($2n = 14$), *M. rigidula* (L.) All. ($2n = 14$), *M. scutellata* (L.) Mill. ($2n = 30$), *M. rugosa* Desr. ($2n = 30$) türlerinde 35S ve 5S rDNA lokuslarını FISH yöntemi ile analiz etmişlerdir. Gerçekleştirilmiş analizler sonucunda diploid türlerde ikişer adet 5S ve 35S rDNA lokusu gözlemlenirken 35S rDNA lokuslarının genellikle kromozomların terminal bölgelerinde, 5S rDNA lokuslarının ise intercalar pozisyonda lokalize olduğunu belirtmişlerdir. Poliploid *Medicago rugosa* türünde ikişer adet 5S ve 35S rDNA lokusu saptanırken, *M. scutella* türünde dörder adet 5S ve 35S rDNA lokusu saptanmıştır. Poliploid türlerde de 45S rDNA lokusları kromozomların terminal bölgesinde (SAT) yer aldığı ve 5S rDNA sinyallerinin ise proksimal bölgelerde bulunduğu belirtilmiştir. Poliploid türlerin evrimi ve rDNA lokuslarındaki varyasyon bağdaştırılmakla beraber *M. rugosa* poliploidinde gerçekleşmiş olan her iki lokusta da eliminasyon poliploidi sonrası diploidizasyondan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Gerçekleştirilmiş diğer bir çalışmada ise farklı ploidi düzeylerine sahip *Fragaria* türlerinin rDNA lokuslarının sayısı saptanmıştır. Artan ploidi düzeyine bağlı olarak rDNA lokusu artış, azalma ve sabit kalma gibi olasılıkların olduğu belirtilmiştir (Davis ve Liu 2011).

Çalışmamızda rDNA lokusu sayı ve deseni bakımından türler arası farklılıkların belirlenmiş olmasının yanı sıra *O. chorossanica* türünde tür içi varyasyonun bulunduğu da belirlenmiştir. Gözlemlenmiş olan bu farklılığın rDNA lokuslarındaki varyasyondan veya türün yanlış teşhisinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde Kolano ve ark. (2015) diploid *Chenopodium ficifolium* Sm. türüne ait aksesyonların birisinde 1 lokus 5S ve 1 lokus 35S rDNA saptamışlarken, diğer bir aksesyonda 2 lokus 5S ve 1 lokus 35S rDNA saptamışlardır. Yine bir diğer çalışmada diploid *Brachypodium sylvaticum* türü aksesyonlarından birisinde 2 tane 5S ve 2 tane 35S rDNA lokusu saptanmışken, diğer bir aksesyonda 2 tane 5S, 2-3 tane 35S rDNA lokusu saptanmıştır. Ayrıca diploid *B. pinnatum* türü aksesyonlarından birisinde 2 tane 5S ve 2 tane 35S rDNA lokusu saptanmışken, diğer bir aksesyonda 2 tane 5S, 4-6 tane 35S rDNA lokusu saptanmıştır (Breda ve ark. 2012). Görüldüğü üzere birçok farklı türde tür içi rDNA lokuslarının sayısında varyasyon gözlemlendiği diğer araştırmacılar tarafından da belirtilmiş ve sunulmuş olan tez çalışmasının sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Bununla beraber *O. hypargyrea*, *O. gracilis*, *O. vassilczenkoi* ve *O. humilis* türlerinde saptanmış olan 25S rDNA sinyallerine bakıldığında bir homolog kromozomda gözlemlenmiş olan bu sinyallerin homolog kromozomlardan birisinde normal iken homolog kromozomun diğer eşinde daha zayıf olduğu gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar yani homolog kromozomların eşlerinde lokusların büyüklük bakımından farklılık göstermesi bazı *Brachypodium* ve *Fragaria* türlerinde de gözlemlenmiştir (Breda ve ark. 2012, Davis ve Liu 2011). Yukarıda bahsedilmiş olan *Onobrychis* türlerinde gözlemlenmiş olan sonuçların kromozomların oryantasyonu veya birçok adımdan oluşmuş olan FISH prosedürü sırasında gerçekleştirilecek teknik bir problemde de kaynaklanmış olabileceği de düşünülmektedir.

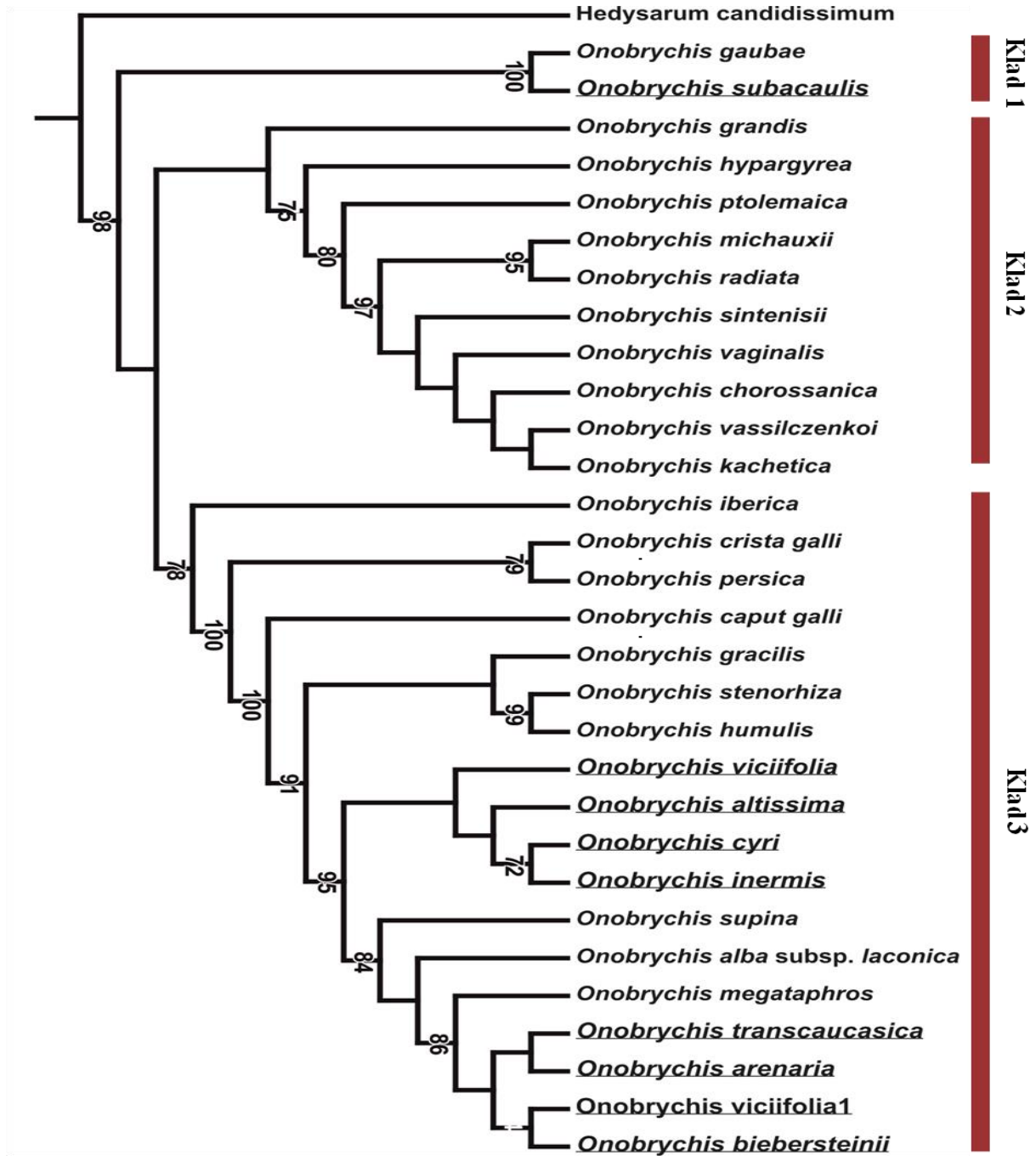
O. argyrea ve *O. kemulariae* türlerinde materyal eksikliğinde dolayı yeteri kadar FISH analizi gerçekleştirilememiştir.

Kromozomların yeniden düzenlenmesi (duplikasyon, delesyon), gen dönüşümü, eşit olmayan crossing over, transposable elementlerin transpozisyonu rDNA lokuslarında gözlemlenen varyasyonun oluşmasında etkili olabilecek mekanizmalar olduğu birçok araştırmacı tarafından açıklanmıştır (Thomas ve ark. 2001, Datson ve Murray 2006, Raskina ve ark. 2008). Bu bahsedilmiş olan mekanizmaların *Onobrychis* türlerinde gözlemlenmiş rDNA lokuslarındaki varyasyonun üzerinde etkili olabilecek mekanizmalar olabileceği düşünülmektedir, fakat kesin bir bilgi için detaylı analizler yapılması gerekmektedir.

4.4 Moleküler Filogenetik Analizler

4.4.1. Filogenetik İlişki

nrITS bölgeleri kullanılarak diploid ve poliploid türler arasındaki filogenetik ilişki incelenmiş ve yapılan analiz sonucu elde edilen filogenetik ağaç Şekil' 4.54de sunulmuştur.



Şekil 4.54. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türleri arasındaki filogenetik ilişkin belirlenmesi amacıyla nrITS bölgeleri kullanılarak yapılan analiz sonucu elde edilen filogram (ML methodu kullanıldı). Dış grup *Hedysarum candidissimum*

Filogenetik ağaç 30 farklı diploid ve poliploid aksesyon kullanılarak oluşturulmuştur. Kalan diğer türler içinde DNA izolasyonu, nrITS bölgelerinin çoğaltılması ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Fakat türlerin yüksek düzeyde tanin, fenol gibi bileşenlere sahip olması sonuçların kalitesini olumsuz yönde etkilediği için bu türlere ait ITS dizileri filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmamıştır. Şekil incelendiğinde ağaç üzerinde 3 farklı ana klad olduğu görülmektedir.

Klad 1' de yer alan *O. gaubae* ve *O. subacaulis* türlerinin *Sisyrosema* altcinsinin *Heliobrychis* seksiyonunda yer almaktadır.

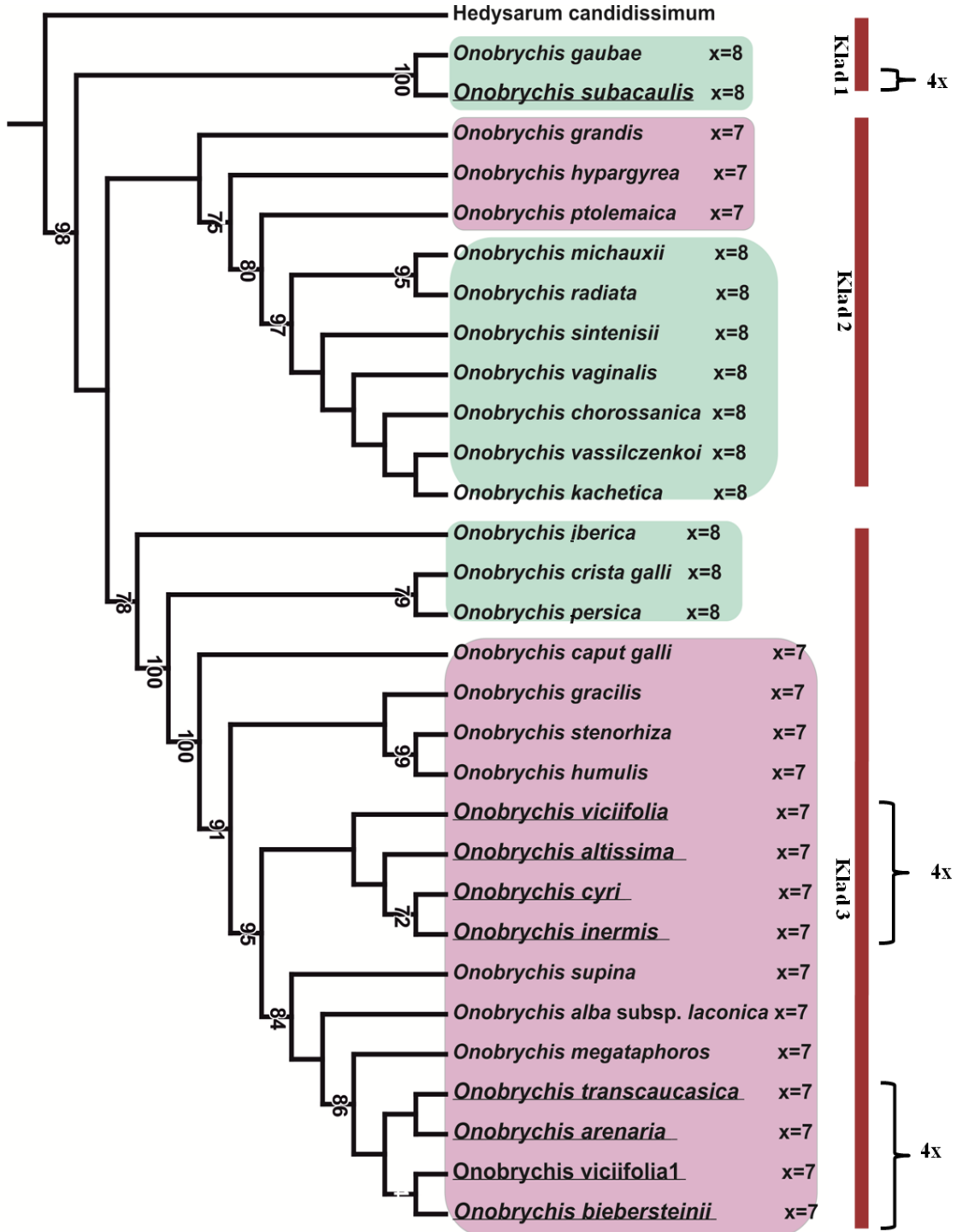
Klad 2' de yer alan tüm türler (*O. grandis*, *O. hypargyrea*, *O. ptolemaica*, *O. michauxii*, *O. radiata*, *O. sintenisii*, *O. vaginalis*, *O. chorossanica*, *O. kachetica*, *O. vassilczenkoi*) *Sisyrosema* altcinsinin üyeleri iken *O. grandis* türü hariç tüm türler *Hymenobrychis* seksiyonu içerisinde yer almaktadır. Klad 2' yi oluşturan türlerden sadece *O. grandis* *Anthyllium* seksiyonuna aittir.

Klad 3' ü oluşturan türlerin (*O. iberica*, *O. crista-galli*, *O. persica*, *O. caput-galli*, *O. gracilis*, *O. sternohiza*, *O. humilis*, *O. vicifolia*, *O. altissima*, *O. cyri*, *O. inermis*, *O. supina*, *O. alba* subsp. *laconica*, *O. megataphros*, *O. transcaucasica*, *O. arenaria*, *O. biebersteinii*) tümü *Onobrychis* altcinsinin üyesi iken *O. caput-galli* ve *O. crista-galli* hariç tüm türler *Onobrychis* seksiyonunda yer almaktadır. *O. caput-galli* ve *O. crista-galli* türleri ise *Lophobrychis* seksiyonu içerisinde yer almaktadır.

Çalışmamızda nrITS bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik analizlerin sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların bir iki küçük farklılık dışı cinsin daha önce yapılmış olan sınıflandırılmasını büyük ölçüde teyit ettiği görülmektedir

Diğer araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda bazı türler (*Chenopodium*, bazı *Poa* türleri) için nrITS bölgelerinin moleküler filogeni için oldukça faydalı olduğu belirtilmiştir (Kolana ve ark. 2015; Rodionov ve ark. 2017). Bununla beraber Fabaceae, Orchidaceae, Brassicaceae ve Apiaceae gibi bir çok farklı familyada da ITS bölgelerinin yoğun bir şekilde çalışıldığı belirtilmektedir (Poczai ve Hyvönen 2010).

Diploid ve poliploid türler arası ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç üzerine türlere ait temel kromozom sayıları eklenmiş ve poliploid türler 4x şeklinde gösterilmiştir (Şekil 4.55).

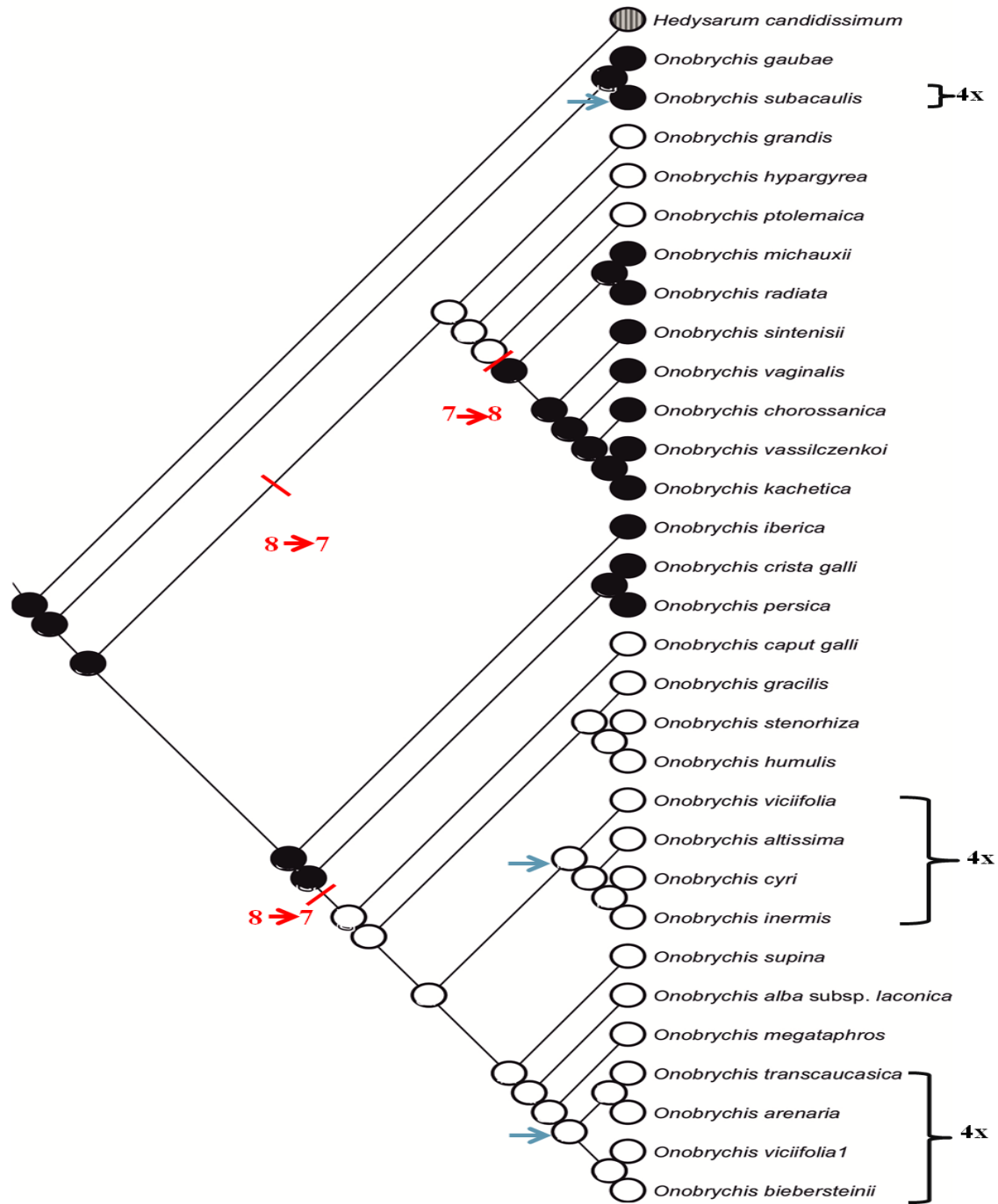


Şekil 4.55. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türleri arasındaki filogenetik ilişkiyi (nrITS) gösteren ağaç üzerinde türlere ait temel kromozom sayılarının ve ploidi düzeylerinin belirtilmesi. Poliploidler 4X şeklinde gösterilmiştir

Poliploid türlerin *O. subacaulis* hariç 3. kladda yer aldığı, *O. subacaulis* türünün ise 1.kladda yer aldığı saptanmıştır. Diploid türlerin 3 farklı klad üzerinde bulunduğu gözlemlenmiş ve 2 farklı temel kromozom sayısına sahip diploid türlerde filogenetik ağaç üzerinde her hangi bir ayırım saptanmamıştır. Türlerin temel kromozom sayısı ile filogenetik ağaçları arasında her hangi bir korelasyon belirlenmemiştir. Bundan dolayı *Onobrychis* cinsinin oldukça kompleks bir genom yapısına sahip olduğu düşünülmektedir.

4.4.2. Temel Kromozom Sayısının Evrimi

Çalışmamızda nrITS dizileri kullanılarak elde edilmiş olan filogenetik ağaç üzerinde türlere ait temel kromozom sayıları kullanılarak diploid ve poliploidlerde temel kromozom sayısının evrimi incelenmiştir.



Şekil 4.56. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türlerinin temel kromozom sayılarının filogenetik filogram kullanılarak MP yöntemi ile analizi. Mavi ok poliploidizasyonu göstermektedir. Siyah küreler x=8, beyaz küreler x=7 göstermektedir

Çalışmamızda yapmış olduğumuz maximum parsinomy analizlerine göre (Şekil 4.56.) *Onobrychis* cinsinde aneşör temel kromozom sayısının $x = 8$ olduğu saptanmıştır. Temel kromozom sayısının 1. kladda değişmeden $x = 8$ olarak kalırken, 2. kladda temel kromozom sayısında 8'den 7'ye azalma ve 7'den 8'e artma, 3. kladda ise bazı türler için $x = 7$ ve diğer türlerde 8'den 7'ye azalma olduğu saptanmıştır. Filogenetik ağaç üzerinde 3 farklı bölgede poliploidizasyon (mavi ok ile gösterilmektedir) saptanmıştır. Elde edilmiş olan sonuçlar Mesquite programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı analizler maximum likelihood ile de gerçekleştirildiğinde evrimsel süreçte gerçekleşebilecek senaryolar (türleşme, kromozomal düzenlenmeler vb) açısından ufak değişiklikler olmakla beraber benzer sonuçlar elde edilmiş ve ekler bölümünde (Ek 5) paylaşılmıştır. Aynı analizler ChromEvol. programında da gerçekleştirilmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. ChromEvol. sonrası elde edilmiş olan veriler ekler bölümünde (Ek 6) gösterilmiştir.

Birçok bitki cinsinde evrimsel süreç içerisinde kromozom sayısında artış ve azalmalar değişik araştırmacılar tarafından saptanmıştır. Kromozom sayısının değişmesinde etkili olan en önemli mekanizmalardan birisinin poliploidi (kapalı tohumlu bitkilerin yaklaşık %70'inde gerçekleşmiş) olduğu bilinmektedir. Dysploidi (temel kromozom sayısında artış ve azalmalar) ve aneuploidi (bir veya birkaç kromozomun kaybolması) kromozom sayısının değişmesinde etkili olan diğer mekanizmalardandır. Bununla beraber mixoploidi ve B kromozomlarının kromozom sayısında varvasyona sebep olduğu belirtilmiştir. Kromozom sayısında meydana gelen bu değişimler genom boyutunda etkili olmakla beraber, genom boyutu, kromozom sayısının değişimi, filogenetik analizler ile morfoloji ve ekolojik özelliklerin birlikte değerlendirilmesi evrimsel süreçlerin anlaşılmasında çok etkili olduğu belirtilmiştir (Valles ve ark. 2012).

Turpgiller (*Brassicaceae*) familyasında kromozom sayısının $n = 2$ 'den $n = 120$ 'e kadar değiştiği belirtmektedir. *Arabidopsis* cinsi içerisinde temel kromozom sayısının $x = 5, 6, 7$, ve 8 olarak varyasyon gösterdiği (*A. thaliana* (L.) Heynh. $n = 5$; *A. lyrata* $n = 7, 8$) ayrıca *Medicago* türlerinde de $x = 8$ 'den $x = 7$ 'e temel kromozom sayısından azalma (dysploidy) olduğu ve bu sebeple $2n = 14$ kromozom sayısına sahip türlerin $2n = 16$ kromozom sayısına sahip progenitörden geldiği belirtilmiştir (Lysak ve ark., 2006, Falistocco 2019). *M. lesinsii* ve *M. murex* Willd türlerinde pakiten kromozomlarının karşılaştırmalı analizleri sonucunda *M. lesinsi türünde* ($2n = 16$), translokasyon ile büyük bir kromozom oluşması ve sentromerin kaybı sonucunda $2n = 14$ kromozom sayısına sahip *M. murex* türediği belirtilmiştir (Lesins ve ark. 1970, Falistocco 2019). Lysak ve Schubert 2013, Roberstonian translokasyonunun

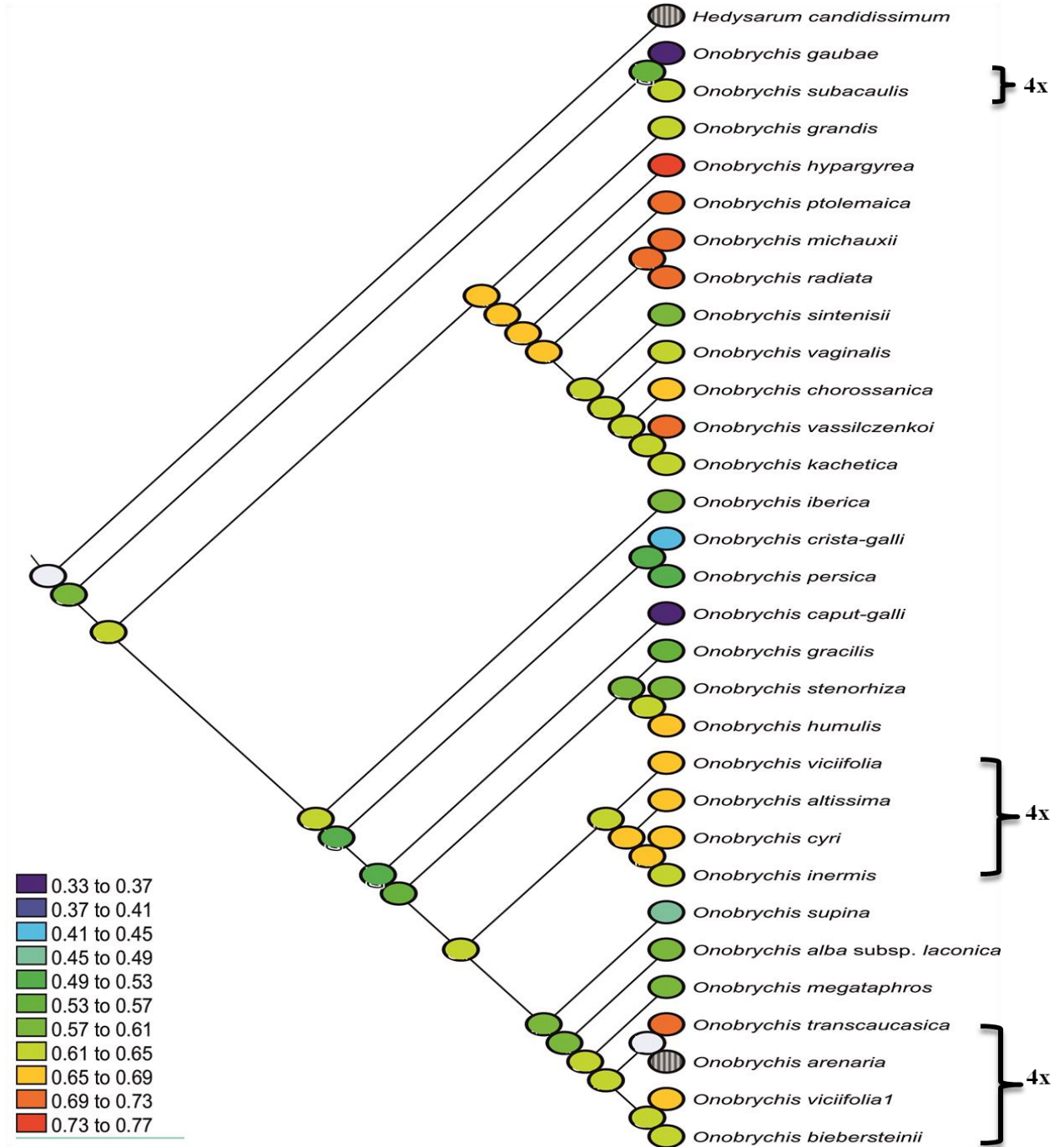
azalan (descending) dysploidinin yani kromozom sayısında azalmanın gerçekleşmesinde etkili olabilecek mekanizmalardan biri olduğunu belirtmişlerdir. Bununla beraber genomik data lar çerçevesinde, nested kromozom füzyonunun çim tülerinde descending dysploidinin gerçekleşmesinde öne çıkan mekanizmalardan biri olabileceği önerilmiştir (Luo ve ark., 2009, Murat ve ark. 2010). Diğer araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda *Artemisia* türlerinde azalan dsyploidy gerçekleştiği temel kromozom sayısının çoğunlukla $x = 7$ olduğu, fakat sentrik veya Roberstonian füzyonu sonrası kromozom sayısının $2n = 18$ 'den $2n = 16$ 'ya değiştiği, yani temel kromozom sayısının $x = 9$ 'dan $x = 8$ 'e azaldığı belirtilmiştir (Xirau ve Siljak Yakovlev 1997).

Bazı *Allium* ($x = 7 - 9$) türlerinde artan (ascending) dysploidii kaynaklı kromozom sayısında artma olabileceği belirtilmiştir (Levan ve ark. 1932). Lysak ve Schubert (2013), sentrik füzyonunun artan dysploidinin oluşmasında etkili olabileceğini belirtmişler ve bitkilerde de rastlandığını açıklamışlardır.

Inersiyon, delesyon, duplikasyon gibi kromozomal yapı değişikliklerinin kromozom boyutu ve morfolojisini etkileyerek karyotipik değişimlere sebep olduğu düşünülürken, sentrik füzyon ve farklı tipte translokasyonların kromozom sayısında artma ve azalmalara sebep olduğu bilinmektedir (Lysak ve Schubert 2013). Bu çalışmada azalan ve artan dysploidinin *Onobrychis* cinsinde temel kromozom sayısının değişmesinde etkili olabilecek mekanizmalar olduğu düşünülmektedir.

4.4.3. Çekirdek DNA içeriğindeki varyasyon

nrITS dizileri kullanılarak elde edilmiş olan filogenetik ağaç üzerinde *Onobrychis* türlerine ait elde edilmiş 1Cx çekirdek DNA içerikleri haritalanarak diploid ve poliploid türlerde çekirdek DNA içeriğindeki değişimi incelenmiştir.



Şekil 4.57. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türlerine ait 1Cx çekirdek DNA içeriklerinin filogenetik filogram kullanılarak MP methodu ile analizi

Çekirdek DNA içeriklerinin analizi continuous karakter (örneğin; 1,21, 5,68 vb. devam eden datalar) ve parsinomy methodu kullanılarak Mesquite programında gerçekleştirildi.

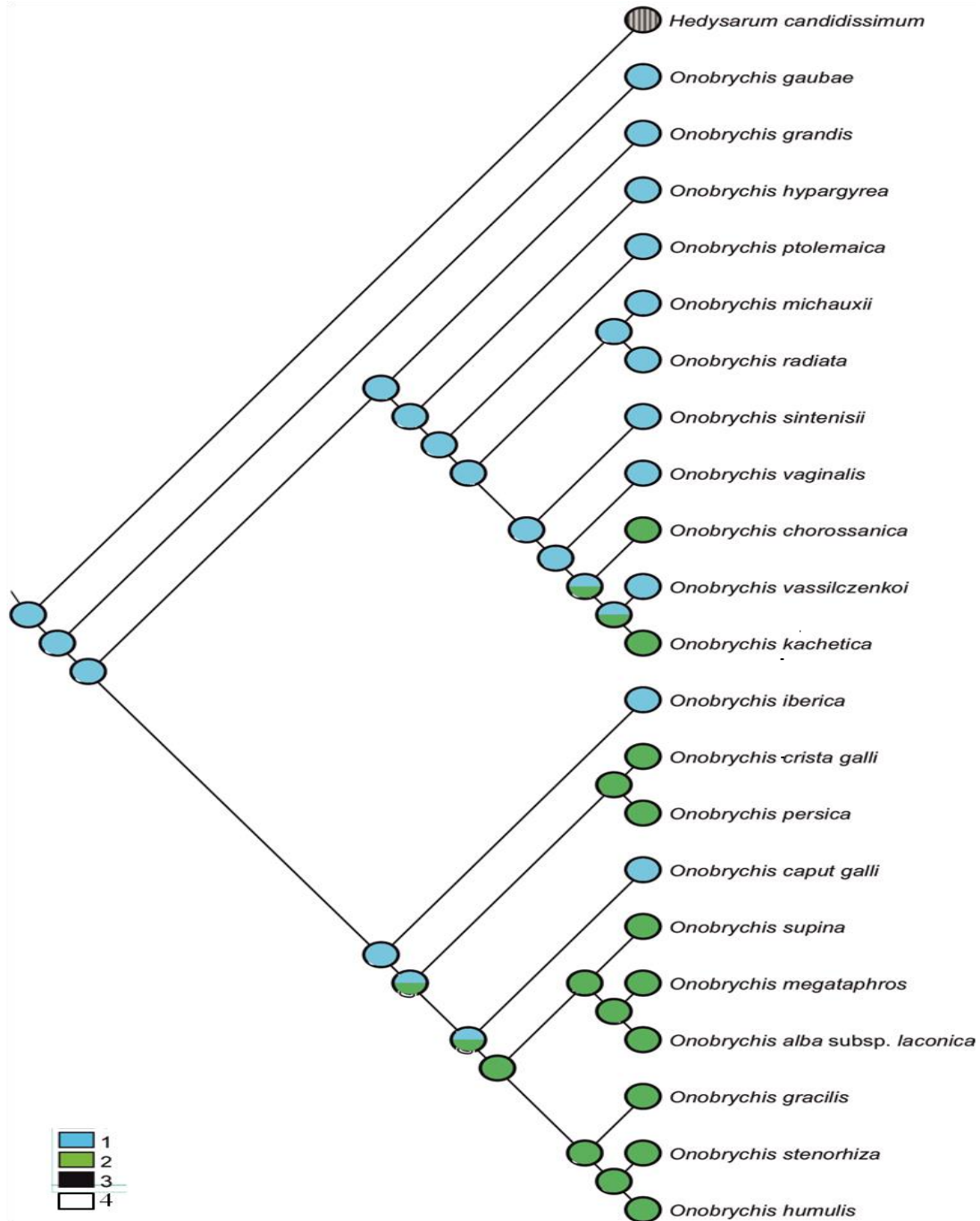
Continuous karakter kullanıldığı için filogenetik ağaç üzerinde gösterilen çekirdek DNA içerikleri her tür için belli bir aralık içerisinde yaklaşık olarak belirtilmiştir. Analizlerde kullanılmış olan *Onorbychis* türleri diploid ve poliploid türlerden oluştuğu için daha hassas sonuçlar elde edilebilmesi açısından 1Cx çekirdek DNA içerikleri kullanılmıştır.

Aynı ve farklı klad içerisinde yer alan diploid türlerin çekirdek DNA içeriklerinde artış ve azalışlar olduğu saptanmıştır. Türler arasında her hangi bir gruplaşma olmadığı, her türün birbirinden bağımsız ve gruplaşma olmadan çekirdek DNA içeriğine sahip olduğu saptanmıştır.

Elde edilmiş olan filogenetik ağaç ile çekirdek DNA içerikleri arasında her hangi bir korelasyon saptanmamıştır.

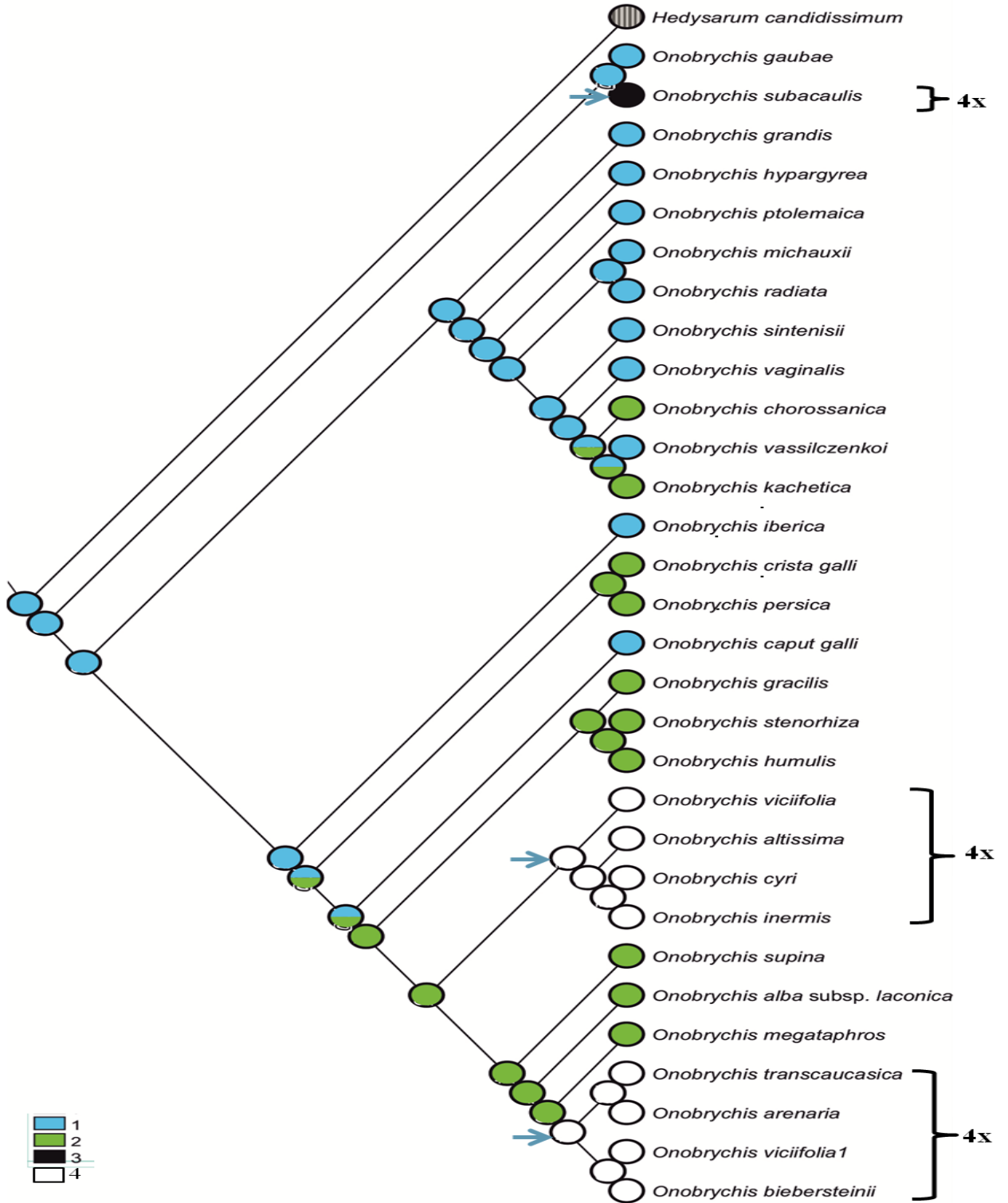
4.4.4. 5S rDNA lokuslarındaki varyasyon

nrITS dizileri kullanılarak elde edilmiş olan filogenetik ağaç üzerinde diploid türlere ait 5S rDNA lokuslarının sayısı haritalararak rDNA lokuslarının evrimi incelenmiştir (Şekil 4.58). Mavi işaretler 1, yeşil işaretler 2 çift homolog lokusu temsil etmektedir. İlk kladdaki türler çoğunlukla 1 çift homolog 5S rDNA lokusuna sahipken, ikinci kladda yer alan türler çoğunlukla 2 çift homolog 5S rDNA lokusuna sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.58. Diploid *Onobrychis* türlerinde 5S rDNA homolog lokus sayılarının filogram kullanılarak MP methodu ile analizi

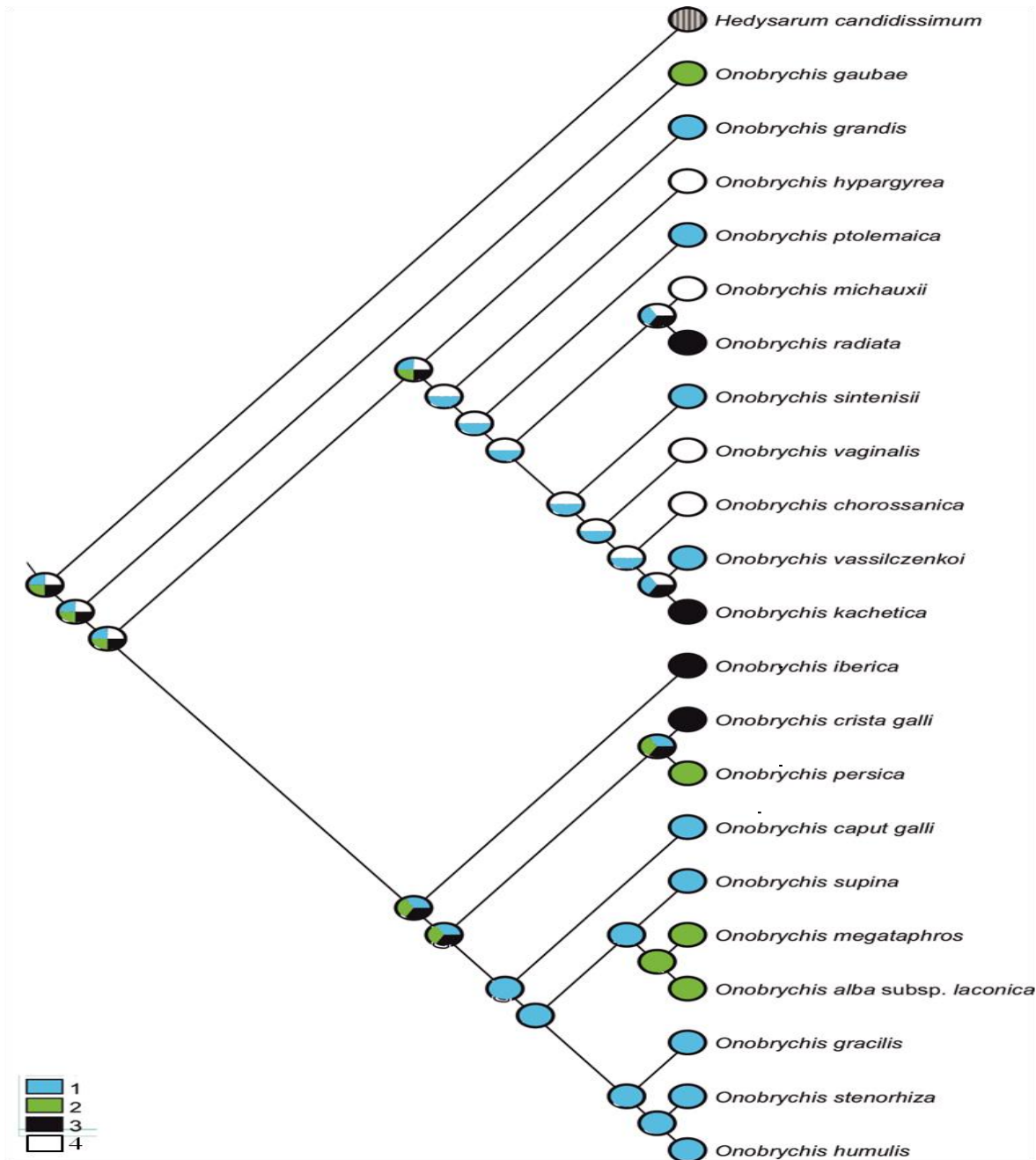
nrITS dizileri kullanılarak elde edilmiş olan filogenetik ağaç üzerinde diploid ve poliploid türlere ait 5S rDNA lokusları haritalanarak rDNA lokuslarındaki değişim incelenmiştir (Şekil 4.59.). Ayrıca 1 çift homolog 5S rDNA lokusunun tüm türler için aneştör olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.59. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türlerinde 5S rDNA homolog lokus sayılarının filogram kullanılarak MP methodu ile analizi. Mavi oklar poliploidizasyonu gösterir.

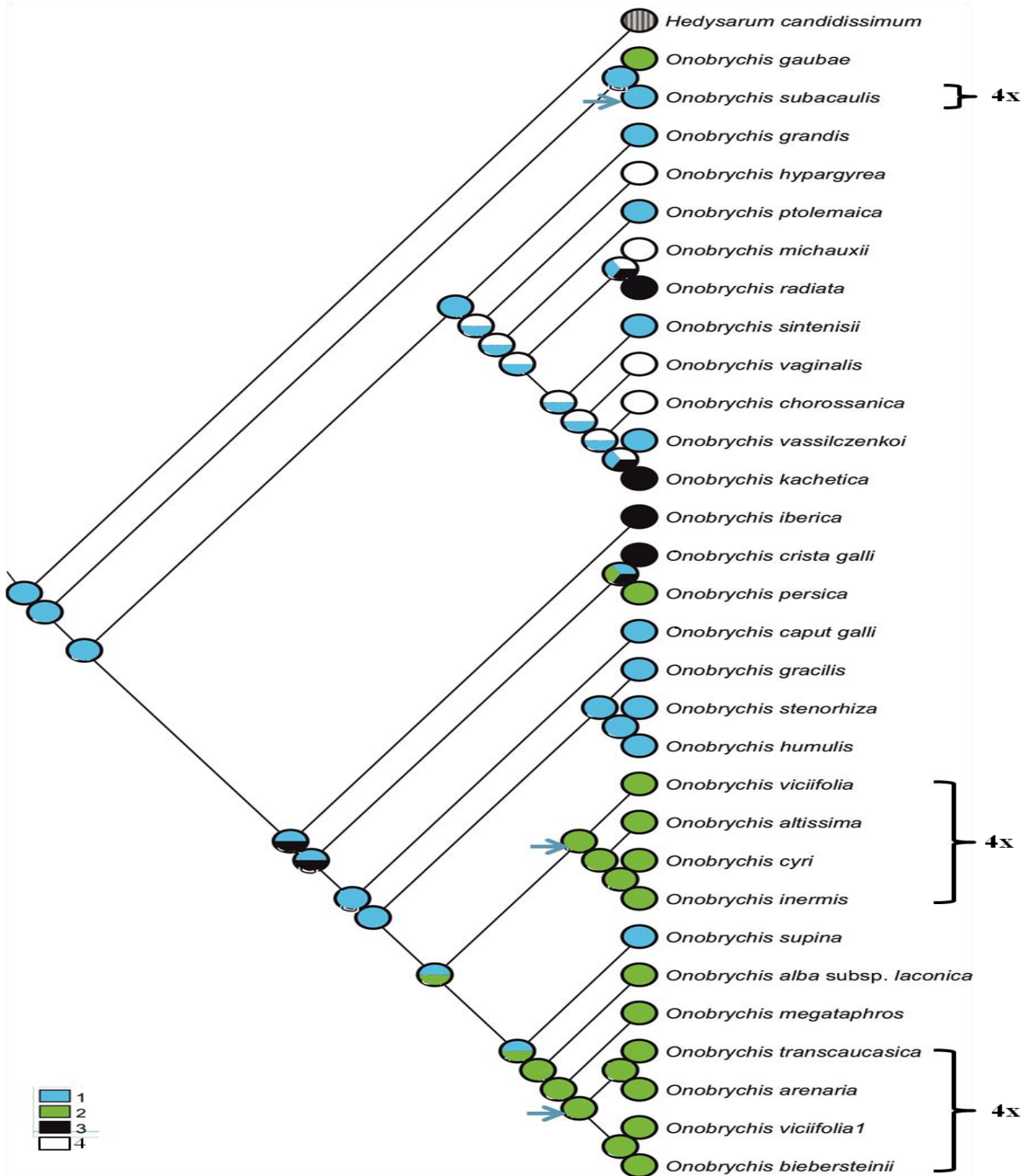
4.4.5. 35S rDNA lokuslarındaki varyasyon

nrITS dizileri kullanılarak elde edilmiş olan filogenetik ağaç üzerinde diploid türlere ait 35S rDNA lokuslarının sayısı haritalarak rDNA lokuslarının evrimi incelenmiştir (Şekil 4.60). Mavi işaretler 1, yeşil işaretler 2, siyah işaretler 3 ve beyaz işaretler 4 çift homolog lokusu temsil etmektedir. 35S rDNA lokuslarında diploid türler arası artma ve azalmaları kapsayan büyük bir varyasyon gözlemlenmiştir. Filogenetik ağaç ile rDNA lokusları arasında her hangi bir korelasyon saptanmamıştır.



Şekil 4.60. Diploid *Onobrychis* türlerinde 35S rDNA homolog lokus sayılarının filogenetik filogram kullanılarak MP methodu ile analizi

nrITS dizileri kullanılarak elde edilmiş olan filogenetik ağaç üzerinde diploid ve poliplodi türlere ait 35S rDNA lokuslarının sayısı haritalarak rDNA lokuslarındaki değişim incelenmiştir (Şekil 4.61). Mavi işaretler 1, yeşil işaretler 2, siyah işaretler 3 ve beyaz işaretler 4 çift homolog lokusu temsil etmektedir.



Şekil 4.61. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türlerinde 35S rDNA homolog lokus sayılarının filogenetik filogram kullanılarak MP ile analizi

35S rDNA lokuslarında diploid türler arasında büyük bir varyasyon saptanmıştır. *O. subacaulis* türü hariç diğer tüm poliploidlerin aynı kladda yer aldığı ve benzer rDNA desenleri sergilediği ve *O. subacaulis* türünde 35S rDNA lokusunda diğer poliploid türlere nazaran eliminasyon olduğu saptanmıştır. Filogenetik ağaç ile rDNA lokusları arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

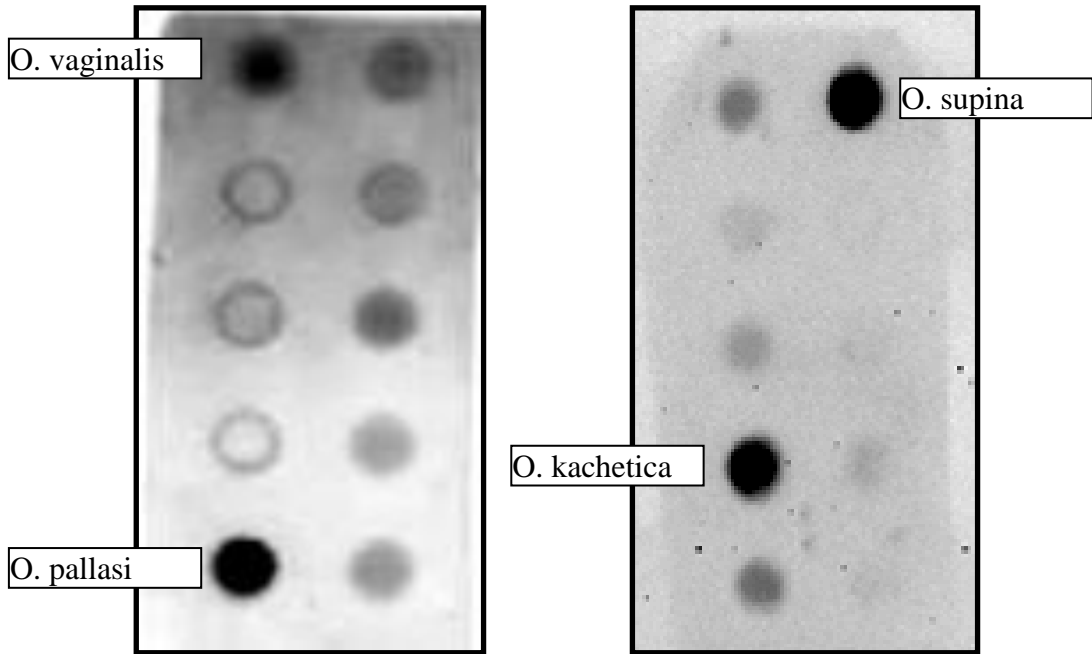
5S ve 35S rDNA lokusları için MP (maximum parsimony) methodu kullanılarak gerçekleştirilmiş analizler ML (maksimum likelihood) methodu da kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 2 farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiş olan analizlerden benzer sonuçlar alınmış ve elde edilmiş olan veriler ekler (EK 1-4) bölümünde paylaşılmıştır.

Elde edilmiş filogenetik ağaçlar ile 5S ve 35S rDNA lokuslarının sayısı arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

Silene türlerinde rDNA lokuslarının sayısı ve çekirdek DNA içeriği arasındaki ilişki analiz edilmiştir. En fazla 35 ve 5S rDNA lokusuna sahip olan *S. pendula* türünün en düşük çekirdek DNA içeriğine sahip olduğu, en az 35S rDNA lokusuna sahip olan *S. chalconica* türünün ise en büyük çekirdek DNA içeriğine sahip olduğu saptanmıştır. Türlerde gözlemlenmiş olan rDNA lokuslarının sayısı ve lokalizasyonundaki varyasyon ile çekirdek DNA içerikleri arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır (Siroky ve ark. 2001). Bununla beraber *Chenopodium* türlerinde gerçekleştirilmiş olan çalışmada türlerde saptanmış olan rDNA lokuslarının sayısı ile çekirdek DNA içerikleri arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır (Kolano ve ark. 2015). Benzer sonuçlar *Onobrychis* türleri için de gözlemlenmiştir.

4.5. DOT Blot Analizi

Dot blot yöntemi ile 20 farklı *Onobrychis* türüne ait genomik DNA ların membrana transferi ve prob olarak kullanılmış olan *O. viciifolia* türüne ait genomik DNA ile hibridizasyonu sağlanmıştır. *O. vaginalis*, *O. kachetica*, *O. supina* ve *O. pallasi* olmak üzere 4 farklı diploid *Onobrychis* türü ile poliploid *O. viciifolia* türü arasında hibridizasyon sağlanmıştır. Dot blot analizi sonrası elde edilmiş olan membranlar Şekil 4.62' de sunulmuştur.



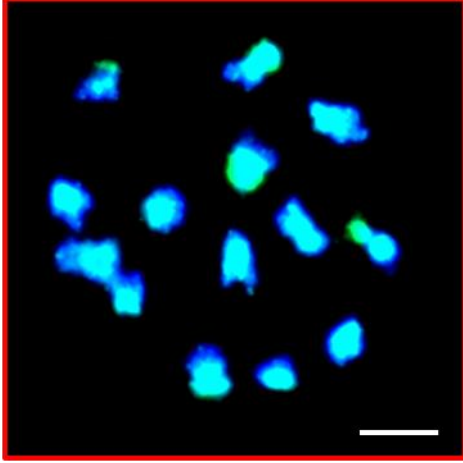
Şekil 4.62. DOT blot analizi sonrası membranların görüntüsü

Robledo ve Seijo (2008), baklagiller familyasından olan *Arachis* türlerinin genellikle A ve B genomundan oluştuğu ve D genomunun *Arachis glandulifera* Stalker türüne spesifik olduğunu belirtmişlerdir. *Arachis glandulifera* türü için kromozomal markır geliştirebilmek amacı ile 5S ve 45S rDNA probları ile FISH ve C- bant yöntemi kullanmışlardır. Yabani *Arachis* türleri DOT blot yöntemi ile membrana transfer edilmiş ve prob olarak hazırlanmış olan *Arachis glandulifera* türü ile hibridizasyonu sağlanarak yabani türlerden *Arachis glandulifera* türü genomuna yakın olanları saptamaya çalışmışlardır. Sonuç olarak D genomunun A ve B genomu arasında olduğu her iki genoma da benzerlik gösterdiğini

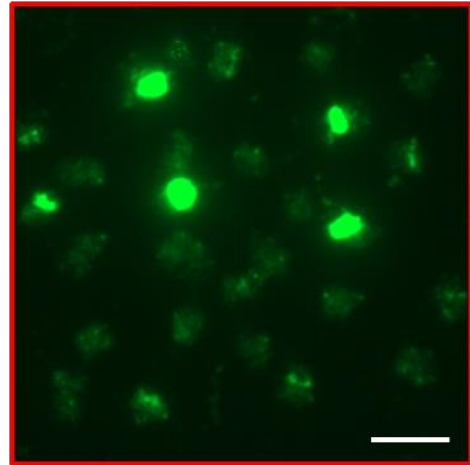
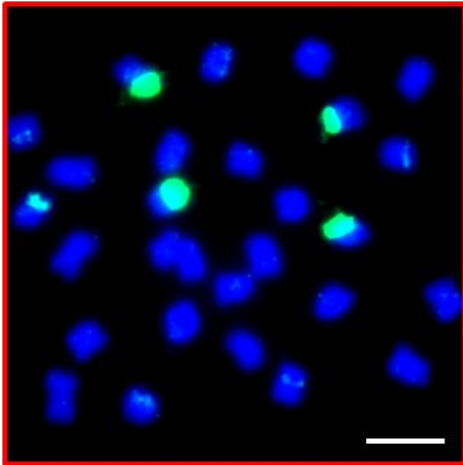
belirtmişlerdir. Sunulmuş olan tez çalışmasında da yabancı türler DOT blot yöntemi ile membrana transfer edilip, prob olarak hazırlanmış olan kültürü yapılan tür olan *O. viciifolia* türü ile hibridize edilmiştir. Böylelikle kültürü yapılan türün genomu ile benzerlik gösteren diploid türler saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla DOT blot tekniği başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

4.6. GISH Analizi Sonuçları

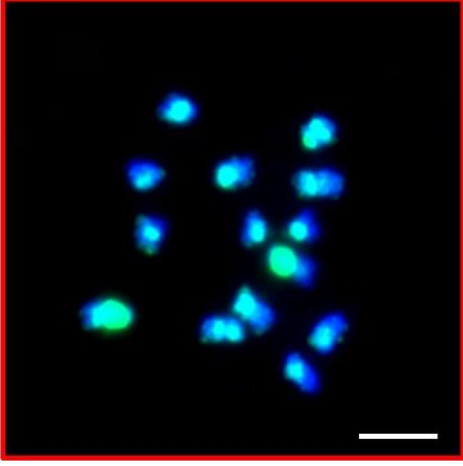
Olası progenitör türlere ait genomik DNAlar ve kültürü yapılan türe (*O. viciifolia*) ait somatik kromozom preparatları kullanılarak gerçekleştirilmiş GISH tekniği sonrası elde edilmiş mikroskop görüntüleri Şekil 4.63-4.71'de gösterilmiştir.



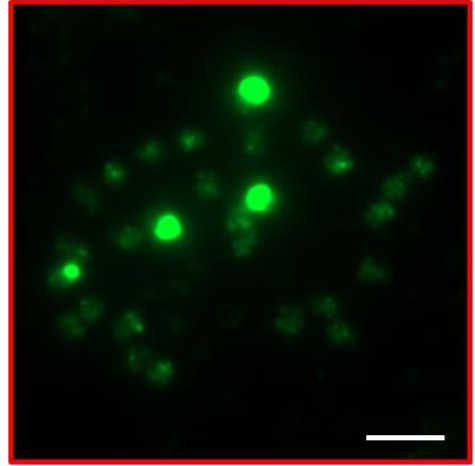
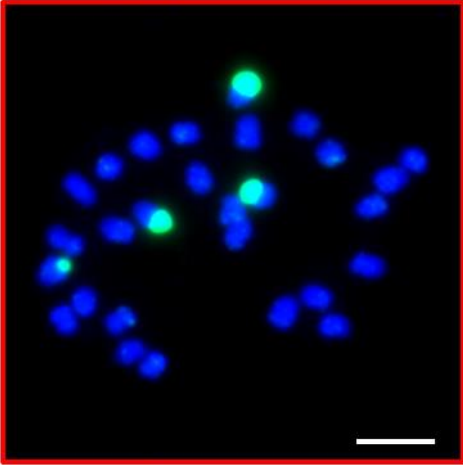
Şekil 4.63. GISH yöntemi ile *O. pallasi* genomik DNA' sının *O. pallasi* kromozomları üzerinde hibridizasyonunu gösteren karyotip



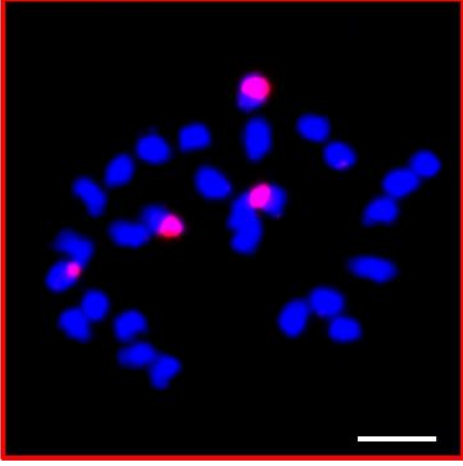
Şekil 4.64. GISH yöntemi ile *O. pallasi* genomik DNA' sının *O. viciifolia* kromozomları üzerinde hibridizasyonu gösteren karyotip (sol image DAPI ve FITC, sağ image sadece FITC görüntüsü)



Şekil 4.65. GISH yöntemi ile *O. hypargyrea* genomik DNA' sının *O. hypargyrea* kromozomları üzerinde hibridizasyonunu gösteren karyotip

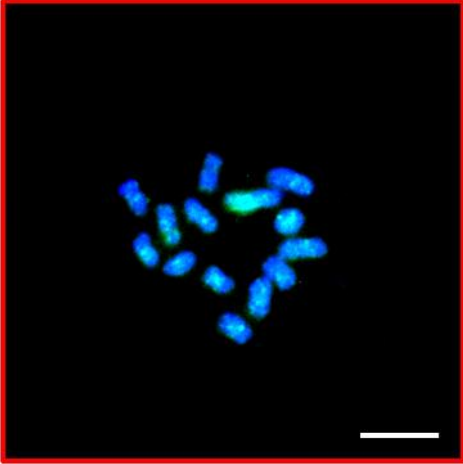


Şekil 4.66. GISH yöntemi ile *O. hypargyrea* genomik DNA' sının *O. viciifolia* kromozomları üzerinde hibridizasyonu (sol image DAPI ve FITC, sağ image sadece FITC görüntüsü)

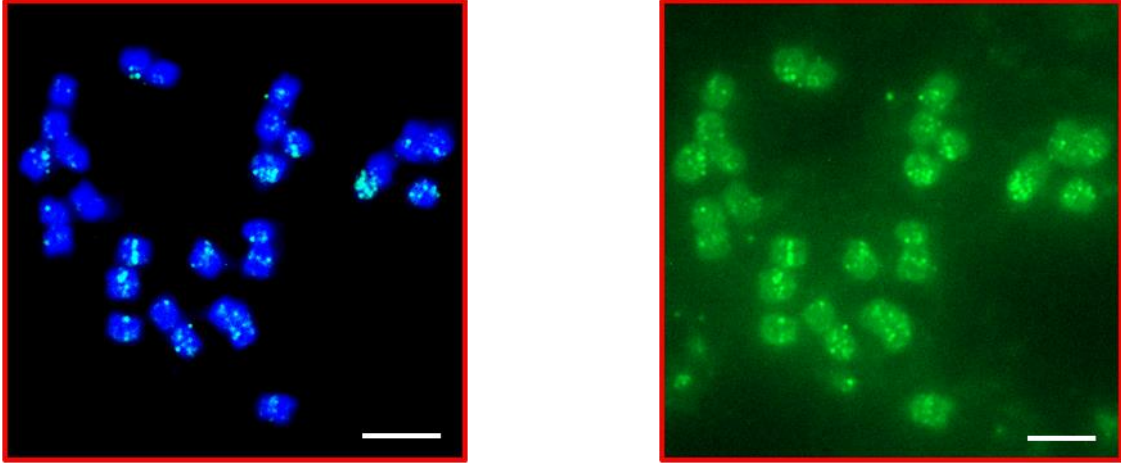


Şekil 57' de kullanılmış olan aynı preperat kullanılarak 25S rDNA probu ile FISH analizi gerçekleştirilmiş ve görülen belirgin sinyallerin 35S rDNA lokusları olduğu ispatlanmıştır.

Şekil 4.67. FISH yöntemi ile *O. viciifolia* kromozomları üzerinde 25S rDNA problemlerinin lokalizasyonunu gösteren karyotip

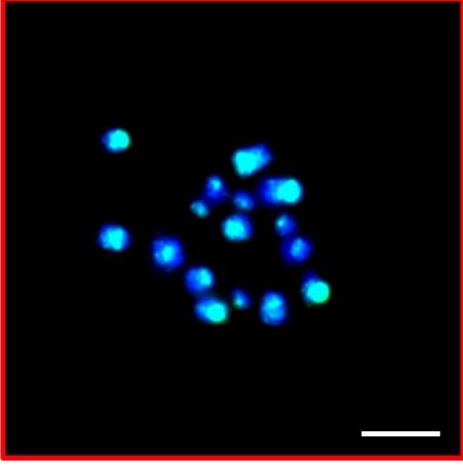


Şekil 4.68. GISH yöntemi ile *O. gracilis* genomik DNA' sının *O. gracilis* kromozomları üzerinde hibridizasyonunu gösteren karyotip

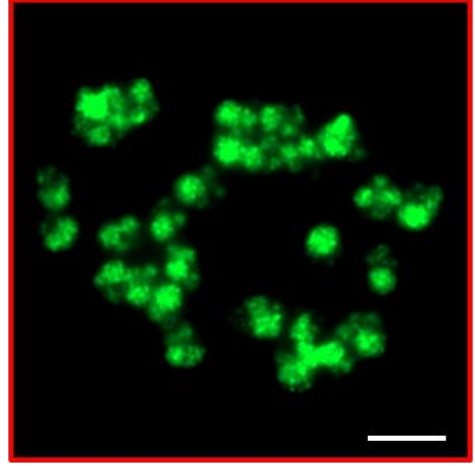
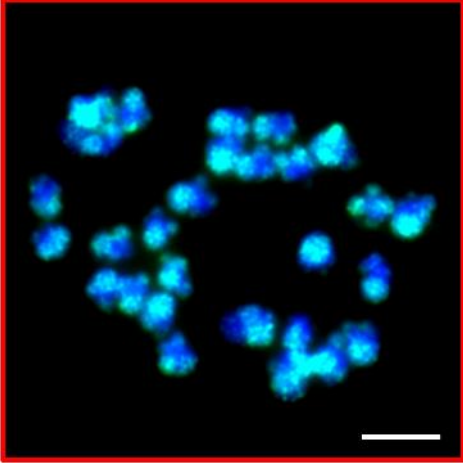


Şekil 4.69. GISH yöntemi ile *O. gracilis* genomik DNA' sının *O. viciifolia* kromozomları üzerinde hibridizasyonu (sol image DAPI ve FITC, sağ image sadece FITC görüntüsü)

GISH analizi gerçekleştirilmiş *O. pallasii*, *O. hypargyrea*, *O. gracilis* olmak üzere 3 farklı türün kontrol gruplarında (türün kendi DNA'sının kendi kromozomları üzerine hibridizasyonu) başarılı hibridizasyon sağlanmış olmasına rağmen, diploid türlerin DNA'larının poliploid türün kromozomlarına hibridizasyonunda çok zayıf sinyaller ve belirgin olan rDNA sinyalleri saptanmıştır. Gözlemlenmiş olan sinyallerin transpozonlar, satelitler ve rDNA gibi tekrarlı DNA bölgeleri olduğu düşünülmektedir. Küçük genoma sahip türlerde örneğin *A. thaliana* türünde tekrarlı DNA bölgelerinin genellikle heterokromatik perisentrometik bölgelerde lokalize olduğu, protein kodlayan gen bölgelerinin ise ökromatik bölgelerde lokalize olduğu diğer araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (She ve ark. 2007). *Onobrychis* türleri de küçük genom boyutuna sahip olduğu için ve mevcut sinyaller incelendiğinde genellikle perisentromerik bölgelerde lokalize olduğu saptanmıştır. Bu türler ile ilgili oldukça zayıf sinyaller elde edildiği için şu aşamada progenitör olma veya olmama ihtimalleri ile ilgili her hangi kesin bir yorum yapılamamaktadır. Bununla beraber *O. supina* ve *O. megataphros* türlerinin GISH yöntemi ile analizi gerçekleştirilmiş fakat diploid türlerin poliploid türün kromozomları üzerine hibridizasyonunda yeterli sonuç elde edilemediği için paylaşılmamıştır. *O. megataphros*, *O. alba* *subsp. laconica* ve *O. supina* (*O. supina* ayrıca dot blot analizi sonrasında da hibridize olmuştur) filogenetik ağaç üzerinde poliploid türlere yakın oldukları için ve *O. pallasii* ile *O. kachetica* türleri de DOT Blot analizi sonrası poliploid prob ile hibridizasyon sağladığı için GISH analizlerinde kullanılmak üzere seçilmişlerdir.



Şekil 4.70. GISH yöntemi ile *O. kachetica* genomik DNA' sının *O. kachetica* kromozomları üzerinde hibridizasyonunu gösteren karyotip



Şekil 4.71. GISH yöntemi ile *O.kachetica* genomik DNA' sının *O. viciifolia* kromozomları üzerinde hibridizasyonu (sol image DAPI ve FITC, sağ image sadece FITC görüntüsü)

O. kachetica diploid türüne ait genomik DNA'nın *O. kachetica* kromozomları üzerine hibridizasyonu Şekil.4.70' de sunulmuştur. *O. kachetica* türünün poliploid *O. viciifolia* türünün yaklaşık tüm kromozomları üzerine hibridize olduğu saptanmıştır (Şekil 4.71). Bu aşamada düşünülebilecek 3 olasılık olabileceği görülmektedir. İlk olasılık *O. viciifolia* türü autopoliploid olabilir ve böylelikle *O. kachetica* tek progenitör tür olarak düşünülebilir. İkinci olasılık ise *O. viciifolia* türü allopoliploid olarak düşünülebilir ve 2 farklı diploid türün *O. viciifolia* türüne genom olarak çok benzer olduğu ve GISH tekniği ile her bir türün *O. viciifolia'* nın tüm kromozomları üzerinde hibridize olduğu düşünülebilir. Böylelikle

progenitör türlerden birinin *O. kachetica* olduğu düşünülebilir ve 2. aday progenitör tür için analizler gerçekleştirilmeye devam edilir. Üçüncü olasılık ise progenitör türlerden bir tanesinin retrotrasposon veya satellit dizileri (tekrarlı DNA dizileri) diğer progenitörün dizileri üzerinde dominant olması düşünülebilir. Fakat kesin bir bilgi paylaşılabilmesi için tekrarlı ve detaylı analizler gerekmektedir.

GISH tekniği dikkatli bir şekilde optimize edilmesi ve oldukça yüksek kalitede genomik DNA elde edilmesi gereken bir yöntemdir. Ayrıca hibridizasyonun ve bağlayıcı yıkamanın oldukça önemli olduğu diğer araştırmacılar tarafından da açıklanmıştır (Hasterok ve ark. 2005). *Onobrychis* cinsinde ilk defa gerçekleştirilmiş olan GISH tekniği ile kültürü yapılan tür olan *O. viciifolia* progenitörleri hakkında önemli bilgiler elde edilmesini sağlamıştır. Benzer çalışmalar aşağıda açıklanmaktadır.

Matyasek ve ark. (2003) allotetraploid bir tür olan *Nicotiana rustica* ($2n = 4x = 28$) türünü GISH tekniği kullanılarak incemişler ve *N. paniculata* ($2n = 2x = 14$) ile *N. undulata* ($2n = 2x = 14$) türlerinin allotetraploid türün progenitörleri olduğunu başarılı bir şekilde saptamışlardır.

Seijo ve ark. (2007) doğal allotetraploid *Arachis hypogaea* L. ($2n = 40$) türünde GISH tekniği ile A ve B genomuna sahip 7 farklı yabani diploid türde denemeler gerçekleştirerek progenitörleri saptamaya çalışmışlardır. Güçlü ve benzer hibridizasyon gösterdikleri için *A. duranensis* (A genomu) ve *A. ipaensis* (B genomu) diploid türleri en başarılı progenitör adayları olarak saptanmıştır.

Hasterok ve ark. (2005) Brassicaceae (turpgiller) cinsine ait allotetraploid türlerde (*Brassica carinata*, *Brassica juncea*, *Brassica napus*) atasal genomu tespit etmek amacı ile GISH analizleri gerçekleştirmişlerdir. GISH sonuçlarına göre; genomik DNA problemleri ile *B. juncea* ve *B. carinata* türlerinin orjinlendiği genomlarla ilgili açık bir sonuç alınabilir iken, *B. napus* için kısmi başarı sağlayabildiklerini belirtmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Moleküler sitogenetik yöntemler kullanılarak bazı yabani ve kültürü yapılan *Onobrychis* türlerinin genom yapısı hakkında yeni ve bilgilerin elde edilmesinin amaçlandığı bu çalışmada türler arası filogenetik ilişki için nrITS bölgesi, çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesi için flow sitometri yöntemi, rDNA lokuslarının analizi için FISH yöntemi ve cinsin en bilindik türü olan *O. viciifolia*'nın progenitör veya progenitörleri hakkında bilgi edinebilmek için GISH yöntemi kullanılmıştır.

Onobrychis cinsinin $x = 7$ ve $x = 8$ olmak 2 farklı temel kromozom sayısına sahip olduğu ve aneuploid temel kromozom sayısının $x = 8$ kromozom olduğu belirlenmiştir. Diploid türler $x = 7$ ve $x = 8$ olmak üzere iki farklı temel kromozom sayısına sahip iken, poliploid türlerin *O. subacaulis* hariç çoğunlukla $x = 7$ temel kromozom sayısına sahip olduğu belirlenmiştir.

O. pallasi ($2n = 14$), *O. stenorrhiza* ($2n = 14$) ve *O. vaginalis* ($2n = 16$) türlerinin kromozom sayıları ile ilgili bilgi ilk defa bu tez çalışmasında elde edilmiştir.

Diploid türler arasında çekirdek DNA içeriği yaklaşık 2 kata varan bir varyasyon gösterirken, poliploid türlerde daha düşük bir varyasyon olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar diploid türlerin genom boyutlarının evriminin poliploid türlere göre daha dinamik olduğuna işaret etmektedir. Genom boyutu ve filogenetik ağaç ile her hangi bir korelasyon saptanmamıştır.

Onobrychis türleri nrITS bölgeleri kullanılarak incelenmiş ve nrITS bölgelerinin alt cins ve seksiyon bazında türlerin ayırımında önemli derecede faydalı olabileceği görülmüştür. Diploid *Onobrychis* türlerinde 5S ve 35S rDNA lokuslarının kromozomlar üzerinde lokalizasyon ve sayısı bakımında önemli derecede varyasyon olduğu saptanmıştır. 35S rDNA lokuslarında varyasyonun daha fazla olduğu belirlenmiştir. Poliploid türlerde ise $2n = 28$ kromozom sayısına sahip türlerde benzer sonuçlar gözlemlenirken, $2n = 32$ kromozom sayısına sahip *O. subacaulis* türünde 2 farklı rDNA lokusu içinde eliminasyon gözlemlenmiştir. Filogenetik ağaç ile rDNA lokusları arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. Çekirdek DNA içerikleri ile rDNA lokusları arasında bir korelasyon olmadığı belirlenmiştir.

GISH tekniği ile elde edilen sonuçlardan özellikle *O.kachetica* türü ile poliploid kültür türü *O. viciifolia* arasında benzerlik olduğu saptanmıştır. *O. kachetica* türünün progenitor olma ihtimali olduğu görölmek ile beraber kesin bir bilginin paylaşılabilmesi için çalışmanın daha detaylı gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Moleküler sitogenetik yöntemler (FISH ve GISH) kullanılarak *Onobrychis* genomlarının incelenmesi ve filogenetik bağlamda değerlendirilmesi ilk defa bu tez çalışmasında gerçekleştirilmiştir.

Onobrychis cinsinin yaklaşık 170 türden oluştuğu diğer araştırmacılar tarafından daha önce belirtilmiştir. *Onobrychis* türleri üzerinde bu güne kadar yapılmış olan sitolojik çalışmalar kromozom sayımı ve klasik yöntemler ile yapılmış olan bir kaç karyotip analizinden ibarettir. Ancak, *Onobrychis* kromozomlarının oldukça küçük ve morfolojik olarak benzer olması nedenleriyle sadece morfolojilerine göre teşhis edilmeleri imkansızdır. Bundan dolayı klasik yöntemler ile elde edilmiş olan bu karyotipler *Onobrychis* genomlarının yapısı ve aralarındaki ilişkilerin belirlenmesinde çok sınırlı bir kullanım potansiyeline sahiptir. Bu nedenle genom spesifik özel markörlere gereksinim bulunmaktadır. Çalışma kapsamında yeni sitogenetik yöntemler kullanarak *Onobrychis* genom ve kromozomları hakkında elde edilmiş olan yeni bilgiler, cinsin genetiği ve genomuğinin çok daha detaylı bir şekilde incelenmiş olan diğer türler (özellikle model baklagil türleri) ile ilişkilendirilmesi, cinsin içerisinde yer alan genomların orijinleri ve ilişkilerinin belirlenmesi, evrimlerinin incelenmesi ve cins içerisinde mevcut olan genetik çeşitliliğin daha üstün tarımsal özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesinde kullanımı açısından son derece önemlidir.

Çalışma kapsamında elde edilen yeni bilgiler *Onobrychis* genetik ve ışlahıları için yararlı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abou-El-Enain MM (2002). Chromosomal Criteria and Their Phylogenetic Implications in the Genus *Onobrychis* Mill. sect. *Lophobrychis* (Leguminosae), with Special Reference to Egyptian species. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 139:409–414.
- Abuş Y (2013). Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen *Hymenobrychis* Seksiyonuna Ait Bazı *Onobrychis* Türlerinin Karyolojik Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir.
- Açıkgöz E (2001). Yem Bitkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. Uludağ Üniversitesi Basımevi. 2. Bölüm Baklagil Yem Bitkileri. 54s.
- Akçelik E (2009). Bazı Yabani Korunga (*Onobrychis* sp.) Türlerinin Kromozom Sayılarının Tespiti ve Karyotip Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Aktoklu E (1995). Türkiye’de Yetişen *Onobrychis* Miller (*Fabaceae*) Türlerinin Revizyonu, T.C. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Malatya.
- Albach DC, Greilhuber J (2004). Genome Size Variation and Evolution in *Veronica*. *Annals of Botany*. 94: 897–911.
- Aliyazıcıoğlu R, Akkaya Ş, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Özgen U, Karaoğlu ŞA (2017). *Onobrychis Oxyodonta*’nın Topraküstü Kısmında Antioksidan, Antimikrobiyal ve Tirozinaz İnhibitör Aktivitesi. *F.Ü. Sağ. Bil. Tıp Derg.* 31: 25-31.
- Alvarez I, Wendel JF (2003). Ribosomal ITS Sequences and Plant Phylogenetic Inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 417–434.
- Ambrozova K, Mandakova T, Bures P, Neumann P, Leitch IJ, Koblízková A, Macas J, Lysak MA. 2011. Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of *Fritillaria* lilies. *Annals of Botany* 107: 255–268.
- 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.
- Anonim (2019). <http://www.bingol.edu.tr/documents/BAKLAG%20YEMB%20B0TK%20LER%20.pdf>
(Erişim tarihi 29.04.2019)
- Anonim (2019 a). www.niab.com/pages/id/172/Healthy_Hay(Erişim tarihi29.04.2019)
- Anonim (2019 b). www.niab.com/pages/id/385/Legume_Plus(Erişim tarihi29.04.2019)
- Anonim (2019c). http://www.agroatlas.ru/en/content/related/Onobrychis_iberica/
(Erişim tarihi 29.04.2019)
- Anonim (2019d). http://www.agroatlas.ru/en/content/related/Onobrychis_arenaria/(Erişim tarihi29.04.2019)
- Anonim (2019 e). http://www.agroatlas.ru/en/content/related/Onobrychis_cyri/(Erişim tarihi29.04.2019)
- Anonim (2019 f). http://www.agroatlas.ru/en/content/related/Onobrychis_biebersteinii/
(Erişim tarihi29.04.2019)

- Arslan E, Ertuğrul K, Tugay O, Dural H (2012). Karyological Studies of the Genus *Onobrychis* Mill. and the Related Genera *Hedysarum* L. and *Sartoria* Boiss. & Heldr. (Fabaceae, Hedysareae) from Turkey. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*. 65,11-17.
- Avcı S (2010). Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Yabani Korunga (*Onobrychis* sp.) Türlerinin Toplanması ve Morfoloji Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Baldes V. Descripción Flora of Iberica. LXXXVIII. Leguminosae – Hedysareae. 960s.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ (1995). The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA – A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247–277.
- Baltisberger M, Baltisberger B 2015. IAPT/IOPB Chromosome Data 19. *TAXON* 64,1068–1074. Ed. Edited by Karol Marhold. Published by: International Association for Plant Taxonomy (IAPT).
- Baykabilov T (1977). Karyosystematics of the Uzbekistan Species of the Genus *Onobrychis*. Tashkent. 96 .
- Benabdelmouna A, Abirached-Darmency M, Darmency H (2001). Phylogenetic and Genomic Relationships in *Setaria italica* and Its Close Relatives Based on the Molecular Diversity and Chromosomal Organization of 5S and 18S-5.8S-25S rDNA Genes. *Theor. Appl. Genet.* 103, 668-677.
- Bennett MD (1972). Nuclear DNA Content and Minimum Generation Time in Herbaceous Plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 181, 109–135.
- Bennett ST, Kenton AY, Bennett MD (1992). Genomic *in situ* Hybridisation Reveals the Allopolyploid Nature of *Millium montianum* (Gramineae). *Chromosoma* 101, 420-424.
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ. 2000. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and Their Modern Uses – 807 New Estimates. *Annals of Botany* 86: 859–909.
- Bennett MD, Leitch IJ (2011). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Targets, Trends and Tomorrow. *Ann. Bot.* 107, 467–590.
- Bennetzen JL, Wang H. 2014. The Contributions of Transposable Elements to the Structure, Function, and Evolution of Plant genomes. *Annual Review of Plant Biology*. 65: 505–530.
- Bisht MS, Mukai Y (2001). Genomic *in situ* Hybridization Identifies Genome Donor of finger millet (*Eleusine coracana*). *Theor. Appl. Genet.* 102, 825-832.
- Boissier, E. (1872) *Onobrychis* in *Flora Orientalis*, vol. 2: 525-553.
- Breda E, Wolny E, Hasterok R (2012). Intraspecific Polymorphism of Ribosomal DNA Loci Number and Morphology in *Brachypodium pinnatum* and *Brachypodium sylvaticum*. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 17,526-541.
- Burton JC, Curley RL (1968). Nodulation and Nitrogen Fixation in Sainfoin (*Onobrychis sativa* LAM.) As Influenced by Strains of Rhizobia. *Sainfoin Symposium*, 3-5.
- Carbonero CH (2011). Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), A Forage Legume with Great Potential for Sustainable Agriculture, and Insight on Its Morphological, Agronomical,

Cytological and Genetic Characterisation. Doctorate Thesis, Faculty of Life Sciences. Manchester.

- Carbonero CH, Mueller-Harvey I, Brown TA, Smith L (2011). Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): A Beneficial Forage Legume. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 9,70-85.
- Carbonero CH, Carbonero F, Smith LMJ, Brown TA (2012). Phylogenetic Characterisation of *Onobrychis* Species with Special Focus on the Forage Crop *Onobrychis viciifolia* Scop. *Genet Resour Crop Evol*. 59,1777–1788.
- Cuadrado A, Schwarzacher T (1998). The Chromosomal Organization of Simple Sequence Repeats in Wheat and Rye Genomes. *Chromosoma*, 107,587-594.
- Çeçen S, Öten M, Erdurmuş C (2015). Antalya Doğal Florasında Bulunan Korunga (*Onobrychis sativa* L.) Populasyonlarının Toplanması ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Derim*. 32,63-70.
- Çimen C (2010). Sitogenetik ve Moleküler Tekniklerin Klinikte Uygulama Alanları. Yüksek Lisans Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Edirne.
- Datson PM, Murray BG, (2006). Ribosomal DNA Locus Evolution in *Nemesia*: Transposition Rather Than Structural Rearrangement As the Key Mechanism? *Chromosome Research*. 14: 845–857.
- Davis TM, Liu B (2011). Conservation and Loss of Ribosomal RNA Gene Sites in Diploid and Polyploid *Fragaria* (Rosaceae). *BMC Plant Biology*. 11:157.
- De Vicente MC, Arus P (1996) Tetrasomic Inheritance of Isozymes in Sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.). *The Journal of Heredity*. 87 :54-62.
- Elena T (2006). Cytological Aspects of the *Onobrychis* genus. *Buletin USAMV*. 62: 154-158.
- Ellul P, Boscaiu M, Vicente O, Moreno V, Rosello JA (2002). Intra and Interspecific Variation in DNA Content in *Cistus* (Cistaceae). *Annals of Botany*. 90: 345–351.
- Estep MC, DeBarry JD, Bennetzen JL. 2013. The Dynamics of LTR Retrotransposon Accumulation across 25 Million Years of Panicoid Grass Evolution. *Heredity* 110: 194–204.
- Falisticco E (2019). Chromosome Investigations in Annual *Medicago* species (Fabaceae) with emphasis on the origin of the Polyploid *Medicago rugosa* and *M. scutellata*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 153:235-241.
- Feliner GN, Rossello JA (2007). Better the Devil You Know? Guidelines for Insightful Utilization of nrDNA ITS in Species-Level Evolutionary Studies in Plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44: 911–919.
- Flora of Turkey and the East Aegean Islands 1988. Volume 10 (*Onobrychis*). Edinburg University. Press. Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. (eds.). 129-131.
- Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume 11 (*Onobrychis*).2000. Edinburg University. Press. Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C. (eds.). 98-99.
- Frame J, Charlton, JFL, Laidlaw AS (1998). Temperate Forage Legumes. CAB International ed. Wallingford.Fr

- Fukui K, Ohmido N, Khush GS (1994). Variability in rDNA Loci in the Genus *Oryza* Detected Through Fluorescence *in situ* Hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 87:893-899.
- Garnatje T. ve Cardona A (1988). Fitodermologia i Cariologia d'*Onobrychis viciifolia* Scop., *O. Supina* (Chaix) DC. i *O. saxatilis* Lam. de Catalunya. *Orsis*, 3:55-65.
- Gerlach WL, Dyer TA (1980). Sequence Organization of the Repeating Units in the Nucleus of Wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 8:4851-4865.
- Girard M, Dohme-Meier F, Wechsler D, Goy D, Kreuzer M, Bee G (2016). Ability of 3 tanniferous forage legumes to modify quality of milk and Gruyère-type cheese. *Journal of Dairy Science.* 99:205-220.
- Graham MJ, Nickell CD, Rayburn AL (1994). Relationship Between Genome Size and Maturity Group in Soybean. *Theoretical and Applied Genetics.* 88: 429-432.
- Greilhuber J, Borsch T, Müller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W (2006). Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae with Chromosomes of Bacterial Size. *Plant Biol (Stuttg).* 8:770-777.
- Grossheim A A (1948). Leguminosae: *Onobrychis* in Flora of the U.S.S.R., vol. 13: 244-281
- Hajdera I, Siwinska D, Hasterok R, Maluszynska J (2003). Molecular Cytogenetic Analysis of Genome Structure in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus cosentini*. *Theor Appl Genet.* 107:988-996.
- Harper LC, Zacheus Cande W (2000). Mapping a New Frontier: Development of Integrated Cytogenetic Maps in Plants. *Functional & Integrative Genomics.* 1, 89-98.
- Harrison GE, Heslop-Harrison JS (1995). Centromeric Repetitive DNA Sequences in the Genus *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics.* 90, 157-165.
- Hasterok R, Maluszynska J (2000). Different rRNA Gene Expression in Primary and Adventitious roots of *Allium cepa* L. *Folia Histochemica et Cytobiologica.* 38, 181-184.
- Hasterok R, Jenkins G, Langdon T, Jones RN, Maluszynska J (2001). Ribosomal DNA is an Effective Marker of *Brassica* Chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics.* 103, 486-490
- Hasterok R, Książczyk T, Wolny E, Maluszynska J (2005). FISH and GISH Analysis of Brassica Genomes. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica.* 47, 185-192.
- Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kowalczyk M, Kulak-Książczyk S, Książczyk T, Heneen WK, Maluszynska J (2006). Comparative Analysis of rDNA Distribution in Chromosomes of Various Species of Brassicaceae. *Annals of Botany.* 97, 205-216.
- Hasterok 2017. *Advance Molecular Cytogenetics (Lab Course for PhD Students)- a Manual.*
- Heckendorn F, Haring DA, Maurer V, Senn M, Hertzberg H (2007). Individual Administration of Three Tanniferous Forage Plants to Lambs Artificially Infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology.* 146, 123-134.
- Hedge IC (1970). *Onobrychis*, Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume 3. Edinburg University. Press. Ed: P.H. Davis. Edinburg. 560-589. (vol 10-11)

- Heil M, Baumann B, Andary C, Linsenmair KE, McKey D (2002). Extraction and Quantification of "Condensed Tannins" As a Measure of Plant Anti-Herbivore Defence? Revisiting an Old Problem. *Naturwissenschaften*. 89 (11),519-524.
- Henras AK, Soudet J, G erus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, Mougin A, Henry Y (2008). The Post-Transcriptional Steps of Eukaryotic Ribosome Biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65, 2334–2359.
- Hermanson GT (2013). Nucleic Acid and Oligonucleotide Modification and Conjugation. *Bioconjugate Techniques*. Third Edition Chapter 23. 959–987.
- Hesamzadeh Hejazi SM, Nasab MZ (2010). Cytotaxonomy of Some *Onobrychis* (Fabaceae) Species and Populations in Iran. *Caryologia*. 63,18-31.
- Heslop-Harrison JS, Schmidt T (1998) Genomes, Genes and Junk: the Large-Scale Organization of Plant Chromosomes. *Trends in Plant Science*. 3, 195–199.
- Heslop-Harrison P, Osuji J, Hull R, Harper G, D'Hont A, Carreell F (1998,1999). Fluorescent In Situ Hybridization of Plant Chromosomes: Illuminating the Musa Genome. In: INIBAP Annual Report 1998. INIBAP Montpellier (FRA) 1999. Courtesy of CIRAD. 26-29.
- Heslop-Harrison JS (2000). Comparative Genome Organization in Plants: from Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. *The Plant Cell*. 12: 617–635.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T (2011). Organisation of the Plant Genome in Chromosomes. *The Plant Journal*. 66, 18–33.
- Hill R (1997). Sainfoin: The Not Quite Forgotten Legume. In: Lane GPF and Wilkinson JM (eds). *Alternative Forages for Ruminants*. Papers, Conference, Cirencester 55-59.
- Hoşg oren H (2006). Total Numbers of Chromosome Numbers in Species of *Onobrychis* Miller (Fabaceae) in Southeastern Anatholia Region. *Biotechnology & Biotechnoogical Equipment*. 20,57-61.
- Hu GJ, Hawkins JS, Grover CE, Wendel JF. 2010. The History and Disposition of Transposable Elements in Polyploid *Gossypium*. *Genome*. 53: 599–607.
- Huyen NT, Desrues O, Alferink SJJ, Zandstra T, Verstegen MWA Hendriks WH, Pellikaan WF (2016). Inclusion of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) Silage in Dairy Cow Rations Affects Nutrient Digestibility, Nitrogen Utilization, Energy Balance, and Methane Emissions. *Journal of Dairy Science* Vol. 99. (5): 3566–3577.
- İleri O (2014). T urkiye'de Doğal Olarak Yetişen *Onobrychis* Seksiyonuna Ait Bazı Endemik KorungaT urlerinin Karyolojik  zellikleri. *Y ksek Lisans Tezi*. Fen Bilimleri Enstit s . Eskişehir.
- Jakob SS, Meister A, Blattner FR (2004). The Considerable Genome Size Variation of *Hordeum* Species (Poaceae) Is Linked to Phylogeny, Life Form, Ecology, and Speciation Rates. *Molecular Biology and Evolution*. 21,860–869.
- Jang TS, Weiss-Schneeweiss H (2015). Formamide-Free Genomic in situ Hybridization Allows Unambiguous Discrimination of Highly Similar Parental Genomes in Diploid Hybrids and Allopolyploids. *Cytogenetic and Genome Research*.146:325–331.
- Jenkins G, Hasterok R (2007). BAC ‘Landing’ on Chromosomes of *Brachypodium distachyon* for Comparative Genome Alignment. *Nature Protocols*. 2, 88-98.

- Karataş Ş (2013). *Onobrychis armena* Boiss. & Huet (Fabaceae)'nin Antioksidan Özellikleri ile Uçucu ve Sabit Yağ Bileşiminin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.
- 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.
- Kempf K, (2016). Self Fertilization and Marker-Trait Associations in Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Doktora Tezi, Dipl.- Agr.Biol., University of Hohenheim, Almanya.
- Kempf K, Mora-Ortiz M, Smith LMJ, Kölliker R, Skot L (2016). Characterization of Novel SSR Markers in Diverse Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) germplasm. *BMC Genetics* .17:124.
- Kolano B, Sıwńska D, Mccann J, Weiss-Schneeweiss H (2015). The Evolution of Genome Size and rDNA in Diploid Species of *Chenopodium s.l.* (Amaranthaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 179, 218–235.
- Kozuharov SI, Kuzmanov BA, Markova T (1972). In IOPB Chromosome Number Reports XXXVI, Ed: Löve A, Wiley, New Jersey, Taxon 21:336.
- Knuth, P. 1906-1909. Handbook of Flower Pollination (trans by J. R. Ainsworth-Davis). Clarendon Press, Oxford. 3 vol.318-320.
- Ksiazczyk T, Taciak M, Zwierzykowski Z (2010). Variability of Ribosomal DNA Sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and Their Intergeneric Hybrids, Revealed by FISH and GISH. *Journal of Applied Genetics*. 51: 449–460.
- Kulak S, Hasterok R, Maluszynska J (2002). Karyotyping of *Brassica* Amphidiploids using 5S and 25S rDNA As Chromosome Markers. *Hereditas* 136: 144-150.
- Leitch IJ, Bennett MD (2004). Genome Downsizing in Polyploid Plants. *Biological Journal of the Linnean Society*. 82,651–663.
- Leitch IJ, Hanson L, Lim KY, Kovarik A, Chase MW, Clarkson JJ, Leitch AR (2008). The Ups and Downs of Genome Size Evolution in Polyploid Species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany*. 101, 805–814.
- Leitch IJ, Leitch AR (2013) Genome Size Diversity and Evolution in Land Plants. In: Leitch IJ, Greilhuber J, Doležal J, Wendel JF (eds). *Plant Genome Diversity*. vol 2. Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes. Springer-Verlag, Wien. 8. 307–322.
- Lesins KA, Lesins I, Gillies CB, 1970. *Medicago murex* with 2n=16 and 2n=14 chromosome complements. *Chromosoma* 30: 109–122.
- Levan A (1932) Cytological studies in *Allium*. II. Chromosome Morphological Contributions. *Hereditas* 16:257–294.
- 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.
- Lifante ZA ve Martin RP 1992. Chromosome Numbers of Plants Collected During Iter Mediterraneum V in Morocco. *Bocconea* 26: 151-172.

- Lim KY, Matyasek R, Lichtenstein CP, Leitch AR (2000). Molecular Cytogenetic Analyses and Phylogenetic Studies in the *Nicotiana* section Tomentosea. *Chromosoma*. 109, 245-258.
- Liston A, Robinson WA, Oliphant JM, Alvarez-Buylla ER (1996). Length Variation in the Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region of Non-Flowering Seed Plants. *Systematic Botany*. 21,109–120
- Long Q, Rabanal FA, Meng D, Huber CD, Farlow A, Platzer A, Zhang Q, Vilhjalmsón BJ, Korte A, Nizhynska V, Voronin V, Korte P, Sedman L, Mandakova T, Lysák MA, Seren Ü, Hellmann I, Nordborg M. 2013. Massive Genomic Variation and Strong Selection in *Arabidopsis thaliana* Lines from Sweden. *Nature Genetics*. 45: 884–890.
- Lorenz MM (2011) Sainfoin Tannins and Their Impact on Protein Degradation During Silage and Rumen Fermentation and Testing of Novel Techniques. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Luo MC, Deal KR, Akhunov ED, Akhunova AR, Anderson OD, Anderson JA, Blake N, Clegg MT, Coleman-Derr D, Conley EJ, Crossman CC, Dubcovsky J, Gill BS, Gu YQ, Hadam J, Heo HY, Huo N, Lazo G, Ma Y, Matthews DE, McGuire PE, Morrell PL, Qualset CO, Renfro J, Tabanao D, Talbert LE, Tian C, Toleno DM, Warburton ML, You FM, Zhang W, Dvorak J (2009). Genome Comparisons Reveal a Dominant Mechanism of Chromosome Number Reduction in Grasses and Accelerated Genome Evolution in Triticeae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:15780–15785.
- Lysak MA, Dolezel J (1998). Estimation of Nuclear DNA Content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia*. 51, 123-132.
- Lysak MA, Rostkova A, Dixon JM, Rossi G, Dolezel J (2000). Limited Genome Size Variation in *Sesleria albicans*. *Annals of Botany*. 86: 399–403.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I (2006) Mechanisms of Chromosome Number Reduction in *Arabidopsis thaliana* and Related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:5224–5229.
- Lysak MA, Schubert I (2013). Mechanisms of Chromosome Rearrangements. I.J. Leitch et al. (eds.), *Plant Genome Diversity Volume 2*. 137-148.
- Maggini F, Marrocco R, Gelati TM, De Dominicis RI (1998). Length and Nucleotide Sequences of the Internal Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Gymnosperms and Pteridophytes. *Plant Systematics and Evolution*. 213,199–205.
- Magulaev AJ (1989). Cytotaxonomicheskoe Isuchenie *Onobrychis* Severnogo Kavkasa. 73-76 in *Tesizy II Symp. Plant Karyology*.
- Magulaev AY (1995). Chromosome Numbers, Distribution and Some Taxonomical Problems in North Caucasus Species of *Onobrychis* subgenus *Hymenobrychis* (Fabaceae). *Botanicheskii Zhurnal*. (Stbursg) 80(7): 55–59.
- Mao Q (2014). The Allotetraploid Evolutionary Origin of Annual Bluegrass. *Doktora Tezi. Bitki Biyolojisi Programı. Pensilvanya*.
- Matyasek R, Lim KY, Kovarik A, Leitch AR (2003). Ribosomal DNA Evolution and Gene Conversion in *Nicotiana rustica*. *Heredity*. 91, 268–275.

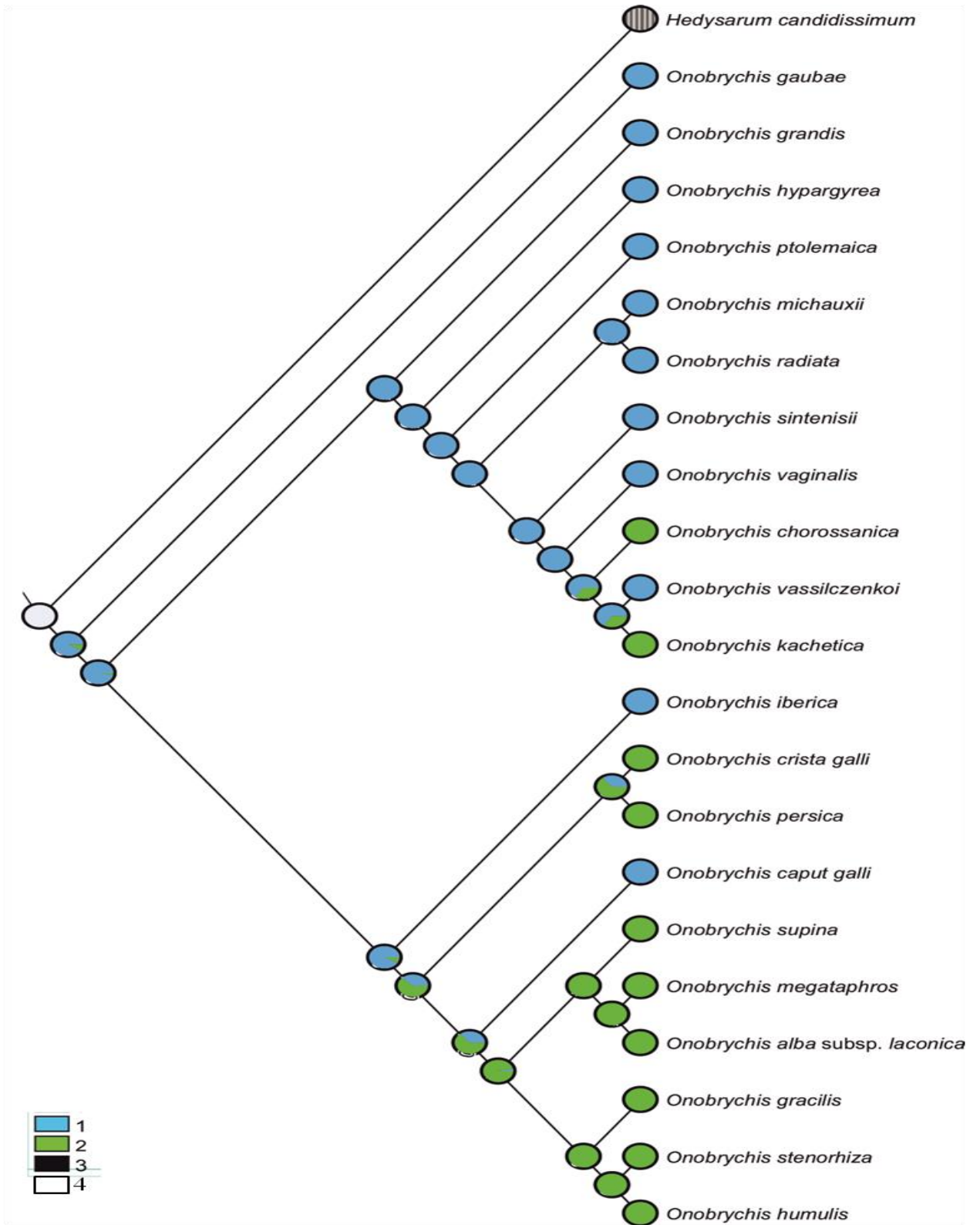
- Michaelson MJ, Price HJ, Johnston JS, Ellison JR (1991). Variation of nuclear DNA content in *Helianthus annuus* (Asteraceae). *American Journal of Botany*. 78: 1238–1243.
- Mora-Ortiz M, Smith L (2016). Sainfoin Surprising Science Behind a Forgotten Forage. Edited by Ian Wilkinson & Fiona Mountain.
- Mora-Ortiz M, Smith LMJ (2018). *Onobrychis viciifolia*; a Comprehensive Literature Review of Its History, Etymology, Taxonomy, Genetics, Agronomy and Botany. *Plant Genetic Resources*. 1–16.
- Morgan DR, Korn RL, Muggleston SL (2009). Insights into Reticulate Evolution in Machaerantherinae (Asteraceae: Astereae): 5S Ribosomal RNA Spacer Variation, Estimating Support for Incongruence, and Constructing Reticulate Phylogenies. *American Journal of Botany*. 96: 920–932.
- Moscone EA, Baranyi M, Ebert I, Greilhuber J, Ehrendorfer F, Hunziker AT (2003). Analysis of Nuclear DNA Content in *Capsicum* (Solanaceae) by Flow Cytometry and Feulgen Densitometry. *Annals of Botany*. 92: 21–29.
- Mukai Y, Nakahara Y, Yamamoto M (1993a). Simultaneous Discrimination of the Three Genomes in Hexaploid Wheat by Multicolour *in situ* Hybridisation Using Total Genomic and Highly Repeated DNA Probes. *Genome*. 36, 489-494.
- Mukai Y, Friebe B, Hatchett JH, Yamamoto M, Gill BS (1993b). Molecular Cytogenetic Analysis of Radiation - Induced Wheat-Rye Terminal and Intercalary Chromosomal Translocations and the Detection of Rye Chromatin Specifying Resistance to Hessian fly. *Chromosoma*, 102, 88-95.
- Murat F, Xu JH, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, Pont C, Messing J, Salse J (2010). Ancestral Grass Karyotype Reconstruction Unravels New Mechanisms of Genome Shuffling As a Source of Plant Evolution. *Genome Research*. 20:1545–1557.
- Ohri D, 1998. Genome Size Variation and Plant Systematics. *Annals of Botany*. 82:75-83.
- Ozkan H, Tuna M, Galbraith DW (2006) No DNA loss in autotetraploids of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Breed* 125:288–291.
- Özbek H (2011). KORUNGA (*Onobrychis viciifolia* SCOP.) Önemli Bir Arı Bitkisi. *Arı Bilimi*.11(2): 51-62.
- Öztürk M, Martin E, Dinç M, Duran A, Özdemir A, Çetin Ö (2009). A Cytogenetical Study on Some Plants Taxa in Nizip Region (Aksaray, Turkey). *Turkish Journal of Biology*. 33,35-44.
- Pellicer J, Fay MF, Leitch IJ (2010). The Largest Eukaryotic Genome of Them All? *Botanical Journal of the Linnean Society*. 164:10–15.
- Pellicer J, Garcia S, Valles J, Kondo K, Garnatje T (2013). FISH Mapping of 35S and 5S rRNA Genes in *Artemisia* subgenus *Dracuncululus* (Asteraceae): Changes in Number of loci During Polyploid Evolution and Their Systematic Implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 171, 655–666.
- Piper CV (1924). *Forage Plants and Their Culture*. New York: The Macmillan Co.
- Poczai P, Hyvönen J (2010). Nuclear Ribosomal Spacer Regions in Plant Phylogenetics: Problems and Prospects. *Mol Biol Rep*. 37:1897-1912.
- Ranjbar M, Hajmoradi F, Karamian R, (2012). An Overviev on Cytogenetics of the Genus *Onobrychis* (Fabaceae) with Special Reference to O. sect. *Hymenobrychis* from Iran.

- Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics. 65,187-198.
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004). Quantum Speciation in Aegilops: Molecular Cytogenetic Evidence from rDNA Cluster Variability in Naturalpopulations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2004) 14818-14823.
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A. 2008. Repetitive DNA and Chromosomal Rearrangements: Speciation Related Events in Plant Genomes. Cytogenetic and Genome Research. 120: 351–357.
- Rayburn AL, Auger JA, Benzinger EA, Hepburn AG (1989). Detection of Intraspecific DNA Content Variation in *Zea mays* L. by Flow Cytometry. Journal of Experimental Botany. 40: 1179–1183.
- Rayburn AL, Biradar DP, Bullock DG, Nelson RL, Gourmet C, Wetzel JB (1997). Nuclear DNA Content Diversity in Chinese Soybean Introductions. Annals of Botany 80: 321–325.
- Rechinger KH (1984). Hedysareae, In: Rechinger KH (ed) Flora Iranica, vol 157. Akademische Druck, Graz, pp 365–475.
- Robledo G, Seijo G (2008). Characterization of the Arachis (Leguminosae) D Genome Using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) Chromosome Markers and Total Genome DNA Hybridization. Genetics and Molecular Biology. 31, 717-724.
- Rochon JJ, Doyle CJ, Greef JM, Hopkins A, Molle G, Sitzia M, Scholefield D, Smith CJ (2004). Grazing Legumes in Europe: A Review of Their Status, Management, Benefits, Research Needs and Future Prospects. Grass and Forage Science. 59, 197-214.
- Rodinov AV, Gnutikov AA, Kotsinyan AR, Kotseruba VV, Nosov NN, Punina EO, Rayko MP, Tyupa NB, Kim ES (2017). ITS1–5.8S rDNA–ITS2 Sequence in 35S rRNA Genes as Marker for Reconstruction of Phylogeny of Grasses (Poaceae Family). Biology Bulletin Reviews. 7, 85–102.
- Sacristan UD (1996). Estudios Citotaxonmicos Sobre El Gnero *Onobrychis* (L.) Adamson. Anales Estac. Exp. Aula Dei 8: 1-114.
- Seijo G, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, Ducasse DA, Bertoli DJ, Moscone EA (2007). Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. American Journal of Botany. 94: 1963-1971.
- Serrano J, Puupponen-Pimia R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F (2009) Tannins: Current Knowledge of Food Sources, Intake, Bioavailability and Biological Effects. Mol Nutr Food Res. 53,S310-S329.
- Sepet H, Emre İ, Kıran Y, Kürşat M, Şahin A (2011). Karyological Studies on Eight Species of *Onobrychis* Genus in Turkey. Biologia 66, 996-1002.
- She C, Liu J, Diao, Y, Hu Z, Song Y (2007). The Distribution of Repetitive DNAs Along Chromosomes in Plants Revealed by Self-genomic *in situ* Hybridization. Journal of Genetics and Genomics. 34, 437–448.
- Singh RJ, Kim HH, Hymowitz T (2001). Distribution of rDNA Loci in the Genus *Glycine* Willd. Theoretical and Applied Genetics. 103, 212–218.

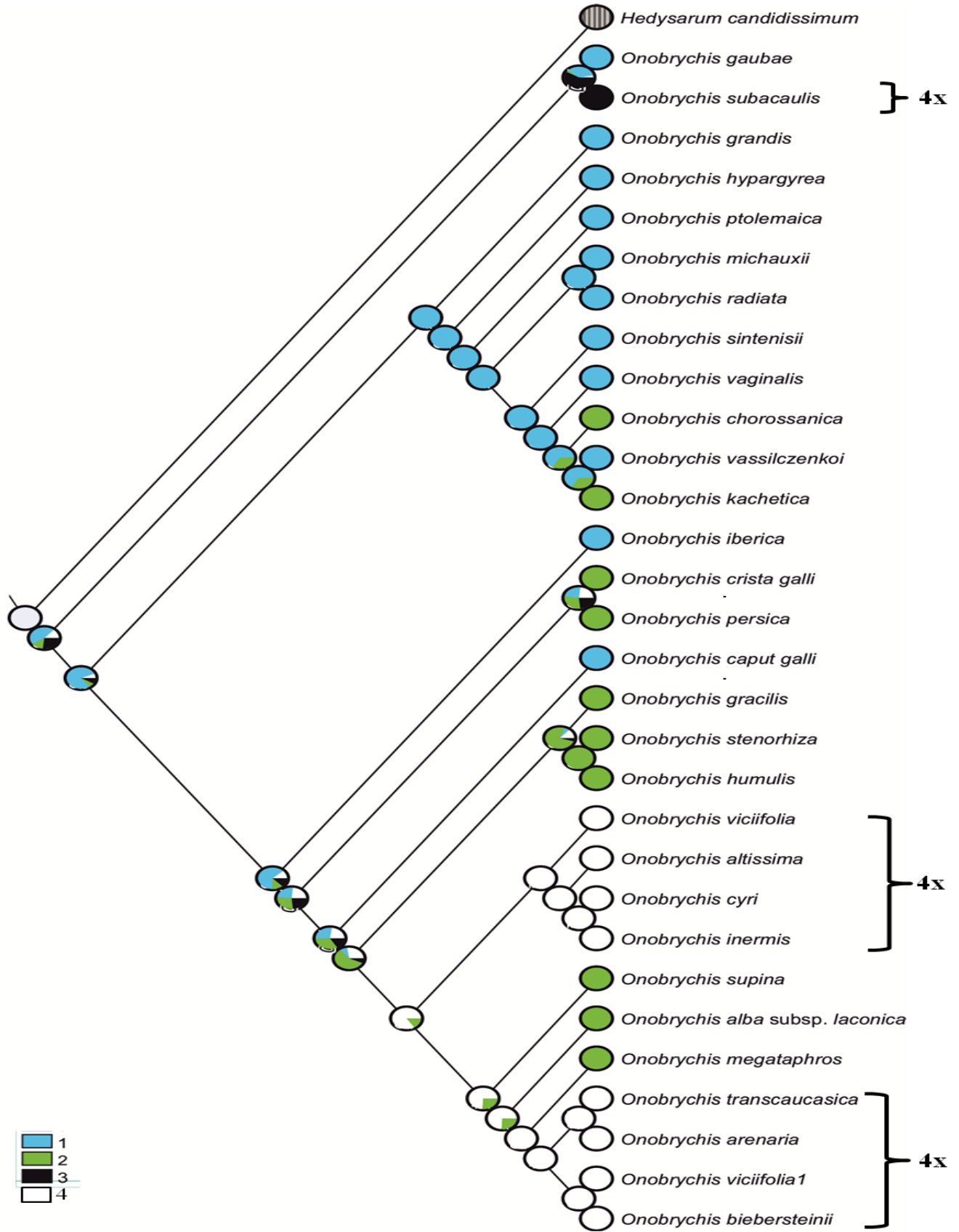
- Sirjaev G (1925) *Onobrychis* Generis Revisio Critica. Faculte' des Sciences de L'Universite' Masaryk, Brno.
- Siroky J, Lysak MA, Dolezel J, Kejnovsky E, Vyskot B (2001). Heterogeneity of rDNA Distribution and Genome Size in *Silene* spp. *Chromosome Research*. 9, 387:393.
- Somay Akçelik E, Avcı S, Uzun S., Sancak C (2012). Karyotype Analysis of some *Onobrychis* (sainfoin) species in Turkey. *Archives of Biological Science Belgrade*. 64, 567-571.
- Tan M, Sancak C (2009). Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Yem Bitkileri, Baklagil Yem bitkileri Rıza Avcioğlu, Rüştü Hatipoğlu, Yaşar Karadağ. *Emre Basımevi, İzmir*.337-352.
- Tel-zur N, Abbo S, Myslabodski D, Mizrahi Y (1999). Modified CTAB Procedure for DNA Isolation from Epiphytic Cacti of the Genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter*. 17, 249–254.
- Thomas HM, Harper JA, Morgan WG. 2001. Gross Chromosome Rearrangements are Occurring in an Accession of the Grass *Lolium rigidum*. *Chromosome Research*. 9: 585–590.
- Tuna M, Vogel KP, Arumuganathan K, Gill KS (2001). DNA Content and Ploidy Determination of Bromegrass Germplasm Accessions by Flow Cytometry. *Crop Science*. 41, 1629-1634.
- Unfried I, Gruendler P. 1990. Nucleotide Sequence of the 5.8S and 25S rRNA Genes and of the Internal Transcribed Spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*. 18: 4011.
- Valles Xirau J, Siljak Yakovlev S (1997). Cytogenetic Studies in the Genus *Artemisia* L. (Asteraceae): Fluorochrome-Banded Karyotypes of Five Taxa, Including the Iberian Endemic Species *Artemisia barrelieri* Besser. *Canadian Journal of Botany*.75(4):595-606.
- Vallès J, Pellicer J, Sánchez-Jiménez I, Hidalgo O, Vitales D, Garcia S, Martin J, Garnatje T. (2012). Polyploidy and Other Changes at Chromosomal Level and in Genome Size: Its Role in Systematics and Evolution Exemplified by Some Genera of Anthemideae and Cardueae (Asteraceae). *Taxon*. 61(4), 841–851.
- Venora G, Blangiforti S, Frediani M, Maggini F, Gelati MT, Castiglione MR, Cremonini R. 2000. Nuclear DNA Contents, rDNAs, Chromatin Organization, and Karyotype Evolution in *Vicia* sect. faba. *Protoplasma* 213: 118–125.
- Vershinin AV, Alkhimova EG, Heslop-Harrison JS (1996). Molecular Diversification of Tandemly Organized DNA Sequences and Heterochromatic Chromosome Regions in Some Triticeaea Species. *Chromosome Research*. 4, 517-525.
- Vitte C, Panaud O. 2005. LTR retrotransposons and Flowering Plant Genome Size: Emergence of the Increase/Decrease Model. *Cytogenetic and Genome Research*. 110: 91–107.
- Volf M, Hrcak J, Julkunen-Tiitto R, Novotny V (2015) To Each Its Own: Differential Response of Specialist and Generalist Herbivores to Plant Defence in Willows. *Journal of Animal Ecology*. 84 (4),1123-1132.
- Volkov RA, Medina FJ, Zentgraf U, Hemleben V (2004). *Molecular Cell Biology: Organization and Molecular Evolution of rDNA, Nucleolar Dominance and Nucleolus*

- Structure. In: Esser K, Luttge U, Beyschlag W, Murata J, eds. Progress in botany. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 65, 106–146.
- Wetzel JB, Rayburn AL (2000). Use of Fluorescence Genomic *in situ* Hybridisation (GISH) to Detect the Presence of Alien Chromatin in Wheat Lines Differing in Nuclear DNA Content. *Cytometry*. 41, 36-40.
- Xirau JV, Siljak-Yakovlev S (1997). Cytogenetic Studies in the Genus *Artemisia* L. (Asteraceae): Fluorochrome-Banded Karyotypes of Five Taxa, Including the Iberian Endemic Species *Artemisia barrelieri* Besser. *Canadian Journal of Botany*. 75(4):595-606.
- Yan H, Martin SL, Bekele WA, Latta RG, Diederichsen A, Peng Y, Tinker NA (2016). Genome Size Variation in the Genus *Avena*. *Genome*. 59, 209–220.
- Zakharyeva OI (1985). Chromosome Numbers of Some Flowering Plants from the Caucasus and Middle Asia. *Bot. Zhurn. SSSR*. 70(12): 1699–1701.
- Zarrabian M, Majidi MM, Ehtemam MH (2013) Genetic Diversity in a Worldwide Collection of Sainfoin Using Morphological, Anatomical, and Molecular Markers. *Crop Science*. 53 ,2483-2496.
- Zarrabian M, Majidi MM (2015). Genetic Diversity and Relationships within and among *Onobrychis* Species using Molecular Markers. *Turk J Bot*. 39, 681-692.

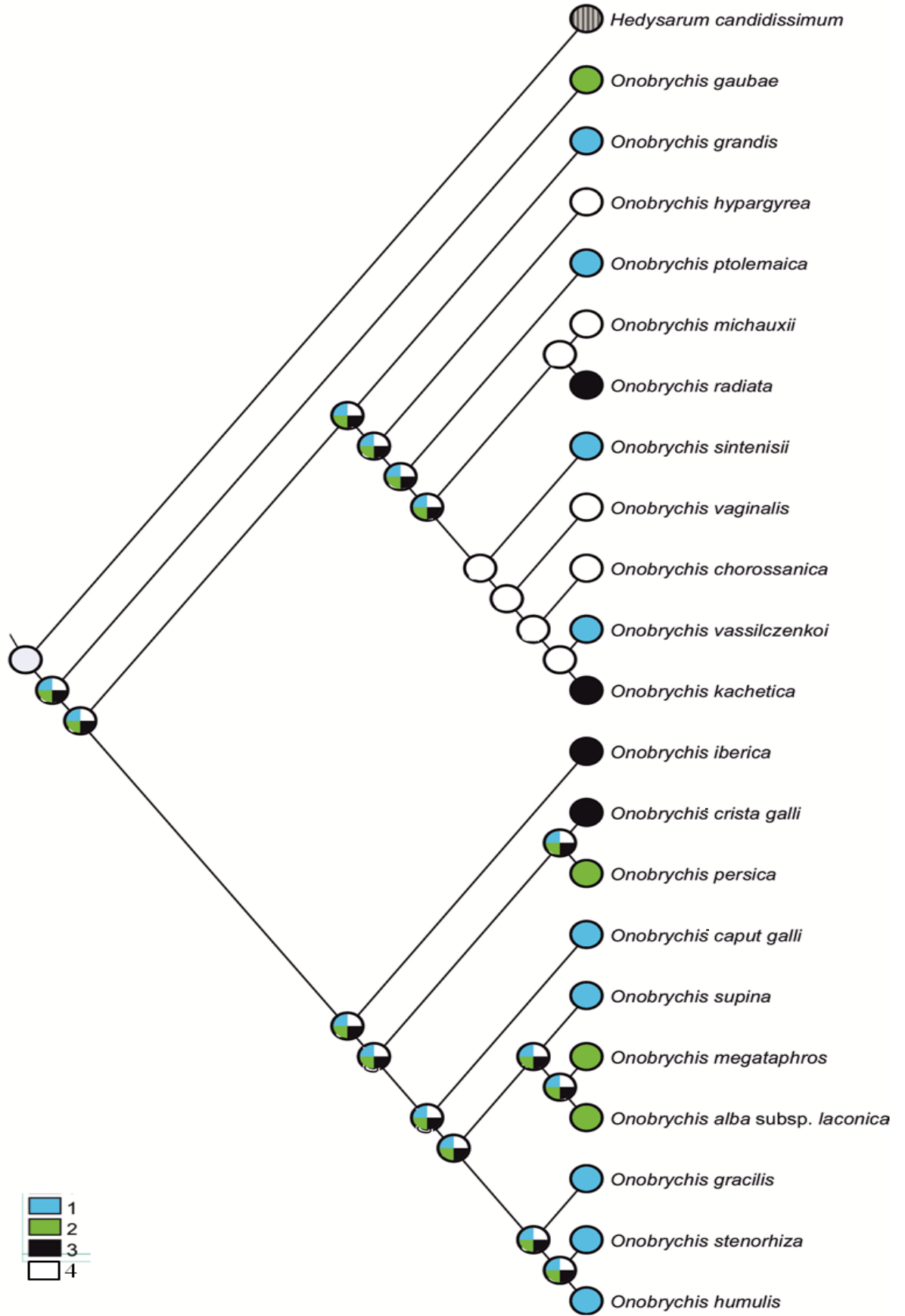
7. EKLER



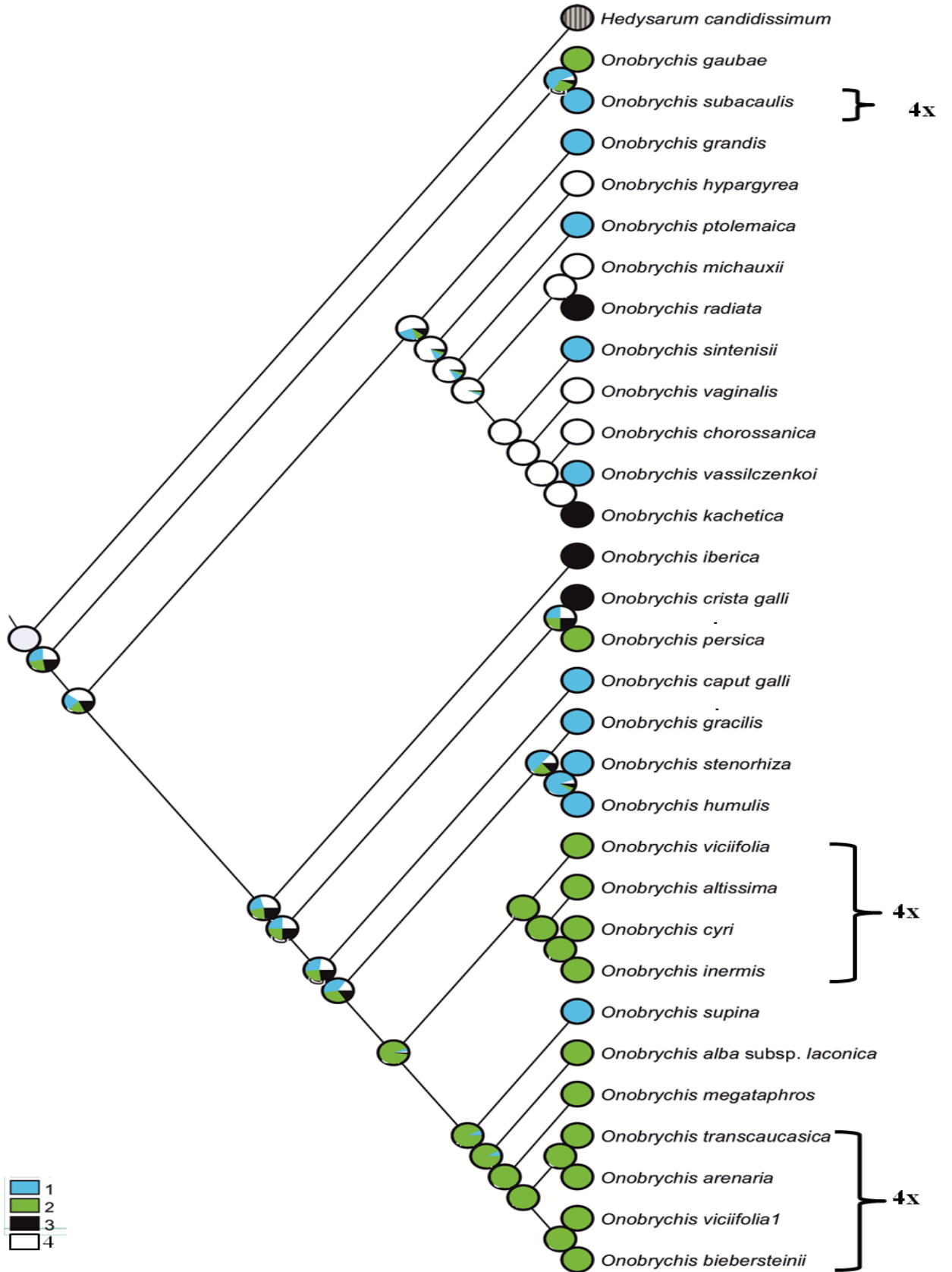
EK 1. Diploid *Onobrychis* türlerinde 5S rDNA homolog lokus sayılarının filogenetik filogram kullanılarak ML methodu ile analizi



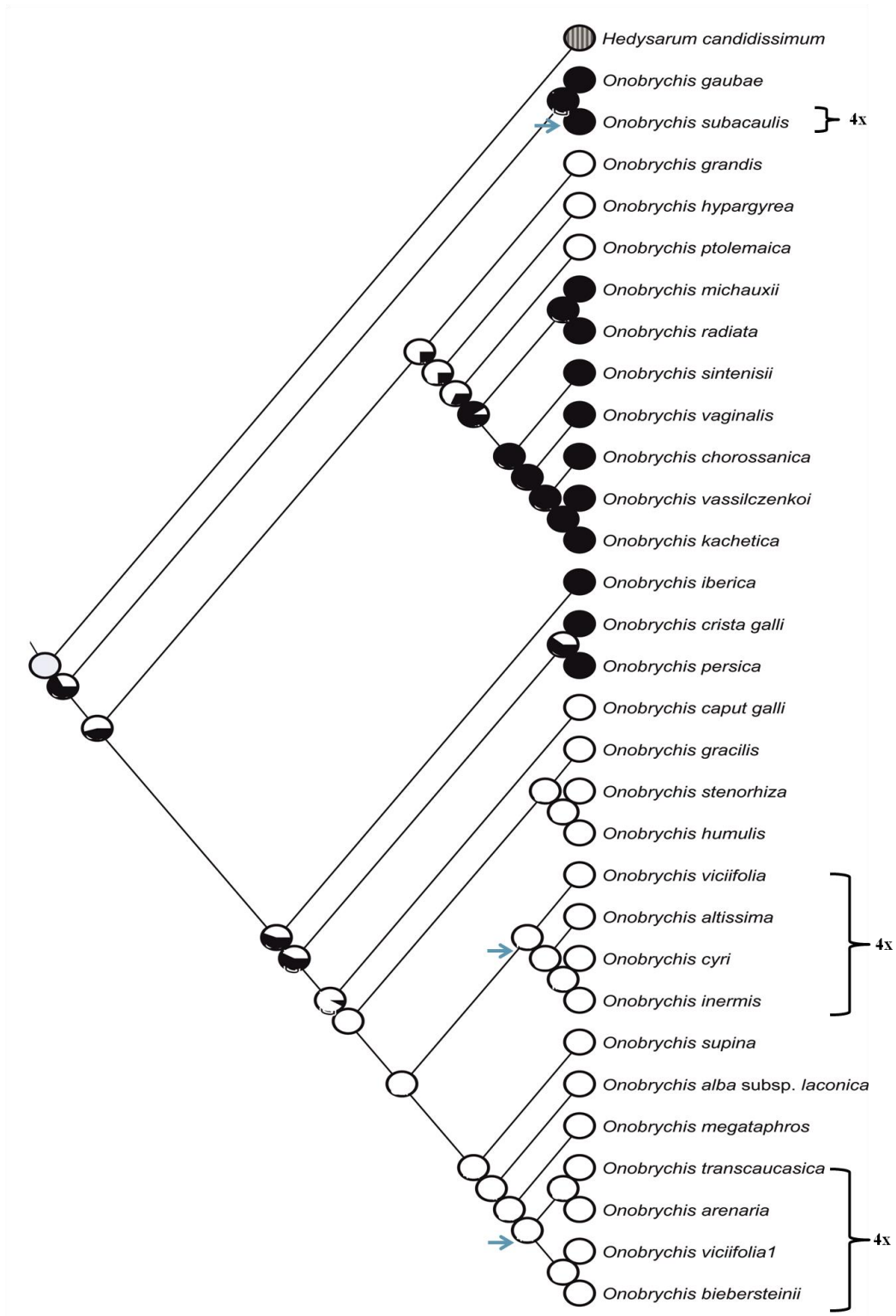
EK 2. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türlerinde 5S rDNA homolog lokus sayılarının filogenetik filogram kullanılarak ML methodu ile analizi



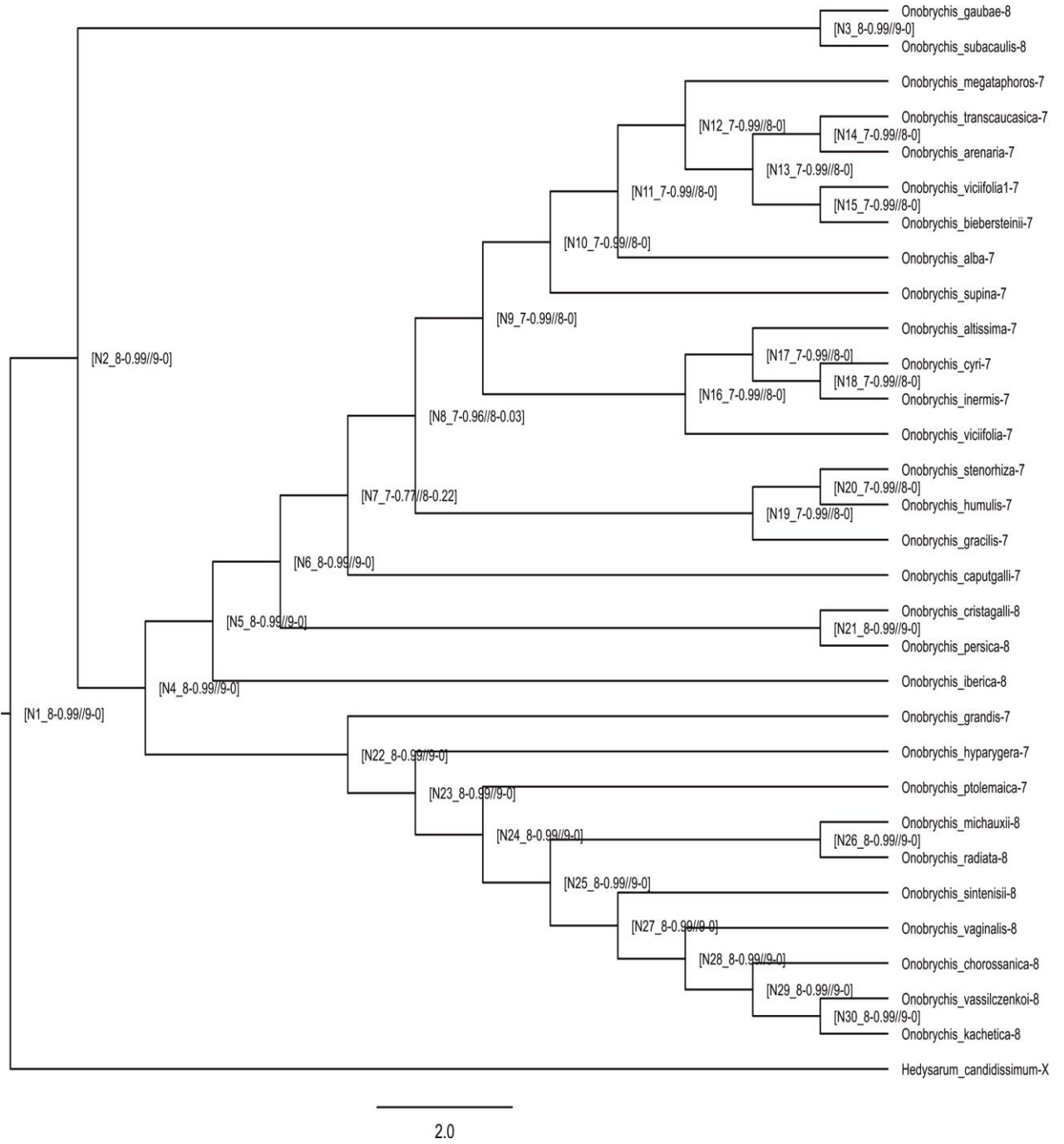
EK 3 Diploid *Onobrychis* türlerinde 35S rDNA homolog lokus sayılarının filogenetik filogram kullanılarak ML methodu ile analizi



EK 4 Diploid ve Poliploid *Onobrychis* türlerinde 35S rDNA homolog lokus sayılarının filogenetik filogram kullanılarak ML methodu ile analizi



EK 5. Diploid ve poliploid *Onobrychis* türlerinin temel kromozom sayılarının filogenetik filogram kullanılarak ML yöntemi ile analizi. Mavi ok poliploidizasyonu göstermektedir. Siyah küreler $x=8$, beyaz küreler $x=7$ göstermektedir



EK 6 ChromEvol. programı kullanılarak diploid ve poliploid *Onobrychis* türlerinin temel kromozom sayıları evriminin gösterilmesi

ÖZGEÇMİŞ

Tekirdağ/Çorlu'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Çorlu'da tamamladı. 2011'de Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde (2011-2013) yüksek lisans eğitimini tamamladı.

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler (SCI & SSCI & Arts And Humanities)

- Çördük N*, Yücel G., Akinci N., Tuna M., Esen O., 2018. In vitro propagation of *Silene bolanthoides* Quézel, Contandr. & Pamukç. and assessment of genetic stability by flow cytometry. Archives of Biological Sciences, vol. 70, pp. 141-148.
- Deniz İ.G., Genç İ*, Yücel G., Sümbül H., Sezik E., Tuna M., 2017. Karyomorphology and nuclear DNA content of sixteen *Ophrys* L. taxa from Turkey. Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology,.
- Savaş Tuna G*, Duyu G., Uzun K., YÜCEL G., Tuna M., 2017. Determination of Nuclear DNA Content and Ploidy of *Hypericum perforatum* L. Accessions Collected From Western Turkey. Tarım Bilimleri Dergisi, vol. 23, pp. 395-403.
- Çördük N., Akinci N*, Yücel G., Kaya N., Aki C., 2015. Evaluation of Genotoxicity and Cytotoxicity of Dodine (1-dodecylguanidium acetate) by Allium Test. Fresenius Environmental Bulletin. Vol:24(12) pp 4527-4531.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- Orhan Özalp Z., Ergönül O., Uysal T., Özer C., Tuna M., Yücel G., 2018. Kotiledon Aşamasındaki M. Palieri Üzüm Çeşidinde Kolhisin Uygulamalarının Morfoloji ve Ploidi Üzerine Etkileri. Bahçe Dergisi, vol 47, special ed 1.pp 709-715.
- Çördük N*, YÜCEL G., Akıncı N., Tuna M., 2017. In vitro Üretilen *Digitalis Trojana* Ivanina Bitkilerinin Genetik Kararlılığının Flow Sitometri ve Sitolojik Analizler ile Değerlendirilmesi. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty. Vol. 14 (1), 69-76.
- Çördük N., Akıncı N*, Kaya N., Yücel G., Akı C. Effects of dodine on total protein content and peroxidase activity in *Vicia faba* L. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 20 (3), 627-633, 2016.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler

- Yücel G., Yılmaz E.C., Şahin B., Savaş Tuna G., Aygün C., Kara I., Isık S., Aksakal E., Dumlu S.E., Uzun M., Terizoglu K., Atıcı M., Ozgoz M.M., Cakal S., Tuna M. Determination of Nuclear DNA Content and Ploidy of Newly Collected *Festuca ovina* Populations from Turkey by Using Flow Cytometer. EGF Eucarpia Symposium, Haziran 24-27, 2019.

- Yücel G*, Savaş Tuna G., Cabi E., Betekhtin A., Kolano B., Hasterok R., TUNA M. Physical Mapping of 5S rDNA and 35S rDNA Sequences on Somatic Chromosomes of Selected *Onobrychis* species. Plant Genome Stability and Change Conference, 3-6 Haziran 2018, Almanya.
- Şahin B., Yılmaz E. C., Savaş Tuna G., Yücel G., Tuna M. Analysis of Nuclear DNA Content and Ploidy in *Onobrychis* Gene Bank Accessions by Flow Cytometry. Plant Genome Stability and Change Conference, 3-6 Haziran 2018, Almanya.
- Tuna M.*, Yücel G., Şahin B., Savaş Tuna G., Ulutaş N. Hasterok R., Genome size, chromosome number and distribution patterns of rDNAs in some *Onobrychis* species. 6th Asia-Pacific Chromosome Colloquium, 4-5 Temmuz 2018, Avustralya .
- Savaş Tuna G., Yücel G., Kaygısız Aşçıoğlu T*, Önemlibıçak S., Tanyolaç M. B., Eşiyok D., Tuna M. Molecular Cytogenetic Characterization of Some Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Gene Bank Accessions. XXX. International Horticultural Congress, 12-16 Ağustos 2018, İstanbul Türkiye.
- Tuna M., Yılmaz E. C., Ulutaş N., Şahin B., Nizam İ., Yücel G., Cabi E., Savaş Tuna G., Aygün C., IŞIK Ş., Aksakal E., Dumlu Emre S., Uzun M., Terzioğlu K., Atıcı M., Merve Özgöz M., Çakal Ş., Sever Mutlu S. Classification of Fine Leaved Fescues (*Festuca* sp.) Collected From Anatolia By Using Flow Cytometer, XXX. International Horticultural Congress, 12-16 Ağustos, 2018, İstanbul Türkiye.
- Yılmaz E. C., Avcı S., Savaş Tuna G., Ulutaş N., Yücel G., Şahin B., Nizam İ., Sancak C., Cabi E., Tuna M. Genome Size of Some *Onobrychis* Species From Turkey, 22nd International Chromosome Conference, 2-5 Eylül 2018, Çek Cumhuriyeti.
- Çördük N., Yücel G., Akıncı N*, Karabıyık F. Ç., Tuna M., Esen O. Nuclear Dna Content And Chromosome Number Analyses In *Silene Bolanthoides* Quézel, Contandr. & Pamukç., An Endangered Endemic Species In Flora Of Turkey. BEWS2017 / 3-5 Nisan 2017, Antalya, Türkiye.
- Savaş Tuna G*, Yüce Berker., Yücel G., Kaygısız T., Nemli S., Tanyolaç B., Eşiyok D., Tuna M. Determination of Nuclear Dna Content Of *Phaseolus Vulgaris* L. Accessions Collected From Different Regions Of The World. 2.uluslararası Balkan Kongresi, 16-18 Mayıs 2017, Tekirdağ Türkiye.
- Yücel G.*, Savaş Tuna G., Betekhtin A., Cabi E., Hasterok R., Tuna M. Fish Analysis Of Sainfoin Chromosomes. 2. Uluslararası Balkan Kongresi, 16-18 Mayıs 2017, Tekirdağ Türkiye.
- Yücel G., Savaş Tuna G., Yılmaz E. C., Şahin B., Özer S., Bayhun G., Doğan E., Aygün C., Aras B., Efe B., Kara I., Ünal S., TUNA M*. Determination Of Nuclear Dna Content And Ploidy Of *Fescue* Populations Collected From Central Anatolia Region Of Turkey By Flow Cytometer 2.uluslararası Balkan Kongresi, 16-18 Mayıs 2017, Tekirdağ Türkiye .
- Savaş Tuna G., Şahin B., Yücel G., Aygün C., Cabi E., Kara I., Şahin B., Ediz Ü., Bilen B., PAŞA C., Ünal S., Aras B., Işık Ş., Acar R., Aksakal E., Terzioğlu K., Uzun M., Cebeci H., Atıcı M., Tuna M., Nuclear Dna Content And Ploidy Determination In *Agropyron Cristatum* (L.) Gaertn. Populations Collected From Diverse Regions Of Turkey By Flow Cytometry. 8.uluslararası Triticeae Sempozyumu,12-16 Haziran 2017.

- Çördük N., Akıncı N., Yücel G., Tuna M. The Influence of Plant Growth Regulator Concentrations on Somaclonal Variation in Regenerated Plants of *Silene bolanthoides* Quézel, Contandr. Pamukç., VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems, 4-7 Ekim 2017, Çanakkale Türkiye .
- Savaş Tuna G.,* Duyu G., Uzun K., Yücel G., Yılmaz A., Tuna M. Analysis Of The Relation Between The Ploidy Levels Of *Hypericum Perforatum* L. And The Amount Of Hypericin Produced. II. International Plant Breeding Congress And Eucarpia Oil And Protein Crops Section Conference, 1-5 Kasım 2015, Antalya Türkiye .
- Savaş Tuna G.,* Duyu G., Uzun K., Yücel G., Tuna M. Detection Of Nuclear Dna Content And Ploidy Levels Of *Hypericum Perforatum* L. Populations Present In The Natural Flora Of Turkey Using Flow Cytometry. II. International Plant Breeding Congress And Eucarpia Oil And Protein Crops Section Conference, 1-5 Kasım 2015, Antalya Türkiye.
- Çördük N., Akıncı N., Yücel G*, Kaya N., Akı C., Genotoxic Effects Of Dodine (1-dodecylguanidium Acetate) On Root Cells Of *Allium Cepa*. Second Scientific Conference on Ecology. 1 Kasım 2013, Plovdiv Bulgaristan .

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

- Akıncı N., Yücel G*, Çördük N., Kaya N., Akı C. Dodin Fungusitine Karşı *Vicia Faba* Bitkisinde Savunma Yanıtı. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir Türkiye.
- Yücel G*, Akı C. Borik Asitin Farklı Konsantrasyonlarının *Allium Cepa* Kök Ucu Hücreleri Üzerine Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Ekoloji Sempozyumu, 2-4 Mayıs 2013, Tekirdağ Türkiye.
- Yücel G*, Deniz İ, Akı C. Çanakkale İlinde Yaşayan Bireylerin Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (gdo) Hakkındaki Bilgi Düzeylerinin Tespiti Üzerine Bir Çalışma. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir Türkiye .