T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İÇ ANADOLU VE AKDENİZ BÖLGELERİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI *VICIA* L. TÜRLERİ ARASINDAKİ AKRABALIK İLİŞKİLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

MERYEM BOZKURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KONYA , 2009

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İÇ ANADOLU VE AKDENİZ BÖLGELERİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI *VICIA* L. TÜRLERİ ARASINDAKİ AKRABALIK İLİŞKİLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Meryem Bozkurt

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL
2009, 52 Sayfa

Jüri: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Doç. Dr. Hüseyin DURAL

Yrd. Doç. Dr. Ahmet TAMKOÇ

Bu çalışmada, Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Vicia* türleri arasındaki akrabalık ilişkileri ISSR- PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Araştırma konusu olan türler *Vicia sativa*, *V. cracca*, *V. hybrida* ve *V. palaestina*'dır. *V. sativa* ve *V. cracca* oldukça kompleks türlerdir ve çok sayıda alt tür ve varyete içerirler. Bu türlerin tür altı kategorideki taksonları arasındaki ilişkiler araştırmamızın ana konusu olmuştur. Çalışmada analizler için *V. hybrida ve V. palaestina* türleri dış grup olarak seçilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda toplam 31 primer denenmiştir. 9 primer tüm taksonlara cevap vermiştir. Taksonlar arasındaki ilişkileri gösteren dendrogramlar BİO-PROFİL BİO1-D++ programı aracılığı ile elde edilmiştir. Finalde kombine edilen verilere göre türler arasındaki Jaccard benzerlik indeksinin 0.61-0.84 arasında değiştiği saptanmıştır. Sonuç olarak, tüm türler dendrograma göre anlamlı bir biçimde birbirinden ayrılmış ve aralarındaki genetik ilişkiler ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Vicia*, ISSR markırları**, Türkiye**

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

The Determination of Relationships of Some *Vicia* L. Species Growing In Mediterranean and Central Anatolia by the Using Molecular Methods

MERYEM BOZKURT

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

2009, 52 pages

Jury: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Doç. Dr. Hüseyin DURAL

Yrd. Doç. Dr. Ahmet TAMKOÇ

In this study, the relationship of naturally growing some *Vicia* species in Turkey was researched by ISSR-PCR methods. The species researched are *V. sativa*, *Vicia cracca*, *V. hybrida* ve *V. palaestina*. *V. sativa* and *V. cracca* are very complex species and they including too many subspecies and varieties in level of sub special category. The main aim of our study has been to detect the relationship and interactions of the studied species. In this study, *Vicia hybrida* and *V. palaestina* have been selected as outer group for analyses. In result of this study, totally 31 primer have been tested but 9 primers have only answered to all studied taxa. The dendograms which display the relationship between the studied taxa have been obtained via BIO -PROFIL BIO1-D++ programme. Finally, Jaccard similarity index among studied species has been detected at interval of 0.61 and 0.84. As a result, all species studied have been separated meaningfully according to final dendogram and genetically relationships among them have been carried out.

Key Words: *Vicia*, ISSR markers**, Turkey**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresince her zaman destek ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL'a, her konuda desteğini gördüğüm, bilgi, beceri ve yorumlarından faydalandığım Öğr. Gör. Dr. Tuna UYSAL'a, moleküler çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübelerini paylaşan Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN'a, çalışma materyalimin toplanması esnasında ki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Yavuz BAĞCI'ya, Yrd. Doç. Dr. Osman TUGAY'a, ve Araş. Gör. Dr. Hakkı DEMİRELMA'ya, Selçuk Üniversitesi 08201029 nolu proje ile çalışmamda maddi destek sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğüne (BAP) teşekkür ederim.

Her zaman lisans ve yüksek lisans çalışmalarım süresince sabırlarını, maddi ve manevi olarak yardımlarını benden esirgemeyen başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

2009, Konya
Meryem BOZKURT

İÇİNDEKİLER

ÖZET……i

ABSTRACT……..ii

TEŞEKKÜR……iii

İÇİNDEKİLER……iv

TABLO VE ŞEKİLLERİN LİSTESİ……vi

SİMGELER VE KISALTMALAR……...vii

1.GİRİŞ……..1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI…….3

2.1. *Vicia* Cinsinin Ekonomik Açıdan Önemi ……..4

2.2. Sitogenetik Analizler İle İlgili Çalışmalar…….5

2.3. Moleküler Analizler İle İlgili Çalışmalar……..5

2.4. Protein Analizi İle İlgili Çalışmalar ……10

2.5. *Vicia* L. Cinsi Özellikleri……11

2.5.1. Sect. *Cracca* S. F. Gray…….11

***2.5.1.1. V*icia *cracca* L……...11**

2.5.1.2. *Vicia palaestina* Boiss.…….13

2.5.2. Sect. *Vicia* L……...14

2.5.2.1. *Vicia sativa* L ……..14

2.5.2.2. *Vicia hybrida* L.…….16

3. MATERYAL VE METOT…….17

3.1. Materyal……..17

3. 2. Sterilizasyon……...18

3.3 Metot…….18

3.3.1. DNA izolasyonu…….18

3.3.2. DNA konsantrasyonunun tayini…….19

3.3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)…….20

3.3.3.1. ISSR analizi……..20

3.3.4. Optimizasyon…….22

3.3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu bütün örneklere uygulanması…….23

3.3.6. Elektroforez……...23

3.4. DNA Bantlarının Skorlanması……..24

3.5. Veri Analizi…….24

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI…….25

4.1. Genotipler Arasındaki Genetik Farklılıklarının Saptanması……25

4.2. ISSR Primerlerinin Değerlendirilmesi ……26

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER……50

6. KAYNAKLAR……53

TABLO VE ŞEKİLLERİN LİSTESİ

TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 3.1, Araştırmada İncelenen *Vicia* Taksonları

Tablo 3.2, Örneklerin spektral sonuçları

Tablo 3.3, Çalışmada kullanılan Primerler, Primerlerin No'su , Nükleotid Dizilimleri, Baz Sayıları ve Yapışma Sıcaklıkları

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.1, ISSR PCR ile UBC 827 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü,

Şekil 4.2, UBC 827 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.3, ISSR PCR ile UBC 830 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü

Şekil 4.4, UBC 830 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.5, ISSR PCR ile UBC 808 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü

Şekil 4.6, UBC 808 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.7, ISSR PCR ile UBC 809 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü

Şekil 4.8, UBC 809 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.9, ISSR PCR ile UBC 812 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü

Şekil 4.10, UBC 812 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.11, ISSR PCR ile UBC 820 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü

Şekil 4.12, UBC 820 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.13, ISSR PCR ile UBC 818 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü

Şekil 4.14, UBC 818 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.15, ISSR PCR ile UBC 829 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü

Şekil 4.16, UBC 829 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.17, ISSR PCR ile UBC 834 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü

Şekil 4.18, UBC 834 primerine göre elde edilen dendrogram

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
ISSR: Inter Simple Sequence Repeat (Basit Sekanslar Arası Tekrarlar)
RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rasgele Çoğaltılmış DNA polimorfizmi)
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)
SSR: Simple Sequence Repeat (Basit Sekans Tekrarları)
bp: Baz çifti
CTAB: Setil trimetil amonyum bromür
dATP: Deoksi adenozin trifosfat
dCTP: Deoksi sitidin trifosfat
dGTP: Deoksi guanozin trifosfat
dTTP: Deoksi timidin trifosfat
dk: Dakika
l: Litre
M: Molar
MA: Moleküler ağırlık
mA: Miliamper
$MgCl_2$: Magnezyum klorür
ml: Mililitre
mM: Milimolar
HCl: Hidroklorik asit
DNA: Deoksiribo nükleik asit
EDTA: Etilendiamin tetraasetikasit
rpm: Dakikadaki döngü
Taq: Thermus aquaticus
TAE: Tris/Asetik Asit/EDTA (tampon çözeltisi)
Tm: Erime sıcaklığı
Tris: Tris (hidroksil metil) aminometan
Tris-HCl: Tris hidroklorür
UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average

(Ölçülmemis Grupların Aritmetik Ortalaması)

UV: Ultraviyole

V: Volt

w/v: Ağırlık / Hacim

W: Watt

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

NaCl: Sodyum klorür

ng: Nanogram

SDS-PAGE: Sodyum dodesil Sülfat

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

T : °C cinsinden sıcaklık

1.GİRİŞ

Dünyanın büyük bir bölümünde kültüre alınan ve tarımı yapılan önemli cinsleri içerisinde barındıran Fabaceae(Baklagiller) familyası, genellikle tarıma dayalı bir ekonomiye sahip olan ülkemiz açısından da oldukça önemlidir. Ülkemizde başta *Vicia sativa* ve *Vicia pannonica* olmak üzere *Vicia* cinsine ait birçok türün tarımı yapılmaktadır. *Vicia* cinsi, ülkemizde gerek türler arasında, gerekse tür içerisinde oldukça yüksek varyasyona sahiptir. Bu cins içerisindeki tür içi ve türler arası varyasyonların belirlenmesi ve taksonomik sorunların çözülmesi gelecekteki ıslah çalışmalarına yapacağı ekonomik katkı açısından oldukça önemlidir.

Varyasyonların tespitinde sitolojik veriler, izoenzimler, tohum depo proteinleri gibi biyokimyasal işaretleyiciler ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) gibi moleküler işaretleyiciler başarıyla kullanılmaktadır(Stuber 1992). Son yıllarda bitki araştırıcıları tarafından çok yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar, bitki populasyonundaki çeşitlilik veya bir populasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde % 100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilir(Gülsen ve Mutlu 2005). Araştırmacılar bu markırlar yardımıyla morfolojik olarak çok benzerlik gösteren tür, çeşit veya tipler, hatta ebeveynleri hakkında kesin bilgiler elde edebilmektedirler(Karaca 2002). DNA temelli markırlar morfolojik markırlarla karşılaştırıldığında genotipler ya da taksonomik gruplar arasında genetik akrabalıkları tahmin etmek için güvenilir bir araç sağlamaktadır.

Bitkilerde genetik çeşitliliği tahmin etmek için RAPD ve ISSR gibi farklı genomlar boyunca çoklu lokuslu örnekler verebilen dominant markırlar (seçiciler) kullanılmaktadır(Albertson ve ark. 1999; El-Rabey ve ark. 2002). Bu yüzden, filogenetik akrabalıkları çözmek için dominant markırların kullanım başarısında ISSR(Joshi ve ark. 2000; Wolfe ve Randle 2001) ve RAPD (Bowditch ve ark. 1993; Spooner ve ark. 1996) yaygın biçimde kullanılan tekniklerdir.

ISSR tekniği, ökaryot genom boyunca hızlı bir şekilde gelişen, mikrosatellit hedefi bol dizilerden oluşan, tek primerli DNA'nın PCR amplifikasyonunu

içermektedir(Kijas ve ark. 1995; Levinson ve Gutman 1987; Tautz ve Renz 1984)

ISSR tekniği; birbirine ters yönlü ve yakın olan mikrosatellit bölgelerin (100–3000 bp) amplifikasyonu esasına dayanan bir tekniktir. Mikrosatellitler genomda bol miktarda ve orantılı olarak dağılmış olarak bulunurlar. Bu şekilde primerler ile elde edilen PCR ürünleri SSR lokuslarıdır. Bu tekniğin en önemli avantajı ön bilgi gerektirmemesidir. ISSR tekniğinde kullanılan primerler 5' veya 3' ucunda rastgele genellikle 1–4 bazdan oluşan seçici baz dizilimlerine sahiptirler. Ancak seçici baz içermeyen primerlerde kullanılabilir. Bu teknikte basit tekrar dizileri içeren (15–24 bp) primerler SSR'lar arasında kalan bölgeleri çoğaltırlar, dolayısı ile bu özellikler ISSR tekniğine bazı olumlu yönler kazandırmaktadır. Bunlardan en önemlisi az miktarda DNA ile bu tekniğin yapılabilmesidir. Tekniğin uygulanmasının çok kolay olduğu ve maliyetinin çok düşük olduğu bilinmektedir (Kafkas 2006). ISSR tekniğinde, bir reaksiyonda çoklu bantlar elde edilebilmektedir.

Sınırlı sayıda olan doğal kaynaklarımızdaki genetik çeşitliliğin korunması ve gerektiğinde verimli bir şekilde kullanımları için bünyelerindeki genetik varyasyonun belirlenmesi gerekir. Bu varyasyonları tespit etmek amacıyla, yapılan araştırmalar sonucunda maliyet bakımından RAPD ve ISSR tekniklerinin avantajlı oldukları belirtilmiştir. Bunların ötesinde çalışılacak laboratuar olanakları göz önünde bulundurulduğunda, RAPD, SSR ve ISSR yöntemlerinin radyoaktif madde kullanımının olmadığı ve araştırma koşullarının sınırlı olduğu laboratuarlarda rahatlıkla kullanılabilecek yöntemler olduğu saptanmıştır(Pejic ve ark. 1998; Crouch ve ark. 1999; Arcade ve ark. 2000; Goulao ve ark. 2001; Belaj ve ark. 2003; Powell ve ark. 1996; Bachmann 1994; Mignouna ve ark. 2003; Rana ve Bhat 2005).

Bu çalışmanı temel amacı, *Vicia* cinsi içerisinde yer alan oldukça karmaşık ve polimorfik türler olan *V. sativa* ve *V. cracca* ile ilgili tür altı seviyede akrabalık ilişkilerini ortaya koymaktır. Bu amaç doğrultusunda her iki tür kompleksine uzak akraba *V. hybrida* ve *V. palaestina* türleri dış grup olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Fabaceae familyasının bir üyesi olan *Vicia* L. cinsi, Avrupa, Asya, Kuzey ve Güney Amerika ılıman bölgeleri boyunca dağılan, tek yıllık, ya da çok yıllık otsu türleri kapsar. *Vicia*. cinsi *Lathyrus* L., *Lens* L. ve *Pisum* L. cinsleriyle birlikte *Vicieae* oymağına aittir. Türkiye Florasın da *Vicia* L. cinsi *Cracca*, *Ervum*, *Vicia* L. ve olmak üzere dört seksiyona ayrılmıştır (Davis 1970). Kupicha (1976) tarafından cins, monografik özelliğine göre *Vicia* ve *Vicilla* (Schur) Rouy olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Maxted (1993) tarafından yapılan kapsamlı taksonomik çalışmada *Vicia* cinsi, seçilen farklı diagnostik karakterlere bağlı olarak *Cracca* S. F. Gray., *Ervum*(L.) S. F. Gray., *Vicia* L. ve *Faba* Aschers. & Graebn..'yı kapsayan üç ya da dört büyük gruba ayrılmştır. Bu grublandırmada *Faba* bazen alt cins bazen de ayrı bir cins olarak değerlendirimiştir. Cins, dünyada 150 türle temsil edilir.

Fabaceae familyasının ülkemizde 69 cinsi vardır. Bu cinslere ait takson sayısı 1128 olup, endemik tür sayısı 375'dir. Familyanın endemizm oranı % 39.1 civarındadır. *Fabaceae* familyasında en kalabalık taksona sahip cinslerinden biri olan *Vicia* L. cinsi, ülkemiz ve Doğu Ege adalarından yeni ilave edilen türlerle birlikte, 64 tür, 23 alt tür ve 21 varyete olmak üzere 92 takson içermektedir Türkiye'de *Vicia* cinsine ait 5 tür ve 3 alt tür endemiktir, tür bazında endemizm oranı % 8.5' dir Takson bazında endemizm oranı % 26.3 civarındadır. *Vicia* cinsinin bazı türleri (*V. sativa*, *V. faba*, *Vicia ervilia* vb...) ülkemizde kültüre alınmıştır ve halen tarımı yapılmaktadır (Davis 1970; Davis ve ark.1988; Güner ve ark. 2000).

Vavilov (1951), Türkiye'nin özellikle adi fiğ için (*Vicia sativa* L) gen merkezi olduğunu belirtmektedir.

Davis (1970), Bu cinse ait türler arasında oldukça yüksek varyasyona rastlandığını, varyasyonun oldukça yaygın olduğunu, tür altı kategorilerdeki birey sayısının da oldukça yüksek olduğunu bildirmiştir.

Açıkgöz (1991), fiğ türlerinin geniş bir yayılma alanı olduğunu ve Türkiye'nin de fiğin anavatanı içerisinde yer aldığını belirtmektedir.

2.1. *Vicia* Cinsinin Ekonomik Açıdan Önemi

Vicia cinsinin, bazı türleri ekonomik olarak kullanışlı bitkilerin önemli bir grubunu oluşturur (Gençkan 1992). Fabaceae familyasının bazı türleri hem insan hem de hayvanlar için ucuz protein kaynağıdır (Tewatia ve Virk 1996).

Baklagiller ailesinin yüksek protein içerikleri kadar, yüksek yağ içerikleri de dikkat çekmiş ve bu nedenle yağ asit içerikleri geniş çapta incelenmiştir (Smouse ve Chang 1967; Howells ve ark. 1972; Onochie 1972; Grela ve Gunter 1995). Soya fasulyesi ve yer fıstığı hariç diğer legümen türlerinin yağ içeriğinin genellikle düşük olduğu tespit edilmiştir (Jones ve Earle 1966). *Vicia* cinsinin farklı türlerinde yağ asit ve toplam lipit içeriği üzerine yapılan bir araştırmada, türlerdeki lipit içeriğinin % 2.30-3.91 arasında değiştiği belirlenmiş ve başlıca doymuş yağ asitlerinden stearik ve palmitik asit, doymamış yağ asitlerinden de oleik, linoleik ve linolenik asitleri daha fazla bulundurdukları gözlenmiştir (Akpinar ve ark. 2001).

Baklagiller yağ asit içeriğine göre ilk kemotaksonomik çalışma, Wolff ve Kwolek (1971) tarafından yapılmış ve kemotaksonomik verilerin morfolojik verilere göre daha güvenilir ve tatmin edici olduğunu rapor etmişlerdir.

Bazı çalışmalar sonucunda legümenlerdeki doymamış yağ asidi içeriğinin birbirine benzer olduğu ve esas olarak oleik ve linoleik asitleri içerdiği tespit edilmiştir (Kwieicinska ve Matyka 1986, Daulatabad ve ark. 1987).

Bağcı ve ark. (2004) legümenlerdeki farklı cinslerine ait yağ asit içeriğinin karşılaştırılmasına yönelik yaptıkları çalışmalar da temel olarak oleik, linoleik ve linolenik asitleri içerdiklerini ve bu yağ asitlerin türler arasında oldukça değişkenlik gösterdiklerini desteklemektedir.

2.2. Sitogenetik Analizler İle İlgili Çalışmalar

Vicia sativa türünün temel kromozom sayısı n=6 olduğu rapor edilmiştir (Beyazoğlu ve Hayırlıoğlu 1991; Tiţă ve ark. 1992).

Vicia sativa subsp. *sativa* alt türünün temel kromozom sayısının n=6 olduğu rapor edilmiştir(Elçi 1965; Davis ve Plitmann 1970; Maxted ve ark. 1991).

Vicia sativa subsp. *nigra* (L.) Ehrh. alt türünün temel kromozom sayısının n=6, 7 olduğu rapor edilmiştir (Tutin 1968; Davis ve Plitmann 1970).

Vicia sativa subsp. *incisa* var. *cordata*(Wulfen ex Hoppe) Arc. varyetesinin temel kromozom sayısının n=5 olduğu bildirilmiştir (Raina ve ark. 1983; Kamari, ve ark. 1994).

Vicia cracca subsp. *cracca* alt türünün temel kromozom sayısı n=7 olarak bildirilmiştir (Şahin ve Babaç 1990, Beyazoğlu ve Hayırlıoğlu 1991; Akpınar ve Bilaloğlu 1997; İnceer ve ark. 2002)

Vicia hybrida türünün temel kromozom sayısı n=6 olarak rapor edilmiştir (Meriç ve Olgun 1994).

2.3. Moleküler Analizler İle İlgili Çalışmalar

DNA seviyesindeki varyasyonu belirleyebilen metotlar, özellikle yakından ilişkili genotipler arasındaki ayırım için oldukça etkili yöntemlerdir (Hartl ve Seefelder 1998). Bu yöntemlerden biri dominant markır olan RAPD olup birkaç cinsin yakından ilişkili genotipleri arasındaki genetik varyasyonu belirleme kapasitesi ve kolaylığı sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır. *Malus* (Koller ve ark. 1993; Harada ve ark 1993; Yae ve Ko 1995), *Citrus* (Deng ve ark. 1995), *Pyrus* (Bellini ve Stefania 1997), *Brassica* (Jain ve ark. 1994), *Solanum* (Hosaka ve

Hanneman 1994), *Petunia* (Cerny ve ark.1996), *Pisum* (Hoey ve ark. 1996), *Prunus* (Gregor ve ark. 1994; Chaparro ve ark. 1994; Warburton ve Bliss 1996; Ortiz ve ark. 1997, Hashmi ve ark. 1997; Heinkel ve ark. 2000), *Corylus* (Galderisi ve ark. 1999), *Vitis* (Wang ve ark. 1999), *Persea* (Kobayashi ve ark. 2000), *Morus ssp*. (Vijayan 2004) gibi birçok çalışmada RAPD markırlarından yararlanılmıştır. Yine, kültür identifikasyonu (Yang ve Quiros 1993), nesil belirlenmesi (Elisiairo ve ark. 1999), genetik ilişkilerin değerlendirilmesi (Nicese ve ark. 1998) ve popülasyonların genetik varyasyon tahminleri (Harrison ve ark. 1997) RAPD'nin kullanım alanlarındandır.

Ayrıca *Vigna* (Fabaceae) cinsine ait farklı popülâsyonların varyasyon çalışmaları için izoenzim, tür içi ve türler arası genetik bağlantı için RAPD markırları kullanılmıştır. 13 izoenzim lokusunun 7'sinin polimorfik olduğu gözlenmiş, türler arasındaki genetik varyasyonun çok düşük olduğu, popülasyonlar arasındaki varyasyonun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. RAPD analizleri daha ayırt edici olup toplam 85 banttan 66 sının polimorfik olduğu tespit edilmiştir. İzozim verileriyle oluşturulan dendrogram da iki *V.marina ssp. marina*, *V. luteola* ile ayrı olarak gruplandırılmıştır. RAPD verileriyle oluşturulan dendrogram ise, birbirine benzeyen üç takson üç temel grupta gösterilmiştir. Bu verilere göre, *V.marina* ssp. *oblonga* akraba olan *V. luteola*'dan *V.marina* ssp. *marina*'ya daha yakın olduğu saptanmıştır(Sonnante ve ark. 1997).

Araştırma konusu olan *Vicia* cinsi ile yakın akraba *Lathyrus* cinsindeki, beş farklı mürdümük türüne ait (*Lathyrus sativus, L. cicera, L. ochrus, L. sylvestris* ve *L. latifolius*) farklı coğrafik orijinli 9 popülasyon üzerinde RFLP ve RAPD markırları ile analiz yapılmıştır. RFLP ve RAPD analizi sonuçlarına göre *L. ochrus*'un diğer türlerden genetik olarak açıkça ayrıldığı bildirilmiştir. *L. sativus* türü ile *L. cicera* türlerinin yakın akraba oldukları ve bu iki türün bir melezleme sonucu ortaya çıkmış olabilecekleri veya ortak bir ebeveyne sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca, *L. sylvestris* türü ile *L. latifolius* türünün filogenetik bir yakınlığın saptandığı bildirilmektedir(Chtourou-Ghorbel ve ark. 2001).

Potokina (1997), yaptığı çalışmada RAPD analizleri ve tohum protein elektroforezi *Vicia segetalis* üzerinde iki coğrafik grup göstermiştir: Kırım - Kafkasya ve Orta Asya. Bölgeler arasında kesin ayırıcı özellik fenotipik düzeyde keşfedilmemiştir. *V. segetalis* için morfolojik çeşitliliğin merkezi Kırım ve

Kafkasya'dan ziyade Orta Asya olduğu görülmüştür.

Samuelsson ve ark. (1997), *Vicia pisiformis* (Fabaceae) popülasyonları arasındaki varyasyon, morfolojik analizler ve RAPD markır sistemiyle incelemişlerdir. Popülasyon içi ve popülasyonlar arasında morfolojik farklılıkların olmasına rağmen, çalışılan 11 RAPD primeriyle popülasyon içi ve popülasyonlar arasındaki varyasyon düşük bulunmuştur.

Potokina ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada Akdeniz ülkelerinden elde ettikleri *Vicia macrocarpa*'nın üç, *V. cordata*'nın iki çeşidi ve *V. sativa*'nın dört kültür çeşidi ile Sovyetler Birliğinden elde edilen *V. sativa* grubunu oluşturan bir popülasyonla 58 doğal *Vicia* taksonu arasındaki genetik uzaklıklar RAPD-PCR ve SDS-PAGE elektroforez yöntemleriyle incelenmişlerdir. Sonuçta bu iki metodun popülasyonlarda gözlenen genetik varyasyonla ve onların coğrafik dağılımları arasındaki ilişki tespit edilmiştir.

Agar ve ark. (2006), yağ asitleri (FAs) ve RAPD profillerini 12 *Vicia* taksonu arasındaki fenotipik ve genetik akrabalıkları dikkatle gözden geçirmek için kullanmışlardır. 125-2500 bp büyüklüğünde toplam 156 amplikon 12 *Vicia* taksonundan sekiz primerle üretilmiştir. Tüm *Vicia* türlerinin RAPD profilleri farklı olmasına rağmen, genetik olarak üç ayrı grup test edilen türler arasında bulunmuştur. Genetik ve fenotipik akrabalıkları incelemek için kullanılan RAPD ve FAME analizleri *Vicia*'nın fark ve sınıflandırılmasında ve muhtemelen diğer bitki tür ve taksonlar için faydalı bir metot olduğunu bildirmişlerdir.

Bahgat ve ark. (2008), *Vicia faba* L. türünün genetik stabilitesi RAPD analizleri yapılarak gözlenmiş, iki bakla kültürü 'Giza 2' ve '24 Hyto' bu amaç için kullanılmıştır. Giza 2'nin genetik stabilitesinin 24 Hyto'dan daha çok olduğu gösterilmiştir. Sonuçta, baklanın besin değerini geliştirmek için bakla kültürlerinin kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Haider ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada bakla ve onunla ilişkili olan *Vicia* türleri arasındaki genetik çeşitliliği tanımlamayı amaçlamışlardır. Altı *Vicia* cinsi içerisinde on üç takson (*V. sativa*, *V. villosa*, *V.monantha*, *V. narbonensis* ve *V. cinerea*, ek olarak, *V. faba*) Mısır'ın Kuzey-Batı Kıyı bölgelerinden toplanmıştır. Elektroforetik protein örnekleri farklı *Vicia* türlerinin yanı sıra aynı türün taksonları arasında açık farklılıklar göstermiştir. Üç izozim sistemi (glutamat okzaloasetat

transaminaz, amilaz ve esteraz) kuru tohumlarda incelenmiştir ve *V.faba* L. ve *V.narbonensis* türünün diğer türlerden farklı spesifik izozim örneklerine sahip olduğu bulunmuştur. DNA seviyesindeki çeşitlilik, farklı *Vicia* türleri arasındaki farklılıklar ve aynı türün taksonları arasındaki önemli benzerlikler açık olarak RAPD-PCR analizleri ile gösterilmiştir. Sonuçlar *V. monantha*'nın *V. villosa* ve *V. cinerea* ile çok yakın olduğunu göstermiştir. *V.faba* L. ve *V.narbonensis*'in tamamen ayrı olduğu bildirilmiştir.

Son zamanlarda dominant bir markır olan ISSR, tür ve türler arası varyasyonu belirlemede daha çok kullanılmaktadır. *Gossypium* (Liu ve Wendel 2001), *Hordeum* (Fernandez ve ark. 2002; Tanyolaç 2003; Agnese ve ark. 2004), *Oryza granulata* (Wu ve ark. 2004), *Olea europaea* (Essadki ve ark. 2006), *Populus* (Jianming ve ark. 2006), *Jurinea* (Doğan ve ark. 2007), *Eucalyptus grandis* (Okun ve ark. 2008) gibi birçok çalışmada ISSR markırından yararlanılmıştır.

ISSR baklagilleri içeren birçok tahıl türünde kullanılmıştır (Ratnaparkhe ve ark. 1998, Bornet ve Branchard 2001, Iruela ve ark. 2002, Rajest ark. 2003). Ayrıca ISSR genetik haritalamada fayda sağlamakta ve markır seçimine yardım etmektedir (Zietkiewicz ark. 1994, Ratnaparkhe ark. 1998, Rubeena ve ark. 2003).

ISSR tekniği PCR'a dayalı mikrosatellitleri de içine alan tekrarlanabilirliği ile yüksek bir tekniktir (Reddy ve ark. 2002a). Bu yöntem birçok kültür bitkisine uygulanmış bir metottur. ISSR analizleri mısır (Kantety ve ark. 1995) ve fasulyede (Métais ve ark. 2000) genetik çeşitliliği değerlendirmenin yanı sıra patates (Prevost ve Wilkinson 1999) ve limon (Fang ve Roose 1997) kültürlerini teşhis etmek için kullanılmıştır.

Reddy ve ark. (2002b), *Cicer arietinum* L. türünde yapmış oldukları çalışmada ISSR tekniğin kültür bitkilerinde uygulanabilirliğini ortaya koymuşlardır. Bu metotla yüksek oranda polimorfizm bulduklarını açıklamışlardır.

Galvàn ve ark. (2003), Arjantin orijinli 10 ve Fransa orijinli üç fasulye(Phaseolus vulgaris L.) genotipinde genetik çeşitliliği ve genotipler arası ilişkileri saptamak amacıyla 23 ISSR primeri kullanmışlar ve bu primerlerin dokuz adedinin polimorfik olduğunu, bu polimorfik primerlerin 75 adet polimorfik bant oluşturduğunu, oluşan bantların büyüklüğünün 300-2400 bp arasında değiştiğini, 33 adet polimorfik bantın tanımlanabilir olduğunu, trinükleotid motif primerleri ile

oluşturulan ISSR markırlarının % 53'ünün polimorfik olmasına karşılık, dinükleotid primerleri ile oluşturulan ISSR markırlarının % 38'inin polimorfik olduğunu, ISSR markırlarının incelenen genotipleri Peru ve Arjantin gen havuzu orjinli ve Orta Amerika gen havuzu orijinli olmak üzere iki gruba ayırdığını, Fransa orijinli genotiplerin Peru ve Arjantin gen havuzu orijinli grup ile % 72 genetik benzerlik gösterdiğini, Fransa orijinli genotiplerin Arjantin orijinli genotiplere göre daha az genetik varyasyon gösterdiğini bildirmişlerdir.

Sica ve ark. (2005), İtalya orjinli *Asparagus acutifolius* L. çeşitleri arasındaki genetik çeşitliliği incelemek amacıyla ISSR moleküler markır tekniğini kullandıkları çalışmada; 23 ISSR primeri kullanarak toplam 228 polimorfik bant elde ettiklerini, çeşitler arasında geniş bir varyasyon tespit ettiklerini, UPGMA analizi ile genotipleri net bir şekilde coğrafik orjinlerine göre ayrılabildiğini belirtmişlerdir.

Araştırma konusu olan *Vicia* cinsi ile yakın akraba *Lathyrus* cinsindeki genetik çeşitliliği değerlendirmek amacıyla ISSR tekniği ile *Lathyrus* seksiyonuna giren *L. sativus* L. ve *L. cicera* L. türleri ile *Clymenum* (Adans.) DC. seksiyonuna giren *L. ochrus* DC. türleri üzerinde yapılan çalışmada, 4 ISSR primeri kullanarak toplam 60 polimorfik DNA bandı saptanmış, bir ISSR primerinde elde edilen 500 bp uzunluğundaki bandın *Clymenum* seksiyonunda bulunmadığının ortaya çıktığı bildirilmiştir. Araştırıcılar, elde ettikleri bulguların mürdümükte tür içi ve türler arası yüksek bir moleküler polimorfizm bulunduğunu gösterdiğini bildirmektedirler. Bu çalışma *Lathyrus* seksiyonları arasında ya coğrafik orjinli geniş bir yayılma alanından popülasyonların genetik çeşitliliğini değerlendirmek için ya da moleküler ayrım için ISSR prosedürün etkinliğini kanıtlamıştır (Belaid ve ark. 2006).

Terzopoulos ve ark. (2008) tarafından *Vicia faba* türü ISSR markırları ile analiz edilmiştir.190'ı polimorfik olan (% 98.9), total 192 DNA bandı rapor edilmiştir.

Duran ve ark. (2004) *Vicia* ile yakın ilişkili diğer bir cins olan *Lens* cinsine ait 22 örnekli bir koleksiyonun genetik varyasyonunu RAPD ve ISSR markırlarıyla belirlemişlerdir. Koleksiyona ait kültür mercimek örnekleri; *Lens culinaris* ssp. *culinaris*, ve onun yabani atası *L. c.* ssp. *orientalis*, Aynı zamanda cinsin diğer yabani türleri olan *L. odemensis*, *L. ervoides*, *L. nigricans*, *L. tomentosus*, ve *L. lamottei*'yi içerir. Kültür olan materyal içinde varyasyon derecesi düşük olmasına rağmen, RAPD (% 91.3) ve ISSR (% 98.8) markırları tüm koleksiyonda yüksek

sayıda polimorfik markır üretmiştir. ISSR markırları RAPD markırdan ortalama daha fazla bant üretmiş ve daha fazla polimorfik olduğu görülmüştür. Bu markırların mercimek kültürlerini teşhisini gerçekleştirmeye fayda sağladığı belirtilmiştir

2.4. Protein Analizi İle İlgili Çalışmalar

Potokina ve Eggi (1999), *Vicia sativa* ve *Vicia angustifolia*'nın farklı coğrafik bölgelerden toplanan 82 çeşidinin toplam proteinlerini SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle incelemişler, bu bantlara dayanarak *V. sativa*'da 6 tip protein, *V. angustifolia*'da ise 3 tip protein tanımlamışlardır. Neticede bu iki tür tohum protein profilleri ile kolayca birbirinden ayrılmıştır.

Beyazbenli ve ark. (2006), Konya bölgesindeki *Vicia* L. türlerinin tohum depo protein profillerini SDS-PAGE Yöntemi ile belirlemişlerdir. Çalışma sonucu protein profilleri çıkarılmıştır. Türler arasındaki genetik ilişkilerin değerlendirilmesi sonucu oluşan dendrograma göre *Vicia* türleri iki ana gruba ayrılmıştır. Bu grup üyelerinin genetik uzaklıklarının %18 ile %70 değerleri arasında değiştiği görülmüştür. SDS-PAGE ile ortaya konulan *Vicia* türleri arasındaki uzaklıklar Davis'in (1970) Türkiye Florası'ndaki morfolojik karakterlere göre belirlenmiş olan akrabalık derecesi ile uyumlu bulunurken birkaç türde farklı sonuçlar bulunmuştur.

2.5. *Vicia* L. Cinsi Özellikleri

Salgı tüyleri taşımayan, tek yıllık, iki yıllık ya da çok yıllık bitkiler; gövde kanatsız, genellikle tırmanıcı. Yapraklar genellikle tendril ya da bir mukro ile sonlanan paripinnat, nadiren imparipinnat; ağsı damarlanmaya sahip yaprakçıklar bir ya da çok çiftten oluşur, kenarları parçalanmamış ya da nadiren dişli. Stipullar düz ya da dişli, nektaryumlu veya değil. Çiçekler, bir ana eksenden çıkan rasem, ya da tek tek. Kaliks düzenliden, iki dudaklıya kadar değişir, gibboz ya da değil; kaliks dişleri eşit ya da farklı uzunlukta, yapraksı değil. Kanatlar serbest ya da kayıkçıkla birleşik. Stilus yukarı uca doğru pubescent tüylü ya da sadece aşağı kısmı sakalsı tüylü, nadiren sadece üst kısmında bir hat boyunca tüy mevcut veya tüysüz. Legüm (meyva) aşağı yukarı basık, bir ya da çok tohumlu, meyve suture kanatsız. Tohumlar hemen hemen küresel, bazen basık, hilum çoğu zaman uzunca.

Bu cins *Lathyrus* ve *Lens* ile oldukça benzerlik gösterir. Özellikle *Faba* seksiyonunda bulunan türler *Lathyrus'la* yakın ilişkidir. Bu cinsin çoğu türü hem çevresel farklılıklardan hem de genetik olarak oldukça yüksek varyasyon gösterirler. Homolog varyasyonu geniş yayışlıdır.

2.5.1. Sect. *Cracca* S. F. Gray

2.5.1.1. *Vicia cracca* L.

Zayıf, çok yıllık, dik veya tırmanıcı, hemen hemen tüysüz ya da basık tüylü. Yaprakçıklar (5-) 8-16(-20) çift, 0,8-4 cm, ovat-oblongdan lineara (ipliksi - şeritsi); Stipullar zayıf, semihastate, daima parçalanmamış; Tendriller dallanmış. Pedunkul kısa ya da yapraktan uzun; rasem 10-40 çiçekli, yoğun ya da gevşek. Çiçekler 13-18 (-20) mm, menekşe ya da lila renginde (nadiren beyaz). Kaliks 3-6 mm, hemen

hemen gibboz, genellikle morumsu, en aşağıdaki diş daha kısa kısmen tüpten daha uzun. Standart dudağı hemen hemen kılavın iki katı. Stilus yanlardan basık. Legümen (meyve) 20-30 mm, daima tüysüz. Tohumlar birden fazla.

Çok polimorfizm gösteren bu türü, özellikle kalıtsal varyasyonlardan ve fenotipik esnekliklerinden dolayı ayırt etmek çok zordur. Bu kompleks en fazla varyasyonu Balkanlar'da, Anadolu'da ve Kafkasya'da gösterir Türkiye için 5 tane alt tür tanımlanmıştır. Bunlar subsp. *cracca* ve subsp. s*tenophylla* birbirinden bariz farklıdır. *V. cracca* kompleksi Avrupa'da biyosistematik çalışmalara alındığı halde bu grubun Anadolu ve Kafkasya'da bulunanları için sitogenetik bir bilgi yoktur. Kafkasya'nın doğu sınırlarından tanımlanan birkaç türünün durumu kesin değildir. *V. cracca sensu lato* örnekleri *V. villosa* ile sık sık karıştırılır.

V. cracca L. subsp. ***cracca***

Gövdeler zayıf, tırmanıcı, basık pubeskent tüylü; yaprakçıklar 5-12-çift; en aşağıdaki kaliks dişleri tüp kadar, lanseolat; meyve oblong, kaliks içinde kısa bir stripte daralmış.

V. cracca L. subsp. ***atroviolacea*** (Bornm.) Davis

Çiçekler büyük, çok koyu menekşe, 13-18 mm uzunluğunda; pedunkul kısa, daima 2-4 cm, rasem birleşik; bitki erekt, yaprakçıklar daima 8-10-çift, oblong-lanseolattan oblonga, sık sık subsericeous; Standard dudağı kılav kadar(kısa); meyve subsp. *gerardii* gibi.

V. cracca L. subsp. ***stenophylla*** Vel

Yaprakçıklar darca şeritsi 10-30 × 0.5-2(-3) mm, aküt; yaprak ekseni narin; çiçek durumu genellikle gevşek, çiçekler genellikle daha fazla yayılmış; standard dudağı klavın 1.5 katına kadar; meyve oblik, oblanseyolat, diğer alt türlere göre tabanda tedrici(dereceli) olarak daha fazla daralmış.

V. cracca L. subsp. ***gerardii*** Gaudin

Yaprak sayısı 12-16(-22) çift; kaliks alt dişleri tüpden hafifçe daha uzun veya aynı boyda, subuleyt; meyve oblik, oblong, kaliks tüpünden daha uzun veya eşit büyüklükte bir stripte tedrici olarak daralmış.

2.5.1.2. *Vicia palaestina* Boiss.

15-80 cm boyunda, sarılıcı, seyrek basık tüylü, tek yıllık narin bitkiler. Yaprakçıklar (5-)6-10 çift, 5-30 x 0.5-3 mm, darca şeritsi mızraksı, aküt; stipullar küçük, semi-hastat; tendriller çoğunlukla dallı. Pedunkul yaprak uzunluğunun yarısı kadar, (2-)3-8(-10)-çiçekli. Pediseller 1-1.5 mm. Çiçekler 5-7(-9) mm. Kaliks

yaklaşık 2 mm, hemen hemen oblik ağızlı gibboz; dişler tüpten hafifçe daha kısa, mızraksı üçgenimsi standartın dudakları leylak mavi dudaktan daha kısa kılavlı; kanatlar beyazımsı mavi. Meyve romboit-oblong (13-)17-24 x 4-8 mm, subtoruloz, tüysüz. Tohumlar 1-4; çiçeklenme 3-5. aylar. Taşlık yamaçlar, *Quercus aegilops* ormanlarında ve stepte 1-1000m aralarında yayılış gösterir.

2.5.2. Sect. *Vicia* L.

2.5.2.1 *Vicia sativa* L.

Tüylüden subglabroza tek yıllık, 20-80(-100) cm, yatık gövdeli, dik ya da tırmanıcı. Yaprakçıklar (2-)4-8(-9)- çift, genellikle 10-40x2-15 mm, linear (şeritsi) ya da lanseolattan (mızraksı), oblong ya da ovata, nadiren derince dişli. Stipullar semihastate, dentat; tendriller genellikle dallanmış. Çiçekler 1-2(-3), aksiller, (10-)14-27(-30) mm, solgun pembeden morumsu menekşeye, nadiren beyaz; kısa pediselli, çok nadiren kısa pedinkullu. Kaliks 7-20 mm, çan şeklinde - tüpsü, hemen hemen düzenli, pubescent tüylü; dişleri (3-)5-11(-14) mm, neredeyse eşit, linear-subuleyt ya da lanseolat. Meyve (25-)35-65(-70) x 5-9 (-12) mm, linear, bazen gagalı genellikle pubeskent tüylü, 1-2 tohumlu. Tohumlar genellikle 6-12 adet, düz, 2-7 mm çapında. Hilum kısa.

Vicia cinsinin en fazla varyasyon gösteren (genetik ve fenotip olarak) kozmopolit türleridir. Cins içerisinde en çeşitlilik gösteren türlerden birisi kültürü de yapılan *Vicia sativa* türüdür. Türe ait kompleks içerisinde beş alt tür tanımlanabilir. *Vicia sativa*'nın alt türleri ve popülasyonları arasındaki değişkenlik birbirlerine göre benzerlik gösterir ve açıkçası bu varyasyonlar üst üste çakışır. Daha önceki çalışmalara göre, temel kromozom sayısında ve özellikle yaprakçık morfolojisinde büyük ölçüde varyasyon gözlenir. Türkiye florasındaki anahtara göre tanımlanan alt türler meyve ve çiçek özelliklerine göre iki ana gruba ayrılır. İlk ana grupta dimorfik çiçek ve meyve özelliği ile *V. sativa* subsp. *amphycarpa* yer alır. Diğer ana grupta ise

diğer dört alt tür varyeteleri ile birlikte yer alır.

V. sativa L. subsp. ***sativa***

Meyve hemen hemen toruloz, 45-70 x 6-10 mm; tohumlar 4.5-7 mm; kaliks dişleri genellikle 5-11 mm; korolla 20-26 mm; yaprakçıklar (5-)6-8(-9)-çift, linear veya oblongdan obovat, trunkeyt

V. sativa L. subsp. ***incisa*** (Bieb.) Arc. var. ***cordata*** (Wulfen ex Hoppe) Arc.

Tüm yaprakçıklar parçalanmamış, oblongtan obovat-küneyata; korolla daima iki renkli.

V. sativa L. subsp**. nigra** (L.) Ehrh var**. nigra**

Yaprakçıklar genellikle 1-6 mm genişliğinde, lineardan oblong veya oblanseolata, bazen eliptik, akütten retusa; kaliks 7-12 mm, dişler 2.5-7 mm; korolla (10-)14-20 mm, bitki narin gövdeli.

V. sativa L. subsp**. *nigra*** (L.) Ehrh var. ***segetalis*** (Thuill.) Ser. ex DC.

Yaprakçıklar genellikle 4-10 mm genişliğinde, oblong-lineardan oblong ovata akütsü çentikli; kaliks (8-)10-12 ve (-13) mm, dişler 4-8 mm; korolla 17-22 mm; bitki çalımsı gövdeli.

V.sativa subsp. *nigra* var. *segetalis* aslında var. *nigra* ve var. *cordata* arasındadır.

2.5.2.2. *Vicia hybrida* L.

15–80 cm boyunda, basık-piloz tüylü, tek yıllık, yatık, yükselici veya tırmanıcı bitkiler. Yaprakçıklar 4-7(-8)-çift, 5-20(-25) x 3-8 mm, obovattan oblanseolata, bazen tersüçgenimsi veya linear, tabanda tedrici olarak daralmış, trunkeyt'den çentikliye, nadiren obtuz; stipullar basit veya dallı, 2-3 mm, semihastat; tendriller basit veya dallı. Pedunkul yok; pedisel kaliksten daha kısa. Çiçekler tek, (18-)20-31(-35) mm, sülfür sarı. Kaliks 8-10 mm, kısmen gibboz, oblik ağızlı, piloz; dişler tüpden daha kısa, farklı uzunlukta, lanseyolat-linear. Standard üst yüzeyde yarı basık pubeskent tüylü, dudak genişliği yaklaşık kılav boyun kadar. Meyve oblong-romboyid, 20-35 x 6-12 mm, basık piloz tüylü. Tohumlar 2-5, çiçeklenme 3-5. aylar. Kayalık kireştaşı yamaçlarda, çayırlık yerlerde, sahil kıyılarında 1-1000 m yüksekliklerde yaylış gösterir.

Coğrafik olarak oldukça geniş bir alanda yayılış gösteren oldukça polimorfik bir türdür. Özellikle meyve boyutları, çiçek uzunluğu yaprakçık şekil ve sayısında büyük ölçüde varyasyon görülür.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan materyaller Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1, Araştırmada İncelenen *Vicia* Taksonları

Örnek No	Takson	Lokalite
VM2	*Vicia sativa* subsp *sativa*	Antalya-Alanya yol ayrımı, tarla kenarı ve içleri 10m, 23.05.2005 *Y.Bağcı 3240* & *T.Uysal*
VM12	*Vicia sativa* subsp *nigra* var. *nigra*	Hatay: İskenderun-Antakya yolu, Belen üstü, 560m, 21.05.2005, *K.Ertuğrul 3476 & O.Tugay*
VM13	*Vicia sativa* subsp *nigra* var. *segetalis*	Kepez üstü, Kepez, Antalya 281m, 23.05.2005, *Y.Bağcı*-3255-*T.Uysal*
VM15	*Vicia sativa* subsp *incisa* var. *cordata*	Kepez üstü, Kepez, Antalya 281m, 23.05.2005 *Y.Bağcı* 3250 & *T.Uysal*
VM16	*Vicia cracca* subsp. *cracca*	Niğde Aladağlar Mazmıl Dağı 1568m, 20.07.2005 *Y.Bağcı* 3382 & *H.Demirelma*
VM17	*Vicia cracca* subsp *gerardii*	Antalya - Alanya yol ayrımı, 0-10 m 23.05.2005, *Y.Bağcı* 3242& *T.Uysal*
VM18	*Vicia cracca* subsp *atroviolacea*	Yozgat; Yozgat çamlığı içi, 1400m, 22.07.2005 *Y.Bağcı* 3437 & *HD*
VM19	*Vicia cracca* subsp *stenophylla*	Belen yolu, Orman içi, 1550m, 23.05.2005, *Y.Bağcı* 3260 & *T.Uysal*
VM22	*Vicia hybrida*	Hatay: Antakya-Yayladağ arası, Çabala Köyü, 630 m, 22.05.2005, *K.Ertuğrul 3525* & *O.Tugay*
VM26	*Vicia palaestina*	Gaziantep: Fevzipaşa-Osmaniye arası, 5. km, 1000 m, 23.05.2005, *K.Ertuğrul* 3547 & *O.Tugay*

3. 2. Sterilizasyon

Çalışmada kullanılacak tüm çözeltiler, tamponlar, kullanılan tüpler ve pipet uçları 121ºC de 20 dakika otoklavda sterilize edilerek kullanılmış ve sterilizasyonun gerçekleştiğini ve kontaminasyonun olmadığını kontrol amaçlı deneylerin her aşamasında kontrol grubu eklenmiştir.

3.3 Metot

3.3.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu Soltis tarafından modifiye edilen Doyle'nin metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir(Soltis ve ark. 1991). Bitki materyalinden genomik DNA`nın elde edilmesi için toplanan bitki örneklerinin her birinin kuru yapraklarından 0,01 gr alınarak sıvı azot ile porselen havanda ezilerek toz haline getirilmiş, eppendorf tüpüne konulmuş daha sonra 65 ºC`da ısıtılmış DNA ekstraksiyon tamponundan [2 X CTAB] 500µl ilave edilerek aralıklarla karıştırılarak 60°C de 4 saat inkübe edilmiş ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerine 500 µl kloroform ilave edilmiş, 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüjden sonra sıvı kısım yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine tekrar 500 µl kloroform ilave edilmiştir. 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilip açık krem renkli sıvı kısım tekrar yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. VM2, VM12, VM13, VM15, VM16, VM17, VM18, VM19, VM22 ve VM26. Her bir örneğin üzerine 32 µl amonyum asetat, 233.3 µl izopropanol eklenip 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı kısım atılıp eppendorf tüpünün dibindeki pellete 1 ml % 70'lik etanol eklenmiştir. 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilip sıvı kısım tekrar atılmış pellet kısmının kuruması için eppendorf tüpü 30 dakika vakumda bekletilmiştir. Bunun sonunda

eppendorf tüpüne 50 µl 1x TE (Tris-EDTA) ilave edilmiş ve 15 dakika 65 ºC'de su banyosunda tutulmuştur. Daha sonra % 0,7'lik agaroz jele yüklenerek bantlar gözlenmiştir ve PCR amplifikasyonlarına kadar 20ºC'da saklanmıştır.

3.3.2. DNA konsantrasyonunun tayini

İzolasyonların gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemek için 3,5 µl EtBr ile hazırlanan % 0,7'lik agaroz jele 5 µl PCR ürünü ve 2 µl yükleme solüsyonundan toplam 6 µl yükleyerek 100V 70mA'de 25 dakika yürütülmüş, UV transilluminator'de görüntülenmiştir. Buna göre elde ettiğimiz DNA'lar 10000 bp' den biraz daha fazla büyüklüğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Buna rağmen sağlıklı bir PCR gerçekleşmesi için DNA konsantrasyonları ND 1000 ile spektral ölçümleri yapılmış olup veriler Tablo 3.2'de görülmektedir.

Spektral sonuçlara göre her bir örnek için 30 ng olacak şekilde 100 µl hacme eklenecek olan DNA miktarı tespit edilmiştir. DNA saflığı için ise A260/ A280= 1,8 formülü kullanılarak bulunan değere yakın olanlar saf DNA olarak düşünülmüş, çok büyük ve çok küçük değerler ise saf olmayan DNA elde edildiğine karar verilip tekrar izolasyonu yapılmıştır.

Tablo 3.2, Örneklerin spektral sonuçları

Örnek No	ABS	A260λ	A280 λ	A260/A280λ	A260/A230λ	[C]
VM2	5,110	8,945	4,600	1,94	1,75	447,21
VM12	7,418	16,153	8,528	1,89	2,18	807,6
VM13	14,752	32,214	15,363	2,10	2,18	1610,7
VM15	16,387	29,496	14,387	2,05	1,80	1474,8
VM16	3,565	7,912	4,023	1,97	2,22	395,6
VM17	2,433	6,894	3,378	2,04	2,83	344,7
VM18	5,388	10,551	5,370	1,96	1,96	527,6
VM19	7,475	18,591	9,099	2,04	2,49	929,6
VM22	4,681	9,627	5,069	1,90	2,06	481,3
VM26	9,478	20,466	10,263	1,99	2,16	1023,3

3.3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Genetik kaynakların karakterizasyonu, genotipler arasında genetik ilişkilerin saptanması ve çeşit tanımlanmaları gibi alanlarda (Kafkas 2006), türlerin filogenetik akrabalığını açıklamak ve legumenleri de içeren birçok crop türünde kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu prensibine bağlı çalışan ISSR markır tekniğinin en uygun yöntem olduğu araştırmalar sonucunda belirlenmiş ve kullanılmasına karar verilmiştir.

3.3.3.1. ISSR analizi

Çalışmada Tablo 3.3 ’de gösterilen ve British Colombia Üniversitesinden elde edilen ISSR primerleri kullanılmıştır.

Tablo 3.3, Çalışmada kullanılan Primerler, Primerlerin No'su, Nükleotid Dizilimleri, Baz Sayıları ve Yapışma Sıcaklıkları

Sıra No	Primer No	Nükleotid Dizilimi (5'-3')	Baz Sayısı	Yapışma Sıcaklıkları (ºC)
1	UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	17	52
2	UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	17	52
3	UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	17	50
4	UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	17	50
5	UBC813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	17	50
6	UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	17	52
7	UBC820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	17	52
8	UBC821	GTG TGT GTG TGT GTG TT	17	50
9	UBC822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	17	50
10	UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	17	52
11	UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	17	52
12	UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	17	52
13	UBC829	TGT GTG TGT GTG TGT GC	17	52
14	UBC830	TGT GTG TGT GTG TGT GG	17	52
15	UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	18	53
16	UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	18	55
17	UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	18	53
18	UBC841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	18	55
19	UBC843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	18	53
20	UBC844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	18	55
21	UBC847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	18	55
22	UBC848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	18	55
23	UBC852	TCT CTC TCT CTC TCT CRA	18	53
24	UBC853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	18	53
25	UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	18	53
26	UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	18	53
27	UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	18	55
28	UBC861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	18	61
29	UBC865	CCG CCG CCG CCG CCG CCG	18	74
30	UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A	16	48
31	UBC876	GAT AGA TAG ACA GAC A	16	43

Primerler için özellikle Adenin ve Guanin açısından zengin olan Tablo 3.3,'de verilen 31 primer seçilmiştir. Bu 31 primer içinden 17 tanesi çalıştığımız örneklere cevap vermiştir (UBC818, UBC 830, UBC 834, UBC 809, UBC 824, UBC 827, UBC 856, UBC 826, UBC 840, UBC 843, UBC 808, UBC 820, UBC 852, UBC 812, UBC 813, UBC 810, UBC 829 ve UBC 855). Bu primerlerden Dokuz tanesi tüm türlerimize cevap vermiştir(UBC 818, UBC 834, UBC 809, UBC 820, UBC 812, UBC 827, UBC 829, UBC 830, UBC 808). Üç (UBC 818, UBC 820 ve UBC 809) tanesi ise tüm alt türlere cevap vermiştir.

3.3.4. Optimizasyon

Öncelikli olarak seçilen primerlerden her biri için $MgCl_2$, Primer ve Taq polimeraz enzim miktarlarını kullanılacak en uygun yöntem araştırılmış ve araştırmalar sonucunda Zietkiewicz ve ark. (1994)'nın belirttiği ISSR protokolü kullanılmıştır. Denemelerde Tm sıcaklıklarına göre gradient uygulanmıştır.

ISSR analizi 25 Mikrolitre amplifikasyon reaksiyon çözeltisi**;** 75 mM Tris-HCl, pH=8.8, 20 mM $(NH4)_2SO_4$, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM dATP, 100 mM dTTP, 100 mM dGTP, 100 mM dCTP, 0.2 mM primer, 1.0 unite Taq DNA polymerase ve 10 ng DNA içermektedir**.** Sıcaklık ve döngü koşulları olarak, 94 ºC'de 2 dk ön denatürasyon işleminden sonra, 36 döngü boyunca örnekler denatürasyon için 94 ºC'de 1 dk, primerin DNA'ya yapışması için primere göre değişmek üzere 45-55 ºC'de1 dk, ve uzama safhası için 72 ºC'de 2 dk tutulmuştur. Ayrıca, örnekler son uzama safhası için 72 ºC'de 10 dk bekletilmişlerdir.

3.3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu bütün örneklere uygulanması

Yapılan optimizasyon doğrultusunda bant sayısı ve bantlardaki parlaklık dikkate alınarak en iyi ürünün elde edildiği Tm sıcaklıkları her örneğe ayrı ayrı uygulanarak ISSR-PCR'ın gradient sonuçlarına göre en fazla bant oluşturan sıcaklıklar seçilmiştir. En fazla bant oluşturan sıcaklıklara göre tek bir sıcaklık denemesinde türlerin hepsi aynı anda cevap vermemiştir. Genellikle hepsi farklı sıcaklıklarda cevap vermiştir. Ayrıca bu sıcaklıklar genellikle primerin Tm sıcaklığından düşük sıcaklık olmuştur.

3.3.6. Elektroforez

Mini yatay elektroforezde elde edilen PCR ürünlerinin elektroforezi 5 µl EtBr ile hazırlanan %1.2 (w/v) agaroz jele 5 µl PCR ürünü ve 2 µl yükleme solüsyonundan toplam 6 µl yükleyerek 1 X TAE tampon çözeltisinde içinde 100V'da 45 dk, 1 saat yürütülmüş ve jeller UV transilluminatör yardımı ile görüntülenmiş ve UV ışığı altında fotoğrafları çekilmiştir.

3.4. DNA Bantlarının Skorlanması

Bu çalışmada kullanılan 10 farklı bireyin genotipinden elde edilen DNA bantları genotipler arasında karsılaştırıldı ve aynı hizada bulunanlar benzer bölge olarak düşünülerek bant varlığında 1, farklı hizalarda bulunanlar 0 olarak kodlandı (Iqbal ve ark. 1997, Zhang ve ark. 2005, Gutierrez ve ark. 2002, Abdalla ve ark. 2001, Senior ve ark. 1998, Rahman ve ark. 2002, Rana ve Bhat 2005, Tabar ve ark. 2004). Elde edilen bütün izler bağımsız olarak ikili değişken seklinde (1 ve 0) değerlendirildi.

3.5. Veri Analizi

Jelde görüntülenen bantlar polimorfik olup olmamasına göre 1 (var) veya 0 (yok) olarak sınıflandırıldıktan sonra, matris oluşturularak genetik benzerlik Jaccard (1908) ‘e göre hesaplanmıştır.

Jeller üzerindeki bantların yorumlanmasıyla oluşturulan matriksler, Centroid (Kümeleme) ve NTSYSpc 2.1 (Rohlf 1998) ile organize edilmiştir. Burada ölçüt; bir genotipteki herhangi bir bölgedeki bandın, soyundan geldiği başka bir genotipteki ve aynı bölgedeki bant ile benzeme ihtimalinin tahmin edilmesidir.

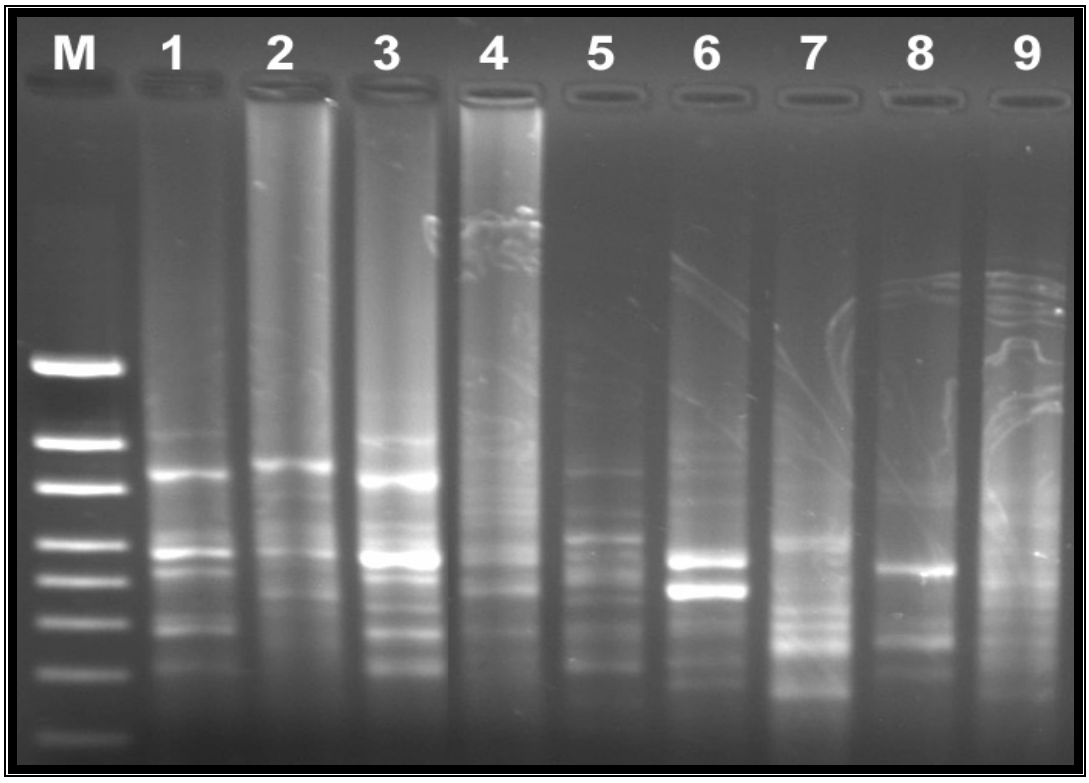
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Genotipler Arasındaki Genetik Farklılıklarının Saptanması

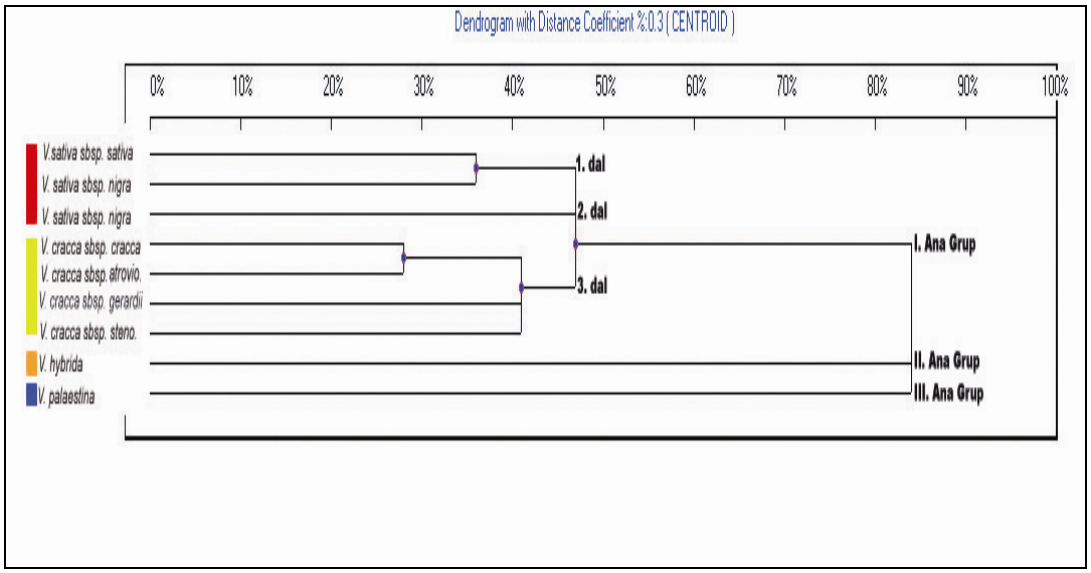
Birçok makaleden materyale uygun olarak seçilen ISSR primerlerinin izlerinin jellerdeki görüntüleri sonucunda, ürünler var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve elde edilen verilerle BİO-PROFİL BİO1-D++ ve NTSYSpc (Rohlf 2004) adlı bilgisayar paket programlarında analiz edilmiştir. Her bir primerden elde edilen veriler ayrı ayrı değerlendirildiği gibi birlikte de değerlendirilmiştir. Genetik benzerlik indeksi Jaccard'a göre hesaplanmıştır. Soyağacının elde edilmesinde Centroid yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada kullandığımız UBC 818, UBC 808, UBC 809, UBC 812, UBC 820, UBC 827, UBC 829, UBC 830, UBC 834 primerleriyle elde edilen bantların hepsinin polimorfik olduğu tespit edilmiştir.

4.2. ISSR Primerlerinin Değerlendirilmesi

827 primeri için; 45–53 ºC'de yapılan gradient çalışması sonucu VM2, VM12, VM13, VM16, VM17, VM18, VM19, VM22, VM26 örneklerinin hepsi 53 ºC'de bant vermiştir. Ancak VM15 örneği ürün vermemiştir (Şekil 4.1).



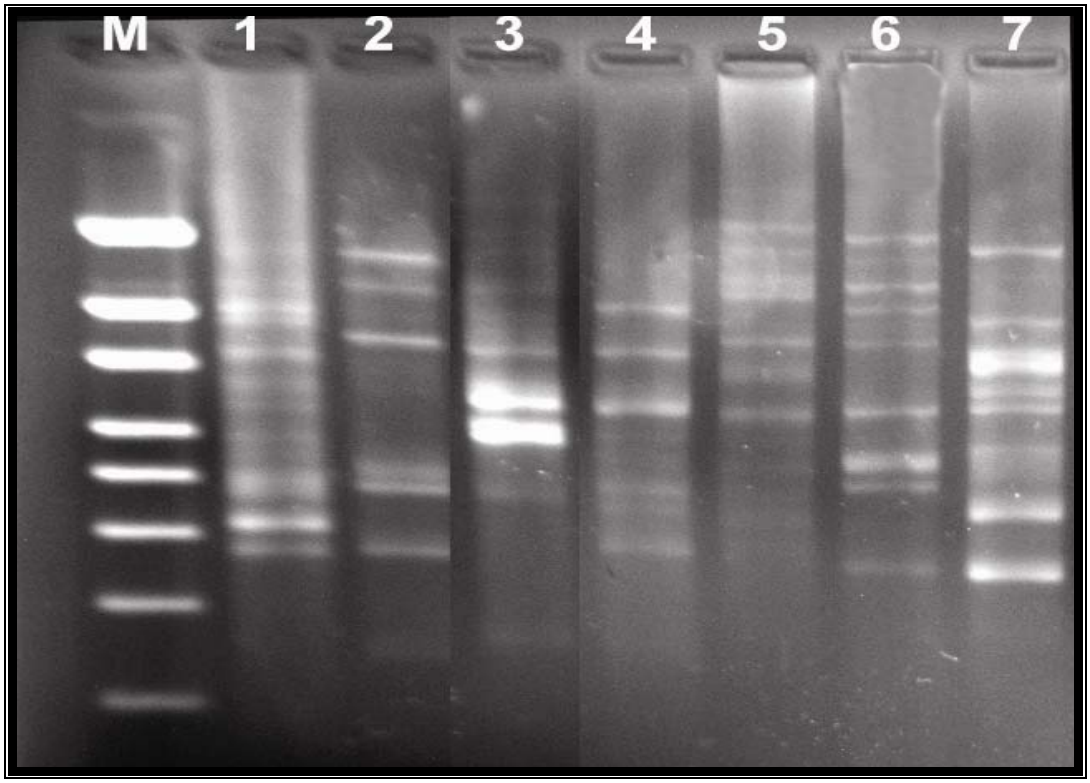
Şekil 4.1, ISSR PCR ile UBC 827 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü



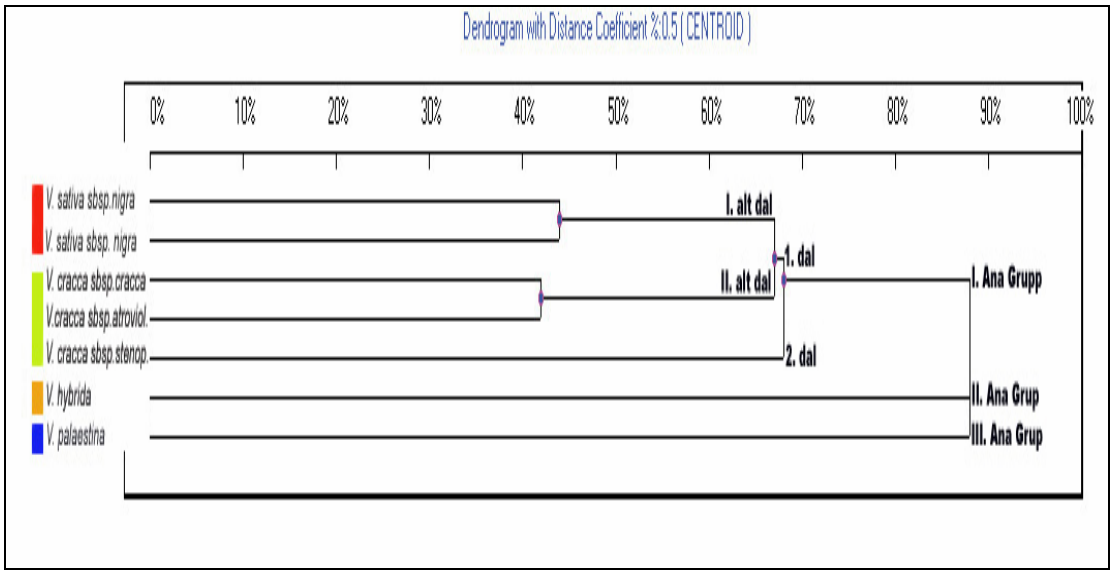
Şekil 4.2, UBC 827 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.2'de de görüldüğü gibi çalışılan taksonlar UBC 827 primeri ile üç ana gruba ayrılmaktadır. Bu üç ana grubun % 84 oranında uzak olduğu görülmektedir. I. ana grupta *V. sativa* türünün alt tür ve varyeteleri ile *V. cracca* türünün alt türleri yer almaktadır. I. ana grup üç dala ayrılmaktadır ve bu üç dal % 48 oranında uzak görülmektedir. Birinci dalda yer alan *V. sativa* subsp. *sativa* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis* varyetesine % 36 oranında uzak görülmektedir. İkinci dalda yer alan *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*, *V. sativa* subsp. *sativa* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis*'ten ayrıldığı görülmektedir. Üçüncü dalda yer alan *V. cracca* subsp. *cracca* alt türü *V. cracca* subsp. *atroviolacea* alt türüne % 28 oranında uzak görülmektedir. Avrupa'daki örneklerden farklılık gösteren, *V. cracca* türünün diğer alt türlerinden yaprak bakımından farklı olması ile tanınan *V. cracca* subsp. *gerardii* alt türü dendrograma göre açıkca ayrılmaktadır. Florada *V. cracca* subsp. *cracca* alt türünden bariz olarak ayrılan *V.cracca* subsp. *stenophylla* alt türü de dendrograma göre ayrılmaktadır. Bu alt türlerin birbirine % 42 oranında uzak olduğu görülmektedir. II. ana grupta *V. hybrida* ve III. ana grupta *V. palaestina* türleri yer almaktadır. Bu iki türün komplekse ait diğer türlerden farklı olduğu dendogramda açıkça görülmektedir.

830 primeri için; 45–53 ºC'de yapılan gradient çalışması sonucu VM12, VM13, VM16, VM18, VM19, VM22, VM26 örnekleri farklı sıcaklıklarda cevap vermiştir. Ancak VM2, VM15 ve VM17 örnekleri ise yapılan gradient çalışmalarında sonuç vermemiştir (Şekil 4.3).



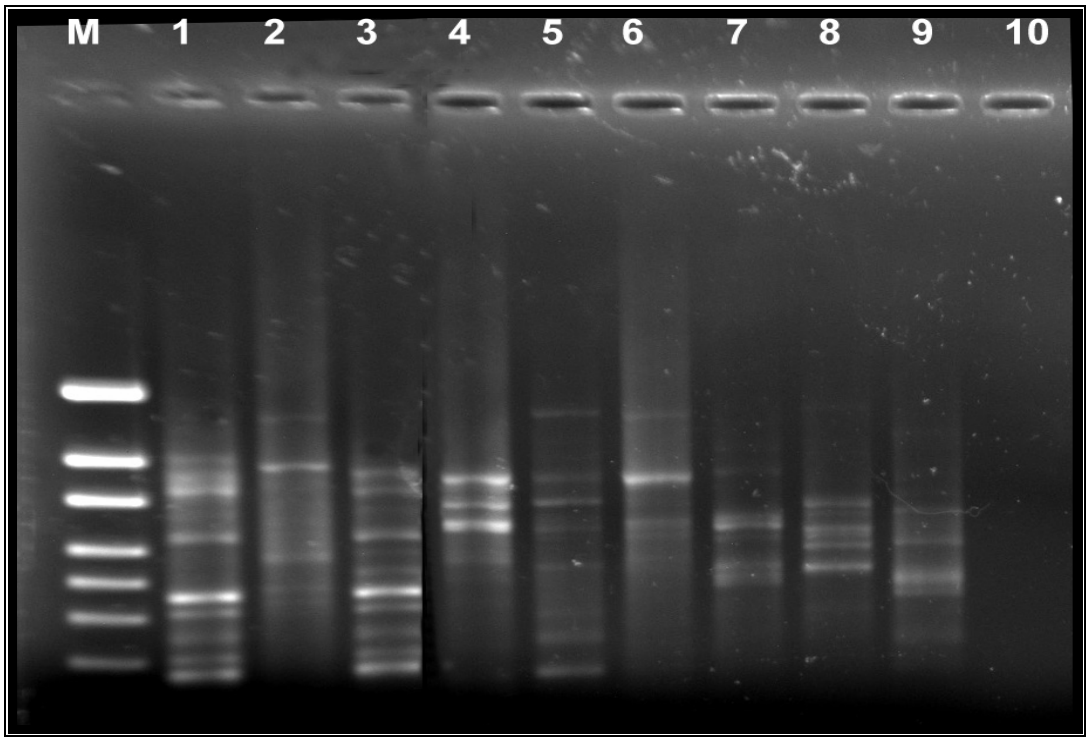
Şekil 4.3, ISSR PCR ile UBC 830 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü



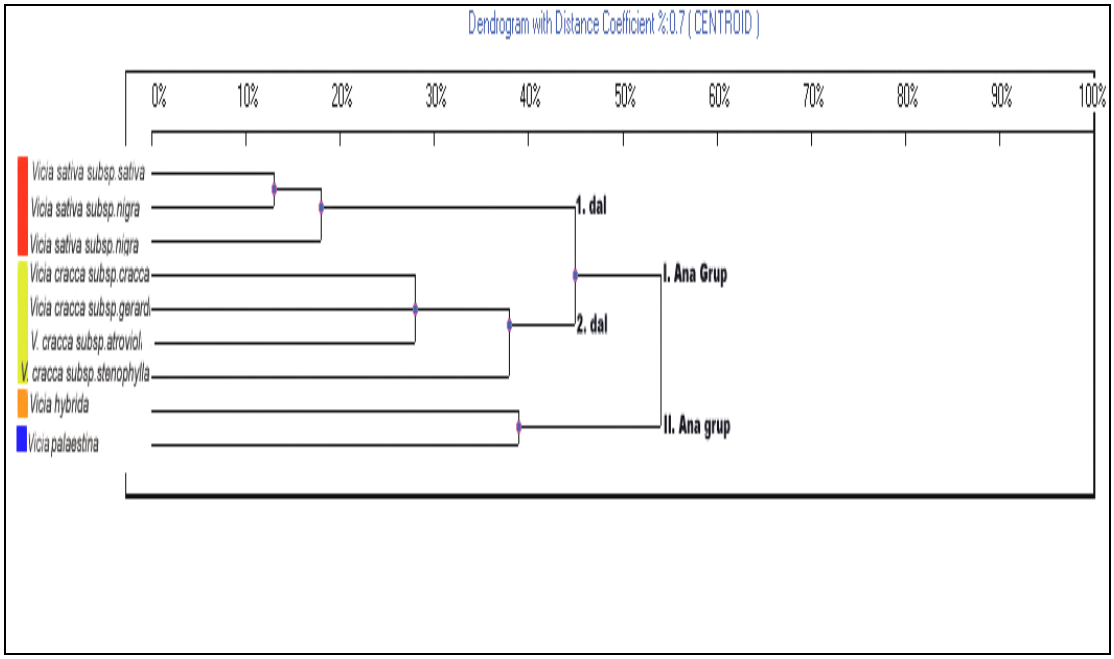
Şekil 4.4, UBC 830 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.4'de de görüldüğü gibi UBC 830 primeri ile üç ana gruba ayrılmaktadır. Bu üç ana grubun birbirine % 88 oranında uzak olduğu görülmektedir. I. ana grup iki dala ayrılmaktadır. Birinci dal iki alt dala ayrılmaktadır. Bu iki alt dal yaklaşık % 65 oranında uzak görülmektedir. I. alt dalda *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis* yer almaktadır. Bu iki varyete birbirine % 44 oranında uzak görülmektedir. II. alt dalda *V. cracca* subsp. *cracca* ve *V. cracca* subsp. *atroviolacea* alt türleri yer almaktadır. Bu iki alt tür % 42 oranında uzak görülmektedir. İkinci ana dalda, *V. sativa* türünün varyetelerine, *V. cracca* türünün iki alt türüne, yaklaşık % 68 uzaklıkla *V. cracca* subsp. *stenophylla* alt türü bağlanmaktadır. II. ana grupta *V. hybrida*, III. ana grupta *V. palaestina* % 88 uzaklıklarla dendogram'ın en dışında yer almaktadır.

808 primeri için, 45–55 ºC'de yapılan gradient çalışması sonucu VM2, VM12, VM13, VM16, VM17, VM18, VM19, VM22, VM26 örnekleri 46 ºC'de sıcaklıkta ürün vermiştir. 10. kuyucukta görüldüğü gibi VM15 örneği hiçbir sıcaklıkta ürün vermemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5, ISSR PCR ile UBC 808 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü



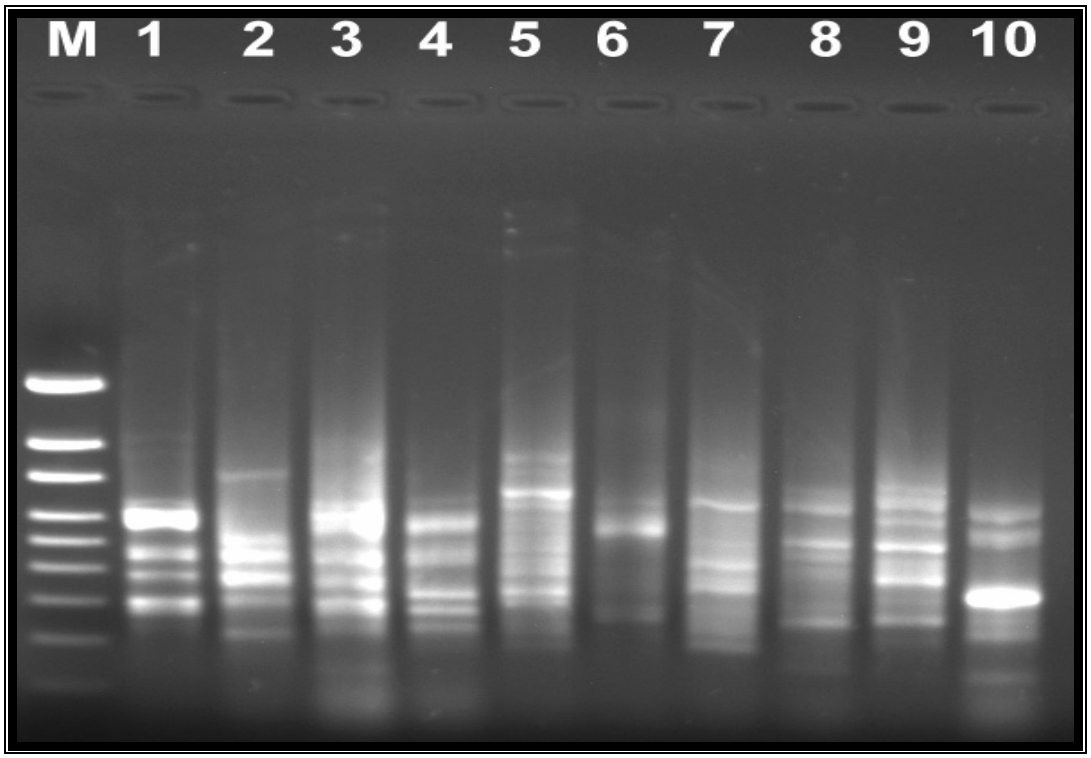
Şekil 4.6, UBC 808 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.6'de de görüldüğü gibi *Vicia* türleri UBC 808 primeri ile iki ana gruba ayrılmıştır. Bu iki ana grup birbirine % 55 oranında uzak görülmektedir. I. ana grupta iki dala ayrılmıştır. Birinci dalda *V. sativa*'nın alt tür ve varyeteleri yer almaktadır. *V. sativa* subsp. *sativa* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis*'e % 12 oranında uzak görülmektedir. Bu iki takson *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*'ya % 18 oranında uzak olduğu görülmektedir. İkinci dal *V. cracca*'nın alt türlerini içermektedir. *V.cracca* subsp. *cracca*, *V.cracca* subsp. *gerardii*, *V. cracca* subsp. *atroviolacea* alt türleri %28 oranında uzak görülmektedir. Bu alt türler *V.cracca* subsp. *stenophylla* alt türüne % 40 oranında uzak görülmektedir. Bu uzaklık ile *V. cracca* subsp. *cracca* ve *V. cracca* subsp. *stenophylla* alt türleri Türkiye Florasın da belirtildiği gibi bariz bir şekilde ayrılmaktadır. II. ana grupta dış grup olarak seçilen *V. hybrida* ve *V. palaestina* yer almaktadır. Bu iki farklı tür birbirine % 40 oranında uzak görülmektedir.

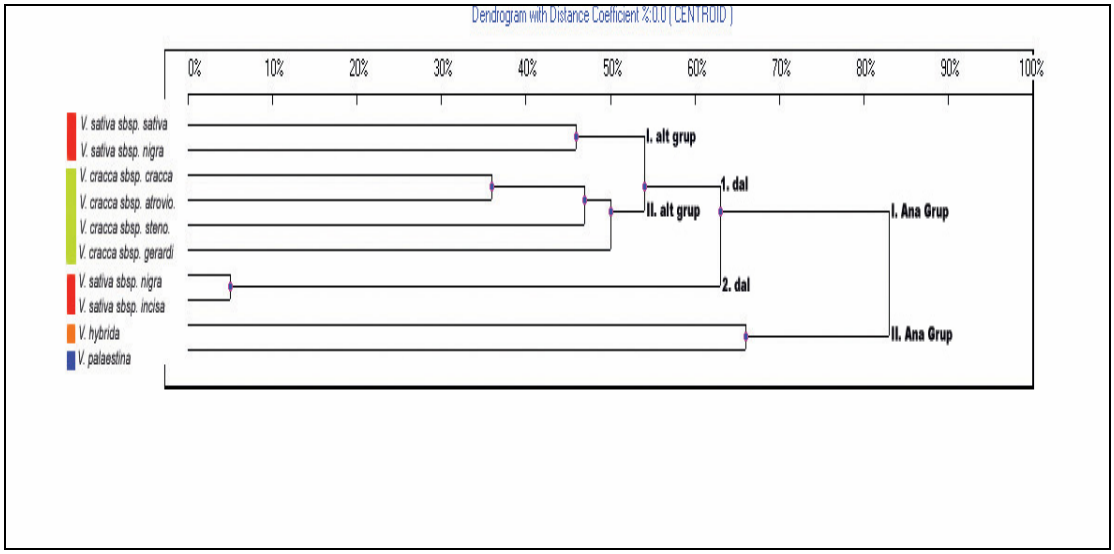
Bu primer hem *V. sativa* tür altı seviyedeki yakın akrabalığını, hem de *V. cracca* alt türleri arasındaki yakın akrabalığı seçmede etkili görülmektedir. Dış

grupta yer alan türler bu iki tür kompleksinde yer alan türlerden % 45 uzaklıkla ayrılmıştır. UBC 808 çalışmamızda kullandığımız primerler içinde en ayırt edici primerlerden biri olmuştur.

809 primeri için; 45-55 ºC'de yapılan gradient çalışması sonucu VM2, VM12, VM13, VM15, VM16, VM17, VM18, VM19, VM22, VM26 örnekleri farklı sıcaklıklarda ürün vermiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7, UBC 809 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü



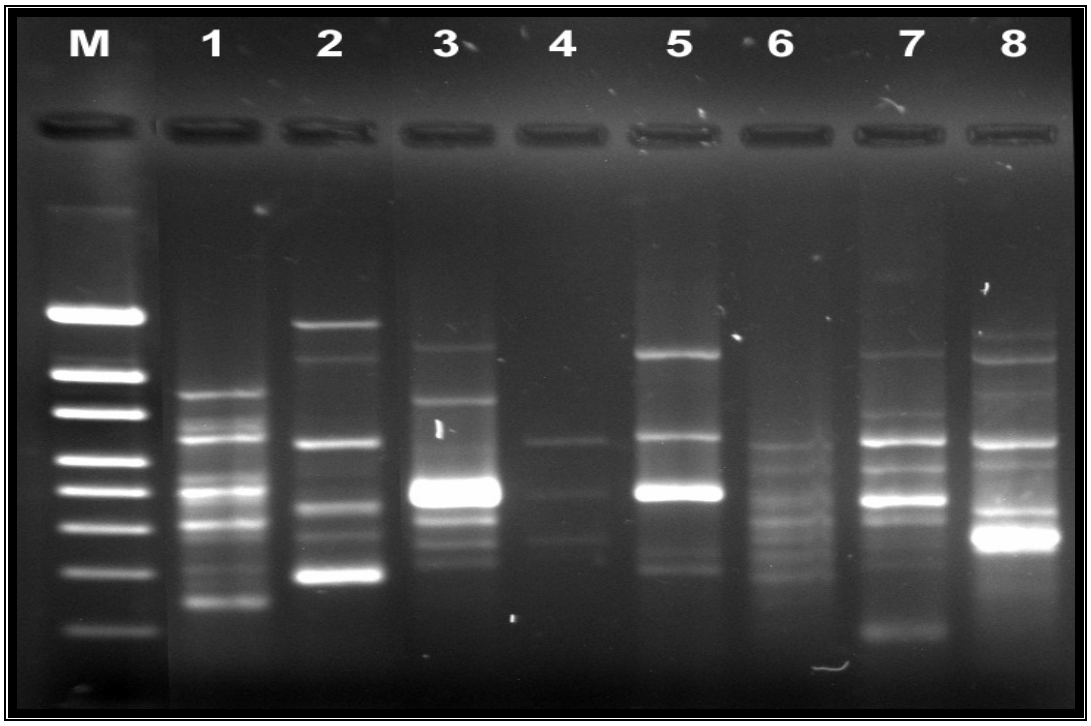
Şekil 4.8, UBC 809 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.8'de de görüldüğü gibi *Vicia* türleri UBC 809 primeri ile iki ana gruba ayrılmıştır. Bu iki ana grup birbirine % 82 oranında uzak görülmektedir. I. ana grup iki dala ayrılmaktadır. Bu iki dal % 63 oranında uzak olduğu görülmektedir. Birinci dalda iki alt gruba ayrılmaktadır. I. alt grupta yer alan *V. sativa* subsp. *sativa* ve *V. sativa* subsp. *nigra var. nigra* % 46 oranında uzak olduğu görülmektedir. II. alt grupta yer alan *V. cracca* subsp. *cracca* ve *V. cracca* subsp. *atroviolacea*'ya % 36 oranında uzak görülmektedir. *V. cracca*'nın bu iki alt türü *V. cracca* subsp. *stenophylla* alt türünden % 46 oranında uzak görülmektedir. Bu uzaklıkta bize Türkiye Florasında belirtildiği gibi subsp. *cracca* alt türü subsp. *stenophylla* alt türünden ayrıldığını göstermektedir. Aynı şekilde florada belirtildiği gibi Türkiye'de Avrupa'daki örneklerden farklı bir tipi olan ve *V. cracca* türünün diğer alt türlerinden yaprak bakımından farklı olması ile tanınan *V. cracca* subsp. *gerardii* dendrograma göre de açıkça ayrılmaktadır. *V. cracca* subsp. *gerardii* diğer üç alt türden yaklaşık % 50 oranında uzak görülmektedir. İkinci dalda *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis* ve *V. sativa* subsp. *incisa* var. *cordata* varyeteleri yer almaktadır. Bu varyeteler % 5 oranında uzak görülmektedir. Bu dendrograma göre *V. sativa* türünün alt tür ve

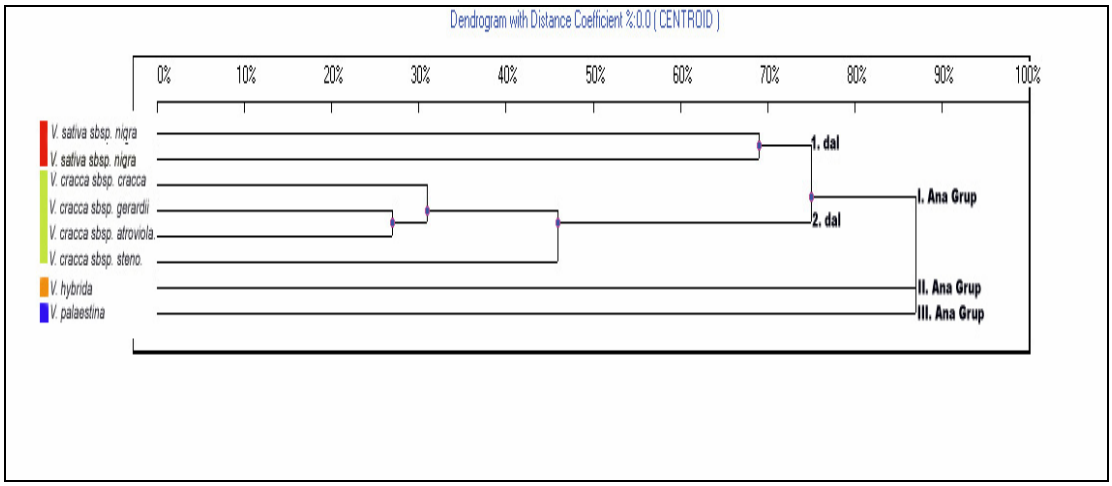
varyeteleri arasında bir parçalanma görülmektedir. Bu parçalanma, bu iki varyetenin genetik açıdan farklılaştığını göstermektedir. II. ana grupta farklı türler olan *V. hybrida* ve *V. palaestina* türleri yer almaktadır. Bu iki tür % 66 oranında uzak görülmektedir.

Sonuç olarak varyete seviyesinde bile yüksek oranda farklılığı seçmeye imkân veren UBC 809 primerinin *Vicia* genomu içerisindeki oldukça polimorfik olan bir bölgeyi seçmiş olabileceği düşünülebilir.

812 primeri için; 45-55 ºC'de arasında yapılan gradient çalışmasında 53 ºC'nin en iyi sıcaklık olduğu belirlenmiş ve 53 ºC'de yapılan ISSR-PCR çalışmasında VM12, VM13, VM16, VM17, VM18, VM19, VM22, VM26 örnekleri 53 ºC'de ürün vermişlerdir. Ancak VM2 ve VM15 örnekleri hem gradientte hem de tek sıcaklık (53 ºC) uygulamasında ürün vermedikleri bulunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9, ISSR PCR ile UBC 812 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü

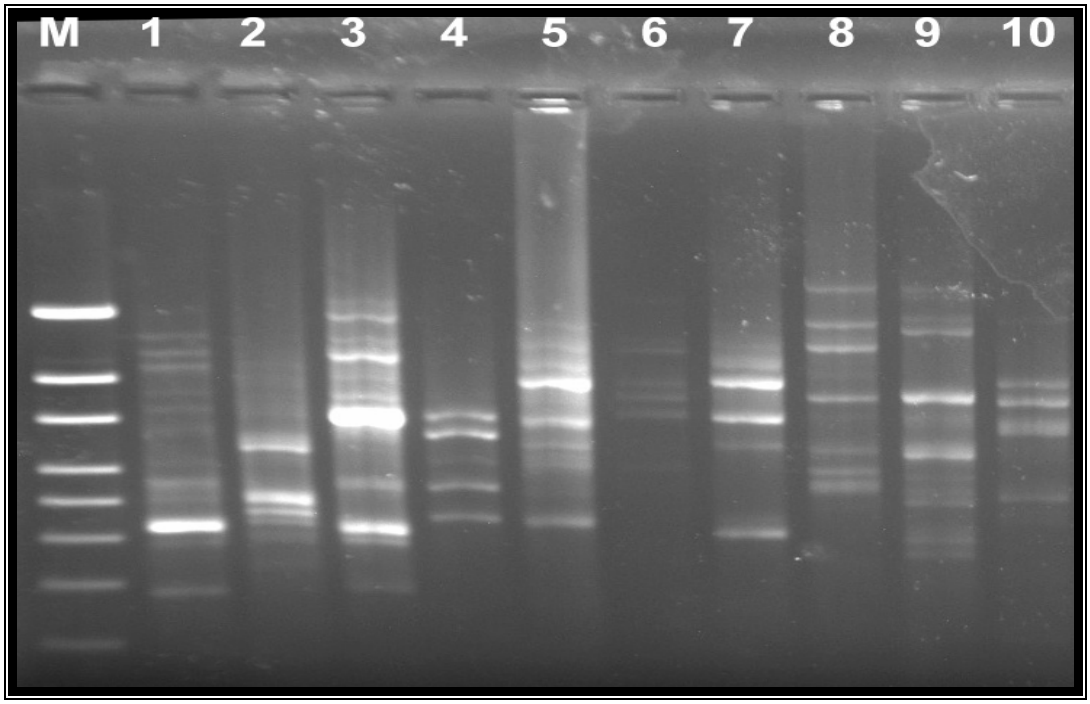


Şekil 4.10, UBC 812 primerine göre elde edilen dendrogram

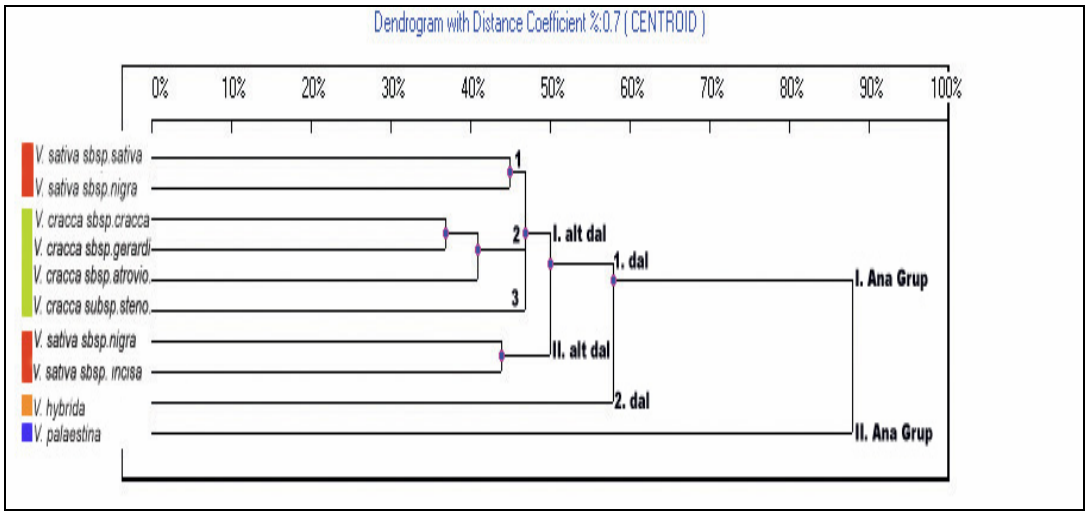
Şekil 4.10'de de görüldüğü gibi UBC 812 primeri ile % 87 oranında uzaklık gösteren üç ana grup oluşmuştur. I. ana grubun iki dala ayrıldığı görülmektedir. Bu iki dal % 75 oranında uzak görülmektedir. Birinci dalda *V. sativa* türünün varyeteleri yer almaktadır. *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis*'e % 68 oranında uzak görülmektedir. İkinci dalda *V. cracca* türünün alt türleri yer almaktadır. *V. cracca* subsp. *gerardii*'nin *V. cracca* subsp. *atroviolacea*'ye % 28 oranında uzak olduğu görülmektedir. Bu iki alt türün *V. cracca* subsp. *cracca* alt türüne % 32 oranında uzak olduğu görülmektedir. Bu dendrograma göre Türkiye Florasında da belirtildiği gibi *V. cracca* subsp. *cracca* alt türü *V. cracca* subsp. *stenophylla* alt türünden bariz olarak ayrılmaktadır. *V. cracca* subsp. *stenophylla* alt türü bu alt türlerden % 45 oranında uzak görülmektedir.

II. ana grupta dalda *V. hybrida* türü yer almaktadır. III. ana grupta *V. palaestina* türü yer almaktadır. II. ve III. ana gruplarda yer alan türlerin farklı türler olduğu açıkça görülmektedir. UBC 812 primeri UBC 809 primeri ile birlikte *Vicia* genomu içerisindeki oldukça polimorfik olan bir bölgeyi seçmiş olabileceği düşünülebilir ve ele alınan türler arasında oldukça önemli bir farklılığın olduğu görülmüştür.

820 primeri için; 45–55 ºC'de yapılan gradient çalışması sonucu VM2, VM12, VM13, VM15, VM16, VM17, VM18, VM19, VM22, VM26 örnekleri farklı sıcaklıklarda ürün vermiştir (Şekil 4.11).



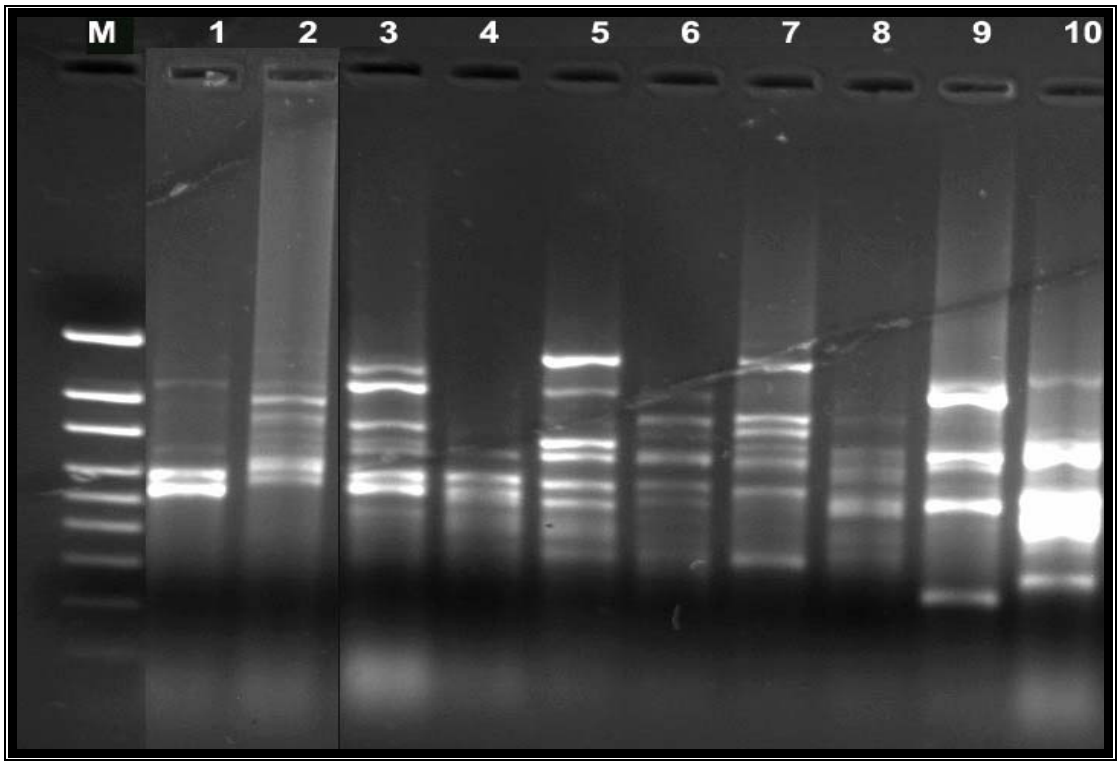
Şekil 4.11, UBC 820 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü



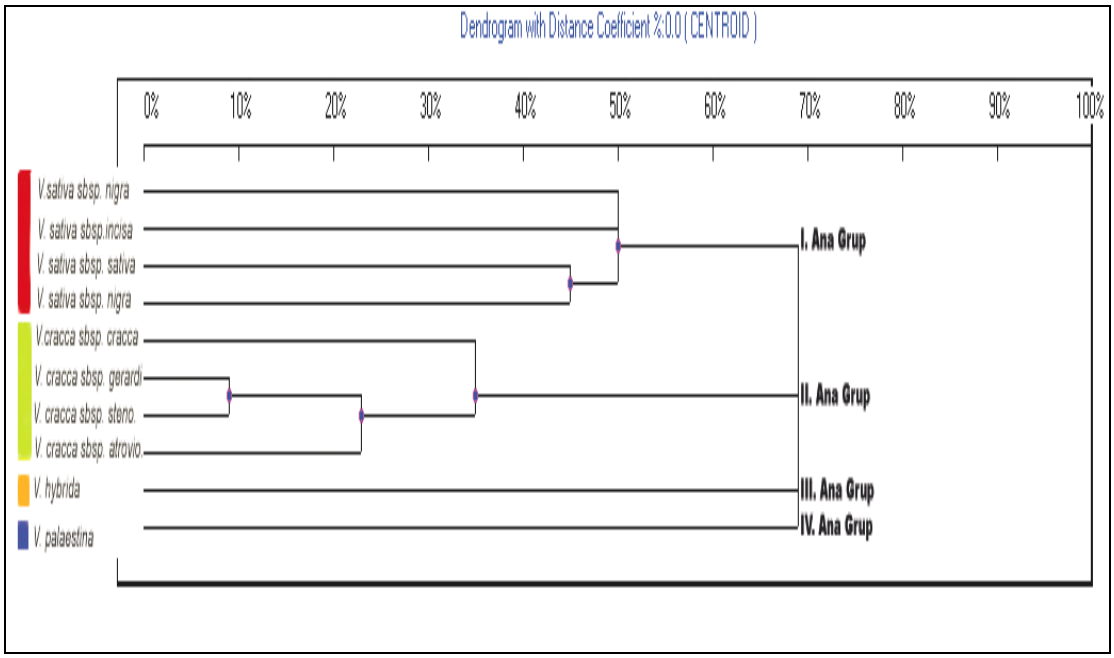
Şekil 4.12, UBC 820 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.12'de de görüldüğü gibi UBC 820 primeri ile iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu iki ana grup % 88 oranında uzak olduğu görülmektedir. I. ana grup iki dala ayrılmaktadır ve bu iki dalda % 58 oranında uzak olduğu görülmektedir. Birinci dal iki alt dala ayrılmaktadır. Bu iki alt dal % 50 oranında uzak olduğu görülmektedir. I. alt dal üç gruba ayrılmaktadır ve bu gruplarda yer alan taksonların en fazla % 47 oranında uzak olduğu görülmektedir. Birinci grupta *V. sativa* subsp. *sativa* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra* yer almaktadır. Dendogramlarda bu taksonlar farklı iki alt tür olarak ifade edilmiştir. Bu taksonlar birbirine % 45 oranında uzak görülmektedir. İkinci grupta *V. cracca* türünün alt türleri yer almaktadır. *V. cracca* subsp. *cracca* ve *V. cracca* subsp. *gerardii* % 37 oranında uzak görülmektedir ve bu iki alt tür *V. cracca* subsp. *atroviolacea*'ye % 41 oranında uzak olduğu görülmektedir. Üçüncü grupta ise *V. cracca* subsp. *cracca* alt türünden çok açık şekilde ayrılan *V. cracca* subsp. *stenophylla* alt türü yer almaktadır. II. alt dalda *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis* ve *V. sativa* subsp. *incisa* var. *cordata* yer almaktadır. Bu iki varyete % 43 oranında uzak görülmektedir. Bu dendrograma göre *V. sativa*'nın alt tür ve varyeteleri arasında bir parçalanma olduğu görülmektedir. Yüksek orandaki bu genetik farklılaşma bu taksonların mevcut pozisyonlarının değişebileceğine ve yeni kombinasyonların yapılabileceğine işaret etmektedir.

818 primeri için; Tm 52 ºC'de yapılan çalışmada VM13, VM15, VM16, VM17, VM18, VM19, VM22, VM26 örneklerinde bant elde edilmiş olmasına rağmen, VM2 ve VM12 örneklerinde bant elde edilememiştir. Bu nedenle, 45,1-53,4 arasında yapılan gradientte VM2'nin 45,1 ve 45,6 ºC'de, VM12'nin ise 45,6 ürün verdikleri bulunmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13, UBC 818 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü



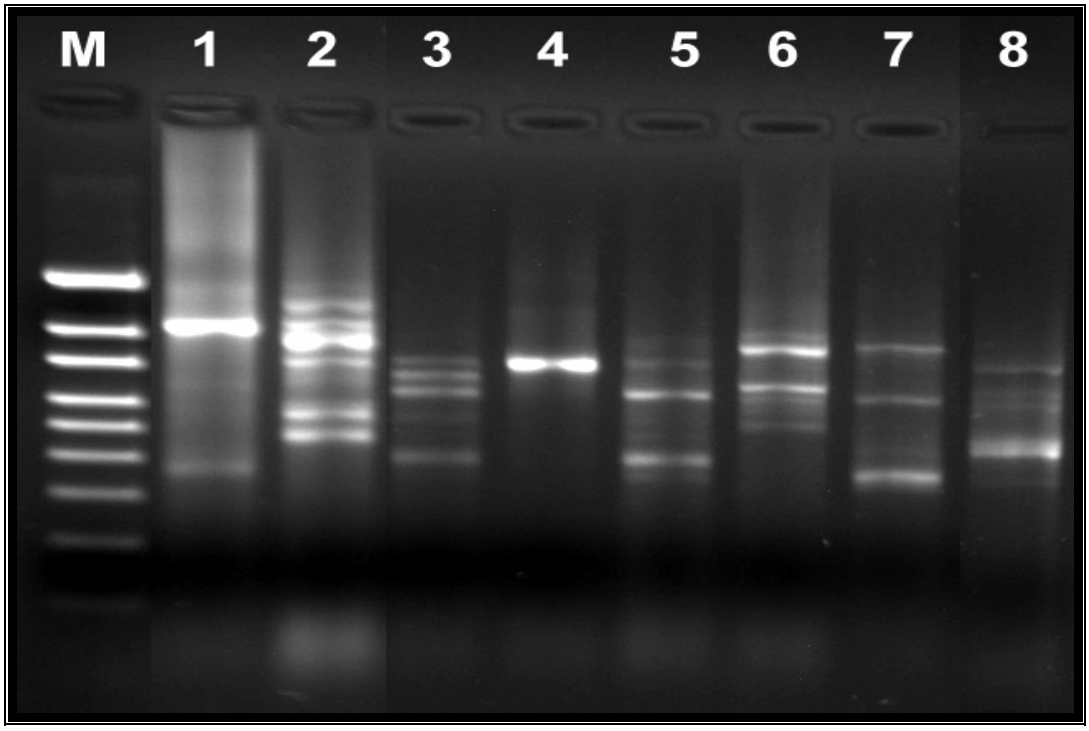
Şekil 4.14, UBC 818 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.14'de görüldüğü gibi *Vicia* türleri UBC 818 primeri ile dört ana gruba ayrılmaktadır ve dört ana grup en fazla % 68 oranında uzaklık görülmektedir.

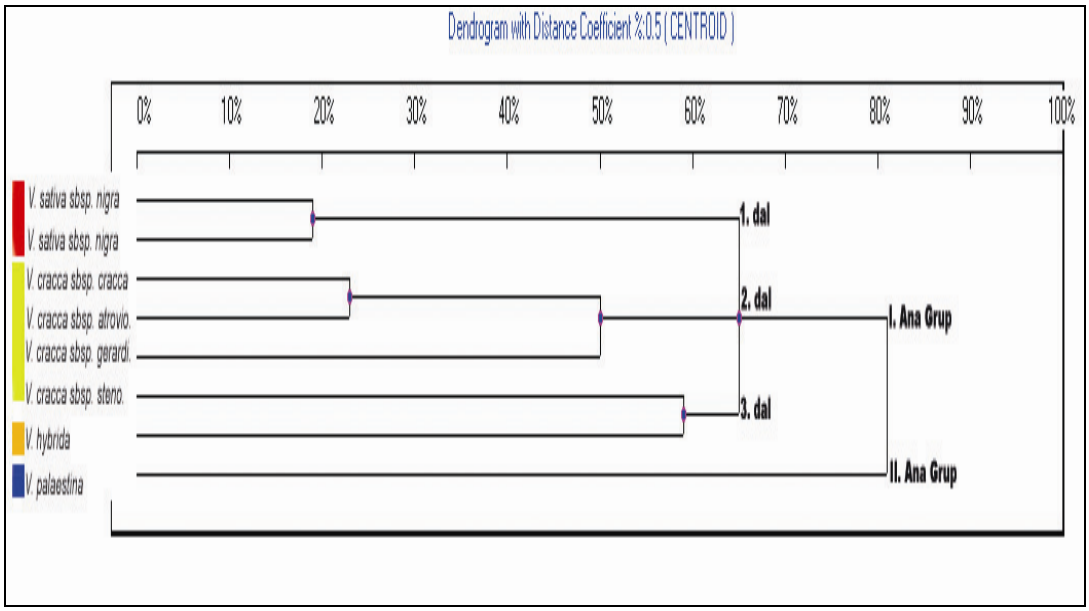
I. ana grupta *Vicia sativa* türünün alt tür ve varyeteleri yer almaktadır. *V. sativa* subsp. *sativa* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*'ya % 45 oranında uzak görülmektedir. Bu iki taksonun *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis* ve V. *sativa* subsp. *incisa* var. *cordata* varyetelerine % 50 oranında uzak olduğu görülmektedir. II. ana grupta *Vicia cracca*'nın alt türleri yer almaktadır. *V. cracca* subsp. *cracca* diğer alt türlere % 35 oranında uzak görülmektedir. Bu ayrım Türkiye Florasın da belirtildiği gibi aynı meyve yapısına sahip olan *V. cracca* subsp. *atroviolacea*, *V. cracca* subsp. *gerardii* ve *V.cracca* subsp. *stenophylla* alt türleri, farklı meyve yapısındaki *V. cracca* subsp. *cracca* alt türünden açıkça ayrılmaktadır. Ayrıca yine Flora da belirtildiği gibi *V. cracca* subsp. *cracca* alt türü *V. cracca* subsp. *stenophylla* alt türünden ayrılmaktadır. *V. cracca* subsp. *gerardii* ve *V.cracca* subsp. *stenophylla*'ya % 8 oranında uzak görülmektedir. Bu iki alt tür *V. cracca* subsp. *atroviolacea*'e % 23 oranında uzak görülmektedir. III. ana grupta *V. hybrida* ve IV.

ana grupta *V. palaestina* türleri yer almaktadır. Çalışmada dış grup olarak seçilen bu iki türün, araştırma konusu olan tür komplekslerinden açıkça ayrıldıkları görülmektedir. UBC 818 primeriyle elde edilen dendrogram da (Centroid) dört farklı türün kesin olarak ayrıldığı görülmektedir. Kompleks türlerin (*Vicia sativa* ve *Vicia cracca*) alt türleriyle kendi sınırları içinde ayrıldığı görülmektedir.

829 primeri için; 45–53 ºC'de yapılan gradient çalışması sonucu VM12, VM13, VM16, VM18, VM19, VM22, VM26 örnekleri 47,2 ºC'de ürün vermiştir. VM17 örneği 49,2 ºC'de ürün vermiştir. Ancak VM2 ve VM15 hiçbir sıcaklıkta ürün vermemiştir (Şekil 4.15).



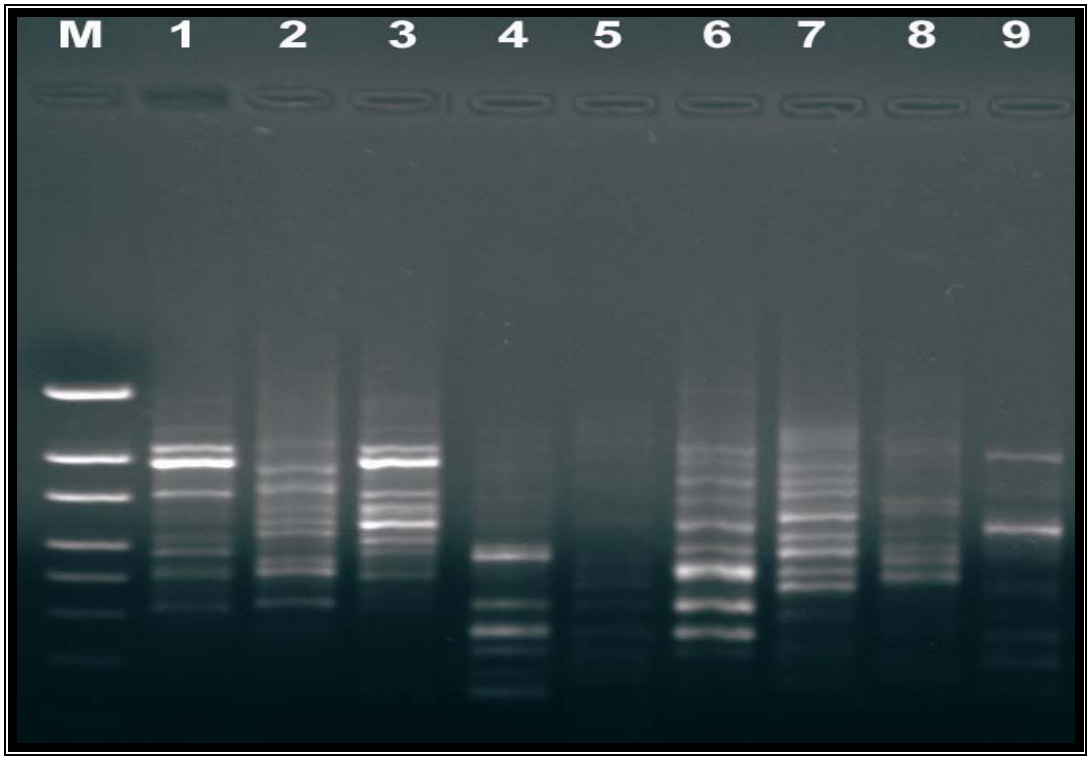
Şekil 4.15, ISSR PCR ile UBC 829 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü



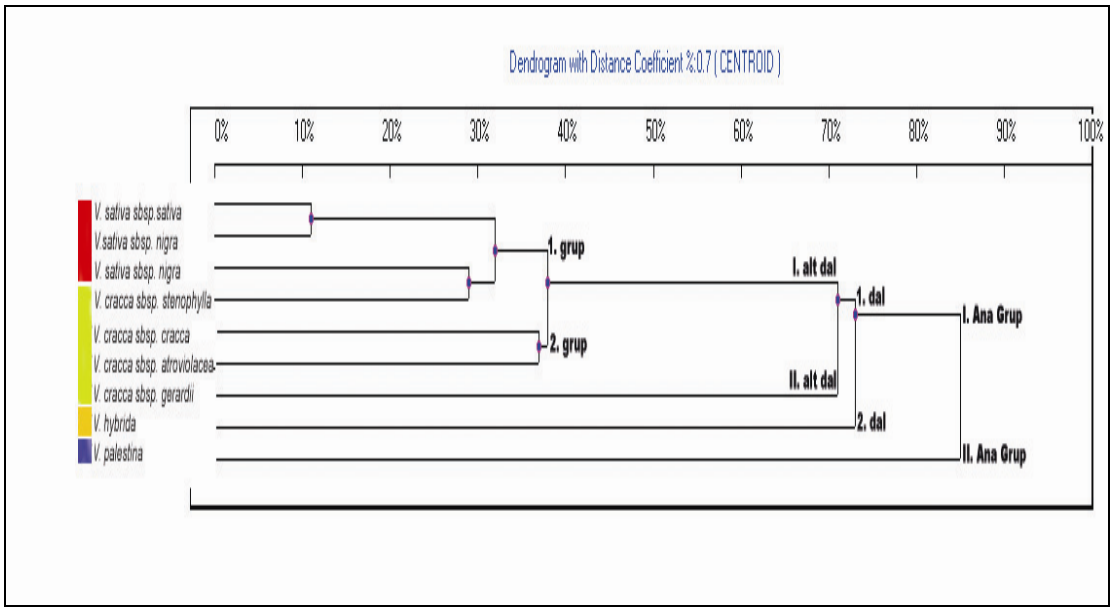
Şekil 4.16, UBC 829 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.16'de de görüldüğü gibi UBC 829 primeri ile iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu iki ana grup % 81 oranında uzak görülmektedir. I. ana grup 3 dala ayrılmaktadır. Bu üç dal birbirine % 65 oranında uzak görülmektedir. Birinci dalda *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis* yer almaktadır. Bu iki varyete % 18 oranında uzak görülmektedir. İkinci dalda *V. cracca* subsp. *cracca* ve *V. cracca* subsp. *atroviolacea* birbirine % 23 oranında uzak görülmektedir. Avrupa'daki örneklerden farklılık gösteren, *V. cracca* türünün diğer alt türlerinden yaprak bakımından farklı olması ile tanınan *V. cracca* subsp. *gerardii* alt türü *V. cracca* türünün bu iki alt türüne % 50 uzak olduğu görülmektedir. Üçüncü dalda *V. cracca* subsp. *stenophylla* ve *V. hybrida* yer almaktadır. Bu alt tür ve türün birbirine yaklaşık % 60 oranında uzak olduğu görülmektedir. *V. cracca* subsp. *stenophylla* alt türü *V. cracca* subsp. *cracca* alt türünden bariz şekilde ayrılmaktadır. II. ana grupta % 80 civarında uzaklıkla *V. palaestina* yer almaktadır.

834 primeri için; 46,3 ºC'de yapılan çalışmada VM2, VM12, VM13, VM16, VM17, VM18, VM19, VM22, VM26 örneklerinde bant elde edilmiş, VM15 örneğinde ise 46,3-53,4 arasında yapılan gradient sonuç vermemiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17, ISSR PCR ile UBC 834 primerinin örnekler üzerindeki jel görüntüsü



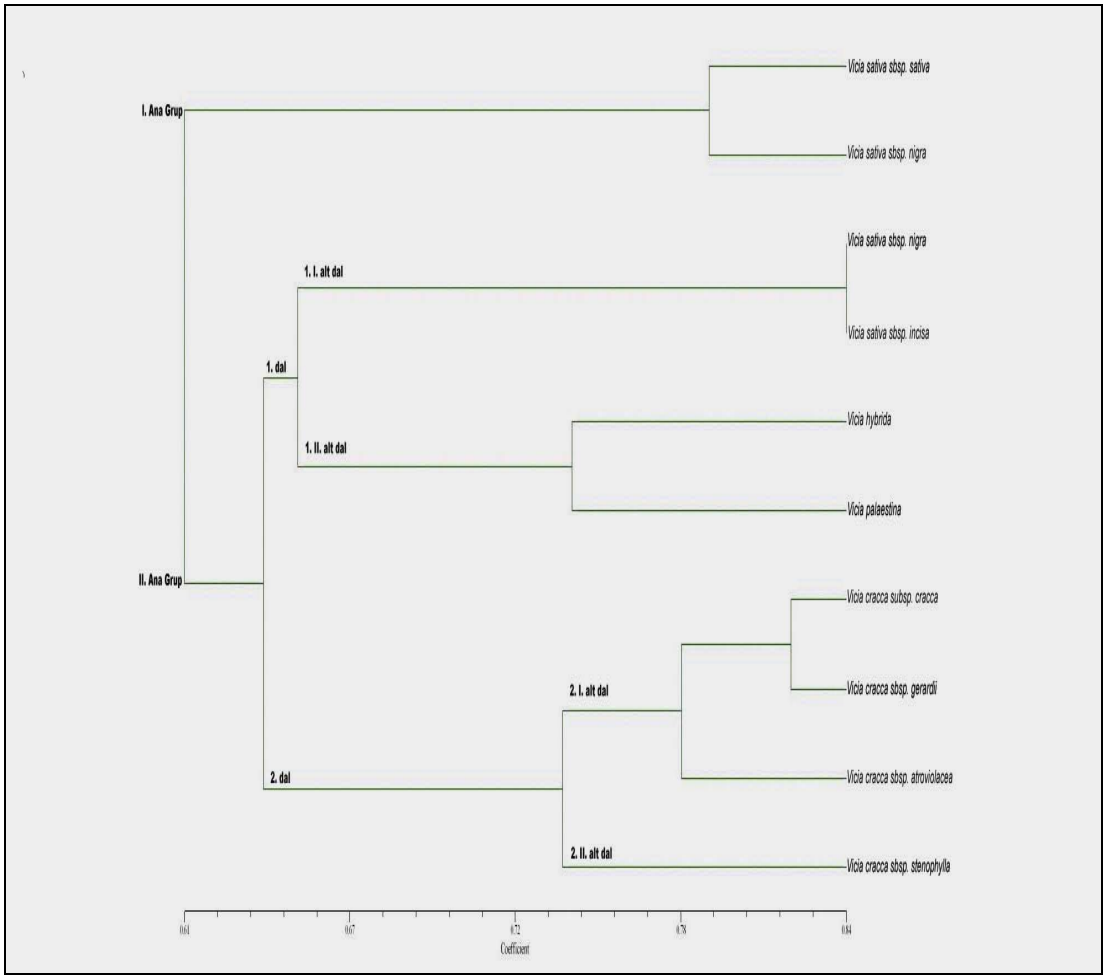
Şekil 4.18, UBC 834 primerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4.18'de de görüldüğü gibi UBC 834 primeri ile iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu iki ana grup % 85 oranında uzak görülmektedir. I. ana grupta iki dala ayrılmaktadır. Bu iki dal birbirine % 73 oranında uzak görülmektedir. Birinci dal iki alt dala ayrılmaktadır ve bunlar % 70 oranında uzak görülmektedir. I. alt dal iki gruba ayrılmaktadır. Bu iki grup % 38 oranında uzak görülmektedir. Birinci alt dalda yer alan birinci grupta, *V. sativa* subsp. *sativa* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis* birbirine % 11 oranında uzak görülmektedir. *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra* ve *V. cracca* subsp. *stenophylla* ise % 28 oranında uzak görülmektedir. *V. cracca* subsp. *stenophylla* alt türü, *V. cracca* subsp. *cracca* alt türünden bariz şekilde ayrılmış olduğu görülmektedir. İkinci grupta *V.cracca* subsp. *cracca* ve *V.cracca* subsp. *atroviolacea* alt türleri % 36 oranında uzaklıkla ayrılmaktadır. II. alt dalda *V. cracca* subsp. *gerardii* diğer alt türlerden yaklaşık % 70 uzaklık ile ayrılmaktadır. Bu ve önceki primerlerin ortaya koyduğu genetik uzaklıklar göz önüne alındığında ve morfolojik diagnostik karakterlerin yeterince desteklemesi halinde bu alt türün yeni bir tür olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. İkinci dalda *V. hybrida* % 72 uzaklıkla kompleks grubun dışında yer almaktadır. II. ana grupta diğer uzak bir tür *V. palaestina* % 85'in üzerinde bir uzaklıkla yer almaktadır.

9 primerde çok sayıda polimorfik bant üretmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre PCR ürünü veren 9 primer toplam 296 bant üretmiştir.

Toplam bant sayısı bakımından ISSR primerleri karşılaştırıldığında; en yüksek bant sayısı 42 adet ile UBC 812 ISSR primerinden, en düşük bant sayısı ise 24 adet ile UBC 829 ISSR primerinden elde edilmiştir.

4.2.10. ISSR Primerleriyle (UBC 818, UBC 809, UBC 820) ile elde edilen verilerin birleştirilmesiyle Taksonların Değerlendirilmesi



Şekil 4.10, UBC 818, UBC 809, UBC 820 primerlerine göre elde edilen dendrogram

Şekil 4. 10'da da görüldüğü gibi UBC 818, UBC 809 ve UBC 820 primerlerinin kombinasyonu sonucu oluşan Coefficient benzerlik indeksine göre *Vicia* türleri iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu iki ana grup birbirine 0.61 oranında benzerlik göstermektedir. Bu veri bize *Vicia* türleri arasındaki yakın bir akrabalığı göstermektedir. I. ana grupta *Vicia sativa* subsp. *sativa* var. *sativa* ve *Vicia sativa* subsp. *nigra* var. *nigra* yer almaktadır. Bu varyeteler yaklaşık 0.80 oranında

benzemektedir. II. ana grupta iki dala ayrılmaktadır ve bu iki dal yaklaşık 0.64 oranında benzemektedir. Birinci dalda iki alt dala ayrılmaktadır ve bu iki alt dal birbirine 0.65 oranında benzemektedir. Birinci I. alt dalda *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis* ve *V. sativa* subsp. *incisa* var. *cordata* yer almaktadır ve birbirlerine 0.84 oranında benzemektedir. Birinci dalın II. alt dalında *V. hybrida* ve *V. palaestina* yer almaktadır ve birbirlerine yaklaşık olarak 0.75 oranında benzemektedir. İkinci dalda iki alt dala ayrılmaktadır. Bu iki alt dalda *V. cracca* türünün alt türleri yer almaktadır. Bu iki alt dal yaklaşık 0.74 oranında benzemektedir. İkinci dalın I. alt dalında yer alan *V. cracca* subsp. *cracca* ve V. *cracca* subsp. *gerardii* yaklaşık 0.82 oranında benzemektedir. *Vicia cracca* subsp. *atroviolacea*, *V. cracca* subsp. *cracca* ve V. *cracca* subsp. *gerardii*'ye 0.78 oranında benzemektedir. İkinci dalın II. alt dalında *Vicia stenophylla* yar almaktadır. *V. cracca* subsp. *cracca Vicia stenophylla* alt türünden bariz olarak ayrılmaktadır.

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Vicia sativa ve *Vicia cracca* alt türlerinin DNA seviyesinde akrabalık ilişkilerinin tanımlanması asıl amacımızdır. Bu amaç doğrultusunda hızlı ve doğru teşhis için moleküler markır olarak ISSR seçilmiştir. *Vicia* cinsi farklı yaklaşımlarla örneğin, morfolojik (Maxted 1993) ve izozim (Jaaska 1997) analizleri açısından da çalışılmıştır. Türlerin teşhisi için morfolojik markırlar çevre ile etkileşimlerinden dolayı genetik akrabalıkları her zaman yansıtmayabilir (Smith ve Smith 1989). DNA markırlarını genetik akrabalık çalışmaları için ideal yapan, bir bitkinin gelişme safhası ya da çevre şartlarıyla etkilenmemesidir (Reddy ve ark. 2002). Yapılan birçok çalışmada örneklerin teşhisi için ISSR'nin kullanılabilen bir markır olduğu ispatlanmıştır. Hatta yapılan çalışmalarda örneklerde çok iyi ISSR profilleri oluşturmuştur. ISSR- temelli filogenetik analizler farklı olarak bitki varyetelerinde yürütülmüştür (Iruela ve ark. 2002; Pharmawati ve ark. 2004). Ayrıca ISSR markırları yakın akraba olan örnekleri de açıklayabilmektedir. Ayrıca ISSR kültür teşhisi için daha çok önerilen bir markırdır(Wolfe ve Liston 1998). ISSR markırı için belirlenmiş olan primerlerden herhangi primer, örnekleri teşhis etmek için ayrı ayrı kullanılabilmektedir. Çalışmada kullandığımız ISSR markırları da tür ve tür altı taksonların ayrımını sağlamıştır.

Bu çalışmada seçilen *Vicia sativa* varyeteleri ve *Vicia cracca* alt türleri ve dış grup olarak seçilen *Vicia hybrida* ve *Vicia palaestina* türleri olmak üzere 10 takson üzerinde çalışma yapılmıştır. 9 ISSR primeri ile elde edilen amplifikasyon sonucuna göre, taksonların birbirlerine % 55 oranında yakın (UBC 808) akraba oldukları gözlenmiştir. UBC 820 ve UBC 809 primerleri ile *V. sativa subsp. nigra var. segetalis* ve *V. sativa subsp. incisa* var. *cordata* varyetelerinin *V. sativa* türünün diğer iki varyetesinden farklılaştığı görülmüştür. UBC 827, UBC 809, UBC 829, UBC 830, UBC 834 ve UBC 808 primerleri ile *V. cracca* subsp. *cracca* ve *V. cracca* subsp. *atroviolacea* alt türleri oldukça yakın bulunmuştur. Türlerin uzaklıkları ayrı ayrı incelendiğinde en az %55 en fazla % 88 oranında uzak olduğu görülmektedir.

Türlerin benzerlikleri göz önüne alındığında UBC 820, UBC 829 ve UBC 834 primerlerine göre en farklı türün *Vicia palaestina* olduğu söylenebilir.

Jaccard benzerlik indeksinin 0.61 ile 0.84 arasında değiştiği saptanmıştır. 0.84 Jaccard benzerlik katsayısı gösteren *V. sativa* subsp. *nigra* var. *segetalis* ve *V. sativa* subsp. *incisa* var. *cordata* genetik olarak birbirlerine en yakın varyeteler olarak belirlenmiştir. Bu sonuç UBC 809 primeri ile görülen % 95 oranında benzerlik ile uyum göstermektedir. 0.80 Jaccard benzerlik katsayısı gösteren *V. sativa* subsp. *sativa* var. *sativa* ve *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra* genetik olarak birbirlerine yakın varyeteler olarak belirlenmiştir. Bu sonuç UBC 808 primeri ile görülen % 15 oranında benzerlik ile uyum göstermektedir. 0.82 Jaccard benzerlik katsayısı gösteren V. *cracca* subsp. *cracca* ve *V. cracca* subsp. *gerardii* alt türlerindeki genetik olarak birbirlerine en yakın alt türler olarak belirlenmiştir. Bu sonuç UBC 820 ve UBC 808 primerleriyle elde edilen verilerle uyum göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan 9 primerde de görüldüğü gibi V. *cracca* subsp. *cracca* ve V. *cracca* subsp. *stenophylla* birbirinden bariz olarak ayrılmıştır.

Okumuş ve Gülümser (2004)`in yaptıkları bazı *Vicia* türlerinin tohum proteinlerinin genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada *Vicia* türlerinin % 33 ve % 83 arasında değişen oranda genetik benzerlik gösterdiklerini bulmuşlardır. Mevcut çalışmada *Vicia* taksonlarının 0.61 ile 0.84 arasında benzerlik gösterdiği saptanmıştır

Beyazbenli ve ark.(2006)'nın yaptıkları çalışmada *V. sativa subsp. nigra var. nigra* ve *V. craca* subsp. *stenophylla* arasında yaklaşık % 38 oranında benzerlik olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada ise bu iki takson birbirine % 61 oranında benzerlik göstermektedir.

Gedik (2007), *Lathyrus sativus* L ile ilgili yaptığı tez çalışmasında bu cinse ait varyete, hat ve çeşitleri arasındaki moleküler farklılıkların tespiti için kullanılan 50 adet ISSR primerinin polimorfik olduğu bildirmiştir. Mevcut çalışmada ise kullanılan dokuz ISSR primerinin hepsinin polimorfik olduğu bulunmuştur.

Bu sonuca göre, tür içi ve türler arası genetik akrabalıkları tespit etmede önemli bir avantaj sağlayan, ISSR yönteminin *Vicia* cinsinin tür ve tür altı taksonlarının genetik farklılıklarının belirlenmesi ve bu cinsin türler arası ve tür içi

sınflandırmasında oldukça kullanışlı olduğunu ve genotiplerin moleküler karakterizasyonunu belirlemek için de başarıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

Açıkgöz E. 1991 ***Yem Bitkileri***. Uludağ Ün. Basımevi

Agar G., Adiguzel A., Baris O., Sengul M., Gulluce M., Sahin F. Ve Bayrak Ö.F. 2006. FAME vand RAPD analysis of selected *Vicia* taxa from eastern Anatolia, Turkey. ***Ann. Bot. Fennici*** 43: 241-249

Agnese K. B., Bothmer R. V., Dayteg C., Rashal I., Tuvesson S., & Weibul J. 2004 Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity andrelationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. ***Hereditas*** 141: 186-192.

Akpınar N & Bilaloğlu R. 1997 Cytological investigations of certain species of *Vicia* L. ***Turk J Biol*** 21: 197-207.

Albertson, R.C., Markert, J.A., Danley, P.D., Kocher, T.D. 1999 Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid .shes of Lake Malawi. ***East Africa. Proc. Natl. Acad. Sci.*** **USA** 96: 5107–5110.

Arcade, A., Anselın, F., Faıvre Rampant, P., Lesage, M. C., Păques, L. E. And Prat, D. 2000 Application of AFLP, RAPD and ISSR Markers to Genetic Mapping of European and Japanese Larch. ***Theor. Appl. Genet***. 100: 299 - 307.

Archak S., Gaikwad A.B., Gautam D., Rao E.V.V.B., Swamy K.R.M., Karihaloo J.L. 2003 Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. ***Genome*** 46: 362–369.

Bachmann K.1994 Molecular Markers in Plant Ecology. ***The New Phytologist***, 126: 403-418.

Bağcı E., Bruehl L., Özçelik H., Aitzetmuller K., Vural M. and Şahin A. 2004. A study of the fatty acid tocochromanol patterns of some Fabaceae(Fabaceae) plants from Turkey I. Grases Y. ***Aceites***. 55,378-384, 2004

Bahgat S., Shabban O. A., El-Shihy O., Lightfoot D. A., and El- Shemy H.A. 2008 Establishment of the Regeneration System for ***Vicia faba*** **L. *Curr. Issues Mol. Biol***. 11:i47–54.

Belaid Y., Chtourou-Ghorbel N., Marrakchi M. ve Trififarah N. 2006. Genetic diversity within and between populations of *Lathyrus* genus (Fabacea) revealed by ISSR markers***. Genetic Resources and Crop Evolution*** 53: 1413-1418.

Belaj A., Satovıc Z., Cdprıanı G., Baldonı L., Testolev R., Rallo L. and Trujtllo I. 2003 Comparative Study of the Discriming Capacity of RAPD, AFLP and SSR Markers and of Their Effectiveness in Establishing Genetic Relationships in Olive. ***Theor. Appl. Genet***. 107(4): 736-744.

Bellini E., Stefania N. 1997 Il miglioramento genetico del pero nel mondo. ***Riv. Frutticoltura*** 3: 19-30.

Beyazoğlu O & Hayırlıoğlu S. 1991 Karyotype analysis of some Vicia species in Turkey. La Kromosomo II-63-64: 2143-2148.

Bornet B., Branchard M. 2001 Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. ***Plant Mol Biol Rep*** 19: 209-215.

Bowditch B.M., Albright D.G., Williams J.G.K., Braun M.J. 1993 Use of randomly

amplied polymorphic DNA markers in comparative genome studies. ***Methods Enzymol.*** 224:294–309.

Cerny T.A., Caetano-Anollesm G., Trigianom R.N., Starmanm T.W. 1996 Molecular phylogeny and DNA amplification fingerprinting of *Petunia* taxa. ***Theor. Appl. Genet.*** 92, 1009-1016.

Chaparro J.X., Werner D.J., O Malley D., Sederoff R.R. 1994 Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach. ***Theor. Appl. Genet***. 83:194-200.

Chtourou-Ghorbel N., Lauga B., Combes D. ve Marakchi M. 2001 Comperative genetic diversity studies in the genus Lathyrus using RFLP and RAPD markers. *Lathyrus,* ***Lathyrism Newsletter*** 2 : 62-68.

Crouch J.H., Crouch H.K., Constandt H., Van Gysel A., Breyne P., Van Montagu, M., Jarret, R.L. And Ortız, R. 1999 Comparison of PCR-Based Molecular Marker Analyses of *Musa* Breeding Populations. ***Mol Breed*** 5:233–244.

Davis P.H., Plitmann U. 1970. *Vicia* L. in ***Flora of Turkey and the East Aegean Islands,*** Vol 3, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.

Davis P.H. 1988 ***Flora of Turkey and the East Aegean Islands***. Vol 10, Edinburgh Univ. Press. Edinburgh.

Daulatabad C.D., Hosamani K.M., Desai V.A. and Alagawadi K.R. 1987. Cyclopropenoid Fatty acids in Fabaceae Oils. ***JAOCS***, 64 (10), 1423.

Deng Z.N., Gentile A., Nicolosi E., Domina, Vardi A. And Tribulato E. 1995 Identification of in vivo and in vitro lemon mutants RAPD markers. ***J. Hortic. Sci.*** 70: 117-125.

Doğan B., Duran A., & Hakki E. E. 2007 Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) spesies from Turkey based on ISSR amplification. ***Ann. Bot. Fennici*** 44: 353-358.

Durán Y. ve Pérez de la Vega M. 2004 Asessment of genetic variation and species relationships in a collection of *Lens* using RAPD and ISSR. ***Spanish Journal of Agricultural Research*** 2(4): 538-544.

Elçi S.1965 Memleketimizin Önemli Fig Türlerinde Kromozom Sayıları Tespiti ve Kromozom Morfolojilerinin Mukayesesi, ***Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları***, No:254, Ankara.

Elisiario P., Justo E. and Leitao J. 1999 Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis***. Sci. Hort***. 81 (3): 287-299.

El-Rabey H.A., Badr, A., Schäfer-Pregl, R., Martin, W., Salamini, F. 2002 Speciation and species separation in Hordeum L. (Poaceae) resolved by discontinuous molecular markers. ***Plant Biol***. 4: 567–575.

Fang D.Q., RooseM.L., Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers, ***Theor. Appl. Genet***. 95 (1997) 408–417.

Fernández M.E., Figueiras A.M., Benito C. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin, ***Theor. Appl. Genet.*** 104 845–851.

Galderisi U., Cipollaro M., Di Bernardo G., De Masi L., Galano G. And Cascino A. 1999 Identification of hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis. ***Plant Cell Reports*** 18: 652-655.

Galván M.Z., Bornet B., Balatti P.A., & Branchard M. 2003 Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity

and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). ***Euphytica*** 132: 297–301.

Gedik A. 2007. Bazı Mürdümük (*Lathyrus Sativus* L.) Varyete, Hat Ve Çeşitleri Arasındaki Morfolojik, Tarımsal Ve Moleküler Farklılıkların Saptanması Üzerine Bir Araştırma. ***Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü***, Adana.

Genckan M.S. 1992 ***Forage Crops Production***. Ege University Press, İzmir.

Goulao L., Cabrıta L., Oltverıa C.M. and Leıtao J.M. 2001 Comparing RAPD and AFLP (TM) Analysis in Discrimination and Estimation of Genetic Similarities Among Apple (*Malus domestica* Borkh.) Cultivars - RAPD and AFLP Analysis of Apples. ***Euphytica*** 119 (3): 259-270.

Greene S.L., Gritsenko M., Vandemark G. 2004. Relating morphologic and RAPD marker variation to collection site environment in wild populations of red clover (*Trifolium pratense* L.). ***Gen. Res. Crop Evol.*** 51: 643–653.

Gülsen O., Mutlu N. 2005 Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. ***Alatarım*** 4 (2): 27–37.

Haider A., Bahieldin A., Hassanin R., Mahmoud N. Ve Madkour M. 2001 Molecular Characterization of some species of the genus *Vicia*. ***Arab Journal of Biotechnology***, 4:202-204.

Harada T., Matsukawa K., Sato T., Ishikama R., Niizeki M., Saito K. 1993 DNA RAPDs detect genetic variation and paternty in *Malus*. ***Euphytica***, 65: 87-91.

Harrison R.E., Luby J.J., Furnier G.R., Hancock J.F. 1997 Morphological and molecular variation among populations of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (Rosaceae) from North America. ***Am. J. Bot***. 84 (5): 612-620.

Hartl L. and Seefelder S. 1998 Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. ***Theor. Appl. Genet***., 96: 112-116.

Hashmi G., Huettel R., Meyer R. and Krusberg L. 1997 RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. ***Plant Cell Reports*** 16: 624-627.

Heinkel R., Hartmann W. and Stosser R. 2000 On the origin of the plum cultivars Cacaks Beauty, Cacaks Best, Cacaks Early and Cacaks Fruitful as investigated by the inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fragments. ***Scientia Horticulturae***. 83: 149-155.

Hoey B.K., Crowe K.R., Jones V.M., Polans N.O. 1996. A phylogenetic analysis of Pisum based on morphological characters and allozyme and RAPD markers. ***Theor. Appl. Genet.*** 92: 92-100.

Hosaka, K. and Hanneman R.E. 1994 Random Amplified Polymorphic DNA markers detected in a segregating hybrid population of *Solanum chacoense* x *S. phureja*. ***Jpn J Genet***. 69: 53-66.

Jain A., Bhatia S., Banga S.S., Prakash S. 1994 Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationships to heterosis. ***Theor. Appl. Genet.*** 88: 116-122.

Jianming G., Shougong Z., Liwang Q., Yong Z., Chunguo W., Wenqin S. 2006. ISSR and AFLP identification and genetic relationships of Chinese elite accessions from the genus *Populus*. ***Ann. For. Sci***. 63: 499-506.

Johns M.A., Schrotch P.W., Nienhuis J., Hinrichsen P., Bascur G., Munoz-Schick C. 1997 Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morhological data. **Crop Sci.** 37: 605–613.

Joshi S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar P.K., Brar D.S. 2000 Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. ***Theor. Appl. Genet***. 100:1311– 1320.

Iruela M., Rubıo J., Cubero J.I., Mıllan T. 2002 Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. ***Theor Appl Genet*** 104: 643-651.

İnceer H., Hayırlıoğlu-Ayaz S & Beyazoğlu O. 2002 Cytotaxonomicinvestigations on some taxa of the genus *Vicia* L. from northeastern Anatolia. ***Acta Botanica Gallica*** 149: 125-138.

Kafkas S. 2006 DNA Markörleri ve Bitki Islahında Kullanımı Kursu. Kurs notu (Yayınlanmamış).

Kamari G., Felber F. & Garbari F., (Ed.) 1994 Mediterranean Chromosome Number Reports 4. ***Flora Mediterranea***, 4: 233-301

Kantety R.V., Zeng X., Bennetzen J.L., Zehr B.E., 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (Zea mays L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. ***Mol. Breeding*** 1, 365–373.

Karaca M., Saha S., Zipf A., Jenkins J.N., Lang D.J. 2002 Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon* spp.): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprintig. ***Crop Science*** 42: 2118–2127.

Kijas J.M.H., Fowler J.C.S., Thomas M.R. 1995 An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. ***Genome*** 38: 349–355.

Kobayashi M., Lin J.Z., Davis J. Francis L. and Clegg M.T., 2000 Quantitative analysis of avocado outcrossing and yield in California using RAPD markers. ***Scientia Horticulturae*** 86: 135-149.

Koller B., Lehmann A., Mcdermott J.M., Gessler C. 1993 Identification of apple cultivars using RAPD markers. ***Theor. Appl. Genet***., 85: 901-904.

Kupicha FK.1976 The infrageneric structure of *Vicia*. ***Notes from the Royal Botanical Garden of Edinburgh*** 34: 287–326.

Kwieicinska B. and Matyka S. 1986. Fatty acids in seeds of pea, Field pea and Horse bean. ***Biuletyn Informacyjny Przemyslu Paszowego***, 25 (3), 11-16.

Levinson G., Gutman G.A. 1987 Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. ***Mol. Biol. Evol***. 4: 203–221.

Linhart Y.B., Grant M.C., 1996 Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. ***Ann. Rev. Ecol. Syst***. 27:237–277.

Liu B. and Wendel J. F. 2001 Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. ***Molecular Ecology Notes.*** 1: 205-208.

Maxted N., Callimassia M.A., Bennett M.D.1991 Cytotaxonomic Studies of Eastern Mediterranean *Vicia* Species (Fabaceae). ***Pl. Syst. Evol***. 177: 221-234.

Maxted N. 1993 A phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (Fabaceae, *Vicieae*). ***Botanical Journal of the Linnean Society*** 111: 155–182.

McGregor C.E., Lambert C.A., Greyling M.M., Louw J.H., Warnich L. 2000 A comparative assessment of DNA .ngerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. ***Euphytica*** 113: 135–144.

Meriç, Ç., Olgun G. 1994. Edirne çevresinde yetişen bazı *Vicia* L. türleri üzerinde morfolojik ve karyolojik araştırmalar. ***XII. Ulusal Biyoloji Kongresi***. 6-8 Temmuz, Edirne.

Mıgnouna H.D., Abang M. M. And Asıedu R. 2003 Harnessing Modern Biotechnology for Tropical Tuber Crop Improvement: Yam (*Dioscorea* spp.) ***Molecular Breeding. African Journal of Biotechnology*** 2(12): 478-485.

Nicese F.B., Hormaza J.L., McGranahan G.H. 1998 Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. ***Euphytica*** 101: 199-206.

Ortiz A., Renaud R., Calzada I., Ritter R. 1997 Analysis of plum cultivars with RAPD markers. ***J. Hortic. Sci***. 72: 1-9.

Okumuş A., Gülümser A. 2004 Determination of Genetic Diversity in Some Vetches (*Vicia* spp.) by seed proteins, ***International Journal of Biology and Biotechnology*** 1 (2), 149-152.

Okun D. O., Kenya E. U., Oballa P.O., Odee D. W. ve Muluvi G. M. 2008. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (*Hill* ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. ***African Journal of Biotechnology*** Vol. 7 (13): 2119-2123.

Pejıc I., Ajmone Marsan P., Morgante M., Cozumplıck V., Castıglıonı P., Taramıno G. and Motto M. 1998 Comparative Analysis of Genetic Similarity Among Maize Inbred Lines Detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. ***Theor. Appl. Genet.*** 97: 1248-1255.

Potokina E. K. 1997 *Vicia sativa* L. aggregate (*Fabaceae*) in the flora of former USSR. ***Genetic Resources and Crop Evolution*** 44: 199–209

Potokina, E.K., Eggi, E. 1999 Intraspecific Diversity of *Vicia sativa* L. and *Vicia angustifolia* Rwichard Deduced from Seed Protein Electrophoresis, **FABIS** Newsletter, 40, 13-17.

Potokina E., Vaughan DA., Eggi EE., Tomooka N. 2000 Population diversity of the Vicia sativa agg. (Fabaceae) in the flora of the former USSR deduced from RAPD and seed protein analyses, ***Genetic Resources and Crop Evolution*** 47:2, 171-183;31 .

Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tevgey S. and Rafalskı A. 1996. The Comparison of RFLP, RAPD,AFLP and SSR (microsatellite) Markers for Germplasm Analysis. ***Molec. Breed***. 2: 225-38.

Prevost A., Wilkinson M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars, ***Theor. Appl. Genet.*** 98 107–112.

Rana M. K. and Bhat K. V. 2005 A comparison of AFLP and RAPD Markers for Genetic Diversity and Cultivar Identification in *Cotton.* ***J. Plant Biochem. Biotec***.13 (1): 342-351.

Raina S.N., Rees H. 1983 DNA Variation Between and Within Chromosome Complements of *Vicia* species. ***Heredity***, 51: 335- 346.

Rajesh P.N., Sant V.J., Gupta V.S., Muehlbauer F.J., Ranjekar P.K. 2003 Genetic relationships among annual and perennial wild species of *Cicer* using inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism. ***Euphytica*** 129: 15-23.

Ratnaparkhe M.B., Santra D.K., Tullu A., Muehlbauer F.J. 1998 Inheritance of inter-simplesequence repeat polymorphisms and linkage with fusarium wilt resistance gene in chickpea. ***Theor Appl Genet*** 96: 348-353.

Reddy M.P., Sarla N. ve Siddiq E.A. 2002 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

Polymorphism and its Application in Plant Breeding. ***Euphytica*** 128: 9-17.

Reddy M.P., Chowdhury M.A., Vandenberg B. ve Warkentin T. 2002 Cultivar Identification and Genetic Relationship Among Selected Breeding Lines and Cultivars in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). ***Euphytica*** 127:317-325.

Rubeena F. R., Taylor P.W.J. 2003 Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*). ***Theor Appl Genet*** 107: 910-916.

Sica M., Gamba G., Montieri S., Gaudio and Aceto S. 2005 ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. ***BMC Genetics*** 6:17

Smouse T.M. and Chang S.S. 1967 A systematic characterisation of the reversion flavour of soybean oil. ***Journal of American Oil Chemists Society,*** 44, 509.

Spooner D.M., Tivang J., Nienhuis J., Miller J.T., Douches D.S., Contreras M.A. 1996 Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *Etuberosum* (subgenus *Potatoe*). ***Theor. Appl. Genet***. 92: 532–540

Stuber W.C. 1992 Biochemical and molecular markers in plant breeding. ***Plant Breeding News*** 9: 36–61.

Şahin A & Babaç MT. 1990 Cytotaxonomic investigations on some *Vicia* L. species in east and southeast Anatolia I. ***Turk J Bot*** 14: 24-38.

Tanyolaç B. 2003. Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (*Hordeum*. *vulgare* subsp. *spontaneum*) populations from west Turkey. ***Genetic Resources and Crop Evolution*** 50: 611–614.

Tautz D., Renz M. 1984 Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. ***Nucleic Acids Res***. 12: 4127–4138.

Terzopoulos, P.J., Bebeli P.J. 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. ***Field Crops Research*** 108 : 39–44

Tewatia B.S. and Virk A.S. 1996 Nutritional potential of faba bean for improved productivity in ruminants. ***FABIS***-New letter 38-39.

Tiță I. 1992 *Studiul comparativ al ADN-ului nuclear şi evoluția din genul Vicia*, În: Cercetări de genetică vegetală şi animală, Institutul de cercetări pentru ceriale şi plante tehnice – ***Fundulea***, p.71-75.

Tiță I.,1996 *Citogenetica şi evoluția plantelor*, Ed. Lotos, Craiova, p. 137-181.

Tutin, T.G. 1968 ***Flora Europaea.*** Vol. 2: 129-136.

Vavilov, N.I. 1951 The origin, variation, immunity and breeding cultivated plants. Translated by K.Start. ***Chron. Bot.*** 13:1-366.

Vijayan, K., 2004 Genetic relationships of Japanese and Indian mulberry (*Morus* spp.) genotypes revealed by DNA fingerprinting. ***Plant Syst. Evol***. 243:221-232.

Wang Y., Chen J., Lu J. and Lamikanra O. 1999. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vitis* species and Florida bunch grapes. Scientia ***Horticulturae***. 82: 85-94.

Warburton M.L., Bliss F.A. 1996 Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. ***J. Am. Soc. Hortic. Sci***. 121: 1012-1019.

Wolfe, A. D. & Liston A. 1998. Contributions of PCR- based methods to plant systematics and evolutionary biology. – In: Soltis, D.E., Soltis P. S. & Doyle J. J.(eds.), ***Molecular systematics of plants II***: 43-86. Kluster Acad. Publ.

Boston.

Wolfe A.D., Randle C.P. 2001 Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. ***Syst. Bot.*** 26:120–130.

Wolff I.A. and Kwolek W.F. 197. Lipids of the Fabaceae. In: ***Chemotaxonomy of the Fabaceae.*** (Eds.): Harborne J.B., Boulter D. and Turner B.L., Academic Press, London and New York.

Wu C.J., Cheng Z.Q., Huang X.Q., Yin S.H., Cao K.M. and Sun C.R. 2004 Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of the endangered species. ***Plant Science***, 167, 35-42.

Yae B. and Ko K. 1995 Classification of *Malus domestica* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. ***J. Korean Soc. Hortic. Sci.*** 36:824-828.

Yamamoto K.1973 Karyotaxonomical studies on Vicia I. on the karyotype and character of some annual species of *Vicia*. ***Japan J Genetics*** 48: 315-327.

Yang X. and Quiros C. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. ***Theoret. Appl. Genet***. 96: 602-611.

Zıetkıewıcz E., Rafalskı A., Labuda D. 1994 Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. ***Genomics*** 20: 176-183.