

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI YAYGIN FİĞ (*Vicia sativa* L.) ÇEŞİTLERİNİN ÇİMLENME DÖNEMİNDEKİ TUZ STRESİNE TOLERANTLIK SEVİYELERİNİN FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Nuray İŞİDOĞRU

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI YAYGIN FİĞ (*Vicia sativa* L.) ÇEŞİTLERİNİN ÇİMLENME DÖNEMİNDEKİ TUZ STRESİNE TOLERANTLIK SEVİYELERİNİN FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Nuray İŞİDOĞRU

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **24/01/2018**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

ÇANAKKALE

Nuray İŞİDOĞRU tarafından Prof. Dr. İskender TİRYAKİ yönetiminde hazırlanan ve **24/01/2018** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan **"Bazı Yaygın Fiğ (*Vicia sativa* L.) Çeşitlerinin Çimlenme Dönemindeki Tuz Stresine Tolerantlık Seviyelerinin Fizyolojik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi"** başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. İskender TİRYAKİ ……

Başkan

Prof. Dr. Metin TUNA ……

Üye

Yrd. Doç. Dr. Yonca SURGUN ACAR ……

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:……

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: 1156

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

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

Nuray İŞİDOĞRU

TEŞEKKÜR

Başta tezimin gerçekleştirilmesinde çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum saygı değer danışman hocam Prof. Dr. İskender TİRYAKİ'ye teşekkürü bir borç bilirim. Tezimin laboratuvar çalışmalarının yürütülmesi aşamasında yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Dr. Uğur SARI ve Gülhan BAYTEKİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince zorlukları benimle göğüsleyen, hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme başarılarımı ithaf eder ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nuray İŞİDOĞRU

Çanakkale, Ocak 2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ml	Mikrolitre
µm	Mikrometre
L	Litre
g	Gram
%	Yüzde oranı
mg	Miligram
cm	Santimetre
ng	Nanogram
˚C	Derece Santigrat
ml	Mililitre
dH_2O	Deiyonize Su
mM	Milimolar
DNA	Deoksiribonükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Tm	Erime sıcaklığı
Ta	Bağlanma sıcaklığı
U	Ünite
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
UV	Ultraviyole
V	Volt
sn	Saniye
dk	Dakika
EtBr	Ethidium Bromide
rpm	Dakikada devir sayısı
kb	Kilo Baz
cM	Santimorgan

ÖZET

BAZI YAYGIN FİĞ (*Vicia sativa* L.) ÇEŞİTLERİNİN ÇİMLENME DÖNEMİNDEKİ TUZ STRESİNE TOLERANTLIK SEVİYELERİNİN FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Nuray İŞİDOĞRU
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman : Prof. Dr. İskender TİRYAKİ
24/01/2018, 44

Bu çalışma ülkemizde tescil edilen ve yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan 10 adet yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) çeşitlerinin tuz stresi altındaki çimlenme performanslarının belirlenmesi ve lokus spesifik gen markırı kullanılarak tuza tolerantlık seviyelerine yönelik çeşitler arası genetik ilişkinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada her genotipten 50 adet tohum, 4 tekrarlamalı olarak tesadüf blokları deneme desenine göre çimlendirme testine alınmıştır. Tohumlar çift katlı kurutma kağıdı bulunduran kapaklı cam petrilere (60x1.5 mm) yerleştirilip üzerlerine 4 ml 250 mM NaCl solüsyonu ilave edilerek karanlıkta sıcaklığı 20±0.5 ^{o}C'ye ayarlanmış iklim dolabına konulmuştur. Çalışmada 3 mm redikula çıkışı çimlenmiş tohum olarak kabul edilmiştir. Çimlenen tohumlar günlük olarak sayılarak petri kabından uzaklaştırılmıştır. Çimlenen tohumlarda çimlenme oranı, çimlenme hızı ve çimlenme homojenitesi parametreleri belirlenmiştir. Sonuçlar tuz stresinin bazı çeşitlerin çimlenme oranlarında büyük düşüşlere neden olduğu, bazı çeşitlerin ise tuz stresini kısmen daha iyi tolere edebildiklerini göstermiştir. Çalışmada kullanılan 9 adet lokus spesifik DNA markırı toplam 55 bant üretmiş olup bunların 34' ünün polimorfik olduğu saptanmıştır. Markır başına ortalama 6,1 adet bant üreten lokus spesifik markırların ortalama polimorfizm oranı % 53,1 olarak tespit edilmiştir. En düşük ve yüksek polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değerleri sırasıyla *MtProDH* (0,19) ve *SOS1* (0,50) markırlarından elde edilmiştir. Markırlara ait ortalama PIC değeri 0,30 olarak hesaplanmıştır. NTSYSpc paket program kullanılarak oluşturulan genetik benzerlik martriksi ve devamında UPGMA yöntemine göre oluşturulan dendrogram, tuz stresine karşı çeşitler arasında dar bir genetik tabanın var olduğunu ve bunun geliştirilmesi gerektiğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Yaygın Fiğ, Tuz Stresi, Çimlenme, Tolerant, DNA Markır, Polimorfizm.

ABSTRACT

DETERMINATION of SALT TOLERANT LEVELS of COMMON VETCH (*VİCİA SATİVA* L.) VARIETIES at GERMİNATİON STAGE BASED on PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

Nuray İŞİDOĞRU

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology

Advisor: Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

24/01/2018, 44

This study aimed to determine germination performance of ten common vetch varieties, which were registered and were commonly used in Turkey, under salt stress condition and to revieal genetic relationship based on loci specific DNA markers for salt tolerance levels. Germination test was conducted with 50 seeds with 4 replications by using randomized complete block design. Seeds were placed on double filter paper in a covered glass petri plates (60x1.5 mm) and 4 ml 250 mM NaCl and were treated with 4 ml of 250 mM NaCl. Then, petri plates were kept in a growth chamber at 20±0.5 ^{o}C in darkness. Seeds showed 3 mm visible redicle recorted as germianted seed. Germianted seeds were dailly counted and were removed from petri dishes. Germination ratio, speed and span of germination parameters were determined. The results reviealed that salt stress significantly reduced germination ratio of some varities while others were able to tolerate salt stress better. Nine loci spsecific DNA markers used in the study produced a total of 55 bants. Mean polimorphism ratio for the markers used was determined as 53.1% along with an avarage 6,1 bant per marker. MtProDH and *SOS1* had the lowest (0,19) and the hishest (0,50) polimorhism information content, respectively. Mean PIC value was calculated as 0,3. Similarity matriks was determined by using NTSYSpc packed program and UPGMA method was used to get dendrogram. The results indicated that genetic base of common vetch for salt tolerance is limited and need broadening such narrow genetic base.

Keywords: Common Vetch, Salt Stress, Germination, Tolerance, DNA Marker, Polymorphism.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 11
3.1. Materyal 11
3.1.1. Bitki Materyalinin Temin Edilmesi 11
3.2. Yöntem 11
3.2.1. Çimlenme Denemeleri 11
3.2.2. Çimlendirme Denemelerinde Ölçülen Parametreler 13
3.2.3. DNA Markır Analizleri İçin Bitkilerin Yetiştirilmesi 14
3.2.4. Genomik DNA İzolasyonlarının Gerçekleştirilmesi 14
3.2.5. DNA Konsantrasyon Eşitlemesi 16
3.2.6. DNA Esasına Dayalı Lokus Spesifik Markır Analizleri 16
3.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Koşulları 17
3.2.8. PCR Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi 20
3.2.9. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi 22
3.2.10. Moleküler Farklılıkların (Polimorfizmin) Belirlenmesi 22
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 24
4.1. Kontrol Tohumlarına Ait Çimlendirme Parametreleri 24
4.1.1. Kontrol Tohumlarına Ait Çimlenme Yüzdesinin Açısal (Arcsin) Transformasyonu [ÇimY] 24
4.1.2. Kontrol Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 10 Çimlenme için Geçen Süre ($Çim_{10}$) 25

4.1.3. Kontrol Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 50 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{50}$) 26
4.1.4. Kontrol Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 90 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{90}$) 27
4.1.5. Kontrol Şartlarında Çimlenen Tohumların Çimlenen Homojenitesi ($Çim_{10-90}$) 27
4.2. NaCl (250 mM) Uygulanan Tohumlara Ait Çimlenme Parametreleri 28
4.2.1. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumların Çimlenme Yüzdesinin Açısal (Arcsin) Transformasyonu [ÇimY] 28
4.2.2. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 10 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{10}$) 30
4.2.3. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 50 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{50}$) 31
4.2.4. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 90 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{90}$) 31
4.2.5. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumların Çimlenen Homojenitesi ($Çim_{10-90}$) 32
4.3. Tuz Stresine Yönelik Lokus Spesifik DNA Markırları ile Genetik İlişkinin Belirlenmesi 33
BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER 38
KAYNAKLAR 40
ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Yaygın fiğ (*Vicia sativa*)'in çiçek yapısına ait bir görünüm.……2
Şekil 3.1. Petrilerin hazırlanmasına ait görüntü……...12
Şekil 3.2. Çift katlı kurutma kağıtlarına yerleştirilen tohumlara ait görüntü……..……12
Şekil 3.3. Petrilerdeki tohumlar üzerlerine 4 ml 250 mM NaCl solüsyonu ilavesine ait görüntü……13
Şekil 3.4. DNA ekstraksiyonu amacıyla kullanılacak olan çeşitlerin fide dönemlerine ait görüntüleri……...14
Şekil 3.5. 12 adet fiğ çeşidinden izole edilen genomik DNA'lar ve stok olarak hazırlanan lokus spesifik primer çiftlerine ait bir görünüm……..15
Şekil 3.6. İzole edilen genomik DNA örneklerine ait jel görüntüsü……16
Şekil 3.7. İlgili primerlerin *Tm* (Melting Temperature) sıcaklıkları esas alınarak 6 farklı sıcaklıkta Gradient PCR kullanılarak test edilmelerine ait jel görüntüsü……....18
Şekil 3.8. Applied Biosystems marka Veriti 96 Well Thermal Cycler……...19
Şekil 3.9. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları……..20
Şekil 3.10. PCR ürünlerinin agaroz jel kuyucuklarına yüklenmelerine ait görüntü……20
Şekil 3.11. 80 volt ve 35-40 amper sabit akımda jelde yürütülen PCR ürünlerine ait görüntü……21
Şekil 3.12. 80 volt ve 35-40 amper sabit akımda jelde yürütülen PCR ürünlerine ait görüntü……21
Şekil 3.13. UV transillüminatör kullanılarak jellerin görüntülerinin alınmalarına ait bir görüntü……22
Şekil 4.1. Kontrol şartlarında Ürkmez (K2) ve Cumhuriyet (K3) çeşitlerine ait tohumların petrilerdeki çimlenmelerine ait görüntü……...28
Şekil 4.2. 250 mM NaCl uygulaması sonrası Cumhuriyet çeşidi tohumlarının çimlenmelerine ait görüntü……..33
Şekil 4.3.1. Çalışmada kullanılan lokus spesifik *SOS1* ve *SOS2* DNA markırlarına ait jel görüntüsü……....35
Şekil 4.3.2. Çalışmada kullanılan *Mt-Acti*n markırına ait jel görüntüsü……..35
Şekil 4.3.3. Çalışmada kullanılan lokus spesifik *SOS3*, *DREB1B*, *P5CS*, *MtP5CS*, *MtProDH*, *AtNHx1* DNA markırlarına ait jel görüntüsü……36
Şekil 4.3.4. UPGMA yöntemine göre oluşturulan dendrogram……...37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan bitki materyaline ait çeşit adı ve kaynağı…….....11
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin adları, sekans dizileri ve PCR bağlanma sıcaklıkları(*Ta*)……17
Çizelge 3.3. PCR çalışmasında kullanılan karışım ve bileşenleri……..19
Çizelge 4.1.1. Kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların çimlenme yüzdesinin açısal (Arcsin) transformasyonu [ÇimY]'na ait varyans analiz sonuçları……..24
Çizelge 4.1.2. Kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların çimlenme oranları (%), açısal trasnformasyonları ([Çim Y]), çimlenme hız ($Çim_{10}$, $Çim_{50}$, $Çim_{90}$) ve homojite ($Çim_{10-90}$) verileri……25
Çizelge 4.1.3. Kontrol tohumlarının % 10 çimlenmesi için gerekli süreye ait varyans analiz sonuçları……..26
Çizelge 4.1.4. Kontrol şartlarında çimlenen tohumlarının % 50 çimlenmesi için gerekli süreye ait varyans analiz sonuçları……..26
Çizelge 4.1.5. Kontrol tohumlarının % 90 çimlenmesi için gerekli süreye ait varyans analiz sonuçları……..27
Çizelge 4.1.6. Kontrol tohumlarının çimlenme homojenitesi verilerine ($Çim_{10-90}$) ait varyans analiz sonuçları ……...27
Çizelge 4.2.1. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumlara ait çimlenme yüzdesinin açısal (Arcsin) transformasyonu [ÇimY]'na ait varyans analiz sonuçları ……29
Çizelge 4.2.2. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumlara ait çimlenme oranları (%), açısal trasnformasyonları ([Çim Y]), çimlenme hız ($Çim_{10}$, $Çim_{50}$, $Çim_{90}$) ve homojite ($Çim_{10-90}$) verileri ……29
Çizelge 4.2.3. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumların % 10'unun çimlenmesi için geçen süreye ilişkin varyans analiz sonuçları ……....30
Çizelge 4.2.4. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumların % 50'sinin çimlenmesi için geçen süre ($Çim_{50}$)'ye ait varyans analiz sonuçları ……...31
Çizelge 4.2.5. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumların % 90' ının çimlenmesi için geçen süreye ilişkin varyans analiz sonuçları ……32
Çizelge 4.2.6.Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumların % 10 çimlenmeden % 90 çimlenmeye ulaşabilmesi için geçen süre ($Çim_{10-90}$)'ye ilişkin varyans analiz sonuçları ……...32
Çizelge 4.3. Tuz stresine yönelik lokus spesifik DNA markırlarının kullanılması sonucu amplifiye olan bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm oranları (%) ve PIC değerleri…….....34

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Akdeniz ve Yakın Doğu gen merkezlerinin örtüştüğü bir coğrafik konuma sahip olan Türkiye, diğer birçok kültür bitkisinde olduğu gibi fiğ bitkisi için de tür içi ve türler arası çeşitliliği ve orijin merkezlerini barındırması bakımından özel bir konuma sahiptir. Serin iklim baklagil yem bitkisi olan yaygın fiğ ülkemizde yoncadan sonra en geniş ekim alanına sahip fiğ türünü oluşturmaktadır. Nemli ve serin yerlerde iyi gelişip yüksek ot verimi verebilen fiğ bitkisi, diğer birçok bitki türünde olduğu gibi tuz stres şartlarında ot ve dane verimi bakımından önemli kayıplara uğramaktadır. Bu durum, hayvansal kaba yem üretiminin zaten yetersiz olduğu ülkemizde çok önemli ekonomik kayıpların oluşmasına neden olmaktadır. Yem bitkileri tarımı, hayvan beslenmesinde ihtiyaç duyulan kaba yemi en ucuz ve bol olarak sağlayan kaynaklar olmaları yanında toprak ve su gibi doğal kaynakların korunmasına sağladıkları katkılar sayesinde sürdürülebilir tarım bakımından da son derece önemli bir yere sahiptir. Tek yıllık olan fiğ (*Vicia sativ*a L.)'in, dünyanın birçok yerinde tane ve ot amaçlı hayvansal-bitkisel üretim sistemi içerisinde yetiştiriciliği yapılmakta yaygın olarak da besi hayvanllarının yem ihtiyacının karşılanmasında kullanılmaktadır (Han, 2010).

Hayvansal üretim artışının sağlanması hayvansal kaynakların geliştirilmesi ve iyileştirilmesi yanında ihtiyaç duyulan kaba yem kaynaklarının geliştirilmesi ve ıslahı ile mümkün olabilmektedir. Hayvansal verimi doğrudan etkileyen unsurların başında kaliteli hayvansal besin kaynakları gelmektedir. Kaliteli hayvan beslenmesi ise hayvanların ihtiyaç duydukları yemin zamanında ve en üst kalitede karşılanmasına bağlıdır. Kaliteli yem kavramı içerisinde hayvan ırklarına uygun rasyonların hazırlanması gibi konular giderek daha da önem kazanmaktadır. Bu nedenle hayvansal ürünlerin hem miktar ve hem de kalitesinin arttırılması uygun ve kaliteli karma yemlerin sağlanması ile mümkün olabilemektedir (Kutlu, 2008).

Baklagil bitkileri, diğer kaba yemlerle karşılaştırıldıklarında mineral, vitamin ve protein bakımından oldukça özel bir konuma sahiptir (Karabulut ve ark., 2007). Fiğ türleri ve özellikle de ülkemizde yaygın olarak tarımı yapılan yaygın fiğ (*Vicia sativa*) tek yıllık olmaları nedeni ile ekim nöbetine girebilecek en önemli baklagil yem bitkisi olma özelliğindedir (Şekil 1). Ham protein oranı yeşil otta % 3-4, danede ise % 20' nin üzerinde bulunduran yaygın fiğ hayvanlar için oldukça lezzetli ve besleyici yem kaynağı olma özelliği taşımaktadır (Francis ve ark., 1999).



Şekil 1.1. Yaygın fiğ (*Vicia sativa*)'in çiçek yapısına ait bir görünüm (Anonim, 2017)

Yaygın fiğ, kışı ılıman geçen sahil bölgelerinde erken sonbaharda ekilerek, kış dönemini değerlendirir ve ilkbaharda biçim olgunluğuna gelir (Gulcan ve Anlarsal, 2006). Kışı ılıman geçen Akdeniz ve Ege bölgelerinde erken sonbaharda, kışı sert geçen Doğu ve Orta Anadolu gibi bölgelerde ise ilkbaharda ekilebilir. Ancak kışlık ve erken ilkbahar ekimlerinin birçok avantajlarının olduğu bilinmektedir. Bu avantajların başında ise kışlık ve erken ilkbahar ekimlerinde veriminin normal ekimlere göre çok daha yüksek olması gelmektedir (Fırıncıoglu ve ark., 1997). Kışlık ve erken ilkbahar ekimlerinin diğer avantajları ise bitkinin hastalık ve zararlılara karşı özellikle daha hassas olduğu gelişme dönemlerinin aşılarak bistkisel tolerantlık ya da dayanıklılığın kazanılmış olmasının sağlanmasıdır. Bunun sonucunda ise verim ve verim bileşenlerinin bu olumsuz biyotik ve abiyotik stres etmenlerinden kaynaklanan kayıplarının minimuma indirilebilmesi mümkün olabilmektedir.

Tuz ve kuraklık bitkisel üretimi doğrudan kısıtlayan en önemli çevresel stres faktörlerinin başında gelmektedir (Botella ve ark., 2005). Tuzluluk yanlış tarımsal uygulamaların yanı sıra toprak ana kayasının tuz kökenli olmasına bağlı olarak ya her zaman var olan ya da sonradan ortaya çıkan önemli bir abiyotik stres faktörüdür. Küresel boyutta bakıldığında tuzluluk probleminin asıl kaynağının NaCl ya da Na_2SO_4 kökenli olduğu görülmektedir (Pessarakli ve Szabolcs, 1999). Bitki büyüme ve gelişmesini doğrudan sınırlandıran tuz, bitki kök bölgesinde osmotik ve iyon dengesinin bozularak ozmotik stresin oluşmasına ve bitkinin topraktan sağlayacağı su miktarının azalarak fizyolojik kuraklık olarak tanımlanan kuralık stresinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Tuteja, 2007). Tuz stresine bağlı olarak ortaya çıkan fizyolojik kuraklık, şiddet ve süreye bağlı olarak bitkinin kullanılabilir su miktarında azalmaya, bitkide fotosentez ürünlerinin azalmasına ve özellikle de bitkide sürgün gelişiminin yavaşlamasına neden olmaktadır. Bitki bünyesinde artan Na

ve Cl iyon miktarları ise bitkinin birçok metabolik olaylarda ihtiyaç duyduğu K^+ , Ca^{+2} ve NO^{-3} gibi iyonların alınamamasına neden olmaktadır (Hu ve Schmidhalter, 2005). Bitkinin ortaya çıkan tuz stresinden etkilenme oranı bitki çeşidi, maruz kalınan tuz stresinin iyon kaynağı ve miktarı ile bitkinin strese maruz kalma süresi ve bitki gelişim evresine bağlı olarak büyük oranda farklılık göstermektedir (Dajic, 2006). Bitki seviyesinde tuz stresine karşı oluşan tepkisel farklılıklar aynı türün farklı çeşitleri arasında dahi değişim gösterebilmektedir (Munns, 2002).

Aşırı sulama gibi yanlış tarımsal uygulamalar hali hazırda var olan tarım alanlarının tuzluluk ve çoraklaşma gibi nedenlerle elden çıkmasına sebep olmaktadır. Diğer taraftan artan dünya nüfusu, iklimsel değişiklikler, bitkilerin yetiştirildikleri bölgelere iyi uyum sağlayabilen, farklı biyotik ve abiyotik stres şartlarını tolere edebilen yeni çeşitlerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilecek olan ıslah çalışmalarında başvurulması gereken en etkin yöntem, hali hazırda var olan ve genetik olarak farklılık gösteren bitki materyalinin amaca uygun olarak taranması çalışmaları oluşturmaktadır.

Bitkisel genetik kaynaklara duyulan ilgi ve duyarlılığın giderek arttığı günümüzde var olan bu genetik kaynaklardan çok yönlü olarak faydalanılabilmesi, söz konusu gen kaynaklarının morfolojik ve fenolojik karakterizasyonları yanında, biyotik ve abiyotik stres etmenlerine karşı tepkilerinin tarla ve laboratuar çalışmaları ile ortaya konmasını ve bunların moleküler çalışmalarla desteklenmesini gerektirmektedir. Ülkemizde altı tanesi endemik olmak üzere 60 türünün bulunduğu bilinen fiğ (*Vicia* ssp.) (Acikgoz ve ark., 1998) cinsi içerisinde, yaygın fiğ çok önemli bir yere tutmaktadır. Ancak fiğ bitkisi, diğer baklagil bitkilerinde olduğu gibi özellikle çimlenme ve fide aşamalarında tuz stesine karşı hassasiyet göstermektedir (Abdul Qados, 2011).

Baklagillerde tür içi ve türler arası taksonomik farklılıklar daha çok morfolojik esaslı yöntemler kullanılarak ortaya konmaktadır (Cil ve Tiryaki, 2016). Bu yaklaşımlar doğru olmakla birlikte farklılıkların ortaya konabilmesi, bütün bitkilerin aynı çevre şartlarında büyütülmesini ve aynı büyüme dönemlerine sahip olmalarını gerektirmektedir. Buna karşın, moleküler markırlar bitki tür ve genotiplerinin belirlenmesi ile genom farklılıklarını daha kısa bir zamanda ve çok kesin bir şekilde belirleyebilme özelliğine sahiptir. Özellikle PCR'a dayalı moleküler markırlar daha az miktarda DNA ile hızlı bir şekilde saptanabilmektedir. Günümüzde farklı amaçlara hizmet çok sayıda moleküler markırlar bulunmaktadır. Bu markırlar bitki moleküler genetiği çalışmalarında genom analizi, genetik haritalama, genotip teşhisi (identification), çeşitlerin kayıt altına alınması, tohumluklarda safiyetin belirlenmesi, genetik çeşitliliğin ortaya çıkarılması ve markıra dayalı seleksiyon ıslahı gibi çok farklı

amaçlarla kullanılabilmektedir (Cil ve Tiryaki, 2016).

Tuz stresine yönelik spesifik gen bölgelerinin, tuza tolerantlık konusunda yapılacak bir tarama çalışmasında kullanılarak ilgili bitki genotiplerinde çoğalma bölgelerinin var olup olmadığının tespiti, kullanılan genotiplerde lokus spesifik çoğalma bölgelerinde var olan farklılıklarının tespit edilerek ilgili genotipler arasındaki genetik ilişkinin tuza tolerantlık esası üzerinden moleküler seviyede belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde tescil edilmiş bazı yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) çeşitlerinin çimlenme evresinde tuz stresine karşı verecekleri tepkilerin laboratuvar şartlarında belirlenmesi, bu stres etmenlerine tolerant çeşitlerin tespit edilmesi, tuz stresine karşı tepki veren spesifik gen markır sistemleri kullanılarak ilgili genotiplerin tuz stresi ile ilgili genetik tabanlarının moleküler yöntemler kullanılarak açığa çıkarılmasını sağlamaktır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Francis ve ark. (1999), çalışmalarında yaygın fiğin çoğunlukla münavebe bitkisi olarak kullanıldığını, bunun yanında yeşil ve kuru ot, silo ve yeşil gübre olarak da çok amaçlı kullanılabildiğini bildirmişlerdir. Yeşil ve kuru otunun hayvanlar için oldukça besleyici ve lezzetli olduğunu, yeşil otunun protein oranının % 3–4, danesinin de % 24-34 civarında olduğunu bildirmişlerdir.

Avcioglu (2000), çalışmasında *Vicia* cinsi içersinde yer alan birçok fiğ türünün ince saplı, bol yapraklı, hayvanlar için lezzetli ot üretmeleri yanında yüksek oranda protein içeren tohumlarının kesif yem olarak değerlendirilebilmesi gibi nedenlerle hayvansal üretim yapan üreticiler tarafından tercih edildiğini bildirmiştir.

Abdul Qados (2011), fiğ (*Vicia ssp*.) cinsi içerisinde, yaygın fiğin çok önemli bir yer tuttuğunu, ancak fiğ bitkisinin diğer baklagil bitkilerinde olduğu gibi özellikle çimlenme ve fide aşamalarında tuz stesine karşı hassasiyet gösterdiklerini belirtmiştir.

Aydın ve Atıcı (2015), yaptıkları çalışmada ülkemizde yetiştirilen buğday, domates, fasulye ve mısır çeşitlerinin farklı konsantrasyonlardaki (0, 75, 150 ve 250 mM) NaCl stresine verdikleri tepkileri araştırmışlardır. Çalışma sonuçları bitki türlerinin tuz stresine farklı tepkiler gösterdikleri ve tolerantlık seviyelerinin bitki türüne bağlı olarak büyük oranda değiştiğini göstermiştir. Araştırıcılar, test edilen bitki türlerinde çimlenme ve fide gelişiminin artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak tüm çeşitlerde büyük oranda gerilediğini, tuza en hassas ve tolerant çşitlerin sırası ile domates ve hibrid mısır olduğunu rapor etmişlerdir.

Doğan ve Çarpıcı (2016), çalışmalarında farklı dozlarda (0, 50, 100, 150 ve 200 mM) tritikale hat ve çeşitlerinin çimlenme dönemlerinde sergiledikleri tepkilerini belirlemişlerdir. Çalışma sonuçları, farklı konsantrasyonlardaki tuz stresinin artan tuz stresine bağlı olarak bitkileri olumsuz yönde etkilendiğini, ancak bazı hatların tuz stresini diğerlerine göre daha iyi tolere edebildiklerini göstermiştir.

Şahin ve Akçalı (2016), farklı konsantrasyonlardaki (0, 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM) tuz uygulamasının bazı pamuk tohumlarının çimlenmeleri üzerine olan etkisini araştırdıkları çalışmada, 100 mM NaCl dozunun tüm çeşitlerin çimlenme oranlarında %30'lara varan düşüşüşlere neden olduğunu, 100 mM üzerindeki tuz konsantrasyonlarının ise çimlenmeyi büyük oranda durdurduğunu rapor etmişlerdir.

Çarpıcı ve Erdel (2015), farklı tuz konsantrasyonlarının çeşitli yonca tohumlarının

çimlenme yüzdesi, kökçük ve sapçık uzunluğu, kökçük ve sapçık kuru ağırlıklarında meydana getirdiği etkileri araştırdıkları çalışmada 100 mM NaCI ve üzeri dozlarda uygulanan tuz stresinin kökçük ve sapçık kuru ağırlığı ile çimlenme oranlarında önemli gerilemelere neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada incelenen bütün özellikler bakımından çeşitler arasında önemli farklılıkların var olduğunu, sapçık kuru ağırlığı ile kökçük ve sapçık uzunluğu açısından çeşit x tuz interaksiyonun önemli çıktığını rapor etmişlerdir. Araştırma sonuçları 200 mM NaCl dozunun özellikle Bilensoy, Gözlü ve İside çeşitlerinde sapçık gelişiminin hiç meydana gelmediğini, Alsancak çeşidinin ise incelenen özellikler bakımından diğer çeşitlere göre daha yüksek bir tolerantlığa sahip olduğunu göstermiştir.

Tolan ve ark. (2017), farklı NaCI konsantrasyonlarının çayır üçgülü (*Trifolium pratense* L.) genotiplerinin çimlenme ve fide gelişimi performansı üzerine etkilerini tespit etmek amacıyla yürüttükleri çalışmada artan tuz konsantrasyonlarının çimlenme yüzdesi, çıkış yüzdesi, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu ve fide yaş ağırlığı verilerinde önemli düşüşlere neden olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada ortalama çimlenme ve ortalama çıkış süreleri ile kuru maddedeki Na^+ ve Cl^- değerlerinde artış meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Aşçı ve Üney (2016), Ege Beyazı macar fiğ tohumlarının farklı konsantrasyonlardaki tuzun (NaCl, 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 ve 300 mM) çimlenme ve bitki gelişimi üzerine etkilerini araştırmışladır. Laboratuvar ve sera şartlarında yürütülen çalışma sonuçları, çimlenme oranının artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda gerilediğini, çimlenme süresininin ise artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını göstermiştir. Araştırıcılar macar fiği bitkisinde 50 mM ve üzeri tuz konsantrasyonunun önemli gerilemelere neden olduğunu, özellikle 100 mM ve üzeri NaCI konsantrasyonlarının ise incelenen çoğu bitkisel özellikte büyük gerilemelere neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Day ve Uzun (2016), farklı tuz konsantrasyonlarının yaygın fiğ tohumlarının çimlenme performasnı üzerine yaptıkları çalışmada 0 dS m^{-1} 'den 20 dS m^{-1} 'e doğru artan tuz miktarının tohumların çimlenme oranlarında önemli azalmalara neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Ertekin ve ark. (2017), Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan Selçuk, Jade, Yücel ve Özveren çeşitlerine ait tohumların farklı tuz konsantrasyonlarına verdikleri tepkileri incelemişlerdir. Çalışmada çimlenme yüzdesi, çimlenme indeksi, ortalama çimlenme süresi, kök ve sap uzunlukları ile fide yaş ağırlığı parametrelerini incelemişlerdir. Araştırıcılar en yüksek çimlenme oranının (%99.29) Selçuk 99 çeşidinin kontrol uygulamasından, en düşük çimlenme oranının ise %5.71 ile Özveren çeşidinin 200 mM NaCI uygulamasından elde

edildiğini rapor etmişlerdir. Çalışma sonuçları tuz konsantrasyonları arasında ortalama çimlenme oranlarının % 29.29 ile %94.82 arasında değiştini, artan tuz konsantrasyonunun çeşitlerin çimlenme oranlarını önemli oranda azalttığını göstermiştir.

Kishor ve ark. (1995), tütünde yapmış oldukları çalışmada, *p5cs* geninin tuz stresi altındaki bitkilerde prolin miktarlarında önemli artışlara neden olduğunu ve bu artışın ise bitkinin tuz stresini daha iyi tolere etmesine neden olduğunu göstermiştir.

Nanjo ve ark. (1999a-1999b), yaptıkları çalışmalarında prolin degredasyonunda görev alan ilk enzimin Prolin dehydrogenase (ProDH) kataliz enzimi olduğu ve bu genin *Arabidopsis* bitkisinden elde edilen dehydrogenase (AtProDH) mRNA ile sessizleştirilmesi sonucunda, bitkinin yüksek NaCl (600 mM) stresine dayanabildiğini göstermişlerdir.

Ünverdi (2007), yaygın fiğ çeşitleri arasındaki morfolojik, moleküler ve tarımsal farklılıkları belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada çeşitler arasında sap kalınlığı, dal sayısı, boş meyve sayısı, meyve genişliği, yaş ve kuru ot verimleri ile bakladaki tohum sayısı bakımından önemli farklılıkların olmadığını bildirmiştir. Çalışmada Jaccard'a göre oluşturulan benzerlik katsayısının 0.36 ile 0.62 arasında değiştiğini, ortalama benzerlik kat sayısının ise 0.52 olduğunu rapor etmiştir. Araştırıcı, Nilüfer ile Ürem-79 ve Cumhuriyet-99 ile Emir fiğ çeşitlerinin birbirlerine en yakın çeşitler olduğunu, Karaelçi ile Kubilay fiğ çeşitlerinin ise genetik olarak birbirlerine en uzak çeşitler olduğunu bildirmiştir.

Topu (2011), bazı adi fiğ hat ve tescilli çeşitleri arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek ve bazı bitkisel farklılıkları ortaya koymak amacıyla yaptığı çalışmada tesadüf blokları deneme desinini üç tekrarlı olarak kullanmıştır. Çalışma sonuçları, çalışmada kullanılan hat ve çeşitler arasında incelenen bitkisel özellikler bakımından çok önemli farklılıkların var olduğunu göstermiştir. Moleküler karakterizasyon amacıyla kullandığı 21 URP markır çiftinin toplam 86 bant üretmiş olup 65'nin polimorfik olduğunu saptamıştır. Ortalama polimorfizim oranı % 74 olarak hesaplamış, ortalama 0.59 olarak hesaplanan PIC katsayısının 0.21 ile 0.88 arasında değişiklik gösterdiğini belirtmiştir. Adi fiğ hatları arasındaki genetik uzaklık 0.04 ile en düşük 0.7 ile en yüksek olarak tespit etmiştir. UPMGA yöntemine göre oluşturulan filogenetik ağaçta fiğ hatları esas olarak iki ana gruba ayrılmıştır. Çalışma sonuçları, fazla oranda polimorfik bant üreten ve PIC değeri yüksek olan URP markırlarının fiğ hat ve çeşitleri arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Ding ve ark. (1996), gelişmiş bitkilerde tuz stresine toleransın geliştirilmesinde hangi genlerin etkili olduğunu belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, kök bükme metodu (root-bending assay) kullanarak tuz bulunduran agarlı besi ortamındaki petrilerde tuza aşırı duyarlı

4 adet mutant *Arabidopsis* bitkisi belirlemişlerdir. Çalışmada bu mutantların (*sosl-7, sosl-2, sosl-3,* and *sosl-4*) birbirleri ile allelik oldukları ve bir resesif gen mutasyonu sonucu meydana geldikleri belirlenmiştir. Araştırıcılar, mutant bitkilerin fenotipik olarak herhangi bir farklılık sergilemediklerini ancak NaCI stresine karşı normal bitkilerdan 20 kat ve üzerinde bir hassasiyet gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Zhu ve Liu (1997), *Arabidopsis thaliana*'nın *SOS1* mutantının, yabani *Arabidodsis*'e göre NaCl stresine yirmi kat daha fazla duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında, Prolin (Pro)'in bitki tuz toleransında genel olarak önemli bir rol oynadığını bildirmişler ve *SOS1* mutantı ile yabani türü NaCl stresi altında Pro biriktirme kapasiteleri açısından karşılaştırmışlardır. *SOS1* mutant bitkilerinde, yabani türe göre daha fazla Pro saptamışlardır. Pro biyosentezinde hız sınırlayıcı aşamayı katalize eden *P5CS* geninin, tuz stresi altında *SOS1*'de yabani türe göre daha yüksek seviyede uyarıldığını belirtmişlerdir. Bir fosfolipaz C homologu ve varsayılan bir koruyucu proteini kodlayan AtPLC ve RD29A'nın sentezlenme seviyelerinin, yabani türde *SOS1*'dekiyle aynı olduğunu, bununla birlikte AtMYB 'nin ifadesinin, *SOS1*'deki tuz stresiyle daha yüksek seviyeye uyarıldığını göstermişlerdir. Dolayısıyla, *SOS1* geni ürününün, *P5CS* ve *AtMYB*'nin ekspresyonu için negatif bir düzenleyici görevi gördüğünü, ancak *AtPLC* ve *RD29A* ekspresyonu üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Zhu ve ark. (1998), tuza karşı aşırı hassas (sos) bitki fenotipini sergileyen herhangi yeni mutantın belirlenmesi amacıyla yapılan geniş kapsamlı mutant taramasında 28 adet sos1, sos2 ve sos3 mutantının yeni allelerini içeren mutant bitkiler belirlenmiştir. Resessif kalıtım gösteren *sos2* geni 5. kromozomuna haritalanmış olup PHYC lokusuna 2.3 cM mesafede linkage olduğu belirlenmiştir. Büyüme parametreleri sos2 mutantının Na1 ve Li1 iyonlarına aşırı hassiyet gösterdiğini ancak diğer stress faktörlerine karşı normal tepkiler verdiğini göstermiştir. Sos2 mutant bitkilerde düşük seviyedeki K1 varlığında büyüme gösteremedikleri ve dolayısı ile *SOS2* geninin aynı zamanda K1 iyonu için gerekli olduğu belirlenmiştir. Sos2 mutant bitkisinde sos uyarımlı birçok genin ifadesinin aşırı şekilde arttığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *SOS1, SOS2* ve *SOS3* allelerinin K1 iyon dengesi ve tuza tolerantlık mekanizmasının oluşturulması için *Arabidopsis* bitkisinde gerekli olduğu belirlenmiştir.

Kasuga ve ark. (1999), çalışmalarında bitki verimliliğinin kuraklık, aşırı tuz ve don gibi çevresel streslerden büyü ölçüde etkilendiğini belirtmişler. Dehidrasyon yanıt elementi (DRE) olan bir *cis*-etkili promotor elementin, bu streslere yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenlemede önemli bir rol oynadığını daha önceki çalışmalarında rapor ettiklerini,

DREB1A transkripsiyon faktörünün, DRE ile spesifik olarak etkileşime girdiğini ve stres tolerans genlerinin ekspresyonunu uyardığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında transgenik bitkilerde *DREB1A* kodlayan cDNA'nın aşırı ekspresyonunun, normal büyüme koşulları altında bu stres tolerans genlerinin çoğunun ekspresyonunu aktive ettiğini ve kuraklığa, aşırı tuza ve donmaya karşı geliştirilmiş toleransa neden olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, *DREB1A*'nın ekspresyonunu tetiklemek için kullandıkları *35S* karnabahar mozaik virüsü (CaMV) promotörünün normal büyüme koşullarında ciddi büyüme geriliği ile sonuçlandığını, bunun aksine, *DREB1A*'nın stresle uyarılabilir *rd29A* promotörünün ekspresyonu, bitki büyümesi üzerinde minimal etkiler yaratırken, stres koşullarında CaMV promotör geninin ekspresyonundan daha fazla tolerans sağladığını belirtmişlerdir.

Shi ve ark. (2000), *Arabidopsis thaliana*'da *SOS1* geniyle ilgili yapmış oldukları çalışmalarda SOS1 mutantlarının yüksek Na^+ ve düşük K^+ şartlarında hassasiyetlerinin çok fazla arttığını, yapılmış olan genin klonlanması sonucunda bu lokusa ait genin 127-kDa'lık bir proteinin kodladığını belirtmişlerdir. Klonlanan bu proteinin N-terminal bölümünde 12 transmembran bölgesinin ve C-terminal bölümünde uzun bir hidrofilik stoplazmik kuyruğunun bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, aynı zamanda *SOS1* geninin bakteri ve fungustaki *Na1yH1* genine benzerlik gösterdiğini ifade etmişlerdir. Yapmış oldukları sekans analizleri *SOS1* geninin tuzluluk stresiyle ilgili önemli fonksiyonlar üstlendiğini tespit etmişlerdir. *SOS1* geninin ifadesi, özellikle tuz stresi varlığında gen ifadesinin arttığı ve dolayısıyla *SOS1* genini bulunduran bitkilerde tuza tolerantlığın arttığını ifade etmişlerdir.

Ortega ve ark. (2008), çalışmalarında kaktüs bitkisinde 6, 9 ve 11 günlük tuz stresindeki prolin biyosentezinde en önemli olan enzimlerden biri olan delta 1-prolin-5-karboksilat sentaz (*P5CS*: γ-glutamil kinaz, EC 2.7.2.11 ve glutamat-5-semialdehit dehidrojenaz, EC 1.2.1.41) enziminin ifade seviyesini incelemişlerdir. NaCl ile muamele edilmiş olan kaktüs bitkisinin yapraklarında kladod kalınlığının azaldığını, kök uzamasının azaldığını ve önemli ve giderek artan seviyede prolin miktarının hem zamana hem de artan konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini, genç yapraklarda biriktiğini bildirmişlerdir. *P5CS* geninin aktivitesini, g-glutamyl kinase enziminin varlığı üzerinden analiz etmişlerdir. Tuz uygulaması sonucunda miktarının genel olarak azaldığını, 6. gündeki 75 ve 150 mM'luk tuz konsantrasyonlarındaki streste kısmi bir artış gözlediklerini bildirmişlerdir. Kaktüsteki *P5CS* geninin sekans bilgilerini incelemek için açık okuma bölgesi (ORF)'ni izole etmişler ve bu proteinin amino asit dizisinin % 90,4 oranında buz çiçeği (*Mesembryanthemum crystalline*)'ndeki P5CS proteini ile benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. RT-PCR

analizleri *Osp5cs* geninin kaktüste 9 ve 11 günlük uygulama neticesinde ekspresyon seviyelerinin arttığını bildirmişler. Aynı zamanda ABA uyarılmış olan gen ifadesinin de yine kaktüs bitkisinde arttığını bildirmişlerdir. Bu da tuz stresi altındaki *O. streptacantha* bitkisindeki prolin akkümülasyon miktarının hücre içerisindeki ozmotik dengenin ayarlanması için kritik bir rol oynadığını göstermiştir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitki Moleküler Genetik ve Biyoteknolojisi laboratuvarında 2016-2017 yılları arasında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyalinin Temin Edilmesi

Çalışmada ülkemizde tescil edilmiş ve yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan 12 yaygın fiğ çeşidi deneme materyali olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bitki materyalinin adı ve kaynağı Çizelge 3.1'de sunulmuştur. Deneme materyali olarak 2015 yetiştirme sezonunda hasat edilmiş tohumlar ilgili kurumlardan talep edilmiş ve çalışmada kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan bitki materyaline ait çeşit adı ve kaynağı

Numara	**Çeşit Adı**	**Kaynağı**
1	Alınoğlu	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enst. (Ankara)
2	Ayaz 2013	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enst. (Ankara)
3	Ankara Moru 2013	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enst. (Ankara)
4	Bakır 2013	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enst. (Ankara)
5	FarukBey 2014	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enst. (Ankara)
6	Zemheri 2014	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enst. (Ankara)
7	Alper	Ege Tarımsal Araştırma Enst. (İzmir)
8	Cumhuriyet	Ege Tarımsal Araştırma Enst. (İzmir)
9	Selçuk	Ege Tarımsal Araştırma Enst. (İzmir)
10	Ürkmez	Ege Tarımsal Araştırma Enst. (İzmir)
11	Özveren	Akdeniz Tarımsal Araştırma Enst. (Adana)
12	Yücel	Akdeniz Tarımsal Araştırma Enst. (Adana)

3.2. Yöntem

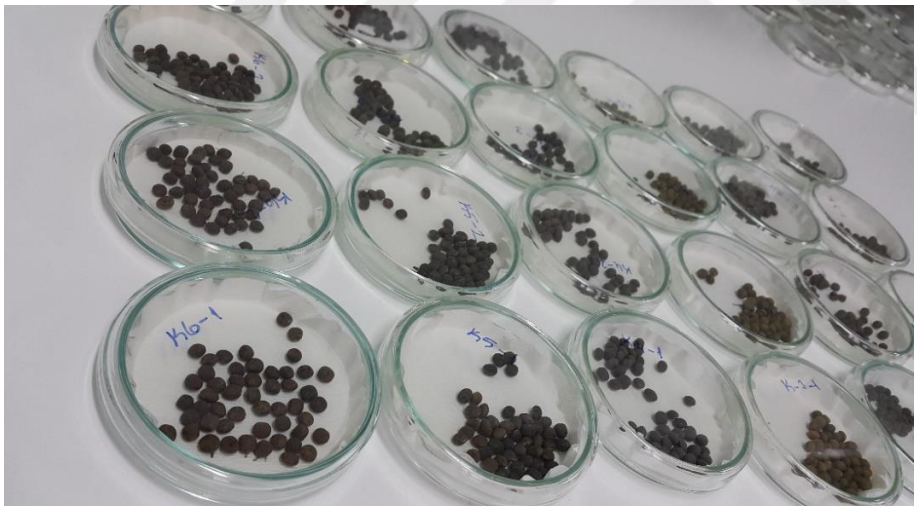
3.2.1. Çimlenme Denemeleri

Çalışmada her genotipe ait 50 adet tohum 4 tekrarlı tesadüf blokları deneme desenine göre çimlendirme testine alınmıştır. Çift katlı kurutma kağıdı üzerine konulan tohumlar kapaklı petrilere (80x1.5 mm) Şekil 3.1-3.2'de gösterildiği şekilde yerleştirilmiştir. Üzerine 4 ml 250 mM NaCI ilave edilerek karanlıkta sıcaklığı 20±0.5 ^{o}C'ye ayarlanmış iklim dolabına konulmuştur (ISTA, 1999, Şekil 3.3). Çalışmada kullanılan tuz stresi seviyesi yapılan ön denemeler ile belirlenmiştir.

Çalışmada kontrol tohumları tuz stresi uygunlanan tohumlarda olduğu şekilde hazırlanmış ve üzerlerine 4 ml saf su ilave edilerek karanlıkta, 20±0.5 ºC'de çimlenmeye bırakılmıştır.



Şekil 3.1. Petrilerin hazırlanmasına ait görüntü



Şekil 3.2. Çift katlı kurutma kağıtları üzerine yerleştirilen tohumara ait görüntü



Şekil 3.3. Petrilerdeki tohumlar üzerine 4 ml 250 mM NaCl solüsyonu ilavesine ait görüntü

Tohumlar günlük olarak kontrol edilmiş ve çimlenen tohumlar petri kabından sayılarak uzaklaştırılmıştır. Denemeye herhangi bir genotipte üç gün süre ile çimlenen tohum sayısında herhangi bir değişikliğin olmadığı zamanda sonlandırılmıştır (15 gün). Çalışmada görünür kökçük çıkışı (1-2 mm) çimlenmiş tohum olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak çimlenme oranı, çimlenme hızı ve çimlenme homojenitesi parametreleri literatürde belirtildiği şekilde hesaplanmış ve varyans analizine tabi tutulmuştur (Tiryaki, 2006).

3.2.2. Çimlendirme Denemelerinde Ölçülen Parametreler

Çimlenen tohumlarda aşağıda belirtilen parametreler literatürde belirtildiği şekilde belirlenmiştir (Tiryaki, 2009).

Çimlenme Oranı (%): **[**Çimlenen tohum sayısı/Toplam tohum sayısı] x100 olarak hesaplanmıştır.

Çimlenme Oranının (Arcsin) Transformasyonu [ÇimY]: ÇimY olarak belirlenen değerlerin açısal (arcsin) transformasyonu alınarak hesaplanmıştır.

$Çim_{10}$ (gün): Çimlenen tohumların % 10'unun çimlenmesi için gerekli gün sayısı.

$Çim_{50}$ (gün): Çimlenen tohumların % 50'sinin çimlenmesi için gerekli gün sayısı.

$Çim_{90}$ (gün): Çimlenen tohumların % 90'ının çimlenmesi için gerekli gün sayısı.

$Çim_{10}$-$Çim_{90}$ (gün): % 90 çimlenmeye ulaşmak için gerekli gün sayısından % 10 çimlenmeye ulaşmak için gerekli gün sayısı çıkarılarak hesaplanmıştır.

3.2.3. DNA Markır Analizleri İçin Bitkilerin Yetiştirilmesi

Her çeşitten 5 tohum içerisinde torf bulunan plastik kaplara ekim derinliği 2-3 cm olacak şekilde ekilmiş ve laboratuvar sıcaklığında (21˚C) büyümeye bırakılmıştır. Çıkış gösteren fideler 21 gün büyütüldükten sonra (Şekil 3.4) her bitkiden genç yaprak ve sürgünleri makasla kesilerek plastik zipbag içerisine konulmuş ve DNA izolasyonu aşamasına kadar -80˚C'de depolanmıştır.



a b

Şekil 3.4. DNA ekstraksiyonu amacıyla kullanılacak olan çeşitlerin fide dönemlerine ait görüntüleri (a) 11 günlük fiğ fideleri, (b) 20 günlük fiğ fideleri

3.2.4. Genomik DNA İzolasyonlarının Gerçekleştirilmesi

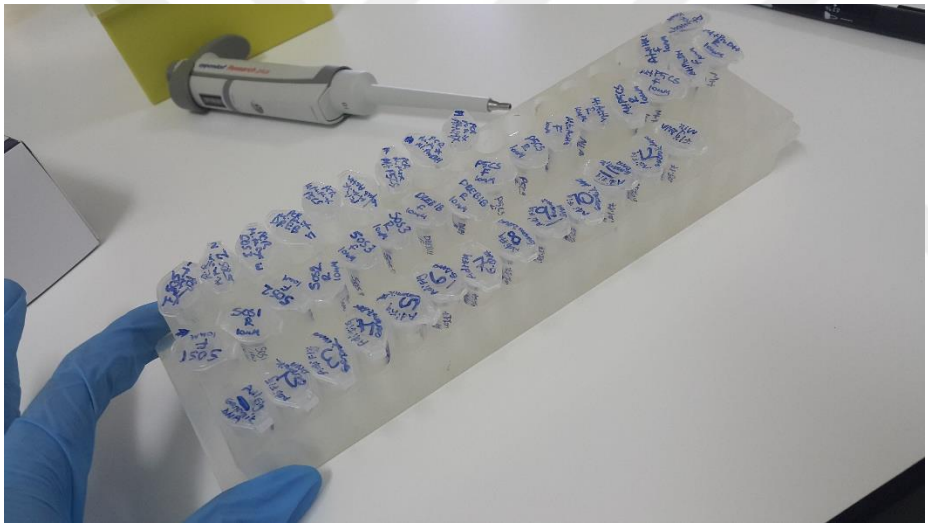
DNA izolasyonu bitki DNA izolasyon kiti (Favorgen, Pingtung, Taiwan) kullanılarak, üretici firmanın protokolü esas alınarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon işlemi için -80˚C'de bekletilen dondurulmuş doku örneklerinden her çeşit için 50 mg numune alınmıştır. Homojenisasyon işleminin ardından örnek tüpüne 400 µl FAPG1 tamponu ve 4 µl RNase A ilave edilip vorteksleme yoluyla karıştırılmıştır. Vorteksleme işleminin ardından örnekler önceden ısıtılmış 65˚C su banyosu içerisinde 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında tüpler her 5 dk da bir ters çevrilerek karışması sağlanmıştır. Aynı zamanda 65˚C'de kullanılacak olan elüsyon tamponu (numune başına 200 µl) önceden ısıtılmaya bırakılmıştır. Örnekler 10 dk inkübasyonun ardından su banyosundan alınmış her bir örnek başına tüplere 130 µl FAPG2 tamponu eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır. 5 dk buzda bekletilerek inkübe edilmiştir. 2 ml'lik bir toplama tüpüne (collection tube) filter kolonu (filter column) yerleştirilmiştir. Bu işlem 12 örnek için hazırlanmıştır. Örnek tüplerindeki karışım 5 dk inkübasyon işleminin ardından filter kolonuna aktarılıp 3 dk tam hızda (13000 rpm) santrifüj edilmiştir. Örnekler filter kolonundan geçirildikten sonar santrifüj işleminin ardından filter kolonları atılıp temizlenmiş supernatant toplama tüpü içinde yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

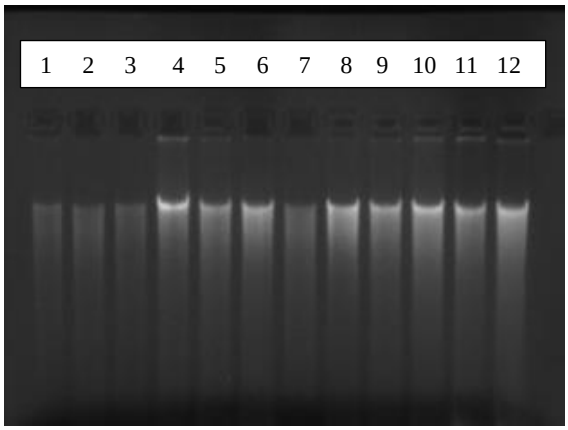
Temizlenmiş lizata 1.5 hacimde FAPG3 tamponu (etanol ilave edilir) ilave edilmiş ve 5 sn vorteksleyerek karıştırılmıştır. 200 ml'lik bir toplama tüpüne bir FAPG kolonu yerleştirilmiş kolona 700 µl önceki aşamadaki karışım uygulanmış 2 dk tam hızda (13000 rpm) santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki kalıntı atılmıştır.

Kolona 500 µl W1 tamponu ilave edilmiş ve 1 dk santrifüj edilmiştir. Ardından kolona 750 µl yıkama tampon ilave edilip (etanol ilave edilir) 30 sn santrifüj edilmiştir. Kolondan geçen sıvı boşaltılmış ve FAPG kolonu toplama tüpüne geri konulmuş kolon matrisini kurutmak için 3 dk santrifüj edilmiştir.

Kuru FAPG kolonu temiz bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktatılmış, kolon matrisine 100 µl önceden ısıtılmış elüsyon tampon ilave edilmiştir. Saflaştırılmış DNA'yı ayrıştırmak için 30 sn tam hızda (13000 rpm) santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elde edilen DNA'lar markör analizinde kullanılmak üzere -20˚C'de saklanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. 12 adet fiğ çeşidinden izole edilen genomik DNA'lar ve stok olarak hazırlanan lokus spesifik primer çiftlerine ait bir görünüm



Şekil 3.6. İzole edilen genomik DNA örneklerine ait jel görüntüsü (1: Alınoğlu, 2: Ayaz, 3: Ankara Moru 2013, 4: Bakır 2013, 5: Faruk Bey 2014, 6: Zemheri 2014, 7: Alper, 8: Cumhuriyet, 9: Selçuk, 10: Ürkmez, 11: Özveren, 12: Yücel)

3.2.5. DNA Konsantrasyon Eşitlemesi

DNA konsantrasyonları %1'lik agaroz jelde kıyaslama yöntemine göre belirlenmiş ve tüm örneklere ait DNA konsantrasyonları 25 ng/µl olacak şekilde eşitlenmiştir (Şekil 3.6). Konsantrasyonu eşitlenen DNA'lar PCR analizlerinde kullanılmıştır.

3.2.6. DNA Esasına Dayalı Lokus Spesifik Markır Analizleri

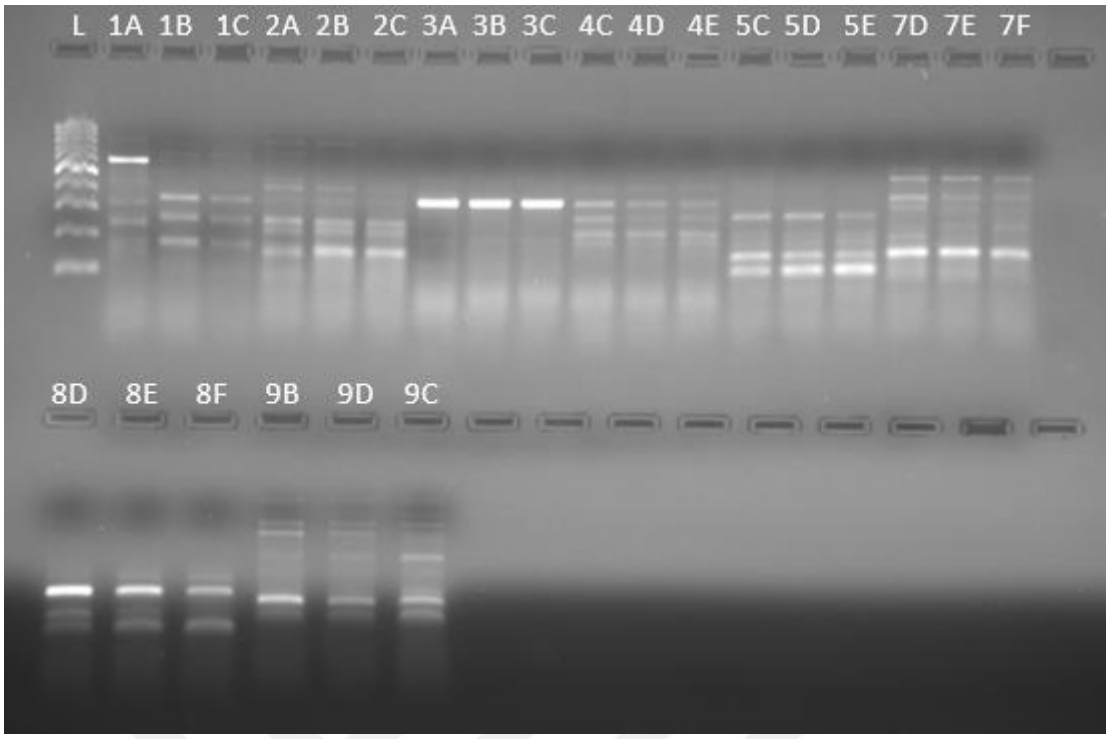
Çalışmada kullanılan lokus spesifik DNA markırları literatürde belirtilen EST ya da kuraklık ve tuz stresinde ekspresyonları artan gen dizilerinden elde edilen primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bai ve ark., 2013; Jin ve ark., 2010; Tang ve ark., 2013). Çalışmada kullanılan lokus spesifik primer çiftlerinin adları, sekans dizileri ve bağlanma sıcaklıkları (*Ta*) Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin adları, sekans dizileri ve PCR bağlanma sıcaklıkları (*Ta*)

Genin Açık Adı	**Gen**	**Forward/ Reverse primer dizisi (5'-3')**	**Bağlanma sıcaklığı (Ta,˚C)**
Medicago truncatula actin	*Mt-Actin*	Forward: ACGAGCGTTTCAGATG	50
		Reverse: ACCTCCGATCCAGACA	
Salt Overly Sensitive Gene 1	*SOS1*	Forward: GCTGACTTTCCCGTATG	48
		Reverse: TGGCACCCAGTTCTTTC	
Salt Overly Sensitive Gene 2	*SOS2*	Forward: CCGTGGTATCTTCTGTT	48
		Reverse: CAAGGGTTAGGTGTATT	
Salt Overly Sensitive Gene 3	*SOS3*	Forward: TCTGAGGCAAACAGGGTA	48
		Reverse: CTGGGAAATGCTAAGGTAAT	
Dehydration Responsive Element Binding factor	*DREB1B*	Forward: GGATCCTGATCAATGAACTACATTTTC	50
		Reverse: AGCTCCCATTCTAAAAAGGAAC	
Delta1 pyrroline -5-carboxylatesynthase	*P5CS*	Forward: TCAGAGGACTACGTGTTGGA	55
		Reverse: ATGAGTACTAAGCAGAGAGG	
Medicago truncatula P5CS	*MtP5CS*	Forward: GAGAGGGAACGGCCAAGTG	52
		Reverse: CAGATCCTTGTGTGTATA	
Medicago truncatula ProlinDeHydrogenase	*MtProDH*	Forward: CCAACGTCCACGCTGATAAGA	57
		Reverse: ACAGGTCCTATAGCCGTTGCA	
Sodium/proton exchangers	*AtNHX1*	Forward: CAACACCCCAAAATCCATAC	52
		Reverse: ATATCCCTTTGTTGGACCAA	

3.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Koşulları

Her bir markır, çalışmada kullanılan çeşitlere ait bitkilerin DNA'larından oluşan DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı ve ayrıntıları aşağıda verilen PCR koşullarında optimizasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Optimizasyon çalışmasında ilgili primerlerin *Tm* (Melting Temperature) sıcaklıkları esas alınarak 6 farklı sıcaklıkta (A: 45˚C, B: 48˚C, C: 50˚C, D: 52˚C, E: 55˚C, F: 57˚C) Gradient PCR kullanılarak test edilmiştir (Şekil 3.7). Bu ön testlerde bant üreten primer çiftleri ve onlara ait en uygun sıcaklıklar (*Ta*) *(SOS1, SOS2* ve *SOS3* için; 48˚C, *DREB1B* için; 50˚C, *P5CS* için; 55˚C, *Mt-Actin* için; 50˚C, *MtP5CS* ve *AtNHx* için; 52˚C, *MtProDH* için; 57˚C) , çalışmada kullanılan çeşitlere ait PCR işlemlerinin yapılmasında kullanılmıştır.



Şekil 3.7. İlgili primerlerin *Tm* (Melting Temperature) sıcaklıkları esas alınarak 6 farklı sıcaklıkta Gradient PCR kullanılarak test edilmelerine ait jel görüntüsü (L: 50 kb DNA ladder; A: 45˚C, B: 48˚C, C: 50˚C, D: 52˚C, E: 55˚C, F: 57˚C; 1: *SOS1*F–*SOS1*R, 2: *SOS2*F-SOS2R, 3: SOS3F–SOS3R, 4: DREB1BF–DREB1BR, 5: P5CSF–P5CSR, 7: MtP5CSF-MtP5CSR, 8: MtProDHF –MtProDHR, 9: AtNHx1F–AtNHx1R)

PCR reaksiyonları, 8'li PCR tüplerinde (strip), 20.5 µl'lik toplam reaksiyon hacminde Applied Biosystems marka Veriti 96 Well Thermal Cycler (PCR makinesi) (Şekil 3.8) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, son konsantrasyonları; 1x PCR tamponu (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, % 0.01 jelatin), 25 mM $MgCI_2$, 0.5 mM dNTPs, 100 ng DNA, 50 ng primer, 0.5 U *Taq* polimeraz (Promega) enzimi olacak şekilde bir araya getirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. PCR çalışmasında kullanılan karışım ve bileşenleri

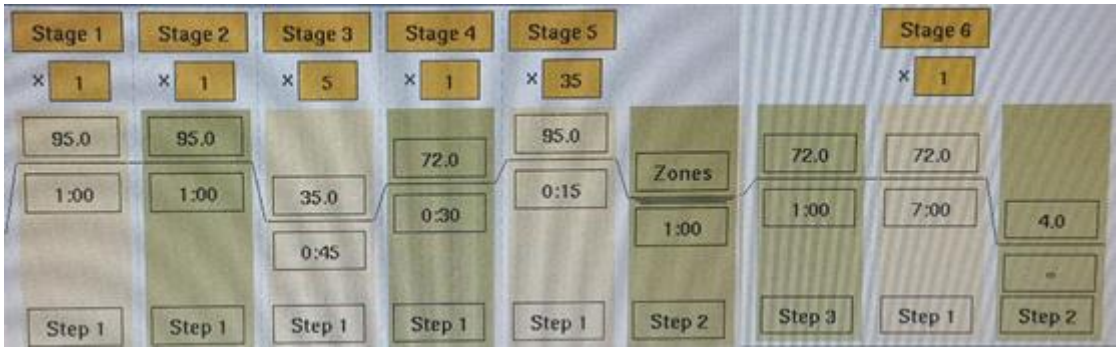
Reaktifler	Hacim	Son Konsantrasyon
dH_2O	33.0 µl	15.0 µl
5x PCR Tamponu	10.0 µl	21.0 µl
$MgCl_2$	3.0 µl	7.0 µl
$dNTP_S$	1.0 µl	7.0 µl
Forward Primer	1.0 µl	7.0 µl
Reverse Primer	1.0 µl	7.0 µl
Taq Polimeraz Enzimi	0.5 µl	0.9 µl
Kalıp DNA	1.0 µl	7.0 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	20.5 µl	



Şekil 3.8. Applied Biosystems marka Veriti 96 Well Thermal Cycler

PCR reaksiyonu, primerlerin bağlanma bölgelerinin kopya sayısını artırmak amacıyla birbirini takip eden ön ve asıl döngü olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Ön döngüde; örnekler 95°C'de 1 dakika, primerlerin spesifik olmayan bağlanma göstermesi için 35°C'de 0:45 dakika ve sentezin gerçekleşmesi için 72°C'de 0:30 dakika 5 döngü kullanılmıştır. Ön döngü devamında cihaz 95°C'de 0:15 dakika, Çizelge 3.2'de verilen bağlanma primer spesifik bağlanma sıcaklıklarında 1:00 dakika ve 72°C'de 1:00 dakika

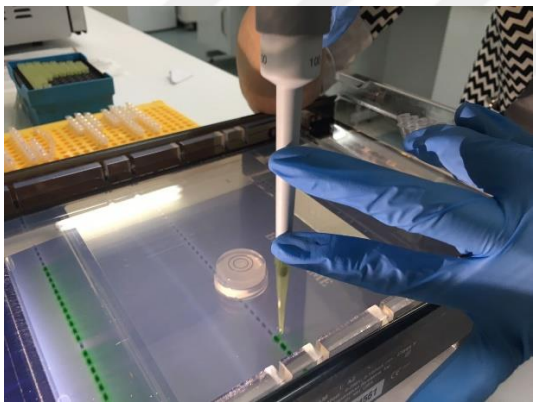
toplam 35 döngü olacak şekilde reaksiyon döngülerinden geçirilerek 72°C'de 7 dakika ile reaksiyon sonlandırılmıştır (Şekil 3.9).



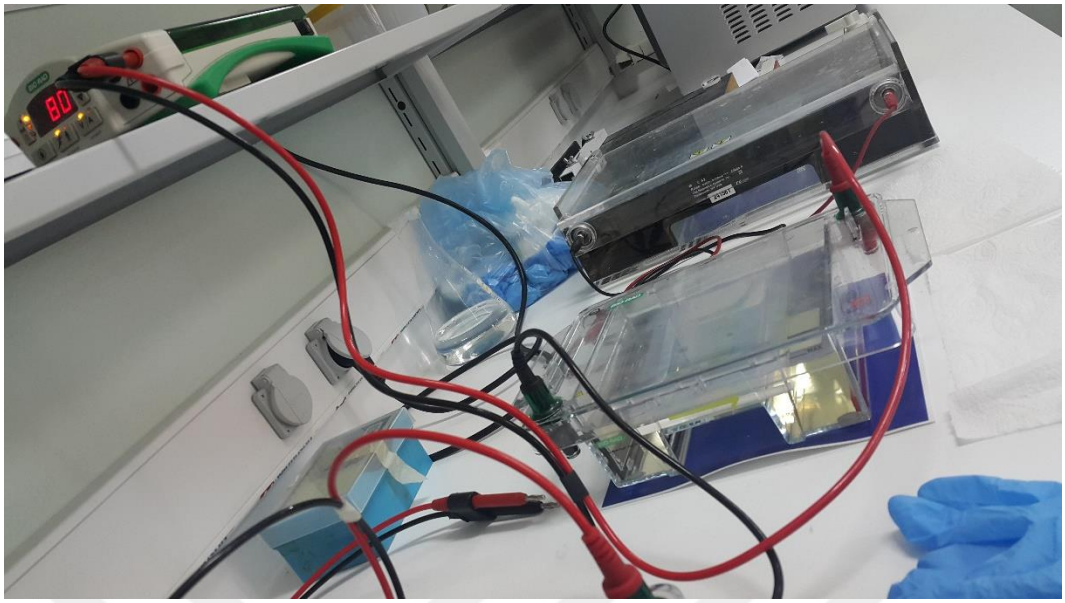
Şekil 3.9. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

3.2.8. PCR Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

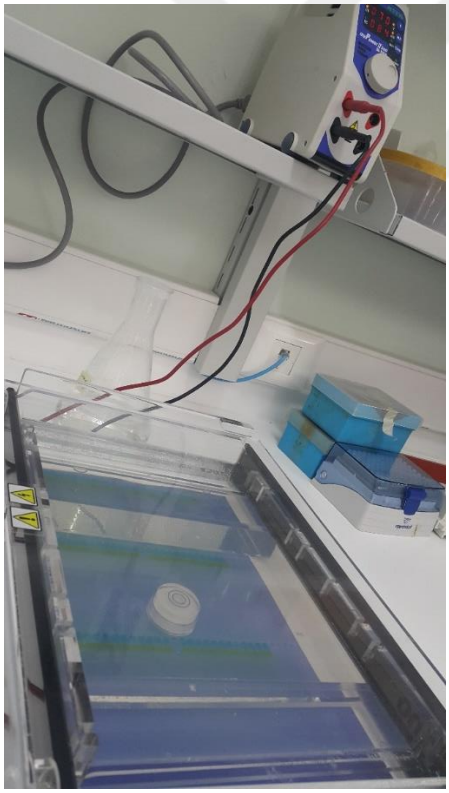
PCR işlemi sonucu elde edilen PCR ürünleri 2.5 µl loading dye (yükleme boyası) ile beraber jele yüklenerek (Şekil 3.10) 80 volt ve 35-40 amper sabit akımda % 2'lik agaroz jelde 3 saat süreyle yürütülmüştür (Şekil 3.11 ve 12).



Şekil 3.10. PCR ürünlerinin agaroz jel kuyucuklarına yüklenmelerine ait görüntü



Şekil 3.11.80 volt ve 35-40 amper sabit akımda jelde yürütülen PCR ürünlerine ait görüntü



Şekil 3.12.80 volt ve 35-40 amper sabit akımda jelde yürütülen PCR ürünlerine ait görüntü

Devamında jeller UV transillüminatör kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 3.13). Görüntülenen jellerin fotoğrafları çekilerek kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.13. UV transillüminatör kullanılarak jellerin görüntülerinin alınmalarına ait bir görüntü

3.2.9. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çimlendirme ve çıkış yüzde değerlerine ArcSin data transformasyonu uygulanmıştır. Sonuçlar SAS paket programı kullanılarak (SAS, 1997) varyans analizine tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Fisher'in en küçük önemli fark (*LSD*) testi ile $P = 0.05$ seviyesinde test edilmiştir.

3.2.10. Moleküler Farklılıkların (Polimorfizmin) Belirlenmesi

Jel elektroforezinden sonra çeşitler arasında DNA profillerindeki benzerlik ve farklılıklara dayalı genetik ilişki NTSYs paket programında genetik mesafe hesaplanarak cluster analizleri yapılmıştır. Bu amaçla jelde görüntülenen DNA bantları var (1) veya yok (0) olarak skorlanmıştır. Oluşturulan verilerden DICE yöntemine göre NTSYS-pc (v.2.1) programı kullanılarak benzerlik matriksi meydana getirilmiştir (Rohlf, 2000). Oluşturulan matriks, UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic average) metoduna göre kümeleme analizinde kullanılmıştır (Kumar ve ark., 2004). Çalışmada kullanılan markırlara ait polimorfizm bilgi içerikleri (PIC, Polymorphism Information Content) aşağıda verilen formüle göre literatürde belirtildiği şekilde hesaplanmıştır (Botstein ve ark. 1980).

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^{n} Pij^2$$

PIC= polimorfizm bilgi içeriği,

Pij= i'inci allelin frekansı,

n= allel sayısının toplamı

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışmanın çimlendirme aşamasıyla ilgili bölümünde kontrol ve 250 mM NaCl uygulamasına ait çimlendirme verileri sunulmuştur. Her iki uygulama da 12 genotip üzerinden yürütülmüş fakat NaCl uygulaması grubuna ait verilerde üç genotip (Ayaz, Alınoğlu ve Bakır) ya hiç ya da değerlendirmeye alınmayacak derecede düşük çimlenme gösterdikleri için istatiksel analizlerden çıkarılmıştır.

4.1. Kontrol Tohumlarına Ait Çimlendirme Parametreleri

Kontrol tohumlarının çimlenme parametreleri hesaplanırken 12 çeşidin tamamı istatistiksel analizlere dahil edilmiştir.

4.1.1. Kontrol Tohumlarına Ait Çimlenme Yüzdesinin Açısal (Arcsin) Transformasyonu [ÇimY]

Kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların çimlenme yüzdesinin açısal (Arcsin) transformasyonu [ÇimY]'na ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1.1. Kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların çimlenme yüzdesinin açısal (Arcsin) transformasyonu [ÇimY]'na ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değeri
Genel	47		
Blok	3	44,50	0,5435
Çeşitler	11	8532,37	0,0001
Hata	33	673,83	

Kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların çimlenme yüzdesinin açısal (Arcsin) transformasyonu [ÇimY]'na ait varyans analiz sonuçları incelendiğinde, çimlendirme oranları bakımından çeşitler arasındaki farkların istatistiksel olarak çok önemli olduğu ($P < 0,0001$) belirlenmiştir (Çizelge 4.1.1).

Çizelge 4.1.2. Kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların çimlenme oranları (%), açısal trasnformasyonları ([Çim Y]), çimlenme hız ($Çim_{10}$, $Çim_{50}$, $Çim_{90}$) ve homojite ($Çim_{10-90}$) verileri*

Çeşitler		Çim Y		$Çim_{10}$	$Çim_{50}$	$Çim_{90}$	$Çim_{10-90}$
		%	ArcSin	(Gün)	(Gün)	(Gün)	(Gün)
1	Selçuk	100,0	$[90,0]^{a}$	$0,97^{de}$	$1,61^{de}$	$2,70^{de}$	$1,72^{bcd}$
2	Yücel	99,5	$[87,9]^{ab}$	$1,15^{cd}$	$1,82^{cd}$	$2,87^{cd}$	$1,72^{bcd}$
3	FarukBey	99,0	$[85,9]^{abc}$	$1,09^{cd}$	$1,55^{de}$	$2,14^{ef}$	$1,04^{de}$
4	Cumhuriyet	99,0	$[85,9]^{abc}$	$0,69^{e}$	$1,54^{de}$	$2,40^{def}$	$1,71^{bcd}$
5	Özveren	98,5	$[83,9]^{abcd}$	$1,09^{cd}$	$1,52^{de}$	$1,70^{f}$	$0,60^{e}$
6	Ürkmez	98,0	$[83,0]^{bcd}$	$0,83^{de}$	$1,02^{f}$	$1,99^{f}$	$1,16^{cde}$
7	Zemheri	95,5	$[79,4]^{cde}$	$1,22^{cd}$	$2,21^{bc}$	$3,58^{c}$	$2,35^{b}$
8	Alper	95,5	$[77,4]^{de}$	$1,08^{cde}$	$1,29^{ef}$	$2,18^{def}$	$1,09^{de}$
9	Ankara Moru	92,0	$[74,1]^{e}$	$0,92^{de}$	$1,86^{cd}$	$2,86^{d}$	$1,94^{bc}$
10	Alınoğlu	78,0	$[62,1]^{f}$	$1,45^{bc}$	$2,43^{b}$	$5,02^{b}$	$3,56^{a}$
11	Ayaz	70,0	$[56,8]^{f}$	$1,66^{ab}$	$2,96^{a}$	$5,76^{a}$	$4,09^{a}$
12	Bakır	50,5	$[45,8]^{g}$	$1,90^{a}$	$3,15^{a}$	$5,86^{a}$	$3,96^{a}$
	$LSD_{0.05}$		6,50	0,40	0,43	0,70	0,83

* Değişik harflerle gösterilen değerler arasındaki fark % 5 seviyesinde önemli

Kontrol tohumlarına ait çimlenme oranları % 50,5-100 arasında değişmiştir. En yüksek çimlenme oranı % 100 çimlenme ile Selçuk çeşidinden elde edilmiştir. Buna karşın en düşük çimlenme oranı % 50,5 ile Bakır çeşidinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.2). Kontrol şartlarında bazı çeşitlerde bu kadar düşük çimlenme oranlarının elde edilmiş olması resmi kurumlardan yeni hasat edilmiş, canlılığı ve çimlenme oranı yüksek tohum örnekleri talep etmemize rağmen tarafımıza gönderilen çeşitlere ait bazı tohumlarda canlılık sorunlarının var olduğunu göstermektedir.

4.1.2. Kontrol Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 10 Çimlenme için Geçen Süre ($Çim_{10}$)

Kontrol şartlarında çimlenen tohumların % 10 çimlenmesi için gerekli süreye ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.1.3. Kontrol tohumlarının % 10 çimlenmesi için gerekli süreye ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değeri
Genel	47		
Blok	3	0,43	0,1638
Çeşitler	11	5,31	0,0001
Hata	33	2,61	

Çizelge 4.1.3'de kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların % 10 çimlenmesi için gerekli süreye ilişkin varyans analiz sonuçları incelendiğinde, zaman bakımından çeşitler arasındaki farkların istatistiksel olarak çok önemli olduğu ($P < 0,0001$) belirlenmiştir. En hızlı çimlenme G_{10}=0,69, Cumhuriyet çeşidinden, en yavaş % 10'luk çimlenme hızı ise çimlenme süresi ise G_{10}=1,90 ile Bakır çeşidinden elde edilmiştir (Çizelge 4.1.2).

4.1.3. Kontrol Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 50 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{50}$)

Kontrol şartlarında çimlenen tohumların % 50 çimlenmesi için gerekli süreye ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.1.4. Kontrol şartlarında çimlenen tohumlarının % 50 çimlenmesi için gerekli süreye ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değeri
Genel	47		
Blok	3	0,12	0,7439
Çeşitler	11	18,73	0,0001
Hata	33	3,06	

Çizelge 4.1.4'de sunulan kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların % 50 çimlenmesi için gerekli süreye ilişkin varyans analiz sonuçları incelendiğinde, çeşitlerin çimlenme hızları arasında çok önemli istatistiksel farkların olduğu ($P < 0,0001$) belirlenmiştir. Kontrol şartlarında çimlenme hızı en yavaş olan çeşitler sırasıyla sırasıyla Bakır ve Ayaz (G_{50}=3,15, G_{50}=2,96 gün), en hızlı çimlenmenin ise G_{50}=1,02 gün ile Ürkmez çeşidinden elde edildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1.2).

4.1.4. Kontrol Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 90 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{90}$)

Kontrol şartlarında çimlenen tohumların % 90 çimlenmesi için gerekli süreye ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.1.5. Kontrol tohumlarının % 90 çimlenmesi için gerekli süreye ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değeri
Genel	47		
Blok	3	3,00	0,0133
Çeşitler	11	96,11	0,0001
Hata	33	7,93	

Çizelge 4.1.5'de sunulan kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların % 90 çimlenmesi için gerekli süreye ilişkin varyans analiz sonuçları incelendiğinde, % 90 çimlenme için geçen zaman bakımından çeşitler arasındaki farkların istatistiksel olarak çok önemli olduğu ($P < 0,0001$) görülmektedir. Kontrol şartlarında en hızlı çimlenme G_{90}=1,70 ve G_{90}=1,99 gün değeri ile sırasıyla Özveren ve Ürkmez çeşitlerinden elde edilmiştir. En yavaş çimlenme ise G_{90}=5,86 ve G_{90}=5,76 gün değerleri ile sırasıyla Bakır ve Ayaz çeşitlerinden elde edildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1.2).

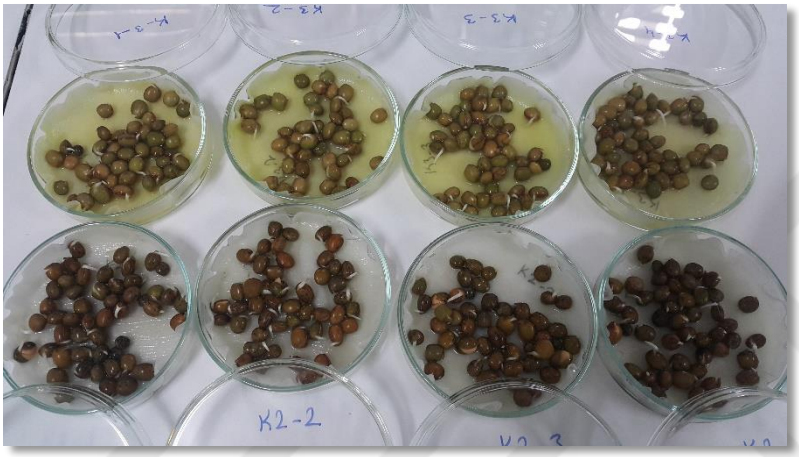
4.1.5. Kontrol Şartlarında Çimlenen Tohumların Çimlenen Homojenitesi ($Çim_{10-90}$)

Kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların % 10 çimlenmeden % 90 çimlenmeye ulaşabilmesi için geçen süre ($Çim_{10-90}$)'ye ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1.6'de verilmiştir.

Çizelge 4.1.6. Kontrol tohumlarının çimlenme homojenitesi verilerine ($Çim_{10-90}$) ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değeri
Genel	47		
Blok	3	2,51	0,0785
Çeşitler	11	61,38	0,0001
Hata	33	11,14	

Çizelge 4.1.6'de sunulan kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların % 10 çimlenmeden % 90 çimlenmeye ulaşabilmesi için geçen süre ($Çim_{10-90}$)'ye ait varyans analiz sonuçları incelendiğinde, çeşitler arasındaki farkların istatistiksel olarak çok önemli ($P < 0,0001$) olduğu görülmektedir. Çimlenme homojenitesi olarak ifade edilen çimlenen tohumların % 10 çimlenmeden % 90 çimlenmeye geçmesi için gerekli süre bakımından en iyi olan çeşidin Özveren (G_{10-90}=0,60), en yavaş çeşitlerin ise G_{10-90}=4,09, G_{10-90}=3,96 ve G_{10-90}=3,56 gün değerleri ile sırasıyla Ayaz, Bakır ve Alınoğlu çeşitlerinin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1.2).



Şekil 4.1. Kontrol şartlarında Ürkmez (K2) ve Cumhuriyet (K3) çeşitlerine ait tohumların petrilerdeki çimlenmelerine ait görüntü

4.2. NaCl (250 mM) Uygulanan Tohumlara Ait Çimlenme Parametreleri

NaCl uygulaması sonrası çimlenen tohumların istatistiksel analizlerine 3 çeşit (Ayaz, Alınoğlu ve Bakır), değerlendirmeye alınmayacak kadar düşük çimlenme oranı (sırasıyla % 0,5, % 0,3 ve % 0,3) gösterdikleri için dahil edilmemiştir.

4.2.1. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumların Çimlenme Yüzdesinin Açısal (Arcsin) Transformasyonu [ÇimY]

Araştırmada kullanılan 12 genotip için 250 mM NaCl uygulaması üzerine kurulan denemede çimlendirilen tohumların çimlenme parametrelerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2.1'de, bu verilere ait çoklu karşılaştırma analiz sonuçları da Çizelge 4.2.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2.1. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumlara ait çimlenme yüzdesinin açısal (Arcsin) transformasyonu [ÇimY]'na ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	**Serbestlik Derecesi**	**Kareler Ortalaması**	**P Değeri**
Genel	35		
Blok	3	155,34	0,4578
Çeşitler	8	11578,72	0,0001
Hata	24	1387,90	

Çizelge 4.2.1' de sunulan sonuçlar incelendiğinde, tuz (NaCl, 250 mM) uygulaması sonrası çimlendirilen tohumların çimlenme oranları bakımından çeşitler arasında çok önemli ($P < 0,001$) farkların olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2.2. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumlara ait çimlenme oranları (%), açısal trasnformasyonları ([Çim Y]), çimlenme hız ($Çim_{10}$, $Çim_{50}$, $Çim_{90}$) ve homojite ($Çim_{10-90}$) verileri*

Çeşitler		Çim Y		$Çim_{10}$	$Çim_{50}$	$Çim_{90}$	$Çim_{10-90}$	Tuz stresinin çimlenme oranında meydana getirdiği gerileme oranı (%)
		%	ArcSin	(Gün)	(Gün)	(Gün)	(Gün)	
1	Özveren	77,5	[62,0]^{a}	2,76^{b}	4,10^{b}	6,81^{ab}	4,05^{ab}	20,6
2	Alper	68,5	[55,8]^{ab}	2,84^{b}	4,03^{b}	6,04^{bc}	3,20^{bc}	25,7
3	Ürkmez	63,5	[52,9]^{ab}	3,33^{b}	4,80^{ab}	7,01^{a}	3,67^{ab}	33,8
4	Cumhuriyet	63,0	[52,6]^{ab}	2,89^{b}	4,75^{ab}	7,19^{a}	4,29^{ab}	35,6
5	Selçuk	57,0	[49,0]^{b}	2,80^{b}	4,66^{ab}	7,26^{a}	4,45^{a}	43,0
6	Yücel	50,5	[45,2]^{b}	3,80^{ab}	5,48^{a}	7,56^{a}	3,75^{ab}	48,7
7	FarukBey	19,0	[23,7]^{c}	3,20^{b}	5,25^{a}	7,08^{a}	3,88^{ab}	79,2
8	Ankara Moru	5,5	[12,6]^{c}	4,70^{a}	5,62^{a}	6,72^{ab}	2,02^{c}	79,5
9	Zemheri	5,5	[13,2]^{c}	3,18^{b}	4,00^{b}	5,56^{c}	2,37^{c}	85,9
	$LSD_{0.05}$		11,09	1,14	1,01	0,93	1,2	
10	Ayaz	0,5						
11	Alınoğlu	0,3						
12	Bakır	0,3						

*Değişik harflerle gösterilen değerler arasındaki istatistik fark % 5 seviyesinde önemli

Tuz (NaCl, 250 mM) uygulaması sonrasında çimlendirilen tohumların çimlenme oranları incelendiğinde (Çizelge 4.2.2), kontrol grubu tohumlarının çimlenme oranlarına göre, önemli derecede düşüşler olduğu gözlenmiştir. Tuz uygulaması sonrası çimlenme oranlarının % 5,5 ile %77,5 arasında değiştiği belirlenmiştir. Tuz uygulaması sonrası en yüksek çimlenme oranı (% 77,5) Özveren çeşidinden, en düşük çimlenme oranı aynı çimlenme oranları (% 5,5) ile Zemheri ve Ankara Moru ile FarukBey (% 19) çeşitlerinden elde edilmiştir. Kontrol şartlarında Zemheri, Ankara Moru ve Faruk Bey çeşitlerinde çimlenme oranları sırasıyla % 95,5, % 92 ve % 99 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1.2). Buna göre tuz stresine bağlı olarak çimlenme oranında en yüksek gerileme % 85,9, % 79,5 ve % 79,2 oranları ile Zemheri, Ankara Moru ve FarukBey çeşitlerinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.2.2). Buna karşılık tuz stresi şartlarına çimlenme oranındaki gerileme %20,6 Özveren çeşidinde en az olarak tespit edilmiştir. Bu durum Özveren çeşidinin tuz stresini daha iyi tolere ettiğini, tuz stresine karşı en hassas olan çeşitlerin ise sırasıyla Zemheri, Ankara Moru ve Faruk Bey çeşitleri olduğuna işaret etmektedir. Bu sonuçlar yaygın fiğ türünde tuza tolerant yeni çeşitlerin geliştirilmesinde Özveren çeşidinin gen kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Buna karşın yaygın fiğ türünde tuza tolerantlık ile ilgili yapılacak genetik haritalama çalışmalarında tuza tolerant Özveren çeşidi ile tuza hassas olan Zemheri, Ankara Moru ve FarukBey çeşitleri arasında yapılacak melezleme çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir.

4.2.2. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 10 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{10}$)

Tuz stresi şartlarında çimlenen tohumların % 10'unun çimlenmesi için gerekli süreye ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.2.3. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumların % 10'unun çimlenmesi için geçen süreye ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değeri
Genel	35		
Blok	3	0,97	0,6662
Çeşitler	8	12,59	0,0347
Hata	24	14,66	

Çizelge 4.2.3' de sunulan sonuçlar incelendiğinde, tuz (NaCl, 250 mM) uygulaması

sonrası çimlendirilen tohumların % 10'unun çimlenmesi için gerekli süre ($Çim_{10}$) bakımından çeşitler arasındaki farkların istatistiksel olarak %5 seviyesinde önemli ($P < 0,0347$) olduğu görülmektedir. Tuz stresi şrtlarında en hızlı çimlenmenin G_{10}=2,76, G_{10}=2,80, G_{10}=2,84, G_{10}=2,89, G_{10}=3,18, G_{10}=3,20 ve G_{10}=3,33 gün değerleri ile sırasıyla Özveren, Selçuk, Alper, Cumhuriyet, Zemheri, FarukBey ve Ürkmez çeşitlerinden, en yavaş % 10'luk çimlenme süresinin ise G_{10}=4,70 gün ile Ankara Moru çeşidinden elde edildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2.2).

4.2.3. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 50 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{50}$)

Tuz stresi şartlarında çimlenen tohumların % 50 çimlenmesi için gerekli süreye ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2.4' de verilmiştir.

Çizelge 4.2.4. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumların % 50'sinin çimlenmesi için geçen süre ($Çim_{50}$)'ye ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değeri
Genel	35		
Blok	3	2,10	0,2515
Çeşitler	8	12,19	0,0133
Hata	24	11,52	

Çizelge 4.2.4' de sunulan sonuçlar incelendiğinde, tuz (NaCl, 250 mM) uygulaması sonrası çimlendirilen tohumların % 50'sinin çimlenmesi için gerekli süre ($Çim_{50}$) bakımından çeşitler arasındaki farkların istatistiksel olarak %5 seviyesinde önemli ($P < 0,0133$) olduğu görülmektedir. Tuz stresi şartlarında çimlenme hızı en yavaş olan çeşitlerin sırasıyla Ankara Moru, Yücel ve Faruk Bey (G_{50}=5,62, G_{50}=5,48 ve G_{50}=5,25), en hızlı çeşitlerin ise G_{50}=4,0, G_{50}=4,03 ve G_{50}=4,10 gün ile sırasıyla Zemheri, Alper ve Özveren çeşitlerinin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.2).

4.2.4. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumlarda % 90 Çimlenme İçin Geçen Süre ($Çim_{90}$)

Tuz (NaCl, 250 mM) stresi uygulaması sonrasında çimlenmeye bırakılan tohumların % 90'ının çimlenmesi için gerekli süreye ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2.5' de verilmiştir.

Çizelge 4.2.5. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumların % 90'ının çimlenmesi için geçen süreye ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değeri
Genel	35		
Blok	3	0,69	0,6435
Çeşitler	8	12,70	0,0046
Hata	24	9,82	

Çizelge 4.2.5' de sunulan sonuçlar incelendiğinde, tuz (NaCl, 250 mM) uygulaması sonrası çimlendirilen tohumların % 90'ının çimlenmesi için gerekli süre ($Çim_{90}$) bakımından çeşitler arasındaki farkların istatistiksel olarak çok önemli ($P < 0,0046$) olduğu görülmektedir. Tuz stresi şartlarında en hızlı çimlenme G_{90}=5,56 gün ile Zemheri çeşidinden, en yavaş çimlenme ise G_{90}=7,01, G_{90}=7,08, G_{90}=7,19, G_{90}=7,26 ve G_{90}=7,56 gün değerleri ile sırasıyla Ürkmez, FarukBey, Cumhuriyet, Selçuk ve Yücel çeşitlerinden elde edilmiştir (Çizelge 4.2.2).

4.2.5. Tuz Stresi Şartlarında Çimlenen Tohumların Çimlenen Homojenitesi ($Çim_{10-90}$)

Tuz stresi şartlarında çimlenen tohumların % 10 çimlenmeden % 90 çimlenmeye ulaşabilmesi için geçen süre ($Çim_{10-90}$)'ye ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.2.6. Tuz (NaCl, 250 mM) stresi şartlarında çimlendirilen tohumların % 10 çimlenmeden % 90 çimlenmeye ulaşabilmesi için geçen süre ($Çim_{10-90}$)'ye ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değeri
Genel	35		
Blok	3	0,18	0,9648
Çeşitler	8	22,50	0,0033
Hata	24	16,36	

Çizelge 4.2.6'da sunulan 250 mM NaCl uygulaması sonrası çimlendirilen tohumların % 10 çimlenmeden % 90 çimlenmeye ulaşabilmesi için geçen süre ($Çim_{10-90}$)'ye ilişkin

varyans analiz sonuçları incelendiğinde, çeşitler arasındaki farkların istatistiksel olarak çok önemli ($P < 0,0033$) olduğu görülmektedir. Tuz stresi şartlarında çimlenme homojenitesinin en iyi olduğu çeşitlerin sırasıyla Ankara Moru ve Zemheri (G_{90-10}=2,02 ve G_{90-10}=2,37) olduğu belirlenmiştir. Ancak bu çeşitlerin tuz stresi şartlarında çimlenme oranlarının %5,5 gibi çok düşük degere sahip olması bu çeşitlerin çimlenme homojenitelerinin iyi olmasını da anlamsız hale getirmektedir. Buna karşılık çimlenme homojenitesi en kötü olan çeşit Selçuk (G_{90-10}=4,45) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2.2).



Şekil 4.2. 250 mM NaCl uygulaması sonrası Cumhuriyet çeşidi tohumlarının çimlenmelerine ait görüntü

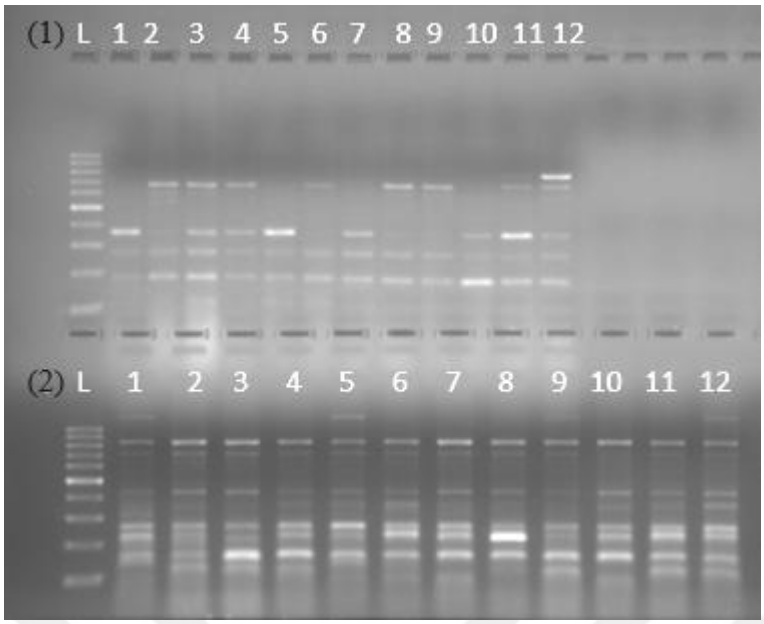
4.3. Tuz Stresine Yönelik Lokus Spesifik DNA Markırları ile Genetik İlişkinin Belirlenmesi

Moleküler markırlar bitki tür ve genotiplerinin belirlenmesi ile genom farklılıklarını daha kısa bir zamanda ve çok kesin bir şekilde belirleyebilme özelliğine sahiptir. Özellikle PCR'a dayalı moleküler markırlar daha az miktarda DNA ile hızlı bir şekilde saptanabilmektedir. Günümüzde DNA markır sistemleri bitki moleküler genetiği çalışmalarında çok farklı amaçlarla kullanılmaktadır (Bell ve Ecker, 1994). Çalışmada tuz stresinde eksprasyonları artan gen dizilerinden DNA markır analiz sonucunda elde edilen tuz stresine yönelik aktif olan lokus spesifik 9 adet marker kullanılmıştır. Kullanılan markırların tamamı bant üretmiş olup bunlardan 1 tanesi (*SOS3*) monomorfik, diğer 8 tanesi (*SOS1, SOS2, DREB1B, P5CS, Mt-Actin, MtP5CS, MtProDH, AtNHx1*) farklı oranlarda polimorfik bant üretmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Tuz stresine yönelik lokus spesifik DNA markırlarının kullanılması sonucu amplifiye olan bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm oranları (%) ve PIC değerleri

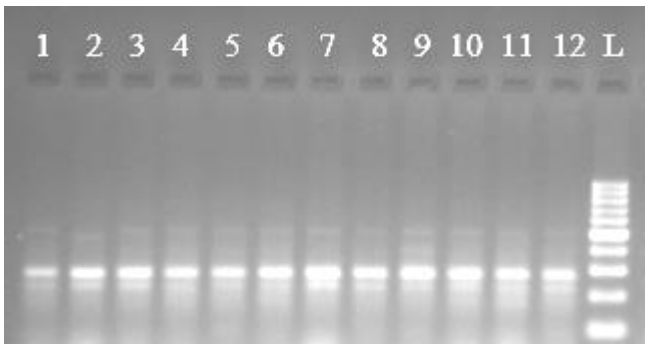
Markır isimleri	**Amplifiye olan bant sayısı**	**Polymorfik bant sayısı**	**Polymorfizm oranı (%)**	**PIC**
SOS1	8	6	75,0	0,50
SOS2	11	5	45,5	0,29
SOS3	1	0	0,0	0,00
DREB1B	4	3	75,0	0,44
P5CS	8	6	75,0	0,32
Mt-Actin	4	1	25,0	0,23
MtP5CS	9	7	77,8	0,45
MtProDH	3	1	33,3	0,19
AtNHX1	7	5	71,4	0,25
Toplam bant Sayısı	55	34		
Ortalama bant Sayısı	6,1	4,3	53,1	0,30

Çalışmada kullanılan lokus spesifik DNA markırları toplam 55 bant üretmiş olup bunlardan 34'ünün polimorfik olduğu saptanmıştır. Toplam üretilen 55 bantın % 53,1'i polimorfik olarak saptanmıştır (Çizelge 4.3). Markır başına ortalama bant sayısının 6,1 olduğu çalışmada ortalama polimorfik DNA bant sayısı 4,3 adet olarak hesaplanmıştır. Ortalama polimorfizm bilgi içeriği (Polymorhisim Information Content, PIC) değeri 0,30 olarak hesaplanmıştır. Polimorfik bant üreten markırlar arasında en düşük PIC değeri 0,19 ile *MtProDH*, en yüksek değer ise 0,50 ile *SOS1* genine ait markırlarda tespit edilmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.3.1-4.1.2).

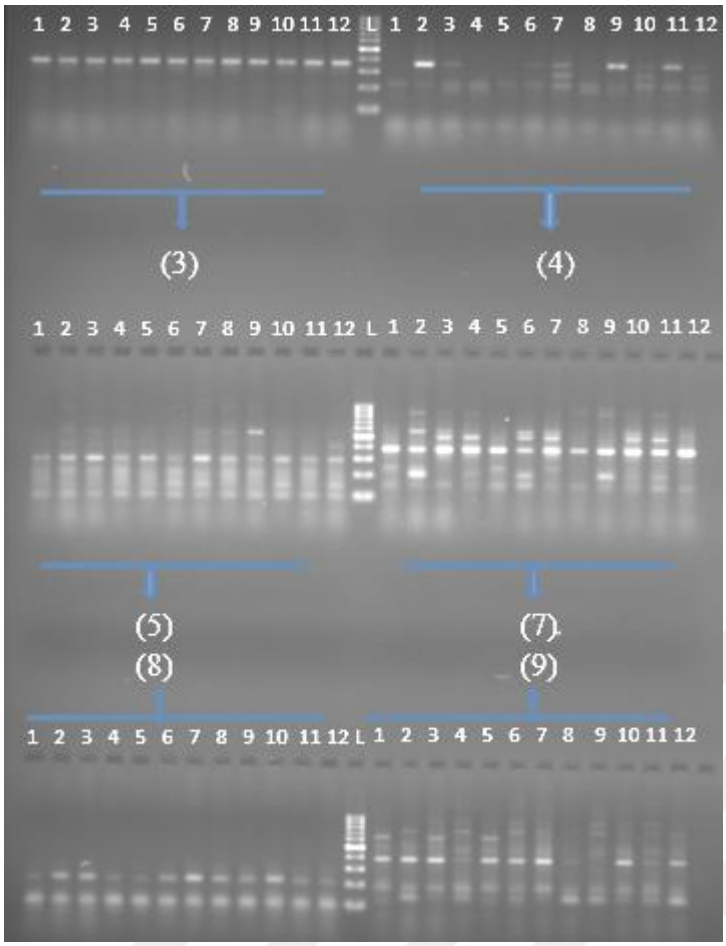


Şekil 4.3.1. Çalışmada kullanılan lokus spesifik *SOS1* ve *SOS2* DNA markırlarına ait jel görüntüsü (1): *SOS1*, (2): *SOS2*, L: 50 kb DNA ladder, 1-Alınoğlu, 2-Ayaz 2013, 3-Ankara Moru 2013, 4-Bakır 2013, 5-FarukBey 2014, 6-Zemheri 2014, 7-Alper, 8-Cumhuriyet, 9-Selçuk, 10-Ürkmez, 11-Özveren, 12-Yücel

Markırlar oluşturdukları DNA bant sayısı bakımından karşılaştırıldıklarında *SOS2* genine ait markırın en fazla (11 adet) ve *SOS3* genine ait markırın ise 1 adet ile en az bant üreten lokuslar oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1.1-4.3.3). Kullanılan markırların polimorfizm oranı % 25,0 ile % 77,8 arasında değişmiştir. En yüksek polimorfizm oranı % 77,8 ile *MtP5CS* markırından elde edilirken, en düşük polimorfizm oranı ise % 25,0 ile *Mt-Actin* markırından elde edilmiştir (Çizelge 4.3.2). Buna karşın *SOS3* lokusunda tek bir monomorfik bant elde edilmiştir (Çizelge 4.3.3).



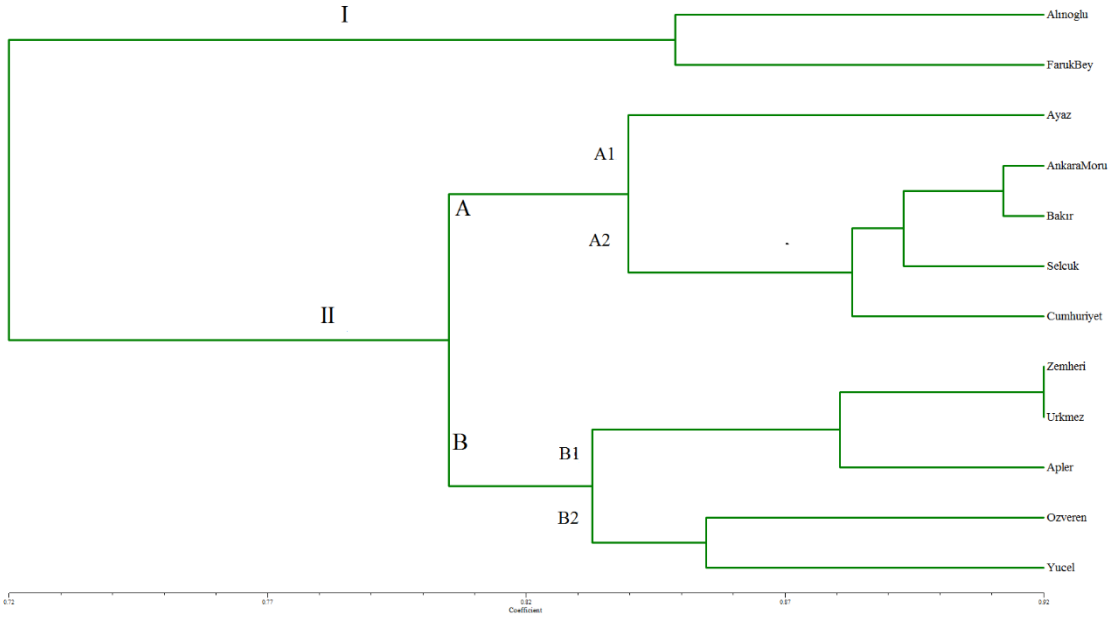
Şekil 4.3.2. Çalışmada kullanılan *Mt-Actin* markırına ait jel görüntüsü L: 50 kb DNA ladder, 1-Alınoğlu, 2-Ayaz 2013, 3-Ankara Moru 2013, 4-Bakır 2013, 5-FarukBey 2014, 6-Zemheri 2014, 7-Alper, 8-Cumhuriyet, 9- Selçuk, 10-Ürkmez, 11-Özveren, 12-Yücel



Şekil 4.3.3. Çalışmada kullanılan lokus spesifik *SOS3*, *DREB1B*, *P5CS*, *MtP5CS*, *MtProDH*, *AtNHx1* DNA markırlarına ait jel görüntüsü (3): *SOS3*, (4): *DREB1B*, (5): *P5CS*, (7): *MtP5CS*, (8): *MtProDH*, (9): *AtNHx1*, L: 50 kb DNA ladder, 1-Alınoğlu, 2-Ayaz 2013, 3-Ankara Moru 2013, 4-Bakır 2013, 5-FarukBey 2014, 6-Zemheri 2014, 7-Alper, 8-Cumhuriyet, 9- Selçuk, 10-Ürkmez, 11-Özveren, 12-Yücel

DICE yöntemine göre oluşturulan benzerlik matriksi kullanılarak UPMGA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetric Mean) yöntemine göre elde edilen dendrogram Şekil 4.3.4' de verilmiştir. Oluşan dendrograma göre incelenen yaygın fiğ çeşitleri esas olarak I ve II olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Oluşan I. grupta Alınoğlu ve FarukBey çeşitlerinin yer aldığı, diğer bütün çeşitlerin ise II. grupta yer aldığı görülmektedir. Kendi arasında A ve B olarak iki alt gruba ayrılan ikinci grupta (II) kendi içerisinde A1, A2, B1, B2 alt gruplarına ayrılmıştır. İkinci grupta (II) A ana alt grubunun A1 ve A2 grubuna ayrıldığı görülmekte, A1 grubunda Ayaz çeşidi, A2 grubunda ise yine kendi içlerinde gruplar halinde olmak üzere Ankara Moru, Bakır, Selçuk ve Cumhuriyet çeşitlerinin bulunduğu görülmektedir. A1 grubunda Ayaz çeşidinin diğer çeşitlerden oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir. İkinci grubun (II) B ana alt grubunda B1 ve B2 alt grupları yer almaktadır. B1 alt grubu kendi içinde iki gruba ayrılmakta olup, ilk grupta

Zemheri ve Ürkmez çeşitleri, ikinci grupta Alper çeşidi yer almıştır. B2 alt grubuna bakıldığında yine kendi içinde iki gruba ayrıldığı görülmekte ve birinci grupta Özveren, ikinci grupta Yücel çeşidi yer almıştır (Çizelge 4.3.4).



Şekil 4.3.4. UPGMA yöntemine göre oluşturulan dendrogram

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, ülkemizde tescil edilmiş 12 adet yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) çeşidinin (Alınoğlu, Ayaz-2013, Ankara Moru-2013, Bakır-2013, FarukBey-2014, Zemheri-2014, Alper, Cumhuriyet, Selçuk, Ürkmez, Özveren, Yücel) çimlenme evresinde tuz stresine karşı verdikleri tepkilerin belirlenmesi, bu stres etmenlerine tolerant hatların tespit edilmesi, tuz stresine karşı tepki veren spesifik gen markır sistemleri kullanılarak ilgili genotiplerin tuz stresi ile ilgili genetik tabanlarının moleküler yöntemler kullanılarak açığa çıkarılması amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada çeşitlerin çimlenme evresinde tuz stresine karşı verdikleri tepkileri belirlemek için 4 tekrarlamalı olarak tesadüf blokları deneme desenine göre laboratuvar şartlarında çimlendirme denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Çimlendirme sonuçları yüksek tuz konsantrasyonu olan 250 mM tuz stresinin çeşitlerin çimlenme oranlarında çok önemli düşüşlere neden olduğunu göstermiştir. Tuz stresinden en fazla etkilenen çeşidin Zemheri olduğu belirlenmiştir. Çalışmada çimlenme evresindeki yüksek tuz stresini en iyi tolere edebilen ve bu şartlarda çimlenme oranı en az düşüş gösteren çeşitlerin sırasıyla Özveren (% 20,6) ve Alper (% 25,7) oldukları belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan dokuz adet lokus spesifik DNA markırı toplam 55 bant üretmiş olup bunların 34'ünün polimorfik olduğu belirlenmiştir. Bu markırlara ait ortalama polimorfizm oranı % 53,1 olarak tespit edilmiştir. Markır başına ortalama 6,1 adet bant üretilmiş olup, markır başına ortalama polimorfik bant sayısı 4,3 adet olarak hesaplanmıştır. Markırlara ait ortalama polimorfizm bilgi içeriği (Polymorhisim Information Content, PIC) 0,30 olarak tespit edilmiştir. En düşük PIC değeri 0,19 ile *MtProDH*, en yüksek değer ise 0,50 ile *SOS1* markırında hesaplanmıştır.

DICE yöntemine göre oluşturulan benzerlik matriksi kullanılarak UPMGA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetric Mean) yöntemine göre oluşturulan dendrogramda çeşitler esas olarak I ve II olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Oluşan I. grupta Alınoğlu ve FarukBey çeşitleri yer alırken, diğer bütün çeşitlerin ise II. grupta yer aldığı belirlenmiştir. Sonuçlar, çalışmada kullanılan lokus spesifik DNA markırlarının yaygın fiğ çeşitlerinde var olan genetik farklılıkları belirlemek için başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ancak elde edilen sonuçların, tuz stresi varlığında çimlendirilen çeşitlerin tuza olan hassasiyetleri ile doğrudan ilişkili olmadığını göstermiştir. Bu durum, çeşitlerde var olan tuza tolerantlık lokuslarınının çok farklı şekillerde regüle olduğuna işaret etmektedir.

Çalışma sonuçları ülkemizde tescil ettirilen yaygın fiğ çeşitlerinde, çimlenme evresinde tuza tolerantlık bakımında genetik varyasyonun kısmen var olduğunu ve tuza tolerant yeni hatların geliştirilmesinde bu genetik farklılıklardan faydalanılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

Abdul Qados A.M.S., 2011. Effect of Salt Stress on Plant Growth and Metabolism of Bean Plant *Vicia faba* (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 10 (1):7-15.

Acikgoz E., Sabanci C.O., Sinsoy A.S., 1998. Ecogeography and Distribution of Wild Legumes in Turkey., in: N. Zencirci, et al. (Eds.), International Symposium on In Situ Conservation of Plant Genetic Diversity., Central Research Institute for Field Crops.

Adi Fiğ Yetiştiriciliği (*Vicia sativa* L.). (b.t.) Retrieved November 20, 2017. http://www.gencziraat.com/Tarla-Bitkileri/Adi-Fig-Yetistiriciligi-7.html

Aşçı Ö., Üney H., 2016. Farklı Tuz Yoğunluklarının Macar Fiğinde (*Vicia pannonica* Crantz) Çimlenme ve Bitki Gelişimine Etkisi. Akademik Ziraat Dergisi, 5: 29-34.

Avcioglu R., 2000. Türkiye Hayvanciliğinda Kaba Yem Uretim Stratejileri. Uluslararasi Hayvan Besleme Kongresi, 1: 448-455.

Aydın İ., Atıcı Ö., 2015. Tuz Stresinin Bazı Kültür Bitkilerinde Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri. MSU Fen Bil. Derg., 3 (2): 360-366.

Bai X., Liu J., Tang L.L., Cai H., Chen M., Ji W., Liu Y., Zhu Y.M., 2013. Overexpression of GsCBRLK from Glycine Soja Enhances Tolerance to Salt Stress in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa*). Funct Plant Biol., 40: 1048-1056.

Bell C.J., Ecker J.R., 1994. Assignment of 30 Microsatellite Loci to the Linkage Map of *Arabidopsis*. Genomics, 19 (1): 137-144.

Botella M.A., Rosado A., Bressan R.A. ve Hasegawa P.M., 2005. Plant Adaptive Responses to Salinity Stress, Plant Abiotic Stress. Blackwell Publishing Ltd., Pondicherry, India. 270p.

Botsteın D., Whıte R.L., Skolnıck M., Davıs R.W., 1980. Construction of A Genetic Linkage Map İn Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. Am Hun Genet, 32 (3): 314-331.

Cil A. and Tiryaki I., 2016. Sequence-Related Amplified Polymorphism and İnter-Simple Sequence Repeat Marker-Based Genetic Diversity and Nuclear DNA Content

Variation in Common Vetch (*Vicia sativa* L.). Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization, 14 (3): 183–191.

Çarpıcı B.E., Erdel B., 2015. Determination of Responses of Different Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Varieties to Salt Stress at Germination Stage. Yyü Tar Bil. Derg., 26 (1): 61-67.

Dajic Z., 2006. Salt Stress, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. ISBN-13 978-1- 4020-4224-9, Dordrecht, The Netherlands, 345p.

Day S., Uzun S., 2016. Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Yaygın Fiğ (*Vicia sativa* L.) Çeşitlerinin Çimlenme ve İlk Gelişim Dönemlerine Etkileri. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknolojisi Dergisi, 4: 636- 641.

Ding L., Zhu J.K., Wu S.J., 1996. *SOS1*, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. The Plant Cell, 8: 617-627.

Doğan R., Çarpıcı B.E., 2016. Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Bazı Tritikale Hatlarının Çimlenmesi Üzerine Etkileri. KSÜ Doğa Bil. Derg., 19 (2): 130-135.

Ertekin İ., Yılmaz Ş., Atak M., Can E., Çeliktaş N., 2017. Tuz Stresinin Bazı Yaygın Fiğ (*Vicia sativa* L.) Çeşitlerinin Çimlenmesi Üzerine Etkileri. Journal of Agricultural Faculty of Mustafa Kemal University, ISSN:1300-9362, 22 (2): 10-18.

Fırıncıoglu H.K., Karagullu N., Unal S., El-Moneim A.M.A., Beniwal, S.P.S., 1997. Improving Feed Legumes for the Central Highlands of Turkey., in: N. Haddad, et al. (Eds.), Proceedings of The Regional Symposium on Integrated Crop-Livestock Integration Systems in the Dry Areas of West Asia and North Africa., Amman, Jordan. . pp. 214-232.

Francis C.M., Enneking D., Abd El Moneim A., 1999. When and where will vetches have an impact as grain legumes?, in: R. Knight (Ed.), Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century. Proceedings of the Third International Food Legume Research Conference, Adelaide 1997. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London. pp. 671-683.

Gulcan H., Anlarsal A.E., 2006. Yem Bitkileri II (Baklagil Yem Bitkileri). Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayinlari Genel Yayın No: 5.

Han Y., 2010. Diyarbakır Koşullarında Yetiştirilen Farklı Baklagil Kaba Yem Kaynaklarının Besin Değerlerinin ve İn Vitro Kuru Madde Sindirilebilirliğinin Belirlenmesi. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yeni Teklif Projesi. 2010 Büyükbaş ve Küçükbaş Hayvancılık Proje Değerlendirme Toplantısı, Kemer-Antalya.

Hu Y. ve Schmidhalter U., 2005. Drought and Salinity: A Comparison of Their Effects on Mineral Nutrition of Plants. Journal of Plant Nutrient and Soil Science, 168: 541-549.

ISTA., 1999. International Rules for Seed Testing Rules. Seed Science and Technology 27:supplement, rules.

Jin H.C., Sun Y., Yang Q.C., Chao Y.H., Kang J.M., Jin H., Li Y., Margaret G., 2010. Screening of Genes İnduced by Salt Stress from Alfalfa. Molecular Biology Reports, 37: 745-753.

Karabulut A., Canbolat O., Kalkan H., Gurbuzol F., Sucu E. and Filya I., 2007. Comparison of In Vitro Gas Production, Metabolizable Energy, Organic Matter Digestibility and Microbial Protein Production of Some Legume Hays. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20 (4): 517-522.

Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., 1999. Improving Plant Drought, Salt, and Freezing Tolerance by Gene Transfer of a Single Stress-İnducible Transcription Factor. Nature Biotechnology, 17: 287-291.

Kishor K.P.B., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A., Verma D.P.S., 1995. Overexpression of D1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase İncrease Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. Plant Physiol, 108: 1387-1394.

Kumar S., Tamura K., Neı M., 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. Brief Bioinform, 5: 150-63.

Kutlu H., 2008. Yem Değerlendirme ve Analiz Yöntemleri (Ders Notu). Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Adana.

Munns R., 2002. Salinity, Growth and Phytohormones, Salinity: Environment-Plants-Molecules. Published by Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-0492-3, Dordrecht, The Netherlands, 522p.

Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., 1999a. Antisense Suppression of Proline Degradation İmproves Tolerance to Freezing and Salinity in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 461: 205-210.

Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Sanada Y., Wada K., Tsukaya H., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., 1999b. Biological Functions of Proline in Morphogenesis and Osmotolerance Revealed in Antisense Transgenic *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 18 (2): 185-193.

Ortega S.C.O., Ochoa-Alfaro A.E., Reyes-Agüero J.A., Aguado-Santacruz G.A., Jime´nez-Bremont J.F., 2008. Salt Stress İncreases the Expression of *p5cs* Gene and İnduces Proline Accumulation in Cactus Pear. Plant Physiology and Biochemistry, 46 (1): 82-92.

Pessarakli M. ve Szabolcs I., 1999. Soil Salinity and Sodicity as Particular Plant/Crop Stress Factors, Handbook of Plant Crop Stress, ISBN 0-8247-1948-4, New York, 1198 p.

Rohlf F.J., 2000. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook, NY 11794-5245.

SAS I., 1997. SAS/STAT Software: Changes and Enhancements Through Release 6.12. SAS Inst., Cary, NC.

Shi H., Ishitani M., Kim C., and Zhu J.K., 2000. The *Arabidopsis thaliana* Salt Tolerance Gene *SOS1* Encodes a Putative Na^+/H^+ Antiporter. Department of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ 85721.

Şahin C.B., Akçalı C.T., 2016. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Bazı Pamuk Çeşitlerinin Çimlenmesi Üzerine Etkisi. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi (UTYHBD), 2 (2): 75 – 79.

Tang L.L., Cai H., Ji W., Luo X., Wang Z.Y., Wu J., Wang X.D., Cui L., Wang Y., Zhu Y.M., Bai X., 2013. Overexpression of *GsZFP1* Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiology Biochemistry, 71: 22-30.

Tiryaki I., 2006. Priming and Storage of Amaranth Seeds: Effects of Plant Growth

Regulators on Germination Performance at Low Temperature. Seed Sci. & Technol., 34: 169-179.

Tiryaki I., 2009. Osmotic Priming İncreases Seed Germination of *Amaranthus caudatus* L. at Low Temperature. Agrochimica, 53: 177-182.

Tolan T., Uzun S., Kardeş Y.M, Orman D., Özaktan H., Uzun O., 2017. Çayır Üçgülü Genotiplerinde Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine NaCl Konsantrasyonlarının Etkileri. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 4 (2): 220–226.

Topu M., 2011. Üniversal Çeltik Primerlerinin Farklı Adi Fiğ (*Vicia Sativa* L.) Hatlarına Ait Genomların Moleküler Karekterizasyonunda Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Sütçü İmam Üniversitesi, Türkiye.

Tuteja N., 2007. Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants, Methods in Enzymology, 428: 419-438.

Ünverdi M., A., 2007. Türkiye'de Tescil Ettirilmiş Bazı Fiğ (*Vicia Sativa* L.) Çeşitleri Arasındaki Morfolojik Ve Moleküler Farklılıkların Saptanması Üzerinde Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Türkiye.

Zhu J.K., Liu J., 1997. Proline Accumulation and Salt-Stress-lnduced Gene Expression in a Salt-Hypersensitive Mutant of Arabidopsis. Plant Physiol, 114: 591-596.

Zhu K.J., Liu J., Xiong L., 1998. Genetic Analysis of Salt Tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition. The Plant Cell, 10: 1181–1191.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nuray İŞİDOĞRU

Doğum Yeri : Tarsus

Doğum Tarihi : 01/06/1992

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Fen Bilimleri Enstitüsü Tezli Yüksek Lisans

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

b) Bildiriler -Uluslararası – Ulusal : Trakya Üniversiteler Birliği Lisanüstü Öğrenci Kongresi Poster Bildirisi

c) Katıldığı Projeler

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : n.isidogru@gmail.com