

## Moleküler Veriler Işığında *Medicago sativa* L. Tür Kompleksinin

### Mevcut Durumu

\*Muhammet ŞAKİROĞLU<sup>1</sup>, Doğan İLHAN<sup>2</sup>, Müge MAVİOĞLU KAYA<sup>2</sup>,

Orkun DEMİRÖZOĞUL<sup>2</sup>, Orhan ULUÇAY<sup>2</sup>, Barış EREN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kafkas Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Biyomühendislik Bölümü

<sup>2</sup>Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

**Yayın Kodu (Article Code): 11-5A**

**Özet:** *Medicago sativa-falcata* kompleksi ya da *Medicago sativa* tür kompleksi olarak adlandırılan birim kültür yoncasını da kapsayan bir taksonomik gruptur ve son zamanlarda poliploitleşme çalışmaları için model bitki olarak önerilmiştir. Baklagillerin model bitkisi olarak sekanslanan ve metagenom analizleri için önemli bir kaynak olan *Medicago truncatula* Gaertn. kompleks ile yakın akrabadır. Kompleks içerisinde yer alan sistematik birimler aynı zamanda kültür yoncasının zirai olarak geliştirilmesi için gerekli genetik kaynak olan birincil gen havuzunu da oluştururlar. Kompleksin üyeleri melezleşme, ıslah ve poliploidi gibi sebeplerden dolayı yüksek morfolojik varyasyon göstermektedir ve yalnızca morfolojik verilerle yapılan sistematik sonucunda ise komplekse ait birimlerin sistematik durumu net olarak ortaya konulamamıştır. Kompleksin içerisinde yer alan birimlerin taksonomik statüleri için yapılan morfolojik çalışmalar ile ilgili birçok kaygı da ortaya atılmıştır. Bu çalışmanın amacı *Medicago sativa* tür kompleksi kapsamında değerlendirilen sistematik birimlerin mevcut durumunun moleküler veriler ışığında yeniden değerlendirilmesidir.

**Anahtar Kelimeler:** *Medicago sativa* L., moleküler filogenetik, tür kompleksi, yonca

### In The Light of The Current State of The Molecular Complex of (*M.sativa* L.)

**Abstract:** The genus *Medicago* is an important component of legumes and includes the model legume *Medicago truncatula* and alfalfa. The complex taxonomic group known as the *Medicago sativa* species complex includes a number of taxa along with the cultivated alfalfa that naturally occurs throughout northern Eurasia. The taxa in the complex have initially been differentiated based on morphological traits such as flower color, pod shape, and pollen shape and were considered as species. However, as further research was conducted, the taxa were relegated to subspecies level. Since each of the morphological traits used here controlled by a few genes, the validity of classification based on morphology has been questioned recently and a number of molecular studies are conducted to overcome the proposed weaknesses of the morphology based taxonomy. We are aiming to provide a comprehensive picture for the current status of the members of the complex in the light of a wealth of recent molecular studies.

**Key Words :** *Medicago sativa*L., molecular phylogenetics, species complex, alfalfa

\*e-mail: msakiroglu@kafkas.edu.tr

## Giriş

Baklagiller, dünya genelinde insanlar için protein kaynağını oluşturan önemli bir familyadır ve ekonomik olarak buğdaygillerden sonra ikinci sırada gelmektedir. Bu familya aynı zamanda atmosferik azotu bağlayarak toprakta verimliliği arttırmaktadır (Shultze 1998). Yaklaşık 350 cins ve 10.000 kadar tür bu familyaya dâhil edilmektedir (Seçmen ve ark. 2011). Birçok baklagil bitkisi hem morfolojik olarak hem de DNA markörleri ve diğer genomik araçlar ile oldukça iyi analiz edilmiştir (Harrison 1997). Baklagillerin önemli cinslerinden birisi ise *Medicago* cinsidir (Lesins ve Lesins 1979, Quiros ve Bauchan 1988). *Medicago* cinsi üçte ikisi tek yıllık olmak üzere 60'dan fazla tür içermektedir. Kanarya Adaları ve İspanya'dan Çin Halk Cumhuriyetine; Sibiry'a'dan Yemen'e kadar oldukça geniş bir coğrafik yayılıma sahip cinsin orijinin merkezi için İran, Türkiye ve Kafkaslar bölgesi önerilmiştir (Quiros ve Bauchan 1988). Baklagillerin model bitkisi olarak sekanslanan ve metagenom analizleri için önemli bir kaynak olan *Medicago truncatula* ile dünyada en yaygın ekilen baklagil yem bitkisi olan Yonca (*Medicago sativa* L.) *Medicago* cinsini önemli kılan unsurların başında gelmektedir.

*Medicago truncatula* son zamanlarda yapılan araştırmalarda gen fonksiyonların anlaşılması için oldukça yoğun bir literatür oluşturmakla kalmayıp, gaz azotun fiksasyonunu sağlayan bakteriler ile oluşturulan simbiyozun moleküler temellerinin anlaşılması için model olarak kullanılmaktadır ve bu alanda oldukça nitelikli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Barker ve ark. 1990, Starker ve ark. 2006). *M. truncatula*'dan bu denli başarılı sonuçların elde edilmesi ve gen

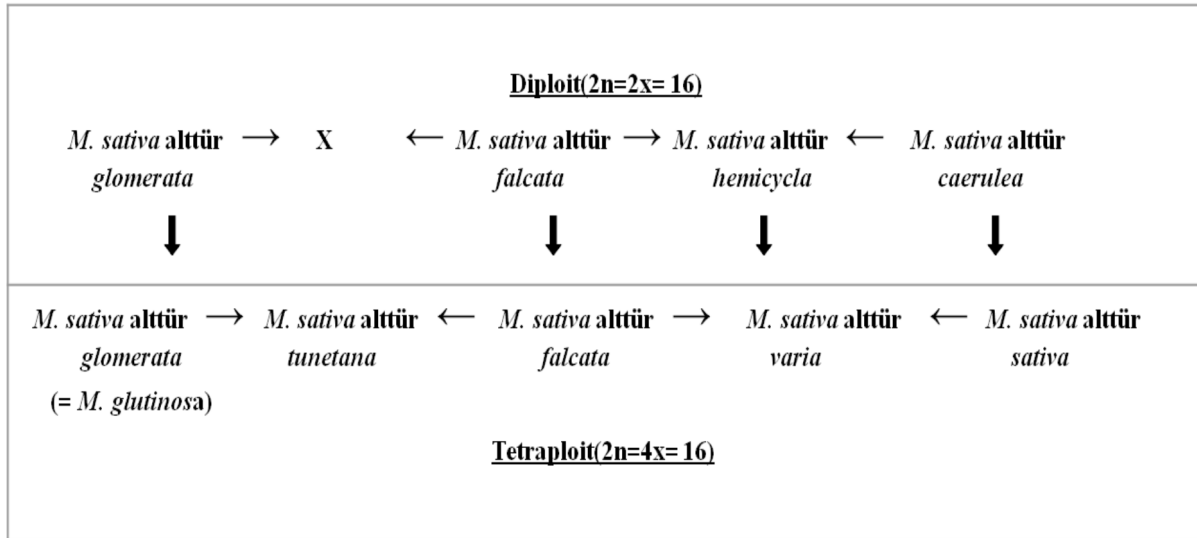
fonksiyonlarının analizi için etkin araç olarak kullanımı, bitkinin nispeten küçük bir genoma sahip olmasının yanında tekrar eden dizilerin ve duplikasyonların az olması ve transformasyonun kolayca gerçekleştirilebilmesi sayesinde (Barker ve ark. 1990, Nam ve ark. 1999, Cook 1999). Baklagil bitkileri içerisinde model bitki olan *M. truncatula* ile genomik benzerliği olan yonca bitkisi ise dünya genelinde 80 milyon hektarda yetiştirilmektedir ve ekonomik açıdan oldukça değerlidir (Michaud ve ark. 1988, Frame ve ark. 1997, Russelle 2001). Kültür yoncası, *Medicago sativa-falcata* kompleksi ya da *Medicago sativa* tür kompleksi olarak adlandırılan bir birimden binlerce yıl süren ıslah çabaları sonucu geliştirilmiştir (Quiros ve Bauchan 1988). Dolayısıyla kompleksin birimleri aynı zamanda yoncanın zirai olarak geliştirilmesi için gerekli genetik kaynak olan birincil gen havuzunu da oluştururlar (Michaud ve ark. 1988, Quiros ve Bauchan 1988, Riday ve Brummer 2002). Özellikle genetik kaynakların öneminin anlaşılmasından sonra kurulan bitki gen bankaları için her bir sistematik birimin tasnifi ve karakterizasyonu oldukça önem arz etmektedir (Şakiroğlu 2010). Dolayısıyla kültür yoncasının genetik kaynağını oluşturan *M. sativa-falcata* kompleksinin üyelerinin sistematik durumlarının tespiti, genetik kaynakların depolama korunması için de oldukça önemlidir (Bauchan ve Greene 2002).

Kompleks, aralarında tozlaşma engeli bulunmayan tamamı çok yıllık diploit ve tetraploit üyelerden oluşmaktadır (Lesins ve Lesins 1979). Kompleks kapsamında kabul edilen her bir takson, zaman içerisinde farklı araştırmacılar tarafından tür ya da alttür olarak nitelendirilmiş ve bu sistematik birimlerin taksonomik statüleri

üzerine bir konsensüs oluşumu için moleküler araçların bu alanda kullanımına kadar beklemek gerekmiştir (Small ve ark. 1990). Bitki genomundaki en ilginç fenomenlerin başında poliploidi gelmektedir ve poliploidi tarımdan ekocoğrafik yayılıma kadar bitki biyolojisinin her alanında önemli bir yer tutmaktadır (Elliot 1958, Grant 1971, Masterson 1994, Soltis ve ark. 2004, Wang ve ark.2006, Gaeta ve ark. 2007). Bu fenomen son yıllarda farklı disiplinlerdeki araştırmacılar tarafından tüm yönleriyle yoğun olarak araştırılmaktadır (Mavioğlu Kaya ve Şakiroğlu 2012, Warner ve Edwards 1993). *Medicago sativa-falcata* kompleksi aynı zamanda poliploidi evrimi araştırmalarında model bitki olarak önerilmiştir ve bu alanda çalışmalar devam etmektedir (Havananda ve ark. 2010, Havananda ve ark. 2011). Bu derlemede *Medicago sativa* tür kompleksi kapsamında değerlendirilen sistematik birimlerin tarihsel evrimi ile birlikte kompleksin birimlerinin moleküler ayrıştırılması ile ilgili yapılmış tüm çalışmaların kapsamlı bir fotoğrafı çekilmeye çalışılmıştır.

### Kompleksin Mevcut Durumu

*Medicago sativa* tür kompleksinin üyeleri olarak kabul gören diploit ( $2n=2x=16$ ) ve tetraploit ( $2n=4x=32$ ) alt birimler, *Medicago* cinsine ait *Falcago* seksiyonunun *Falcatae* alt seksiyonuna dahil edilmektedir. Kompleks içerisinde bulunan birimlerin sistematik ayrışması için baz alınan temel kriterler morfolojik karakterlerdir. Genetik çeşitlilik ve populasyon yapısının değerlendirilebilmesi için bu karakterlerin kullanılması gerekmektedir. *Medicago sativa-falcata* kompleksi için kullanılan en önemli iki temel karakter çiçek rengi ve meyve şeklidir (Lesins ve Lesins 1979, Small ve ark. 1990, Quiros ve Bauchan 1988). Bu karakterler kullanılarak kompleks içerisinde bulunan alttürlerin temel sınıflandırılması yapılmıştır, fakat bu karakterlerin her birisi sadece birkaç gen ile kontrol edildiği için mevcut sınıflandırmanın geçerliliği sorgulanmış ve moleküler metotlar kullanılarak sınıflandırmanın test edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Şakiroğlu ve ark. 2010). Morfolojik karakterlerin yanı sıra moleküler teknikler ve markörlerden yararlanılarak ploidi düzeyine göre de sınıflandırma yapılmıştır (Şakiroğlu ve ark. 2010).



**Şekil.** *Medicago sativa* tür kompleksi içindeki birimlerin taksonomik ilişkisi (Lesins and Lesins 1979, Quiros and Bauchan 1988, Small and Jomphe 1989, Havananda ve ark. 2010)

Kompleksin diploit alttürleri *M. sativa* subsp. *falcata* (L.) Arcang. (sarı çiçek rengi, orak şeklinde meyve), *M. sativa* subsp. *caerulea* (Less. ex Ledeb.) Schmalh. (mor-menekşe çiçek rengi, kıvrılmış meyve) ve bu iki alttürün doğal melezi olan *M. sativa* subsp. *xhemicycla* (Grossh.) C.R. Gunn. (ebruli çiçek rengi, melez meyve şekli)'dir. Tetraploit alttürler ise *M. sativa* subsp. *sativa* L. (diploit alttür olan *caerulea*'nın morfolojik eşleniği) *M. sativa* subsp. *falcata* ve tetraploit melez olan *M. sativa* subsp. *xvaria* (T. Martyn) Arcang.'dan oluşmaktadır (Quiros ve Bauchan 1988).

Komplekse dâhil diploit ve tetraploit alt birimler aynı karyotipi paylaşmakta olup aralarında gen akışının olduğu bilinmektedir (Gillies 1972). Diploit ve tetraploitler arasındaki ploidi farklılıkları doğal bir melezlenme bariyeri olmasına rağmen bu bariyeri aşan mekanizmaların varlığından dolayı ploidi düzeyleri arasında da genetik geçişler mümkündür. Dolayısıyla kompleksin üyeleri arasında hem ploidi içi hem de farklı ploidi düzeyleri arasında da geçişler söz konusudur (Small, 2011). Diploit alttürlerden tetraploit alttürlere doğru gen akışını için indirgenmemiş gametler tetraploit alttürlerden diploit alttürlere gen akış mekanizması için partenogenetik üreme önerilmiştir (Vorsa ve Bingham 1979, McCoy 1982, Pfeiffer ve Bingham 1983). Yapılan çalışmalar, diploit ve tetraploit aksasyonlar arasındaki çaprazlamalarda (2x-4x ya da 4x-2x çaprazlamaları) diploit ebeveynlerin indirgenmemiş gametleri oluşturma yeteneği sayesinde sınırlı sayıda tetraploit döl oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca kompleks üyelerinde partenogenetik çoğalma durumu da mevcuttur. Partenogenetik çoğalmada üst düzeydeki ploidilere sahip yumurtalar döllenme

olmaksızın gelişerek alt düzeye indirgenmektedir ve bu mekanizmanın *M. sativa* tür kompleksinin üyeleri arasında tetraploitlerden diploitle doğru bir indirgenme ve gen akışı sağladığı bulunmuştur (Albertini ve ark. 2000).

Kompleksin diploit alttürleri olan alttür *falcata* ve alttür *caerulea* kendi aralarında melezlendiklerinde melez alttür *M. sativa* subsp. *xhemicycla*'yı oluşturmaktadırlar. Aynı şekilde tetraploit alttürler *M. sativa* subsp. *sativa* ve *M. sativa* subsp. *falcata* çaprazlamaları da yüksek düzeyde melez oluşturma yeteneğine sahip olup *M. sativa* subsp. *xvaria* melezini oluşturmaktadırlar. Komplekste diploit alttür *falcata* ile tetraploit alttür *falcata* arasında, yine diploit alttür *caerulea* ile tetraploit alttür *sativa* arasında gen akışı söz konusudur. Diploit bir alttür olan *Medicago sativa* subsp. *glomerata* (Balb.) Rouy ve alttür *glomerata*'nın tetraploit versiyonu olan *Medicago sativa* subsp. *glutinosa* ile *Medicago sativa* L. nothosubsp. *tunetana* Murb. da *M. sativa-falcata* kompleksine dâhildir. Aynı gen havuzunu oluşturan ve *M. sativa* kompleksi ile yakından ilişkili olan diğer tür ise *Medicago prostrata* Jacq.'dır (Şekil) (Quiros ve Bauchan 1988, Stanford ve ark. 1972). Kompleks içerisinde yer alan tetraploit ve diploit üyelerin genetik haritaları yüksek derecede senteniktir (Kalo ve ark. 2000).

### **Kompleksin Birimlerinin Sistematik Durumuna Tarihi Yaklaşımlar**

Ekonomik değeri yüksek olan kültür yoncasının *M. sativa* tür kompleksinin tetraploit birimlerinden geliştirilmesi, kompleksin sistematikçiler tarafından yoğun olarak çalışılmasını tetiklemiştir. Ayrıca hemen hemen tüm üyeleri Sovyet coğrafyası ve hinterlandında yayılış gösteren *M. sativa* yoğunlukla Sovyet

bilim insanlarının da dikkatini çekmiştir (Vassilchenko 1949, Sinskaya 1950, Ivanov 1988, Small 2011). Kompleksin üyeleri melezleşme, ıslah ve poliploidi gibi sebeplerden dolayı yüksek morfolojik varyasyon göstermektedir (Small 2011) ve bu varyasyon Sovyet bilim insanlarının tür tanımlamasını cömertçe kullanmasına sebep olmuştur. Bunun sonucunda ise alttürlerin ve varyetelerin zaman zaman tür düzeyine kadar yükseltilmesi oldukça sık karşılaşılan bir durum olmuştur (Vassilchenko 1949, Sinskaya 1950, Ivanov 1988). Örneğin Sinskaya kültür yoncaları için varyete olarak sayılabilecek 10 kadar yerel çeşidi (Kafkas yoncası-*M. praesativa*, Yemen yoncası-*M. jemenensis*, Akdeniz yoncası *M. polia*, Mezopotamya yoncası-*M. mesopotamica*, Arap yoncası-*M. tripolititanica*, Suriye-Filistin yoncası-*M. syriaco-palestinica*, Anadolu ya da Yakın Doğu kültür yoncası-*M. orientalis*, Avrupa yoncası-*M. eusativa*, Asya yoncası-*M. asiatica* ve Afgan yoncası-*M. tetrahemicycla*) kompleksin üyeleri olarak tanımlamakta iken kompleks kapsamında halen alttür olarak kabul gören birimlerin tamamını (*M. hemicycla*, *M. caerulea*, *M. trautvetteri*, *M. glutinosa*, *M. sativa* ve *M. falcata*) ise kompleksten bağımsız tür olarak kabul etmektedir (Sinskaya 1961). Sinskaya aynı zamanda alttür *falcata*'nın diploit formlarını da farklı bir tür olarak *M. quasifalcata* olarak kayıt altına almıştır (Sinskaya 1961). Bahsi geçen türler arasında üreme engelini bulunmayışı tür tanımlamasının geçerliliğinin sorgulanmasına sebep olmuş ve devamında taksonların bir kompleksin alttürleri olabileceği önerilmiş (Gunn ve ark. 1968) ve Lesins ve Lesins (1979) bu konuda ilk derli toplu çalışma ile türlerin büyük çoğunluğunun *M. sativa*'nın alttürleri düzeyine indirgemıştır. Bu terminoloji yaygın kabul görmeye başlamıştır (Quiros

ve Bauchan 1988). Ancak Quiros ve Bauchan (1988) ve Lesins ve Lesins (1979) alttür *glomerata*'yı *M. glomerata* olarak tür düzeyinde tutmaya devam ederken son zamanlarda bu birim de alttür seviyesine indirgenerek *M. sativa* subsp. *glomerata* olarak kullanılmaya başlanmıştır (Havananda 2011, Small 2011). Bu durumda komplekse dahil edilen tüm alttürleri şu şekilde sıralamak mümkündür: *M. sativa* subsp. *falcata*, *M. sativa* subsp. *caerulea*, *M. sativa* subsp. *xhemicycla*, *M. sativa* subsp. *sativa*, *M. sativa* subsp. *xvaria*, *M. sativa* subsp. *glomerata*, *M. sativa* subsp. *xtunentana*. Ancak, Small (2011) alttür *caerulea*'yı alttür *sativa* ile birleştirilmesini ve varyete düzeyine indirilmesini bundan dolayı da diploit alttür *xhemicycla*'nın da *xvaria* olarak isimlendirmesini önermektedir. Temelde hem alttür *glutinosa*'nın (tetraploit *glomerata*) aynı sitotip olmasından dolayı alttür *glutinosa* olarak sınıflandırılması hem de alttür *quasifalcata* (diploit *falcata*)'nın alttür *falcata* olarak sınıflandırılması Small (2011)'in önerisinin dikkate değer olduğunu gösterse de bu birleşmenin moleküler verilerle doğrulanması gereklidir.

### **Kompleksin Bireylerini Ayırt Etmek İçin Kullanılan Morfolojik Kriterler**

Bitkilerde çiçek rengi, polen yapısı, tohum şekli ve büyüklüğü gibi kriterler morfoloji temelli sistematik için oldukça önemlidir (Quiros ve Bauchan 1988). Aynı şekilde, *M. sativa* tür kompleksi içerisinde kabul edilen sistematik birimlerin tanımlanması için çiçek rengi, tohum şekli ve ploidi düzeyi kullanılmaktadır. *M. sativa* tür kompleksinin üyelerinde 3 ayrı çiçek rengi görülmektedir. Bu renkler sarı, mor-menekşe ve ebruli (sarı-mor)

renklerdir. Meyve şekli ise orak ya da kıvrımlı olabilmekte ve kıvrım sayısı tedrici olarak artış göstermektedir. Bu iki morfolojik karakterin yanında ploidi de kompleksin üyelerini ayırmada kullanılan önemli bir kriterdir. Kompleksin üyeleri diploit ve tetraploit olabilmektedir (Quiros ve Bauchan 1988, Lesins ve Lesins 1979, Small ve ark. 1990). Her bir sistematik birimin tanımlanmasında kullanılan morfolojik karakterler Tablo'da detaylandırılmıştır.

Sarı çiçek rengine sahip olan *M. sativa* subsp. *glomerata*, *Medicago sativa* subsp. *glutinosa* ve *Medicago sativa* subsp. *falcata* alttürleri arasında ayırım meyve şekli ve ploidi seviyeleri kullanılarak yapılmaktadır. *M. sativa* subsp. *falcata* alttüründe meyve şekli yapısı hilal şeklinde yarım sarmallı ve orağımsı bir yapı gösterirken, *M. sativa* subsp. *glomerata* alttüründe meyvesi 2-4 sarmallı bir yapıdan oluşmaktadır. Yine aynı renk grubu içerisinde yer alan *M. sativa* subsp. *glutinosa*'nın meyve şekli yapısı *M. sativa* subsp. *glomerata* ile aynıdır. *M. sativa* subsp. *glomerata* ile *M. sativa* subsp. *glutinosa* arasındaki ayırım ise ploidi düzeyleri ile yapılmaktadır ve *M. sativa* subsp. *glomerata* diploit iken *M. sativa* subsp. *glutinosa* tetraploittir ve aynı zamanda 'tetraploit *glomerata*' olarak bilinmektedir (Havananda, 2011). Kompleksin mor-menekşe çiçek rengine sahip üyeleri olan *M. sativa* subsp. *caerulea* ile *M. sativa* subsp. *sativa*, 2-4 kıvrımlı meyveye sahipken aralarındaki ayırım ploidi düzeyi ile yapılmaktadır. Tetraploit melez alttür *M. sativa* subsp. *xvaria*, tetraploit *M. sativa* subsp. *falcata* ile *M. sativa* subsp. *sativa*'nın doğal melezidir ve hem çiçek rengi hem de meyve şekli ve bakımından her iki alttürün melezi özelliği taşırlar. *M. sativa* subsp.

*xhemicycla* ise *M. sativa* subsp. *caerulea* ile diploit *M. sativa* subsp. *falcata*'nın doğal melezidir. Her iki melez alttürün çiçekleri ebruli ve meyvesi yaklaşık olarak 1.5 kıvrımdan oluşmaktadır ve aralarındaki temel fark ploidi düzeyleridir (Lesins ve Lesins 1979, Quiros ve Bauchan 1988, Small 2011).

### Moleküler Çalışmalar

Kompleksin içerisinde yer alan birimlerin taksonomik statüleri için yapılan morfolojik çalışmalar ile ilgili birçok kaygı ortaya atılmıştır (Barnes 1972, Small ve Brookes 1984, Sakiroglu ve ark. 2010, Sakiroglu ve ark. 2012). Bu kaygılar temelde iki noktaya yoğunlaşmaktadır: (i) çiçek rengi ve meyve kıvrım sayısı sadece bir kaç gen tarafından kontrol edilmektedir (Small ve Brookes 1984, Barnes 1972) ve bu yüzden farklı alttürleri ayırmada tüm genomu temsil edebilecek nitelikte değildir; (ii) sistematik birimler arasındaki yoğun melezleşmeler morfolojik karakterlerin kullanılabilirliğine gölge düşürmektedir (Small ve Brookes 1984; Small 2011). Bu yüzden komplekse dâhil edilen sistematik birimlerin karakterizasyonunda biyokimyasal ve DNA belirteçlerine ihtiyaç duyulmuştur. Small ve Lefkovitch (1982), bu amaçla kimyasal değişkenleri içeren sayısal bir analiz yöntem ile *M. sativa*'nın alttürlerini ayırmaya çalışmışlardır. Her bir alttürde bulunan çeşitli kimyasal elementlerin miktarını analiz etmişlerdir. Alttürler arasında bazı elementlerin düzeylerinin farklılaştığını bulmuşlarsa da bu farklılıkların meyve şekli ve çiçek rengi kadar güvenilir olmadığını kayıt altına almışlardır (Small ve Lefkovitch 1982).

Doğrudan genetik düzeyde olan ve abiyotik ve biyotik stres koşullarından etkilenmeyen DNA belirteçleri gerek

içerdikleri bilgi miktarı gerek ise kullanım kolaylığı sayesinde, giderek bitki moleküler sistematğinde rutin metot haline gelmektedir (Brummer ve ark 1999). DNA belirteçlerinin yanında özellikle ploidi düzeyini tespit etmede kullanılan flov sitometri yöntemi de sıkça kullanılan bir yöntemdir (Brummer ve ark 1999, Şakiroğlu ve Brummer 2011, Mavioğlu Kaya ve Şakiroğlu 2012).

DNA belirteçlerinin komplekse dahil sistematik birimlerde kullanımı ilk zamanlar daha çok kültürü yapılan yerel çeşitler ile doğrudan ıslahta kullanılan materyalin genetik çeşitliliğine yoğunlaşmıştır (Crochemore ve ark. 1996, Jenczewski ve ark. 1999, Mengoni ve ark. 2000, Maurera ve ark. 2004, Flajoulot ve ark. 2005, Falahati-Anbaran ve ark. 2007, Malosetti ve ark. 2007, Li ve ark. 2010, Mohammadzadeh ve ark. 2011). Her ne kadar bu çalışmalarda temelde kültür yoncası hedeflense de özellikle alttür

*falcata*'nın kültür yoncası dolayısıyla da tetraploit alttür olan *sativa*'dan ayrıştığı tespit edilmiştir (Barnes ve Sheaffer 1983; Maureria ve ark. 2004). Buna karşın son zamanlarda komplekste yer alan birimlerin sistematik konumları için bir dizi çalışma yapılmıştır (Sakiroğlu ve ark. 2009, Sakiroğlu ve ark. 2010, Havananda ve ark. 2010, Havananda ve ark. 2011, Sakiroğlu ve Brummer. 2012). Bu amaçla diploit alttürlerin sistematik konumunu belirlemeye çalışan iki eş zamanlı çalışma (Şakiroğlu ve ark. 2010, Havananda ve ark. 2010), tamamen farklı metotlar ve genetik araçlar kullanmakla beraber benzer sonuçlara ulaşmışlardır. SSR belirteçleri (Sakiroğlu ve ark. 2010) ile kloroplast ve mitokondri DNA sekans bilgileri (Havananda ve ark. 2010), diploit alttürler *falcata* ile *caerulea*'nın alttür kabul edilebilecek düzeyde farklılaştığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, diploit melez alttür olarak adlandırılan alttür x *hemicycla*'nın melez özelliği ise genetik

**Tablo.** Komplekse dâhil birimlerin morfolojik özellikleri

Komplekse ait alttürler	Ploidi seviyesi	Bakla şekli	Kıvrım sayısı	Kıvrım merkezi çapı (mm)
<b>Sarı Çiçek Rengi</b>				
<i>Medicago sativa</i> ssp. <i>glomerata</i>	Diploit	Spiral	1.5 - 4	5-8
<i>Medicago sativa</i> ssp. <i>glutinosa</i>	Tetraploit	Spiral	1-2	8-9
<i>Medicago sativa</i> ssp. <i>falcata</i>	Diploit & Tetraploit	Orak şeklinde, falkat	0.5	1-3
<b>Ebruli (Sarı-Mor) Çiçek Rengi</b>				
<i>Medicago sativa</i> ssp. <i>varia</i>	Tetraploit	Spiral	1.5	5-12
<i>Medicago sativa</i> ssp. <i>hemicycla</i>	Diploit	Orak şeklinde, falkat	0.5	12
<b>Mor-Menekşe Çiçek Rengi</b>				
<i>Medicago sativa</i> ssp. <i>caerulea</i>	Diploit	Spiral	2-4	5
<i>Medicago sativa</i> ssp. <i>sativa</i>	Tetraploit	Spiral	2-4	5-9

araçlar ile ortaya konmuştur. SSR belirteçlerinin sunduğu veriler alttür *falcata* ile *caerulea*'nın ayrıca ikişer alt guruba ayrıldığını ve bu alt grupların alttür *caerulea*'da coğrafik olarak kuzey-güney düzleminde bir ayrışmaya tekabül ettiği ancak alttür *falcata*'da görülen farklılaşmanın ekocoğrafik olduğu kayıt altına alınmıştır (Sakiroglu ve ark. 2010).

Ayrıca, alttür *caerulea*'nın çeşitlilik merkezinin tespiti amacıyla yapılan başka bir çalışmada, Kafkasya ve Orta Asya kökenli populasyonlar karşılaştırılmış, Kafkas bölgesinden elde edilen aksesyonlarda daha yüksek ortalama  $F_{ST}$  değeri, allel çeşitliliği ve heterozigotluk bulunduğu saptanmıştır. Buna göre, Kafkas bölgesinin alttür *caerulea* için çeşitliliğin merkezi olabileceği önerilmiştir (Şakiroğlu ve Brummer 2012). Tetraploit üyeleri de araştırmaya dahil eden tek moleküler çalışmada ise hem diploit hem de tetraploit alt türlere ait populasyonlar ile poliploidinin kökenlerine ışık tutulmaya çalışılmıştır. Kloroplasta ait DNA'nın (cpDNA) iki kodlanmayan bölgesi (*rpl20—rps12* ve *tmS—tmG* spacers) ile sekans varyasyonu çalışılmış ve tetraploit birimlerin çiçek rengine göre ayrıştıkları gösterilmiştir (Havananda ve ark. 2011). Ayrıca, tetraploit birimler olan alttür *falcata* ile alttür *sativa* arasında cpDNA'sı düzeyinde melezleşmeye rastlanmamıştır. Ancak, tetraploitler için de nükleer DNA kullanılarak detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

### Sonuç

*Medicago sativa* tür kompleksi içerisinde yer alan sistematik birimlerin tamamının alttür düzeyinde olduğu yaygın kabul görmeye başlamış ve bu kullanım yaygınlaşmıştır. Bununla birlikte aynı sitotipe sahip bazı alttürlerin variyete seviyesine indirilmesi önerilmiştir ancak bunun yaygın kabul görmesi için

moleküler veriler ışığında değerlendirilmesi gereklidir.

### Kaynaklar

**Albertini E, Barcaccia G, Veronesi F 2000.** Parthenogenesis induction in diplosporic tetraploidized alfalfa. *Universita di Perugia*. Conference paper ISBN: 88-87652-01-5, 68-74.

**Barker DG, Bianchi S, Blondon, F, Dattée Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Génier G, Guy P 1990.** *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* Volume 8, Number 1 (1990), 40-49.

**Barnes DK 1972.** A system for visually classifying alfalfa flower color. *Agriculture Handbook*, 424.

**Barnes DK, Sheaffer CC 1995.** *Alfalfa*. In 'Forages, 5th edn. Vol. 1 An Introduction to Grassland Agriculture.' (Eds RF Barnes, DA Miller, CJ Nelson) pp. 205-216. Iowa State University Press: Ames, Iowa.

**Bauchan GR, Greene SL 2002.** Status of the *Medicago* germplasm collection in the United States. *Plant Genetic Resources Newsletter* 129:1-8.

**Brummer EC, Cazarro PM, Luth D 1999.** Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. *Crop Science* 39(4); 1202.

**Brummer EC, Bouton JH, Kochert G 1995.** Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome*, 38: 362-366.

**Cook DR 1999.** *Medicago truncatula* — a model in the making. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:301-304.

**Crochemore ML, Huyghe C, Kerlan MC, Durve F, Julier B 1996.** Partitioning



ve distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. *Agronomie*, 16: 421-432.

**Elliot FC 1958.** *Plant Breeding ve Cytogenetics*. Toronto: McGraw Hill Book Company, Inc.

**Falahati-Anbaran M, Habashi AA, Esfahany M, Mohammadi SA, Gharayazie B 2007.** Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centres of origin of the species. *J Genet.* 86: 59-63.

**Flajoulot S, Ronfort J, Baudouin P, Barre P, Huguet T, Huyghe C, Julier B 2005.** Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theor Appl Genet*, 111(7): 1420-1429.

**Frame J, Charlton JFL, Laidlaw AS 1997.** Temperate forage legumes. *CAB International, Wallingford, UK*.

**Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E, Osborn TC 2007.** Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* ve their effect on gene expression ve phenotype . *The Plant Cell*, 19: 3403 – 3417.

**Gillies CB 1972.** Pachytene chromosomes of perennial species. II. Species closely related to *M. sativa*. *Heredity*, 72:277-288.

**Grant V 1971.** *Plant Speciation*. New York: Columbia University Press.

**Gunn CR, Skrdla WH, Spencer HC 1978.** Classification of *Medicago sativa* L. using legume characters and flower colors. *Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service*.

**Harrison MJ 1997.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends in Plant, Sci* , 2:54-60.

**Havananda T, Brummer EC, Doyle JJ 2011.** Complex Patterns Of Autopolyploid Evolution In Alfalfa Ve

Allies ( *Medicago Sativa* ; Leguminosae). *American Journal of Botany*, 98(10): 1633–1646.

**Havananda T, Brummer EC, Maureira-Butler IJ, Doyle JJ 2010.** Relationships among diploid members of the *Medicago sativa* (Fabaceae) species complex based on chloroplast ve mitochondrial dna sequences. *Systematic Botany*, 35(1):140-150.

**Ivanov A I 1980.** *Alfalfa*. Balkema.

**Jenczewski E, Prospero JM, Ronfort J 1999.** Differentiation between natural ve cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with rveom amplified polymorphic DNA (RAPD) markers ve comparison with allozymes. *Mol. Ecol*, 86, 1317–1330.

**Kalo P, Endre G, Zimanyi L, Csanadi G, Kiss GB 2000.** Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *TAG Theoretical ve Applied Genetics*, 100(5): 641-657.

**Lesins KA, Lesins I 1979.** Genus *Medicago* (Leguminosae), a taxogenetic study. *Dr. W. Junk Publishers, The Hague*.

**Li X, Wei Y, Moore KJ, Michaud R, Viands DR, Hansen JL, Acharya A 2011.** Association Mapping of Biomass Yield and Stem Composition in a Tetraploid Alfalfa Breeding Population. *The Plant Genome*, 4(1), 24.

**Malosetti M, Van der Linden CG, Vosman B, Van Eeuwijk FA 2007.** A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Genetics*, 175(2), 879.

**Masterson J 1994.** Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264: 421.

- Maureira IJ, Ortega F, Campos H, Osborn TC 2004.** Population structure and combining ability of diverse *Medicago sativa* germplasms. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 109(4), 775–782.
- Mavioglu-Kaya M, Sakiroglu M 2012.** Estimating Genome Size and Determining Ploidy Levels of Wild Tetraploid Alfalfa Accessions (*Medicago sativa* subsp. *varia*) Using Flow Cytometry. *Turkish J of Field Crops* (Değerlendirme).
- McCoy TJ 1982.** The Inheritance of 2n Pollen Formation in Diploid alfalfa *Medicago sativa*. *Canadian Journal of Genetics ve Cytology*, 24(3):315-323.
- Mengoni A, Gori A, Bazzicalupo M 2000.** Use of RAPD ve microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breed*, 119: 311-317.
- Michaud R, Lehman WF, Rumbaugh MD 1988.** World distribution ve historical development. In A. A. Hanson [ed.], D. K. Barnes ve R. R. Hill Jr. [co-eds.], *Alfalfa ve alfalfa improvement*, Agronomy monograph 29, 93 – 124. American Society of Agronomy, Crop Science Society of Agronomy, ve Soil Science Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
- Mohammadzadeh F, Monirifar H, Saba J, Valizadeh M, Haghghi AR, Zanjani BM, Barghi M 2011.** Genetic variation among Iranian alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations based on RAPD markers. *Bangladesh J. Plant Taxon*, 18(2): 93-104.
- Nam YW, Penmetza RV, Endre G, Uribe P, Kim D Cook DR 1999.** Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Medicago truncatula* ve identification of clones containing ethylene-response genes. *Theor Appl Genet*, 98:638-646.
- Pfeiffer TW, Bingham ET 1983.** Abnormal Meiosis in Alfalfa, *Medicago sativa*: Cytology of 2N Egg ve 4N Pollen Formation. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 25(2): 107-112.
- Quiros CF, Bauchan GR 1988.** The genus *Medicago* ve the origin of the *Medicago sativa* complex, p. 93-124, In A. A. Hanson, et al., eds. *Alfalfa ve alfalfa improvement*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Riday H, Brummer EC 2002.** Heterosis of agronomic traits in alfalfa. *Crop Science*, 42: 1081-1087.
- Russelle MP 2001.** Alfalfa: After an 8,000-year journey, the “ Queen of Forages ” stves poised to enjoy renewed popularity. *American Scientist*, 89 : 252 – 261.
- Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E 2011.** Tohumlu Bitkiler Sitematiği. *Ege Üniversitesi Basımevi Bornova- İzmir*, pp. 228.
- Shultze M, Kondorosi A 1988.** Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet*. 32:33-37.
- Sinskaya EN 1950.** Flora of cultivated plants of the USSR: XIII. *Perennial leguminous plants.(Part 1, translated 1961.) Israel Program of Scientific Translations, Jerusalem*.
- Small E, Brookes BS 1984.** Taxonomic circumscription and identification in the *Medicago sativa-falcata* (alfalfa) continuum. *Econ. Bot*, 38: 83-96.
- Small E, Jomphe M 1989.** A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany*, 67 (11): 3260-3294.
- Small E, Lefkovitch LP 1982.** Agrochemotaxometry of alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science*, 62(4), 919–928.

**Small E, Jurzysta M, Nozzolillo C 1990.** The Evolution of Hemolytic Saponin Content in Wild ve Cultivated Alfalfa (*Medicago sativa*, Fabaceae). *Economic botany*, 44.( 2) : 226-235.

**Soltis DE, Soltis PS, Tate JA 2004.** Advances in the study of polyploidy since *Plant Speciation* . *The New Phytologist*, 161 : 173 – 191 .

**Stanford EH, Clement JrWH, Bingham ET 1972.** Cytology ve evolution of the *Medicago sativa-falcata* complex. In C.H. Hanson (ed.) *Alfalfa science ve technology*. *Agronomy*, 15:87-101.

**Starker CG, Parra-Colmenares AL, Smith L, Mitra RM, Long SR 2006.** Nitrogen Fixation Mutants of *Medicago truncatula* Fail to Support Plant ve Bacterial Symbiotic Gene Expression. *Plant Physiology*, vol. 140 no. 2 671-680.

**Şakiroğlu M, Brummer EC 2011.** Clarifying the ploidy of some accessions in the USDA alfalfa germplasm collection. *Turkish Journal of Botany*, 35, 509–519.

**Şakiroğlu M 2011.** Bitki Genetik Kaynaklarının Uluslararası Paylaşım Sorunu. [The international ‘problem’ of Plant Genetic Resources]. *Seta Analiz*, No:25.

**Şakiroğlu M, Brummer EC 2012.** Presence of phylogeographic structure among wild diploid alfalfa accessions (*Medicago sativa* subsp. *microcarpa* Urb.) with evidence of the center of origin. *Genet Resour Crop Evo*, (In Press).

**Şakiroğlu M, Doyle JJ, Brummer EC 2010.** Inferring population structure ve genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions using SSR markers. *Theoretical ve Applied Genetics*, 121: 403-415.

**Vassilchenko IT 1949.** Alfalfa-The best fodder plant. *Trudy Botanicheskogo*, Inta AN USSR I,8,9 2040.

**Vorsa N, Bingham ET 1979.** Cytology of 2n Pollen Formation in Diploid Alfalfa, *Medicago sativa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 21(4): 525-530.

**Wang J, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, Chen ZJ 2006.** Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids . *Genetics*, 172: 507 – 517.

**Warner DA, Edwards GE 1993.** Effects of polyploidy on photosynthesis. *Photosynthesis Research*, Volume 35, Number 2 . 135-147.