

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MERCİMEKTE (*Lens culinaris* Medik.) AG VE AC
MİKROSATELLİTLERİNCE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ
GENOMİK KÜTÜPHANELERDEN YENİ SSRs (Simple
Sequence Repeats) MARKÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ
VE DİĞER BAKLAGİL TÜRLERİNE TRANSFER
EDİLEBİLİRLİĞİNİN TEST EDİLMESİ**

**Hazırlayan
Şehriban DEMİR**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Melike BAKIR**

Yüksek Lisans Tezi

**Şubat 2020
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MERCİMEKTE (*Lens culinaris* Medik.) AG VE AC
MİKROSATELLİTLERİNCE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ
GENOMİK KÜTÜPHANELERDEN YENİ SSRs (Simple
Sequence Repeats) MARKÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ
VE DİĞER BAKLAGİL TÜRLERİNE TRANSFER
EDİLEBİLİRLİĞİNİN TEST EDİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Şehriban DEMİR**

**Danışman
Dr. Öğr.Üyesi Melike BAKIR**

**Şubat 2020
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Şehriban DEMİR



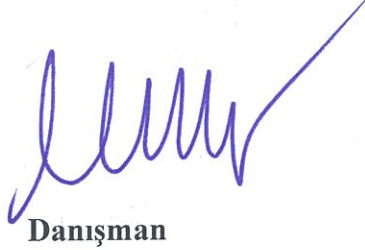
YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) AG ve AC Mikrosatellitlerince Zenginleştirilmiş Genomik Kütüphanelerden Yeni SSRs (Simple Sequence Repeats) Markörlerin Geliştirilmesi ve Diğer Baklagil Türlerine Transfer Edilebilirliğinin Test Edilmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönerge’sine uygun olarak hazırlanmıştır.



Hazırlayan

Şehriban DEMİR



Danışman

Dr. Öğr.Üyesi Melike BAKIR



Tarımsal Biyoteknoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

Dr. Öğr. Üyesi Melike BAKIR danışmanlığında Şehriban DEMİR tarafından hazırlanan “Mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) AG ve AC Mikrosatellitlerince Zenginleştirilmiş Genomik Kütüphanelerden Yeni SSRs (Simple Sequence Repeats) Markörlerin Geliştirilmesi ve Diğer Baklagil Türlerine Transfer Edilebilirliğinin Test Edilmesi” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

21 / 02 / 2020

JÜRİ:

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BAKIR

Üye: Prof. Dr. Faruk TOKLU

Üye: Doç. Dr. Hasan PINAR

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulumun 03/03/2020 tarih 2020/19-20 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde TÜBİTAK 1180791 no.lu projenin bir parçası olarak gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması, her türlü laboratuvar imkanını sağlayan Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'ne ve destekleri için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans öğrenimi boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Melike BAKIR'a, tez savunma sınavımda yer alarak beni şereflendiren, değerli paylaşımları ve önerileri ile tezime değer katan sayın Prof. Dr. Faruk TOKLU ve sayın Doç. Dr. Hasan PINAR hocalarıma saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarımda yanımda olan arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Şeyda Nur TURKAY'a, ve tezimin şekilsel düzenlenmesinde bana yardımcı olan Dr. Duygu SARI YOL'a tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve tez çalışmalarım esnasında maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen, çok değerli annem Zeliha DEMİR, babam Mehmet DEMİR ve kardeşlerime gönülden sevgi ve en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca her zaman bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen dayım Hasan DEMİR'e desteğiyle, hep yanımda olan arkadaşım Şeyma Nur KARACA'ya şükran ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Şehriban DEMİR

Kayseri, ŞUBAT -2020

**MERCİMEKTE (*Lens culinaris* Medik.) AG ve AC
MİKROSATELLİTLERİNCE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ GENOMİK
KÜTÜPHANELERDEN YENİ SSRs (Simple Sequence Repeats)
MARKÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE DİĞER BAKLAGİL TÜRLERİNE
TRANSFER EDİLEBİLİRLİĞİNİN TEST EDİLMESİ**

**Şehriban DEMİR
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2020
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BAKIR**

ÖZET

Simple sequence repeats (SSRs) markörler, bitki genetik ve genomik araştırmaları için yaygın olarak geliştirilen ve kullanılan önemli moleküler gereçlerdir. Ancak ekonomik olarak önemli olan serin iklim baklagillerinden mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) bugüne kadar geliştirilen SSR markörlerin sayısı oldukça azdır. SSR markörlerin bu eksikliği, mercimek moleküler ıslah çalışmalarını sınırlayan başlıca faktörler arasında yer almaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada, mercimekte SSR markörü geliştirmek için *Lens culinaris* cv Kafkas. çeşidi kullanılarak AG ve AC tekrarlarınca zenginleştirilmiş kütüphane tekniği ile yaklaşık 250 klon oluşturulmuştur. Bu klonlardan toplamda 120 adet SSR motifi içeren 33 adet yeni SSR markörü geliştirilmiş ve bu markörlerin 16 adedinin (%48.5) polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Beklenen heterezigotluk oranının 0.095 (Lc_MCu90) ile 0.820 (Lc_MCu87) arasında değiştiği ve ortalama 0.541 olduğu, gözlenen heterozigotluk değerinin 0.100 (Lc_MCu90) ile 1.00 (birden fazla markör) arasında değiştiği ve ortalama 0.363 olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizm bilgi içeriğinin (PIC) ise ortalama 0.46 olduğu tespit edilmiştir. Geliştirilen 33 adet mercimek SSR markörünün farklı baklagillere transfer edilebilme oranının %49.5 (*Vicia*) ile %3 (*P. vulgaris*) arasında değiştiği görülmüştür. Yeni mercimek SSR markörleri, moleküler temelli ıslah çalışmaları olmak üzere, haritalama çalışmaları, genetik çeşitlilik analizleri, populusyon genetiği çalışmalarında kullanılabilecek niteliktedir. Ayrıca, tespit edilen transfer edilebilir SSR markörleri tür içi ve türler arası genetik analiz çalışmaları için de önem taşımaktadır

Anahtar kelimeler Mercimek, SSRs, genomik kütüphane, çapraz transfer

DEVELOPMENT OF NEW SSR (Simple Sequence Repeats) MARKERS FOR LENTILS (*Lens culinaris* Medik.) FROM GENOMIC LIBRARY ENRICHED WITH AG AND AC MICROSATELLITES AND TRANSFERABILITY OF OTHER LEGUME SPECIES

Şehriban DEMİR

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, February 2020

Supervisor; Ass.Prof. Melike BAKIR

ABSTRACT

Simple sequence repeat (SSR) markers is a major molecular tool for genetic and genomic research that has been extensively developed and used in major crops. However, few are available in lentil (*Lens culinaris* Medik.), which is an economically important cool-season legume. The lack of informative SSR markers in lentil has been a significant limitation on the lentil molecular breeding. Therefore, in this study, in order to develop SSR markers in lentil, two enriched genomic libraries for AC and AG repeats were constructed from the *Lens culinaris* cv Kafkas. A total of 250 clones were inquired for the detection of SSRs. Thirty-three new markers, which include 120 SSR motif, were developed from these clones. Of 33 markers, 16 markers (48.5%) were found polymorphic. Expected heterozygosity value were found to change between 0.095 (Lc_MCu90) and 0.820 (Lc_MCu87), mean 0.541, and observed heterozygosity value found to change between 0.100 (Lc_MCu90) and 1.00 (more than one marker), mean 0.363. Polymorphic information content (PIC) found mean 0.46. Transferability of the developed 33 lentil SSR markers to other legumes was found to change between 49.5% (*Vicia*) and 3% (*P. vulgaris*). Newly developed SSR markers in this study have the quality to use in molecular breeding researches, mapping researches, genetic analysis studies, and population genetics. Additionally, these SSR makers are important for genetic analysis of intraspecific and interspecific studies.

Key words: Lentil, SSR, genomic library, cross-transferability

İÇİNDEKİLER

**MERCİMEKTE (*Lens Culinaris* Medik.) AG ve AC
MİKROSATELLİTLERİNCE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ GENOMİK
KÜTÜPHANELERDEN YENİ SSRs (Simple Sequence Repeats)
MARKÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ ve DİĞER BAKLAGİL TÜRLERİNE
TRANSFER EDİLEBİLİRLİĞİNİN TEST EDİLMESİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	İ
YÖNERGEYE UYGUNLUK	İİ
TEŞEKKÜR	İV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER	VII
KISALTMA VE SİMGELER	X
TABLolar LİSTESİ	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
GİRİŞ	2

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Mercimek (<i>Lens Culinaris</i> Medik.).....	3
1.1.1. Tarihçesi.....	3
1.1.2. Sınıflandırılması.....	4
1.1.3. Anatomik Yapısı	5
1.1.4. Toprak ve İklim İstekleri.....	5
1.1.5. Hastalık ve Zararlıları	6
1.1.6. Ekonomik Önemi ve Besin Değeri	6
1.2. Moleküler Markörler	7
1.2.2. Mikrosatellitleri Geliştirme Stratejileri	10
1.2.2.1. Klasik (small insert genomic) Genomik DNA Kütüphanelerden Mikrosatellitlerin Geliştirilmesi	10
1.2.2.2. Zenginleştirilmiş Genomik DNA Kütüphanelerinden Mikrosatellitlerin Geliştirilmesi	10

1.2.2.3. EST (Expressed Sequenced Tag) Kökenli Genik DNA Kütüphanelerinden Mikrosatellitlerin Geliştirilmesi	11
1.2.2.4. RAPD Amplikonlarının Taranması ile Mikrosatellitlerin Geliştirilmesi ...	12
1.2.2.5. Mikrosatellit Markörlerin Çapraz Amplifikasyonu/ Aktarılabirlik	13
1.3. Literatür Değerlendirmesi	13
1.3.1. Mercimekte Genik ve Genomik SSR Markörü Geliştirmeye Yönelik Çalışmalar	13
1.3.2. Diğer Yemlik ve Yemelik Baklagil Türlerinde Genik ve Genomik SSR Markörü Geliştirmeye Yönelik Çalışmalar	16
1.3.3. SSR Markörlerin Farklı Türlerde Kullanabilirliğinin Araştırılmasına Yönelik Çalışmalar	17

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali	21
2.2. Yöntem	23
2.2.1. DNA İzolasyonu	23
2.2.2. Kütüphanelerin Oluşturulması	24
2.2.3. Mikrosatellit İçeren Pozitif Klonların Belirlenmesi	24
2.2.4. Plazmidlerin Çoğaltılması	25
2.2.5. Dizi Analizi	26
2.2.6. Mikrosatellitleri İçeren Dizilerin Analizi ve Primer Dizaynı	26
2.2.7. Geliştirilen SSR Markörlerinin Test Edilmesi	27
2.2.8 İstatistik Analizleri	28

3.BÖLÜM

BULGULAR

3.1. DNA İzolasyon Sonuçları	29
3.2 Mikrosatellitleri İçeren Pozitif Klonların Belirlenmesi	33
3.3. Mikrosatellit Motiflerinin Karakterizasyonu	36
3.4. Yeni Geliştirilen Mercimek SSR Markörlerinin Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi	40
3.5. Yeni Geliştirilen Mercimek SSR Markörlerin Mercimekte Polimorfizm Oranının Belirlenmesi	41

3.6. Yeni Geliştirilen Mercimek SSR Markörlerin Mercimek Çesitlerinde Genetik ilişkilerin Analizi.....	43
--	----

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1.Yeni Geliştirilen Mercimek SSR Markörlerinin Genomik Kütüphanelerden Geliştirilen Diğer SSR Markörleri ile Karşılaştırılması.....	50
---	----

4.2. Mercimek SSR Markörlerinin Diğer Türlere Transfer Edilebilirliğinin Karşılaştırılması	53
--	----

4.3. Sonuç ve Öneriler.....	55
-----------------------------	----

KAYNAKLAR	56
------------------------	-----------

ÖZGEÇMİŞ.....	70
----------------------	-----------

KISALTMA VE SİMGELER

ABI	Applied Biosystems
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılan Parça Uzunluğu Farklılığı)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Dizi Homolojisi Arama Motoru)
bp	Base Pair (Baz çifti)
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid (Tamamlayıcı DNA Dizisi)
da	Dekar
dbEST	Database EST (EST Veritabanı)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksi-Nükleotid Trifosfat
EST	Expressed Sequence Tag (İfadelemiş Dizi Etiketleri)
FAO	Food and Agriculture Organization
GAP	Güney Anadolu Projesi
ha	Hektar
He	Beklenen Herezigotluk oranı
Ho	Gözlenen Herezigotluk oranı
M	Molar
MAS	Marker Assisted Selection
Mb	Megabyte
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
nk	Negatif Kontrol
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIC	Polimarfizim Bilgi İçeriği (probability of Identity)
QTL	Quantitative Trait Loci (Kantitatif Özellik Bölgesi)
rpm	Revolutions Per Minute (Dakikadaki Dönüş Sayısı)
SSR	Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarı)
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average
µl	Mikrolitre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Test edilen tescilli mercimek ve diğer baklagil çeşitleri.....	21
Tablo 2.2. Koloni PCR reaksiyonu koşulları	25
Tablo 2.3. Dizi analizi PCR reaksiyonu koşulları.....	26
Tablo 2.4. SSR PCR'ı reaksiyon koşullar	27
Tablo 2.5. İşaretli M13 primeri ile PCR reaksiyonu koşulları.....	28
Tablo 3.1. Mercimek ve diğer baklagil çeşitlerine ait DNA'ların miktar ve saflık değerlerinin üç tekrarlı ölçüm verileri.....	32
Tablo 3.2. Dizi analizi sonrası belirlenen mikrosatellit tekrarları.....	37
Tablo 3.3. Geliştirilen mercimek SSR markörleri ve bu markörlere ait bilgiler.....	37
Tablo 3.4. SSR lokuslarına ait genetik parametreler (allel sayısı (n), beklenen (He) ve gözlenen (Ho) heterozigotluk, lokusların tanımlama olasılığı	42
Tablo 3.5. Mercimek genotipleri arasındaki genetik benzerlik oranları	45
Tablo 3.6.a. Diğer baklagillerde amplifiye olan markörlere ait bilgiler	49
Tablo 3.6.b. Diğer baklagillerde amplifiye olan markörlere ait bilgiler	49
Tablo 3.6.c. Diğer baklagillerde amplifiye olan markörlere ait bilgiler	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.1. Mikrosatellitlerin dağılımı, fonksiyonları, uygulama alanları, geliştirme yöntemleri ve mikrosatellitlere dayalı metotlar (Kalia vd. 2011)9
- Şekil 3.1. Mercimek ve diğer baklagil çeşitlerine ait DNA izolasyonun %1'lik 29
- Şekil 3.2. Tekrar içeren klonlara ait örnek agaroz jel görüntüsü (%2), M: ladder (100bp), (1a, 1c ve 1b klon numaralarını temsil etmektedir). 34
- Şekil 3.3. SSR bölgesi içeren dizilere ait örnek görüntüler klonlar sırasıyla, P10-7E, P9-9D, P10-7B, P8-1D, P9-12C 34
- Şekil 3.4. Mercimekte primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonlarına ait örnek agaroz jel görüntüsü (%2), M: 100bp ladder, nk: Negatif kontrol 40
- Şekil 3.5. Lc_MCu70 (FAM-mavi), Lc_MCu81 (ROX-kırmızı) ve Lc_MCu88 (HEX-yeşil) primerlerine ait kapilleri elektroforez örnek pik görüntüleri (GeneMapper (version 5.0) software) 41
- Şekil 3.6. Yeni geliştirilen SSR primerleri ile 10 mercimek çeşidinde, genetik benzerlik matrisinden UPGMA kullanılarak oluşturulan genetik benzerlik dendogramı 44
- Şekil 3.7. Diğer türlere transfer edilebilirliğine ait %2 'lik örnek jel görüntüleri, Primer: Lc_MCu97, 1: *L.culinaris* (pozitif kontrol), 2: *Phaseolus vulgaris*, 3: *Vicia faba* 4: *Glycine max*, 5: *Pisum sativum*, 6: *Vicia sativa*, 7: *Onobrychis sativa* L., 8: *Trifolium pratense* L., 9: *Medicago sativa* L, nk: Negatif kontrol, M: 100bp ladder 47
- Şekil 3.8. Diğer türlerde primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonlarına ait %2 'lik jel optimizasyon görüntüleri, 1: *L. culinaris* (pozitif kontrol), 2: *C. bijigum*, 3: *C. echinospermum*, 4: *C. reticulatum*, 5: *C. pinnatifidum*, 6: *C. anatolicum*, nk: negatif kontrol M: 100bp ladder 48

GİRİŞ

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) kültüre alınan en eski baklagillerden biridir. (Bahl vd. 1993; Rehman vd. 1994). Mercimek diploid genoma sahip ($2n = 2x = 14$), kendine döllen (Muehlbauer, 1991), genom boyutu 4063 Mbp olan ve tek yıllık serin iklim baklagil bitkisidir (Arumuganathan ve Earle, 1991).

Mercimek bitkisinde geliştirilen moleküler markörlerin eksikliği mercimekte moleküler temelli çalışmalar ile genetik ve genomik çalışmaların yetersiz kalmasına neden olmuştur. Bu durum ürün geliştirmek için yeni teknolojik imkanlardan yararlanmayı kısıtlamıştır (Gupta vd. 2012). İslah yöntemlerinde kullanılmak üzere yeni moleküler markörlerin geliştirilmesi ve bu moleküler markör sayılarının artırılması, mercimek ve benzeri önemli baklagillerin genetik ve genomik bilgi kaynaklarının geliştirilerek biyoteknolojik kapasitesini iyileştirmek ve geliştirmek adına büyük önem taşımaktadır.

Mevcut moleküler markörler arasında, genomda kodlanan ve kodlanmayan bölgelerde bulunan 1-6 bp nükleotid uzunluğunda DNA tekrar motifleri “mikrosatellit” olarak tanımlanmaktadır. Mikrosatellitler kodominant özelliği, lokusa spesifik olması, tekrar edilebilirliği ve polimorfizimin yüksek olması gibi genetik özellikleri sayesinde bitki genetiği ve bitki ıslah çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Mikrosatellitlerin geliştirme sürecinin zahmetli, pahalı ve çok zaman alıcı olması SSR markörlerinin geliştirilmesini kısıtlayan bir faktördür. Bununla birlikte, SSR markörler taksonlar arasında da transfer edilebilmektedir (Rossetto, 2001) ve bu durum birçok türde başarılı bir şekilde gösterilmiştir (Ellis ve Burke, 2007). SSR markörlerin türler arasında aktarabilmesi, bitkilerde bu markörlerin kullanım alanlarını artırmaktadır (Reddy vd. 2010). SSRs (Simple Sequence Repeats) veya mikrosatellitler, genetik çeşitlilik, populasyon yapısı, taksonomik ve filogenetik çalışmalar, bağlantı haritalarının oluşturulması, QTL (Quantitative Trait Loci) haritalama, genom haritalama ve markör

destekli seleksiyon (MAS) gibi temel genetik araştırmaları ve bitki ıslahı çalışmaları için en uygun markörlerdir (Hendre ve Aggarwal, 2007; 2014).

Bu çalışmada, mercimekte ihtiyaç duyulan genetik ve genomik çalışmalarda (haritalama, bağlantı analizi, QTL, MAS vb.) kullanılmak üzere yeni fonksiyonel SSR markörleri geliştirilmiştir. Ayrıca mercimekte yeni geliştirilen bu SSR markörleri diğer baklagil türlerinde test edilmiş ve diğer baklagillere transfer edilebilir olanlar belirlenmiştir.



1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Mercimek (*Lens culinaris* Medik.)

1.1.1. Tarihçesi

Mercimek bitkisi Alman Botanikçi Friedrich Kasimir Medikus tarafından 1787'de "*Lens culinaris* Medik." olarak adlandırılmıştır (Hanelt, 2001). Arkeolojik çalışmalar sonucunda mercimeğe ait en eski fosil kalıntıların Suriye (Mureybit)'de M.Ö. 8.500 ile 7.500 tarihlerine ait olduğu bulunmuştur (Zohary, 1972). Mercimeğin anavatanı, Yakın Doğu olup buradan Mısır, Akdeniz havzası, Etiyopya, Afganistan, Hindistan ve Pakistan, Çin ve daha sonra Latin Amerika'ya yayılmıştır (Cubero, 1981, Duke, 1981). Günümüzde kültürü yapılan mercimeğin (*Lens culinaris* Medik.) kökeninin Yakın Doğu ve Orta Asya olduğu, dağılım gösterdiği ülkeler ise Türkiye, Irak, İran, Suriye, Lübnan, İsrail, Ürdün, Afganistan, Yunanistan ve Özbekistan olduğu bilinmektedir (Ladizinsky, 1979a, Cubero 1981, Zohary, 1972).

Mercimeğin yabani türlerinin günümüzden yaklaşık 10.500 yıl önce insanlar tarafından işlendiği, (Cubero, 2009: 13), kültüre alınmasının ise, bezelye (*Pisum sativum*), kavlca/gernik (*Triticum dicoccon*), arpa (*Hordeum vulgare*) ve siyez/kaplıca (*Triticum monococcum*) türleri ile aynı dönemde M.Ö 6.000-5.000 yıllarında olduğu düşünülmektedir (Hopf, 1962; Cubero vd. 2009: 13, Mazoyer ve Roudart, 2010: 93; Cokkizgin ve Shtaya, 2013: 55).

1.1.2. Sınıflandırılması

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.), Plantae alemi, Magnoliophyta şubesi, Magnolliopsida sınıfı, Fabales takımı, Fabaceae familyası, Fadoideae alt familyası ve *Lens* cinsi içerisinde yer almaktadır (Anonymous, 2012). Alt türlerin sınıflandırmasında günümüze kadar morfolojik, sitogenetik ve hibridizasyona dayalı çalışmaların yanı sıra moleküler markör temelli çok sayıda çalışma mevcuttur (Vishnumittre vd. 1974; Ahmad vd.1996).

Önceleri Lazdizinsky vd. (1984) tarafından mercimek, üç alt türe ait *L. culinaris* (ssp. *culinaris*, ssp. *odemensis*, ve ssp. *orientalis*) ve iki alt türe sahip *L. nigricans* türünden (ssp. *nigricans*, ssp. *ervoides*) olmak üzere rapor edilmiş. Yine, Van Oss vd. (1997) tarafından *Lens* cinsinin, *Lens culinaris* ssp. *culinaris*, *L. culinaris* ssp. *orientalis*, *L. odemensis*, *L. ervoides*, *L. nigricans*, *L. tomentosus* ve *L. lamottei* olmak üzere 7 taksondan oluştuğu ileri sürülmüştür. Ferguson vd. (2000) tarafından yapılan sınıflandırmada, mercimeğin 4 tür içinde gruplanan (*L. culinaris* ssp. *culinaris*, *L. culinaris* ssp. *orientalis*, *L. culinaris* ssp. *tomentosus*, *L. culinaris* ssp. *odemensis*, *L. ervoides*, *L. lamottei* ve *L. nigricans*) 7 taksondan oluştuğu ileri sürülmüştür. Son dönemde Wong vd. (2015) *Lens* cinsinin birbiriyle yakından ilişkili *L. culinaris*, *L. ervoides*, *L. lamottei*, *L. nigricans*, *L. odemensis*, *L. orientalis* ve *L. tomentosus* olmak üzere dört farklı gen havuzunda içerisinde yedi taksona ayırmıştır. Gen havuzunda birinci grupta, *L. culinaris*, *L. orientalis* ve *L. tomentosus* türlerinin, ikinci grupta *L. odemensis* ve *L. lamottei* türlerinin, üçüncü ve dördüncü grupta sırası ile *L. ervoides* ve *L. nigricans* türleri bulunmaktadır. Mercimek türlerinin sınıflandırılmasıyla ilgili günümüze kadar yapılan tüm taksonomik çalışmalara rağmen bütün çalışmalarda *L. culinaris* ssp. *orientalis*'in *L. culinaris* ssp. *culinaris*'e en yakın akraba ve yabani atası olduğu ve *L.nigricans*'in ise *L. culinaris* ssp. *culinaris*'e en uzak akraba olduğu konusunda hem fikir olunmuştur (Wong vd. 2015).

1.1.3. Anatomik Yapısı

Mercimek tek yıllık, çok dallı ve çalı formunda bir uzun gün bitkisidir (Şahin, 2016). İnce kazık kök sistemine sahip olmakla birlikte, kök yapısı yetiştirildiği toprak koşullarına göre farklılık göstermektedir. Alüviyal topraklarda mercimek bitkisinin kökleri toprak yüzeyinde ve saçaklanma şeklinde gelişim gösterirken, kurak topraklarda kökler derin ve dallanma sayısı azdır. Bu iki toprak koşulları arasında olan topraklarda ise bitki kökleri geçit kök olarak adlandırılan kök gelişim sistemi göstermektedir. (Geçit vd. 2009; 271-278). Baklagil bitkilerinin en belirgin özelliklerinden birisi, köklerindeki nodüllerde bulunan *Rhizobium* cinsi bakterilerdir. Mercimekte etkili olan bakterilerin türü *Rhizobium leguminosarum* olup (Humphrey vd. 2001), mercimek bitkisi bu bakteriler aracılığı ile havanın serbest azotunu toprağa bağlamakta ve toprağı azotça zenginleştirmektedir (Tosun ve Eser, 1978).

Mercimek bitkisinin gövdesi ince, otsu ve genellikle çeşit ve genotiplerine bağlı olarak tüylü olduğu görülmektedir. Bitki boyu çevresel faktörlerin ve genotipin etkisi ile 15-75 cm arasında değişiklik göstermektedir (Geçit vd. 2009;272). Çiçek rengi soluk mavi-lila damarlı, beyaz renkte, çok nadir açık mavimsi ve pembedir. İnce uzun salkım şeklinde çiçeklerin oluşturduğu bakla sayısı ortalama 1-4 arasında değişmektedir. Mercimek yaprakları birleşik yapraklı olup ortalama 10-16 yaprakçık bulunmaktadır. Baklalar (kesede) tüysüz ve kabaca dörtgen şekilli olup, her bir baklada 1 veya 2 (nadiren 3) tohum bulunmaktadır. Tohumlar yeşil, sarı, kırmızı, siyah renkte olabildiği gibi lekeli (benekli) tanelerde bulunmaktadır (Şehirli, 1998; Yürür vd. 1995).

1.1.4. Toprak ve İklim İstekleri

Mercimek diğer baklagil türleri ile kıyaslandığında, iklim ve toprak özellikleri açısından daha az seçicidir. Yükseklik arttıkça birim alanında verim düşmekte olup 3000 metre rakıma kadar yetişebilmektedir (Whyte vd. 1953). Mercimek, çok çeşitli toprak türlerinde yetişen adaptasyonu yüksek bir bitkidir. Bununla birlikte, ağır topraklar verim azalmasına neden olurken, kumlu tınlı topraklarda mercimek bitkisinin büyümesi için en uygun toprak yapısıdır (Şehirli, 1988; Özdemir, 2002).

Yemelik dane baklagil olan mercimek serin iklim bitkisidir. Ayrıca kurağa, sıcağa ve soğuğa dayanıklılığı ile bilinen mercimek bitkisi 90 ile 110 gün arasında vejetasyon süresini tamamlayan bir uzun gün bitkisidir. Mercimek tohumları 4-5°C’de çimlenmekte (Geçit vd. 2009:275), 18° ile 30°C’deki sıcaklıklarda optimum gelişim göstermektedir. Mercimeğin vejetasyon süresi boyunca toplam 1500–1800°C sıcaklığa ihtiyacı vardır (Saxena, 2009: 34, Kaya, 2010: 6).

1.1.5. Hastalık ve Zararlıları

Mercimeğin kalitesini ve ürün miktarını etkileyen hastalıkların başında *Fusarium*, *phytbium*, *Rbizontanica* türlerine ait mantar hastalıkları gelmektedir. Bu hastalıklar kök ve kök boğazına zarar vererek etkisini göstermektedir (Geçit vd. 2009:271-278). Yapılan çalışmalarda, bitkide kök boğazı çürüklüğü (*Ascochyta pinodella*) ve solgunluk hastalığına (*Fusarium oxysporum* f. sp.) neden olan toprak kökenli etmenlerin, daha kompleks halde bulunabileceği ve aynı tarlada birden fazla hastalık etmenin farklı türlerinin bir arada bulunabileceği ortaya konulmuştur (Mittal, 1997; Hwang, 1994; Abou zeid vd. 1990; Al Ahmad ve Mouselli, 1987; Saxena vd. 1992; Bellar ve Kebapch 1983). Mercimekte, *Uromyces fabae*’nın yaprak pas hastalığına ve nem miktarının fazla olduğu bölgelerde ise *Ascochyta lentis*’in antraknoz hastalığına neden olduğu bilinmektedir (Muehlbauer vd. 1995; Geçit vd. 2009: 278). Ayrıca ülkemizde bulunan en yaygın hastalık etmeni ise mercimek tohum böceği *Bruchus lentis*’tir (Geçit vd. 2009:278).

1.1.6. Ekonomik Önemi ve Besin Değeri

Mercimek ekonomik değeri ve içerdiği besin değerleri açısından insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Mercimek danesinde çeşide bağlı olarak değişmekle beraber %23-31 protein, %18 lif ve %35-53 nişasta (Devos, 1988) bulunmaktadır. Bunun yansıra demir (Fe), kalsiyum (Ca), potasyum (K) mineral içeriği açısından oldukça zengindir. Ayrıca mercimek A, B, C ve D vitaminlerini de içermektedir (Çiftçi, 2004). Besin içeriği bakımından zengin olan mercimek diğer ürünlere kıyasla sindirimi daha kolay olan bir baklagildir (Eser, 1978). Aynı zamanda mercimek, hayvan beslenmesinde önemli besin kaynağıdır. İçerdiği protein bakımından bir ton baklagil sapının sekiz ton tahıl sapına eşit olduğu belirtilmiştir (Engin, 1989).

FAO, (2018) verileri incelendiğinde 2018 yılında Dünya genelinde 6.119 milyon ha alanda yetiştirilmektedir ve 6.375 milyon ton üretim değerine sahiptir. Üretim açısından Kanada 2.0 milyon ton ile birinci sırada, Hindistan 1.6 milyon ton ile ikinci sırada yer alırken Türkiye 353 bin ton ile üçüncü sırada yer almaktadır.

Türkiye’de hem kırmızı hem de yeşil mercimek yetiştirilmekte olup, kırmızı mercimek kışlık olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, yeşil mercimek ise daha çok yazlık olarak Orta Anadolu ve Geçit Bölgelerinde üretilmektedir. Ülkemizde mercimek 282 bin ha alanda yetiştirilmektedir ve ekim alanlarının yaklaşık %84’ünü kırmızı mercimek oluşturmaktadır. Mercimek ekim alanları Güneydoğu Anadolu bölgesinde yoğunlaşmış olup, 2019 yılında 950 bin da ile Şanlıurfa birinci, Diyarbakır, 632 bin da ile ikinci sırada Mardin 277 bin da ile üçüncü sırada yer almaktadır. Kırmızı mercimek üretim miktarları il düzeyinde incelendiğinde; 103 bin ton üretim ile Diyarbakır birinci, 91 bin ton ile Şanlıurfa ikinci sırada yer almaktadır. Toplam mercimek ekim alanlarının yaklaşık %16’sını oluşturan yeşil mercimekte ise; 2019 yılında birinci sırayı 163 bin da ile Yozgat yer alırken, 104 bin da ile Konya ikinci sırada 39 bin da Kırşehir üçüncü sırada yer almaktadır. Yeşil mercimek üretim miktarları il düzeyinde incelendiğinde; 17.2 bin ton üretim ile Yozgat birinci, 10.9 bin ton üretim ile Konya ve ikinci 4.9 ton ile Kırşehir üçüncü sırada yer almaktadır (TÜİK, 2019).

1.2. Moleküler Markörler

Genetik markör, kromozom üzerinde yeri bilinen bir gen veya özellik ile ilişkili bir gen ya da DNA dizisidir. Genomik lokustaki değişim veya mutasyon nedeniyle ortaya çıkan ve gözlenebilen bir varyasyon olarak ta tanımlanabilir. Genetik markör, tek bir baz çifti değişikliğini kapsayan kısa bir DNA sekansı olan tek nükleotid polimorfizmi (TNP=SNP) veya minisatellit ve mikrosatellitler (SSRs) gibi uzun bir DNA sekansı olabilir (Al-Samarai ve Al-Kazaz, 2015).

Moleküler/genetik markörler, genlerin veya genetik lokusların allelik formları tarafından belirlenen ve bir nesilden diğerine aktarılabilen biyolojik özelliklerdendir. Bir dokuyu, hücreyi, kromozomu veya geni takip etmek için deneysel problemler/primerler olarak kullanılabilirler. Moleküler markörler büyüyen tarımsal sorunlara (iklim, zararlılar, toprak koşulları, vb.) çözüm sağlamak için önemli gereçlerdir (Evans 1997; Reynolds ve Rodomiro 2010). İdeal bir DNA markeri eş baskın olmalı, genom boyunca

eşit olarak dağılmış, yüksek oranda tekrarlanabilir ve daha yüksek düzeyde polimorfizm saptama yeteneğine sahip olmalıdır (Mondini vd. 2009). Markör seçimi bütün bu özellikleri göz önünde bulundurularak amaca uygun olarak yapılmaktadır. Markörler genel olarak DNA hibridizasyonuna dayalı teknikler (RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)) ve PCR (Polymerase Chain Reaction)'a dayalı teknikler (SSR (Simple Sequence Repeats), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), STS (Sequence Tagged Sites) ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism)) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

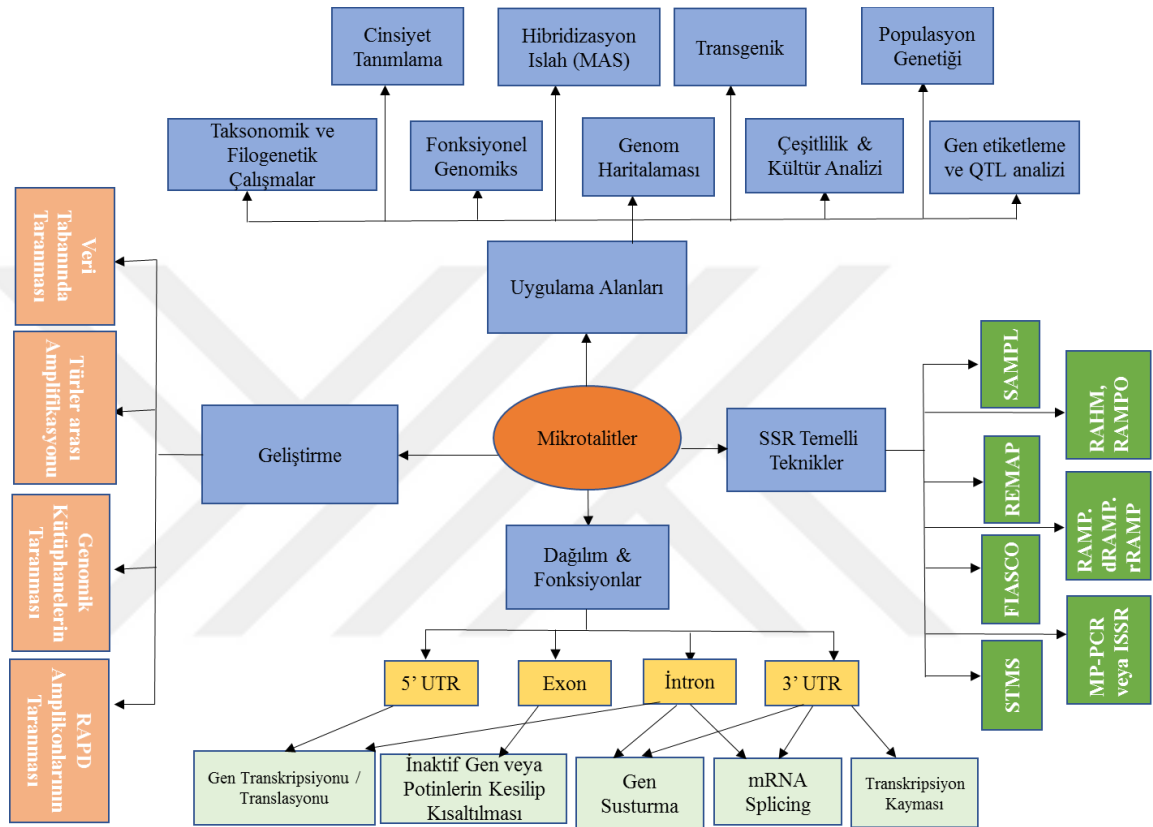
1.2.1. Mikrosatellitler

Mikrosatellitler veya SSR markörleri (Simple Sequence Repeats), prokaryotik ve ökaryotik genomlarda sıklıkla görülen 1-6 bp uzunluğunda kısa tekrar dizi motifleridir (Zane vd. 2002). Mikrosatellit bölgelerinin genotipler arasındaki allelik varyasyonları, replikasyon kaymalarına (replication slippage) (Schlotterer ve Tautz, 1992) ve rekombinasyona (eşit olmayan crossing over) (Li vd. 2002) dayandırılmaktadır. Mikrosatellitler ökaryotik organizmalarda genoma özgünlük göstermektedir (Litt ve Luty 1989). Ko-dominant özelliğe sahip olmaları, daha az DNA miktarına ihtiyaç duyulması, otomasyonun uygun olması, lokus spesifik olmaları, polimorfizm oranının yüksek olması, genomda çok miktarda bulunmaları ve tekrar edilebilirliğinin yüksek olması sebebiyle moleküler markörler arasında çok önemli bir yere sahiptirler (Gupta vd. 1996; Parida vd. 2009).

Mikrosatellitler, genomda 5'-UTR, intronlar, eksonlar, 3'-UTR bölgelerinde bulunmaktadır. İtronlarda bulunan mikrosatellitler, mRNA'nın eklenmesi ve gen susturulmasının yanı sıra bağımsız olarak veya 5'-UTR bölgelerinde bulunan SSR'lar ile kombinasyon halinde transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynarlar. 3'-UTR bölgelerinde bulunan SSR'lar ise, transkripsiyon kayması, mRNA eklenmesi ve gen susturmada etkin rol üstlenmektedirler (Li vd. 2004; Nalavade vd. 2013).

Mikrosatellit markörleri genomik kütüphanelerin ve veri tabanlarının taranması, türler arası amplifikasyonlardan ya da RAPD yöntemlerinden geliştirilmektedir. Sequence tagged microsatellites sites (STMS), microsatellite-primed PCR (MP-PCR) veya Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), Random amplified microsatellite polymorphisms (RAMPs), Random amplified microsatellite polymorphisms (RAMPO), Selective

amplification of microsatellite polymorphic loci (SAMPL), Fast isolation by AFLP of sequences containing repeats (FIASCO) ve Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) teknikleri ise SSR'a dayalı teknikler arasında yer almaktadır (Şekil 1.1) (Kalia vd. 2011).



Şekil 1.1. Mikrosatellitlerin dağılımı, fonksiyonları, uygulama alanları, geliştirme yöntemleri ve mikrosatellitlere dayalı metotlar (Kalia vd. 2011)

Mikrosatellitler, büyüklüklerine, tekrar yapısının tipine ve genomdaki yerine bağlı olarak çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır. Tekrar birimi başına nükleotid sayısına bağlı olarak, SSR motifleri; mono-, di-, tri-, tetra-, penta- veya heksanükleotidler olarak sınıflandırılmıştır (Weber 1990). Tekrarlanan motiflerdeki nükleotidlerin düzenlenmesine bağlı olarak, sınıflandırma için mükemmel, basit mükemmel olmayan, birleşik ve mükemmel olmayan mikrosatellit şeklinde terimleri kullanılmaktadır. Bunlar, mükemmel veya basit mükemmel tekrarlar $(TC)_n$, basit mükemmel olmayan tekrarlar $(AAC)_n$ ACT $(AAC)_n$, birleşik veya basit birleşik tekrarlar $(CA)_n$ $(GA)_n$, Mükemmel olmayan veya mükemmel olmayan birleşik tekrarlar $(CCA)_n$ TT $(CGA)_n$ olarak sınıflandırılmıştır (Wang vd. 2009a).

Genomdaki konumlarına göre ise, mikrosatellitler çekirdek (nuSSR), mitokondri (mtSSR) ve kloroplast (cpSSR) SSR'lar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Son yıllarda, kloroplast cpSSR'lar, uniparental kalıtımlarından dolayı doğal populasyonlardaki genomik varyasyonları ve doğal popülasyonlardaki gen akışını (Provan vd. 2001) araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mikrosatellit markörlerin özelliklerden yola çıkarak, genetik materyalin korunması, çeşitlerin belirlenmesi, populasyon genetiği çalışmaları, Quantitative Trait Loci (QTL) haritalama, Markır Destekli Seleksiyon (Marker Assisted Selection, MAS), taksonomik ve filogenetik çalışmalarda genom haritalama, gibi çalışma alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 1.1) (Kalia vd. 2011).

1.2.2. Mikrosatellitleri Geliştirme Stratejileri

1.2.2.1. Klasik (small insert genomic) Genomik DNA Kütüphanelerden Mikrosatellitlerin Geliştirilmesi

Klasik (small insert genomic) genomik DNA kütüphanelerden mikrosatellit geliştirme yöntemi veya zenginleştirilmemiş genomik DNA kütüphanelerden mikrosatellit geliştirme yöntemi olarak da bilinmektedir. Bu yöntem zaman alıcı olması, kütüphane oluşturmak için ve mikrosatellitlerin belirlenmesinde fazla bilgi gerektirmesi gibi dezavantajları olsa da birçok genetik analiz için yararlı bir yöntemdir (Blair vd. 2009). Klasik (small insert genomic) yöntemle mikrosatellit geliştirme, DNA kütüphanelerinin oluşturulması, oluşturulan kütüphanelerden mikrosatellit tekrarlarına özgü oligonükleotid işaretli prob/primerlerle taranması, pozitif klonlara ait dizilerin belirlenmesi, primer dizaynı, PCR amplifikasyonu ve polimorfizmlerinin belirlenmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir (Kibar, 2012). Bu yöntem ile Moriguchi vd. (2003) tarafından kamelyada (*C. japonica*), Golein vd. (2006) tarafından limonda (*Citrus limon*) ve Blair vd. (2009) tarafından fasulyede (*Phaseolus vulgaris*) SSR markörleri geliştirmiştir.

1.2.2.2. Zenginleştirilmiş Genomik DNA Kütüphanelerinden Mikrosatellitlerin Geliştirilmesi

Genomik kütüphanelerden mikrosatellit markörlerin izolasyonu; seçici hibridizasyon (Karagyoov vd. 1993; Kandpal vd. 1994; Hamilton vd. 1999) ve primer ekstensiyon

zenginleştirme (Paetkau, 1999) olarak iki yöntemle gerçekleştirilmektedir. Seçici hibridizasyon yönteminde, genomik DNA'dan sonikasyon ya da endonükleaz kesimi ile fragmentler oluşturulur ve fragmentlerin bir adaptöre ligasyonu gerçekleştirilir. Bu aşamayı takiben DNA denatüre edilerek tekrar içeren primer/problar ile hibridize edilir ve hibridizasyon aşamasından sonra nonspesifik bağlanmalarını yok etmek için tamponla birkaç defa yıkama yapılır ve proba bağlı DNA süzülerek elde edilir. Elde edilen DNA PCR amplifikasyonu yapılarak klonlanıp sekanslanır ya da doğrudan sekanslanır (Kalia vd. 2011; Senan vd. 2014). Sekans aşamasından sonra elde edilen dizilerden belirli programlar kullanılarak mikrosatellit markörleri dizayn edilir.

Primer ekstensiyon zenginleştirme yöntemi ile mikrosatellit tekrarları için zenginleştirilmiş genomik kütüphaneleri oluşturmak Paetkau, (1999) tarafından geliştirilen protokole göre, birincil kütüphaneden tek zincirli DNA ipliği kurtarılır, primer ekstensiyon ile 5'biotinli oligolara tabi tutulur, biotinli oligoların uzaklaştırılması ve mikrosatellit içeren ssDNA'yı elde etmek için hibridizasyon ürünleri streptavidin kaplı manyetik boncuklar ile muamele edilir. Mikrosatellitleri içeren moleküller, ikinci primer ekstensiyon ile çift sarmallı moleküllere dönüştürülür ve ikinci zenginleştirilmiş kütüphane oluşturulur. Oluşturulan kütüphaneler PCR ile taranarak mikrosatellit tekrarı içeren pozitif klonlar belirlenerek sekanslanır. Sekanslanan diziler belirli programlar ile primer dizayn edilir.

Mevcut farklı zenginleştirme yöntemleri arasında, seçici hibridizasyon, klonlamadan önce zenginleştirme ve seçime izin vererek, birden fazla örnekle çalışmak için daha hızlı ve daha kolay bir yöntem sağladığından, ağırlıklı olarak kullanılan stratejidir (Glenn and Schable, 2005).

1.2.2.3. EST (Expressed Sequenced Tag) Kökenli Genik DNA Kütüphanelerinden Mikrosatellitlerin Geliştirilmesi

Bitki genom projeleri çerçevesinde oluşturulan EST (Expressed Sequence Tag) verilerinin transkripsiyona giren ve girmeyen bölgelerinden (UTR) tespit edilen EST kökenli SSR'ların katılımı ile çoğu bitki türünde geniş bir SSR veri tabanı oluşturulmuştur (Scott, 2001; Dirlewanger vd., 2003; Decroocq vd., 2003). EST kökenli SSR markörlerini geliştirmek için bir organizmadan elde edilmiş birçok sayıda cDNA klonları ile cDNA kütüphaneleri oluşturulur (Oruç, 2009). Oluşturulan cDNA klonunun

dizilenmesi için birkaç yüz nükleotid uzunluğunda 5' EST ile 3' EST dizileri belirlenmektedir. Klonların dizi analizleri sonucu EST'ler belirlenir. EST'ler tespit edildikten sonra ilk önce gen bankasına (GenBank) sunulur ve en yaygın kullanılan NCBI bünyesinde dbEST veri tabanına kaydedilir. EST dataları insan dışında diğer 300 organizmaya ait EST datalarında bulunduğu dbEST veritabanı yolu ile EST dizilerinin bilinen gen dizilerini ile BLAST gibi analiz yöntemleri kullanarak karşılaştırılmaktadır. Böylece dizi benzerlikleri ve fonksiyonları tespit edilir. EST, yeni genlerin belirlenmesi, genlerin ifade edilmesinde ve düzenlenmesinde, genom haritalama için hızlı ve maliyeti düşük bir yöntemdir (Kibar, 2012).

EST markörleri yeni nesil sekanslama verilerinin taranması ile de geliştirilebilmektedir. Bunun için EST-SSR Roche 454, SOLID, Illumina HiSeq 2000 ve IonTorrent gibi ikinci nesil sekanslama teknolojileri veya Helicos, Pacific Biosciences ve Oxford Nanopore Technologies üçüncü nesil sekanslama teknoloji platformları kullanılmaktadır (Schuster, 2008). Mikrosatellit markörlerinin ikinci nesil sekanslama teknolojileri ve üçüncü nesil sekanslama teknolojileri ile geliştirmek için sekanslama ile elde edilen diziler içerisinde mikrosatellit tekrarlı diziler biyoinformatik programlar ile belirlenir ve bu bölgelerden markörler geliştirilir (Jenning vd. 2011). Yeni/ikinci nesil sekanslama teknolojileri ve üçüncü nesil sekanslama teknolojileri ile mikrosatellit markörlerin geliştirilmesi diğer geleneksel yöntemlerden daha hızlı olup bu platformlar daha fazla markör geliştirme olanağına imkan tanımaktadır (Shendure ve Ji, 2008; Duan vd. 2017).

1.2.2.4. RAPD Amplikonlarının Taranması ile Mikrosatellitlerin Geliştirilmesi

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), polimorfizm çalışmalarında kullanılan PCR temelli bir moleküler markör yöntemidir. RAPD yönteminin temel prensibi hedef organizmaya ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında rastgele bağlanıp PCR ile çoğaltılmasıdır (Williams vd. 1990; Welsh ve McClelland, 1990).

Bu yöntemle SSR markörü geliştirilirken, kütüphane oluşturulmadan ve tarama yapılmadan bilinmeyen mikrosatellitleri belirlemek için RAPD amplikonlarında gözlemlenen tekrar bölgelerinin bolluğuna dayanarak, mikrosatellit bölgeleri belirlenmektedir. RAPD profillerinde tekrar içeren primer/problar ile southern hibridizasyon, ardından pozitif bantların seçici klonlanması (Ender vd. 1996), veya tüm

RAPD ürünlerinin klonlanması ve dizilmiş klonların taranması yoluyla mikrosatellitler geliştirilmektedir (Lunt vd. 1999).

1.2.2.5. Mikrosatellit Markörlerin Çapraz Amplifikasyonu/ Aktarılabirlik

Mikrosatellit markörlerin geliştirilmesi yüksek maliyet ve iş gücünden dolayı, farklı bitkilerde SSR markörlerinin yaygın olarak uygulanmasını kısıtlayan ciddi bir faktördür (Senan vd. 2014). Karşılaştırmalı genetikte, yakından ilişkili türler arasında yüksek oranda korunmuş gen bölgelerinin olduğu ortaya koymuştur. Dolayısıyla, bir türden elde edilen sekanslardan geliştirilen SSR markörleri, ilgili türlerde ve hatta aynı ailenin diğer cinslerinde SSR'ların tespit etmek için kullanılabilir. Hem genik hem de genomik SSR markörleri türler arasında transfer edilebilir, ancak genik SSR markörlerinin ilgili türler arasında transkripsiyon yapılmış bölgelerin korunması nedeniyle aktarılabirlik oranının yüksek olması beklenmektedir (Kalia vd. 2011). Mikrosatellit markörlerin farklı türlere aktarılabirliği ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Buğday ve arpada geliştirilen SSR markörlerin mısır (*Zea mays*), yulaf (*Avena sativa*) ve çeltik (*Oryza sativa*) genotiplerine transfer edilebilirliği (Sipahi vd. 2016), çeltikte (*Oryza sativa* L.) geliştirilen SSR markörlerin 9 farklı çeltik türüne transfer edilebilirliği (Ngangkham vd. 2019), mercimekte (*L. culinaris* Medik.) geliştirilen SSR markörlerin *C. arietinum*, *C. echinospermum*, *C. reticulatum*, *C. bijugum*, *C. pinnatifidum* ve *C. anatolicum* gibi nohut türlerine transfer edilebilirliği doğrulanmıştır (Bakır, 2019). Bir türde geliştirilen markörlerin farklı türlere aktarılabirliği ile ilgili örnekleri çoğaltmak mümkündür.

1.3. Literatür Değerlendirmesi

1.3.1. Mercimekte Genik ve Genomik SSR Markörü Geliştirmeye Yönelik Çalışmalar

Genomik SSR markörlerini geliştirmek amacıyla yapılan ilk genotip kütüphane çalışması Hamwieh vd. (2005) tarafından ILL5588 mercimek çeşidinde (*Lens culinaris* Medik.) yapılmıştır. Bu çalışmada (GT)₁₀, (GA)₁₀, (GC)₁₀, (GAA)₈, (TA)₁₀ ve (TAA)₅ tekrar dizileri kullanılarak oluşturulan kütüphanelerden 54 yeni SSR markörü geliştirilmiş ve bunlardan 30'un da polimorfizm oranının yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu SSR markörleri, AFLP markörleri ile Fusarium solgunluğu (Fusarium wilt, Fw) 4 lokusunun tespiti için haritalama çalışmalarında kullanmıştır. SSR markörü

olan SSR59-2B markörü ve AFLP markörü olan p7m30710 markörleri Fusarium solgunluğu lokusu ile ilişkili olduğu ve uzaklıklarının SSR59-2B marköründe 8.0cm, p7m30710 markörlerinde 3.5 cm olduğu bildirilmiştir. Yine bu çalışmada Fusarium solgunluğuna dayanıklılık lokusunun LG 6'da yer aldığını bildirmişlerdir.

Hamwieh vd. (2009) tarafından geliştirilen 14 adet polimorfik SSR markörü, mercimekte genetik çeşitliliği tanımlamak için 15 ülkeden toplanan 52'si yabani, 57'si kültür olmak üzere toplam 109 genotipte test edilmiştir. Test edilen 14 adet SSR markörü 182 allel oluşturmuş ve genetik çeşitlilik katsayısının yabani çeşitlerde 0.16 ile 0.93 arasında kültür çeşitlerinde ise 0.03 ile 0.87 arasında değiştiği bildirilmiştir. Filogenetik analizlerde kültür ve yabani genotiplerin iki ayrı gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. Yeni geliştirilen SSR markörlerinin genetik çeşitlilik, ıslah programlarında ve genetik kaynakların korunması gibi çalışma alanlarında büyük öneme sahip olduğu belirtilmiştir.

Kaur vd. (2011), mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) geliştirilen 192 adet EST-SSR markörünü 12 kültür ve 1 yabani mercimek genotipinde test etmişlerdir. Geliştirilen 192 EST-SSR markörden 166'sının amplifikasyon gösterdiği, bunlardan ise % 47.5'in polimorfizm gösterdiği bildirilmiştir.

Verma vd. (2013), mercimekte yeni nesil sekanslama ile SSR markörleri geliştirmek amacıyla 8.722 SSR dizi taramış ve 5.373 SSR markörü geliştirilmiştir. Geliştirilen markörler arasında validasyon analizleri için rastgele 96 markör seçilmiş ve 82 (%85,4) markörün amplifiye olduğu ve 23 markörün ise polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Amplifiye olan markörler arasında 54 SSR markörü seçilerek *Medicago*, *Vigna* ve *Glycine* türlerine aktarılabirlik test edilmiştir. Aktarılabirlik oranının %42.85 olduğu bildirilmiştir.

Verma vd. (2014), mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) GA/CT motifleri ile zenginleştirilmiş genomik kütüphanelerden SSR markörleri geliştirmiştir. Çalışmada 151 mikrosatellit lokusundan 122 fonksiyonel SSR markörü geliştirilmiştir. Geliştirilen markörler kültür ve yabani mercimekte toplam 28 genotipte ve diğer 8 baklagil türüne ait 18 genotipte test edilmiştir. Tüm lokuslar için polimorfik bilgi içeriği (PIC), 0.13 ile 0.99 arasında değişirken ortalama 0.66 olarak tespit edilmiştir. Mercimek markörlerinin diğer 8 baklagil türünde aktarılabirlik oranı % 69.70 ile en

yüksek *T. alexandrinum* türünde % 12.12 ile en düşük *Vigna radiata* türünde olduğu belirtilmiştir.

Andeden vd. (2015), mercimekte SSR markörleri geliştirmek için (CA)_n, (GA)_n, (AAC)_n ve (ATG)_n tekrarlarını kullanarak dört genomik kütüphane oluşturmuştur. Oluşturulan kütüphanelerden 360 SSR markörü geliştirilmiş ve 15 Türkiye orijinli mercimek çeşidinde test edilmiştir. Geliştirilen SSR markörlerinden GA ve CT tekrar motiflerini içerenlerin polimorfizm oranının yüksek olduğu belirtilmiştir. Locus başına ortalama allel sayısı sırasıyla 7.80 ve 6.55 olarak tespit edilmiştir. Analizler sonucu geliştirilen markörlerden 78'si polimorfik bulunmuş, locus başına ortalama allel sayısı 5.1 olarak belirlenmiştir. Polimorfizm oranı en yüksek 0.89 ile CULA109 marköründe en düşük ise 0.07 ile CULD309 marköründe olduğu belirtilmiştir.

Gupta vd. (2016), Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) veri tabanını kullanarak 9513 EST dizisinde 374 SSR tekrarı tespit etmişlerdir. Sentezlenen 312 markörler arasından, 219'unun mercimekte başarılı bir şekilde amplifiye olduğu bildirilmiştir. Polimorfik primerleri belirlemek için, *Lens* cinsine ait 24 genotip kullanılmış ve 57 markörün polimorfizm gösterdiği bildirilmiştir. Bu markörlerin moleküler ıslah çalışmaları için kullanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Bakır ve Kahraman, (2019), mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) AC/AG motifleri ile zenginleştirilmiş genomik kütüphanelerden SSR markörleri geliştirmiştir. Geliştirilen 53 SSR markörü 24 mercimek çeşidinde test edilmiş, 31 adedinin polimorfik olduğu bildirilmiştir. Geliştirilen SSR kullanılarak yapılan polimorfizm analizinde, toplamda 144 allel üretilmiş ve locus başına ortalama sayısının 4.64 olduğu, ortalama heterozigotluk oranının ise 0.588 olduğu bildirilmiştir. Polimorfizm bilgi içeriğinin 0.194 ila 0.895 arasında değiştiği (ortalama 0.520) olduğu belirtilmiştir. Bu yeni geliştirilen SSR'ların, moleküler ıslah, genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi ve popülasyon çalışmaları için yararlı araçlar olduğu belirtilmiştir.

Singh vd. 2019, mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) geliştirilen 50 adet EST-SSR markörü kültür ve yabani olmak üzere 234 mercimek genotipinde ve 12 farklı baklagilin 34 aksesinde test edilmiştir. Geliştirilen 50 EST-SSR marköründen 46'sinin polimorfik olduğu ve PIC değerlerinin 0.16-0.74 arasında değiştiği belirtilmiştir. Polimorfik olan 46 markörün 12 farklı baklagil bitkisine aktarılabilirliği test edilmiş ve

en yüksek aktarılabirlik %54.3 ile pirinç fasulyesine (*Vigna umbellata*) ve en düşük %10.8 ile maş fasulyesine (*Vigna radiata* L.) olarak belirtilmiştir.

Bugüne kadar mercimekte genomik kütüphaneler kullanılarak Hamwieh vd. (2005, 2009) tarafından 44, Verma vd. (2014) tarafından 33, Andeden vd. (2015) tarafında 78 ve son olarak Bakır ve Kahraman, (2017) tarafından 31 olmak üzere toplam 186 polimorfik SSR markörü geliştirilmiştir. Mercimekte genik temelli yapılan çalışmalardan ise EST kökenli olarak Kaur vd. (2011) tarafından 79, Gupta vd. (2016) 57 ve Singh vd. (2019) tarafından 46 olmak üzere 182 polimorfik genik SSR markörü geliştirilmiştir. Yeni nesil sekanslama teknolojileri ile Verma vd. (2013) tarafından geliştirilen SSR markörü ssayısı 23'dür.

1.3.2. Diğer Yemlik ve Yemeklik Baklagil Türlerinde Genik ve Genomik SSR Markörü Geliştirmeye Yönelik Çalışmalar

Odeny vd. (2009), güvercin bezelyesine (*Cajanus cajan*) ait genomik kütüphanelerden elde ettikleri 208 klonu sekanslamıştır. Sekanslanan klonlardan 113 SSR primer dizayn edilmiş ve 24 güvercin bezelyesi genotipinde test edilmiştir. Test edilen markörlerin 35'inin polimorfik olduğu belirtilmiştir. Tespit edilen toplam alel sayısı 110 ve lokus başına ortalama allel sayısının 3.1 ile 2-6 arasında değiştiği, gözlenen heterozigotluk oranının ise 0.07–0.76 arasında değişiklik gösterdiği ve ortalama 0.4 olduğu görülmüştür. Çalışmada kullanılan SSR markörlerinin *Cajanus* cinsine ait türlere aktarılabirliği de ayrıca test edilmiştir.

Zhang vd. (2013), yürüttükleri çalışmada soya fasulyesinde (*Glycine max*) geliştirilen 22 adet EST-SSR markörünü 48 genotipte test edilmişlerdir. Yaptıkları araştırmada geliştirilen markörlerin %34.8'nin (22 adet EST-SSR) polimorfik olduğu, en fazla tekrar eden tri-nükleotidlerin toplam motiflerin 50'sini oluşturduğu tespit edilmiştir. Polimorfizm analizleri sonucunda, lokus başına ortalama allel sayısı 3.23 olmak üzere 71 allel tanımlanmış ve polimorfizm (PIC) değerleri ise 0.144 ile 0.630 arasında (ortalama 0.386) olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada gözlenen heterozigotluk değerlerinin 0.0196 ila 1.0000 arasında ve ortalama 0.6092, beklenen heterozigotluk değerlerinin 0.1502 ila 0.6840 arasında (ortalama 0.4616) olduğu belirtilmiştir.

Raveendar vd. (2015), fiğ (*Vicia sativa*) için yeni geliştirilen 36 SSR markörünü 23 *Vicia* türünde 88 genotipte test etmişlerdir. Geliştirilen 36 SSR marköründen 35'inin polimorfik oluşu bildirilmiştir. Türler arası ve alt türler arasında en yüksek aktarılabirlik oranları karşılaştırıldığında ilk sırada %82 ile *V. sativa* subsp *nigra* ve ikinci sırada %33 ile *V. ervilia*'nın olduğu görülmüştür. 22 *Vicia* türü için ortalama aktarılabirlik oranı %52 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada, her bir lokasyonda tespit edilen allellerin sayısı 1 ila 17 arasında değiştiği (ortalama 6.3) belirtilmiştir.

1.3.3. SSR Markörlerin Farklı Türlerde Kullanabilirliğinin Araştırılmasına Yönelik Çalışmalar

Peakall vd. (1998), soyada (*Glycine max*) 31 adet SSR markörü geliştirmiştir. Geliştirilen SSR markörlerinin *Glycine*'nin alt türleri olan *G. falcata*, *G. clandestina*, *G. microphylla* türlerine ve *Vicia*, *Vigna*, *Trifolium*, *Lupinus*, *Albizia* ve *Kennedia* türlerine aktarılabirliği test edilmiştir. *Glycine*'nin alt türlerinde test edilen 31 SSR marköründen 20'sinde amplifikasyon sağlanmış ve %85'inin *G. clandestina*'de polimorfik olduğu bulunmuştur. Diğer türlere aktarılabirlik yüzdelerinin %13 ile (*Vigna*), %3 (*Vicia*, *Lupinus* ve *Albizia*) arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca geliştirilen markörlerden AG81 markörünün test edilen türlerde korunmuş olduğu tespit edilmiş ve bu durumu markörün seryl-tRNA sentez genine yakın olması ile açıklanabileceğini bildirmişlerdir.

Kuleung vd. (2003), buğdayda (*Triticum aestivum* L.) ve çavdarda (*Secale cereale* L.) sırası ile 148 SSR ve 28 SSR markörü geliştirilmişler ve bu markörlerin buğday çavdar ve tritikale (*X Triticosecale wittmack*) arasında aktarılabirliği test edilmiştir. Buğdayda geliştirilen SSR markörlerinin çavdara transfer edilebilirliği %17, çavdarda geliştirilen SSR markörlerin buğdaya transfer edilebilirliği %25 olarak belirlenmiştir. Buğdayda ve çavdarda geliştirilen SSR markörlerinin tritikaleye transfer edilebilirliği ise sırasıyla %58 ve %39 olarak tespit edilmiştir. Buğdayda geliştirilen SSR markörlerinin polimorfizm oranı ortalama buğdayda 2.6, çavdarda 2.7 ve tritikalede 2.4 olarak belirlenmiştir. Çavdarda geliştirilen SSR markörlerin polimorfizm oranı çavdarda ortalama 2.0 olarak bulunmuş, bu markörlerin buğday ve tritikalede polimorfizm göstermediği bildirilmiştir.

Wang vd. (2005), buğday, çeltik ve mısırdaki 50'şer EST-SSR, sorgumda 30 EST-SSR ve 30 genomik SSR markörü geliştirmişlerdir. Geliştirilen 210 SSR markörlerinin *Eleusine coracana*, *Paspalum vaginatum* ve *Cynodon dactylon* yem bitkilerine aktarılabirliği test edilmiştir. Test edilen yem bitkilerinde yeni geliştirilen bu SSR markörlerin aktarılabirliğinin ortalama %57 olduğu bildirilmiştir.

Gutierrez vd. (2005), *M. truncatula*'dan geliştirilen 209 EST-SSR ve 33 genomik SSR markörünün nohut, bezelye ve bakla türlerine aktarılabirliği test edilmiştir. Geliştirilen 242 SSR markörlerin nohut, bezelye ve bakla türlerine aktarılabirlik oranlarının sırasıyla %36.3, %37.6 ve %40 olduğu, EST-SSR markörlerin aktarılabirlik oranının %39 ile %43 arasında değişiklik gösterdiği ve genomik SSR markörlerin aktarılabirlik oranının ise %21 ile %24 olduğu tespit edilmiştir.

He vd. (2006), soyada geliştirilen 432 SSR markörünün yer fıstığına (*Arachis hypogaea* L.) aktarılabirliğini test etmişlerdir. Yer fıstığında test edilen SSR markörlerinin %25'inin aktarılabir olduğu bulunmuştur. İlgili markörlerin yer fıstığı ile soya bitkilerinde haritalama çalışmalarında kullanılabileceği bildirilmiştir.

Jensen vd. (2007), İngiliz çiminde *Lolium perenne* (çok yıllık çim) geliştirilen 105 SSR markörünün buğdaygillerin (*Poaceae*) üç alt familyasından 7 grubu temsil eden 23 buğdaygil türüne transfer edilebilirliğini test etmişlerdir. Sonuç olarak, transfer oranının %2 ile %96 arasında değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Choudhary vd. (2008) yaptıkları araştırmada nohuttan NCBI veri tabanından elde edilen EST-SSR dizisi ve olgunlaşmamış nohut tohumlarından 822 EST-SSR dizileri taranarak 60 EST-SSR markörü geliştirilmiştir. Altı yıllık *Cicer* türleri arasında aktarılabirlikleri % 68.3 ile %96.6 arasında değiştiğini ve 7 baklagil türünde aktarılabirliğinin ise %29.4 ile %61.7 olduğu sonucuna varmışlardır.

Moon vd. (2008), tütünde (*Nicotiana tabacum* L.) 100 SSR markörü geliştirmişlerdir. Geliştirilen markörlerden 5'inin yakın akraba türler olan *N. otophora*, *N. sylvestris*, *N. tomentosa*, *N. kawakamii* ve *N. tomentosiformis* türlere aktarılabirlikleri test edilmiş ve aktarılabirlik oranının %42 ila %56 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir.

Gautami vd. (2009), yer fıstığında (*Arachis hypogaea* L.) geliştirilen 23 SSR marköründen 14'ünün amplifikasyonu başarılı bir şekilde sağlanmıştır. PCR optimizasyonu sonucunda 8 SSR markörü polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir. Polimorfizm belirlenen SSR markörleri maş fasulyesi (*Vigna radiata*), börülce (*Vigna unguiculata*), soya (*Glycine max*), fasulye (*Phaseolus vulgaris*), blackgram (*Vigna mungo*), nohut (*Cicer arietinum*) ve yonca (*Medicago sativa*) türleri aktarılabirlikleri test edilmiş ve aktarılabirlik oranının % 43 ile % 71 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir.

García-Moreno vd. (2010), ayçiçeğinde geliştirilen 117 SSR markörünün aspir bitkisine transfer edilebilirliği test edilmiştir. Geliştirilen markörler aspir bitkisine ait 6 ıslah hattında test edilmiş ve % 16.2 (19) oranında transfer edilebildiği belirlenmiştir.

Hu vd. (2010) tarafından hıyarda (*Cucumis sativus*) geliştirilmiş 35 EST-SSR markörünün kavun, karpuz, kabak ve sukabağına transfer edilebilirliği test edilmiştir. 35 EST-SSR markörden 28'nin çalıştığı ve aktarılabirlik yüzdesinin sırasıyla %92.9, % 57.1, % 53.6 ve % 60.7 olduğu belirtilmiştir.

Jingade vd. (2014), nohutta (*Cicer arietinum* L.) geliştirilmiş 201 SSR markörünün diğer baklagillere transfer edilebildiğini test edildiği bildirilmiştir. En yüksek aktarılabirlik oranı %66.7 ile maş fasulyesi (*Vigna radiata*), % 66.2 ile *Macrotyloma uniflorum*, % 62.7 ile soya, % 61.7 ile güvercin fasulyesi (*Jajanus jajan*) ve en düşük aktarılabirlik oranı %54.7 ile börülce (*Vigna unguiculata*) ait olduğu belirtilmiştir.

Sipahi vd. (2016), arpa ve buğdayda *Fusarium* enfeksiyon koşulları altında oluşturulan EST kütüphanelerinden geliştirilen SSR markörlerini 8 *Aegilops*, 6 *Triticum* türü ile, *Zea mays*, *Avena sativa* ve *Oryza sativa*'yı içeren 17 türde test etmişlerdir. Arpa için geliştirilen SSR markörlerin belirtilen cins ve türlere aktarılabirlik yüzdesinin %29 ile %100 arasında değiştiğini, cinsler arasında en yüksek geçişin *Avena sativa*'da (%100) ve *Zea mays* (%92) olduğunu bunları sırası ile *Triticum* (%83), *Aegilops* (68%) ve *Oryza sativa* (%8) takip ettiğini bildirmişlerdir. Buğdayda geliştirilen SSR markörleri değerlendirildiğinde, *Triticum* türleri içinde aktarılabirlik yüzdelерinin %70 ile %100 arasında değiştiği ve sırası ile *Hordeum*'da %60, *Oryza sativa*'da %50, *Zea mays*' da %45, *Avena sativa*' da %15 olduğu tespit edilmiştir. Buğdayda

geliştirilen 20 SSR markörün ve arpa için geliştirilen 12 SSR markörün uzak türler arasında yüksek aktarılabirlik gösterdiği bildirilmiştir.

Chen vd. (2015), maş fasulyesinde toplam 500 EST-SSR ve genomik SSR geliştirmiş ve bunlardan sadece 58'i Doğu Asya'nın farklı bölgelerinden alınan 157 kültür ve yabani maş fasulyelerinde çeşitliliği değerlendirmek için test edilmiştir. Her bir lokus için ortalama allel sayısı 2.66, kültür maş fasulyesi için ortalama PIC değeri 0.36, yabani maş fasulyesi için ise 0.25 olduğu belirtilmiştir. Genomik SSR'ların ortalama polimorfizm bilgi içeriğinin 0.40, EST-SSR'ların ise 0.30 olduğu belirtilmiştir.

Kaldate vd. (2017), *Macrotyloma uniflarum* L. bitkisinde geliştirilen 48 SSR markörünün *M. sarghrwalensis*, nohut (*Cicer arietinum*), börülce (*Vigna uniuiculata*), mercimek (*Lens culinaris*), bezelye (*Pisivum sativum*), üçgül (*Trifolium prantense*), pirinç fasülyesi (*Vigna umbelleta*) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris*) belirtilen 9 ilgili baklagil türünde aktarılabirliği test edilmiştir. Aktarılabirlik oranı en yüksek *P. sativum*'da (% 91.49) olduğu ve bunu sırası ile *T. prantense* (% 53.19), *V. umbelleta* (%40.43), *V. muga*, *C. aritinum* ve *L. culinaris* (%36,17), *M. sarghrwalensis* ve *P. vulgaris* (%34.04) takip etmiştir. Aktarılabirlik oranı en düşük olarak ise %31.91 ile *V. uniuiculata* bulunmuştur.

Ngangkham vd. (2019), türler arası aktarılabirlik oranının potansiyelini araştırmak için çeltikte (*Oryza sativa* L.) geliştirilen 70 SSR markörü dokuz farklı genom türünü temsil eden 18 farklı çelitik genotipinde test etmiştir. Aktarılabirlik yüzdeleri *O. rufipogon* için % 97, *O. Laberrima* için % 94.20, *O. nivara* için % 92.80, *Oryza sativa* sp. Indica çeşidi Swarna için % 92.80, *O. longistaminata* için % 91.40, *O. eichingeri* için %90, *O. barthii* için % 88.50, *O. alta* için % 82.80, *O. australiensis* için %77.10, *O. grandiglumis* için%74.20, *O. Officinalis* için %74.20, *Zizania latifolia* için %70, *O. Latifolia* için %68.50, *O. brachyantha* için %62.80, *Leersia perrieri* için %57.10, *O. ridleyi* için %41.40 ve *O. coarctata* için %28.50 olduğu sonucuna varmışlardır.

Bakır, (2019), mercimekte geliştirilen 53 adet SSR markörünü yabani ve kültür olmak üzere 32 nohut genotipine aktarılabirliğini test edilmiştir. Geliştirilen markörlerin nohut türlerine aktarılabirlik oranı *C. arietinum* için %33.09, *C. echinospermum* için %37.7, *C. reticulatum* için %35.8, *C. bijugum* için %39.6, *C. pinnatifidium* için % 18.8, *C. anatolicum* için %15.09 ve tüm nohut türleri için %11.3 olduğu bildirilmiştir.

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Geliştirilen markörlerin polimorfizm oranlarının belirlenmesi ve diğer baklagillere transfer edilebilirliğinin test edilmesi için farklı araştırma merkezlerinden temin edilen 10 mercimek çeşidi ile 32 adet diğer baklagillere ait tescilli çeşitler ve yabancı türlere ait genotipler olmak üzere toplam 42 genotip kullanılmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Test edilen tescilli mercimek ve diğer baklagil çeşitleri

Tür Adı	No	Çeşit Adı	Tescil Merkezleri
<i>L.culinaris</i> Medik.	1	Tigris	GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi
	2	Seyran-96	GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi
	3	Altın toprak	GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi
	4	Yerli Kırmızı	GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi
	5	Kafkas	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
	6	Ankara yeşili	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
	7	Ceren	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
	8	Erzurum-89	Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
	9	Emre-20	Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
	10	Sazak-91	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
<i>P. vulgaris</i>	11	Berrak	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
	12	4F-89 Fransız	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
	13	Eresen-87	Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü

<i>V. faba</i>			Müdürlüğü
	14	Filiz-99	Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
<i>G. max</i>	15	Nazlıcan	Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
	16	Türksoy	Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
<i>P. sativum</i>	17	13	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi
	18	14	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi
<i>V. sativa</i>	19	Yücel	Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
<i>V. narbonensis</i>	20	Tarman-2002	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
<i>V. sativa</i>	21	Ankara Moru-08	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
<i>V. pannocina</i>	22	Kansur	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
<i>V. villosa</i>	23	Selçuklu-2002	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
<i>V. villosa</i>	24	Seğmen-2002	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
<i>O. sativa</i> L.	25	Özerbey	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Ens.
<i>T. pratense</i>	26	Dadaş Çayır Üçgülü	Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Ens.
<i>M. sativa</i> L.	27	Sazova	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Merkezi
<i>C. bijugum</i>	28	AWC-6	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. echinospermum</i>	29	AWC-306	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. echinospermum</i>	30	AWC-307	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. reticulatum</i>	31	AWC-605	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. reticulatum</i>	32	AWC-609	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. reticulatum</i>	33	AWC-610	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. reticulatum</i>	34	AWC-613	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. reticulatum</i>	35	AWC-614	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. reticulatum</i>	36	Bari	Harran Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. reticulatum</i>	37	Cudi	Harran Üniversitesi

			Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. reticulatum</i>	38	Kesen	Harran Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. pinnatifidum</i>	39	AWC-500	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. pinnatifidum</i>	40	AWC-503	Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü
<i>C. anatolicum</i>	41	K621	Erciyes Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü
<i>C. anatolicum</i>	42	K630	Erciyes Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

2.2. Yöntem

2.2.1. DNA İzolasyonu

Kontrollü koşullarda 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlıkta 23 °C sıcaklık altında viyollerde 15 gün süre ile gelişimleri sağlanan bitkilerden toprak üstü kısımları toplanarak Lefort vd. (1998) tarafından geliştirilen protokole göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyon protokolü (Lefort vd. 1998):

- Genç yaprak veya sürgün ucu sıvı azotla ezildi.
- 100 mg yaprak dokusuna DNA ekstraksiyon solüsyonundan (50ml-son konsantrasyon 50mM TRIS (pH 8.0), 50mM EDTA (pH 8.0), 0.4 M LiCl, %1 CTAB, %2 PVP, % 0.5 TWEEN 20) 1 ml eklendi.
- Örnek başına 10 µl 2-Merkaptoethanol eklendi.
- 65°C de ara sıra çalkalanarak 15 dk eklendi.
- Oda koşullarına soğutulan örneklere 0.5 ml kloroform/isoamil alkol (24:1) karışımı eklenerek, 30 dk buz üzerinde bekletildi.
- 14000 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
- Üst sıvı (süpernatant) temiz bir ependorf tüpe aktarılır ve üzerine 0.8 ml isopropanol eklendi.
- Örnekler 15-20dk buz üzerinde tutularak 14000 rpm de 1dk santrifüj edilir, üst sıvı atıldı.
- Pellet (alt katı) üzerine 1 ml %70 lik etanol eklenerek 14000 rpm de 2 dk santrifüj edildi.
- Etanol uzaklaştırılarak pellet kurutulur ve pellet 50-100µl TE (pH 8) veya H₂O (nükleaz free)'da çözüldü.

İzole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde 80 Volttta 30 dakika yürütülmüş ve BioSpec-nano spektrofotometre cihazında DNA'ların saflıkları ve konsantrasyonları belirlenmiştir.

2.2.2. Kütüphanelerin Oluşturulması

'Mercimekte (*L. culinaris* Medik.) AG ve AC Mikrosatellitlerince Zenginleştirilmiş Genomik Kütüphanelerden Yeni SSRs (Simple Sequence Repeats) Markörlerin Geliştirilmesi (TUBİTAK, Proje No: 215O088)' projesi kapsamında hazırlanan kolonilerden, aşağıdaki protokol kullanılarak kütüphaneler/gliserol stokları oluşturulmuştur.

- Platelere (Nunc marka) 150 µl TB (Terrific Broth) ve Ampisillin (50 mg/ml) solüsyonu karışımından konulmuştur.
- Her bir kuyucuğa ayrı ayrı bir rekombinant (beyaz) koloni steril (otoklavlanmış) yuvarlak kürdanlar kullanılarak aktarılmıştır.
- Tüm kürdanlar plate den bir düzene göre uzaklaştırılmıştır.
- Plate non-sterile gözenekli seal film (AeraSeal B-100) kullanılarak kapatılmıştır.
- Plate çalkalayıcılı inkübatörde 300 rpm'de 37°C'de 12-17 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonu takiben hücre gelişimi tamamlanan platelere 50 µl %75'lik steril gliserol eklenmiştir.
- Platelere gözenekli olmayan seal ile kaplanarak hafifçe vortexlenmiştir.
- Stoklar plazmidlerin çoğaltılması aşamasına kadar -80° C de saklanmıştır.

2.2.3. Mikrosatellit İçeren Pozitif Klonların Belirlenmesi

Gliserol stokları hazırlandıktan sonra SSR motifi içeren hücreleri belirlemek için Koloni PCR reksiyonu Bloor vd. (2001) tarafından uygulanan protokol üzerinde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.2). PCR ürünleri %2'lik jelde kontrol edilmiş ve iki veya daha fazla bant içeren klonlar belirlenmiş ve plazmidlerin çoğaltıldığı TempliPhi kiti (Amersham) ile amplifikasyon aşamasına geçilmiştir.

Tablo 2.2. Koloni PCR reaksiyonu koşulları

Hücre solusyonu (gliserol stoğu 1-10)	1 µl	
10X Buffer	2 µl	
Taq DNA polimeraz (5u/ µl)	0,25µl	
dNTP (2,5 mM)	1 µl	94°C 2dk
MgCl ₂ (25mM)	2 µl	95°C 45sn
SSRLIBF3 (10 pmol)	2,5 µl	T _m 45sn
AG oligonükleotit (10pmol)	2,5 µl	72°C 1dk
AC oligonükleotit (10pmol)	2,5 µl	72°C 10dk
Su	8,75µl	
Toplam	20 µl	
SSRLIBR3 Primeri	5'→3'	
SSRLIBR3 F	CGGGAGAGCAAGGAAGGAGT	

2.2.4. Plazmidlerin Çoğaltılması

Plazmid izolasyonu yapılmaksızın plazmidler TempliPhi Amplifikasyon Kiti (Amersham) kullanılarak kit protokolüne göre aşağıdaki gibi çoğaltılmıştır.

- -80°C' de saklanan hücre stoklarının buz üzerinde yaklaşık 2 saat boyunca çözünmesi sağlanmıştır.
- Hücreler PCR plate'ine aktarılmadan önce 4 dk boyunca hafifçe vortekslenmiştir.
- Denatüre buffer buz üzerinde eritildikten sonra 5µl PCR plate'lerine aktarılmıştır.
- Hücreler başka bir plate içerisinde 1/50 oranında steril su ile seyreltilmiştir (1µl hücre: 49 µl su).
- Seyreltilen hücreler 4 dk boyunca vortekslenmiştir.
- Seyreltilmiş hücrelerden 1.3 µl alınıp denatüre buffer bulunan plate'lere aktarılıp hızlı devirde 1 dk vortekslenmiştir.
- PCR plate'nin üzeri silikon mat seal ile kaplandıktan sonra 95°C' de 3dk. denatüre edilip hemen buz üzerine alınmıştır.
- Plate'ler soğuduktan sonra 5 µl TempliPhi premix eklenmiş, üzerleri sealla kaplandıktan sonra 3 dk vortekslenip, sonra santrifüj edilmiştir.
- Plate' ler nemli havlu kağıtla kaplanmış saklama kutularına yerleştirilip 14-18 saat 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır.
- Bu sürenin sonunda 65°C' de 10 dk. bekletilip hemen buz üzerine alınmış ve dizi analizi aşamasına geçilmiştir.

2.2.5. Dizi Analizi

TempliPhi aşaması ile çoğaltılan plazmidlerin dizi analizi BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) ile Tablo 2.3'deki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.3. Dizi analizi PCR reaksiyonu koşulları

Hücre	2 µl (10-50 ng)	96°C 5dk	
M13 primeri (0.8 pmol/µL)	1.5 µl	94°C 30sn	} 35döngü
BigDye® Direct PCR Master Mix	5.0 µl	62°C 45sn	
su	1.5 µL	68°C 45sn	
Toplam	10.0 µl	72°C 2dk	
M13 Primerleri	5'→3'		
M13 F	TGTAACGACGGCCAGT		
M13 R	CAGGAAACAGCTATGACC		

Dizi analizi reaksiyonu sonrası PCR ürünleri BigDye XTerminator® Purification Kiti kullanılarak purifiye edilmiştir. Bunun için örnek başına 45µl SAM™ solusyonu ve 10µl XTerminator® solusyonu olacak şekilde 55 µl karışım oluşturularak örnekler ilave edilmiştir. Daha sonra 2200 rpm de 30 dk vortekslenip yaklaşık 3000 rpm'de 2 dk. spin edilerek ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazına yüklenmiş ve sekans görüntüleri elde edilmiştir.

2.2.6. Mikrosatellitleri İçeren Dizilerin Analizi ve Primer Dizaynı

Dizi analizi sonrası elde edilen dizilerden plazmid dizilerini belirlemek ve temizlemek için Vecscreen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) programı kullanılmıştır. Dizi fazlalıklarının çıkartılıp (gürültü, kirlilik vb.) verilerin işlenmesi için ise CAP3 programı (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) (Huang ve Madan 1999) kullanılmıştır. Dublike diziler BioEdit (Hall,1997) programı kullanılarak belirlenmiş ve çıkartılmıştır. Elde edilen mikrosatellit tekrarlarının yerleri SSRIT (<http://archive.gramene.org/db/markers/ssrtool>) (Temnykh vd. 2001) programı ile belirlenmiştir. Dinükleotit tekrarları için en az beş, trinükleotit tekrarları için en az üç ve daha fazla tekrar içeren dizileri için Primer3 programı (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Koressaar ve Remm 2007;

Untergasser vd. 2012) ve BatchPrimer3 (<https://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>) (You vd. 2008) kullanılarak primer dizayn edilmiştir.

2.2.7. Geliştirilen SSR Markörlerinin Test Edilmesi

Geliştirilen SSR primerleri ilk aşamada, Tigris ve Seyran-96 mercimek çeşitleri kullanılarak Tablo 2.4.'de verilen reaksiyon koşullarına kullanılarak optimize edilmiştir. Bant büyüklüklerini belirlemek için PCR ürünleri %2'lik agoroz jelde yürütülmüş ve fazla bant verenler ve amplifikasyon aralığı 100-500 bp dışında olanlar belirlenmiştir.

Tablo 2.4. SSR PCR'ı reaksiyon koşullar

DNA (200ng)	3 µl		
PCR buffer (5X)	2 µl	94 ⁰ C 3 dk	
dNTP (2,5mM)	1,6 µl	94 ⁰ C 1 dk	} 35 döngü
Primer F(10µM)	1µl	Tm ⁰ C 1dk	
Primer R(10µM)	1µl	72 ⁰ C 2dk	
MgCl ₂ (25mM)	0,6µl	72 ⁰ C 5dk	
Taq DNA polimeraz (5u/µl) (Fermantase)	1 µl		
Su	-		
Toplam	10 µl		

İkinci aşamada ise, işaretli primerler ile Tablo 2.5.'de verilen PCR reaksiyonu kullanılarak geliştirilen markörlerin polimorfizm oranları tespit edilmiştir. PCR ürünleri işaretlemede kullanılan floresan boyalara göre farklı oranlarda (1:5, 1:10 gibi) seyreltilmiş, üzerlerine 0.2-0.5µl Gene Scan™ 600 LIZ® size standart eklendikten sonra yükleme buffer (Hi-Di™ Formamide) ile 10 µl'ye tamamlanarak, Applied Biosystems® 3500 Genetik Analiz Sisteminde elektroforez edilmiştir. Daha sonra GENEMAPPER (Applied Biosystems) software kullanılarak her bir lokusa ait pikler değerlendirilmiş, istatistik analizleri için hazır hale getirilmiştir. IDENTITY 1.0 (Wagner ve Sefc, 1999) adlı yazılım programı ile her bir lokustaki allellerin sayısı (n), allel frekansı, beklenen heterozigotluk (He) ve gözlenen heterozigotluk (Ho), tanımlama olasılığı (PIC) Paetkau vd. (1995) tarafından belirtildiği gibi tespit edilmiştir.

Tablo 2.5. İşaretli M13 primeri ile PCR reaksiyonu koşulları

DNA (15ng)	6 µl		
PCR buffer (5X)	3 µl	94 ⁰ C 3 dk	
dNTP (2,5mM)	0,75 µl	94 ⁰ C 1 dk	} 35 döngü
Primer F (5µM) (işaretli)	0,75µl	Tm ⁰ C 1dk	
Primer R (5µM)	0,75µl	72 ⁰ C 2dk	
MgCl ₂ (25mM)	1,2 µl	72 ⁰ C 5dk	
Taq DNA polimeraz (5u/µl) (Fermantase)	1 µl		
Su	0,8 µl		
Toplam	15 µl		

2.2.8 İstatistik Analizleri

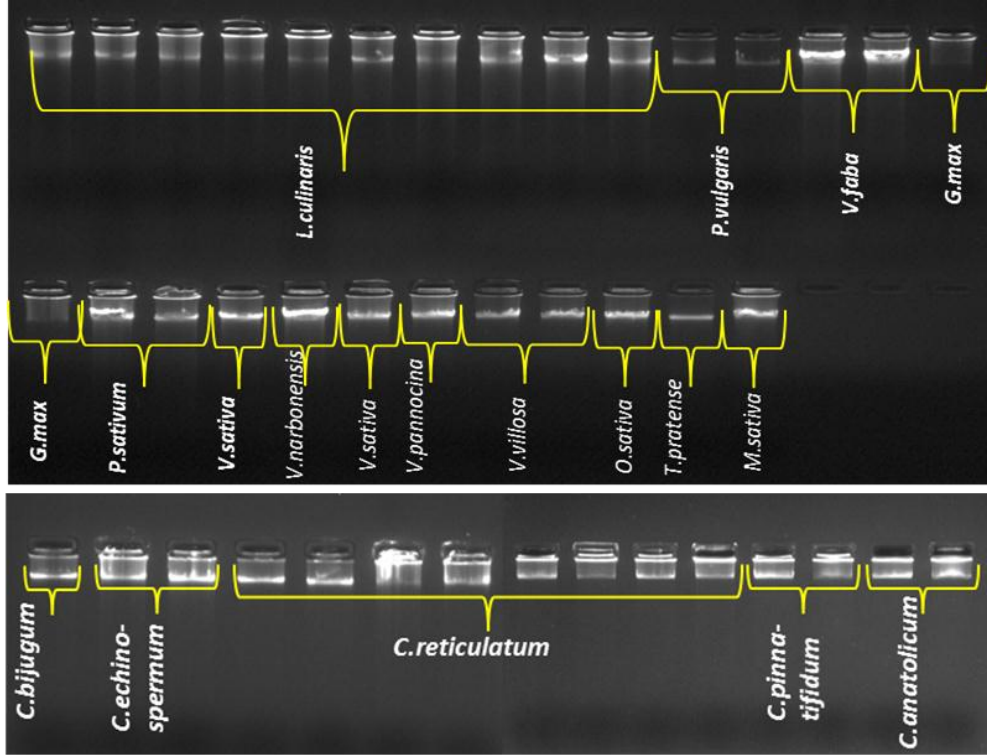
Geliştirilen her bir mercimek SSR lokusu için, beklenen heterozigotluk (H_e), gözlenen heterozigotluk (H_o) ve polimorfizm bilgi içeriği (PIC) hesaplanmıştır. Beklenen heterozigotluk ($H_e=1-\sum p_i^2$) (Nei, 1973), gözlenen heterozigotluk direkt sayımdan ve polimorfizm bilgi içeriği ($PIC=1-\sum p_i^2-\sum p_j^2$) (Botstein vd. 1980) PowerMarker v.3.25 (Liu ve Muse, 2005) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Diğer baklagil türlerinde test edilen ve temiz bant veren lokuslar içinde tür bazında aynı hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

3.BÖLÜM

BULGULAR

3.1. DNA İzolasyon Sonuçları

İzole edilen DNA'ların kalite kontrolleri %1'lik agaroz jelde görsel olarak (Şekil 3.1), spektrofotometrik ölçümleri ise, BioSpec-nano' da DNA saflığı (260/280-260/230) ve miktarı için BioSpec-nano' cihazında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır (Tablo 3.1). Agaroz jel ve spektrofotometre değerlerine bakıldığında DNA bütünlüğünün korunduğu, miktarlarının yeterli olduğu ve saflık sınırlarının ise olması gereken 1.81 – 2.1 değerleri arasında bulunduğu görülmektedir.



Şekil 3.1. Mercimek ve diğer baklagil çeşitlerine ait DNA izolasyonun %1'lik jel görüntüsü

Tablo 3.1. Mercimek ve diğer baklagil çeşitlerine ait DNA'ların miktar ve saflık değerlerinin üç tekrarlı ölçüm verileri

Çeşit Adı	ng/ul	260/ 230	260/ 280	Çeşit Adı	ng/ul	260/ 230	260/ 280
Tigris	856,68	2,08	2,02	Kansur	1156,44	1,86	2,04
	854,63	2,04	2,06		1141,45	1,87	2,01
	851,04	2,04	2,08		1123,59	1,88	2,01
Seyran-96	1924,17	1,85	2,12	Selçuklu-2002	1055,53	2,09	2,00
	1917,51	1,86	2,08		1028,42	2,07	2,07
	1883,75	1,86	2,07		1039,03	2,09	2,02
Altın toprak	1826,79	1,89	2,01	Seğmen-2002	1625,62	2,06	2,01
	1777,88	1,92	2,00		1624,38	2,06	2,08
	1775,43	1,95	2,03		1628,89	2,06	2,07
Yerli Kırmızı	835,53	1,82	2,03	Özerbey	1576,10	2,15	2,06
	837,09	1,83	2,01		1543,61	2,15	2,06
	835,23	1,83	2,00		1580,86	2,16	2,00
Kafkas	762,69	1,91	2,05	Dadaş Çayır Üçgülü	1464,57	2,06	1,98
	761,66	1,91	2,09		1492,42	2,07	1,97
	762,83	1,91	2,08		1455,27	2,06	1,98
Ankara yeşili	606,79	2,09	2,05	Sazova	1958,40	1,87	2,03
	610,67	2,02	2,08		1951,37	1,85	2,03
	615,51	2,01	2,09		1934,79	1,87	2,07
Ceren	2306,23	2,05	2,01	AWC-6	576,98	1,88	2,26
	2194,71	2,06	2,04		518,03	1,86	2,20
	2058,98	2,07	2,01		520,51	1,88	2,26
Erzurum-89	1708,48	2,07	2,01	AWC-306	1387,48	2,03	2,09
	1681,26	2,07	2,09		1365,19	2,09	2,06
	1666,54	2,07	2,09		1409,63	2,07	2,09
Emre-20	1044,51	1,88	1,94	AWC-307	880,73	2,06	2,00
	1048,79	1,86	1,94		899,29	2,05	2,04
	1043,81	1,84	1,93		952,26	2,05	2,04
Sazak-91	888,18	2,03	2,10	AWC-605	2250,50	1,93	2,07
	909,03	2,04	2,08		2204,53	1,89	2,07
	899,85	2,05	2,07		2201,05	1,87	2,07
Berrak	568,51	1,97	2,13	AWC-609	1031,31	1,95	2,09
	567,18	1,97	2,12		1057,61	1,97	2,02
	570,99	1,97	2,11		1042,80	1,97	2,03
4F-89 Fransız	1990,37	2,07	2,02	AWC-610	2045,67	1,90	2,37
	1965,21	2,06	2,03		2039,61	1,89	2,38
	1944,63	2,08	2,03		2030,60	1,88	2,37
Eresen-87	3887,75	1,87	1,85	AWC-613	794,28	2,14	2,02
	3881,41	1,92	1,86		768,15	2,14	2,01
	3886,78	1,84	1,83		769,11	2,14	2,02
Filiz-99	2389,97	2,05	2,03	AWC-614	1587,46	1,85	2,00
	2802,69	2,03	2,05		1554,48	1,83	2,08
	1904,84	2,10	2,00		1546,63	1,85	2,06

Nazlıcan	1490,82	1,82	2,07	Bari	488,56	2,09	2,02
	1478,32	1,82	2,08		491,13	2,13	2,06
	1467,34	1,81	2,00		485,26	2,11	2,05
Türksoy	1297,55	1,89	2,06	Cudi	972,73	1,90	2,08
	1293,36	1,92	2,06		918,18	1,91	2,06
	1286,30	1,88	2,06		925,67	1,91	2,05
13'lu genotip	2828,66	1,95	2,05	Kesen	451,11	2,02	2,09
	2865,14	1,93	2,05		454,71	2,02	2,02
	2845,54	1,98	2,05		435,16	2,02	2,00
14'lu genotip	3736,32	2,07	2,00	AWC-500	1184,64	2,01	2,04
	3666,05	2,06	2,04		1016,36	2,00	2,08
	3623,44	2,01	2,03		989,62	2,00	2,07
Yücel	2283,94	2,00	2,03	AWC-503	570,99	2,01	2,04
	2302,33	2,02	2,08		533,63	2,00	2,02
	2318,01	2,03	2,07		498,79	2,01	2,09
Tarman-2002	1788,70	1,81	2,05	K621	979,79	2,08	2,14
	1789,55	1,80	2,04		978,21	2,08	2,16
	1914,59	1,89	2,06		1001,36	2,09	2,17
Ankara Moru-08	1603,21	1,97	2,04	K630	1546,18	2,05	2,01
	1578,02	1,98	2,04		1554,49	2,03	2,08
	1571,39	1,98	2,04		1562,75	2,03	2,10

3.2 Mikrosatellitleri İçeren Pozitif Klonların Belirlenmesi

Tez çalışmasında Techen vd. (2010) tarafından geliştirilen metot kullanılarak toplam 250 adet kütüphane oluşturulmuştur. Tekrar motiflerini içeren klonları belirlemek için koloni PCR reaksiyonu (Bloor vd. (2001) ürünleri %2'lik jelde kontrol edilmiş ve iki veya daha fazla bant içeren klonların mikrosatellit içeren pozitif klonlar olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2). PCR reaksiyon sonucunda taranan 250 kütüphanenin 37 adedinin SSR içerdiği belirlenmiştir. Bu 37 adet SSR içeren kütüphane sekanslandığında ise, 4'ünün duplike olduğu görülmüş ve diziler çıkartılarak geri kalan 33 dizi için primerler dizayn edilmiştir. SSR motifi içeren dizi analizi sonuçlarına ait örnek görüntü Şekil 3.3'de sunulmuştur.

3.3. Mikrosatellit Motiflerinin Karakterizasyonu

Hizalama analizleri sonrası BioEdit (Hall, 1997), programı ile primer dizayn edilebilir olan 33 dizinin toplamda 120 adet SSR motifi içerdiği belirlenmiştir. Mikrosatellit tekrarlarının çoğunlukla dinükleotit tekrarı içerdiği, trinükleotitlerin azınlıkta olduğu ve genellikle mükemmel olmayan tekrarların içinde yer aldığı görülmüştür. Tetranükleotit tekrarları ise sayıca az olmakla birlikte, genellikle iki veya 3 tekrar içerdiğinden dolayı primer sentezi için kullanılmamıştır. Az sayıda trinükleotit ve tetranükleotit tekrarına rastlanmasında kullanılan metot ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Zira metodun geliştirildiği yayında bu durum vurgulanmış (Techen vd. 2010), bu metot kullanılarak daha çok dinükleotit tekrarlarının izole edilebileceği bildirilmiştir. SSR primeri dizayn edilebilir olarak değerlendirilen 33 dizide belirlenen 120 SSR motifi tekrarı için 33 SSR markörü dizayn edilmiştir (Tablo 3.3). Dizilerdeki her bir tekrar bölgesi için ayrı ayrı primer dizaynı yapılması, sentezlenen primerlerin haritalama çalışmalarında aynı bölgeye bağlanması açısından anlamsız olacağı için tercih edilmemiştir. Geliştirilen 33 SSR marköründen %78.8'i mükemmel olmayan tekrarları, % 15.2'si dinükleotit mükemmel tekrarlarını, % 6'i ise birleşik tekrarları içermektedir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Dizi analizi sonrası belirlenen mikrosatellit tekrarları

Mikrosatellit çeşidi	Mikrosatelit tekrar motifi	Adet	Toplam
Dinükleotit mükemmel tekrarı	TG/AC	0/1	1
	GA/CT	2/0	2
	AG/TC	1/1	2
	GT/CA	0/0	0
Trinükleotit	-	-	-
Tetranükleotit	-	-	-
Pentanükleotit	-	-	-
Birleşik tekrarlar	(CT) ₅ CG(CT) ₃	2	2
Mükemmel olmayan tekrarlar	-	26	26
Toplam		33	33

Tablo 3.3. Geliştirilen mercimek SSR markörleri ve bu markörlere ait bilgiler

Lokus Adı	5' →3'	Tekrar	Klon	Bç	Tm (°C)
Lc_MCu68F	TGTAGTGGTGAAATGAAGCA	(AT) ₄ .(GA) ₉ .(GA) ₃ .(GA) ₄ .(TG) ₃ imperf	P6_5B	359	58
Lc_MCu68R	TCATCACTGACAAGTCACTACC				
Lc_MCu69F	GAGCGTGAATGAGAGAGAGA	(GA) ₃ .(GA) ₃ .(GA) ₃ .(GA) ₄ .(GA) ₆ imperf	P6-5H	197	55
Lc_MCu69R	CGGTCGTTTCATTCTAAAAG				
Lc_MCu70F	AGTTGGAAACCCTGATTTG	(GA) ₉ .(TA) ₃ imperf	P6-9C	176	55
Lc_MCu70R	GCCAAC TAGTCCATTTCGTTA				
Lc_MCu71F	CTCTCTAACACTATCACGCTCA	(TC) ₄ .(TC) ₃ .(CT) ₅ .(TC) ₃ .(TC) ₃ .(TC) ₃ imperf	P6-11C	282	60
Lc_MCu71R	GAAGGAGTAGACAGGGAGAAG				
Lc_MCu72F	AAGAACAGAGCAATGGAAGA	(AG) ₄ .(AG) ₃ .(AG) ₄ .(AG) ₃ .(AG) ₃ imperf	P6-11G	207	-
Lc_MCu72R	AAGACAAATGTTGCCTCCTA				
Lc_MCu73F	TGGGACTTGAGAGAAGATTG	(GA) ₃ 4T(GA) ₃ G4T(GA) ₃ .(GTAT) ₃ G3A(GT) ₃ .(GT) ₃ .(GT) ₃ imperf	P6-12A	209	58
Lc_MCu73R	GTCTCTCTCCCTCCTCATT				

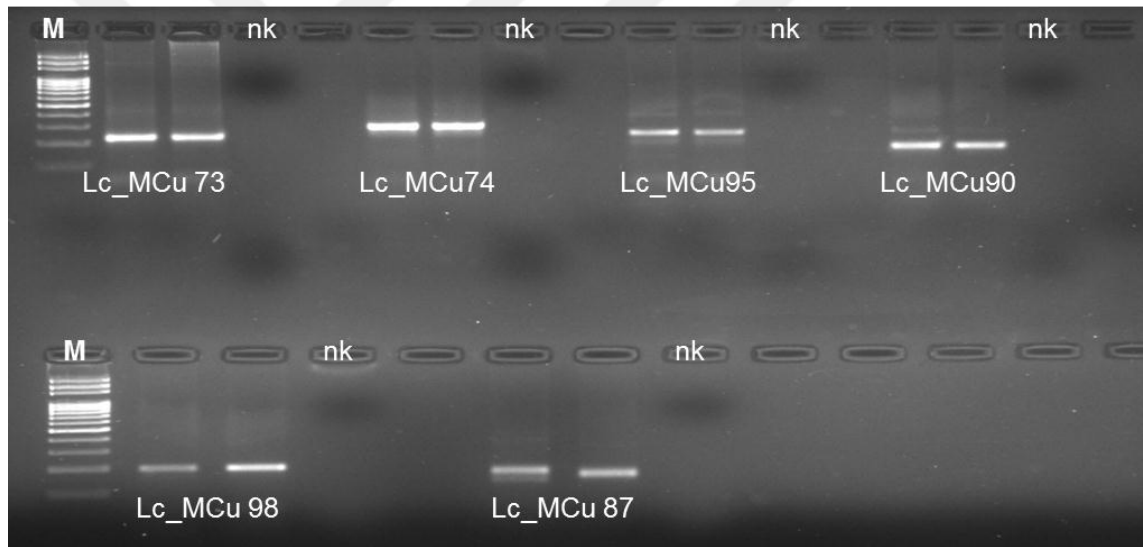
Lc_MCu74F	GTGGAAAACCCTAATTCCTT	(CT) ₆ .(CT) ₄ .(TC) ₃ .(CT) ₃ .(CT) ₃ .(TC) ₅ imperf	P6-12C	283	55
Lc_MCu74R	AGTTGCCGGAGAGAGAAT				
Lc_MCu75F	TCACGTCTTCTAGGAAGTCTCT	(CCG) ₃ ... (TC) ₃ ... (TC) ₂ T(TC) ₃ imperf	P8-1D	296	55
Lc_MCu75R	ATTGAGGATCCTGAGGTTG				
Lc_MCu76F	TCAACTTCTTCTCCCTACCA	(CT) ₁₇ (AC) ₇ .(TC) ₃ .(CTT) ₃ imperf	P8-3E	175	-
Lc_MCu76R	CTACAAAGTTCCCAAGGTCA				
Lc_MCu77F	GATGAGAGAGGGAGAATGAGT	(GA) ₃ TA(GA) ₂ .(GA) ₃ ..(GA) ₄ imperf	P8-5D	270	55
Lc_MCu77R	CCAAACCCAGTTCACACATA				
Lc_MCu78F	GGTTGGGTGACAGTGAGA	(GA) ₅ .(GA) ₃ ..(GA) ₃ ..(GA) ₃ ..(GA) ₄ ..(GA) ₅ imperf	P8-5E	195	50
Lc_MCu78R	AACGAAGGAGTCCCAAAC				
Lc_MCu79 F	AGGTGGATTCATGTATGCTT	(GA) ₃ ..(GA) ₆ ..(GA) ₄ ..(GA) ₃ ..(GA) ₅ ..(GA) ₃ imperf	P8-6D	296	55
Lc_MCu79R	CATACACGGAAGAGGAAAAA				
Lc_MCu80F	GGAATCTAACTGCAAAATCG	(AC) ₁₂ perf	P8-8A	368	58
Lc_MCu80R	CACGTAAAGATGACTTTCTCAC				
Lc_MCu81F	CCTTTTCAAGATAGGGAAT	(GA) ₁₇ pref	P8-8F	245	52
Lc_MCu81R	TTGGAACATCTTGTTTCATCA				
Lc_MCu82F	ACACGTACAGCACAAACTCA	(TA) ₃ ..(CT) ₃ ..(CT) ₄ ..(CT) ₃ ..(CT) ₃ ..(CA) ₃ ..(CT) ₃ ..(CT) ₄ ..(CA) ₄ imperf	P8-9F	387	-
Lc_MCu82R	AGTTGTATGGGTGGAGAATG				
Lc_MCu83F	ATCCTAAGCAAAGAATGACG	(GA) ₄ ..(GA) ₃ ..(GA) ₄ ..(GA) ₃ ..(GA) ₆ imperf	P9-1C	388	55
Lc_MCu83R	AAGGAGTCCACATACAAAACC				
Lc_MCu84F	ATCGTGTTTGCGCGTGAAT	(GA) ₅ ..(GA) ₃ ..(GA) ₃ ..(GA) ₃ ..(GA) ₄ ..(GA) ₆ imperf	P9-3G	248	52
Lc_MCu84R	ACAACAAAGGGTGGAAAAC				
Lc_MCu85F	CAGTCGTTTCATTCTCTTCC	(CT) ₄ ..(CT) ₃ ..(TC) ₃ ..(CT) ₃ CA(TC) ₃ imperf	P9-6A	249	55
Lc_MCu85R	GAGTACGGAACCGGAGAT				
Lc_MCu86F	GTTGCTTACCATCCACATTT	(GA) ₃ ..(GA) ₆ ..(GA) ₄ ..(GA) ₃ ..(GA) ₂₀ imperf	P9-8F	283	58
Lc_MCu86R	GGAGTCTCTTAAACGCTCTCT				
Lc_MCu87F	ACCCCTTTAGGGAATTACAC	(TC) ₁₈ perf	P9-9D	155	53
Lc_MCu87R	AGGAGTCTTTTGTGCAAAT				
Lc_MCu88F	GCTGTATCACTAACTGTGATGT	(TTC) ₄ ... (GA) ₁₀ imperf	P9-11E	292	55

Lc_MCu88R	GGCTCCTTTGTAGAAGAAAGA				
Lc_MCu89F	CCATGGACCTTCCACTTAG	(TC) _{5..} (TC) ₆ A(TC) _{3..} (TC) ₃ imperf	P9-12C	151	55
Lc_MCu89R	CAAGGTGCGATTGAGTTTAT				
Lc_MCu90F	AGGCTTTGACATATGGTAGG	(GA) _{4..} (AG) _{6..} (AG) _{4..} (AG) _{3..} (AG) _{3..} (AG) ₃ imperf	P9-12D	154	58
Lc_MCu90R	TAATGCACACACGTACTGCT				
Lc_MCu91F	AAAATGATGCTTGGTTTTGT	(GA) ₄ A(AG) ₃ AT(AG) _{3..} (GA) _{3..} (GT) ₃ imperf	P10-1G	202	58
Lc_MCu91R	CCACAACCCCTAACATAC				
Lc_MCu92F	TGTGGGAGATTTCCAAGAC	(TA) _{3..} (CTAT) ₂ (CT) _{8..} (AAG) ₃ imperf	P10-2D	294	58
Lc_MCu92R	AGAGCAACGAAGGAGTACAA				
Lc_MCu93F	CTTATAAACTTGGTGCCTCTC	(AT) _{3..} (CT) _{4..} (CT) ₃ imperf	P10-2H	240	50
Lc_MCu93R	GGAGAGCTAATAAACCTCTCT				
Lc_MCu94F	CGCCACTGTAATTTTTCTTC	(CT) _{3..} (AG) ₂ A(AG) _{3..} (AG) ₆ imperf	P10-3A	189	58
Lc_MCu94R	CTCACCTCGCTTTCTCTTAC				
Lc_MCu95F	CCTTCACTCTACTCTCTCGTTC	(CT) ₅ CG(CT) ₃ comp	P10-4C	233	55
Lc_MCu95R	CTTTCATTCACTCGTTCCTC				
Lc_MCu96 F	GGAGTTTGAGAACTTGATGA	(GA) ₃ ATT(GA) _{3...} (GA) _{9...} (AT) ₃ imperf	P10-5E	260	55
Lc_MCu96R	TTCCTTCACATTTCAAGAACC				
Lc_MCu97 F	CTACTCTCTCGTTCAGATCCTC	(CT) ₅ CG(CT) ₃ comp	P10-6A	248	55
Lc_MCu97R	ATCCATAAGAGCCCGTATTT				
Lc_MCu98 F	GAGAGATCATGTTTGGGAGA	(GA) _{3...} (AG) _{3...} (AG) _{4...} (AG) ₅ imperf	P10-6G	181	55
Lc_MCu98R	CGGTCGTTTCATTCTAAAAG				
Lc_MCu99 F	CATCGAAAGAGGAAGACAAG	(AG) ₁₉ perf	P10-7B	196	55
Lc_MCu99R	TTCCTTTACCACTGCCTCT				
Lc_MCu100F	CTTTTCTCAAGATGCCAAAC	(GA) ₈ perf	P10-7E	158	55
Lc_MCu100R	GCAACGAAGGAGTACTTTTG				

* Lc: *Lens culinaris*, MCu: Melike Bakır (Cu), *perf*: perfect (mükemmel tekrarlar), *imperf*: (imperfect) mükemmel olmayan tekrarlar, *comp*:(compound) birleşik tekrarlar, Bç: Bant büyüklüğü

3.4. Yeni Geliştirilen Mercimek SSR Markörlerinin Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Geliştirilen yeni SSR markörleri, uygun primer bağlanma sıcaklığının (annealing) belirlenmesi için 2 adet mercimek çeşidinde (Tigris, Seyran-96) PCR reaksiyon koşulları kullanılarak optimize edilmiştir (Tablo 2.4.). Optimize edilen primerler Tablo 2.1'de verilen tescilli mercimek çeşitlerinde ve diğer baklagillerde test edilmiştir. Optimizasyonu sağlanan primerlerin PCR koşulları (Tablo 2.5) kullanılarak PCR yapılmış ve %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil-3.4). Jel görüntüsü değerlendirilerek amplifikasyon aralığı 100-500 bp dışında olanlar ve fazla bant verenler iptal edilmiştir.



Şekil 3.4. Mercimekte primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonlarına ait örnek agaroz jel görüntüsü (%2), M: 100bp ladder, nk: Negatif kontrol

Belirlenen tekrar bölgelerine yönelik geliştirilen 33 adet SSR markörüne ait dizi bilgileri, tekrar motifi bilgileri, klon/hücre bilgileri, bant büyüklüğü bilgileri, bağlanma sıcaklığı bilgileri Tablo 3.2.'de verilmiştir. Her bir markör için en uygun bağlanma sıcaklığı farklı bağlanma sıcaklıkları denenerek belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında Lc_MCu72, Lc_MCu76, Lc_MCu82 isimli lokusları için amplifikasyon sağlanamazken, Lc_MCu71, Lc_MCu78, Lc_MCu92, Lc_MCu93, Lc_MCu99 ve Lc_MCu100 lokusları çok sayıda nonspesifik bant oluşturduğu belirlenmiştir.

3.5. Yeni Geliştirilen Mercimek SSR Markörlerin Mercimekte Polimorfizm Oranının Belirlenmesi

Her bir primer için bant büyüklükleri göz önünde bulundurularak, gruplar oluşturulmuş ve gruptaki her bir primer için farklı floresan boya ile (FAM (Mavi), ROX (Kırmızı), HEX (Yeşil)) işaretlenmiş M13 primeri (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') kullanılmıştır. İşaretli primerler ile Tablo 5'teki koşullar ile elde edilen PCR ürünleri, ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sisteminde görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Lc_MCu70 (FAM-mavi), Lc_MCu81 (ROX-kırmızı) ve Lc_MCu88 (HEX-yeşil) primerlerine ait kapilleri elektroforez örnek pik görüntüleri (GeneMapper (version 5.0) software)

Geliştirilen 33 SSR marköründen amplifiye olmayanlar ve çok sayıda bant verenler çıkartılmış ve kalan 24 markör, polimorfizm oranlarının ve genetik analizlerde kullanılabilirliğinin belirlenmesi için 10 mercimek çeşidinde test edilmiştir. Her bir SSR lokusu için, allel sayısı (n), beklenen heterozigotluk (H_e), gözlenen heterozigotluk (H_o), polimorfizm bilgi içeriği (PIC) belirlenmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. SSR lokuslarına ait genetik parametreler (allel sayısı (n), beklenen (He) ve gözlenen (Ho) heterozigotluk, lokusların tanımlama olasılığı (PIC: probability of identity)

Lokus	n	He	Ho	PIC
Lc_MCu68	4	0.740	1.000	0.69
Lc_MCu69	2	0.320	0.200	0.26
Lc_MCu70	6	0.710	0.900	0.67
Lc_MCu74	2	0.255	0.300	0.22
Lc_MCu79	7	0.805	0.600	0.77
Lc_MCu80	3	0.460	1.000	0.41
Lc_MCu81	5	0.715	0.300	0.66
Lc_MCu83	2	0.420	0.200	0.33
Lc_MCu84	3	0.395	0.200	0.34
Lc_MCu85	3	0.565	0.700	0.48
Lc_MCu86	3	0.460	1.000	0.41
Lc_MCu87	8	0.820	0.500	0.79
Lc_MCu88	2	0.500	1.000	0.37
Lc_MCu90	2	0.095	0.100	0.09
Lc_MCu94	3	0.645	0.700	0.57
Lc_MCu98	2	0.320	0.200	0.26
Toplam	57	8.225	5.900	7.38
Ortalama	3.56	0.541	0.363	0.46

*Analizler sonrası monomorfik olduğu tespit edilen markörler için genetik parametre değeri girilmemiştir.

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, Lc_MCu68, Lc_MCu69, Lc_MCu70, Lc_MCu74, Lc_MCu79, Lc_MCu80, Lc_MCu81, Lc_MCu83, Lc_MCu84, Lc_MCu85, Lc_MCu86, Lc_MCu87, Lc_MCu88, Lc_MCu90, Lc_MCu94, Lc_MCu98 lokusları polimorfik bulunurken, Lc_MCu73, Lc_MCu75, Lc_MCu77, Lc_MCu89, Lc_MCu91, Lc_MCu95, Lc_MCu96, Lc_MCu97 lokuslarının ise monomorfik olduğu tespit edilmiştir.

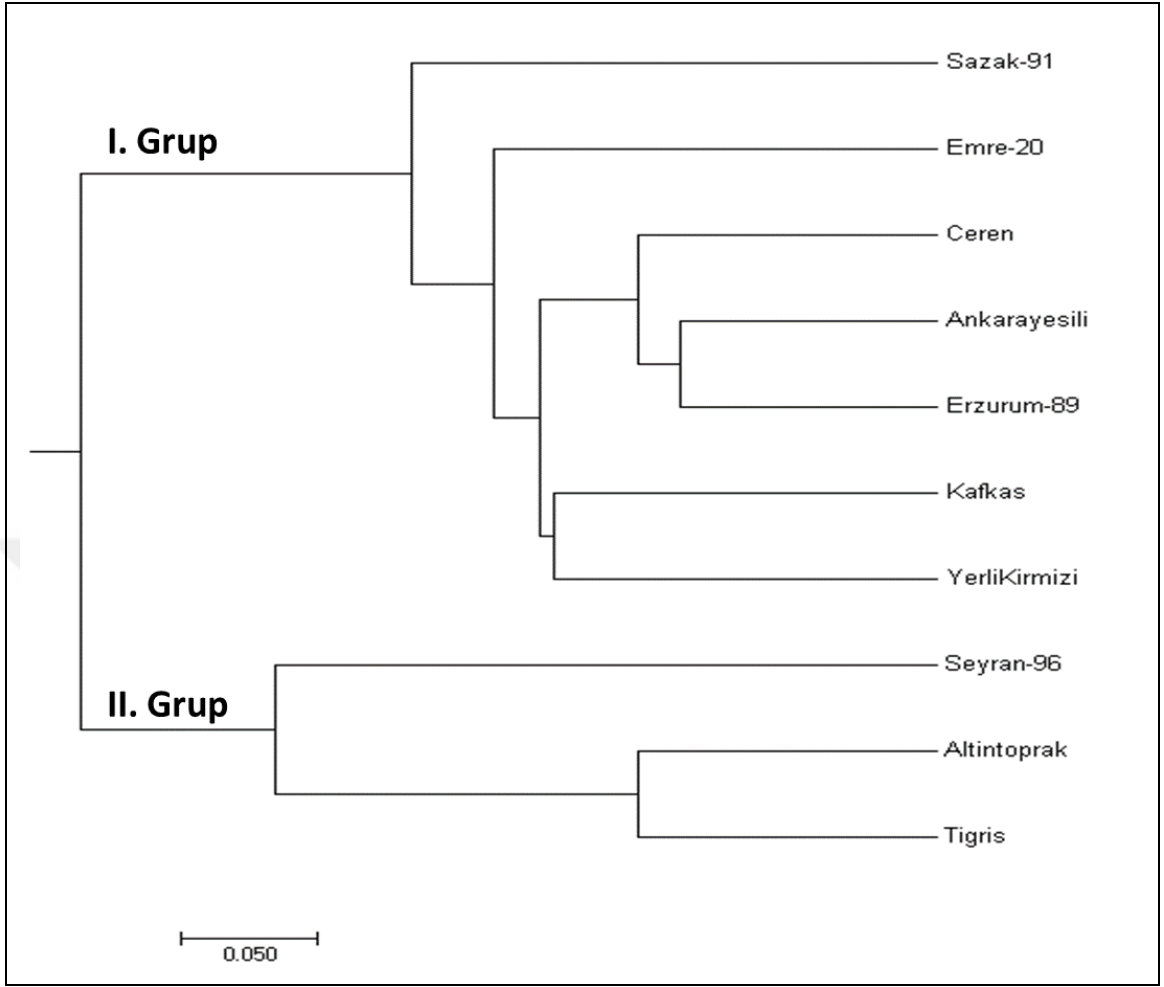
Geliştirilen 33 mercimek SSR lokusundan 16'si (%48.5) polimorfik, 8'i (%24.2) monomorfik, 6'si (%18.2) çok sayıda bant vermiş, ve 3'ü (%9) ise amplifiye olmamıştır. Polimorfik olarak tespit edilen 16 primer, 10 çeşitte toplamda 57 allel üretilmiş ve lokus başına düşen allel sayısının 2 ile 8 arasında ve ortalama 3.56 olduğu görülmüştür. En fazla allel sayısına sahip olan primer 8 allel ile Lc_MCu87 olmuştur. Bu primeri, 7 allel ile Lc_MCu79 primeri takip etmiştir. Polimorfik olduğu tespit edilen 16 adet primerin, beklenen heterozigotluk oranının 0.095 (Lc_MCu90) ile 0.820 (Lc_MCu87) arasında değiştiği ve ortalama 0.541 olduğu, gözlenen heterozigotluk değerinin 0.100 (Lc_MCu90) ile 1.000 (birden fazla markör) arasında değiştiği ve

ortalama 0.363 olduğu tespit edilmiştir. Polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerinin ise, 0.09 (Lc_MCu90) ile 0.79 (Lc_MCu87) arasında değiştiği ve ortalama 0.46 olduğu tespit edilmiştir.

3.6. Yeni Geliştirilen Mercimek SSR Markörlerin Mercimek Çesitlerinde Genetik ilişkilerin Analizi

Yeni geliştirilen primerler ile oluşturulan dendrogram incelendiğinde, dendrogramın iki farklı gruba ayrıldığı görülmektedir (Şekil 3.6). Birinci grupta Sazak-91, Emre-20, Ceren, Ankara Yeşili, Erzurum-89, Kafkas, Yerli Kırmızı, ikinci grubu Seyran-96, Altın toprak, Tigris çeşitlerinin yer aldığı görülmüştür. Birinci grup kendi içinde Sakaz-91 çeşidi bir gruba, Emre-20, Ceren, Ankara Yesili, Erzurum-89, Kafkas, Yerli Kırmızı çeşitleride diğer bir gruba ayrılmıştır. İkinci grubu kendi içinde Seyran-96 çeşidi gruba, Altın toprak, Tigris çeşitleride diğer bir gruba ayrılmıştır.

Test edilen mercimek çeşitlerin genetik açıdan en yakın çeşitler Ankara Yeşili ile Erzurum-89 (% 80), ve Tigris ile Altın Toprak (% 80) olduğu Sazak-91 ile Altın Toprak (% 24) çeşitlerin genetik benzerlik açısından en uzak olduğu saptanmıştır.



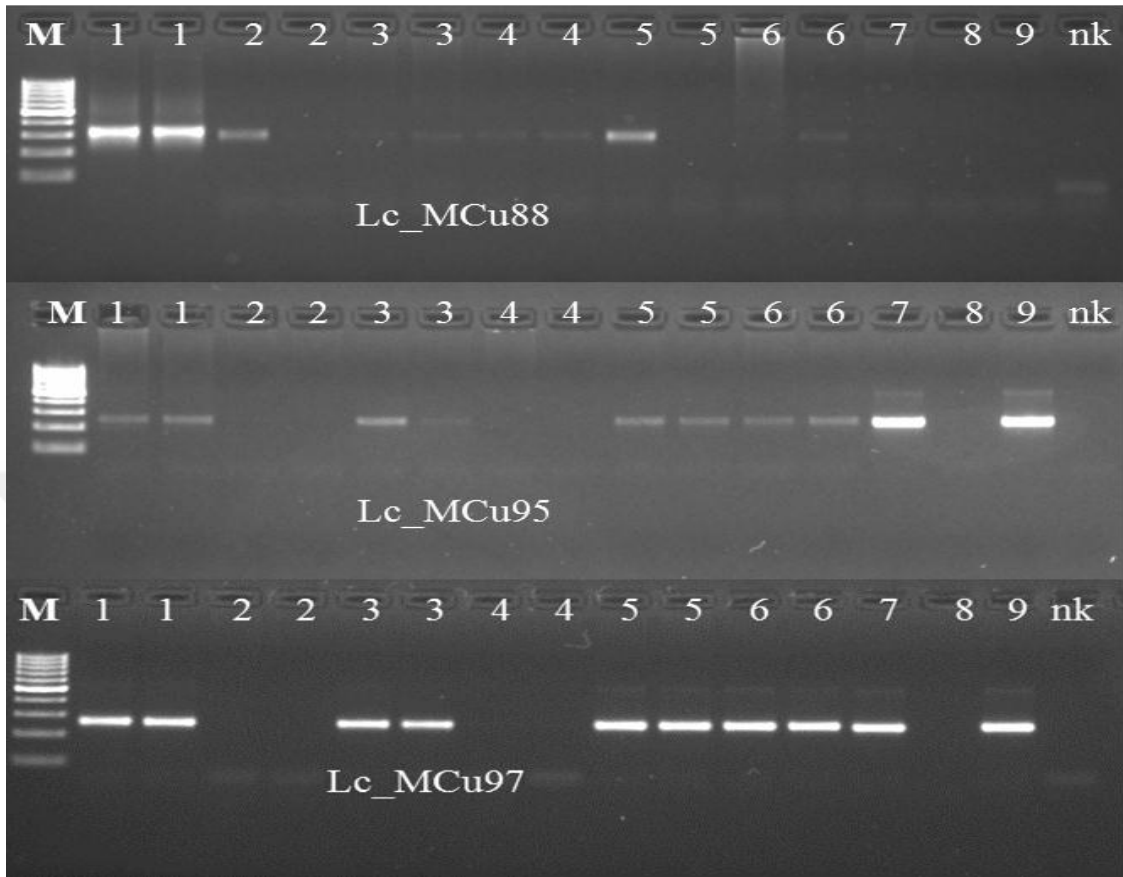
Şekil 3.6. Yeni geliştirilen SSR primerleri ile 10 mercimek çeşidinde, genetik benzerlik matrisinden UPGMA kullanılarak oluşturulan genetik benzerlik dendogramı

Tablo 3.5. Mercimek genotipleri arasındaki genetik benzerlik oranları

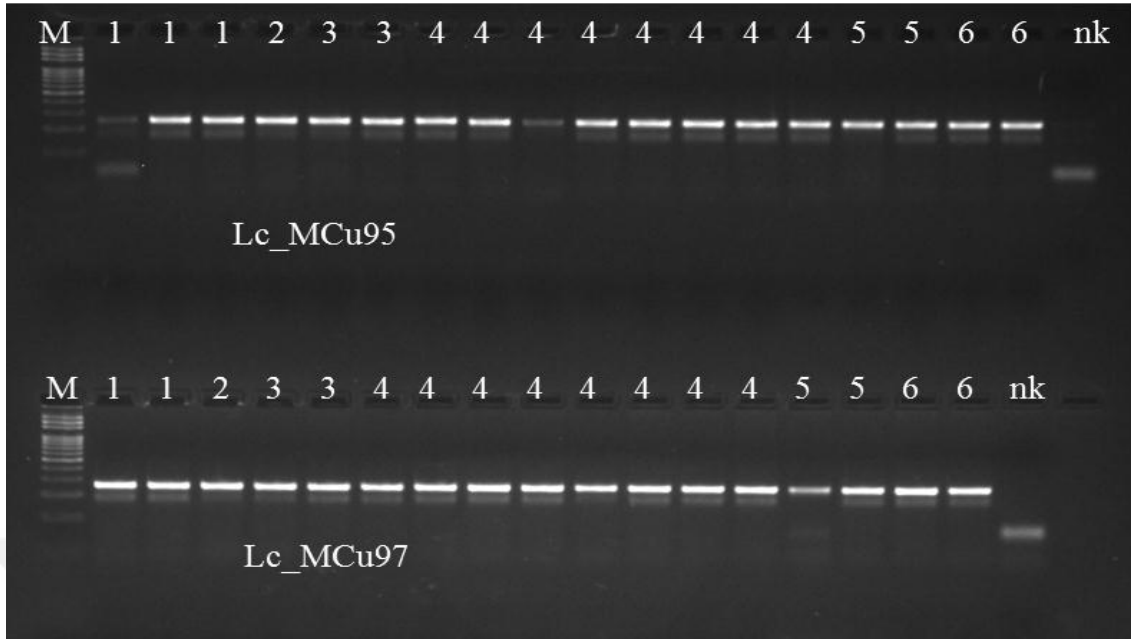
Mercimek Genotipleri	Altın Toprak	Ankara Yeşili	Ceren	Emre -20	Erzurum -89	Kafkas	Sazak -91	Seyran -96	Tigris	Yerli Kırmızı
Altın Toprak	1									
AnkaraYeşili	0.40	1								
Ceren	0.37	0.76	1							
Emre-20	0.40	0.67	0.67	1						
Erzurum-89	0.40	0.80	0.77	0.64	1					
Kafkas	0.44	0.77	0.67	0.67	0.67	1				
Sazak-91	0.24	0.64	0.50	0.54	0.64	0.60	1			
Seyran-96	0.47	0.30	0.40	0.44	0.40	0.40	0.27	1		
Tigris	0.80	0.44	0.37	0.37	0.47	0.47	0.34	0.54	1	
Yerli Kırmızı	0.34	0.74	0.67	0.64	0.64	0.70	0.64	0.30	0.37	1

3.7. Mercimek SSR Markörlerinin Diğer Baklagil Türlerine Transfer Edilebilirliği

Yakın türler arasında gen içeriği ve sırasının önemli ölçüde korunduğu karşılaştırmalı genomik çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Tür/cinsler arasında var olan yeterli homoloji sayesinde, bir türde geliştirilen markörler yakın tür/cinslerde ortak SSR'ların tespitinde kullanılabilir (Kalia vd. 2011; Verma vd. 2014). Geliştirilen 33 adet SSR lokusu Tablo 2.1.'de verilen yemlik ve yemeklik diğer baklagil türlerine transfer edilebilirliği test edilmiştir (Şekil 3.7, 3.8). Amplifiye olan markörler türlere göre değişiklik göstermiştir (Tablo 3.6a, 3.6b, 3.6c). Test edilen 33 mercimek SSR markörü en yüksek transfer edilebilme oranı %49.5 (15 adet) ile *Vicia* türlerinde görülmüştür. *Vicia* türlerinin kendi içinde transfer edilebilme oranları ise, sırasıyla, *V. sativa* için %33.3 (11 adet), *V. pannocina* ile *V. villosa* (10 adet) için %30.3 ve *V. faba* ile *V. narbonensis* için %29.7 (9 adet) olarak bulunmuştur. Amplifiye olan markörlerin % 26'sı tüm *Vicia* türlerinde çalışmıştır. İkinci en yüksek transfer edilebilme oranı % 30.3 (10 adet) ile *Cicer* türlerinde görülmüştür. Türler arasında ise transfer edilebilme oranı *C. anatolicum* için %18.1 (6 adet), *C. reticulatum*, *C. bijugum* ve *C. pinnatifidum* için % 15.1 (5 adet) *C. echinospermum* için % 9 (3 adet) olarak bulunmuştur. Amplifiye olan markörlerin % 20'si tüm *Cicer* türlerinde çalışmıştır. Diğer türlerde ise sırası ile, *P. sativum* için %30.3 (10 adet), *O. sativa* için %21.2 (7 adet), *M. sativa* için %18.1 (6 adet), *G. max* için %15 (5 adet), *T. pratense* ve *P. vulgaris* için ise %3 (1 adet) olarak belirlenmiştir. Aynı cins içerisinde yer alan türlerde amplifiye olan markörler incelendiğinde, bu markörlerin %80-85 oranında aynı olduğu görülmüştür. Lc_MCu 95 ve Lc_MCu97 markörlerinin türlerin %98'inde amplifiye olduğu görülmüştür.



Şekil 3.7. Diğer türlere transfer edilebilirliğine ait %2 'lik örnek jel görüntüleri, Primer: Lc_MCu97, 1: *L.culinaris* (pozitif kontrol), 2: *Phaseolus vulgaris*, 3: *Vicia faba* 4: *Glycine max*, 5: *Pisum sativum*, 6: *Vicia sativa*, 7: *Onobrychis sativa* L., 8: *Trifolium pratense* L., 9: *Medicago sativa* L, nk: Negatif kontrol, M: 100bp ladder



Şekil 3.8. Diğer türlerde primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonlarına ait %2 'lik jel optimizasyon görüntüleri, 1: *L. culinaris* (pozitif kontrol), 2: *C. bijigum*, 3: *C. echinospermum*, 4: *C. reticulatum*, 5: *C. pinnatifidum*, 6: *C. anatolicum*, nk: negatif kontrol M: 100bp ladder

<i>Pisum sativum</i>			<i>Vicia faba</i>			<i>Glycine max</i>			<i>Phaseolus vulgaris</i>		
Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp
Lc_MCu69	50	262-290	Lc_MCu68	52	359	Lc_MCu68	52	359	Lc_MCu88	55	292
Lc_MCu75	50	241-245	Lc_MCu74	50	283	Lc_MCu74	50	283			
Lc_MCu78	50	195	Lc_MCu75	50	249	Lc_MCu78	50	278			
Lc_MCu80	55	378	Lc_MCu77	55	270	Lc_MCu88	55	292			
Lc_MCu83	55	388	Lc_MCu83	55	388	Lc_MCu92	55	294			
Lc_MCu85	55	225	Lc_MCu88	55	292						
Lc_MCu88	55	292	Lc_MCu90	55	154						
Lc_MCu91	58	201	Lc_MCu95	55	249						
Lc_MCu95	55	249	Lc_MCu97	55	264						
Lc_MCu97	55	264									
<i>Onobrychis sativa L.</i>			<i>Medicago sativa L.</i>			<i>Trifolium pratense</i>					
Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp			
Lc_MCu69	50	249	Lc_MCu73	55	209	Lc_MCu74	55	283			
Lc_MCu74	50	283	Lc_MCu78	50	195						
Lc_MCu75	50	296	Lc_MCu83	55	388						
Lc_MCu78	50	195	Lc_MCu92	55	294						
Lc_MCu91	58	202	Lc_MCu95	55	245						
Lc_MCu95	55	241	Lc_MCu97	55	260						
Lc_MCu97	55	248									

Tablo 3.6.a. Diğer baklagillerde amplifiye olan markörlere ait bilgiler

<i>Vicia sativa</i>			<i>Vicia narbonensis</i>			<i>Vicia pannocina</i>			<i>Vicia villosa</i>		
Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp
Lc_MCu71	55	282	Lc_MCu71	55	282	Lc_MCu71	55	282	Lc_MCu71	55	282
Lc_MCu73	55	209	Lc_MCu73	55	209	Lc_MCu73	55	209	Lc_MCu73	55	209
Lc_MCu74	50	283	Lc_MCu75	50	249	Lc_MCu75	50	296	Lc_MCu75	50	249
Lc_MCu75	50	249	Lc_MCu78	50	195	Lc_MCu78	50	195	Lc_MCu78	50	195
Lc_MCu78	50	188-226	Lc_MCu83	55	388	Lc_MCu80	55	364	Lc_MCu80	55	362-364
Lc_MCu80	55	362	Lc_MCu85	55	249	Lc_MCu83	55	325	Lc_MCu83	55	385
Lc_MCu83	55	335	Lc_MCu95	55	249	Lc_MCu85	55	249	Lc_MCu85	55	249
Lc_MCu85	55	249	Lc_MCu97	55	264	Lc_MCu95	55	249	Lc_MCu90	55	206
Lc_MCu88	55	292				Lc_MCu97	55	264	Lc_MCu95	55	249
Lc_MCu95	55	249				Lc_MCu98	55	197	Lc_MCu97	55	264
Lc_MCu97	55	264									

Tablo 3.6.b. Diğer baklagillerde amplifiye olan markörlere ait bilgiler

<i>C.bijugum</i>			<i>C.echinosperrum</i>			<i>C.reticulatum</i>			<i>C.pinnatifidum</i>			<i>C.anatolicum</i>		
Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp	Lokus Adı	Tm	bp
Lc_MCu69	55	197	Lc_MCu78	50	195	Lc_MCu69	55	211	Lc_MCu69	55	197	Lc_MCu73	58	209
Lc_MCu74	55	283	Lc_MCu95	55	249	Lc_MCu78	50	195	Lc_MCu74	55	298	Lc_MCu74	55	283
Lc_MCu95	55	249	Lc_MCu97	55	264	Lc_MCu83	55	388	Lc_MCu95	55	249	Lc_MCu79	55	296
Lc_MCu97	55	264				Lc_MCu95	55	249	Lc_MCu97	55	264	Lc_MCu95	55	249
Lc_MCu98	55	181				Lc_MCu97	55	264	Lc_MCu98	55	197	Lc_MCu96	55	260
												Lc_MCu97	55	264

Tablo 3.6.c. Diğer baklagillerde amplifiye olan markörlere ait bilgiler

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1.Yeni Geliştirilen Mercimek SSR Markörlerinin Genomik Kütüphanelerden Geliştirilen Diğer SSR Markörleri ile Karşılaştırılması

Mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) AG ve AC tekrarları birlikte kullanılarak zenginleştirilen genomik kütüphanelerden elde edilen 250 klonun, 37 adedinin (%14.8) tekrar içerdiği tespit edilmiştir. Tekrar içeren bu klonların dizi analizi sonuçları incelendiğinde, dizilerin 120 adet SSR motifi içerdiği ve %89'unun primer dizayn edilebilir olduğu tespit edilmiştir. Bakır ve Kahraman (2019), aynı tekrarlar ile zenginleştirilerek oluşturulan 350 adet kütüphaneyi koloni PCR ile taramış ve 68 adedinin (%19.1) tekrar içerdiğini tespit etmişlerdir. Tekrar içeren bu klonların dizi analizi sonuçları incelendiğinde, dizilerin 53 adet (%79.1) dizinin 134 adet SSR motifi içerdiği ve primer dizayn edilebilir olduğu tespit edilmiştir. Hamwieh vd. (2009), tarafından mercimek çeşidini olan ILL5588'i kullanarak yürüttükleri çalışmada, 200,000 klonu GT, GA, GC, GAA, TA, TAA tekrar motifleri ile taradıklarını ve 371 (%0.18) klonun mikrosatellit bulunduğu ve bunlardan 243 (%65.4) klonun sekanslanabilir olduğunu belirtmişlerdir. Dizi analizleri yapılan 243 klonun 173 adedinin (%71.2) SSR motifi içerdiğini belirtmişlerdir. Verma vd. (2014), tarafından Precoz mercimek çeşidini kullanarak, GA/CT tekrar motifleri ile zenginleştirilmiş genomik DNA kütüphanelerinden 514 adet klonu sekansladıkları ve bunların 375 adedinin (%72.9)'unun 3 yada daha fazla SSR motifi içerdiğini belirtmişlerdir. SSR motiflerini içeren 144 adedinin (%55.1) primer dizayn edebildiklerini belirtmişlerdir.

Andeden vd. (2015), mercimek çeşidini olan Karacadağ'ı kullanarak, CA, GA, AAC ve ATG tekrar motifleri ile zenginleştirilmiş genomik DNA kütüphanelerinden 432 klon oluşturmuşlardır. Oluşturulan kütüphanelerden, 360'ında (%83.3) SSR motiflerine elde etmişler ve 301 adedi (%83.6) için SSR primeri dizayn etmişlerdir. Mercimekte

genomik SSR markörlerini geliştirme amaçlı yapılan bu çalışmalarda elde edilen veriler, yapılan bu çalışma ile karşılaştırıldığında; Hamwieh vd. (2009)'un çalışmasında kullandığı yöntemde zenginleştirilmiş kütüphane metodunu yer almamaktadır ve taranan klonlardan %0.18'inin SSR motifi içerdiği belirtilmektedir. Bu çalışmada da yapılan farklı zenginleştirilmiş kütüphane metodu kullanılarak SSR markörleri geliştiren Verma vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada taranan klonların %72.9'u ve Andeden vd. (2015)'in %83.3'ünün SSR içerdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada tekrar motifi içeren klon sayısı zenginleştirilmiş yöntemi kullanmayan Hamwieh vd. (2009)'a göre oldukça fazla iken zenginleştirilmiş yöntem kullanan Verma vd. (2014), Andeden vd. (2015), Bakır ve Kahraman (2019)'e göre nispeten düşük bulunmuştur. Bununla birlikte, SSR motifi içeren dizilerin bu çalışma için %89'u primer dizayn edilebilir olarak tespit edilirken, Hamwieh vd. (2009), tarafından %71.2, Verma vd. (2014) tarafından %55.1 Andeden vd. (2015) tarafından %83.6, Bakır ve Kahraman (2019)'de ise, %79.1 olarak belirlenmiştir. SSR markörü geliştirilmesinde farklı zenginleştirilmiş kütüphane metodları kullanılarak, farklı bitkilerde yapılan çalışmalarda SSR tekrar motifi içeren dizilerin yüzdelik oranları incelendiğinde, çim bitkisinde %67.6 (Hirata vd. 2006), kavunda %60.8 (Fukino, 2007), patlıcanda %81.7 (Nunome vd. 2009) buğdayda %60.8 (Li vd. 2016), asperde %82.2 (Betha vd. 2019) olarak belirlenmiştir.

Mikrosatellit belirleme çalışmaları değerlendirildiğinde sonuçların, kütüphane oluşturma aşamasında restriksiyon enzimlerinin seçimi, zenginleştirme için seçilen SSR motiflerinin çeşidi, metotsal yaklaşımlar veya seçilen SSR motiflerinin ilgili bitki genomunda az bulunması gibi nedenlerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Cuc vd. 2008). Örneğin Tang vd. (2002) ayçiçeğinde yapılan çalışmada, aynı tekrarlar (AG ve AC) kullanılarak ayrı ayrı zenginleştirilmiş kütüphane metodu ile, AG ve AC tekrarları için klonların sırası ile %43.1 ve %59.6'sının SSR motifi içerdiği bildirilmiştir. Bu durum seçilen SSR motiflerinin bitki genomunda özellikle mercimek bitkisinde bulunma yüzdesinin, diğer SSR motiflerine göre daha az olabileceğini düşündürmüştür. Yine bu durumu destekler nitelikte, bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak klonlar, zenginleştirmenin gerçekleştirildiği AG ve AC tekrarları ile koloni PCR yapılarak taranmış, AG ve AC tekrarları için, PCR reaksiyonu sonucu doğal olarak bu tekrarlar için pozitif bant veren bölgeler sekanslanmıştır.

Hamwieh vd. (2009), geliştirdikleri markörlerin 56 adedinin (%33) polimorfik bant ürettiğinin 58 adedinin (%34) monomorfik bant ürettiğini geri kalanların ise smear (süprüntü) veya nonspesifik bant oluşturduğunu bildirmişlerdir. Verma vd. (2014), SSR içeren 375 sekans için 151 SSR markörü dizayn etmişler ve ancak bunların sadece 122 adedinin beklenen büyüklükte bant ürettiğini bildirmişlerdir. Üretilen bandların 33'ü genetik ilişki amaçlı kullanılmıştır. Kullanılan 33 markörün tamamının polimorfik olduğu bildirilse de, diğer markörler için bilgi verilmediğinden dolayı karşılaştırma yapılamamıştır. Andeden vd. (2015) ise, geliştirdikleri 149 SSR markörünün 78 adedinin polimorfik (%52), 71 adedinin (%48) ise monomorfik olduğunu bildirmişlerdir. Bakır ve Kahraman (2019) yürütükleri araştırmada, geliştirilen 53 SSR marköründen 32 adedinin (%60.4) polimorfik, 15 adedinin (%28.3) ise monomorfik olduğu sonucuna varmışlardır. Geri kalanlar ise, amplifiye olmayan ve nonspesifik bant veren (%11.4) marköründen oluşmuştur. Bakır ve Kahraman (2019)'ın yaptıkları çalışmanın devamı niteliğinde olan bu çalışmada ise, geliştirilen 33 mercimek SSR marköründen 16 adedi (%48.5) polimorfik, 8 adedi (%24.2) monomorfik, 9 adedinin (%27.2) amplifiye olmayan ve nonspesifik bant veren markörlerden oluşmuştur. Bu çalışmada, elde edilen polimorfik markör yüzdesi Bakır ve Kahraman (2019) tarafından geliştirilen markörlerin polimorfizm yüzdesinden düşük, ancak mercimekte daha önce yapılan çalışmalar ile benzer bulunmuştur.

Hamwieh vd. (2009), tarafından *Lens culinaris*'te geliştirilen SSR'ların *Lens culinaris*'in alt türleri olan (*L. culinaris* subsp. *culinaris*, *L. culinaris* subsp. *orientalis*, *L. culinaris* subsp. *tomentosus*, *L. culinaris* subsp. *odemensis*) test etmişlerdir. Test edilen toplam allel sayısını 182, lokus başına düşen ortalama allel sayısını 13 olarak belirtmişlerdir. *L. culinaris* subsp. *culinaris* için, toplam allel sayısı 128, lokus başına allel sayısının 2 ile 16 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 9.14 olduğu bildirilmiştir. Verma vd. (2014), geliştirdikleri markörlerden 33 adedini 46 genotipte test etmişlerdir. Toplam allel sayısının 123, allel sayısının 2 ile 5 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 3.73 olduğu bildirilmiştir. PIC değerinin ise, 0.13 ile 0.99 arasında değiştiği ve ortalama 0.66 olduğu sonucuna varmışlardır. Andeden vd. (2015), geliştirdikleri 78 polimorfik markörden, 15 genotipte toplam 400 allel elde edildiğini ve lokus başına düşen allel sayısı 2 ile 11 arasında değiştiğini ve ortalama allel sayısının 5.1 olduğunu bildirmişlerdir. PIC değerinin ise, 0.07 ile 0.89 arasında

değiştirdiği ve ortalama 0.58 olduğu bildirilmiştir. Bakır ve Kahraman (2019) polimorfik olduğu tespit edilen 32 SSR lokusunu 24 çeşitte test ettikleri araştırmalarında, toplamda 142 allel üretilmiş ve lokus başına düşen allel sayısının 2 ile 15 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 4.36 olduğu tespit etmişlerdir. PIC değerinin ise, 0.19 ile 0.90 arasında değiştiği ve ortalama 0.50 olduğu sonucuna varmışlardır. Araştırma sonucunda ise, 16 SSR lokusu 10 mercimek çeşidinde test edilmiş, toplamda 57 allel üretilmiş ve lokus başına düşen allel sayısının 2 ile 7 arasında değiştiği ve ortalama 3.56 olduğunu tespit etmişlerdir.

Lokus başına ve ortalama allel sayısı açısından sonuçlar yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında elde edilen veriler, Hamwieh vd. (2005) ve Andeden vd. (2015)'nin yaptıkları çalışmaya göre düşük Verma vd. (2014)'nin elde ettikleri sonuçlar ile benzer bulunmuştur. Bakır ve Kahraman (2019)'ın yaptıkları çalışmaya göre düşük bulunmuştur. Bu durumun çalışmalarda kullanılan genotip sayısı ve kullanılan genotiplerin çeşitliliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. PIC değerleri ise, birbirine yakın bulunmuştur.

4.2. Mercimek SSR Markörlerinin Diğer Türlerle Transfer Edilebilirliğinin Karşılaştırılması

Evrimsel yakınlık ve türler arasında var olan yeterli homoloji SSR markörlerin transfer edilebilirliğini mümkün kılmaktadır (Doyle ve Luckow 2003; Choi vd. 2004). Taksonomik olarak *Lens* cinsine en yakın cinsler *Vicia* ve *Pisum* olup bunları *Trifolium* ve *Medicago* takip etmektedir. *Phaselous* ve *Glycine* cinsleri ise *Lens* cinsinden uzak türlerdir (Doyle ve Luckow 2003; Choi vd. 2004). Bu çalışmada, yeni geliştirilen 33 adet mercimek SSR markörlerinin farklı baklagillere transfer edilebilirliği test edilmiş, transfer edilebilme oranının %49.5 ile %3 arasında değiştiği görülmüştür. Evrimsel yakınlık baz alındığında, yakın türlerde en yüksek transfer edilebilme oranı *Vicia* (%49.5) türlerinde bulunurken, *P. sativum* ve *M. sativa* türlerinde sırası ile (%30.3) ve (%18.1) olarak bulunmuş, uzak türlerden *G. max* (%15) ve *P. vulgaris* (%3) ise düşük bulunmuştur. Diğer taraftan evrimsel olarak mercimeğe çok yakın olmadığı bilinen *Cicer* (%30.3) türlerine transfer edilebilirliği ikinci en yüksek bulunurken, çok yakın olduğu bilinen *Trifolium* (%3) oldukça düşük bulunmuştur. Verma vd. (2014) 33 SSR markörünü *L. culinaris* alt türleri ve

yabanileri ile *P. sativum* (4 adet), *C. arietinum* (3 adet), *T. alexandrinum* (2 adet), *G. max* (2 adet), *M. truncatula* (2 adet), *C. cajan* (2 adet), *V. radiata* (2 adet), ve *C. reticulatum* (1 adet) olmak üzere 8 farklı baklagil türünde test etmişlerdir. SSR markörlerin türler arası transfer edilebilme oranı *Lens* türleri arasında %80.72 (*L. ervoides*) ile %87.88 (*L. lamottei*) arasında değişirken, diğer baklagillerde bu oranın %72.73 (*T. alexandrinum*), %69.70 (*P. sativum*), %60.61 (*C. reticulatum*), %54.55 (*M. truncatula*), %48.48 (*C. cajan*), %45.45 (*G. max*) ve en az %12.12 (*V. radiata*). Test edilen markörlerin %45.45'inin tüm baklagillerde çalıştığı, ancak her türün tüm çeşitlerinde amplifiye olmadığı bildirilmiştir. Markörlerin %84.85'i mercimek dışındaki en az bir baklagil türünde amplifiye olduğu bildirilmiştir. Datta vd. (2010) ise, mercimek mikrosatellitlerinin *C. cajan*'a transfer edilebilirliğinin %9.3 olduğunu bildirmiştir. Mercimekte yeterli mikrosatellit markörlerin olmaması nedeni ile, *T. prantense*, *M. truncatula* ve *P. sativum* türlerinden geliştirilen markörlerin mercimeğe transfer edilebilirliği test edilmiş ve transfer oranı *Trifolium* SSR'ları için %62, *Medicago* SSR'ları için %36 ve *Pisum* SSR'ları için %25 olarak belirlenmiştir (Reddy vd. 2010). Diğer baklagillerde yapılan benzer çalışmalarda (Gutierrez vd. 2005) ise, EST ve genomik temelli *M. truncatula* SSR markörleri *P. sativum*, *V. faba*, *C. arietinum* ve *C. reticulatum* türlerinde test edilmiş ve sırasıyla %37.6, %40, %36.3 (her iki nohut türü için) bulunmuştur. Ayrıca *M. truncatula* EST-SSR'larının genomik SSR'lara göre dört türde de 2 kattan fazla olduğunu bildirmişlerdir. Choudhary vd. (2008), nohutta geliştirdikleri EST-SSR markörleri *Cicer* türleri ve *P. mungo*, *P. sativum*, *G. max*, *T. alexandrinum*, *L. esculenta*, *C. cajan*, *M. truncatula* olmak üzere 7 diğer baklagil türünde test etmişlerdir. *Cicer* türleri arasında markör transfer oranı %96.6 (*C. reticulatum*) ve %68.3 (*C. judaicum*) arasında değişirken, diğer türlerde ise %29.4 (*P. mungo*), %35.2 (*P. sativum*), %41.1 (*G. max* ve *T. alexandrinum*), %47.0 (*L. esculenta*), %50.0 (*C. cajan*) ve %61.7 *M. Truncatula* ortalama %43 olarak belirlenmiştir.

4.3. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada, Kafkas çeşidi kullanılarak AG ve AC tekrarları ile zenginleştirilmiş genomik kütüphanelerden 33 yeni mercimek markörü geliştirilmiştir. Yeni geliştirilen 33 SSR markörü 10 mercimek çeşidinde test edilerek 16'sı polimorfik olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak;

1. Genetik yakınlık değerlerine göre oluşturulan UPGMA grafiğinde, test edilen mercimek genotipleri iki gruba ayrıldığı, birinci grupta Sazak-91, Emre-20, Ceren, Anakara Yeşili, Erzurum-89, Kafkas, Yerli Kırmızı, ikinci grubu Seyran-96, Altın toprak, Tigris çeşitlerinin yer aldığı ikinci grupta ise Seyran-96, Altın toprak, Tigris çeşitlerinin yer aldığı gözlemlenmiştir.
2. Test edilen mercimek çeşitlerinin genetik açıdan analiz edildiğinde en yakın çeşitler Ankara Yeşili ile Erzurum-89 (% 80), ve Tigris ile Altın Toprak (% 80) olduğu Sazak-91 ile Altın Toprak (% 24) çeşitlerinin genetik benzerlik açısından en uzak olduğu belirlenmiştir.
3. Yeni geliştirilen 33 adet mercimek SSR markörleri yemlik ve yemelik bazı baklagil türlerinde transfer edilebilirliği test edilmiş, transfer edilebilme oranı %49.5 (*Vicia*) ile % 3 (*P. vulgaris*) arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Kafkas mercimek çeşidi kullanılarak zenginleştirilmiş kütüphane yöntemi ile geliştirilen yeni SSR markörleri, moleküler destekli ıslah, filogenetik analizler ve genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılabilir kalite ve nitelikte olup ve türler arası genetik ilişki çalışmalarında kullanılabilir niteliktedir. Bu çalışmada geliştirilen mercimekte moleküler temelli çalışmalara katkı sağlamakla birlikte mercimekte geliştirilen markör sayısı hala yetersiz kalmaktadır. SSR markörü sayısının gerek geleneksel yöntemlerle gerekse ikinci/üçüncü nesil dizileme teknolojileri artırılması ıslah çalışmaları açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abou Zeid, N.M., El Wakil., A.A., El Sherif., I.M., Amer., M.I., 1990. Studies On Root ROT And Wilt Of Lentil And Their Control. **Agricultural Research Review**. **68**:3, 471-479; 9 Ref.
- Ahmad, M., Mcneil, D.L, 1996. Comparison Of Crossability, RAPD, SDS-PAGE And Morphological Markers For Revealing Genetic Relationships Within And Among Lens Species. **Theoretical and Applied Genetics** **93**: 788–793. Doi: 10.1007/BF00224077 PMID: 24162409
- Al Ahmad, M., Mouselli, N., 1987. Wilt And Root Rot Of Lentis. Lens (Newsletter). Vol: 14 (1/2), 27-31 ; 5 Ref.
- Al-Samarai, F. R., Al-Kazaz, A., 2015. Molecular Markers: an Introduction and Applications. **European Journal of Molecular Biotechnology**, Vol. (9), Is. 3 pp. 118-130, DOI: 10.13187/ejmb.2015.9.118
- Andeden, E.E., Çakir, E., Toklu F., Özkan, H., 2015. —Development, Characterization And Mapping Of Microsatellite Markers For Lentil (*Lens Culinaris Medik.*). **Plant Breeding**, **134**, 589-598.
- Anonymous, 2012. *Taxonomical Database*. United States Department Of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Retrieved From [Http://Plants.USDA.Gov](http://Plants.USDA.Gov).
- Arumuganathan, K., Earle, E. D. 1991. —Nuclear DNA Content Of Some Important Plant Species. **Plant Molecular Biology Reporter**, **9**, 208-218.
- Bahl, P.N., Lal, S., Sharma, B.M. 1993. An Overview Of The Production And Problems In Southeast Asia. In: Lentil In South Asia. Proceedings Of The Seminar On Lentils In South Asia, ICARDA. Editör: Erskine, W., Saxena, M.C. Aleppo, Syria. Sayfa: 1-10.
- Bakır, M., Kahraman, A., Gürçan, K., 2017, Mercimekte (*Lens Culinaris Medik.*) AG Ve AC Mikrosatellitlerince Zenginleştirilmiş Genomik Kütüphanelerden Yeni Ssrs (Simple Sequence Repeats) Markörlerin Geliştirilmesi (Proje No:2150088) Tubitak Final Raporu
- Bakır M., Kahraman A. 2019. “Development of New SSR (Simple Sequence Repeat) Markers for Lentils (*Lens culinaris Medik.*) from Genomic Library Enriched with AG and AC Microsatellites”, **Biochemical Genetics** **57**:338–353.

- Bakır, M. 2019. Transferability of newly developed genomic lentil SSR markers to *Cicer* species. **Legume Research**, cilt.42, ss.479-484.
- Bellar, M., S.Kebapch., 1983. A List Of Diseases, Ğnjuries And Prasitic Weeds Of Lentils İn Syria. *Lens* (Newsletter), 10: 30-31.
- Betha, U.K., Shaik, M., Kadirvel P., Mukta N. And Senthilvel S., 2019. Development And Characterization Of Microsatellite Markers From Enriched Genomic Libraries İn Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.). **Research Journal Of Biotechnology**, Vol. 14 (12)
- Blair, M., Torres, M.M., Pedraza, F., Giraldo, M.C., Buendía, H.F., Hurtado, N., 2009. Development Of Microsatellite Markers For Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Based On Screening Of Non-Enriched, Small-İnsert Genomic Libraries. *Genome* 52:772-82.
- Bloor, P.A., Barker, F.S., Watts, P.C., Noyes, H.A., Kemp, S.J. 2001. “Microsatellite Libraries By Enrichment”.[Http://Www.Genomics.Liv.Ac.Uk/Animal/RESEARCH/MICROSAT.PDF](http://Www.Genomics.Liv.Ac.Uk/Animal/RESEARCH/MICROSAT.PDF)
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M.H., Davies, R.W., 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, **American Journal of Human Genetics** 32, 314–33.
- Chen, H., Qiao, L., Wang, L., Wang, S., Blair, M.W., Cheng, X., 2015. Assessment Of Genetic Diversity And Population Structure Of Mung Bean (*Vigna Radiata*) Germplasm Using EST-Based And Genomic SSR Markers. **Gene**, 566: 175–183.
- Choi, H.K., Mun, J.H., Kim, D.J., Zhu, H., Baek, J.M., Mudge, J., Roe, B., Ellis, N., Doyle, J., Kiss, G.B., Young, N.D., Cook, D.R. 2004. “Estimating Genome Conservation Between Crop And Model Legume Species”, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 101:15289–15294.
- Choudhary, S., Sethy, N. K., Shokeen, B., And Bhatia, S., 2008. Development Of Chickpea EST-SSR Markers And Analysis Of Allelic Variation Across Related Species. **Theoretical And Applied Genetics**, 118: 591–608.
- Cokkizgin, A., Shtaya, M.J.Y., 2013. Lentil: Origin, Cultivation Techniques, Utilization And Advances İn Transformation. **Science and Education Centre of North America** 1, Issue: 1, P. 55– 62,

- Cubero, J. I., 1981. Origin, Taxonomy And Domestication. P. 15–38, Lentils. In: C. Webb And G. Hawtin (Eds), CAB, London, UK.
- Cubero, J.I., Perez De La Vega, M., Fratini, R., 2009. Origin, Phylogeny, Domestication And Spread, The Lentil Botany, Production And Uses (Ed. William Erskine, Fred Muehlbauer And Others), S. 13 – 33, Preston / UK.
- Cuc, L.M., Mace, E.S., Crouch, J.H., Quang, V.D., Long, T.D., Varshney R.K. 2008. Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biology**, **8**,55.
- Çiftçi, C.Y., (2004). Dünyada Ve Türkiye’de Yemelik Tane Baklagiller Tarımı. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası. Teknik Yayınlar Dizisi No:5 Ankara.
- Datta, S., Mahfooz, S., Singh, P., Choudhary, A.K., Singh, F., Kumar, S. 2010. “Cross-genera amplification of informative microsatellite markers from common bean and lentil for the assessment of genetic diversity in pigeonpea”, **Physiol Mol Biol Plants**, 16:123–134.
- Decroocq, V., Fave, M.G., Hagen, G., Bordenave, L., Decroocq, S. 2003. Development And Transferability Of Apricot And Grape EST Microsatellite Markers Across Taxa. **Theoretical And Applied Genetics**, 106, 912-922.
- Devos, P., 1988. Mercimek ve Nohutun Besin Değeri ve Proses Sırasındaki Değişiklikler (Nutritional Value Of Lentils And Chickpeas And Changes During Processing), Herkes İçin Mercimek Sempozyumu (Lentils For Everyone Symposium) Marmaris/Muğla,174-196.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M.J., Poizat, C., Zanetto, A., Arus, P., Laigret, F., 2003. Development Of Microsatellite Markers İn Peach (*Prunus Persica L.*) And Their Uses İn Genetic Diversity Analysis İn Peach And Sweet Cherry (*Prunus Avium L.*). **Theoretical And Applied Genetics**, 105, 127-138.
- Doyle, J.J., Luckow, M.A. 2003.The Rest Of The Iceberg: Legume Diversity And Evolution In A Phylogenetic Context, **Plant Physiology**, 131:900–910.
- Duan, X., Wang, K., Su, S., Tian, R., Li, Y., Chen, M. 2017. De Novo Transcriptome Analysis And Microsatellitemarker Development For Population Genetic Study Of A Serious İnsect Pest, *Rhopalosiphum Padi* (L.) (Hemiptera:Aphididae). **Plos ONE**, 12, E0172513.

- Duke, J. A., 1981. Handbook Of Legumes Of World Economic Importance. **Plenum Press, New York Post** 52–57.
- Ellis, J. R. And Burke, J. M., 2007, EST–Ssrs As A Resource For Population Genetic Analyses. **Nature Publishing Group All rights reserved** 0018-067X/07 .
- Ender, A., Schwenk, K., Stdler, T., Streit, B., Schierwater, B., 1996. RAPD Identification Of Microsatellites İn Daphnia. **Molecular Ecology** 5:437–441
- Engin, M., 1989. Yemeklik Tane Baklagiller. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Kitabı:110, Ç.Ü. Basımevi, Adana.
- Eser, D., 1978. Yemeklik Tane Baklagiller Ders Rotosu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, S:98.
- Evans, L.T., 1997. Adapting And İmproving Crops: The Endless Task. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 352:901–906. Doi: <https://doi.org/10.1098/Rstb.1997.0069>
- FAO, 2018. Food And Agriculture Organization Of The United Nations Statistics Division [Http://Faostat. Fao. Org](http://faostat.fao.org). (Erişim Tarihi 06.02.2020).
- Ferguson, M.E., Maxted, N., Slageren, V.M., Robertson, L.D., 2000. A Reassessment Of The Taxonomy Of *Lens* Mill. (*Leguminosae*, *Papilionoideae*, *Vicieae*). **Botanical Journal of the Linnean Society** 133:41–59.
- Fukino, N., Sakata, Y., Kunihiya, M., Matsumoto, S., 2007. Characterization of novel simple sequence repeat (SSR) markers for melon (*Cucumis melo* L.) and their use for genotype identification, **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology** 82:330–334.
- Garcia-Moreno, M. J., Velasco, L., Pérez-Vich, B., 2010. Transferability of non-genic microsatellite and gene-based sunflower markers to safflower. **Euphytica**, 175 (2), 145-150.
- Gautami, B., Ravi, K., Narasu, M. L., Hoisington, D. A., And Varshney, R. K., 2009, Novel set of groundnut SSR marker for Germplasm analysis and interspecific transferability. **International Journal of Integrative Biology**, 17(2) : 100.
- Geçit, H. H., Çiftçi, C. Y., Emeklier, H.Y., Ekiz, H., Altınok, S., Sancak, C., Sevimay, C.S., Kendir, H., 2009. Yemeklik Tane Baklagiller. Tarla Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Sayfa Sayısı 540, ISBN:978-975-482-803-0, Türkçe (Ders Kitabı), (Yayın No: 1817009)

- Glenn, T.C., Schable, N.A., 2005. Isolating Microsatellite DNA Loci. **Methods In Enzymology**, 395:202-222.
- Golein B, Talaie A, Zamani Z, Moradi B (2006). Development And Characterization Of New Microsatellite Loci From Lemon (*Citrus Limon*). **Internation Journal Of Agriculture Biology** 8:172-174.
- Gupta S., Kumari, K., Sahu, P.P., Vidapu, S., Prasad, M., 2012. Sequence-Based Novel Genomic Microsatellite Markers For Robust Genotyping Purposes In Foxtail Millet [*Setaria Italica* (L.) *P. Beauv.*]. **Plant Cell Reports**, 31:323–337.
- Gupta, D. S., Cheng, P., Sablok, G., Thavarajah, D., Thavarajah, P., Coyne, C. J., Kumar, S., Baum, M., Mcgee, R. J., 2016. Development Of A Panel Of Unigene-Derived Polymorphic EST–SSR Markers In Lentil Using Public Database Information. **The Crop Journal**, 425–433, [Doi.Org/10.1016/J.Cj.2016.06.012](https://doi.org/10.1016/J.Cj.2016.06.012)
- Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C., Ramesh, B., 1996. Microsatellites In Plants: A New Class Of Molecular Markers. **Current Science**, 70, 45–54.
- Gutierrez, M. V., Vazpatto, M. C., Huguet, T., Cubero, J. L., Moreno, M. T. And Torres, A. M., 2005. Cross-Species Amplification Of *Medicago Truncatula* Microsatellites Across Three Major Pulse Crops. **Theoretical And Applied Genetics**, 110: 1210-1217.
- Hall, T., 1997. BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Win95/98/NT/2K/XP. Ibis Biosciences, Carlsbad, CA 92008. www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html
- Hamilton, M.B., Pincus. E.L., Di-Fiore, A., Fleischer, R.C., 1999. Universal Linker And Ligation Procedures For Construction Of Genomic DNA Libraries Enriched For Microsatellites. **Biotechniques**, 27:500–507
- Hamwiah, A., Udupa, S.M., Choumane, W., Sarker, A., Dreyer, F., Jung, C., Baum, M., 2005. A Genetic Linkage Map Of Lens Sp. Based On Microsatellite And AFLP Markers And The Localization Of Fusarium Vascular Wilt Resistance. **Theoretical And Applied Genetics**, 110: 669–677.
- Hamwiah, A., Udupa, S.M., Sarkar, A., Jung, C., Baum, M., 2009. Development Of New Microsatellite Markers And Their Application In The Analysis Of Genetic Diversity In Lentils. **Breeding Science**, 59:77–86.

- Hanelt, P., 2001. Lens Mill. In: Hanelt P (Ed.), Mansfeld's Encyclopedia Of Agricultural And Horticultural Crops, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, Vol. 2, 849 – 852.
- Havey, M. J., And Muehlbauer, F. J., 1989. Linkages Between Restriction Fragment Length, Isozyme And Morphological Markers In Lentil. **Theoretical And Applied Genetics**, 77, 395–401. Doi:10. 1007/Bf00305835
- He, G., Woullard, F. E., Marong, I., Guo, B. Z. 2006. Transferability Of Soybean SSR Markers In Peanut (*Arachis Hypogaea* L.). **Peanut Science**, 33(1), 22-28.
- Hempel, K., Peakall, R., 2003. Cross-Species Amplification From Crop Soybean (*Glycine Max*) Provides Informative Microsatellite Markers For The Study Of Inbreeding Wild Relatives. **Genome**, 46: 382-393.
- Hendre, P.S., Aggarwal, R.K. 2014. Development Of Genic And Genomic SSR Markers Of Robusta Coffee (*Coffea Canephora* Pierre Ex A. Froehner). **Plos ONE**, DOI: 10.1371/Journal.Pone.0113661.
- Hendre, P.S., Aggarwal, R.K., 2007. DNA Markers: Development And Application For Genetic Improvement Of Coffee. In: Genomics Applications In Crops (Vol 2). Editor: Varshney, R.K., Tuberosa, R. Genomics Assisted Crop Improvement, Springer Netherlands. Sayfa 399-434.
- Hirata, M., Cai, H.W., Inoue, M., Yuyama, N., Miura, Y., Komatsu, T., Takamizo, T., Fujimori, M. 2006. "Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)", **Theoretical and Applied Genetics** 113, 270–279.
- Hopf, M., 1962. Bericht Uber Die Untersuchung Von Samen Und Holzkohlenresten Von Der Argissa-Magula Aus Den Priikermischen Bis Mittelbronzezeitlichen Schichten. In: V. Milojci, J. Boessneck Und M. Hopf: Die Deutschen Ausgrabungen Auf Der Argissa-Magula In Thessalien. I. Rudolf Habelt Verlag, Bonn. Pp. 101-119.
- Hu, J. B., Zhou, X. Y., Li, J. W., 2010. Development Of Novel EST-SSR Markers For Cucumber (*Cucumis Sativus*) And Their Transferability To Related Species. **Scientia Horticulturae**, 125(3), 534-538.
- Huang, X., Madan. A., 1999. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Resources** 9:868–877

- Humphrey, D.R., Cummings, S.P., Andrews, M., 2001. Comparison And Tentative Identification Of Rhizobiaceae Isolated From Nodules Of Lentil Grown 64 In New Zealand And The United Kingdom. **Aspects Of Applied Biology**, 63: 101–110.
- Hwang, S.F., 1994. Potential For Integrated Biological And Chemical Control Of Seedling In Lentil With *Bacillus Subtilis* And Vitaflo R-280. *Biological Sciences*. 2, 188-199; 40 Ref.
- Jafari, N., Behroozi, R., Bagheri, A., Moshtaghi, N., 2013. Determination Of Genetic Diversity Of Cultivated Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Using *Medicago Truncatula* EST-Srs. **Journal Of Plant Molecular Breeding**, 1(2): 1-16.
- Jennings, T.N., Knaus, B.J., Mullins, T.D., Haig, S.M., Cronn. R.C., 2011. Multiplexed Microsatellite Recovery Using Massively Parallel Sequencing. **Molecular Ecology Resour.** 11:1060-1067.
- Jensen, L. B., Holm, P. B., Lubberstedt, T., 2007. Cross-Species Amplification Of 105 *Lolium Perenne* SSR Loci In 23 Species Within The Poaceae. **Molecular Ecology Notes**, 7(6), 1155-1161.
- Jingade, P., Bhosale, L. V., Sanjayrao, J. A., Rajanna, R., Jain, M., Ravikumar, R. L. 2014. Characterization of microsatellite markers, their transferability to orphan legumes and use in determination of genetic diversity among chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, 17(3), 191-199.
- Kaldate, R., Rana, M., Sharma. V., Hirakawa, H., Kumar, R., Singh, G., Chahota, R. K., Isobe S. N., Sharma T. R., 2017. Development of genome-wide SSR markers in horsegram and their use for genetic diversity and cross-transferability analysis. **National Institute of Plant Genome Research, Mol Breeding** 37: 103 DOI 10.1007/s11032-017-0701-1
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K., 2011. Microsatellite Markers: An Overview Of The Recent Progress In Plants. **Euphytica**, 177:309-334.
- Kandpal, R.P., Kandpal, G., Weissman, S.M., 1994. Construction Of Libraries Enriched For Sequence Repeats And Jumping Clones, And Hybridization Selection For Region-Specific Markers. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, USA 91:88–92

- Karagyozov, L., Kalcheva, I.D., Chapman, V.M., 1993. Construction Of Random Small-Insert Genomic Libraries Highly Enriched For Simple Sequence Repeats. **Nucleic Acids Research**, **21**:3911–3912
- Kaur, S., Cogan, N. O., Pembleton, L.W., Shinozuka, M., Savin, K.W., Materne, M., Forster, J.W., 2011. Transcriptome Sequencing Of Lentil Based On Second-Generation Technology Permits Large-Scale Unigene Assembly And SSR Marker Discovery. **Bio Med Central Genomics**, **12**:265
[.Biomedcentral.Com/1471-2164/12/265](http://Biomedcentral.Com/1471-2164/12/265)
- Kaya, F., 2010. Ülkemizde Yetiştirilen Bazı Mercimek Çeşitlerinin Bileşenlerinin Belirlenmesi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Basılmamış Yüksek Lisans Tezi, Adana, 50 S.
- Kibar, U., 2012. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Est (Expressed Sequence Tag) Koleksiyonlarından Üzüm Mikrosatellit Lokuslarının Tanımlanması. Ankara Üniversitesi Fen Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Türkiye Ss. 63
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements And Modifications Of Primer Design Program Primer3. **Bioinformatics** **23**10:1289–1291
- Kuleung, C., Baenziger, P.S., Dweikat, I., 2003. Transferability Of SSR Markers Among Wheat, Rye And Triticale. **Theoretical and Applied Genetics**, **108**:1147–1150
- Ladizinsky, G., 1979. The Origin Of Lentil And Its Wild Genepool. **Euphytica**. **28**: 179–187.
- Ladizinsky, G., Braun, D., Goshen, D., Muehlbauer, F.J., 1984. The Biological Species Of The Genus *Lens*. **Botanical Gazette** **145**: 253–261.
- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D., Douglas, G.C. 1998. Morfolojical Traits Microsatellite Fingerprinting And Genetic Relatedness Of A Stand Of Elite Oaks (*Q. Robur* L.) At Tuallynally, Ireland. **Silvae Genetica**, **47**, 5-6.
- Li Y-C, Korol AB, Fahima, T., Nevo, E., 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, And Evolution. **Molecular Biology and Evolution** **21**:991-1007.
- Li, L., Sun, F., Wu, D., Zhen, F., Bai, G., Gao, D., And Li, T., 2016. High-Throughput Development Of Genome-Wide Locus-Specific Informative SSR Markers In Wheat. **Science China Life Science**. Doi: 10.1007/S11427-016-0252-X

- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. 2002. Microsatellites: Genomic Distribution, Putative Functions And Mutational Mechanisms: A Review. **Molecular Ecology**, **11**, 2453-2465.
- Litt, M., Luty, J.A., 1989. A Hypervariable Microsatellite Revealed By In Vitro Amplification Of A Dinucleotide Repeat Within The Cardiac Muscle Actin Gene. **American Journal Of Human Genetics**, **44**, 397-401.
- Liu, K., Muse, S.V., 2005. "PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis", **Bioinformatics** **21**, 2128–2129.
- Lunt, D.H., Hutchinson, W.F., Carvalho, G.R., 1999. An Efficient Method For PCR-Based Identification Of Microsatellite Arrays (PIMA). **Molecular Ecology** **8**:893–894
- Mazoyer, M., Roudart, L. 2010. Dünya Tarım Tarihi Neolitik Çağ'dan Günümüzdeki Krize, (Çev. Şule Ünsaldı), Epos Yayınları, I. Baskı, S. 585, Ankara.
- Mittal, R.K., 1997. Effect Of Sowing Dates And Disease Development In Lentil As Sole And Mixed Crop With Wheat. **Journal Of Mycology And Plant Pathology** **27**:2, 203-209, 10 Ref.
- Mondini, L., Noorani, A., Pagnotta. M. A., 2009. Bitki Genetik Çeşitliliğinin Moleküler Araçlarla Değerlendirilmesi. Çeşitlilik., 1 (1): 19 - 35
- Moon, H. S., Nicholson, J. S., Lewis, R. S., 2008. Use Of Transferable Nicotiana Tabacum L. Microsatellite Markers For Investigating Genetic Diversity In The Genus Nicotiana. **Genome**, **51**(8): 547-559, <https://doi.org/10.1139/G08-039>
- Moriguchi, Y., Iwata, H., Ujino-Ihara, T. et. al., 2003. Development And Characterization Of Microsatellite Markers For Cryptomeria Japonica D.Don. **Theoretical And Applied Genetics** **106**: 751. <https://doi.org/10.1007/S00122-002-1149-0>
- Muehlbauer, F.J., Kaiser, W.J., Clement, S.L., Summerfield, R.J., 1995. Production and breeding of lentil. **Advances in Agronomy** **54**: 283–332
- Muehlbauer, F.J., 1991. Use Of Introduced Germplasm In Cool Season Food Legume Cultivar Development. In: Use Of Plant Introductions In: Cultivar Development (Part 2). Editör: Shands, H.L., Wiesner, L.E. Crop Sci. Soc. Amer., Social Publication. Sayfa 49-73

- Nalavade, R., Griesche, N., Ryan, D.P., Hildebrand, S., And Krau, S., 2013. Mechanisms Of RNA-Induced Toxicity Incagrepeat Disorders. **Citation: Cell Death and Disease** **4**, e752; doi:10.1038/cddis.2013.276
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **70**,3321–3323.
- Ngangkham, U., Dash, S., Parida, M., Samantaray, S., Nongthombam, D., Yadav, M.K., Kumar, A., Chidambaranathan, P., Katara, J. L., Patra, B. C., Bose, L. K., 2019. The Potentiality Of Rice Microsatellite Markers In Assessment Of Cross-Species Transferability And Genetic Diversity Of Rice And Its Wild Relatives. **Biyoteknoloji**, **9**: 217 (<https://doi.org/10.1007/S13205-019-1757-X>)
- Nunome, T., Negoro, S., Kono, I., Kanamori, H., Miyatake, K., Yamaguchi, H., Ohyama, A., Fukuoka H. 2009. "Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.)", **Theoretical and Applied Genetics** **119**,1143– 1153.
- Odeny, D.A., Jayashree, B., Gebhard, C., Crouch, J., 2009. New Microsatellite Markers For Pigeonpea (*Cajanus Cajan* L.) Millsp.). **BMC Research Notes** Doi:10.1186/1756-0500-2-35
- Oruç, F., 2009. Olea Europaea Cv Gemlik (Zeytin) Bitkisine Ait Cdna Kütüphanesinin Hazırlanması Ve Sonuçların Bioenformatik Analiz Yöntemleri İle Değerlendirilmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Türkiye.
- Özdemir, S. 2002. *Grain Legume Crops* (P.142). Hasad Publishing, Istanbul, Turkey.
- Paetkau, D., 1999. Microsatellites Obtained Using Strand Extension: An Enrichment Protocol. **Biotechniques**, **26**:690–697
- Parida, S.K., Kalia, S.K., Sunita, K, Dalal, V., Hemaprabha, G, Selvi, A., Pandit, A., Singh, A., Gaikwad, K., Sharma, T.R., Srivastava, P.S., Singh, N.K., Mohapatra, T., 2009. Informative Genomic Microsatellite Markers For Efficient Genotyping Applications İn Sugarcane. **Theoretical And Applied Genetics**, **118**:327–338
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M. And Rafalski, A., 1998. Cross-Species Amplification Of Soybean (*Glycine Max*) Simple Sequence Repeats (Ssrs) Within The Genus And Other Legume Genera; Implications For The

- Transferability Of Ssr In Plants. **Molecular Biology And Evolution**, **15**: 1275-1287.
- Provan, J., Powell, W. And Waugh, R., 1996. Microsatellite Analysis Of Relationship Within Cultivated Potato (*Solanum Tuberosum*). **Theoretical And Applied Genetics**, **92**: 1078-1084.
- Raveendar S, Lee G.A., Jeon YA, Lee Y, Lee JR, Cho GT, Cho JH, Park JH, Ma KH, Chung JW. 2015. Cross-Amplification Of *Vicia Sativa Subsp. Sativa* Microsatellites Across 22 Other *Vicia* Species. **Molecules**, **20**:1543–1550 DOI 10.3390/Molecules20011543.
- Reddy, M.R.K., Rathour, R., Kumar, N., Katoch, P., And Sharma, T.R. 2010. Cross-Genera Legume SSR Markers For Analysis Of Genetic Diversity In *Lens* Species. **Plant Breed**, **129**, 514–518. Doi: 10.1111/J.1439-0523.2009.01723.X
- Rehman, S., Altaf, C. H. M., 1994. Karyotypic Studies In *Lens Culinaris* Medic, Ssp. *Macrosperma* Cv. Laird X Precoz. **Pakistan Botanik Dergisi** **26**(2), 347-352.
- Reynolds, M.P., Rodomiro, O., 2010. Adapting Crops To Climate Change: A Summary. **Climate Change and Crop Production** **51**:1–8. <https://doi.org/10.1079/9781845936334.0000>
- Rossetto, M., 2001. Sourcing Of SSR Markers From Related Plant Species. **CAB International 2001. Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants** **211–224**.
- Röder, M.S., Plaschke, P., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D. And Ganai, M.W., 1995. Abundance, Variability And Chromosomal Location Of Microsatellites In Wheat. **Molecular Genetics And Genomics** **246**: 327-333.
- Saxena, D.R., S. Moly., R.R. Saxena., M.N. Khare., 1992. Root Morphology And Anatomy In Relation To Wilt Incidence In Lentil. *Lens* (Newsletter). **19**(2), 46-49
- Saxena, K.B., 2009. Evolution Of Hybrid Breeding Technology In Pigeonpea. In Ali, M., And Kumar, S.(Eds), **Milestones In Food Legume Research**, Kanpuri India, Pp 82-114)
- Schlotterer, C., Tautz, D., 1992. Slippage Synthesis Of Simple Sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, **20**, 211-215.
- Schuster S.C., 2008. Next Generation Sequencing Transforms Today's Biology. **Nature Methods**, **200**(8):16-18.

- Scott, K.D., 2001. Microsatellites Derived From Etss, And Their Comparison With Those Derived By Other Methods. In: Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting Of Plants, Editör: Henry, R.J. CABI International, UK. Sayfa 225-237.
- Senan, S., Kızhakayıl D., Sasikumar B., Sheeja T. E., 2014. Methods For Development Of Microsatellite Markers: An Overview. **Notulae Scientia Biologicae**, Print ISSN 2067-3205; Electronic 2067-3264. 2014, 6(1):1-13.
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-Generation DNA Sequencing. **Nature Biotechnology** **26**, 1135–1145.
- Singh, D., Singh, C.K., Tribuvan, K.U., vd., 2019. Development, Characterization, And Cross Species/Genera Transferability Of Novel EST-SSR Markers In Lentil, With Their Molecular Applications. **Plant Molecular Biology Reporter**, Doi:10.1007/S11105-019-01184-Z
- Sipahi H., Aslan Y., Yumurtacı A., 2013. Transferability Of Barley And Wheat EST Microsatellite Markers In Some Poaceae Members. **Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, 102-113. ISSN: 2536-4383
- Sipahi, H., Aslan, Y., Yumurtacı, A., 2016. Transferability Of Barley And Wheat EST-Microsatellite Markers In Some *Poaceae* Members. **Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, **1(2)**: 102 -113 (2016) ISSN: 2536-4383
- Şahin, G., 2016. 2016. Uluslararası Bakliyat Yılı Hasebiyle Türkiye’de Mercimek (*Lens Culinaris Medik*) Yetiştiriciliği. **Atatürk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi**, **20(4)**: 1665-1696
- Şehirli, S., 1988. Yemelik Tane Baklagiller, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Matbaası, S. 435, Ankara.
- Tang, S., Yu, J.K., Slabaugh, M.B., Shintani, D.K., Knapp, S.J., 2002. Simple Sequence Repeat Map Of The Sunflower Genome, **Theoretical and Applied Genetics** **105**,1124–1130.
- Techen, N., Arias, R.S., Glynn, N.C., Pan, Z., Khan, I.A., Scheffler, B.E., 2010. Optimized Construction Of Microsatellite-Enriched Libraries, **Molecular Ecology Resources** **10**:508-515.
- Temnykh, S., Declerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S., Mccouch, S.R., 2001. Computational And Experimental Analysis Of Microsatellites In

- Rice (*Oryza Sativa* L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, And Genetic Marker Potential. **Genome Resources**, **11**:1441–1452
- Tosun, O., Eser, D., 1978. Mercimek (*Lens Culinaris* M.)’Te Ekim Sıklığı Araştırmaları I- Ekim Sıklığının Verim Üzerine Etkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı: 28 (1): 218-236.
- TÜİK, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu, [Http://Www.Tuik.Gov.Tr](http://www.tuik.gov.tr). (Erişim Tarihi:15 Ocak 2020)
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3— new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Res** **40**(15):e115
- Van Oss, H., Aron, Y., Ladizinsky, G. 1997. Chloroplast DNA Variation And Evolution İn The Genus *Lens* Mill. **Theoretical And Applied Genetics**, **94**:452–457.
- Verma P., Shah, N., Bhatia, S., 2013. Development of an expressed gene catalogue and molecular markers from the de novo assembly of short sequence reads of the lentil (*Lens culinaris* Medik.) transcriptome. **Plant Biotechnology Journal** **11**, pp. 894–905 doi: 10.1111/pbi.12082
- Verma, P., Sharma, T.R., Srivastava, P.S., Abdin, M.Z., Bhatia, S., 2014. Exploring Genetic Variability Within Lentil (*Lens Culinaris* Medik.) And Across Related Legumes Using A Newly Developed Set Of Microsatellite Markers. **Molecular Biology Reports**, **41** 5607–5625 10.1007/S11033-014-3431-Z.
- Vishnumittre, A., 1974. The Beginnings Of Agriculture-Paleo-Botanical Evidence İn India. In: Hutchinson J. B., Editor Editors. Evolutionary Studies On World Crops: Diversity And Change İn The Sub-Continent. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pp. 23–24.
- Wagner, H.W., Sefc, K.M., 1999. Identity 1.0. Centre For Applied Genetics. University Of Agricultural Science, Vienna.
- Wang, M.L., Barkley, N.A., Jenkins, T.M., (2009a). Microsatellite Markers İn Plants And İnsects. Part I. Applications Of Biotechnology. **Genes Genomes Genomics** **3**:54–67
- Wang, M., Barkley., N., Yu, J., Dean, R., Newman, M., Sorrels, M., Pederson, G., 2005. Transfer Of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers From Major Cereal

- Crops To Minor Grass Species For Germplasm Characterization And Evaluation. **Plant Genetics Research**, **3**:45–57.
- Weber, J.L., 1990. Informativeness Of Human (Dc-Da)N _ (Dgdt) N Polymorphisms. **Genomic**, **7**:524–530
- Welsh, J., Mcclelland, M., 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers, **Nucleic Acids Research**, **18**, 7213-7218.
- Whyte, R. O., Leissner, G. N., Trumble, H. C., 1953. Legume In Agriculture. **Fao Agricultural Studies**, **21**, 323-325.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990 . DNA Polimorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers, **Nucleic Acids Research**, **18**, 6531-6535
- Wong, M.M., Gujaria-Verma, N., Ramsay, L., Yuan, H.Y., Caron, C., Diapari, M., Vandenberg, A., Bett, K.E., 2015. Classification And Characterization Of Species Within The Genus *Lens* Using Genotyping-By-Sequencing (GBS). **Plos ONE** **10** (3),E0122025.
- You F.M, Huo N, Gu YQ, Luo MC, Ma Y, Hane D, Lazo GR, Dvorak J, Anderson OD 2008. Batchprimer3: A High Throughput Web Application For PCR And Sequencing Primer Designi. **BMC Bioinformatics** **9**:253. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-253>
- Yürür N., E. Açıköz, A. Özgümüş, N. Azkan, N.Çelik, **Tarla Bitkileri**, Eskişehir, 1995.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002. Strategies For Microsatellite Isolation: A Review. **Molecular Ecology**, **11**:1–16
- Zhang, G., Xu, S., Mao, W., Hu, Q., Gong, Y., 2013. Determination Of The Genetic Diversity Of Vegetable Soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.] Using EST-SSR Markers. **Journal Of Zhejiang University-SCIENCE B**, ISSN 1673-1581 (Print); ISSN 1862-1783
- Zohary, D., 1972. The Wild Progenitor And Place Of The Cultivated Lentil. *Lens Culinaris*. **Economic Botany**, **26**:236-332.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Şehriban DEMİR
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 20.02.1994, Adıyamna
Medeni Durumu: Bekâr
email: shrbn_@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü	2020
Lisans	Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü	2017
Lise	Şehit Necati Sayın Anadolu İmam Hatip Lisesi. Adıyaman	2012

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
-	-	-
-	-	-

YABANCI DİL

İngilizce

Sunum ve Kongreler

Demir, Ş., Turkay, Ş., Bakır, M., (2018). Mercimek'te (*Lens culinaris* Medik.) TG/TC Tekrarları ile Yeni SSR Markörlerin Geliştirilmesi. Çukurova I. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi Adana (Turkey) Özet kitapçığı ss 44

Projeler

Demir, Ş., (2017). Mercimek'te (*Lens culinaris* Medik.) TG/TC Tekrarları ile Yeni SSR Markörlerin Geliştirilmesi. 2209-A kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.