

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MERCİMEK ÇEŞİT VE TÜRLERİNİN SSR (Simple Sequence Repeat)  
MARKÖRLERİ İLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Ümran Akgün YILDIRIM**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2012**



**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

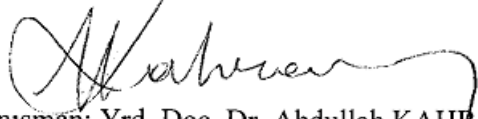
**MERCİMEK ÇEŞİT VE TÜRLERİNİN SSR (Simple Sequence Repeat)  
MARKÖRLERİ İLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Ümran Akgün YILDIRIM**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2012**

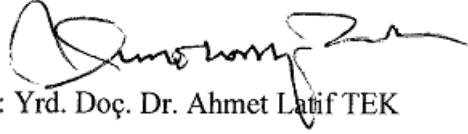
Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN'ın danışmanlığında, Ümran Akgün YILDIRIM'ın hazırladığı “**Mercimek Çeşit ve Türlerinin SSR (Simple Sequence Repeat) Markörleri ile Moleküler Karakterizasyonu**” konulu bu çalışma 16/01/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi tezi olarak kabul edilmiştir.



Danışman: Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN



Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖZDEN



Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

**Bu Tezin Tarla Bitkileri Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım**



**Prof. Dr. Mehmet CİCİ**

**Enstitü Müdürü**

**Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.**

**Proje No: 1171**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	v
SİMGELER DİZİNİ .....	vi
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	5
2.1. Genetik Markörler .....	5
2.1.1 Morfolojik markörler .....	7
2.1.2 Protein markörleri.....	7
2.1.3. DNA markörleri.....	8
2.1.3.1. DNA melezleme markörleri .....	9
2.1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanımına dayanan moleküler markörler .....	10
2.2. Genetik Çeşitlilik Çalışmaları .....	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	25
3.1. Materyal.....	25
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Bitki materyalinin temini .....	28
3.2.2. DNA izolasyonu .....	28
3.2.3. DNA saflık analizi .....	29
3.2.4. DNA konsantrasyonunun spektrofotometrik ölçümü .....	30
3.2.5. Mikrosatelit markör analizleri ve PZR protokolü .....	34
3.2.6. PZR protokolü (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) .....	34
3.2.7. Jel elektroforezi .....	35
3.2.8. Jellerin boyanması .....	36
3.2.9. Verilerin değerlendirilmesi .....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....	37
4.1. SSR amplifikasyonları.....	37
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	50
ÖZET.....	51
SUMMARY .....	52
EK 1.....	53
EK 2.....	54

## ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

### MERCİMEK ÇEŞİT VE TÜRLERİNİN SSR (Simple Sequence Repeat) MARKÖRLERİ İLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ümran Akgün YILDIRIM

Harran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN

Yıl:2012 , Sayfa: 54

Bu çalışmada SSR markörleri kullanarak mercimek (*Lens culinaris* Medik.) bitkisinin moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır. Çalışmada Türkiye ve yurtdışında tescil edilen 35 çeşit ve 6 yabancı türe ait 12 aksesyon kullanılmıştır. Çalışmada 13 SSR markörü kullanılmış ve 44 polimorfik bant elde edilmiştir. Veriler NTSYS-PC 2.0 istatistik programı ile analiz edilmiştir. Denemede kullanılan mercimek genotipleri arasında genetik benzerlik ve uzaklık matrisi oluşturularak dendogram elde edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre kullanılan mercimek genotipleri 2 ana kol oluşturmuştur. Tescilli Türk çeşitleri bu ana kollardan birinin içinde yer almış olup kendi içerisinde iki grup oluşturmuştur. Türkiye’de tescil edilen mercimek çeşitlerinin bulunduğu ana kol içerisinde *L. culinaris*, *L. orientalis*, *L. odemensis*, *L. montbretti* ve *L. nigricans* yer almaktadır. Yabancı tescilli çeşitler Türk tescilli çeşitlerinin bulunduğu ana kol arasında yer almaktadır. *L. culinaris* ve *L. orientalis* türlerinin Güneydoğu Bölgesinde yetiştirilen Fırat-87 Çağıl-2004 ve Seyran gibi çeşitlerle yakın olması bu yabancı türlerin gen kaynağının bu bölge olduğu görüşünü desteklemektedir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Mercimek, SSR markörleri, Moleküler karakterizasyon

## ABSTRACT

MSc Thesis

### CHARACTERISATION OF LENTIL SPECIES AND CULTIVARS USING SSR (Simple Sequence Repeat) MARKERS

Ümran Akgün YILDIRIM

Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Field Crops

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Abdullah KAHRAMAN

Year: 2012, Page: 54

The objective of this study was to evaluate genetic diversity in lentil (*Lens culinaris* Medik.) using SSR (Simple Sequence Repeats) markers. Thirty five lentil cultivars released in Turkey and abroad and 6 wild species of lentil with 12 accessions were evaluated in the study. Data were analyzed using NTSYS PC 2.0 computer software to determine genetic diversity among the genotypes. Thirteen SSR markers that produced 44 scorable polymorphic bands were used to evaluate lentil genotypes. An unweighted pair- group method with arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis results indicated two main groupings. Cultivars released in Turkey and abroad including wild species of *L. culinaris*, *L. orientalis*, *L. odemensis*, *L. montbretti* and *L. Nigricans* were in the first group. Close genetic distances between wild species of *L. culinaris*, *L. Orientalis* and lentil cultivars (Firat-87, Seyran-96 and Cagil) commonyl grown in South Anatolia supported the views of the gene center of these wild species.

**KEYWORDS:** Lentil, SSR markers, Moleculer diversity,

## **TEŐEKKÖR**

Çalıőmalarımın tüm evrelerinde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN'a (Harran Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü), laboratuvar çalıőmalarımda yardımını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL'e (Harran Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü)ve genetik çalışmalarla tanışmamı sağlayan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Latif TEK'e (Harran Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü) teőekkürlerimi sunarım.



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. SSR 113 primerine ait oluşan bant görüntüleri .....	38
Şekil 4.2. SSR 559 primerine ait oluşan bant görüntüleri .....	38
Şekil 4.3. SSR markör analizleri ve Nei genetik uzaklık indeksine göre mercimek çeşit ve türleri arasındaki ilişkileri gösteren dendogram.....	42

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 2.1 Yaygın olarak kullanılan moleküler markör teknikleri .....	11
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan mercimek çeşitleri ve ıslah eden kuruluşlar .....	25
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan Lens türleri, aksesyon numaraları ve kaynak ülkeleri .....	27
Çizelge 3.3 Denemede kullanılan mercimek bitki örneklerine ait DNA miktarları spektrofotometre okuması ve örnekte bulunan DNA miktarı) ve PZR çalışmalarına uygun konsantrasyonun (10 ng/μl) hazırlanması için uygulanan seyreltme oranı .....	31
Çizelge 3.4. PZR karışım hazırlama (Bir örnek için hazırlanacak reaksiyon içeriği) .....	34
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan SSR markörleri, DNA dizileri ve bağlanma (T <sub>m</sub> ) sıcaklıkları .....	38

## SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism - Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
BDT	Basit dizi tekrarları
CTAB	Cetilthree metil amonyum bromid
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribo nükleozid tri fosfat
EDTA	Ethylen dinitrilo tetra acetic acid
EtBr	Etidyum bromit
ICARDA	International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System – Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi
OD	Optik Dansite
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA - Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism – Kesilmiş Parça Uzunluğu polimorfizmi
Rpm	Rotation per minute-Dakikada döngü sayısı
SSR	Simple Sequence Repeat - Basit Tekrar Dizileri
SAMPL	Selective amplication of microsatellite polymorphic loci
Taq	Termusaquaticus
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris- EDTA
T <sub>m</sub>	Melting Temperature-Bağlanma Sıcaklığı
UV	Ultra-viyole

## 1. GİRİŞ

Tarımın başlangıcı ile kültüre alındığı bilinen mercimek (*Lens culinaris* Medik) kendine tozlanabilen, diploid ( $2n=14$ ) ve tek yıllık serin iklim baklagil bitkisidir (Yağmur ve Kaydan, 2004). Mercimek, havanın serbest azotunu toprağa bağlayabilen, genellikle hububatlarla münavebe halinde yetiştirilen, sap ve samanı ise hayvan beslenmesinde kullanılan ve en önemlisi de yüksek oranda protein içermesinden dolayı insan beslenmesinde kullanılan önemli bir baklagildir.

Mercimek gelişmiş yan köklere sahip olup kazık köklüdür. Yüzeğe yakın yan kökler etrafında çimlenmeden 15 gün sonra oluşup çiçeklenme başlangıcı ile sayıları düşmeye başlayan nodüller azot fiksasyonu yaparlar (Şehirali, 1988). Gelişmekte olan ülkelerde mercimek bitkisi besin açısından fakir topraklarda az yada hiç gübrelemeden yetiştirilebilmektedir. Bu durum bitkinin kök yapısının gelişmiş olması ile ilgilidir (Gahoonia ve ark., 2006). Bitki otsu gövdeye sahip olup bitki boyu genotip ve çevre koşullarına bağlı olarak 15-75 cm arasında değişir. Bileşik yaprak formuna sahip olan mercimekte yapraklar 1-8 yaprakçıktan oluşmakta ve üst yapraklar sülükle sonlanmaktadır. Çiçekler salkım formunda beyaz, mor, mavi renklerde olabilmektedir. Meyvesi bakladır ve her baklada 1-2 tohum olabilir. Bitkiye bilimsel ismi olan *Lens culinaris* adı tohumunun lens şekline benzemesi nedeniyle 1787'de Alman botanikçi ve fizikçi olan Medikus tarafından verilmiştir (Cubero ve ark., 1981).

Mercimek yaygın olarak Hindistan'ın belli bölgeleri, Orta Doğu, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika ve Avustralya'da yetiştirilmektedir. Dünya genelinde (yaklaşık 48 ülkede) 3.63 milyon hektar alanda toplam 3.59 milyon tonluk üretime sahip olup 988 kg/ha verim alınmaktadır (FAO 2009). Mercimeğin % 58'i Asya ülkelerinde yetiştirilirken, % 37'si Batı Asya ve Kuzey Afrika ülkelerinde yetiştirilmektedir (Muehlbauer, 2006; Furman ve Baum, 2006).

Mercimek Türkiye'de önemli bir baklagil ürünü olup, ekim alanı yıllara göre dalgalanma göstermektedir. Güncel verilere göre ülkemiz yıllık mercimek üretimi

yaklaşık 210.000 hektar alanda 302.000 ton olup, ortalama verimi 1436 kg/ha ile dünya ortalamasının (1000 kg/ha) üstündedir (FAO, 2009). TÜİK (2010), verilerine göre 2010 yılında kırmızı mercimek ekim alanı 211600 ha, üretim 422000 ton ve verim 2000 kg/ha iken, yeşil mercimek ekim alanı 22800 ha, 25400 ton üretim ve dekara verim ise 111 kg'dır.

Baklagiller dünya nüfusunun beslenmesinde gerekli proteinin yaklaşık %10'unu karşılamaktadır. Türkiye'de günlük olarak tüketilen 74,2 g bitkisel kaynaklı proteinin yaklaşık % 10.5'ini (7.8 g) baklagillerden bununda %76'sını (5.9 g) nohut ve mercimekten karşılanmaktadır. 1995-2002 yılları arasında kişi başına ortalama dünya mercimek tüketimi 0.5 kg olurken ülkemizde bu rakam 5.78 kg olarak gerçekleşmiştir (Aydoğan ve ark., 2002).

*Lens* grubunda, kültüre alınmış *L. culinaris* Medik. ssp. *culinaris*, yabani *L. culinaris* ssp. *orientalis* bulunmaktadır. Ayrıca, 5 tane ilave tür daha tanımlanmıştır. Yabani türler genellikle Akdeniz çevresinde dağılım gösterirken, *L. culinaris* ssp. *orientalis* doğuda Asya'nın ortalarına kadar uzanmaktadır. ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) tarafından belirtilen rapora göre *Lens* taksonomik olarak *L. culinaris* ssp. *orientalis*, *L. odemensis*, *L. ervoides* ve *L. nigricans* olarak 4 gruba ayrılmaktadır (Ferguson ve ark., 1998, Ferguson ve Erskine, 2001).

Mercimek dört yabani ata olan *Lens culinaris*, *Lens ervoides*, *Lens lamottei* ve *Lens nigricans* ve *Lens culinaris*'in alt türleri olan *L. culinaris* ssp. *orientalis*, *L. culinaris* ssp. *odemensis*, *L. culinaris* ssp. *tomentosus* 'tan oluşur. Bu türler arasında *L. culinaris orientalis* günümüzde kültürü yapılan mercimeğin progenitörüdür (ata bitki) (Hamwieh ve ark., 2009). Türkiye mercimeğin önemli gen merkezlerinden biridir ve yabani mercimek türlerinden *L.culinaris*, *L.orientalis*, *L.odemensis*, *L.nigricans*, *L.ervoides* ve *L. tomentosus* bitkileri doğal florada yetişmektedir (Ladizinsky, 1997).

Islah çalışmalarının da temel amaç, bitkilerin genetik yapılarında gerçekleştirilecek değişiklik ile ortaya çıkacak çeşitlilikten yararlanarak yapılacak seleksiyon yoluyla daha kaliteli, önceki çeşide oranla yüksek verimli, hastalık ve zararlılara dayanıklı ve adaptasyon yeteneği yüksek olan yeni çeşitlerin mümkün olduğunca kısa sürede elde edilmesini sağlamaktır. Bitki ıslahında melezlemeler yoluyla genetik işlemlerin ve seleksiyonun etkinliği arttırılmaya çalışılmaktadır. Bunlar çok uzun zaman alan, çok iş gücü gerektiren ve yüksek maliyetli işlemlerdir.

Günümüze kadar uygulanan klasik ıslah programları sayesinde bitkisel ürünlerin kalite ve miktarlarındaki gelişmeler göz ardı edilemez bir gerçektir. Ancak, hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere kültür bitkilerinin diğer birçok tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde klasik ıslah yöntemleri çoğu zaman yetersiz kalmakta ya da oldukça uzun bir zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Oysaki son yıllarda çok hızla gelişen bitki biyoteknolojisi teknikleri sayesinde tarımsal öneme sahip genler farklı bitki türlerinden veya organizmalardan izole edilerek, kültür çeşitlerine kolayca aktarılabilir (Özcan ve ark., 2001).

Moleküler markörlerin çeşitli tipleri (örneğin RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism; AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism; RAPD, Random-Amplified Polymorphic DNA; ISSR, Inter-SSR Amplification) mercimek koleksiyonlarında allelik çeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılırken son yıllarda değişik bitkilerde yaygın kullanım alanı olan SSR (Simple Sequence Repeats, basit dizi tekrarları) markörleri ile mercimekte moleküler karakterizasyon çalışmaları sınırlı seviyede kalmıştır (Babayeva ve ark., 2009).

BDT (Basit dizi tekrarları, mikosatellitler veya Simple Sequence Repeats), DNA belirleyicilerinin genomda çok bulunması, yüksek derecede bilgi içermesi, polimeraz zincir reaksiyonu analizlerinin yapılabilmesi ve primer sekansların yayımlar aracılığıyla laboratuvarlar arasında iletişimin kolaylığı da göz önüne alındığında, bu markörlerin pek çok bitkisel genetik uygulamalarda faydalı olacağı açıktır (Akkaya ve Yalın, 1996).

Islah yöntemlerinin başarısı bu yöntemlerin temelini oluşturan seleksiyon işlemlerinin başarısı ile doğrudan ilgilidir. Çünkü ıslah çalışmaları seleksiyonla başlar ve yine seleksiyonla son bulur (Yüce ve ark, 2010). Klasik ıslah yöntemlerinde öncelikle yerel çeşitlerin genetik varyasyonları göz önüne alınır. Bu yeterli olmazsa başlangıç materyallerine başvurulur. Bu çeşitlilik içinde arzu edilen genotipler seçilir kombinasyon ıslahı, hibrid ıslahı, poliploidi ıslahı gibi bir dizi yöntemler kullanılır. Bu yöntemler oldukça uzun zaman alan ve fazla işgücü gerektiren işlemlerdir.

Günümüzde genetik tanımlamalarda kullanılan tekniklerin başında morfolojik, protein ve DNA belirleyicileri gelmektedir. DNA belirleyicileri, diğer tekniklere oranla daha güvenilir olmaları, çevreden etkilenmeyişi, bitkilerin gelişmelerinin her aşamasında kullanılabilmeleri ve geniş bir varyasyon göstermeleri gibi avantajları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler belirleyiciler, mercimek gibi kompleks genom yapısına sahip bitki türlerinde sağladıkları kolaylıklar nedeniyle daha çok tercih edilmektedir.

Bu çalışmada Türkiye için önem teşkil eden bitkilerden mercimekte SSR markörleri kullanarak Türkiye ve Kanada'da geliştirilen tescilli mercimek çeşitlerinin ve yabancı mercimek türlerinin moleküler karakterizasyonu yapılarak çeşitler arasındaki genetik benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun biçimde yönlendirilmesi açısından protein, izoenzim ve DNA markörleri gibi moleküler markörlerin gerek araştırma gerekse uygulamada kullanımı büyük önem kazanmakta ve bitki ıslahında bunlardan yararlanma olanakları araştırılmaktadır. Moleküler markörler ile yapılan bitki karakterizasyonu çalışmalarıyla bitkilerin genetik tabanları hakkında bilgiler elde edilmekte ve elde edilen bu bilgilerin ıslah çalışmalarında kullanımı önem taşımaktadır.

Bitki ıslahında kantitatif (nitelik) karakterleri etkileyen genlerin klasik ıslah metoduyla aktarılmasında özellikle bağlantı sürüklenmesi (linkage drag) gibi birçok problemle karşılaşılmaktadır (Sönmezoğlu ve ark., 2010). Geleneksel veya klasik ıslah metotlarının başarısını etkileyen tekniklerin başında markör destekli seleksiyon gelmektedir. Markör destekli seleksiyon tarımsal açıdan önem arz eden ve birden fazla gen veya lokus tarafından kontrol edilen karakterlerin etkin bir şekilde aktarılmasını sağlar (Yıldırım, 2005).

**2.1. Genetik Markörler**

Kalıtım şekilleri morfolojik, biyokimyasal ve DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere genetik markörler denir (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Bu karakterlerin markör olarak isimlendirilmelerinin nedeni, çalışılan organizmadaki ilgilenilen diğer özellikler hakkında, dolaylı da olsa, bilgi sağlamalarıdır. Moleküler markörler, DNA'nın aktif bölgelerinden veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilirler (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Kromozom üzerinde yer gösteren küçük bir DNA parçası, gen veya genin bir parçası ya da genler arasındaki bir DNA dizilimi ve bir tür içerisindeki bireyler arasındaki farklılığı gösteren bir işaret gibi farklı tanımlar yapmakta mümkündür (Bovenhuis ve Meuwissen, 1996).



Genetik markörlerin birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Gerek organizmalarda çeşitliğin ve akrabalık derecesinin incelenmesi, parmak izi çalışmaları, genetik, fiziksel haritaların çıkarılması gerekse çeşitli stres etmenleri ile ilişkili genom bölgelerinin bulunması ve genom yapısı hakkında bilgi edinilmesi çalışmalarında DNA markör teknolojisi kullanılmaktadır (Uncuoğlu, 2010).

Genetik markörlerin kullanım alanları; genetik haritaların hazırlanması, doğrudan gen etiketlenmesi, genlerin klonlanması ve genetik parmak izi analizi olarak sıralanır (Özcan ve ark., 2001).

### **Genetik Parmak İzi Analizi:**

DNA profilinin ya da genetik parmak izinin tasarlanabileceğinin başlangıcı Leicester Üniversitesi biyologlarından Alec J. Jeffereys'in kas liflerinde oksijen taşıyan bir protein olan miyoglobin geni üzerine yaptığı çalışmalarla bulunmuştur. Jeffereys bulduğu bu segmentleri minisatalit olarak adlandırmıştır. Çünkü bu segmentler küçük ve genin çok yakınında olup aslında bir genin tasarımını oluştururlar (Romero ve ark., 2009). Parmak izi analizi genetik materyallerin birbirleriyle benzerlik veya farklılıklarının saptanmasını amaçlar güder. Genetik markörlerdeki varyasyonun genlerdeki varyasyonu temsil ettiği varsayımından hareketle parmak izi analizinde markörlerin kullanımı fikri doğmuştur. Parmak izi analizinde aynı anda genomun pek çok yerine dair bilgi sağlayan markörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonuçta genetik materyaller arasında farklılık gösteren lokusların oranları belirlenir. Bu tip analizler bitki ıslah programına alınacak materyallerin seçiminde kullanılır ve varyasyonu yüksek olan hatların kullanımı ile ıslahçı daha geniş bir değişim içinde istediklerini seçme şansına sahip olur (Özcan ve ark, 2001). Tüm yüksek yapılı organizmaların genomlarındaki bir veya daha fazla özelliğin karakterizasyonu DNA bantlarının ortaya koyulması ile olur. Farklı büyüklükteki ve farklı sayıdaki DNA bantlarının ortaya koyulması ile her birey için DNA parmak izi elde edilmiş olur.

### 2.1.1. Morfolojik Markörler

Morfolojik markörler, çok uzun zamandır bilinmelerine rağmen sayılarının az oluşu yanında çevreden ve diğer etmenlerden etkilenmeleri nedeniyle fazlaca kullanılmamaktadırlar. Esas avantajları analizlerinin kolay olmasıdır.

Morfolojik markörlerin avantajları genellikle dominant olmaları ve analizlerinin çok kolay olmasıdır. Morfolojik markörlerin dezavantajları ise sayıca az olmaları, heterozigotları belirleyememeleri, mutasyonlarla oluşmuş olabilmeleri ve çevresel faktörlerden kolayca etkilenmeleridir.

Ahmad ve ark. (1997), krolla rengi, gövdedeki antosiyanin, çiçek rengi gibi morfolojik markörleri kullanarak *Lens* cinsindeki türleri sınıflandırmışlardır. *Lens* cinsine ait 22 örnekte morfolojik karakterlerle genetik ilişkiler araştırılmış ve *L. culinaris* ssp. *orientalis*, *L. nigricans* ve *L. odemensis* aynı grupta toplandığı fakat *L. ervoides* ve *L. culinaris* ssp. *culinaris* ayrı ayrı gruplarda toplandığı belirlenmiştir.

Solmaz ve Sarı (2009), 134 kavun (*Citrullus lanathus*) hattında morfolojik özelliklerin karakterizasyonunu belirlemişlerdir. Çalışmada 134 hat UPOV tanımlanma listesine göre 56 kalitatif karakter (6 fide, 4 bitki, 11 yaprak, 5 çiçek, 23 meyve ve 7 tohum) morfolojik olarak karakterize edilmiştir.

### 2.1.2. Protein Markörleri

Protein markörleri, depo proteinleri ve enzim proteinleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Depo proteinleri bir jel üzerinde hareket ettirilip boyandıklarında, farklı genotiplerde ortaya çıkan yapı farklılıkları genetik markör olarak kullanılabilir. Enzim markörleri de kendi arasında iki grup altında incelemektedirler. Bunlar alloenzimler ve izoenzimlerdir. Alloenzimle birbirinden ayrı edilebilen allelleri bulunan enzimleri ifade eder. İzoenzimler ise farklı genler tarafından üretilen fakat birbirine çok benzeyen enzimleri ifade eder. Enzim markörlerinin avantajları,

kodominant olmaları, analizleri çabuk, ucuz ve güvenilir olması, çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmemeleri, morfolojik markörlerden sayıca fazla olmalarıdır. Buna karşın dezavantajları olarak da sayılarının çok az olması ve bazı izoenzimlerin ancak özel dokularda ve belli bir gelişme periyodunda aktif olmalarıdır.

Balkaya ve Yanmaz (2002), tarafında taze tüketime hazır olarak geliştirilen 15 fasulye çeşidi ile ülkemizde ticari olarak yetiştirilen 5 taze fasulye çeşidi üzerinde morfolojik çeşit özellikleri dikkate alınarak hem de protein markörleri yardımı ile tanımlanmaları çalışmasını yapmışlardır. Araştırma sonucunda çeşitlerin hem morfolojik hem de protein bant sayısı ile bant uzunlukları yönünden farklılık gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Mercimekte genetik çeşitlilik çalışmaları genelde morfolojik özellikler, izoenzim ve tohumdaki protein oranları bakımından incelenmiştir. Fakat bu markörler sadece kısıtlı polimorfizm göstermekte ve çevre şartlarından etkilenmektedirler.

### **2.1.3. DNA markörleri**

DNA markörleri farklı genotiplere ait DNA nükleik asit dizilişi farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markörlerdir. Nükleik asit temeline dayalı genetik markörlerin genom analizinde kullanımı ıslahçılar açısından ihtiyaç duyulan bir alandır. Bu markörler kullanılarak genetik varyasyon araştırılabilir, türlerin taksonomik tanımlanması yapıp filogenetik akrabalıkları bulunabilir. Moleküler seviyedeki çeşitlilik bilgilerinin gen bankalarında gen kaynaklarının korunması stratejilerinde ve yabancı gen kaynaklarının ıslah programına alınmasının başlanmasında önemli bilgilerin elde edilmesini sağlarlar (Babayeva ve ark., 2009).

Moleküler markörler görünür özelliklere dayanan morfolojik markörlerden ve genlerin ürünü olan proteinlere dayanan biyokimyasal markörlerden farklı olarak DNA düzeyindeki analizlerle saptandıklarından dolayı DNA markörleri olarak bilinirler. Moleküler markörler ile genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen

bölgesi ile ilişkili biyolojik etkisi olmayan ve sonraki nesillere aktarılan DNA parçası temsil edilmektedir (Uncuoğlu, 2010).

Moleküler markörler genel olarak kalitatif ve kantitatif özelliklerin ıslahında seleksiyon süresini kısaltarak maliyetleri düşürmekte ve buna ilaveten genetik bağlantı haritaları oluşturulmasında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası akrabalık derecelerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Genetik parmak izi çalışmaları genetik çeşitlilik ve genetik kaynakların etkin korunması ve muhafazasında kullanılacak metotlar hakkında önemli bilgiler vermektedir (Babayeva ve ark., 2009). Soy ağacı analizleri, bağlantı haritalamaları ve seleksiyon programlarında kullanılabilir.

DNA markörleri; DNA melezleme markörleri ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayalı DNA çoğaltım markörleri olmak üzere iki başlık altında toplanırlar.

### **2.1.3.1. DNA Melezleme Markörleri**

#### **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi olarak adlandırılırlar. Tanıma yerinin baz dizilişi değişikliği farklı genotipler arasında polimorfizmin bir sebebidir. Ancak bu polimorfizim daha yaygın olarak kesim enzimin tanıdığı iki kesim bölgesi arasında parça eklenmesi veya çıkmasından kaynaklanır. RFLP markörlerinden faydalanmak kısa ömürlü radyo aktif materyal kullanımı gerektirir, bu durum sınırlayıcı etmendir (Uncuoğlu, 2010). RFLP analizi, hücreden izole edilen genomik DNA'nın belirli bir noktadan nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve prob (sonda) DNA'nın melezi olduğu DNA etrafındaki farklı kesim yapılarının saptanması esasına dayanır (Özcan ve ark., 2001).

RFLP tekniğinin türler, cinsler hatta familyalar arasında transferi mümkündür. Güvenilirdir, bu sayede farklı laboratuarlarda ve farklı araştırmacılar tarafından aynı

sonuçlara ulaşılabilmektedir. RFLP markörleri kodominant özellikte oldukları için heterozigotların belirlenmesinde ve karakterizasyonlarında kullanılmaktadırlar ve orta düzeyde polimorfizm göstermeleri bu markörlerin avantajları arasındadır. Bu tekniğin bazı dezavantajları da mevcuttur. Bunlar; analizleri pahalı, fazla zaman alıcı ve çok fazla iş gücü gerektirmektedir. Çoğu durumda yaygın olarak radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılmaktadır. Yüksek kaliteli DNA'ya ihtiyaç vardır. Az kopya edilen dizilerin genomlarda belli noktalarda kümelenmelerinden dolayı RFLP markörleri genom üzerinde rastgele dağılım göstermezler. Bu durum haritalamada büyük boşluklar oluşturacağı için olumsuz etkiler.

### 2.1.3.2. PZR Kullanımına Dayanan Moleküler Markörler

Bu markörler polimorfik bölgelerin çoğaltımındaki farklılığı saptamak amacıyla çeşitli tipteki primerlerin PZR kullanımına dayanır. PZR, hücrede normal şartlar altında gerçekleşebilen doğal DNA replikasyonunun laboratuvar şartlarında özel 'termocycler' yardımı ile gerçekleşmesi olayına denir. Diğer bir tanımlama ile PZR, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinden seçilmiş, bir veya birden fazla oligonükleotid primerler ve saflaştırılarak elde edilmiş olan tag polimeraz enzimleri kullanılarak bir otomatik termocyclen sistemi yardımıyla *invitro* şartlar altında çoğaltılma metodudur (Devrim ve Kaya, 2004). PZR işleminde amaç, dizilimi bilinen iki bölge arasında bulunan bir DNA parçasını çoğaltmaktır.

PZR, çift iplikli bir DNA molekülünde, hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerde melezlenirler. Primerlerin, spesifik olan hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit dNTP varlığında primerlerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur (Devrim ve Kaya, 2004).

PZR tekniği günümüzde birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar, tanı ve teşhis, genetik yapısı değiştirilmiş bitki ve organizmaların tespiti, moleküler klonlama (DNA klonlaması) ve DNA baz dizilişlerinin belirlenmesi ile genetik akrabalık ve adli tıp vakalarının çözülmesi.

Farklı genotiplerde DNA dizilisinin farklı olması nedeniyle aynı primerlerin kullanılması ile farklı DNA ürünleri elde edilir. Bu farklı ürünler genetik markör olarak kullanılmaktadır. Bu şekilde çok değişik DNA markör tipleri geliştirilmiştir. Moleküler genetik laboratuvarlarında PZR kullanımına dayalı SSR, AFLP, RAPD ve ISSR gibi DNA markörleri rutin bir şekilde başarıyla kullanılmaktadır. Aşağıda SSR, RAPD, AFLP ve ISSR markör tekniklerinin İngilizce ve Türkçe isimleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.**Yaygın olarak kullanılan moleküler markör teknikleri

<b>Teknikler</b>	<b>İngilizce Adı</b>	<b>Türkçe Açık Adı</b>
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	Çoğaltılmış Parça uzunluğu Polimorfizmi
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Kesilmiş Parça uzunluğu Polimorfizmi
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences	Bölünerek Çoğaltılmış Polimorfik diziler
DAF	DNA Amplification Fingerprinting	Çoğaltılmış DNA Parmakizi
ISSR	Inter-SSR Amplification	Raslantısal Basit Dizi Tekrarı
RAPD	Random-Amplified Polymorphic DNA	Raslantısal Çoğaltılmış Polimorfik DNA
SSR	Simple Sequence Repeats	Basit Dizi Tekrarı
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region	Sekansı Tanımlanmış Çoğaltılmış Bölge Polimorfizmi
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Tek nükleotid Polimorfizmi

### **RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - Rastlantısal çoğaltılmış plimorfik DNA)**

RAPD ilk defa 1990'da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PZR'ı temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA olarak adlandırılır. 6-10 nükleotid uzunluğundaki başlatıcı DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Polimorfizimler primer bağlanma noktalarındaki mutasyon yada dizi değişikliklerinin sonucunda, bantların varlığı ve yokluğuna dayanılarak belirlenir. Yöntemin temel prensibi, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak PZR ile çoğalma yapmasıdır (Özaydın, 2004). Çabuk sonuç vermesi, ucuz olması ve az iş gücü gerektirmesi ile az miktarda DNA ile çalışılabilmesi ve polimorfizim oranının yüksek olması tekniğin avantajlarıdır. Güvenirliliğinin sınırlı olması, farklı laboratuarlarda farklı sonuçlar hatta bir "termocycler" cihazından diğerine farklı sonuç verebilmesi, dominant markör olması ve bu yolla elde edilen markörlerin diğer haritalara transferde yaşanan zorluklardır tekniğin dezavantajları arasındadır.

### **AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Plimorfizmi)**

Çoğaltılan parça uzunluğu polimorfizmi olarak adlandırılır. AFLP tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. Bu teknikte genomik DNA önce birisi altı, diğeri dört taban tanıyan iki kesim enzimi tarafından kesilir. Kesilen parçaların uçlarına nükleotid dizilişi sentetik olan DNA'lar eklenir. Eklenen sentetik DNA'nın nükleotid dizilisini de taşıyan başlatıcı DNA'lar (primerler) kullanımıyla nispeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Bu çoğaltma iki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada, her iki uçtan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı ön üretim yapılır. Asıl üretimde ön üretimde elde edilen parçaların kullanımıyla kesim enzimi tanıma

yerinden sonraki ikinci ve üçüncü nükleotidler için secici üretim yapılır. Bütün başlatıcılar sentetik uçların nükleotid dizilişini de taşıdığı için üretim oldukça spesifik şartlarda yapılmış olur (Zabeau, 1993). Üretilen parçacıklar bir baz uzunluğu farklarını dahi ayırt edebilen poliakrilamid jel (dizileme/sekanslama jeli) üzerinde hareket ettirilerek farklı genotiplere ait farklılık gösteren parçacıklar tespit edilir. Bu teknik RAPD'den yavaş fakat RFLP tekniğinden hızlıdır, masraf, iş gücü ve güvenilirlik açısından RAPD ve AFLP arasındadır. Çok sayıda aynı anda etkili bir şekilde tarama yapması nedeni ile parmak izi analizine çok uygundur. Sayıları RAPD ve RFLP'den daha fazladır. Tekniğin uygulanmasında genomik DNA'nın bilinmesine gerek yoktur. Polimorfizm oranı çok yüksektir ve bu özelliklerinden dolayı otomasyona uygundur. Teknik bazı dezavantajlara da sahiptir bunlar, çoğunlukla dominant markör verirler. Ancak son zamanlarda kodominant markörde verdiği bildirilmiştir. Farklı genetik haritalar arasında transferleri güçtür.

### **SSR (Simple Sequence Repeats - Basit Dizi Tekrarı)**

Basit dizi tekrarları bütün ökaryotik genomlarda bulunmakta ve genom boyunca 1-6 nükleotid uzunluğundaki motiflerin ardışık sıralı tekrarlarından meydana gelmektedir. Bu diziler DNA replikasyonunda hatalar sonucu oluşurlar. Bu motifler örneğin (AT)<sub>n</sub>, (GT)<sub>n</sub>, (ATT)<sub>n</sub>, (GACA)<sub>n</sub> şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. SSR markörleri olarak bilinen mikrosatellitler genetik çeşitliliğin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Lapitan ve ark., 2007).

Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların PZR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık SSR tekrarlarının sayısındaki farklılık, PZR sonucu farklı uzunlukta parça çoğaltımıyla sonuçlanır. Bu tekrarlar çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol açan mutasyonlar nedeni ile oldukça polimorfiktir (Gupta ve ark.,1994). SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PZR metodu vasıtasıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir. Ancak bu metodun kullanılabilmesi için ilgili lokuslara ait primer sekanslarının önceden bilinmesi



gerekir. Ancak kullanılacak primerler belirlendikten sonra farklı araştırmacılar tarafından rahatlıkla kullanılabilir. SSR primerlerinin üretiminde genel olarak üç farklı yaklaşım bulunmaktadır: a) Genomik DNA kütüphanelerinin SSR oligonukleotidleri ile hibridizasyon yoluyla gözlenmesi, b) DNA veri bankalarında SSR'ların araştırılması, c) Akraba bitki türlerinde geliştirilmiş olan SSR-spesifik primerlerinin kullanımınıdır (Özcan ve ark., 2001).

SSR-spesifik primer çiftleri (ileri ve geri çalışan primerler) PZR çoğaltımı için mikrosatelitleri çevreleyen diziler temel alınarak dizayn edilirler. Mikrosatelitlerin en önemli dezavantajı yeni markör geliştirilmesinin güçlüğüdür. Yeni markör geliştirilmesi için genomik DNA klonlarının tekrarlanan oligonukleotid içeren problemlerle melezlenme yoluyla bulunması, nükleotid dizilerinin belirlenmesi ve yan yana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş yerlerine özel başlatıcı DNA'lar geliştirilmesi gerekmektedir. Bu da oldukça iş gücü gerektiren pahalı bir işlemdir. Buna karşın SSR'lar yüksek oranda polimorfik olduklarından bitkilerde oldukça fazla bilgi vericidir. Ayrıca eşbaskın (kodominant) olmaları ve PZR kolaylığına sahip olması da kullanım oranını artırmaktadır. SSR tekniği sahip olduğu avantajları nedeniyle bitkilerde genetik haritalama çalışmalarında kullanımı her geçen gün artmaktadır.

### **ISSR (Inter Simple Sequence Repeats-Rastlantısal Basit Dizi Tekrarı)**

ISSR yöntemi, ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan RAPD yöntemine göre çok daha hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. ISSR markörlerinin genetik çeşitliliğin belirlenmesinde, filogenetik çalışmalarda, genom haritalarının oluşturulmasında ve evrim biyolojisinde birçok tarla bitkisinde uygulanabilecek yararlı bir teknik olduğu rapor edilmiştir. RAPD markörleri gibi ISSR markörleri de kullanımı hızlı, uygulanması kolay fakat primerleri daha uzun olduklarından güvenilirlikleri fazladır (Bornet ve Branchard, 2001).

## 2.2. Genetik Çeşitlilik Çalışmaları

Abo-elwafa ve ark. (1995), mercimekte intra ve interspesifik çeşitlerin RAPD markörleri ile ortaya çıkarılması çalışmasında 20 kültürü yapılan *culinaris* hattı ve 16 yabancı akraba ile çalışmışlardır. Çalışmada 50 skorlanabilir bant üretilmiş olup bunların %90'nı polimorfik olarak tespit edilmiştir. Genetik mesafenin basit uyumlu katsayı (simple matching coefficient) ile hesaplanan çalışmada *L. culinaris* ssp. türünün *L. orientalis*'in progenitör olduğubelirlenmiştir.

Ahmad ve ark. (1996), RAPD markörleri kullanarak *Lens* türleri ve ebeveyn türler ve interspesifik hibritler arasındaki genetik akrabalıkları belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmayla kültürü yapılan mercimeklerin RAPD markörü yardımıyla orijinlerinin belirlenmesi ve mercimek gen kaynakları içinde genetik çeşitlilik oranını ölçmeyi amaçlamışlardır. 3 kültür çeşidi ve 4 yabancı türün kullanıldığı çalışmada 158 bant üretilmiş ve skorlanmıştır. Araştırmacılar kültürü yapılan türlerin genetik çeşitliliğinin yabancı türlere oranla dar olduğunu, *L. culinaris* ssp. *orientalis* türlerinin, kültür çeşitlerinin progenitörü olduğunu ve *Lens* interspesifik hibritlerinde genetik materyallerin taşınması özel olduğunu belirtmişlerdir.

Sharma ve ark. (1996), 6 kültür çeşidi popülasyonu ve bunların yabancı akrabalarını temsil eden 56 mercimek hattı ile mercimeğin genetik çeşitlilik ve akrabalık derecesini AFLP analizi ve RAPD analizi ile kıyaslanması çalışmasında, her iki metodunda mercimeğin akrabalık derecesi ile ilgili benzer sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir. Çalışmada ayrıca AFLP tekniğinin RAPD'e oranla daha yüksek seviyede polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir.

Nagaoka ve Ogihara (1997), diploid, tetraploid ve hekzaploid üyeleri içeren 6 buğday aksiyonunda ISSR markörleri ile yapılan genetik akrabalık ve çeşitlilik sonuçlarının RAPD ve RFLP ile yapılan sonuçlarla aynı olduklarını ve ISSR

markörlerinin genotiplerde kullanım ve güvenilirliğinin yüksek olduğunu bildirilmişlerdir.

Ahmad ve ark. (1997), lens türleri ve onların interspesifik hibritlerinin arasındaki akrabalık ve genetik çeşitliliğin SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphat polyacrylamide gel elektroforesis)'le belirlenmesi çalışmasını yapmışlardır. Çalışmada kültürü yapılan mercimek tohumun proteinleri, yabancı akrabaları (*L. culinaris* ssp. *orientalis*, *L. odemensis*, *L. ervoides*, *L. nigricans*) ve bunların F1 generasyonları kullanılmıştır. Protein bantları bulunup bulunmama durumlarına göre skor edilmiş olup genetik mesafe 'spilt decomposition analysis' ile hesaplanmış ve *L. culinaris* ssp. *orientalis*, *L. odemensis* kültür çeşitlerinin progenitörü olduğu, hibrid F1'ler ise ebeveynlerinden farklı derecede genetik benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Barrett ve Kidwell (1998), Kuzeybatı Pasifik'te toplamda 56 buğday çeşidiarasında AFLP markörleri kullanarak yaptıkları çalışmada, 229 polimorfik 1749 monomorfik olmak üzere toplamda 1978 band elde etmişlerdir. AMOVA bilgisayar programı kullanarak yaptıkları genetik akrabalıkların tespitinde ise guruplar yazlık ve kışlık olmak üzere iki ana guruba ayrılmıştır. Genetik farklılık seviyesi en yüksek 0.58 ve en düşük 0.49'la yazlık çeşitlerde tespit edilirken kışlık çeşitlerde 0.53 olarak belirlenmiştir.

Sonnante ve Pignone (2001), çoğunluğu İtalya'dan olan fakat Akdeniz ve yabancı gen kaynaklarını da içeren yerel çeşit mercimek koleksiyonunun RAPD ve ISSR markörleri kullanarak değerlendirmişlerdir. 46 hat (22 büyük tohumlu, 24 küçük tohumlu) kullanılan çalışmada örneklerin getirildikleri bölgelere göre daha yakınlık gösterdikleri belirlenmiştir. Jaccard benzerlik indeksine dayalı UPGMA programı ile hazırlanan ağaçta RAPD ve ISSR ayrı ayrı alınmış ve benzer salkım üretmemişlerdir. Bununla birlikte her iki sonuç için, Etiyopya'dan olan elde edilen hat diğerlerinin birçoğundan farklılık göstermiş, aynı zamanda dikkate değer çeşitlilik seviyesi göstermiştir.

Iruela ve ark. (2002), RAPD ve ISSR markörleri ile 75 adet nohut genotipinde yaptıkları filogenetik çalışmada 243 polimorfik fragment elde etmişlerdir. Jaccard benzerlik indeksi sonuçların göre nohuttaki çeşitliliğin dağılımı yetiştikleri habitat ve coğrafik orijinleri ile ilişki gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Nguyen ve ark. (2004), AFLP markörleri kullanarak nohutta 17 türü (16 yabani, 1 kültür türü) temsil eden genotipler ile yaptıkları çalışmada, genetik çeşitlilik bakımından nohut türlerini üç grup altında toplamışlardır. Grup1; *C. arietinum*, *C. echinospermum*, *C. reticulatum*, Grup 2; *C. bijugum*, *C. judaicum*, *C. pinnatifidum* ve Grup 3; *C. anatolicum*, *C. canariense*, *C. cuneatum*, *C. flexuosum*, *C. macracanthum*, *C. microphyllum*, *C. multijugum*, *C. nuristanicum*, *C. oxyodon*, *C. songaricum*, *C. Yamashitae* türlerini kapsamaktadır. Türler içinde en yüksek çeşitlilik *C. pinnatifidum* ve *C. reticulatum* da görülmüştür. En düşük çeşitlilik ise *C. macracanthum* da belirlenmiştir.

Sudupak (2004), iki çok yıllık ve sekiz tek yıllık *Cicer* türü arasındaki genetik benzerlik ve akrabalığı belirlemek için 6 ISSR primeri kullanmıştır. Elde edilen 150 ISSR bandmeticesinde çok yıllık bir tur olan *C. insicum*'un tek yıllık türlerden *C.judaicum*, *C.bijugum* ve *C. pinnatifidum*'un oluşturduğu kümeye yakın olduğunu bildirmiştir. Ayrıca *C. reticulatum* türü de kültür nohodu *C. arietinum*'a en yakın tür olarak belirlenmiştir. Araştırmacı, ISSR tekniğinin *Cicer* türlerinin genetik akrabalık ve benzerliğinin belirlenmesinde güvenilir, hızlı ve ucuz bir teknik olduğunu bildirmiştir.

Aydınoğlu ve ark. (2005), DNA minisatelit markörlerikullanarak fiğde tane veriminin önceden belirlenmesi olanakları için yaptıkları çalışmada, tane verimi ile hatların genetik akrabalıkları arasında benzerlikler saptamışlardır. Çalışmada 10 adet fiğ hattı kullanılmıştır. Benzer ilişkiyi tane ağırlığı ve hatların genetik yakınlığı arasında da test etmişlerdir. Bu çalışmayla DNA markörleri ile çalışılarak tane verimi yüksek hatlar arasında bulunan genetik ilişkiler uzun tarla denemelerini beklemeden, önceden belirlemede kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Erkılınç ve Karaca (2005), 25 SSR markörü ile 36 pamuk çeşidi arasındaki genetik varyasyonu inceledikleri çalışmalarında, özellikle bazı yeni çeşitlerde genetik akrabalığın çok yakın olduğunu, Türk pamuk çeşitlerinin genetik temellerinin ise oldukça dar olduğunu ve çeşitlerde fiziksel ve genetik karışım bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Bilgin ve Korkut (2005), RAPD markörleri kullanarak 20 ekmeçlik buğday çeşit ve hatlarında (Sana, Kate A-1, Pehlivan, Saraybosna, Flamura-85, Flamura-80, Bezostaja-1, Prostar, MV-17, Mirjina, IBWSN-42, IBWSN-58, IBWSN-62, ME-2 (51), ME-7 (274), ISWYN-9, ISWYN-14, ISWYN-24, ISWYN-29) genetik akrabalık derecelerini belirleyerek çeşit ve hatlar arasında mevcut olan benzerlik ve genetik farklılıkları ortaya çıkarmışlardır.

Perez ve ark. (2005), SSR markörlerinin moleküler karakterizasyon, muhafaza ve genetik çeşitlilik açısından kaysı ıslahında uygulanması çalışmasında farklı ülkelerden (İspanya, Kuzey Amerika, Fransa ve Almanya) elde edilen 8 kültür çeşidi kaysı için 17 SSR markörü kullanmışlardır. Bu SSR markörlerinden 14'ü polimorfik amplifikasyon üretmiş olup elde edilen data UPGMA analizi ile şema haline getirilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre ıslah programına alınan kaysı çeşitleri için genetik çeşitliğin hesaplanmasında SSR markörlerinin oldukça yararlı olduğunu belirtmişlerdir.

Chowdhury ve ark. (2002), nohutta kültür ve ıslah hatları kullanarak çeşit teşhisi ve genetik akrabalıkların belirlenmesi çalışmalarında 22 RAPD ve 22 ISSR markörü kullanmışlardır. 19 örneğin kullanıldığı çalışmada UPGMA programı kullanmışlardır. ISSR markörlerinin polimorfizm oranlarının daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Baydar ve ark. (2005), 23 AFLP ve 9 mikrosatelit kullanarak Isparta gülünde genetik ilişkilerin belirlenmesi üzerine çalışmada yağlık güller arasında polimorfizm bulunmadığını ve bu sonuçlara göre güller yöresinde yetiştirilen yağ gülü bitkilerinin

orijinlerinin aynı olduğunu ve vejetatif olarak üretildikleri için günümüze kadar genetik çeşitlilik göstermediğini belirtmişlerdir.

Sonnante ve Pignone (2006), başlıca İtalyan mercimeklerinin olası orjinlerini en doğru biçimde hesaplamak amacı ile yaptıkları çalışmada ISSR markörlerini kullanmışlardır. Çalışmada ülkenin farklı bölgelerinden rastgele seçilmiş 11 örnekle çalışılmıştır. AMOVA bilgisayar programı ile hesaplanan sonuçlara göre yerel mercimekler yüksek derecede benzerlik göstermişlerdir.

Yüzbaşıoğlu (2005), 14 çeşit (Kafkas, Özbek, Yerli kırmızı, Çiftçi, Ali Dayı, Malazgirt, Sultan, Kayı, Emre-20, Fırat, Meyveci-2001, Erzurum, Pul 11, Seyran) ve 36 hattın kullanıldığı, genetik varyasyonun belirlenmesi çalışmasında SDS-PAGE ve RAPD markörleri kullanmıştır. Araştırmacı RAPD sonucuna göre mercimek çeşitlerini 3 ana guruba ayırmıştır. Bu üç ana gurubun içindeki çeşitlerin kendi arasında farklılık gösterdiğini, birinci grup içinde Malazgirt, Fırat, Erzurum, Pul 11, ve Sultan çeşitlerini, ikinci grupta Kafkas, Özbek, Yerli kırmızı, Çiftçi, Ali Dayı, Emre-20, Meyveci-2001, Kayı ve üçüncü grupta ise sadece Seyran çeşidinin bulunduğunu kaydetmiştir.

Saraçoğlu (2007), yedi tek yıllık *Cicer* (nohut) türünden toplam 22 aksesyon kullanmak yaptığı moleküler karakterizasyon çalışmasında RAPD ve ISSR primerleri kullanmıştır. Çalışma sonucunda Jacard benzerlik indeksine göre hesaplanan dendogramda *C. arietinum* ve *C. reticulatum* diğer türlerden uzak kendi aralarında akrabalık ilişkisi göstermişlerdir. Çalışmada Türkiye'nin Güneydoğu'sunun nohutun anavatanı olduğu görüşünü destekleyici sonuçlar elde edilmiştir.

Yong Bi ve ark. (2007), SSR markörleri ile Kanada kültür ve yabani soyalarının genetik çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmalarında, 45 kültür ve 37 yabani çeşitte 37 SSR primer çifti kullanarak 234 polimorfik bant elde etmişlerdir. UPGMA dendogram programı ile yapılan salkım analizi çizelgesinde başlıca yedi grup belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak yabani soya fasulyelerinin genetik çeşitliliğinin kültürü yapılanlara oranla fazla olduğu belirtilmiştir.

Lapitan ve ark. (2007), 24 Filipin çeltik çeşidinde 164 SSR markörü ile genetik çeşitlilik değerlendirmesi yapmışlardır. Çalışmada 151 polimorfik markörle 890 allel belirlenmiştir. Shannon çeşitlilik indeksini temel alarak yapılan analizde toplamgenetik çeşitlilik 0.71 olarak belirlenmiş ve kültür çeşitleri arasında yüksek seviyede genetik çeşitlilik olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarlarıyla SSR markörlerinin kültür çeşitlerinin alt türlerine göre sınıflandırılmasının kolaylaştığını rapor etmişlerdir.

Ağar (2007), turunçgil ve akrabalarına ait cins, tür, çeşit ve tiplerinden oluşan 88 örnekle yapılan moleküler karakterizasyon çalışmasında 14 SSR markörü kullanmış olup oluşan bantlar Nei ve Li tarafından geliştirilen benzerlik indeksi formülüne göre hesaplanmıştır. Elde edilen verilerin NTSYS PC programında yapılan analizler sonucunda oluşturulan dendogramda benzerlik indeksi 0.98 ile 0.31 arasında değişmiştir.

Liu ve ark. (2008), SSR markörleri ile mercimek (*Lens culinaris* Medik.)'te genetik çeşitlilik ve popülasyon yapısının belirlenmesi çalışmasında, Çin Ulusal gen Bankasından aldıkları 440 mercimek hattıyla çalışmışlardır. Çalışmada 14 SSR primeri kullanılmış olup genetik çeşitlilik hesaplanması UPGMA analizi ile hesaplanmıştır. Cluster analizine göre sekiz ana sınıfa ayrılan örneklerde Çin'in yerel mercimeklerinde genetik çeşitliliğin yabancı kökenli çeşitlere oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Yong Bi ve Williams (2008), 25 yulaf türünde AFLP markörleri ile genetik çeşitlilik çalışmasında, 413 AFLP polimorfik bandı elde etmişlerdir. AMOVA bilgisayar programı kullanarak yaptıkları bu çalışmada polimorfik band sıklığının 0.006 ile 0.994 arasında değiştiklerini belirtmişlerdir.

Achleitner ve ark. (2008) dünya çapında yayılım göstermiş 114 yulaf (*Avena sativa*) varyetesinde 8 AFLP primer kombinasyonu ile üretilen 77 moleküler polimorfizmi temel alarak genetik çeşitliliği değerlendirmişlerdir. Çalışmada genetik

benzerlik DICE katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır. Toplamda 8 AFLP primer kombinasyonu ile 87 polimorfik AFLP fragmenti tespit etmişlerdir.

Babayeva ve ark. (2008), SSR markörleri kullanarak Orta Asya ve Kafkasya bölgesinde yetiştiriciliği yapılan 39 mercimek çeşidinde yaptıkları genetik parmak izi çalışmalarında, toplam 33 allel belirlemiş olup çeşitler arasında genetik farklılık seviyesinin 0.66 ve genetik benzerlik indeksinin 0.24 ile 1 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Çalışmada kullanılan SSR markörlerinin çeşit ayırımında ve çeşitleri gruplamada etkin olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar elde edilen çeşitlilik bilgilerinin gen bankalarında gen kaynaklarının korunması stratejilerinde, Orta Asya ve Kafkasya'da yabancı gen kaynaklarının ıslah programına entegre edilmesinde önemli bilgiler verdiğini belirtmişlerdir.

Toklu ve ark. (2008), ISSR ve AFLP markörleri kullanarak Güneydoğu Anadolu Bölgesinden topladıkları 38 yerel mercimek hattı ve 6 tescilli çeşit ( Fırat-87, Yerli kırmızı, Çağıl-2004, Çiftçi, Kafkas, Özbek) ile yaptıkları çalışmada, mercimek hat ve çeşitleri arasında önemli ölçüde genetik benzerlikler ve farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Elde ettikleri bilgiler ışığında mercimek çeşit ve hatlarını benzerlik ve farklılıklarına göre iki ana gruba ayırmışlardır. Karacadağ/Diyarbakır bölgesi mercimek çeşitleri diğer bölgelerden önemli farklılıklar göstermişlerdir. Tescilli çeşitlerden, Fırat-87 ve Çağıl-2004 aynı grupta yer alırken, Kafkas, Özbek, Çiftçi ve Yerli Kırmızı farklı grupta yer almıştır. Araştırmacılar Türkiye'deki yerel mercimek hatları arasında hala genetik çeşitlilik kaynağını temsil edecek şekilde mercimek hatlarının mevcut olduğunu belirtmişlerdir. Bununda güneydoğu bölgesindeki çiftçilerin özellikle kendi bölgelerine adapte olmuş çeşitleri kendi seleksiyon yöntemleri ile küçük alanlarda yetiştirmesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu alanlar hala mercimek ıslahında önemli rol oynamaktadır.

Altıntaş ve ark. (2008), Türkiye'deki ekmeklik ve makarnalık buğdayların AFLP ve SAMPL (selective amplication of microsatellite polymorphic loci) markörleri ile genetik çeşitliliğinin hesaplanması çalışmasını yapmışlardır.



Araştırmacılar 12'si makarnalık 22'si ekmeklik olma üzere 34 yerli ve yabancı kaynaklı olup Türkiye'de kültürü yapılan çeşitle çalışmışlardır. Çalışma sonucunda skorlanan 344 banttan 214'nü polimorfik olarak tespit etmişlerdir. Dendogram programı olarak UPGMA'yı seçen araştırmacılar örnekleri iki ana başlık altında toplamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmalarlarıyla eski ve yeni kültürü yapılan buğday çeşitlerinin genetik çeşitliliğinin sınırlı olduğunu belirtmişlerdir.

Ganeva ve ark. (2009), 102 Bulgar buğday çeşidinde 14 SSR (mikrosatellit) markörü kullanarak, toplamda 100 allel yeri tanımlamışlardır. Genetik çeşitlilik değeri 0.23 ile 0.77 arasında olup ortalama 0.52 olarak tespit edilmiştir.

Hamwieh ve ark. (2009), 14 mikrosatelit markör (SSR) ile mercimek genetik çeşitliliğinin belirlenmesi için 15 ülke (Bangladeş, Hindistan, İran, Ürdün, Pakistan, Suriye, Türkiye, Sırbistan, Filistin, Ermenistan, Kıbrıs, Özbekistan, Tacikistan, Türkmenistan ve Lübnan)'den elde edilen 109 genotip ve 52 yabancı tip üzerinde çalışma yapmışlardır. Toplamda alleller üzerinde 182 mikrosatelit yeri belirlemişlerdir. Genetik çeşitlilik indeksi yabancı çeşitlerde 0.16 il 0.93 arasında değişirken kültür çeşitlerinde 0.03 ile 0.87 değiştiği belirtilmiştir. Cluster analizinde ise tüm mercimek çeşitleri kültürü yapılan ve yabancı çeşitler olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Çalışmada farklı mercimek türleri arasındaki genetik çeşitlik ve akrabalığın, genetik kaynakların korunmasında ve ıslah programlarında kullanılmasında büyük öneme sahip olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar morfolojik markörler üzerinde moleküler markörlerin kullanılmasının başlıca yararının bu markörlerin hatlar arasında genetik uzaklık-yakınlığın ve genetik çeşitliliğin belirlenmesinde daha iyi bir gösterge olması ve bu sayede hatlar arasında bağımsız seleksiyonu sağladığını vurgulamışlardır.

Fiocchetti ve ark. (2009), 3 tip iri tohumlu İtalyan mercimek çeşitlerinde florasan temelli AFLP markörleri ile parmak izi analizi yapmışlardır. Çalışmada 6 primer kombinasyonu kullanılmıştır. Genotipler ve popülasyonlar arasındaki akrabalık UPGMA dendogram programı ile görselleştirilmiş ve Dice (1945) tarafından geliştirilen genetik benzerlik indeksi ile değerlendirilmiştir. Araştırmada

toplam genetik çeşitlilik, populasyon içindeki genetik çeşitlilik ve populasyonlar arasındaki değişim genişliği sırasıyla 0.198, 0.155 ve 0.043 olarak hesaplanmıştır.

Campbell ve Bauchan (2009), çalışmalarında yonca gen kaynakları genetik akrabalıklarını değerlendirmek üzere SSR markörlerini geliştirip belirlemiştir. Autotetraploid yonca gen kaynaklarından elde edilen genomik DNA'dan W10 kullanarak 81 primer (SSRs AC, AT, CT, CTT, GAT ve GGT motiflerini içermektedir) çifti geliştirmiştir. Araştırmada cluster analizi ile oluşturulan dendogramda yonca hatları üç ana kola ayrılmıştır. Araştırmacılar bu genomik yonca SSR markörlerinin yoncada filogenetik ve haritalama çalışmalarında çok yararlı olduklarını belirtmişlerdir.

Çetin ve Yüce (2009), makarnalık buğday (*Triticum durum*) ve yabani buğday (*Triticum dicoccoides*) ve bu türlerin hibritlerini kullandıkları çalışmalarında RAPD markörlerini kullanarak genotip belirleme yapmışlardır. 20 RAPD primeriyle yaptıkları ön çalışmada önemli bant veren 6 primeri belirlemiş olup seçilen bu primerlerle polimorfizmi ve genotipleri belirlemek için kullanmışlardır. Elde edilen bantlar Cluster yöntemiyle analiz edilip dendogram hazırlanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmadan elde edilen verilerin gelecek ıslah programları için bir temel oluşturacağını belirtmişlerdir.

Fikiru ve ark. (2010), genetik çeşitlilik çalışmalarının Etiyopya yerel mercimek çeşitlerinde uygulanması amacıyla yapılan çalışmada 9 morfolojik özellik ve 4 ISSR markörüyle yaptıkları kıyaslama çalışmasında, fenotip ile genotip arasında bir bağlantıyı değerlendirmişlerdir. Toplamda 70 yerel mercimek hattı ile çalışan araştırmacıların ISSR'a dayalı elde ettikleri veriler genetik uzaklık matrisi UPGMA ile hesaplanmış ve oluşan cluster analizinde örnekleri başlıca 3 ana dala ayırmışlardır. Genetik indeks ise Etiyopya mercimeklerinde 0.17 ile 1.00 arasında değişmiştir.

Carimi ve ark. (2010), İtalya'nın Sicili bölgesinden toplamda 82 asma genotipten örnekler elde etmişlerdir. Asma örnekleri 6 mikrosatelit markör kullanılarak genetik çeşitlilikleri hesaplanmıştır. 82 örnek asmadan 70 kültür çeşidi

olup bu çeşitler SAHN-Cluster ve TREE program kullanılarak dendogram hazırlanmıştır. Benzerlik indeksi 0.15 ile 1.00 arasında değişmiştir.

Lamia ve ark. (2010), Tunus kaysı (*Prunus armeniaca*) gen kaynaklarının AFLP ve SSR markörleri ile genetik çeşitliliğinin kıyaslanması analizinde bölgede bulunan 81 hat kaysı üzerine çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar 5 AFLP ve 24 SSR markörü ile toplamda 339 polimorfik markör ortaya çıkarmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmalarında dendogramlarını AFLP ve SSR dataları için ayrı ayrı sonrada her iki markörden elde edilen toplam datalar için ayrı bir kıyaslama dendogramı yaparak ortaya koymuşlardır. Dendogram hesaplamasında kullandıkları program Wards dendogram programı olup varyans aralığı 4 ile 0 arasında değişmektedir.

Torricelli ve ark. (2011), 28 mercimek çeşit ve hatları ile İtalya'da yerel mercimekçeşitlerinin karakterizasyonu çalışması yapmışlardır. AFLP markörlerinin kullanıldığı çalışmada veriler UPGMA cluster analizine tabi tutularak dendogram elde edilmiştir. Araştırmada Jacard benzerlik indeksi 0.98 ile 0.65 arasında değişmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada, *Lens* cinsine ait 6 tek yıllık türden toplam 12 aksesyon, 19 Türk tescilli çeşit ve 16 tane yurtdışı tescilli çeşit olmak üzere toplam 47 genotip kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Türkiye tescilli çeşitler, çeşitlerin geliştirildiği Enstitülerden, Kanada mercimek çeşitleri Saskatchewan Üniversitesi, Kanada ve yabancı mercimek türleri ise Wasihgton State Regional Plant Introduction Station, Pullman, ABD gen bankasından temin edilmiştir. Genetik çeşitlilik çalışmasında kullanılan tür ve çeşitlere ait bilgiler Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1** Çalışmada kullanılan mercimek çeşitleri ve ıslah eden kuruluşlar

Çeşit	Tescil Yılı	Yazlık/Kışlık	Tescil Eden Kurum
Fırat-87	1987	Kışlık kırmızı	GTAE- Güneydoğu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Seyran	1996	Kışlık kırmızı	GTAE- Güneydoğu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Çağıl-2004	2006	Kışlık kırmızı	GTAE- Güneydoğu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Altıntoprak	2006	Kışlık kırmızı	GTAE- Güneydoğu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Yerli Kırmızı	1983	Kışlık kırmızı	GTAE- Güneydoğu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Kafkas	2001	Kışlık kırmızı	TARM- Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
Özbek	2001	Kışlık kırmızı	TARM- Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
Çiftçi-62	2001	Kışlık kırmızı	TARM- Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
Ali Dayı	2001	Yazlık kırmızı	TARM- Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü

Çizelge 3.1 (Devam)

Meyveci-2001	2001	Yazlık kırmızı	TARM- Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
Malazgirt-89	1989	Yazlık kırmızı	DATAE- Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Erzurum-89	1989	Yazlık yeşil	DATAE- Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Emre-20	1991	Yazlık kırmızı	ETA E-Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Sultan-1	1977	Yazlık yeşil	ETA E-Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Sazak-91	1991	Kışlık kırmızı	ETA E-Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Kayı-91	1991	Kışlık yeşil	ETA E-Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Şakar	2008	Kışlık kırmızı	Dicle Üniversitesi
Kışlık Yeşil-21		Kışlık yeşil	Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Pul-11		Kışlık yeşil	Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Blaze	2001	Yazlık Kırmızı	CDC Kanada
Milestone	1998	Yazlık Kırmızı	CDC Kanada
Plato	2002	Yazlık Yeşil	CDC Kanada
Redbow		Yazlık Kırmızı	CDC Kanada
Redcoat		Yazlık Kırmızı	CDC Kanada
Reddiff		Yazlık Kırmızı	CDC Kanada
Robin	1999	Yazlık Kırmızı	CDC Kanada
Rosebud		Yazlık Kırmızı	CDC Kanada
Vantage	1999	Yazlık Yeşil	CDC Kanada
Redwing	2002	Yazlık Kırmızı	CDC Kanada

Çizelge 3.1 (Devam)

Redcap		Yazlık Kırmızı	CDC Kanada
Seedley	2001	Yazlık Yeşil	CDC Kanada
WA8649041	1999	Yazlık Kırmızı	CDC Kanada
Precoz	1990	Yazlık Yeşil	Arjantin
Giza	1992		Mısır

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan Lens türleri, aksesyon numaraları ve kaynak ülkeleri

Sıra No	Tür Adı	Aksesyon No	Kaynak Ülke
1	<i>Lens culinaris ssp. odemensis</i>	572360	İsrail
2	<i>Lens culinaris ssp. odemensis</i>	572364	Türkiye (İzmir)
3	<i>Lens culinaris ssp. orientalis</i>	572384	Türkiye (Gaziantep)
4	<i>Lens culinaris ssp. orientalis</i>	572306	Türkiye (Mersin)
5	<i>Lens nigricans</i>	572344	İspanya
6	<i>Lens nigricans</i>	572359	Türkiye
7	<i>Lens montbretti</i>	TR 58080	Türkiye (Şanlıurfa)
8	<i>Lens montbretti</i>	TR 54584	Türkiye (Şanlıurfa)
9	<i>Lens ervoides</i>	572311	Türkiye (Antalya)
10	<i>Lens ervoides</i>	572317	İtalya
11	<i>Lens culinaris</i>	TR 26520	Türkiye (Balıkesir)
12	<i>Lens culinaris</i>	TR 51401	Türkiye (Tokat)

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Bitki materyalinin temini

Her bir çeşit ve türe ait mercimek tohumları sera şartlarında saksılarda (10 bitki/saksı) çimlendirilip gelişmeleri sağlanmıştır. Bitkiler fide döneminde iken DNA analizleri için genç yaprak örneklerinden yaklaşık 1-1.5 g alınarak sıvı azot içerisinde muhafaza edilip laboratuvara getirilmiş ve -80°C derin dondurucuda muhafaza altına alınmıştır.

#### 3.2.2. DNA izolasyonu

Bitki DNA içeriğinin zarar görmemesi için -80°C'de saklanan örnekler sıvı azot içinde toz haline getirilmiştir. DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1987)'nin uyguladığı yöntem üzerinde bazı modifikasyonlar yapılarak sağlanmıştır. Bitkilerden DNA izolasyonu aşağıda belirtilen protokole göre yapılmıştır.

1. -80°C'de muhafaza edilen yaprak örneklerinden yaklaşık 1-1.5 g yaprak alınıp, sıvı azot ilave edilerek havan içinde havan kolu yardımıyla toz şekline gelinceye kadar ezilip 50 ml'lik tüplere konularak muhafaza için köpük kutu içinde sıvı azotta tutulmuştur.
2. Ezilerek 50 ml lik tüplere konulan yaprak örneklerinin üzerine buzdolabında (+4°C'te bekletilen) bekletilen soğuk DNA ekstraksiyon tamponundan 7.5 ml ilave edilerek tüplerin ağzı kapatılıp yavaşça kısa bir süre çalkalandı.
3. 7.5 ml parçalama tamponu ve 3 ml % 5 lik sarkosyl ilave edilerek tüpler tekrar hızlı bir şekilde çalkalandı.
4. Örnek içeren 50ml'lik bu tüpler su banyosunda 65°C de 20-30 dakika bekletildi.
5. Su banyosundan alınan tüpler çeker ocak içinde bir kaç dakika soğumaya bırakıldı. Sonra Kloroform/İzoamil Alkol (24:1) karışımından 18 ml ilave edildi.
6. Kloroform/İzoamil Alkol ilave edildikten sonra, tüpler çok hafif bir şekilde

- alt üstedildikten sonra santrifüje yerleştirilerek. 2200 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
7. Santrifüjden sonra tüp içinde üstte kalan kısım pipetle dikkatle alınarak yeni 50 ml'lik tüplere aktarıldı ve üzerine tekrar 15 ml Kloroform/İzoamil Alkol karışımı ilave edilerek kısa bir süreliğine elde sallanarak karışımın homojen olması sağlandı.
  8. Tüpler tekrar 10 dakika santrifüj (2200 rpm) edildikten sonra tekrar üst kısımdaki karışım pipetle alınarak yeni 50 ml'lik tüplere aktarıldı.
  9. Steril kabinde, tüp içinde bulunan karışımın hacminin 2 katı kadar (yaklaşık 30 ml) soğuk etanol ilave edilerek tüpler aşağı yukarı olacak şekilde yavaşça döndürülerek DNA'nın tüpün alt kısmında çökeltmesi sağlandı.
  10. Tüp içinde çökelti oluşturan DNA, tüpün dip kısmında iyice çökmesi için 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüpler içindeki etanolün fazlası dikkatli bir şekilde alındı ve tüp içinde kalan etanolün uçması için tüpler belli bir süre ağzı açık bırakıldı.
  11. Kuruyan DNA üzerine 6 ml etanol eklenerek yaklaşık 10-60 dk muamele edilen DNA örneklerine 2 ml ultra saf su eklenerek yine 10 dk ile 1 sa bekletildi. Sonra örnekler 5 dk santrifüjde edildikten sonra 1 gece kurumaya bırakıldı.
  12. DNA örnekleri üzerine 1 ml steril TE çözeltisi eklendi. Kuruyan DNA'ların çözülmesini sağlamak için 12 saat çalkalayıcıda çalkalandı. Sonra örnekler 1.5 ml'lik tüplere aktarılarak saflık analizleri ve diğer analizlerde kullanmak üzere muhafaza edildi.

### 3.2.3. DNA saflık analizi

Her bir mercimek çeşidi için izole edilen DNA miktarını PZR çalışmalarına uygun (25 ng/ $\mu$ l) hale getirmek için DNA'lar %1'lik Agarose jel elektroforezi ile ayrıştırılıp, jeldeki standart markör temel alınarak DNA miktarları belirlenerek örneklerin ne kadar seyreltilmesi gerektiği hesaplandı. DNA saflık analizi için 2:8:2 oranına göre (2  $\mu$ l DNA: 8  $\mu$ l bromfenol blue: 2  $\mu$ l ultra saf su karışımı) yükleme yapıldı ve örnekler agaroz jelde 1 saat koşturuldu. Seyreltme denemeleri sonucunda



DNA miktarına göre uygun seyreltme oranları kullanıldı. DNA örnekleri RNA'dan saflaştırmak için örneklere 5 µl RNase enzimi eklenerek 60°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

### 3.2.4. DNA Konsantrasyonunun Spektrofotometrik Ölçümü

Nukleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu özellik nükleik asit miktarının belirlenmesinde bir ölçüdür. Bu nedenle 260 nm'de ki absorpsiyon değerleri (A260) oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin mikrogram düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. 280 nm'de ise protein miktarı belirlenir. Çift zincirli DNA molekülleri için, optik dansitenin (OD) 50 mg/ml'ye karşılık geldiği bilinmektedir.

Buna göre çiftzincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\text{DNA } (\mu\text{l/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD (Absorbans değeri)} \times \text{seyreltme oranı} \times 50$$

Çalışmada DNA'ların konsantrasyonlarının ölçümleri için her bir örnekten 5µl DNA alınıp 995µl saf su eklenerek (seyreltme oranı 1:200) karışımı sağlanmıştır. Daha sonra bu karışımlar spektrofotometre tüplerine yüklenip 260nm dalga boyunda Biochrom marka spektrofotometrede okunmuştur. Örnekler ait DNA miktarları farklılık gösterdiğinden, örneklerin konsantrasyonlarının 10 ng/µl olacak şekilde eşitlenmeleri için seyreltme oranları belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Örneğin çizelge 3.3'te ilk sıradaki bitki DNA'sı için spektro okuması 0.18 olarak belirlenmiştir. Bu değer yukarıda verilen formülde yerine konularak ( $0.18 \times 200 \times 50 = 1800 \text{ ng}$ ) örneğe ait DNA miktarı belirlenmiştir. Bu örnekten PZR' çalışmalarında kullanmak üzere çalışma çözeltisi hazırlamak (1000 µl ve 10 ng/ml konsantrasyonda) için alınması gerekli DNA miktarı belirlenmiştir.

**Çizelge 3.3** Denemede kullanılan mercimek bitki örneklerine ait DNA miktarları (Spektrofotometre okuması ve örnekte bulunan DNA miktarı) ve PZR çalışmalarına uygun konsantrasyonun (10 ng/μl) hazırlanması için uygulanan seyreltme oranı.

Çeşit/Tür Adı	A260 okuması ve DNA miktarı	Örnekte bulunan DNA miktarı (ng/ml)	10 ng/μl DNA konsantrasyonu için Seyreltme faktörü	1000 μl çalışma çözeltisi hazırlamak için alınması gereken DNA miktarı (μl)	Eklenmesi gereken saf su miktarı (μl)	PZR çalışmalarında kullanılacak çalışma Çözeltisi (10 ng/μl)
<i>L. culinaris</i> 26520	0.18	1800	(1800/10) = 180	1000/180=5.55	994.44	1000
<i>L. culinaris</i> 51401	0.245	2450	245	4.08	995.91	1000
<i>L. orientalis</i> 572460	0.272	2720	272	3.67	996.32	1000
<i>L. orientalis</i> 572384	0.223	2230	223	4.48	995.51	1000
<i>L. montbretti</i> 54584	0.328	3280	328	3.04	996.95	1000
<i>L. montbretti</i> 58080	0.203	2030	203	4.92	995.07	1000
<i>L. nigricans</i> 572344	0.176	1760	176	5.68	994.31	1000
<i>L. nigricans</i> 572359	0.123	1230	123	8.13	991.86	1000
<i>L. odemensis</i> 572364	0.243	2430	243	4.11	995.88	1000
<i>L. odemensis</i> 572306	0.32	3200	320	3.12	996.87	1000
<i>L. ervoides</i> 572317	0.173	1730	173	5.78	994.21	1000
<i>L. ervoides</i> 572311	0.199	1990	199	5.02	994.97	1000
Altıntoprak	0.171	1710	171	5.84	994.15	1000
Fırat-87	0.124	1240	124	8.06	991.93	1000

Çizelge 3.3 (devam)

Seyran-96	0.24	2400	240	4.16	995.83	1000
Çağıl-2004	0.211	2110	211	4.73	995.26	1000
Şakar	0.09	900	90	11.11	988.88	1000
Yerli Kırmızı	0.26	2600	260	3.84	996.15	1000
Kışlık yeşil-21	0.261	2610	261	3.83	996.16	1000
Çiftçi-62	0.212	2120	212	4.71	995.28	1000
Özbek	0.105	1050	105	9.52	990.47	1000
Kafkas	0.212	2120	212	4.71	995.283	1000
Meyvec2001	0.258	2580	258	3.87	996.12	1000
Alıdayı	0.292	2920	292	3.42	996.57	1000
Sultan	0.229	2290	229	4.36	995.63	1000
Pul-11	0.174	1740	174	5.74	994.25	1000
Kayı	0.288	2880	288	3.47	996.52	1000
Sazak-91	0.326	3260	326	3.06	996.93	1000
Emre-20	0.317	3170	317	3.15	996.84	1000
Malazgirt-89	0.201	2010	201	4.97	995.02	1000
Erzurum-89	0.341	3410	341	2.93	997.06	1000
Blaze	0.141	1410	141	7.09	992.91	1000
Milestone	0.193	1930	193	5.18	994.82	1000
Plato	0.192	1920	192	5.21	994.79	1000

Çizelge 3.3 (devam)

Redbow	0.235	2350	235	4.26	995.74	1000
Redcoot	0.199	1990	199	5.03	994.97	1000
Reddift	0.206	2060	206	4.85	995.15	1000
Robin	0.157	1570	157	6.37	993.63	1000
Rosebud	0.21	2100	210	4.76	995.24	1000
Vantage	0.153	1530	153	6.54	993.46	1000
1897-30 Q	0.243	2430	243	4.12	995.88	1000
Giza	0.223	2230	223	4.48	995.52	1000
Seedley	0.344	3440	344	2.91	997.09	1000
Redwing	0.259	2590	259	3.86	996.14	1000
Redcap	0.271	2710	271	3.69	996.31	1000
WA 41	0.382	3820	382	2.62	997.38	1000
Precoz	0.328	3280	328	3.05	996.95	1000

### 3.2.5. Mikrosatelit markör analizleri ve PZR protokolü

Mercimek için yaklaşık 175 mikrosatelit (SSR) primeri geliştirilmiştir. Bu çalışmada polimorfik olduğu bilinen ve mercimek genetik haritalama çalışmalarında değerlendirilen (Varlı, 2009) 23 SSR primerinden 15 SSR primeri (SSR 19, SSR 33, SSR 66, SSR 107, SSR 113, SSR 138, SSR 204, SSR 207-2, SSR 212-1, SSR 317-2, SSR 336, GLLC 537, GLLC 559, GLLC 562, GLLC 565) kullanılmıştır. Kullanılan SSR primerlerinin isimleri, primer dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

### 3.2.6. PZR protokolü (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR analizleri için 20 µl lik bir karışım hazırlanmıştır ve bu karışım 5 µl DNA eklenmiştir. PZR karışımı 2 µl primer, 2 µl DNA, 2 µl 10xPZR tampon, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µl Taq DNA polimeraz enzimi ve 6.8 µl saf sudan oluşmaktadır.

**Çizelge 3.4.** PZR karışım hazırlama (Bir örnek için hazırlanacak reaksiyon içeriği)

Kullanılan kimyasallar	Çalışma çözeltilerinin konsantrasyonları	Reaksiyon Konsantrasyonu	Reaksiyon hacmi
DNA	3 ng/µl	0.75 ng/ µl	5 µl
Primer (forward ve reverse)	10 pmol	10 pmol	1 µl +1 µl
dNTP (Adenin/100mM. Guanin/100mM. Sitozin/100mM. Timin/100mM. 4X25 µl Fermentas)	2 mM	200 µM	2 µl
10X PZR tamponu + 25 mM MgCl <sub>2</sub>	10x	1x	2 + 2 µl
Taq DNA polimeraz enzim	5 u/ µl	0.05 u/µl	0.2 µl
Ultra saf su			6.8 µl
Toplam			20 µl

PZR için hazır hale getirilen DNA örnekleri termal döngü cihazında (thermal cycler, Biorad-Mycycler US) PZR uygulaması yapılmıştır. Mikrosatellit primerleri için PZR protokolü aşağıda belirtilen programa göre yapılmıştır.

1	94°C	3dk denatürasyon (çift sarmal DNA'nın birbirinden ayrılması) 1 tekrar	} (2. 3 ve 4. adımlar 35 kez tekrarlanacak)
2	94°C	30s (denatürasyon aşaması)	
3	55°C	35s (primer bağlanma aşaması)	
4	72°C	60 s (Primerlerin taq polimeraz enzimi ile uzama aşaması)	
5	72°C	5dk	
6	4°C	∞ (PZR ürünlerinin muhafaza edileceği sıcaklık)	

### 3.2.7. Jel elektroforezi

PZR işleminden sonra DNA örnekleri % 3'lük yüksek kaliteli metaphor agaroz jelinde elektroforezi ile ayırtılmaya tabi tutuldu. Bu amaçla 4.5 g agaroz 150 ml TBE içinde homojen olarak karıştırılıp 100°C de 15 dk. kaynatılarak çözdürüldü ve 60°C ye kadar soğuması beklendi. Daha sonra agaroz jel, elektroforez kasasına dökülerek 25 lik taraklarla 50 tane örnek sayısı kadar kuyucuk açılması sağlandı. Bu kuyucuklardan 47 tanesi örnekler için 2 tanesi ise markör için kullanıldı. Amplifikasyon ürünlerine her örnek için 5 µl Bromfenol blue boyası ilave edildikten sonra elektroforez kasalarına her örnekten yaklaşık 25 µl alınarak yükleme yapılmış ve 120 Voltta serbest akımda yaklaşık olarak 180 dakika sürede ayrışması sağlanmıştır.

### 3.2.8. Jellerin boyanması

Örneklerin jel üzerinde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra amplifikasyon ürünlerinin boyanması yaklaşık 10 dakika kadar içinde 5 mg/L Etidyum bromit (EtBr) bulunan kapta bekletilerek yapıldı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra fazla boyanın uzaklaştırılabilmesi için jeller saf su ile 5-10 dk yıkandıktan sonra jeller GEL LOGİC ultraviyole jel görüntüleme sistemi ile fotoğrafları görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

### 3.2.9. Verilerin değerlendirilmesi

Agaroz jelde belirlenen bantlar, bant olma veya olmama durumlarına göre '1' veya '0' şeklinde, amplifikasyon bulunmayan durumlarda ise '-' olarak skorlanmıştır. Benzerlik indeksleri Nei ve Li (1979), tarafından geliştirilen 'benzerlik indeksi' formülüne göre hesaplanmıştır.

Türler ve çeşitler arasındaki genetik benzerlik ve bu benzerliklere dayalı dendogramların oluşturulması Rolf (1992), tarafından geliştirilen NTSYS (Numerical Taksonomy and Multivariate Analysis System, 2.0) bilgisayar paket programı ile yapılmıştır.

$$\text{Benzerlik İndeksi} = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j}$$

$N_{ij}$ : İki çeşitteki homolog (ortak) bant sayısı

$N_i + N_j$ : İki çeşitteki toplam bant sayısı

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Toplam 47 örnekten DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek DNA'nın SSR yöntemi için uygun olduğu belirlenmiştir.

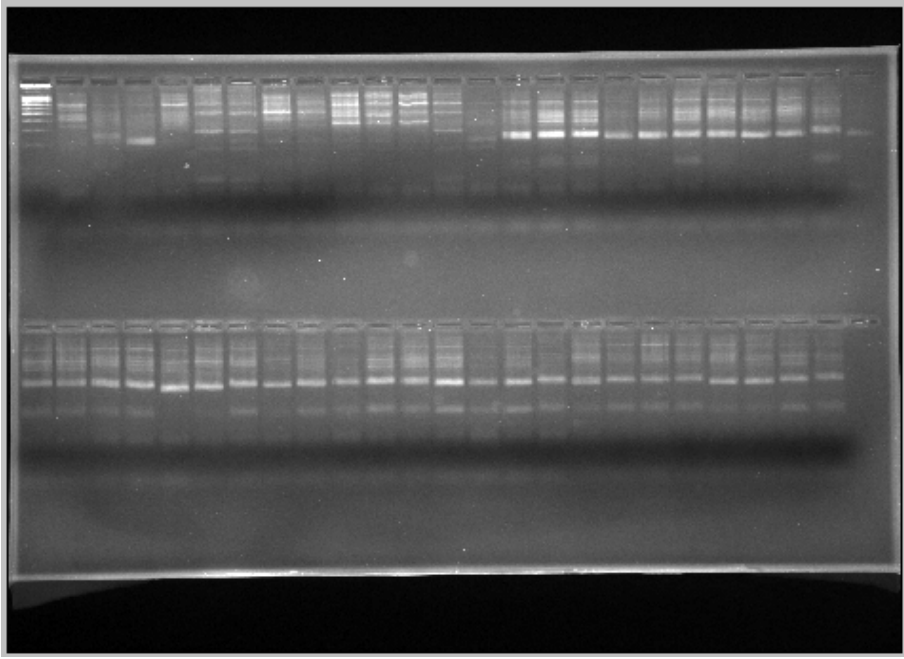
Nukleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda azami absorpsiyon özelliği göstermelerinden dolayı 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A260) oldukça saf elde edilen nükleik asitlerin miktar tayininde kullanılmıştır. A260'daki değerler DNA ve RNA'yı birbirinden ayırt etmediğinden izolasyon aşamasında RNase uygulanarak toplam nükleik asitler içinde yer alan RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. Örneklere karışan protein miktarının belirli sınırlarda tutulması örneklerin saflaştırma sonrasında kullanılacakları hassas uygulamalarda (örneğin; restriksiyon enzim kesimlerinde) sorun yaşanmamasını sağlamaktadır.

Kullanılan PZR protokolü Hamwieh ve ark (2005) ve Rajesh ve ark. (2008)'larına göre optimize edilmiştir. İnce çepirli 0,25 µl'lik PZR tüplerine DNA izolasyonu sonucunda elde edilen ve spektrofotometre sonuçlarına göre seyreltilen DNA örneklerinden 5 µl ilave edilmiştir. PZR reaksiyonunda kullanılan moleküler biyoloji hassasiyetindeki kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.4'de verilmiştir. Uygulamalarda her zaman aynı PZR cihazı kullanılmıştır. Varlı (2009) tarafından polimorfik olduğu tespit edilen Çizelge 4.1'de verilen 15 SSR primeri kullanılmıştır.

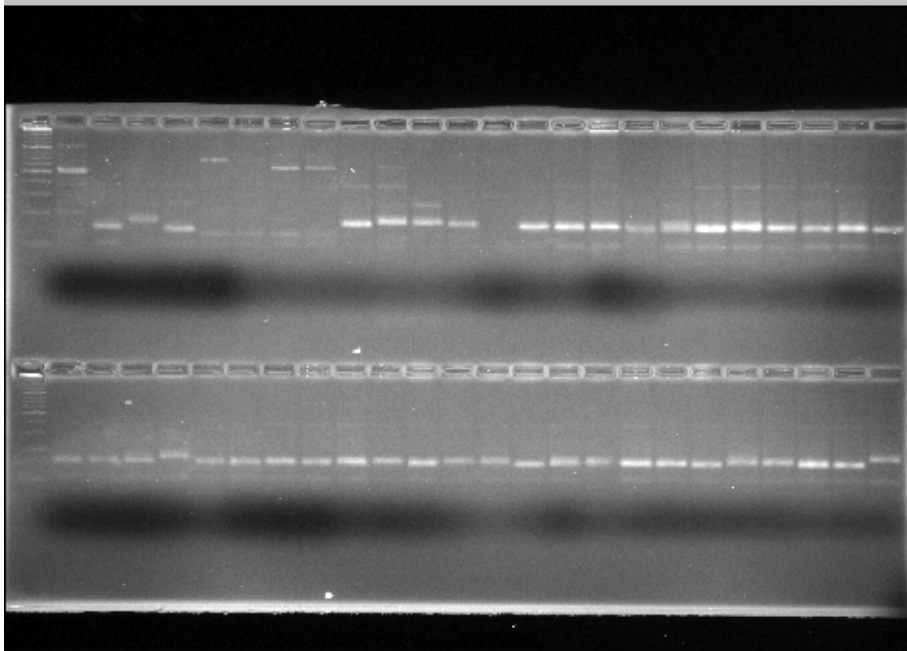
##### 4.1. SSR amplifikasyonları

Bu çalışmada kullanılan 15 adet primer SSR primerinden 13 adedi *Lens* türlerinde istenilen amplifikasyonları (Şekil 4.1. SSR 113 bant görüntüleri ve Şekil 4.2. SSR 559 bant görüntüleri) gerçekleştirmiştir. SSR 559 primeri 5 skorlana bilir bantla en fazla bant üreten primer olurken, SSR 204 primeri 2 bantla en az bant üreten primer olmuştur.





Şekil 4.1. SSR 113 primerine ait oluşan bant görüntüleri



Şekil 4.2. SSR 559 primerine ait oluşan bant görüntüleri

**Çizelge 4.1.** Çalışmada kullanılan SSR markörleri, DNA dizileri ve bağlanma ( $T_m$ ) sıcaklıkları

Pirimer ismi	Pirimer Dizilimi	Bağlanma Sıcaklığı ( $T_m$ )
SSR19-F	GACTCATACTTTGTTCTTAGCAG	58 °C
SSR 19-R	GAACGGAGCGGTACATTAG	
SSR33-F	CAAGCATGACGCCTATGAAG	56 °C
SSR 33-R	CTTCACTCACTCAACTCTC	
SSR66-F	GGTAGTGGTGAGGAATGAC	55.1 °C
SSR 66-R	GCATCACTGCAACAGACC	
SSR107-F	GCGGCGAGCAAATAAAT	51 °C
SSR 107-R	GGAGAATAAGAGTGAAATG	
SSR113-F	CCGTAAGAATTAGGTGTC	46 °C
SSR 113-R	GGAAAATAGGGTGGAAAG	
SSR138-F	GAAATGGGATAGCAGATAG	53 °C
SSR 138-R	GAAGACTCTCACCGTCG	
SSR204-F	CACGACTATCCCACTTG	52 °C
SSR 204-R	CTTACTTTCTTAGTGCTATTAC	
SSR212-F	GACTCATTGTTGTACCC	44 °C
SSR 212-R	GCGAGAAGAATGGTTG	
SSR317-2-F	CACGTAACATCTTGCTTATG	48 °C
SSR 317-2-R	GTAGCAATAATTACACCCAC	
SSR336-F	GTGTAACCCAAGTGTCC	49 °C
SSR 336-R	GGCCGAGGTTGTAACAC	
SSR-537-F	GATTCGGGAATTCTGGCTCT	55 °C
SSR-537-R	CTCCTCTTGCTCCTTCCAGA	
SSR-557-F	GCTCTGCGACATGGATCTTT	55 °C
SSR-557-R	TGAGAACAAATGAGCAGTGCTTT	
SSR-559-F	CATGGATCCAAATGCAAAAA	53 °C
SSR-559-R	GCTTCTTCAAGAGCACGTTTC	
SSR-562-F	TGTGTAGGCACATCAACAAAA	55 °C
SSR-562-R	GGTGGGCATGAGAGGTGTTA	
SSR-565-F	TGCGGTTGAAGTTGTAGGAA	53 °C
SSR-565-R	TCAATTATATGAAGAGCTCGTAGCA	

Analizler sonucunda elde edilen dendogram Şekil 4.3'te verilmiştir. Dendogramda yabancı türler, tescilli yerli ve yabancı mercimek çeşitleri arasındaki genetik benzerlik indeksi 0.54 ile 0.93 arasında değişmiştir.

Dendogram iki ana gruba ayrılmıştır (A ve B). A ana grubu kendi içinde A1 ve A2 grubu oluşturmuştur. A1 grubunda *L. ervoides* türünün '572317' hattı tek başına yer almıştır. A2 grubu kendi içerisinde A3 ve A4 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır.

A3 grubu kendi içerisinde A5 ve A6 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. A5 grubu içerisinde *L. culinaris* türleri, *L. orientalis* türleri ve tescilli Türk çeşitlerinden Yerli kırmızı, Özbek, Kafkas, Altıntoprak, Fırat-87, Seyran, Çağıl-2004, Şakar, Kışlık yeşil-21, Çiftçi-62, Meyveci-2001, Alidayı ile yabancı tescilli çeşitlerden WA8649041 genotipi bir arada bulunmaktadır.

A4 grubunda *L. montbretti* türleri, *L. ervoides* türleri ve *L. nigricans* türünün '572359' nolu aksesyonu yer almıştır. Çalışmamızda Seyran ve Çağıl-2004 hatları arasındaki benzerlik 0.98 olarak belirlenmiştir. Bu yönüyle çalışmamız Toklu ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışma ile örtüşmektedir.

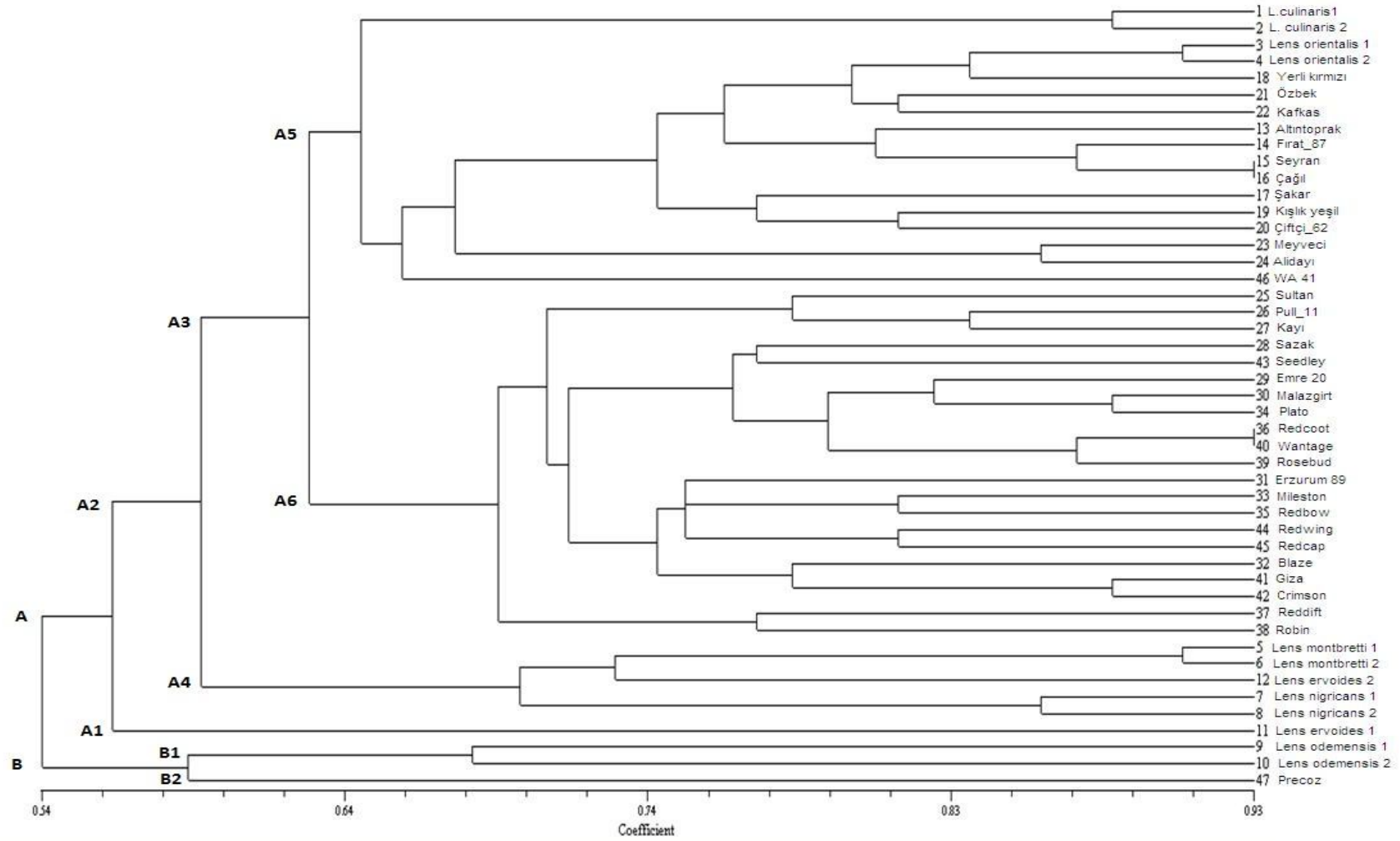
Toklu ve ark. (2008) elde ettikleri dendogramda aynı ana kol içinde Çiftçi-62, Yerli kırmızı, Kafkas ve Özbek yer almakta ve bu yönü ile çalışmamızla örtüşmekte iken Çağıl-2004 ile Fırat-87 ayrı bir ana kolda fakat aynı grupta bulunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen dendogramda A5 grubunun alt kolları incelendiğinde Özbek, Kafkas, Altıntoprak, Fırat-87, Seyran, Çağıl-2004 aynı alt dal içinde iken Şakar, Kışlık yeşil-21, Çiftçi-62, Meyveci-2001, Alidayı çeşitleri ayrı bir alt dal içindedir. Yüzbaşıoğlu (2005) tarafından rapor edilen çalışmada Kafkas, Meyveci-2001, Özbek, Yerli kırmızı, Alidayı çeşitleri aynı ana grup içinde olup çalışmamızla örtüşmektedir.

Analizler sonucunda elde edilen dendogramda oluşan A ana kolu içerisindeki A6 grubunda ise tescilli Türk çeşitlerinden Sultan-1, Pul-11, Kayı-91, Sazak-91,

Emre-20, Malazgirt, ve Erzurum-89 ile yabancı tescilli çeşitlerden Plato, Redcoat, Wantage, Rosebud, Milestone, Redbow, Redwing, Redcap, Blaze, Giza, Crimson, Reddif ve Robin çeşitleri bir arada yer almışlardır. Yüzbaşıoğlu (2005) çalışmasında da Malazgirt-89, Fırat-87, Erzurum-89, Sultan ve Pull-11 çeşitlerini aynı grup altında toplanmıştır.

Fırat-87 çeşidi A5 grubunda Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetiştirilen ve Güneydoğu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından Tescil edilen Seyran, Çağıl-2004, Altıntoprak ve Yerli kırmızı çeşitleri ile yine Güneydoğu Anadolu Bölgesinin gen merkezi olduğu *L. culinaris* ve *L. orientalis* türleri ile aynı grupta yer almıştır.

Dendogramda oluşan diğer ana kol ise B olarak adlandırılmıştır. B ana kolu B1 ve B2 olarak iki gruba ayrılmıştır. B1 ana grubunda *L. odemensis* yabani türünün her ikisi yer almaktadır. B2 grubunda Yabancı tescilli çeşit olan Arjantin çeşidi Precoz tek başına yer almıştır.



Şekil 4.3 SSR markör analizleri ve Nei genetik uzaklık indeksine göre mercimek çeşit ve türleri arasındaki ilişkileri gösteren dendrogram

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Islah programlarında gen kaynaklarının en iyi şekilde kullanılabilmesi için genetik çeşitliliğin tespit edilmesi öncelik arz etmektedir. Daha önce mercimeklerle ilgili yapılan çalışmalarda, Türkiye'nin mercimeğin anavatanı olduğu ve özellikle Türkiye'nin Güneydoğu'sunun kültür mercimeğinin evrimleşme sürecinin başladığı yer olarak belirtilmiştir. Bu da Türkiye topraklarında yetişen yabancı mercimek türlerinin var olan zengin gen havuzundan yararlanma fikrini gündeme getirmektedir.

Bu çalışmada kültürü yapılan tescilli Türk ve yabancı çeşitler ile yabancı mercimek türlerinde genetik benzerlik ve farklılıklar SSR moleküler markörleri ile karakterize edilmiştir.

Türkiye'de tescil edilen çeşitler aynı grupta toplanmalarına rağmen genetik benzerlik indeksi 0.63 ile 0.93 arasında değişim göstermiş olup çeşitler arasında genetik varyasyonun bulunduğu, bazı çeşitler de örneğin Seyran ve Çağıl-2004 çeşitleri arasında genetik benzerliğin yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Yabancı tescilli çeşitler ile Türk tescilli çeşitler aynı grupta fakat farklı alt gruplarda kümelendiği gözlemlenmiştir. Kültürü yapılan mercimek çeşitlerinin genetik taban olarak birbirine yakın olduğu fakat çeşit geliştirmede farklı pedigrilerin kullanıldığını göstermektedir.

Çeşit geliştirme çalışmalarında genetik farklılıkların yüksek olduğu genotiplerin melezleme programlarına alınması, genetik varyasyonu artırmada önemli etkiye sahiptir. Genetik farklılık bulunmayan çeşitlerin ıslah programlarından çıkarılması popülasyondaki genetik çeşitliliği azaltmamakla birlikte ıslah programının daha ekonomik ve etkin olmasını sağlayacaktır.

Yabancı mercimek türlerinden sadece *L.odemensis* B grubunda yer alırken diğer türler A grubunda yer almıştır. Yabancı türlerin kültürü yapılan tescilli çeşitlere göre

farklı alt gruplarda kümelendiği dolayısıyla genetik uzaklığın ve genetik varyasyonun yüksek olduğu belirlenmiştir.

Türkiyede tescil edilen mercimek çeşitleriyle yabani türlerden *L. culinaris*, ve *L. orientalis* türleri arasında genetik mesafenin diğer türlere nazaran daha yakın olduğu ve bu türlerin kültürü yapılan mercimeğin progenitörü (atası) olduğu tezini desteklemektedir.

Fırat-87 çeşidi Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaygın olarak kullanılan bir çeşittir. Bu çeşit üzerinde iyileştirmeler yapılacaksa ve genetik varyasyon genişletilmek isteniyorsa, Precoz, WA8649041 gibi genotiplerle melezlenmeleri önerilebilir.

## KAYNAKLAR

- ABO-ELWEFA, A., MURAI, K., SHIMADA, T., 1995. Intra-and interspecific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theor appl Genet* 90:995-340.
- ACHLEITNER, A., TINKER, N. A., ZECHNER, E., BUERSTMAYR, H., 2008. Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative. *Theor Appl Genet* 117:1041-1053.
- AĞAR, A., 2007. Aurantiodeae alt familyasındaki cinslerde yer alan bazı türlerin SSR markırlarıyla moleküler karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, yüksek Lisans Tezi, Adana 104s.
- AHMAD, M., Mc NEIL, D.L. and SEDCOLE, R., 1997. Phylogenetic relationships in *lens* species and their interspecific hybrids as measured by morphological characters. *Euphtica*, 94:101-111.
- AHMAD, M., McNEIL, D. L., FAUTRIER, A. G., ARMSTRONG, K. F., PATERSON, A. M. 1996. Genetic relationships in *Lens* species and parentage determination of their interspecific hybrids using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 92: 1091-1098.
- AHMAD, M., FAUTRIER, A. G., BURRITT, D.J., McNEIL, D. L. 1997. Genetic diversity and relationships in *Lens* species and their F1 interspecific hybrids as determined by SDS-PAGE. *New Zealand journal of Crop and Horticulture Science* 25:99-108.
- AKKAYA, M., YALIN, S., 1996. Mikrosatelit DNA molekül belirleyicikeri kullanarak bitki genotiplerinin belirlenmesi. TÜBİTAK proje.
- ALTINTAŞ, S., TOKLU, F., KAFKAS, S., KILIAN, B., BRANDOLİNİ, A., ÖZKAN, H., 2008. Estimating genetic diversty in durum and bread wheat cultivars form Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding* 127. 9-14
- AYDINOĞLU, B., KARACA, M., ÇAKMAKÇI, S., İNCE, A., ELMASULU, S., 2005. Early determination possibilities of seed yield in common vetch (*Vicia sativa*) using DNA minisatellite markers. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 18(2), 169-174.
- AYDOĞAN, A., KARAGÜL, V., BOZDEMİR, Ç., 2002. Lentil breeding activites for central Anatolia region. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*.
- BABAYEVA, S., AKPAROV, M., ABBASOV, M., MAMMADOV, A., ZAI FİZADEH, M., STREET, K., 2009. Diversity analysis of Central Asia and Caucasian lentil germplasm using SSR fingerprinting. *Genet Resour Crop Evol*. 56: 293-298.
- BALKAYA, A., YANMAZ, R., 2002. Bazı taze fasulye çeşit adayları ile ticari çeşitlerin morfolojik özellikler ve protein markör yolu ile tanımlanması. *Tarım Bilimleri Dergisi*. 9(2) 182-188.
- BAYDAR, H., BAYDAR, N., G., DEBENER, T., 2005. Isparta gülünde genetik ilişkilerin AFLP ve mikrosatellit markırları ile belirlenmesi. *Türkiye 4. Tarla Bitkileri Kongresi*, 5-9 Eylül2005, Antalya cilt 3 sayfa 1123-1126.
- BARRET, B. A., KIDWELL, K. K., 1998. Comparison of AFLP and pedigree based genetic diverstiy assesment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Sci*. 38:1271-1278.



- BİLGİN, O., KORKUT, K.,Z., 2005. Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının genetik uzaklıklarının belirlenmesi. Journal of Tekirdağ Agricultural Faculty. 2(3)
- BOVENHUIS, H., and MEUWISSEN, T., 1996. Detection and mapping of quantitative trait loci. Animal Genetics and Breeding Unit, university of New England Armidale.
- BORNET, B., and BRANCHARD, M., 2001. Nonanchored inter-simple sequence repeat.
- CARIMI, F., MERCATÌ, F., ABBATE, L., SUNSERÌ, F., 2010. Microsatellite analyses for evaluation of genetic diversity among Sicilian grapevine cultivars. Genet Reour crop Evoul. 57:703-719.
- CHOWDHURY, M. A., VANDENBERG, B., WARKENTIN, T., 2002. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum*). Euphytica 127. 317-325.
- CUBERO, J., I.1981. Origin, domestication and evolution in lentils. Commonwealth Agricultural Bureau. Slough, UK.
- ÇETİN. B., YÜCE, S., 2009. *Triticum diccodies* ile *Triticum durum* melezlerinin F4 neslinde ve ebeveynlerinde RAPD yöntemiyle genotip belirlenmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 46(2) 111-116
- DEVİRİM, A., K., KAYA, N., 2004. Polimeraz Zimcir Reaksiyonu. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 10(2):209-214.
- DICE, L.R., 1945 Measures of the amount of ecological association between species. Ecology. 26:297-302.
- DOYLE, J. L., DOYLE, J., J., 1987 Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- ERKİLİNÇ, A., KARACA. M., 2005. Assessment of genetic variation in some cotton varieties (*Gossypium hirsutum*) grown in Turkey using microsatellites. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 18(2). 201-206.
- FERGUSON, M.E., FORD-LOYD., B.V., ROBERTSON, L.D., MAXTED, N. and NEWBURY, H. J. 1998. Mapping the geographical distribution of genetic variation in the genus *Lens* for the enhanced conservation of plant genetic diversity. Molecular Ecology. 7: 1743-1755.
- FERGUSON, M. ve ERSKİNE, W., 2001. Lentils (*Lens* L.). In Maxted. N. and S.J. Bennett (eds.). Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- FIOCCHETTI, F., LAFFOMADA, B., ROSELLI, M., CRİNO, P., LUCRETTI, S., 2009. Fingerprinting of three typical macrosperma Italian lentil landraces using fluorescence-based AFLP markers. Scientia Horticulturae 121:383-387.
- FIKİRÜ, E., TESFAYE, K., and BEKELE, E., 2010. A comparative study of morphological and molecular diversity in Ethiopian lentil landraces. African Journal of Plant Science 4 (7) 245-254.
- FAO, food and agricultural organization of The United Nations, Rome, 2010. <http://www.fao.org>
- FURMAN, B.J. and BAUM. M., 2006. Genotyping a composite germplasm set of lentil. ICARDA Activities Under the Generation Challenge Programme. [www.icarda.org](http://www.icarda.org). Syria.

- GAHOONIA, T. S., OMAR, A., SARKER, A., NIELSEN, N. E., and RAHMAN, M. M., 2006. Genetic variation in root traits and nutrient acquisition of lentil genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 29: 643-655.
- GANEVA, G., KORZUN, V., LANDEJEVA, S., POPOVA, Z., CHRISTOV, N., 2009. Genetic diversity assessment of Bulgarian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) landraces and modern cultivars using microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol* 57:273-285.
- GUPTA, M., CHYL, Y.S., ROMERO-SEVERSON, j., OWEN. J.L., 1994. Amplification of DNA markers from evaluationarily diverse genomes using single primers of SSR. *Theor. Appl. Genet.*, 89:998-1006.
- HAMWIEV, A., UDUPA, S. M., SARKER, A., JUNG, C., and BAUM, M., 2009. Development of new microsatellite markers and their application in the analysis of genetic diversity in lentils. *Breeding Science* 59:77-86.
- HAMWIEH, A., UDUPA, S. M., CHOUMANE, W., SARKER, A., DREYER, F., JUNG, C., and BAUM, M., 2005. A Genetic Linkage Map of *Lens sp.* Based on Microsatellite and AFLP Markers and the Localization of Fusarium Vascular Wilt Resistance. *Theor. Appl. Genet.* 110: 669-677.
- IRUELA, M., RUBIO, J., CUBERO, J.I., GIL, J., MILLAN, T., 2002. Phylogenetic analysis in the genus cicer and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theor Appl Genet* 104:643-651.
- LADIZINSKY, G., 1997. A New Species of *Lens* from South-East Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 123: 257-260.
- REDONA. E., 2007.
- LAMIA, K., HEDIA, B., JEAN-MARC, A., NEILA, T., F., 2010. Comparative analysis of genetic diversity in Tunisian apricot germplasm using AFLP and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 127. 54-63.
- LAPITAN, V., C., BRAR. D., S., ABE. T., and REDONA. E. A., 2007. Assesment of of genetic diversity of philippine rice cultivars carrying good quality traits using SSR markers. *Breeding science* 57:263-270
- LIU, J., GUAN, J. P., ZHANG, X. Y., GU, J., ZONG, X. X., 2008. Genetic diversity and population structure in Lentil germplasm detected by SSR markers. *Acta Agronomica Sinica* 34-11.
- MUEHLBAUER, F.J., CHO. S., SARKER, A., MCPHEE, K.E., COYNE, C.J., RAJESH, P. N., and FORD. R., 2006. Application of biotechnology inbreeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress. *Euphytica.* 147: 149-165.
- NAGAOKA, T., and OIGHARA, Y., 1997. Applicability of ISSR polymorphisms inwheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RPAD markers. *Theor Appl Genet* 94:597-602.
- NEI, M., and LI, W., 1979. Mathematical model for studying genetic variance in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5256-5273.
- NGUYEN, T., TAYLOR, W.J., REDDEN, R.J., FORD, R., 2004. Genetic diversity estimates in Cicer using AFLP analysis. *Plant Breeding.* 123: 173-179.
- ÖZAYDIN, S., 2004. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği. *Dumlupınar Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü Dergisi.*
- ÖZCAN, S., GÜREL, E., BABAOĞLU, M., 2001. Bitki Biyoteknolojisi- Genetik Mühendisliği ve Uygulamalar 2. Selçuk üniversitesi vakıf yayımları.
- RAJESH, P. N., WHITE, D., SAHA, G., CHEN, W., and MUEHLBAUER, F., 2008. Development and genetic analysis of SSR markers in lentil. *Plant*

- &Animal Genomes XVI Conference, January 12-16, 2008, Town & Country Convention Center, San Diego, CA
- ROHLF, F.J., 1992. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. version 1.80. Applied Biostatistics. Setauket, N. Y.
- RUBEENA, R., FORD. P. and TAYLOR. W.J., 2003. Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris ssp. culinaris*). Theor. Appl. Genet. 107: 910-916.
- SANCHEZ-PEREZ, R., RUIZ. D., DİCENTA. F., EGEEA. J., MARTİNEZ-GOMEZ. P., 2005. Aoplication of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization. protection. and genetic relationships. Scientia Horticultrae 130. 305-315.
- SARAÇOĞLU, D., 2007. Yabanive kültür nohutlarının ISSR ve RAPD markörleri ile moleküler karakterizasyonu. Selçuk Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi. Konya, 90s.
- SHARMA, S. K., KNOX, M.R., ELLİS, T. H. N. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparsion with RAPD analysis. Theor Apple Genet 93:751-758.
- SONNANTE, G., PİGNONE. D., 2001. Assesment of genetic variation of lentil using molecular tools. Euphytica 120:301-307.
- SONNANTE, G., PİGNONE. D., 2006. The major İtalian landraces of lentil (*Lens culinaris Medik.*): Tehir molecular diversity and possible origin. Genet Resour Crop Evol 54.1023-1031.
- SOLMAZ, İ., SARI. N., 2009. Characterization of watermelon accesions collected from Turkey for morphological traits. Genet Resour Crop Evol. 56:173-188.
- SÖNMEZOĞLU, Ö. A., YILDIRIM, A., GÜLEÇ, T., E., KANDEMİR, N., 2010. Markör destekli seleksiyonun buğday ıslahında kullanımı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 27(1). 105-112.
- SUDUPAK, M.A., AKKAYA, M.S., KENCE, A., 2004. Genetic relationships among perennial and annual cicer species growing in turkey assesed by AFLP fingerprinting. Theor Appl Genet 108.937-944.
- ŞEHİRALİ, S., 1988. Yemeklik Tane Baklagiller- Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- TOKLU, F., KARAKÖY, T., HAKLI. E., BİÇER, T., BRANDOLİNİ, A., KILAN, B., ÖZKAN, H., 2008. Genetic variation among lentil landraces from Southeast Turkey. Plant Breeding. 10.1111/j.1439-0523.2008.01548.x
- TORRICELLI, R., SİLVER, D. D., FERRADİNİ, N., VENORA, G., VERONESİ, F., RUSSİ, L., 2011. Characterization of the lentil landrace Santo Stefano di Sessanio from Abruzzo, İtaly. Genet Resour Crop Evol DOI 10.1007/s10722-011-9682-9.
- TUİK, Türkiye istatistik kurumu, 2010, <http://www.tuik.gov.tr>.
- UNCUOĞLU, A. A., 2010. Moleküler markerler ve haritalama. Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları. Erciyes Üniversitesi Yayınları.
- VARLI, İ., 2007. Mikrosatellit DNA markörlerinin mercimek genom haritalanmasında kullanılması. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- YAĞMUR, M., KAYDAN. D., 2004. The effects of foliar Applications on lentil seed yield and some yield componenets. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Ziraat Fakültesi. Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.)2005. 15(1): 31-37.

- YONG-BI, FU., Peterson. G.,W., Morrison. M., J., 2007. Genetic diversity of Canadian soybean cultivars and Exotic germplasm revealed by simple sequence repeat markers. *Crop science*. 47: 1947-1945
- YONG-BI, FU., Williams. D., J., 2008. AFLP variation in 25 avena species. *Theor Appl Genet*. 117:333-342.
- YÜZBAŞIOĞLU, E., 2005. Mercimek hat ve çeşitlerinde genetik varyasyonun tespiti. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- YILDIRIM, A., 2005. Moleküler marker facilitated pyramiding of resistance genes for fungal diseases of wheat. Workshop on Genomic and Marker Assisted Selection in Plant Breeding. 3-7 Ekim (Sunulu-bildiri). İzmir.
- YILDIRIM, A., KANDEMİR, N.,2001. Genetik markörler ve analiz metotları (ÖZCAN. S., GÜREL. E., BABAOĞLU). Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları 2. Selçuk Üniversitesi Vakıf Yayınları.
- ZABEAU, M., 1993. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). European Patent Application.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Şanlıurfa doğumludur, 2009 yılında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Şubat döneminde Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Tarla Bitkileri Anabilin Dalında yüksek lisansa başladı.

## ÖZET

Bu çalışmada kültürü yapılan tescilli Türk ve yabancı çeşitler ile yabancı mercimek türlerinde genetik benzerlik ve farklılıkların SSR moleküler markörleri ile karakterizasyonu amaçlanmıştır. Çalışma materyali olarak Türkiye ve yurt dışında tescil edilen 35 çeşit ve 6 yabancı türe ait 12 aksesyon kullanılmıştır. Çalışmada 13 SSR primeri kullanılmış olup 44 polimorfik band elde edilmiştir. Benzerlik indeksleri Nei ve Li (1979), tarafından geliştirilen ‘benzerlik indeksi’ formülüne göre hesaplanmıştır. Türler ve çeşitler arasındaki genetik benzerlik ve bu benzerliklere dayalı dendogramların oluşturulması Rolf (1992) tarafından geliştirilen NTSYS (Numerical Taksonomy and Multivariate Analysis System, 2.0) bilgisayar paket programı ile yapılmıştır. Dendogram verilerine göre yabancı türler, tescilli yerli ve yabancı mercimek çeşitleri arasındaki genetik benzerlik indeksi 0.54 ile 0.93 arasında değişmiştir. SSR yöntemi ile elde edilen araştırma sonucuna göre mercimek hat ve çeşitleri 2 ana (A ve B) gruba ayrılmışlardır. Ve her bir ana grupta kendi içinde alt gruplar oluşturmuştur. Türkiye’de tescil edilen mercimek çeşitleriyle yabancı türlerden *L. culinaris*, ve *L. orientalis* türleri arasında genetik mesafenin diğer türlere nazaran daha yakın olduğu ve bu türlerin kültürü yapılan mercimeğin progenitörü (atası) olduğu tezini desteklemektedir. Yabancı tescilli çeşitler ile Türk tescilli çeşitler aynı grupta fakat farklı alt gruplarda kümelendiği gözlemlenmiştir. Kültürü yapılan mercimek çeşitlerinin genetik taban olarak birbirine yakın olduğu fakat çeşit geliştirmede farklı pedigrilerin kullanıldığını göstermektedir.

## SUMMARY

The objective of this study was to evaluate genetic diversity in lentil (*Lens culinaris* Medik.) using SSR (Simple Sequence Repeats) markers. Thirty five lentil cultivars released in Turkey and abroad and 6 wild species of lentil with 12 accessions were evaluated in the study. Data were analyzed using NTSYS PC 2.0 computer software to determine genetic diversity among the genotypes. Thirteen SSR markers that produced 44 scorable polymorphic bands were used to evaluate lentil genotypes. An unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis results indicated two main groupings. Cultivars released in Turkey and abroad including wild species of *L. culinaris*, *L. orientalis*, *L. odemensis*, *L. montbretti* and *L. nigricans* were in the first group. Although lentil cultivars released in Turkey and abroad were in the same main group, they were clustered in different sub-groups. In spite of close genetic similarities of the released lentil cultivars, it appeared to be derived from different pedigrees or genetic backgrounds indicating presence of genetic variation among the cultivars. Close genetic distances between wild species of *L. culinaris*, *L. Orientalis* and lentil cultivars (Firat-87, Seyran-96 and Cagil) commonly grown in South Anatolia supported the views of the center of origin of these wild species.

## Ek -1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar

DNA ekstraksiyon tamponu hazırlamak için gerekli kimyasallar;

Sorbitol 63.77 g

Tris 12.10 g

EDTA 1.68 g

Parçalama tamponu (Nuclei Lysis Buffer) hazırlamak için gerekli kimyasallar;

1 M Tris-HCl 200 ml

0.5 M EDTA 100 ml

5 M NaCl 400 ml

CTAB 20 g

dH<sub>2</sub>O.....300 ml

Sarkosyl (%5'lik)

Sarkosyl (N-lauryl-sarcosine).....5 g

dH<sub>2</sub>O.....1000 ml





