

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



MERCİMEK (*Lens culinaris* Medik.)'DE
FARKLI ÇEŞİTLER ARASINDA GENETİK
POLİMORFİZMİN DNA MARKIR
TEKNOLOJİSİ İLE TANIMLANMASI

Sami AKSOY

109929

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr. S. Tülay HEKİMBAŞI

GEBZE

2001



Sami Aksoy'un tez çalışması, G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 6-7-2004..... tarih ve 2004/12..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Biyoloji.....Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. S. Tülay HEKİMBASI (G.Y.T.E.)

ÜYE

Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN (G.Y.T.E.)

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN (G.Y.T.E.)



G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 02.08.2004..... tarih ve 2004/20..... sayılı kararı.

ÖZET

109929



Bu çalışma, mercimek (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) bitkisinin Türkiye'ye has 6 çeşidi (Emre 20, Erzurum 89, Kayı 91, Pul 11, Sazak 91, Sultan 1) arasındaki genetik polimorfizmi RAPD markırları aracılığıyla belirlemek için yapıldı. Çalışma adı geçen çeşitler üzerine yapılmış RAPD analizlerine dayalı ilk genetik polimorfizm çalışmasıdır. Analizler için rastgele seçilmiş 10 nükleotidden oluşan 9 primer kullanıldı. %75'i polimorfizm gösteren toplam 102 RAPD markırına dayanarak çeşitler arasındaki benzerlik oranları çıkarıldı ve bir dendogram hazırlandı.

Sonuç olarak, Emre 20 ve Erzurum 89 çeşitlerinin birbirlerine en fazla benzerlik gösteren (%71.48) çeşitler olduğu tespit edildi. Bu iki çeşide en uzak olan çeşit ise Sultan 1 olarak tespit edildi. En az benzerlik oranı ise %39.76 ile Pul 11 ve Sultan 1 çeşitleri arasında gözlemlendi. Buna ek olarak, benzerlik oranları ile tohum ağırlığı ve tohum rengi gibi morfolojik özellikler arasında bir ilişki olmadığı belirlendi.



SUMMARY

This study was performed to estimate the genetic polymorphism using RAPD markers among 6 accessions (Emre 20, Erzurum 89, Kayı 91, Pul 11, Sazak 91, Sultan 1) of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*). This research is the first genetic polymorphism analysis based on RAPD markers on these 6 accessions which are unique to Turkey. Nine primers that have been randomly designed in 10 nucleotids were used for the analysis. Similarity rates among the accessions were established using a total of 102 RAPD markers presented 75% polymorphism. A dendogram was constructed to find out the variations among the accessions.

As a result of this study, Emre 20 and Erzurum 89 were found to be more similar to each other (71.48%) than the rest. Sultan 1 was observed to have the lowest similarity to these two accessions. Pul 11 and Sultan 1 were found to be the most variable for each other (39.76%) comparing with the rest of the accessions. In addition to these, no correlation was found between morphological features (such as seed weight and colour) and genetic similarity rates.



TEŞEKKÜR

Öncelikle tezimi bitirmemde büyük yardımları olan tez danışmanım Yard. Doç. Dr. Sema Tülay Hekimbaşı'na teşekkür ederim. Bana bu çalışmayı gerçekleştirme fırsatını sağlayan Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümündeki tüm hocalarıma ve Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Abdülkadir Akçin'e teşekkürlerimi arz ederim. Tezimi hazırlarken aynı çalışma mekanını paylaştığım Mine Akşehirli ve Yaprak Aktekin'e tüm yardımları ve destekleri için teşekkür ederim. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü asistanlarına özellikle Yelda Özden ve E. Aylin Özüdoğru'ya göstermiş oldukları yardımlardan dolayı teşekkür ederim. Çalışmamda kullandığım bitki materyalini sağlamış olan Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsünden Teknik İşler Md. Yard. Dr. Aydan Ottekin ve Yemeklik Dane Baklagil Islah Biriminden Dr. Nezahat Aydın'a şükranlarımı sunarım.

Tüm hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek vererek bu çalışmaya ulaşmamı sağlayan sevgili anne ve babama saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

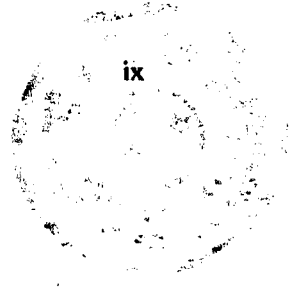
İÇİNDEKİLER DİZİNİ



	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	11
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Materyal	20
3.2. DNA İzolasyon Metodu	21
3.3. RAPD Analizi ile Genomik Parmakizlerinin Çıkarılması	24
3.3.1. Primerler	24
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	24
3.3.3. Agaroz Jel Elektroföresi	26
3.3.3.1. %0.8'lik deneme jeli	26
3.3.3.2. %1'lik boyama jeli	27
3.4. Polimorfizm Oranlarının Hesaplanması	28
4. BULGULAR	29
4.1. Çeşitlere ait RAPD Analizi Bulguları	29
4.2. Çeşitler Arasındaki Polimorfizm Değerlerinin Karşılaştırılması	31
5. TARTIŞMA	44
5.1. DNA İzolasyon Yönteminin Seçimi	44
5.2. Uygun Genetik Markır Sisteminin Seçimi	47
5.3. RAPD Amplifikasyon Şartlarının Optimizasyonu	48
5.3.1. DNA Konsantrasyonunun Optimizasyonu	48
5.3.2. Primer Konsantrasyonunun Optimizasyonu	49
5.3.3. dNTP Konsantrasyonunun Optimizasyonu	49

5.3.4. MgCl ₂ Konsantrasyonunun Optimizasyonu	49
5.3.5. Tampon Konsantrasyonu	50
5.3.6. Enzim Konsantrasyonu	50
5.4. RAPD Koşullarının Optimizasyonu	51
5.5. RAPD Markır Sonuçlarının Değerlendirilmesi	52
6. SONUÇLAR	54
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	68
EKLER	
EK 1.	
EK 2.	





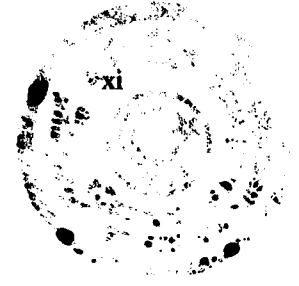
SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphisms.
AP-PCR	: Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction.
bp	: Baz Çifti (Base pair)
°C	: Santigrad Derece
cDNA	: Kopya DNA
cm	: Santimetre
cM	: Santimorgan
cpDNA	: Kloroplast DNA'sı
CsCl	: Sezyum Klorür
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromid
DAF	: DNA Amplification Fingerprinting
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
Gr (g)	: Gram
KCl	: Potasyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
M	: Molarite
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
mtDNA	: Mitokondri DNA'sı
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
NaCl	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)



pH	: Hidrojen İyon Konsantrasyonu
PVP	: Polivinilpirolidon
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Kısıtlanmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
Rnaz	: Ribonükleaz
rpm	: Dakikada dönme sayısı
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroföresi
ssp	: Alttür
TBE	: Tris Borik Asit EDTA
TE	: Tris EDTA
U.V.	: Ultraviyole
V	: Volt
VNTR	: Variable Number Tandem Repeat

ŞEKİLLER DİZİNİ



Şekil	Sayfa
3.1.6 Mercimek Çeşidinin Genomik DNA'larının Jel Görüntüsü	23
4.1. 6 Mercimek Çeşidinin CS 44 Primeri İle Elde Edilen RAPD Bandlarının Jel Üzerinde Görüntüsü	33
4.2. 6 Mercimek Çeşidinin CS 46 Primeri İle Elde Edilen RAPD Bandlarının Jel Üzerinde Görüntüsü	33
4.3. 6 Mercimek Çeşidinin CS 56 Primeri ile Elde Edilen RAPD Bandlarının Jel Üzerinde Görüntüsü	34
4.4. 6 Mercimek Çeşidinin SA-F Primeri İle Elde Edilen RAPD Bandlarının Jel Üzerinde Görüntüsü	34
4.5. 6 Mercimek Çeşidinin OS-03 Primeri İle Elde Edilen RAPD Bandlarının Jel Üzerinde Görüntüsü	35
4.6. 6 Mercimek Çeşidinin OH-04 Primeri İle Elde Edilen RAPD Bandlarının Jel Üzerinde Görüntüsü	35
4.7. 6 Mercimek Çeşidinin OR-12 Primeri İle Elde Edilen RAPD Bandlarının Jel Üzerinde Görüntüsü	36
4.8. 6 Mercimek Çeşidinin OG-06 Primeri İle Elde Edilen RAPD Bandlarının Jel Üzerinde Görüntüsü	36
4.9. 6 Mercimek Çeşidinin SA-R Primeri İle Elde Edilen RAPD Bandlarının Jel Üzerinde Görüntüsü	37

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
3.1. Kullanılan 6 Mercimek Çeşidine Ait Genomik DNA'ların Spektrofotometre Cihazında 260 ve 280 nm Dalga Boylarında Ölçülen Konsantrasyon Değerleri	23
3.2. RAPD Analizlerinde Kullanılan 9 Primer ve Nükleotid Dizileri	25
3.3. RAPD Analizlerinde Kullanılan Bileşenler ve Miktarları	25
3.4. %0.8 ve %1'lik Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Maddeler, İçerikleri ve Miktarları	28
4.1. 6 Mercimek Çeşidinde CS-44 Primeri İle Elde Edilen Bandlar ve Uzunlukları	38
4.2. 6 Mercimek Çeşidinde CS-46 Primeri İle Elde Edilen Bandlar ve Uzunlukları	38
4.3. 6 Mercimek Çeşidinde CS-56 Primeri İle Elde Edilen Bandlar ve Uzunlukları	39
4.4. 6 Mercimek Çeşidinde SA-F Primeri İle Elde Edilen Bandlar ve Uzunlukları	39
4.5. 6 Mercimek Çeşidinde OS-03 Primeri İle Elde Edilen Bandlar ve Uzunlukları	40
4.6. 6 Mercimek Çeşidinde OH-04 Primeri İle Elde Edilen Bandlar ve Uzunlukları	40
4.7. 6 Mercimek Çeşidinde OR-12 Primeri İle Elde Edilen Bandlar ve Uzunlukları	41
4.8. 6 Mercimek Çeşidinde OG-06 Primeri İle Elde Edilen Bandlar ve Uzunlukları	41
4.9. 6 Mercimek Çeşidinde SA-R Primeri İle Elde Edilen Bandlar ve Uzunlukları	42
4.10. 6 Mercimek Çeşidi Arasında Benzerlik Oranları	43
4.11. 6 Mercimek Çeşidi İçin Oluşturulan Dendogram	43

1. GİRİŞ:

Lens culinaris (mercimek), *Lens* Miller genusu içerisinde yer alan bir türdür. Genus *Lens* Miller, Rosales takımı, Rosineae alt takımı, Leguminosae (baklagiller) familyası, Papilionacea alt familyası ve Viciae kabilesinin bir üyesidir. Viciae içerisinde *Lens*'in yanında üç genus daha yer alır: *Vicia* L., *Lathyrus* L., ve *Pisum* L.. Morfolojik olarak bakıldığında, *Lens* ve *Vicia* genusları arasında çok az bir morfolojik fark vardır. *Lens* genusu bir yıllık, küçük çiçekli, derin bir şekilde subulat olan (kunduracı bizi şeklinde), bölünmüş kalikse sahip ve bir veya iki dairesel tohumu içeren bir tohum kabuğu ile karakterize edilen çok daha küçük bir cinstir.

Barulina (1930) ve Davis and Plitman (1970), *Lens* genusunun; *L. orientalis* (Boiss) Hand. Hazz., *L. nigricans* (M. Bieb.) Godr., *L. ervoides* (Brign.) Grande. ve *L. montbretii* (Fisch. and Mey.) şeklinde dört yabancı türe sahip olduğunu savunmuşlardır. Ladizinsky and Sakar (1982), *L. montbretii*'nin morfolojik ve sitogenetik bakımlardan *Lens* türlerinden oldukça farklı olduğunu tesbit etmiş ve taksonomik durumunu *Vicia montbretii* Fisch. and Mey. olarak değiştirmişlerdir. Bu takson, yaprak ve tohum kabuğu yüzeylerinin oldukça villoslu (yumuşak tüylerle kaplı yüzey), yaprak başına yaprakçık sayısının daha fazla olması, uzun dallanmış tendrilleri (sülüksü yapı) ve daha büyük tohum kabukları bulundurması nedeniyle diğer *Lens* türlerinden farklılık gösterir. *Vicia* ve *Lens* sitogenetik açıdan da bazı farklılıklar arz eder. *Vicia*'da kromozom sayısı $2n=12$ 'dir. Oysa *Lens* genusunda kromozom sayısı $2n=14$ 'dür. *Vicia*'nın karyotip yapısı da *Lens*'den farklıdır. *Vicia* büyük bir metasentrik, telomere yakın bir ikincil yapıya sahip küçük bir metasentrik ve farklı büyüklüklerde dört akrosentrik kromozom çiftinden oluşur (Ladizinsky and Sakar, 1982). *Lens* türlerinde ise üç çift metasentrik veya submetasentrik kromozom, sentromere oldukça yakın bir ikincil yapıya sahip bir çift metasentrik kromozom ve üç çift akrosentrik kromozom şeklindedirler (Ladizinsky, 1979b).

Mercimek, en eski Batı Asya tahıllarından biridir ve bugün hala Hint yarımadası ve civar bölgelerinde, Orta Doğu, Güney Avrupa, Batı ve Kuzey Afrika'da ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır. Yakın Doğu arkeolojik bölgelerinde bulunan karbonlaşmış mercimek tohumlarının tarihi M.Ö. 7. bin yıla

kadar gitmektedir ki, bu Akdeniz ve Orta Avrupa'da mercimeğin ziraatının Neolitik zamanlarda başladığını göstermektedir. (Renfrew, 1969). Barulina (1930) *L. orientalis*'in, *L. culinaris*'in yabani atası olduğunu önermektedir. Bu fikir sitogenetik olarak desteklenmektedir (Ladizinsky, 1979b). Ayrıca *Lens* genusu için yapılan bir allozim analizi çalışmasında da bu iki alt tür arasında yüksek bir genetik benzerlik bulunması bu fikri desteklemektedir (Pinkas et al. 1985).

Ladizinsky ve ark. (1984)'nın önerisine göre, *Lens* genusu içerisinde iki tür veya çaprazlanabilirlik grubu vardır. Birincisi, *Lens culinaris*'dir ve kültür mercimeği olan *ssp. culinaris*, yabani alt türler olan *ssp. orientalis* ile *ssp. odemensis*'i içermektedir. İkincisi ise, *Lens nigricans*'dır ve iki yabani alt tür *ssp. ervoides* ile *ssp. nigricans*'ı içermektedir. Bir çaprazlanabilirlik grubu içerisinde kısmi veya tam olarak üretken hibridler üretilebilir. Çaprazlanabilirlik grupları arasında yapılan çaprazlamalar ise döllenmeden kısa bir süre sonra embriyonun bozulması ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte *ssp. culinaris* ile *ssp. ervoides* arasındaki hibridler, embriyo kurtarılarak üretilebilmektedir. Fakat düzensiz mayoz bazı kromozomlar arasında kromozomal değişikliklerin varlığına işaret etmektedir (Cohen et al. 1984, Ladizinsky et al. 1985).

Ladizinsky (1993) son olarak *Lens* sınıflandırmasını, içerisinde izozim markırlarına (Pinkas et al. 1985; Hoffman et al. 1986) ve nükleus DNA'sı RFLP sonuçlarına (Havey and Muehlbauer et al. 1989a) dayanarak değiştirmiştir. Yeni önerisinde *culinaris* ve *orientalis* haricindeki tüm alt türleri tür statüsüne yükseltmiştir. Bunların dışındakileri ise *L. culinaris*'in alt türleri olarak önermiştir. Sonuç olarak, Ladizinsky (1993)'e göre *Lens* genusunun taksonomisi şöyle özetlenmiştir:

L. culinaris

ssp. culinaris (kültür mercimeği)

ssp. orientalis (yabani mercimek)

L. odemensis

L. ervoides

L. nigricans

Bir başka çalışmada (Ahmad et al. 1995) yapılan SDS-PAGE analizi ise, *L. odemensis*'in kültürü yapılan mercimeğe *L. culinaris ssp. orientalis*'den çok daha yakın akraba olduğu ve *L. odemensis*'in, *L. culinaris*'in bir alt türü olduğuna işaret edilmiştir. Ahmad et al. (1995) bu sonucu metoda bağlı olarak genetik akrabalıklara ilişkin farklı sonuçlara ulaşılabileceği şeklinde yorumlamaktadır.

Genus içerisinde hibridizasyon, morfolojiye bakılarak türleri sınırlandırmanın oldukça yetersiz kaldığına işaret etmektedir. Morfolojilerine dayanarak aynı tür içerisinde sınıflandırılan ırklar bazen çaprazlanamamaktadırlar. Bu nedenle, önceleri *L. nigricans*'ın bir üyesi olarak kabul edilen *L. odemensis* yeni bir tür olarak tanımlanmıştır. Bu türlerin her ikisinde stipüller yarı hastat (ok şeklinde) fakat *L. nigricans*'da stipüller dik görünür. *L. odemensis*'de horizontal ve daha az dişli bir stipül yapısı söz konusudur.

Lens Miller küçük bir genustur ve kültürü yapılan türleri ekonomik bakımdan önemlidir. Mercimek, Batı Asya, Etiyopya, Kuzey Afrika ve daha az ekonomik öneme sahip olmakla birlikte Güney Avrupa'da uzun süredir yetiştirilen taneli bir tarla bitkisidir. Bu baklagil türü daha sonradan Amerika ve Avustralya kıtalarına da sokulmuştur. Kültürü yapılan mercimek *Lens culinaris*'in alt türüdür ve bitki sistematğinde *Lens culinaris ssp. culinaris* olarak adlandırılır.

Geri kalmış ülkelerde, nüfus artışı besin maddelerinin üretimindeki artıştan fazladır ve bu sebeple beslenme yetersizliği, özellikle de beslenmede protein eksikliği ile karşılaşmaktadır. Ülkemizde de karbonhidratlarca zengin besin maddeleri oldukça fazla tüketilmekte, zeka ve vücut gelişimi için önemli olan proteinli besin maddeleri ise yeterince tüketilmemektedir. Hayvansal ürünlerin fiyatları fertlerin normal alım gücünün üzerinde olması nedeniyle protein açığı, daha ucuz ve saklanması daha kolay olan, danesinde %18-32 protein içeren yemeklik dane baklagiller ile karşılanabilir. Mercimek bitkisi de bu özelliklere sahip olduğundan önemli bir gıdadır.

Ayrıca, bilhassa nohut ve mercimek, kurak ve yarı kurak bölgelerde tahıllarla ekim nöbetine girerek birim alan verimini artırmakta ve nadas alanlarını azaltmakta önemli bir yere sahiptir. Köklerine yerleşen ve bitki ile ortak yaşam sürdüren

Rhizobium bakteri türlerinin yardımı ile havanın serbest azotunu toprağa fiksederler.

Türkiye’de yemeklik dane baklagillerin ekilişinde, 1997 yılı rakamlarına göre 721 000 hektar ile nohut ilk sırada, 560 000 hektar ile mercimek ikinci sırada yer almaktadır. Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü’ne göre mercimeğin ıslah amaçları; yüksek verimli, kurağa ve soğuğa dayanıklı, makinalı hasada uygun, aynı zamanda olgunlaşan iri taneli çeşit yetiştirmektir.

Muehlbauer and Tullu, 1997’de bildirildiği üzere mercimeğin protein konsantrasyonu %22- %34,6 arasında değişmektedir. 100 gram kuru mercimek tohumu 340-346 gr kalori, %12 su, 20,2 gr protein, 0,6 gr yağ, 65 gr total karbonhidrat ve yaklaşık 4 gr fiber, 2,1 gr kül, 68 mg Kalsiyum, 325 mg Fosfor, 70 mg Demir, 29 mg Sodyum, 780 mg Potasyum, 0,46 mg Tiamin, 033 mg riboflavin, 1,3 mg niasin içermektedir. Soğuk dönem baklagil ürünleri arasında mercimek, önemli aminoasitler (Lisin, Arginin, Lösin ve sülfür içeren aminoasitler) bakımından en zenginidir. Tohumda nişasta içeriği, %35- %53 arasında değişir ve kurumuş halinde bu değer %42’dir. Tohum nişastasının %27- %38,5 arasındaki kısmını amilaz oluşturur. Kabuktan arındırılmış 100 gr mercimek tohumu 344 kalori, %9,9 su, 25,8 gr protein, 1.8 gr yağ, 58,8 gr toplam karbonhidrat, 0,9 gr fiber, 3,7 gr kül, 24 mg kalsiyum, 271 mg fosfor, 10,6 mg demir, 0,47 mg tiamin, 021 mg riboflavin, 1,5 mg niasin içermektedir. Mercimek iyi bir B vitamini kaynağıdır. Her 100 gr mercimek tohumu 0,26 mg Tiamin, 0,21 mg riboflavin, 1,7 mg nikotonik asit, 223 mg kolin, 107 mg folik asit, 130 mg inositol, 1,6 mg pantotenik asit, 13,2 mg biotin ve 0,49 mg piridoksin içermektedir. Vitaminler, folik ve pantotenik asitler hariç, çimlenme esnasında belirgin bir şekilde artar. Kuru tohum kabukları, %11,1 protein (%1,3’ü sindirilebilir), %0,7 yağ, %47,5 karbonhidrat, %25,6 fiber ve %3,1 kül içerir. Mercimek proteininin yaklaşık %90’ı, ana fraksiyonlar olan albümin ve globülinler ile kotiledonlarda bulunmaktadır. Mercimek için sindirilebilirlik katsayısı %78 - %93 arasında değişir ki, biyolojik değerler %32- %58 arasındadır. Oleik, palmitik ve linoleik asitler baskın yağ asitleridir.

Mercimek tohumları yukarıda belirtildiği gibi proteince zengin olmasına karşın diğer hububat baklagillerde olduğu gibi, triptofan ve sülfür içeren aminoasitler,

metionin ve sistin bakımından yetersizdir. Buna karşın mercimek proteini, tahıllarda kısıtlı bir aminoasit olan lisini önemli konsantrasyonlarda içermektedir. Tahıllar ise triptofan ve sülfür içeren aminoasitler bakımından nispeten zengindir. Bu yüzden, mercimek ve tahıllar dengeli bir beslenme dahilinde birlikte tüketildiğinde, insan beslenmesinde önemli aminoasitleri yeterli miktarlarda sağlamaktadırlar. Tohum besinsel kompozisyonu, genotip ve tohumun olgunluğu ile değişiklik göstermektedir ve toprağın besleyicilik yeteneğinden etkilenmektedir.

Mercimeğin tıbbi önemi de bulunmaktadır. Örneğin, kabızlığa ve diğer intestinal şikayetlere bir çare olduğuna inanılmaktadır. Hindistan'da mercimek, çiçek hastalığından kalan yaralar için yara lapası halinde kullanılmaktadır. Altıncı yüzyılda nohutun afrodizyak olduğuna inanılırken, mercimeğin zıt bir etkiye sahip olduğu düşünülmekteydi ve bu düşünce muhtemelen, manastırlarda etsiz günlerdeki diyetlerde yer almasının nedeniydi.

Lens culinaris ssp. culinaris; ince, tekyıllık bir bitkidir. Genellikle 30-45 cm uzunluktadır. Bireysel bitkiler bir tek gövdeden, güçlü çalı formlarına kadar değişiklik göstermektedir. Her biri yaklaşık 1-4 cm uzunlukta olan pinnat yapraklar (yaprakçıkların ana eksen üzerine karşılıklı dizilme durumu), soya fasulyesi ve *Phaseolus* üyelerinin trifoliolatları (bir ana sapın ucunda üç yaprakçığı bulunan bileşik yaprak) ile karşılaştırıldığında nispeten küçüktürler ve 14 kadar, sessil, ovat, eliptik, obvat veya lanseolat yaprakçıklar içerebilirler. Her bir yaprak iki küçük stipül taşır ve bir tendril ile son bulur veya hiç tendril oluşturmaz. Üretken nodlar genellikle tek çiçek taşırlar fakat bazen iki veya üç, çok nadir dört çiçek kısa pedunkul (çiçek kümesi sapı) üzerinde yer alır. Kelebek benzeri (papilionaceous) tipik çiçekleri küçüktür, 4-8 mm uzunlukta ve beyaz, soluk mor veya siyahımsı mor renkte olurlar. Mercimekte çiçeklenme, akropetal olmaktadır. Bu yüzden, daha genç olan nodlar çiçek oluşturmayı başlatırken, daha alttaki nodlar olgunlaşmaya yakın tohum kabuklarını bulundurlar. Çiçekler kendi kendilerini polenler. Tripsler ve diğer küçük böceklerin aracılığı ile çapraz polenleşme olur, ancak rüzgar veya bal arıları ile polenleşme gerçekleşmez. Küçük böcekler ile sağlanan dış çaprazlamalar %0.8'den daha az olmaktadır (Wilson and Law, 1972). Polenleşme çiçek açılması öncesinde gerçekleşir. Çiçek açıldıktan sonra üç gün içinde taç yaprak solar ve meyvalar ya da tohum kabukları 3-4 gün sonra ortaya çıkar. Oblong (dikdörtgensel)

olan tohum kabukları yassılaşıp, düz, 1-2 cm uzunluktadır ve genellikle 1 veya 2, nadiren 3 tohum içermektedir.

Mercimek tohumları, Barulina (1930)'nın tanımladığı üzere iki tipe ayrılır:

Macrosperma- başlıca Akdeniz havzasında, Avustralya ve Amerika kıtalarında bulunmaktadır. 6-9 mm çapında geniş tohumlara sahiptir. Normalde sarı kotiledonlara sahiptir ve çiçeklerde veya vejetatif yapılarda pigmentasyon azdır veya hiç yoktur.

Microsperma- başlıca Hindistan alt kıtasında ve Yakın Doğuda bulunur. 2-6 mm çapında daha küçük tohumlara sahiptir. Kırmızı, turuncu veya sarı kotiledonlara sahiptir. Daha kısa, daha çok pigmentasyonlu olan tohum kabukları, yapraklar ve yaprakçıkları ile tanınırlar.

Mercimek tohumları, lens şeklindedir ve 100 tanesi yaklaşık 2-8 gr ağırlığındadır. Testa (tohum dış örtüsü) rengi solgun sarımsı kahveden, kahverengi ve siyaha kadar değişiklik göstermektedir. Bu renklerin üzerinde mor ve siyah benekler veya noktalar bazı kültürlerde yaygındır. Mercimek tohumları, mekaniksel hasarlara karşı bezelye, bakla ve nohuta nazaran çok daha hassastır. Fakat mercimek tohumunda çimlenmenin hypogeal olması (kotiledonların toprak altında kalması) fidelerin çevresel hasarlara uğramasını önlemektedir. Filizlerin hasar görmesi durumunda, toprak altındaki nodlardan yeni dallar gelişebilmektedir.

Mercimek, bezelye ve baklada da yumrulaşmaya sebep olan *Rhizobium leguminosarum* tarafından enfekte edildiğinde yumrulaşma gösterir. Yumrular (nodül) uzarlar ve nadiren 5 mm uzunluğu aşarlar.

Kültür mercimeği morfolojik olarak diğerlerinden farklılaşma gösterir (Barulina, 1930), fakat tohum büyüklüğü, tohum rengi, yaprak boyutu, yetiştirme habitatı ve muhtemelen çiçek rengi gibi özelliklerde varyasyonlar ehlileştirme sonrasında seleksiyonla arttırılmışlardır (Ladizinsky et al. 1984). *L. ssp. culinaris* ve *L. ssp. orientalis* arasındaki morfolojik farklar kültürü yapılanın ehlileştirilmesinin bir sonucudur. Fakat bu iki alttür tamamen interfertiledir (Ladizinsky, 1993).

Tohumlar donma sıcaklığının üzerinde çimlenir. Fakat, en iyi çimlenme sıcaklıkları 18-21°C arasındadır. 27°C'nin üzerindeki sıcaklıklar zararlıdır. Büyüme ve ürün vermesi için optimum sıcaklık değeri 24°C civarındır. Yarı kurak tropiklerde bir soğuk hava veya kış bitkisi olarak yetiştirilir ve deniz seviyesinden 3800 m. yüksekliğe kadar kültürü yapılır. Fakat nemli tropiklere uygun değildir. Kuraklıktan, aşırı sudan göreceği zarardan daha az zarar görür. Bulgaristan'da küçük tohumlu kültürler kuraklığa büyük tohumlu kültürlerden daha fazla dirençlidirler. Mercimek hafif humusludan alüvyonlu toprağa kadar bir çok toprak tipinde yetişir. En iyi ise killi topraklarda gelişir. Orta derecede alkaliniteye tolerans gösterir. Tuza toleransı, çimlenme esnasında sonraki gelişme periyoduna göre daha yüksektir. 20.0 mmhos/cm değerinde bir tuzluluk tohum ürününü %50 azaltır. Sera çalışmaları 3.9 mmhos/cm'e toleransın daha gerçekçi olduğunu önermektedir. Bitki, 2.8-24.3 dm yıllık yağış değerine, 6.3-27.3°C sıcaklığa ve 4.5-8.2'lik pH değerlerine tolerans gösterir.

Tüm *Lens* taksonları diploiddir ($2n=14$) ve benzer karyotipe sahiptirler (Ladizinsky et al., 1984). Üç çift metasentrik veya submetasentrik kromozom, üç çift akrosentrik kromozom ve bir çift satellitli kromozomdan oluşmaktadır (Ladizinsky et al., 1984). Kültür mercimeği çeşitlerinde yapılan bir karyotip çalışmasında tüm çeşitlerde somatik kromozom sayısı $2n=14$ olarak bulunmuş fakat çeşitler total kromatin uzunluğu, kromozom kol oranları ve sentromer konumları bakımından birbirlerinden farklılıklar göstermiştir (Kumar and Sinha, 1992). Aynı çalışmada kromozomların büyük çoğunluğu submetasentrik yapıda bulunmuştur.

Ladizinsky et al. (1984) *Lens* türleri içerisinde bir çok kromozomal düzenlenmenin olduğunu ortaya koymaktadır. Fakat bu cins içerisinde genel olarak hibridler kolaylıkla elde edilebilmektedir ve bunlar tamamen veya kısmen fertile olmaktadır. Dikkat çeken bir istisna (Ladizinsky et al., 1984) *Lens nigricans*'da ortaya konmaktadır. Bu türün bir sitotipi yaygın sitotipinden dört translokasyon ve bir parasentrik inversiyon ile farklılık gösterirken, *ssp. ervoides*'den sadece iki translokasyon ile farklılık göstermektedir. Ladizinsky et al. 1984 bu sitotipi aynı yayında *L. culinaris ssp. odemensis* olarak adlandırmaktadır. *L. nigricans*'ın bu iki sitotipi arasındaki hibridler tamamen steril olmaktadır. Aynı çalışmada kültür

mercimeğinin ise *ssp. odemensis* olarak belirlediği sitotipten üç resiprokal translokasyon ile farklılık gösterdiği ortaya konmaktadır. *L. culinaris ssp. culinaris* ve *L. culinaris ssp. orientalis* birbirinden yine üç translokasyon ile farklılaşır (Ladizinsky et al., 1984).

Ladizinsky, 1979, mercimek bitkisinde epikotil renginin bir tek gen (Gs, green seedling) tarafından kontrol edildiğini ve bu genin dominant olduğu durumda mor renk, genin çekinik olması durumunda ise yeşil renk epikotilin fenotipe yansıdığını ortaya çıkarmıştır.

Lens cinsinde kloroplast genomunun büyüklüğü çoğu kara bitkisinden küçüktür ve yaklaşık olarak 120 kb'dır (Palmer et al. 1985). Bu küçük boy çoğu papilionid baklagillerin ortak atasında meydana gelen 25 kb'lık inverted (ters çevrilmiş) tekrar dizisinin kaybındandır (Lavin et al. 1990).

Moleküler biyolojide bir süredir DNA moleküler markır teknikleri kullanılmaktadır. Genetik parmakizi tekniği, özel yetiştirme projelerinde gerek duyulan ve istenilen belirli genleri tanımlamakta kullanılmaktadır. Bu bilhassa hastalıklara veya zararlı böceklerle direnç gösterici özelliklere sahip germplazımlar araştıran ulusal zirai programlar açısından önemlidir.

Genetik markırların bitki yetiştiriciliğinde son derece kullanışlı olduğu, bitkilerde gen haritası oluşturmaya dayalı RFLP metodunun gelişimi ile olmuştur. DNA parmak izi, bir RFLP tekniği kullanarak minisatellit lokuslarda yüksek düzeylerde VNTR (variable number tandem repeat) varyasyonunu kullanmak üzere geliştirilmiştir. PCR (polimerase chain reaction)'ın geliştirilmesinden beri, bu oldukça değişken lokusların analizleri daha çok ilgi çekti ve yeni VNTR markırları keşfedildi. Nokta mutasyonları ve VNTR tip değişikliklerine işaret eden varyasyonlar, eşzamanlı olarak lokusları çoğaltan PCR metodları kullanılarak taranmaktadır.

Kültür mercimeğinde morfolojik özellikler bakımından polimorfizm oldukça yaygındır. Fakat biyokimyasal markırlar bakımından polimorfizm ise daha az

görülmektedir (Hoffman et al., 1986). Biyokimyasal markırlar ile polimorfizm yabani alt türler arasında daha yaygın bulunmaktadır.

PCR'a dayalı DNA parmak izi metotları arasında muhtemelen en yaygın olarak kullanılanlar RAPD ve AFLP dir. Diğer metodlar, DNA amplifikasyon fingerprinting (DAF) ve arbitrarily primed PCR (AP-PCR)'dır. Bu metodlardan DAF, RAPD, ve AP-PCR tamamen benzer temellere dayanır. Üç methodda da genomik DNA'yı rastgele çoğaltmak için bir tek primer kullanılır. DAF ve RAPD arasındaki en büyük fark, DAF'da daha kısa primerler (DAF'da 5-10 bp iken RAPD'de 10-12 bp) kullanılması ve buna bağlı olarak daha çok sayıda DNA parçasının çoğaltılmasıdır. AP-PCR'da ise 15-25 bp ve 10 µM konsantrasyonda primerler kullanılır. AP-PCR ısı döngüsü profili ile de farklılık gösterir. Bu üç metodun en büyük dezavantajı, elde edilecek bandların reaksiyon koşulları, DNA'nın niteliği ve PCR ısı profilindeki değişikliklere oldukça hassas olmasıdır.

RAPD tekniğinin 1990'da keşfi (Williams et al., 1990 ; Welsh and McClelland, 1990) ile birlikte mercimek bitkisinde RAPD tekniği ile polimorfizm çalışmaları (Abo-elwafa et al. 1995; Ahmad et al. 1996) gerçekleştirildi. Bu çalışmalar mercimek bitkisinde tür içi ve türler arası polimorfizmin genelde düşük olduğunu bildirmektedir.

Bu çalışma, kültür mercimeğine ait altı çeşit üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmanın ana konusu bu altı farklı çeşit arasında RAPD markırları kullanılarak polimorfizm araştırması yapmaktır. Daha önceki yıllarda gerçekleştirilmiş olan bu yöndeki çalışmalar (Abo-elwafa et al. 1995; Ahmad et al. 1996) mercimekte tür içi polimorfizmin düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla çalışmaya başlarken kullanılan bireyler arasında düşük polimorfizm oranları bulunması öngörüldü. Çalışma, RAPD PCR tekniğinin bu altı kültür mercimeği çeşidinde de polimorfizm belirlemede uygun bir teknik olduğunu göstermeyi ve Türkiye'ye has bu çeşitler arasındaki varyasyonun derecesini belirlemeyi hedeflemektedir.

Çalışma, Türkiye için büyük ekonomik öneme sahip olan mercimek bitkisinin ıslah çalışmalarına katkı sağlayacaktır. Zira bakımından önemli özelliklere sahip olan çeşitler ile bu özelliklere sahip olmayan çeşitlerden elde edilcek F₁ ve F₂ bireylerinde

bu özellikleri veren genler takip edilebilir. Çalışma RAPD markırları kullanılarak mercimek varyeteleri arasında polimorfizmin belirlenebileceğini göstermeyi hedeflemektedir.



2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR:



Kültür mercimeği ile yapılan çalışmalar ekonomik önemine rağmen modern anlamda 1980'lerin ortalarından itibaren olmuştur ve diğer ekonomik bitkilere nazaran düşük seviyede kalmıştır. İlk çalışmalar (Barulina, 1930; Davis and Plitman, 1970) kültür mercimeğinin *Lens* genusu içinde yerleşimi ve yabancı türler ile ilişkisini ortaya koymak üzere morfolojik karakterlere dayanan çalışmalar olmuştur. Fakat taksisler arasında morfolojiye dayanan ayırmalar, büyük oranda stipüllerin şekline, yönelmesine ve kaliks dişlerinin boyuna dayanan az ve net sonuç vermeyen kıstaslar olmuştur (Ladizinsky et al. 1984). Moleküler markır tekniklerinin geliştirilmesi ile *Lens* sistematigi farklı bir seyir almıştır.

Ladizinsky ve ark. (1984), içinde Türkiye, İsrail ve Güney Avrupa'nın da bulunduğu dünyanın çeşitli bölgelerinden *Lens culinaris* ve diğer *Lens* cinsi türlerinden bireyler toplayıp bunları çaprazlamışlardır. Elde ettikleri sonuçları bu türlerin çaprazlanabilirliğine, akrabalıklarına ve kromozom değişimine göre değerlendirerek *Lens* cinsini *L. culinaris* ve *L. nigricans* şeklinde iki ana gruba ayırmışlardır. Yayınlarında elde ettikleri sonuçları şu şekilde açıklamaktadırlar: "*Lens* cinsi içerisinde iki ana çaprazlanabilir grup belirlendi. Aynı grubun üyeleri, doğrudan veya dolaylı yoldan bir diğeri ile uyumlu bir biçimde çaprazlandı ve hibrid tohumlar elde edilebildi. Fakat gruplar arası çaprazlamalarda, hibrid embriyoların yaklaşık iki hafta gelişebilmesi ve sonrasında gelişimin başarısız kalması nedeniyle hibrid tohumlar elde edilemedi." Bu sonuçlara dayanarak Ladizinsky ve ark. (1984) buna göre ilk çaprazlanabilir grubuna, kültür mercimeğinin çeşitli kültürlerini, *L. orientalis* ve horizontal stipül tipine sahip *L. orientalis*'i dahil etmektedir. İkinci gruba ise *L. ervoides* ve dik stipül tipine sahip *L. nigricans*'ı dahil etmektedir. Bu sınıflandırmada *L. nigricans* türü her biri bağımsız bir tür olarak düşünülebilecek iki kısma ayrılmaktadır. Stipül şekilleri ile birbirlerinden morfolojik olarak ayırt edilebilmektedirler ve reproduktif bariyerle birbirlerinden izole olmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar dik stipül tipine sahip olan çeşidi *L. nigricans* Godr. grubuna dahil etmişlerdir. Horizontal stipül tipine sahip olanı da *L. culinaris* grubuna aktarmışlar ve ssp. *odemensis* Ladizinsky olarak adlandırmayı önermişlerdir.

Fakat Ladizinsky, (1993) son olarak *Lens* sınıflandırmasını içinde izozim markırlarının (Pinkas et al. 1989; Hoffman et al. 1986) ve nukleus DNA'sı RFLP'lerinin (Havey and Muehlbauer, 1989) kullanıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre değiştirdi. Buna göre, kültür mercimeği *Lens culinaris culinaris* olarak *Lens culinaris orientalis* ile birlikte *Lens culinaris*'in alt türü olarak belirlenirken, diğer alt türler tür seviyesine çıkmaktadır.

Wilson ve ark. (1970), kırmızı kotiledonlu ve sarı kotiledonlu mercimek bitkileri arasında yaptıkları çaprazlamalardan elde ettikleri F₂ soylarında, kotiledon rengini sağlayan genler arasında kırmızı fenotipin sarı fenotipe baskın olduğunu ve aralarında Mendel kurallarına uygun şekilde 3:1 oranını veren bir allelomorfik ilişki elde etmişlerdir. Aynı ilişkiyi mikrosperma ve makrosperma grupları altında da gözlemişlerdir.

Kumar ve Sinha, (1992) *Lens culinaris* bitkisinin on varyetesinde karyotip analizine dayalı evrimsel eğilimleri ve türleşmelerine yol açan muhtemel sebepleri araştırmışlardır. Çalıştıkları tüm varyetelerde somatik kromozom sayısının $2n=14$ olduğunu, fakat birbirlerinden toplam kromozom uzunluğu, kromozom kolu oranı ve sentromerin konumu bakımından farklılaştıklarını tesbit etmişlerdir. Bu çeşitlerde kromozomların farklı tiplerinin yani metasentrik, submetasentrik ve subtelosentrik kromozomların sayısının sabit olmadığını belirlemişlerdir. Total kromozom uzunluğunu maksimum 73.87 μm ve minimum 51.92 μm olarak belirlemişlerdir. Tohum büyüklüğü ve toplam kromozom uzunluğu arasında bir ilişki olmadığını gözlemişlerdir.

Redy ve Annadurai, (1992) yaptıkları bir mutasyon çalışmasında gamma ışınlarının, EMS, sodyum azid ve bunların kombinasyonlarının bir mercimek varyetesi olan PL-639'un M₂ jenerasyonunda quadrivalent oluşumu, bivalent oluşumu, univalent oluşumu, parça kromozom oluşumu, anafazda geri kalma ve diğer sitolojik düzensizlikler üzerine etkilerini incelemişlerdir. Mutajenler ile muameleye sokulan populasyonlarda kiazma frekansı azalırken quadrivalentler, çubuk bivalentler, parça kromozomlar, anormal sitolojiye sahip hücreler ve polen kısırlığında artış olduğu gözlenmiştir. Mutajenler birleştirilerek uygulandığında bu

etkilerde artış gözlenmiştir. Mutajenler tek tek uygulandığında ise en büyük mutajenik etkiyi gamma ışınları göstermiştir ve EMS'nin ise sodyum azidden biraz daha fazla mutajenik etkiye sahip olduğunu tesbit etmişlerdir.

Pinkas ve ark. (1985) tarafından yapılan bir çalışmada, 67 *Lens* popülasyonu 9 enzim sistemi için elektroforetik olarak incelenmiş ve 37 alleli 15 enzim geni tanımlanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, bu enzim genleri bakımından *L. nigricans* popülasyonları monomorfik bulunurken, *L. culinaris* ve *L. orientalis*'de polimorfik popülasyonların yaygın olduğu bulunmuştur. Popülasyon ortalaması içerisinde polimorfik lokusların oranı, *L. orientalis*, *L. ervoides* ve *L. culinaris*'de *L. odemensis* ve *L. nigricans*'dan önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Tür içerisinde polimorfik lokusların oranı, *L. orientalis*'de en yüksek olduğu ve *L. ervoides*, *L. culinaris*, *L. nigricans* tarafından takip edildiği gözlenmiştir. Heterogenite indeksi, *L. culinaris* ve *L. odemensis*'de diğer üç tür ile karşılaştırıldığında önemli değerde yüksek olduğunu tesbit edilmişlerdir. 67 *Lens* popülasyonunun tümü arasındaki genetik mesafe de hesaplanmıştır. Aynı türe ait popülasyonlar arasındaki genetik mesafe, farklı türe ait popülasyonlar için elde edilen genetik mesafe değeri ile karşılaştırıldığında, *L. culinaris* ve *L. orientalis* hariç tüm durumlarda aynı türe ait popülasyonlar arasındaki genetik uzaklık değeri, farklı türden popülasyonlar için elde edilen değerlerden daha düşük bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda, *L. orientalis* ve *L. culinaris* karşılaştırılan türler arasında en yakın akraba bulunanlar olmuştur. *L. ervoides*, *L. orientalis* ve *L. culinaris*'e *L. odemensis*'e olduğundan daha çok benzerbir durum sergilerken, *L. nigricans* ise diğer türlerden en büyük uzaklık göstermiştir ve en çok *L. odemensis*'e benzer bulunmuştur. Kültür mercimeğinde 31 popülasyonun on sekizinde polimorfizm belirlerken, Pinkas ve ark. (1985) 31 *L. culinaris* popülasyonunun %52'si üç alleli bulunan *Got-2* (glutamat oksaloasetat transaminaz-2) geni için polimorfiktir demiştir. Pinkas ve ark. (1985) *Aat-2* ve *Got-3* genlerinin ise monomorfik olduğunu bildirmiştir. Pinkas ve ark. (1985) bu çalışmada ayrıca, Barulina (1930)'un öne sürdüğü, *L. orientalis* *L. culinaris*'in yabani atasıdır önerisini de destekler sonuçlar bulmaktadır. Zira çalışmalarında bu iki tür arasında yüksek bir genetik benzerlik bulunmuştur.

Hoffman ve ark. (1986) yine izozim markırlarını kullanarak *Lens* genusu içersindeki polimorfizm araştırması gerçekleştirmiş ve elde edilen sonuçlarla kültür mercimeğinin genetik kökeni araştırmışlardır. Bu çalışmada, 14 enzim için 25 izozim lokusu bulunmuş ve bu lokuslardan 16 tanesinin *Lens* türleri içerisinde polimorfik olduğunu ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar Ladizinsky ve ark. (1986)'nın *L. culinaris ssp. odemensis* olarak adlandırılan türün *ssp. orientalis* ve *ssp. culinaris* ile bir çok allozimi paylaştığını ortaya koymaktadır. İnceledikleri enzimlerde kültür mercimeği ile *ssp. orientalis*'in 22 alleli ortak bulundurduğunu ve aralarında yüksek bir genetik benzerlik olduğunu tesbit etmişlerdir. Aynı şekilde, *ssp. odemensis* ve kültür mercimeği arasında da yüksek bir genetik benzerlik ve 25 allelin 21'inin ortak olduğunu gözlemişlerdir. Elde ettikleri verileri daha önceki sitolojik ve morfolojik verilerle birlikte değerlendirdiklerinde, Ladizinsky ve ark. (1984)'nın elde ettiği sitolojik bulguların kültür mercimeğinin türediği türün *ssp. orientalis* olduğunu göstermesine rağmen *ssp. odemensis*'in de kültür mercimeğinin gen havuzuna katkısının olmuş olabileceği sonucuna varmışlardır.

Zamir ve ark. (1984) mercimekte elektroforetik olarak belirlenebilir sekiz enzimin genetiğini incelenmiştir. Çalıştıkları lokusların herbirinde allozimler kodominant bir biçim ve beklenen Mendel kurallarında farklılaşma göstermiştir. Epikotil renk geni *Gs*, ve glutamat oxaloasetat transminaz-2 geni arasında bir bağlantı (14cM), ayrıca epikotil renk geni ve malik enzim-1 geni (*Me-1*) arasında bir bağlantı (25cM) belirlemişlerdir. Ortaya koydukları ikinci bağlantı grubu 21cM (santimorgan) aralıklı olarak iki enzim geni, glutamat oxaloasetat-3 (*Got-3*) ve alkol dehidrogenaz-1 geni (*Adh-1*) arasındadır. Toplam olarak bu çalışmada mercimek genomunun altı bağımsız segmentini tanımlamışlardır.

Vaillancourt ve Slinkard, (1992) yaptıkları bir çalışmada 11 morfolojik markır ve 17 izozim markırının mercimek (*Lens culinaris*) bitkisinde kalıtımını açıklamaya çalışmışlardır. Araştırmalarında 11 morfolojik markır ve 11 izozim markırının monogenik kalıtımını doğrulamışlar ve altı izozim markırının kalıtımını ilk kez bu yayında rapor etmişlerdir. Morfolojik karakterlerin kalıtımı açısından vardıkları bir sonuç, siyah tohum örtüsünün bir tek gen ile belirlendiği ve siyah tohum örtüsünün siyah olmayan tohum örtüsü üzerine baskın olduğudur. Malik enzim geni *ME-1* ve bir malat dehidrogenaz geni *MDH-6*'nın mitokondride yer aldığı bildirilmektedir.

Çalışmada, 11 morfolojik markırın kalıtımı 3:1 oranında bulunmuştur. 17 izozim markırının kalıtımının kodominansi gösterdiği de tesbit edilmiştir.

Havey ve Muehlbauer, (1989) mercimek bitkisinin 333 cM dan ibaret olan bir genetik bağlantı haritasını çıkarmışlardır. Bu bağlantı haritası bir tek türler arası çaprazlamada (*L. culinaris* X *L. orientalis*) farklılaşma gösteren 20 RFLP, 8 izozim ve 6 morfolojik markır ile yapılandırılmıştır. RFLP markırlarını belirleyen etiketler, mercimeğin bir cDNA'sından ve *EcoRI* ile *Pst I* tercihli genomik kütüphanelerinden izole edilmiştir. Çalışmada cDNA kütüphanesinden, rastgele genomik kütüphanelere nazaran düşük-kopya sayılı problemlerin en yüksek frekansı elde edilmiştir. Araştırmacılar kullanılan 20 RFLP'nin 15'inde, 8 izozimin 5'inde ve 6 morfolojik markırın 5'inde gözlenen F₂ farklılaşma oranları beklenen (Mendel yasalarına göre) 1:2:1 veya 3:1 oranlarına uygun olduğunu bulmuşlardır. 9 markırın ise beklenen F₂ oranlarından önemli sapmalar gösterdiğini ve *L. culinaris*'den gelen allellerin predominansi eğiliminde olduğunu tesbit etmişlerdir.

Havey ve Muehlbauer (1989), kültür mercimeği ve yabani mercimek çeşitlerini mercimek cDNA ve kısmi genomik kütüphanelerinden seçilmiş on tane nispi düşük-kopya-sayılı etiketler (problar) kullanarak RFLP çalışmaları yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçların Pinkas ve ark. (1985) ve Hoffman ve ark. (1986)'nın izozim markırları ile elde ettikleriyle uyumlu olduğunu görmüşlerdir. Ortalama gen farklılığı değerini kültür mercimeği ve yabani türlerde düşük olarak tesbit etmişlerdir. Kültür mercimeğinin bir çok restriksiyon parça uzunluğunu *orientalis* ve *odemensis* ile ortak olarak içerdiğini bulup, oluşturdukları dendogramda kültür mercimeğini bu iki yabani tür arasına yerleştirmişlerdir. Ladizinsky (1984)'ün çaprazlanabilirlik grubu 2 (*L. nigricans*) içinde yer alan *ervoides* ve *nigricans* alt türlerinde gözlenen parça boylarını, çaprazlanabilirlik grubu 1 (*L. culinaris*) üyelerinden, birbirleri arasında olduğundan daha çok farklı bulmuşlardır. Bu sonuçlar, Pinkas ve ark. (1985) ve Hofman ve ark. (1986)'nın kültür mercimeğinin atasının *ssp. orientalis* olduğu iddialarını desteklemektedir. Bu çalışmalarda alttür *nigricans*, alttür *culinaris*'den en uzak tür olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, araştırmacılar kültür mercimeği içersinde RFLP'lere dair değişkenliğin ayrıntılı bir genetik harita oluşturmak için yetersiz olduğu kanısına varmışlardır. Bu yüzden harita oluşturmak için yeterli sayıda RFLP'nin tanımlanması için *culinaris*'in *orientalis* veya *odemensis*'den biri ile

çaprazlanmasının gerekli olduğu kanısına varmışlardır. Fakat bu çaprazlamalarda translokasyonların ve çarpık allelik frekansların gözlenmesi nedeniyle haritanın oluşturulmasında problemler oluşabileceği sonucuna varmışlardır.

Muench ve ark. (1991)'de yapılan çalışmada kloroplast DNA'sı üzerinde elde edilen RFLP'ler, kültür mercimeği ile yabani mercimek türlerinin taksonomik akrabalıklarını incelemek ve *Lens* cinsindeki genetik varyasyonun miktarını tespit etmek için kullanılmıştır. Kültür mercimeği ile en büyük varyasyonu *L. ervoides* ve *L. nigricans*'ın gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları *L. c. ssp. orientalis*'in kültür mercimeğinin atası olduğuna dair önceki tespitleri desteklemektedir. Çünkü bu iki alttürün diğer herhangi bir alttür ile olduğundan daha çok sayıda kloroplast DNA parçasını ortak bulundurduğu belirlenmiştir.

Mayer ve Soltis, (1994) ise *Lens* cinsinde kloroplast genomunun varyasyonu üzerine bir restriksiyon-bölge analizi yapmışlardır ve kültür mercimeğinin bir çeşidinin restriksiyon bölge haritasını HindIII, EcoRV ve HaeII enzimleri ile yapılandırmışlardır. Ayrıca *Lens* cinsi için bir soy ağacı oluşturmuş ve burada *odemensis/nigricans/ervoides* şeklinde bir monofiletik grup tesbit edilirken, *culinaris* ve *orientalis* ayrı bir monofiletik grup olarak belirlenmiştir. *Odemensis* de bu iki grubun arasında yer almaktadır. Çalışmalarında *odemensis*'in, *L. nigricans* ile *culinaris* veya *orientalis* ile olduğundan daha yakın bir ortak atayı paylaştıkları ve kültür mercimeği çeşitlerinin identik cpDNA'lara sahip oldukları sonucuna varmışlardır.

Rajora ve Mahon (1994) ise mercimek bitkisinde ilk defa mitokondri DNA (mtDNA)'sının biparental (iki ebeveynli) kalıtımına rastlamışlardır. Mitokondri DNA'sının kalıtımını, alttür içi (*Lens culinaris ssp. culinaris*) çaprazlamalardan elde ettikleri F₁ ve F₃ soyları ile alttürler arasında (*L. c. ssp. orientalis* X *L. c. ssp. culinaris*) yaptıkları çaprazlamalardan elde ettikleri F₁ soyları üzerinde restriksiyon parça analizi kullanarak incelemişlerdir. Alttür içi çaprazlamalarda, 13 F₁ soyundan 12'si, F₃ soylarının tümünde ve alttürler arası çaprazlamalardan elde edilen tüm F₁'lerde sadece maternal olan mtDNA restriksiyon parçalarına rastlamışlardır. Sadece alttür içi çaprazlamalardan elde edilen bir F₁ soyunda her iki ebeveyn den olan mtDNA'nın kalıtımına rastlamışlardır. Paternal mtDNA aktarımı için kesin bir

frekans belirleyememelerine rağmen bu çalışma mercimek bitkisinde mtDNA'nın kalıtımında parental katkının olduğunu gösteren ilk çalışma olmuştur.

Rajora ve Mahon (1995) mercimek bitkisinde paternal (erkek ebeveyne ait) plastid DNA'sının kalıtılabileceğini gösteren bir çalışma yapmışlardır. *Lens culinaris*'in alt türleri *culinaris* ve *orientalis* arasındaki çaprazlamalardan elde ettikleri F₁ soylarında RFLP analizi ile kloroplast DNA (cpDNA)'sının kalıtımını incelemişlerdir. Bu iki alttür arasında farklılık gösteren RFLP'leri cpDNA'nın kalıtımını incelemeye kullanmışlar ve *Lens culinaris ssp. culinaris* alttürü içerisinde cpDNA varyasyonuna rastlamamışlardır. Fakat *Lens culinaris ssp. orientalis*'in iki RFLP ile inceledikleri tüm *Lens culinaris ssp. culinaris* çeşitlerinden farklılık gösterdiğini bulmuşlardır. *culinaris* X *orientalis* çaprazlamalarından elde ettikleri 10 F₁ soyundan 9'unun sadece maternal (dişi ebeveyne ait olan) cpDNA restriksiyon parçalarına sahip olduğunu ve bir F₁ bitkisinin her iki ebeveynden de cpDNA parçalarını bulundurduğunu tesbit etmişlerdir.

Kamboj ve ark. (1990), Hindistan'daki mercimek germplazmında *Fusarium*'a direncin kalıtımını incelediler. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*'e direnç gösteren üç mercimek genotipini (Pant L 234, JL 446 ve LP 286) iki hassas mercimek genotipi ile çaprazlamışlardır. Dirençli ve hassas bitkiler ile yapılan tüm çaprazlamaların sonucunda F₁ hibridlerinin hastalığa dirençli olduğunu bulmuşlardır. F₂ soyları, F₁'lerin dirençli ebeveyn ve hassas ebeveyn ile geri çaprazlanmalarından elde edilen soylar ve F₃ soyları üzerinde yaptıkları incelemelerden elde ettikleri sonuçlar, Pant L 234 genotipinde hastalığa direncin iki dominant genin kontrolü altında olduğunu bulmuşlardır. Yazarlar, JL 446 ve LP 286'da ise tamamlayıcı etki gösteren iki bağımsız gen ile kontrol edildiğini de bildirmişlerdir. JL 446 ve LP 286'nın dominant genlerini tamamlayan üçüncü bir dominant geni ise, iki hassas mercimek hattında gözlemişler ve allelik testlerin direnç bakımından bağımsız olarak ayrılım gösteren beş genin varlığına işaret ettiğini tesbit etmişlerdir.

Abbo ve ark. (1992), kültür mercimeği ve yabani mercimek türleri arasında çaprazlamalarda tohum ağırlığının genetiğini çalışmışlardır. Tohum ağırlığı karakterinin yardımcı ve dominant gen davranışı ve çoğul genle kontrol edilme

özelliğinde olduğunu bulmuşlardır. Düşük tohum ağırlığını veren allellerin kısmi dominansi gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca yapılan resiprokal çaprazlamalar (birbirlerine göre düşük ve yüksek tohum ağırlığına sahip ebeveynler kullanarak) nüklear-sitoplazmik etkileşimin tohum ağırlığı üzerinde etkisi olduğuna işaret etmiştir.

Mercimek bitkisinde RAPD markırları ile yapılan ilk çalışma Abo-elwafa ve ark. (1995) olmuştur ve çalışmaları RAPD markırlarının *Lens* türlerinde tür içi polimorfizmleri tanımlamakta kullanılabilir olduğunu göstermiştir. DNA izolasyonunda Murray ve Thompson (1980)'in geliştirmiş olduğu protokolü modifiye ederek kullanmışlardır. RAPD markırları ile *Lens* cinsinde tür içi ve türler arası varyasyonları incelemişler ve kültür mercimeğine ait 11 mikrosperma ve 9 makrosperma çeşitleri ile yabancı türlerin her birinden 16 çeşiti kullanmışlardır. Kalıp DNA konsantrasyonunun 10 ng/20µl reaksiyon karışımında ve 36°C annealing sıcaklığında en iyi sonuç verdiğini tespit etmişlerdir. Primer olarak ise dekamer (10 nükleotitden oluşan) oligonükleotitler kullanmışlardır. Çalışmaları sonunda ssp. *orientalis*'in kültür mercimeğine genetik bir benzerlik gösterdiğine işaret eden sonuçlar tesbit etmişlerdir. Elde ettikleri RAPD markırları, makrosperma ve mikrosperma tiplerinin genetik zeminde farklılık göstermediğini açıklamıştır. *Lens ervoides* hariç tutulmak kaydıyla yabancı türler ile karşılaştırıldığında kültür mercimeğinde tür içi varyasyonun düşük düzeyde oluşu kültür mercimeğinin ehlileştirilmesi esnasında genetik bir dar boğazdan geçtiğine işaret etmiştir. *Lens ervoides* türünde de düşük varyasyon gözlemişlerdir ve bu sonuç Mayer ve Soltis (1994)'ün bulgularının tersi bir sonuçtur. Bunun sebebini kendilerinin yaptıkları çalışmada bu türe ait az sayıda çeşit kullanmalarına bağlamışlardır. Oluşturdukları dendogram ssp. *orientalis*'in kültür mercimeğinin en yakın akrabası olduğunu göstermiştir. Yabancı türlerde (*L. ervoides* hariç) tür içi varyasyonu, kültür mercimeğinden daha yüksek oranlarda bulmuşlardır.

Ahmad ve ark. (1996), *Lens* genusunda RAPD markırları kullanarak tür içi ve türler arası genetik varyasyonu ve genetik akrabalıkları çalışmışlardır. DNA izolasyonu için Appels ve Lagudah (1990) tarafından hazırlanan protokolü kullanmışlardır. Yapılan çalışmaların sonucunda kültür mercimeğinin alttür içi varyasyonlarının düşük olduğunu göstermiştir. kültür mercimeği ile

karşılaştırıldığında yabani türlerden *L. odemensis* ve *L. nigricans*' ın tür içi varyasyonları yüksek bulunmuştur. Bunların aksine diğer yabani türler olan *L. c. ssp. orientalis* ve *L. ervoides* kendi içlerinde düşük varyasyonlar göstermişlerdir. Soy ağaçları *L. c. ssp. orientalis*'in kültür mercimeğine en yakın tür olduğunu ve kültür mercimeğinin atası için bir aday olduğunu göstermiştir. Sonuçlarının Ladizinsky (1993) tarafından yapılan sistematigi desteklediğini belirtmişlerdir.

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Materyal

Çalışılan 6 farklı Türkiye'ye has mercimek ırkı Ankara Tarla Bitkileri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden elde edilmiştir. Çalışılan ırklar, Pul 11, Kayı 91, Sultan 1, Sazak 91, Emre 20, Erzurum 89 ırklarıdır. Bunlardan Pul 11, Kayı 91, Sultan 1 ve Erzurum 89 yeşil tane rengine sahip olup yeşil mercimek grubunda yer alırken, Sazak 91 ve Emre 20 kırmızı tane rengine sahiptir ve kırmızı mercimek grubunda yer almaktadır.

Pul 11, Ankara Ziraat Fakültesi Bitki Yetiştirme ve İslah bölümü tarafından ıslah edilmiş, 1000 dane ağırlığı 55-60 g, kışlık, erkenci, çapı 6-7 mm olan pul mercimek çeşididir.

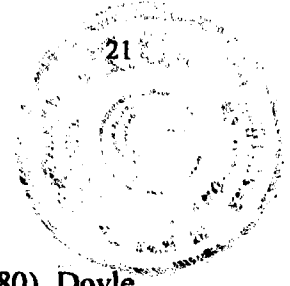
Kayı 91, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından ıslah edilmiş, 6.6-7 mm çapında, 1000 dane ağırlığı 60-65 g olan kışlık geççi pul mercimektir.

Sultan 1, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından ıslah edilmiş, 6-7 mm çapında, 1000 dane ağırlığı 60-65 g olan kurağa dayanıklı yazlık pul mercimek çeşididir.

Erzurum 89, Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından ıslah edilmiş, 4-5 mm çapında, 1000 dane ağırlığı 50 g olan yazlık bir çeşittir.

Sazak 91, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından ıslah edilmiş, 6-7 mm çapında 1000 dane ağırlığı 60 g olan, erkenci, kışlık, kırmızı kotiledonlu pul mercimek çeşididir.

Emre 20, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından ıslah edilmiş, 4.5-5 mm çapında, 1000 dane ağırlığı 35-40 g olan, erkenci, yazlık bir çeşittir.



3. 2. DNA izolasyon metodu:

Eldeki çalışmada DNA izolasyonu işlemi Murray ve Thompson (1980), Doyle ve Doyle (1990) ve Appels ve Lagudah (1990)'ın metodları laboratuvar şartlarına göre modifiye edilerek uygulandı. DNA izolasyonu basamaklar halinde şu şekilde gerçekleştirildi:

1-Bitkiler saksılara 5 veya 6 tohum halinde ekildi ve 15-25 cm uzunluğa eriştiklerinde genç yaprakları toplandı. Alüminyum folyalara sarılan yaprak dokuları bir kez sıvı azota batırıldıktan sonra -80°C'de depolandı.

2-Yaklaşık 20 dakika öncesinden -80°C'ye konulmuş steril havanların içine bu materyalden 0.25 gr örnekler alınarak kondu, yapraklar sıvıya gömülecek şekilde sıvı azot (N₂) eklendi. Sıvı azotun uçması beklendikten sonra havanda hızla öğütüldü. Öğütülen yaprak dokusunun üzerine, önceden su banyosunda 60°C' ye kadar ısıtılmış CTAB izolasyon tamponundan 7ml eklendi. Havanda bulamaç halinden sıvılaşınca kadar karıştırıldı.

3-Solüsyon 15ml'lik steril tüpe aktarıldı. Çeker ocakta tüpe 15µl β-merkapt-etanol eklendi. Tüp aliminyum folyoya sarıldıktan sonra 60°C'lik sıcak su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.

4-Sıcak su banyosundan çıkarılan numunelere, -20°C'de bekletilmiş olan kloroform:isoamil alkol (24:1) karışımından 1:1 oranında yani 7ml eklendi. 15-20 dakika kadar elde çalkalandı.

5-Oda sıcaklığında, 3500 rpm'lik devirde 10 dakika santrifüj edildi.

6-Tüpteki nümunenin üstte kalan bölümü ölçülerek 15ml'lik tüpe alındı. Bu sıvının 2/3 hacmi kadar önceden -20°C'da soğutulmuş izopropanol eklendi ve yavaşça karıştırıldı.

7-Numuneler 4°C'de bir gece veya -80°C'de 1 saat bekletildi. Her iki durumda da olumlu sonuç alındı.

8-Tüp 3100 rpm'de, oda sıcaklığında 2-3 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı dikkatlice döküldü ve kalan çökeltinin oda sıcaklığında suyu uçuruldu.

9-Numuneler karıştırıcıda çok hafif şiddette 20 dakika boyunca sallanarak 10 ml'lik yıkama tamponunda yıkandı. Oda sıcaklığında 4500 rpm'lik devirde 10 dakika santrifüj edildi.

10-Üst sıvı atıldı. Materyalin suyu uçurulmaya bırakıldı ve 1ml TE tamponu içinde çözüldü.

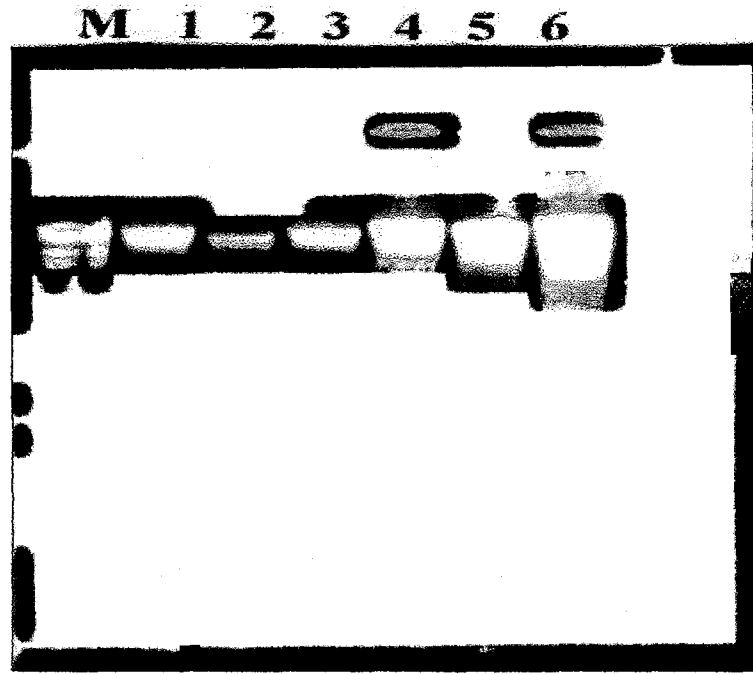
11-Tüpe önceden hazırlanmış RNaz stoğundan 5µl eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.

12-Materyalin hacmi TE tamponu ile iki katına çıkarıldı ve çözelti eşit şekilde iki eppendorf tüpüne bölündü. Bunların üzerlerine önceden hazırlanmış olan 7.5 M'lık amonyum asetat çözeltisinden son derişim 2.5 M olacak şekilde eklendi ve ilk hacmin 2.5 katı %99'luk soğuk (-20°C) etil alkol eklendi. Numuneler 1 saat için -80°C'de bekletildi.

13-Eppendorf tüpleri içersindeki karışımlar 9500 rpm ve 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı döküldü ve materyalin suyu uçuruldu. Materyalin miktarına göre TE tamponu içinde çözüldü.

14-Daha sonra materyal %0.8'lik jelde yürütülerek DNA'nın varlığı gözlemlendi. Elde edilen DNA bandlarının görüntüsü Şekil 3.1'de sunulmaktadır.

15-U.V. spektrofotometrede (Milton Roy 601) 240nm ve 260nm dalga boylarında DNA'ların konsantrasyonları ölçüldü. Elde edilen değerler Tablo 3.1'de sunulmaktadır. Elde edilen DNA'ların jel görüntüsü ise Şekil 3.1'de verilmektedir.



Şekil 3.1. 6 Mercimek Çeşidinin Genomik DNA'larının Jel Görüntüsü (M: λ Hind III kesim markır, 1: Emre, 2: Erzurum, 3: Kayı, 4: Pul, 5: Sazak, 6: Sultan).

Tablo 3.1. Kullanılan 6 Mercimek Çeşidine Ait Genomik DNA'ların Spektrofotometre Cihazında 260 ve 280 nm Dalga Boylarında Ölçülen Konsantrasyon Değerleri

Mercimek Çeşidi	Konsantrasyon	
	260 nm	280 nm
Pul	0.209	0.100
Erzurum	0.251	0.159
Kayı	0.102	0.040
Sazak	0.135	0.080
Sultan	0.133	0.059
Emre	0.112	0.059

3.3. RAPD Analizi İle Genomik Parmak İzlerinin Çıkarılması

Williams ve ark. (1990) ile Welsh ve McClelland (1990) tarafından önerilmiş olan RAPD metodu bu amaç için geliştirildi. Rastgele seçilmiş 9 adet 10 bazlık primerler kullanılarak genomun rastgele bölgeleri çoğaltıldı ve bireylerin genomik parmak izleri çıkartıldı.

3. 3. 1. Primerler

RAPD analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla her bir birey için Operon teknolojisi tarafından sentezlenen ve Prizma A.Ş. firmasından temin edilen 10 nükleotid uzunluğunda 9 farklı primer kullanıldı (Tablo 3.2). Primer stokları -20°C'de saklandı. Primerlerin seçiliminde dikkat edilen husus Guanin Sitozin (GC) içeriğinin %50 ile %80 arasında olması idi.

3. 3. 2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Williams ve ark.(1990)'nın geliştirdikleri protokol modifiye edilerek bu amaç için kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu 0.5 ml'lik PCR tüplerinde 25 µl 'lik toplam reaksiyon hacmine ajirojenik su ile tamamlanmak suretiyle Tablo 3.3'de belirtilen bileşenler tüplere eklendi.

PCR analizindeki bileşenlerden DNA, MgCl₂ ve Taq DNA polimerazın en iyi amplifikasyon şartlarını elde etmek için optimizasyonları yapıldı. DNA miktarı pilot çalışmalarda 25, 50, 100 ng'lık miktarlarda denendi. Pilot çalışmalar sonunda PCR'da kullanılacak DNA miktarı 25 ng olarak belirlendi. Taq polimeraz 1, 2 ve 2.5 ünite miktarlarında denendikten sonra PCR analizlerinde 2.5 ünite kullanıldı. MgCl₂ miktarı ise her PCR reaksiyonunda 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 mM şeklinde kullanıldı ve elde edilen PCR ürünlerinden, U.V. ışığı altında en iyi band görüntüsü verenler boyama jeline yüklenerek polimorfizm analizine dahil edildiler.

Tablo 3.2. RAPD Analizlerinde Kullanılan 9 Primer ve Nükleotid Dizileri

Primer Adı	Primer Nükleotid Dizisi
CS-44	5' ATT CGG CCG C 3'
CS-46	5' GGG ATC TAG C 3'
CS-56	5' TGG TGG GTC C 3'
OH-04	5' GGA AGT CGC C 3'
OS-03	5' CAG AGG TCC C 3'
SA-F	5' CGG CCC CTG T 3'
SA-R	5' AGG TCA CTG A 3'
OG-06	5' GTG CCT AAC C 3'
OR-12	5' ACA GGT GCG T 3'

Tablo 3.3. RAPD Analizlerinde Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Solüsyon Adı	İçeriği	Konsantrasyon
Apirojenik su	-	-
10 X PCR tamponu	TrisHCl (pH 8.8, 25°C) KCl Nonidet P40	10 mM 50 mM %0.01 (W/V)
MgCl ₂	-	1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mM
dNTP mix	dATP dCTP dGTP dGTP	5 µM 5 µM 5 µM 5 µM
Primer	-	2 µM
Genomik DNA	-	25 ng
Taq Polimeraz (5ü/µl)	-	2.5 ünite

Termal döngü programı; PCR cihazında (MJ Research PTC-200) şu şekilde gerçekleştirildi: 5 dakikalık ilk denatürasyon basamağı bir kere uygulandıktan sonra sırasıyla denatürasyon için 94°C'de 1 dakika, annealing için 34°C'de 1 dakika ve uzama için 72°C'de 2 dakika şeklinde 42 döngü uygulandı. Ardından son bir

son bir elongation için 72°C'de 10 dakika ve stabilizasyon için 4°C'de 5 dakikalık termal basamak uygulandı.

3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

3.3.3.1. %0.8'lik Deneme Jeli

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin kullanılan primerler ile çoğalıp çoğalmadığını tespit etmek için %0.8'lik deneme jeli hazırlandı.

1-Bunun için 0.40 gr agaroz tartılıp bir balon joje içerisine konduktan sonra 50 ml 1X TBE (Tris-borik asit-EDTA) tamponu ile karıştırıldı.

2-Agarozun TBE içerisinde erimesi için bu karışım, 5.5 dk mikrodalga fırında orta sıcaklık ayarında tutuldu.

3-Eriyiğin 50-55°C' ye düşmesi beklendi.

4-DNA' nın U.V. ışığı altında görülebilmesi için bu %0.8' lik jele 1.5µl etidyum bromür (10mg/ml) eklenerek elektroforez tankı trayine döküldü ve kuyuların oluşturulması için tarak yerleştirildi.

5-Yarım saat sonra donan jel, içerisinde 1 X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına alındı. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan maddeler, içerikleri ve konsantrasyonları Tablo 3.4'de verilmiştir.

6-Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerini içeren mikrotüplere, DNA' ların kuyuya çökelmelerini sağlamak için 5µl bromofenol mavisi eklendi.

7-Mikrotüpler santrifüjde kısa bir süre santrifüj yapılarak bromofenolün iyice karışması sağlandı.

8-Jel kuyularına 3µl'lik yüklemeler yapıldı.

9-70V' da 20-25 dakika yürütölüp U.V. (PhotoCap, Vilber Laurmat) ışığı altında örneklerin kullanılan primer ile çalışıp çalışmadığı gözlemlendi.

10-Pozitif sonuç veren materyallerin tüplerde kalan bölümleri boyama jellerine yüklenmek üzere -20°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.3.3.2. %1' lik Boyama Jeli

Deneme jellerinde pozitif sonuç veren PCR ürünleri %1' lik jel kullanılarak analiz edildi.

1-%1' lik boyama jeli için 0.5 gr agaroz tartılıp 50 ml TBE tamponu (Tablo 3.4) ile bir balon joje içerisinde karıştırıldı.

2-%0.8'lik jelin hazırlanmasındaki basamaklar aynen tekrar edildi. Farklı olarak bu jelin kullanımında, elektroforez tankına dökülen TBE tamponu içersine 15 µl etidyum bromid karıştırıldı.

3-Jel üzerinde açılan kuyulardan ilkin markır DNA olarak Ladder (1kb) DNA (1.5 µl Ladder DNA ve 1.5 µl Bromofenol mavisi ile karışımı şeklinde) yüklendi.

4-Negatif kontrol ve pozitif sonuç vermiş olduğu deneme jellerinde görölen örneklerin her birinden 16 µl kuyulara yüklendi.

5-Etidyum bromidin ışıktan etkilenmemesi için elektroforez tankı alüminyum folyo ile sarıldı.

6-80 V'da 3-3.5 saat yürütöldü.

7-U.V. ışık altında görölen bandların fotoğrafları çekildi ve görüntüler disketlere kaydedildi. Görüntülerin analizleri PhotoCap Mw programı ile yapıldı.

Tablo 3.4. %0.8 ve %1'lik Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Maddeler, İçerikleri ve Miktarları

Madde İsmi	İçeriği	Miktar
Agaroz	-	-
TBE tamponu (10X) (500 ml)	Tris-HCl Borik Asit EDTA	54 gr 27.5 gr 20 ml
Bromofenol mavisi (20 ml)	Bromofenol Sukroz Distile su	0.05 gr 8 gr 11.95 ml
Etidyumbromür(10 mg/ml)	Etidyum bromür Distile su	5 gr 500 ml

3.4. Polimorfizm Oranlarının Hesaplanması

Bu çalışmada kullanılan *Lens culinaris ssp. culinaris* alttürüne ait 6 farklı çeşitlerden birey arasındaki DNA farklılıklarının hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı (Sokal and Sneath, 1963).

Benzerlik oranı = Homolog bantlar / Homolog bantlar + Homolog olmayan bantlar

4. BULGULAR

4.1. Çeşitlere ait RAPD analizi bulguları:

Çalışmada 10 baz uzunluğunda 9 farklı oligonükleotid primer kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ve RAPD analizleri yapıldı. Kullanılan primerlerin hepsi ile amplifikasyon ürünü elde edildi ve heteromorfik bandlar verdiği gözlemlendi. Uzunlukları yaklaşık 200-4000 baz çifti arasında değişen toplam 102 adet markır elde edildi. Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'da kullanılan primerler ile elde edilen amplifikasyon sonuçlarının agaroz jel üzerinde ve U.V. ışık altında çekilmiş fotoğrafları yer almaktadır.

Daha sonra hangi markırın hangi çeşitte yer aldığı şeklinde değerlendirme yapılarak her bir primer için tablolar hazırlandı (Tablo 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9).

CS-44 primeri ile elde edilen RAPD analizi sonucunda 500-3800 bp uzunlukları arasında olan 16 adet markır elde edildi. (Şekil 4.1 ve Tablo 4.1). Bunlardan 1100 bp uzunluğundaki 5. ve 660 bp uzunluğundaki 12. markır tüm bireylerde gözlemlendi. Elde edilen markırlardan 1., 6., ve 15. markır sadece Kayı çeşitinde, 4., ve 16. markır sadece Emre çeşidinde gözlemlendi. 16 markırın 14'ünün polimorfizm gösterdiği tespit edildi. Bu 16 markırın 8'i Emre çeşidinde, 6'sı Erzurum çeşidinde, 11'i Kayı çeşidinde, 5'i Pul çeşidinde, 3'ü Sazak cinsinde, 7'si Sultan cinsinde gözlemlendi.

CS-46 primeri kullanılarak yapılan RAPD analizinde 8 markır elde edildi (Şekil 4.2 ve Tablo 4.2). Bu markırların uzunluğu 310-1650 bp arasındadır. 980 bp uzunluğundaki 4. Markır tüm bireylerde bulunurken, 7. Markır sadece Pul çeşidinde bulundu. Yaklaşık 1650 bp uzunluğundaki en uzun markır sadece Pul ve Sazak çeşitlerinde görüldü. Bu primer ile yapılan analizde Emre ve Erzurum aynı markırlara sahiptir ve 8 markırın 3'ü bunlarda görülemedi. Kayı cinsinde yaklaşık 980 bp uzunluğunda olan tek markır (4. Markır) tesbit edildi. Pul çeşidinde sadece

yaklaşık 600 bp uzunluğundaki markır gözlenmeyip, diğer 7 markır gözlendi. Sazak çeşidinde 6, Sultan çeşidinde 3 markır elde edildi.

CS-56 primeri kullanarak yapılan RAPD analizlerinde 12 markır elde edildi (Şekil 4.3 ve Tablo 4.3). Markırların baz uzunlukları yaklaşık olarak 450-2300 bp arasında bulundu. 1., 4., 7., 9., 10. ve 11. markırlar tüm bireylerde gözlendi. 2. markır sadece Kayı ve Sazak çeşitlerinde gözlendi. 3. markır Sazak hariç tüm çeşitlerde elde edildi. Yaklaşık 450 bp uzunluğundaki 12. markır sadece Emre cinsinde gözlendi. 5. markır Kayı ve Sultan çeşitlerinde görülmezken diğer çeşitlerde görüldü. 6. markır sadece Kayı çeşidinde, 8. markır Kayı ve Sultan hariç tüm çeşitlerde tesbit edildi. Görülen 12 markırın, Emre çeşidinde 10'u, Erzurum, Kayı, Pul ve Sazak çeşitlerinde 9'u ve Sultan çeşidinde 7'si görüldü.

SA-F primerinin kullanıldığı amplifikasyon reaksiyonlarında 11 adet markır elde edildi (Şekil 4.4 ve Tablo 4.4). Markırların baz uzunlukları yaklaşık olarak 500-2600 bp arasında ölçüldü. Bu primer, kullanılan primerler arasında en az polimorfizm ortaya çıkarıcı oldu. Sadece 5 no'lu markır Sazak çeşidinde, 11 no'lu markır da Kayı çeşidinde görülmedi. Diğer markırların hepsi tüm çeşitlerde gözlendi.

OS-03 primerinin kullanıldığı RAPD analizleri sadece 5 markır ile en az markırın elde edildiği analiz oldu (Şekil 4.5 ve Tablo 4.5). Bu 5 markırın baz uzunlukları yaklaşık olarak 735-2300 bp arasında ölçüldü. Markır sayısının az olmasına rağmen elde edilen tüm markırlar heteromorfik karakterde bulundu. 1 no'lu markır Emre ve Sazak çeşitlerinde gözlenirken, 2 no'lu markır Emre, Erzurum ve Sultan çeşitlerinde gözlendi. Yaklaşık 930 bp uzunluğundaki 3 no'lu markır Pul ve Sazak çeşitlerinde gözlendi. Yaklaşık olarak 820 bp uzunluğundaki 4 no'lu markır ise Erzurum ve Pul çeşitlerinde görülürken, 5 no'lu markır Sazak çeşidi haricinde tüm bireylerde gözlendi.

OH-04 primeri ile elde edilen RAPD analizi sonucunda, uzunlukları yaklaşık olarak 275-1500 bp arasında değişen 10 adet markır elde edildi (Şekil 4.6 ve Tablo 4.6). Yaklaşık 1500 bp uzunluğundaki 1. Markır sadece Emre çeşidinde gözlendi. 2. Markır Emre çeşidi dışında tüm çeşitlerde tesbit edildi. 3. Markır ise Sultan dışında tüm çeşitlerde bulundu. 4. Markır ise sadece Erzurum çeşidinde görüldü. 5 ve 7 no'lu

markırlar tüm bireylerde gözlemlendi. 6. markır Sazak ve Sultan dışında diğer dört çeşitte yer aldı. 8. Markır Erzurum, Pul ve Sazak çeşitlerinde, 9. Markır sadece Sazak çeşidinde görülürken, 10. Markır Emre, Erzurum ve Pul çeşitlerinde tesbit edildi.

OR-12 primeri ile yapılan RAPD analizlerinde 10 markır elde edildi (Şekil 4.7 ve Tablo 4.7). Bu markırların nükleotid uzunlukları yaklaşık olarak 350-1800 bp arasında ölçüldü. Sadece 6 no'lu markır tüm bireylerde gözlenirken, diğer markırlar heteromorfik karakter gösterdi. Emre, Pul ve Kayı çeşitlerinde 8, Erzurum ve Sazak çeşitlerinde 9, Sultan çeşidinde ise 2 markır gözlemlendi.

OG-06 primeri ile yapılan RAPD analizleri sonucunda uzunlukları 700-2800 arasında değişen 14 markır elde edildi (Şekil 4.8 ve Tablo 4.8). 4, 5, 9, 10 ve 11 no'lu markırlar tüm çeşitlerde görülürken, diğer markırlar heteromorfik karakter gösterdi. 1 no'lu markır sadece Kayı ve Sazak çeşitlerinde gözlemlendi. 2 no'lu markır Emre, Erzurum, Kayı ve Pul çeşitlerinde görüldü. 3 no'lu markır Sultan hariç tüm çeşitlerde tespit edildi. 6 no'lu markır Kayı ve Sazak çeşitlerinde gözlenirken 7 no'lu markır Erzurum, Pul, Sazak ve Sultan çeşitlerinde bulundu. 8 no'lu markır Sazak dışındaki tüm çeşitlerde yer aldı. Elde edilen 12. Markır Emre, Erzurum ve Sultan çeşitlerinde bulundu. 13. Markır Kayı, Pul, Sazak ve Sultan çeşitlerinde gözlenirken 14 no'lu markır sadece Sultan çeşidinde gözlemlendi.

SA-R primeri ile yapılan amplifikasyon uzunlukları yaklaşık olarak 190-3200 bp arasında değişen 16 markır oluşturdu (Şekil 4.9, Tablo 4.9). 4., 6., 7., ve 10. markırların tüm bireylerde yer aldığı ve diğer markırların heteromorfik olduğu görüldü. 3. ve 14. markır sadece Pul çeşidinde tesbit edildi. Emre çeşidinde 11, Erzurum çeşidinde 6, Kayı çeşidinde 7, Pul çeşidinde 13, Sazak çeşidinde 8 ve Sultan çeşidinde 9 markır bulundu.

4.2 Çeşitler Arasındaki Polimorfizm Değerlerinin Karşılaştırılması

Lens culinaris ssp. culinaris alttürüne ait 6 çeşidin birbirleri arasındaki benzerlik dereceleri Sokal ve Sneath (1963) tarafından önerilen formüle göre



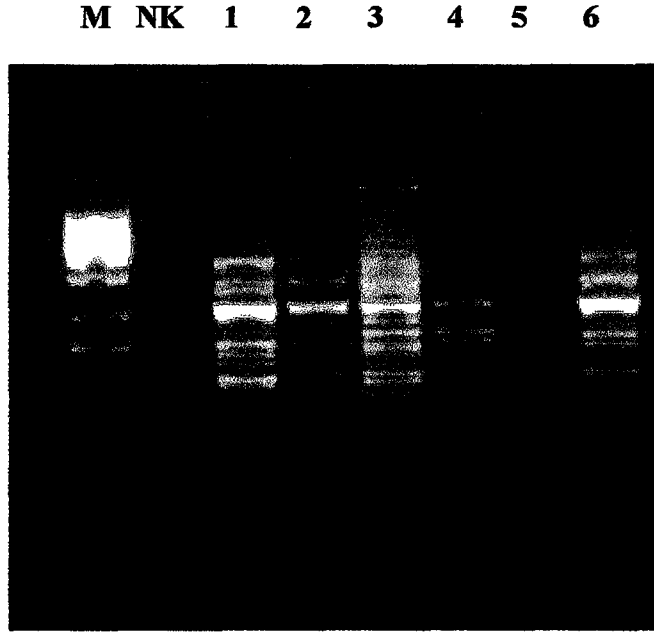
belirlendi. Bu değerler Tablo 4.10'da gösterilmektedir. Benzerlik derecelerine göre oluřturulmuř olan dendogram (Rohlf,1990'a göre) ise izelge 4.11'de sunulmaktadır.

Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda en yüksek benzerlik derecesi %71.48 ile Emre ve Erzurum eřitleri arasında bulundu. İkinci en yüksek benzerlik derecesi %68.46 ile aynı tohum rengine sahip olan Erzurum 89 ve Pul 11 eřitleri arasında gözlendi. Tohum renklerine göre bakıldığında yeşil tohum rengine sahip olan Erzurum 89 ile kırmızı tohum rengine sahip Emre 20 eřitleri arasında en yüksek benzerlik derecesi tesbit edildi.

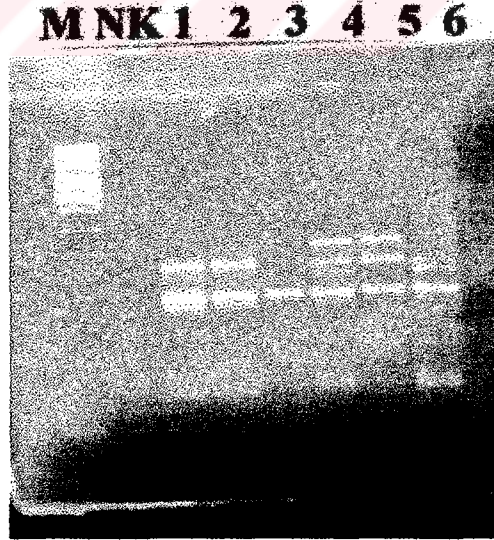
Kırmızı tohum rengine sahip olan Sazak 91 ve Emre 20 eřitleri arasında %57.87 değerinde bir benzerlik görüldü.

Yeşil tohum rengine sahip çeşitlerden Pul 11 ile Sultan 1 arasında %39.76 oranında benzerlik belirlendi. Bu benzerliğin nispeten düşük bir benzerlik oranı olduğu tespit edildi. Pul 11 ile Kayı 91 arasında %54.77, Pul 11 ile Erzurum 89 arasında ise %68.46 benzerlik gözlendi. Kayı 91 ile Sultan 1 arasında %55.56 benzerlik görülürken, Kayı 91 ile Erzurum 89 arasında %57.75 oranında benzerlik bulundu. Erzurum 89 ile Sultan 1 arasında ise %57.40'lık bir benzerlik hesaplandı.

Kırmızı tohum rengine sahip olan Sazak 91 ile yeşil tohum renkli Pul 11, Kayı 91, Erzurum 89 ve Sultan 1 arasındaki benzerlik oranları sırasıyla, %65.16, %49.05, %58.42 ve %41.85 olarak görüldü. Kırmızı tohum renkli Emre ile Pul 11, Kayı 91, Erzurum 89 ve Sultan 1 arasındaki benzerlikler sırasıyla, %60.56, %57.74, %71.48 ve %55.56 olarak belirlendi.

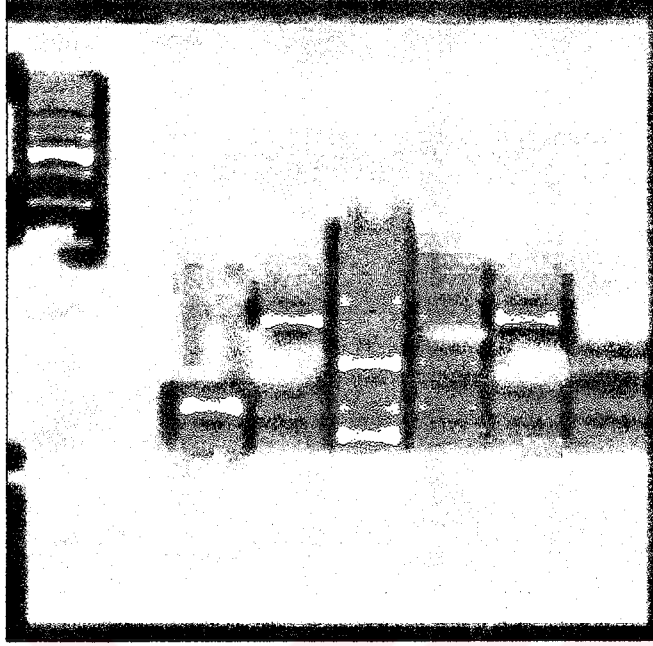


Şekil 4.1. 6 Mercimek Çeşidinin CS 44 Primeri ile Elde Edilen RAPD Bantlarının Jel Üzerinde Görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Emre, 2: Erzurum 3: Kayı, 4: Pul 5: Sazak 6: Sultan)



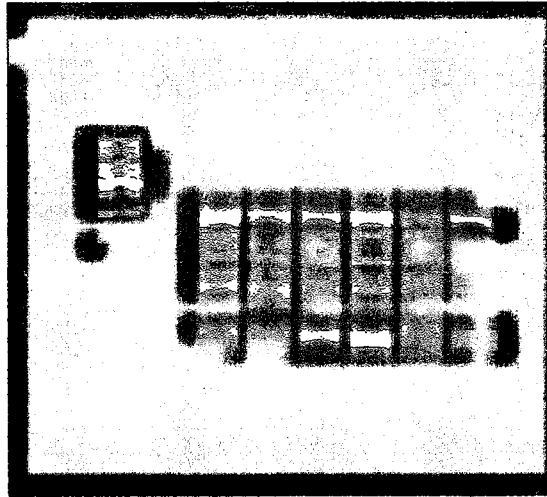
Şekil 4.2. 6 Mercimek Çeşidinin CS 46 Primeri ile Elde Edilen RAPD Bantlarının Jel Üzerinde Görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Emre, 2: Erzurum 3: Kayı, 4: Pul 5: Sazak 6: Sultan)

M NK 1 2 3 4 5 6



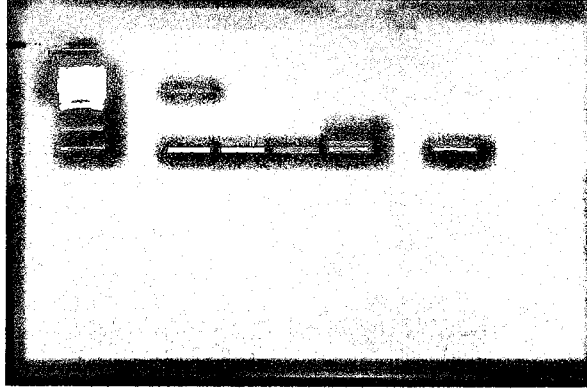
Şekil 4.3. 6 Mercimek Çeşidinin CS 56 Primeri ile Elde Edilen RAPD Bantlarının Jel Üzerinde Görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Emre, 2: Erzurum 3: Kayı, 4: Pul 5: Sazak 6: Sultan)

M NK 1 2 3 4 5 6



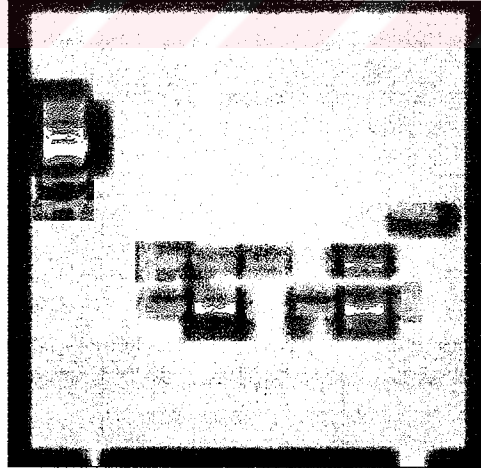
Şekil 4.4. 6 Mercimek Çeşidinin SA-F Primeri ile Elde Edilen RAPD Bantlarının Jel Üzerinde Görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Emre, 2: Erzurum 3: Kayı, 4: Pul 5: Sazak 6: Sultan)

M NK 1 2 3 4 5 6



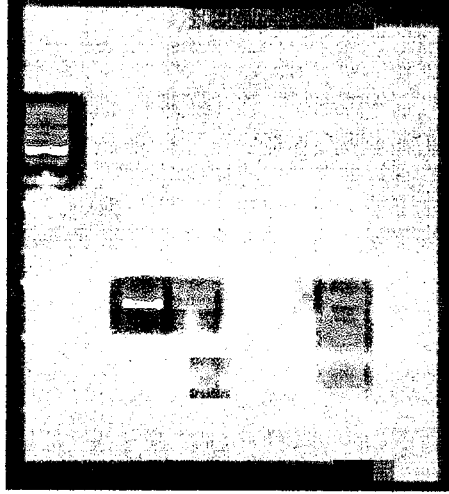
Şekil 4.5. 6 Mercimek Çeşidinin OS-03 Primeri ile Elde Edilen RAPD Bantlarının Jel Üzerinde Görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Emre, 2: Erzurum 3: Kayı, 4: Pul 5: Sazak 6: Sultan)

M NK 1 2 3 4 5 6



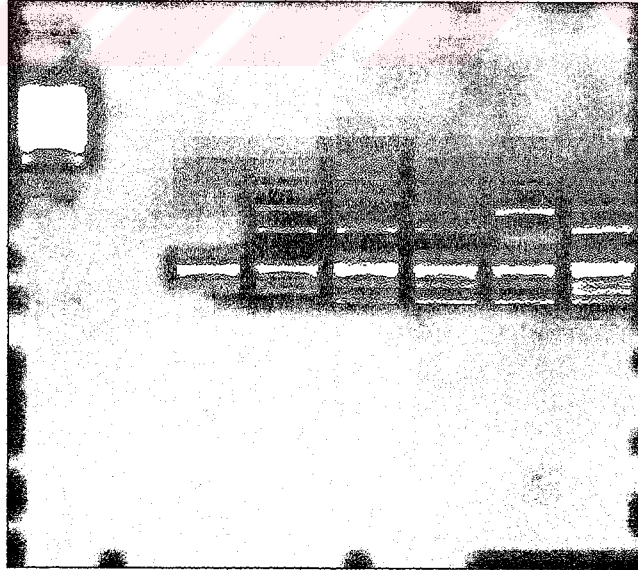
Şekil 4.6. 6 Mercimek Çeşidinin OH-04 Primeri ile Elde Edilen RAPD Bantlarının Jel Üzerinde Görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Emre, 2: Erzurum 3: Kayı, 4: Pul 5: Sazak 6: Sultan)

M NK 1 2 3 4 5 6



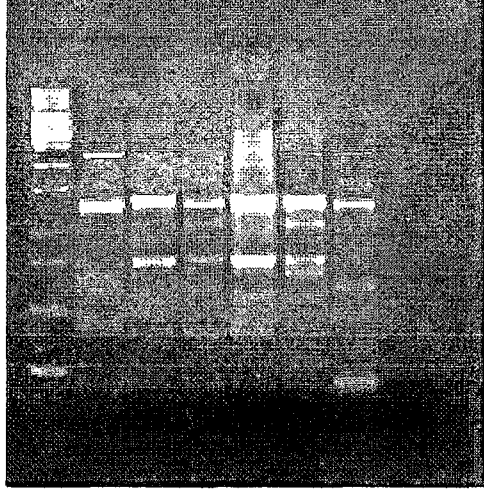
Şekil 4.7. 6 Mercimek Çeşidinin OR-12 Primeri ile Elde edilen RAPD Bantlarının Jel Üzerinde Görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Emre, 2: Erzurum 3: Kayı, 4: Pul 5: Sazak 6: Sultan)

M NK 1 2 3 4 5 6



Şekil 4.8. 6 Mercimek Çeşidinin OG-06 Primeri ile Elde Edilen RAPD Bantlarının Jel Üzerinde Görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Emre, 2: Erzurum 3: Kayı, 4: Pul 5: Sazak 6: Sultan)

M 1 2 3 4 5 6 NK



Şekil 4.9. 6 Mercimek Çeşidinin SA-R Primeri ile Elde Edilen RAPD Bantlarının Jel Üzerinde Görüntüsü (M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Emre, 2: Erzurum 3: Kayı, 4: Pul 5: Sazak 6: Sultan)



Tablo.4.1. 6 Mercimek Çeşidinde CS-44 Primeri ile Elde Edilen Bantlar ve Uzunlukları

Markır	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan	MW (bp)
M1	-	-	+	-	-	-	3800
M2	+	+	+	-	-	+	2500
M3	-	+	+	-	-	+	1500
M4	+	-	-	-	-	-	1300
M5	+	+	+	+	+	+	1100
M6	-	-	+	-	-	-	980
M7	-	-	+	+	-	+	880
M8	-	-	-	+	+	-	820
M9	+	-	-	-	-	+	790
M10	-	+	+	-	-	-	750
M11	+	-	-	-	-	-	712
M12	+	+	+	+	+	+	660
M13	-	+	+	+	-	+	610
M14	+	-	+	-	-	-	593
M15	-	-	+	-	-	-	550
M16	+	-	-	-	-	-	500

Tablo 4.2. 6 Mercimek Çeşidinde CS-46 Primeri ile Elde Edilen Bantlar ve Uzunlukları

	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan	MW (bp)
M1	-	-	-	+	+	-	1650
M2	+	+	-	+	+	+	1350
M3	-	-	-	+	-	+	1250
M4	+	+	+	+	+	+	980
M5	+	+	-	+	+	-	900
M6	+	+	-	-	+	-	600
M7	-	-	-	+	-	-	490
M8	+	+	-	+	+	-	310

Tablo 4.3. 6 Mercimek Çeşidinde CS-56 Primeri ile Elde Edilen Bantlar ve Uzunlukları

	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan	MW(bp)
M1	+	+	+	+	+	+	2300
M2	-	-	+	-	+	-	1700
M3	+	+	+	+	-	+	1400
M4	+	+	+	+	+	+	1300
M5	+	+	-	+	+	-	1100
M6	-	-	+	-	-	-	1000
M7	+	+	+	+	+	+	900
M8	+	+	-	+	+	-	800
M9	+	+	+	+	+	+	700
M10	+	+	+	+	+	+	580
M11	+	+	+	+	+	+	500
M12	+	-	-	-	-	-	450

Tablo 4.4. 6 Mercimek Çeşidinde SA-F Primeri ile Elde Edilen Bantlar ve Uzunlukları

	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan	MW(bp)
M1	+	+	+	+	+	+	2600
M2	+	+	+	+	+	+	2200
M3	+	+	+	+	+	+	1800
M4	+	+	+	+	+	+	1500
M5	+	+	+	+	-	+	1400
M6	+	+	+	+	+	+	1200
M7	+	+	+	+	+	+	1000
M8	+	+	+	+	+	+	900
M9	+	+	+	+	+	+	750
M10	+	+	+	+	+	+	600
M11	+	+	-	+	+	+	500

Tablo 4.5. 6 Mercimek Çeşidinde OS-03 Primeri ile Elde Edilen Bantlar ve Uzunlukları

	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan	MW(bp)
M1	+	-	-	-	+	-	2300
M2	+	+	-	-	-	+	1463
M3	-	-	-	+	+	-	930
M4	-	+	-	+	-	-	820
M5	+	+	+	+	-	+	735

Tablo 4.6. 6 Mercimek Çeşidinde OH-04 Primeri ile Elde Edilen Bantlar ve Uzunlukları

	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan	MW(bp)
M1	+	-	-	-	-	-	1500
M2	-	+	+	+	+	+	1400
M3	+	+	+	+	+	-	1200
M4	-	+	-	-	-	-	1100
M5	+	+	+	+	+	+	900
M6	+	+	+	+	-	-	700
M7	+	+	+	+	+	+	600
M8	-	+	-	+	+	-	540
M9	-	-	-	-	+	-	400
M10	+	+	-	+	-	-	275

Tablo 4.7. 6 Mercimek Çeşidinde OR-12 Primeri ile Elde Edilen Bantlar ve Uzunlukları

	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan	MW(bp)
M1	-	+	-	-	-	-	1800
M2	+	+	+	+	+	-	1600
M3	+	+	+	+	+	-	1400
M4	-	-	-	+	+	-	1200
M5	+	+	+	+	+	-	860
M6	+	+	+	+	+	+	680
M7	+	+	+	-	+	+	630
M8	+	+	+	+	+	-	570
M9	+	+	+	+	+	-	500
M10	+	+	+	+	+	-	350

Tablo 4.8. 6 Mercimek Çeşidinde OG-06 Primeri ile Elde Edilen Bantlar ve Uzunlukları

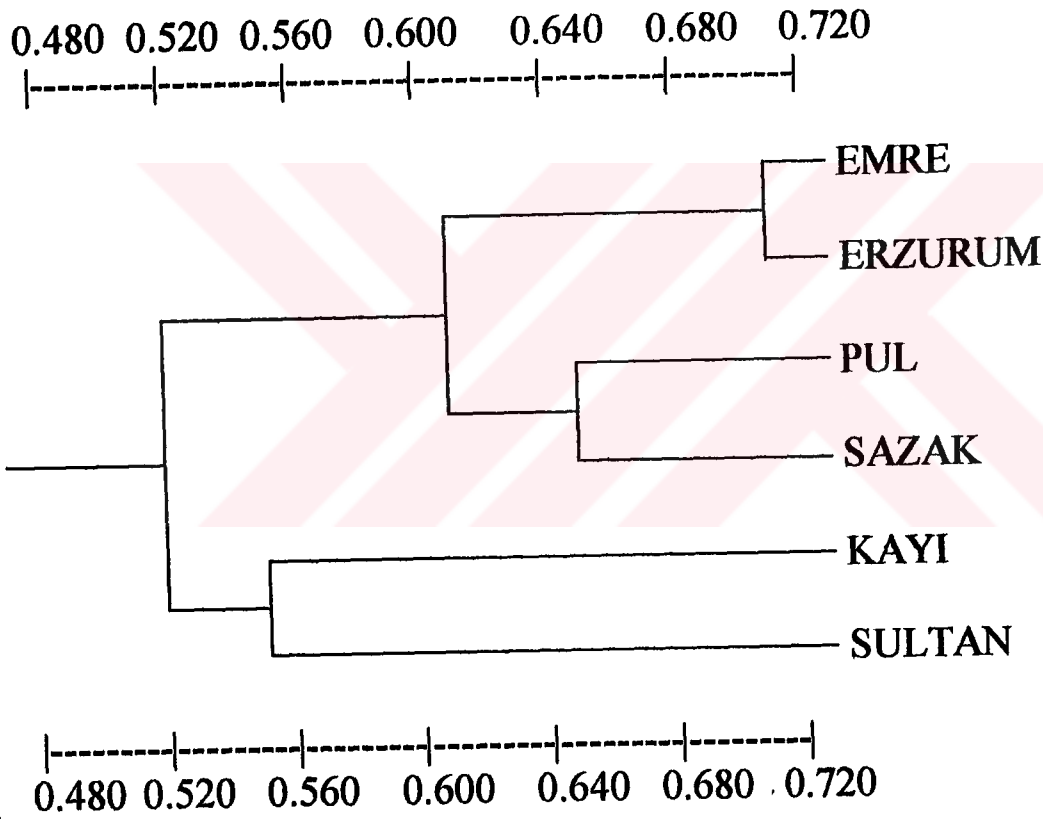
	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan	MW(bp)
M1	-	-	+	-	+	-	2800
M2	+	+	+	+	-	-	2100
M3	+	+	+	+	+	-	1900
M4	+	+	+	+	+	+	1700
M5	+	+	+	+	+	+	1550
M6	-	-	+	+	-	-	1450
M7	-	+	-	+	+	+	1350
M8	+	+	+	+	-	+	1200
M9	+	+	+	+	+	+	1000
M10	+	+	+	+	+	+	900
M11	+	+	+	+	+	+	850
M12	+	+	-	-	-	+	800
M13	-	-	+	+	+	+	750
M14	-	-	-	-	-	+	700

Tablo 4.9. 6 Mercimek Çeşidinde SA-R Primeri ile Elde Edilen Bantlar ve Uzunlukları

	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan	MW(bp)
M1	+	+	-	+	-	+	3200
M2	+	-	-	+	-	-	2800
M3	-	-	-	+	-	-	2500
M4	+	+	+	+	+	+	2280
M5	+	-	-	+	+	+	2000
M6	+	+	+	+	+	+	1600
M7	+	+	+	+	+	+	1300
M8	-	-	+	-	+	-	1100
M9	+	-	-	+	-	+	1000
M10	+	+	+	+	+	+	750
M11	+	-	-	+	+	-	680
M12	+	-	+	-	-	+	600
M13	-	-	-	+	+	-	560
M14	-	-	-	+	-	-	410
M15	-	+	-	+	-	-	220
M16	+	-	+	-	-	+	190

Tablo 4.10. 6 Mercimek Çeşidi Arasında Benzerlik Oranları

	Emre	Erzurum	Kayı	Pul	Sazak	Sultan
Emre	-					
Erzurum	71.48	-				
Kayı	57.74	57.75	-			
Pul	60.56	68.46	54.77	-		
Sazak	57.87	58.42	49.05	65.16	-	
Sultan	55.56	57.40	55.22	39.76	41.85	-

Tablo 4.11. 6 Mercimek Çeşidi İçin Oluşturulan Dendogram

5. TARTIŞMA

5.1. DNA İzolasyon Yönteminin Seçimi

Bu çalışmada DNA izolasyonu işlemi Murray & Thompson (1980), Doyle & Doyle (1990) ve Appels & Lagudah (1990)'ın metotları laboratuvar şartlarına göre modifiye edilerek uygulandı.

Son yıllarda sistematik ile ilgilenen araştırmacılar, tür içi veya türler arası varyasyonu en sağlıklı biçimde açıklayabilmek için moleküler biyoloji tekniklerini kullanmaktadırlar. Bununla birlikte böyle çalışmaları sıklıkla sınırlayan faktörlerden birisi bireylerden DNA izolasyonunu gerçekleştirebilmektir. Bitki numunelerinin DNA izolasyonunda, doğal DNaz'ların ve ikincil bitki bileşiklerinin varlığı ve de ileri ki enzimsel reaksiyonları önleyecek polisakkarit kontaminantların birlikte izolasyonu sebebiyle zorluklar artmaktadır (Hoelzel, 1998). DNA ürünü ve niteliği, orijinal dokunun şartlarından ve ekstraksiyon öncesinde korunma şeklinden oldukça etkilenmektedir. Başarılı bir DNA ekstraksiyonunu engelleyen tannin, fenolik veya diğer ikincil metabolitleri büyük oranlarda bulunduran türler için bu durum özellikle geçerli olmaktadır. Mümkün mertebe en taze materyali toplamak en iyisidir.

Birçok moleküler sistematik çalışması, total hücresel DNA'nın izolasyonunu takip eden, PCR, Southern blotting veya klonlama yoluyla genomun daha alt seviyelerde incelenmesine dayanmaktadır. Farklı kaynaklardan elde edilen doku örneklerinin kimyasal bileşimlerinin son derece değişken olması, ayrıca endogenler (bitki ikincil bileşikleri) ve ekzogenlerin (eski örneklerde indirgenmiş ürünler) olabilmesi nedeniyle uygun izolasyon tekniklerinin aralığı genişleyebilmektedir. DNA'nın izole edilme niteliği ve bunun için gereken süre bakımından protokoller farklılık gösterirler (Hoelzel, 1998).

Bitki hücreleri yaygın olarak, kompozisyonları türden türe büyük farklılıklar gösteren bol miktarda ikincil bileşikler içermektedirler. Özel türlerde karşılaşılan problemlerin üstesinden gelmek üzere birçok alternatif izolasyon tamponu

tasarlanmıştır. Hayvan hücrelerinden DNA izolasyonu için kullanılan metodlar ile bitkilerde kullanılan metodlar arasındaki önemli bir fark, SDS'in yerine yaygın olarak katyonik deterjan CTAB'ın kullanılmasıdır. İzolasyon tamponunun pH değeri ve koruyucu ajanlar veya deterjanların özel bir tür için optimize edilmesi gerekebilir. pH değeri parçalayıcı enzimleri engelleyecek şekilde seçilmelidir. Örneğin birçok lipolitik enzim ve lipoksigenazlar 5.0 ve 6.0 arasında optimal pH değerlerine sahiptir. Oysa, nuklear DNaz'lar 7.0 civarındaki pH değerlerinde optimaldir (Dunham and Bryant, 1983). Bu nedenle, birçok bitki DNA ekstraksiyon tamponları 8.0'lık bir pH değerine sahiptir. Bazıları ise pH 9.0 değerine kadar yükseltilebilir (Hoelzel, 1998).

Bitki materyalleri için kullanılan DNA izolasyon tamponlarının ana bileşenleri, DNA'yı doğal enzimlerden veya hücrelerin parçalanması esnasında serbest kalan ikincil bileşiklerden korumayı sağlamaktadırlar. Bunlar çok geniş bir bileşik aralığını içermektedir. EDTA genellikle metale bağımlı enzimleri inhibe etmek üzere kullanılmaktadır. Bununla birlikte buğdayda EDTA ile teşvik edilen en az bir tane DNaz bilinmektedir (Jones and Boffey, 1984). Bovine serum albumin, parçalayıcı enzimlerin yüzey denaturasyonunu sağlamak üzere tampona eklenmektedir (Price, 1983). β -merkaptöetanol, glutathione, sistein, dithiothreitol (DTT) ve diğer tioller gibi indirgeyici veya sülfidril ajanlar DNA'yı kininlere, disülfidlere, peroksidazlara ve polifenoloksidazlara karşı korumak için yaygın olarak izolasyon tamponları içerisinde kullanılmaktadırlar (Herrmann et al., 1980).

Polyvinilpyrrolidon (PVP), polifenol, kinin ve tanninlerin etkilerini azaltmak üzere izolasyon tamponuna eklenmektedir (Hoelzel, 1998). Daha az yaygın olarak tampona eklenenler ise kininlere karşı koruma sağlayan askorbik asit, RNazlardan koruma sağlayan dietilpirokarbonat, bentonit, spermin ve diğer poliaminler, ağır metal oksidazlara karşı koruyucu olarak siyanit, etidyum bromid ve hindistancevizi sütü izolasyon tamponuna eklenebilmektedir. Ayrıca auritrikarboksilik asit de nukleazları inhibe etmek amacıyla bitki DNA izolasyonunda kullanılmaktadır, fakat bu kimyasal nükleik asitleri sarmalayarak herhangi bir enzimin aktivitesinden koruduğu için (Nagy et al. 1988) izolasyon sonrasında çıkarılmalıdır.

Polisakkarit kontaminasyonu, bitki DNA'sı saflığını etkileyen en yaygın problemdir. Bu karbonhidratlar birçok biyolojik enzimin örneğin polimerazlar,

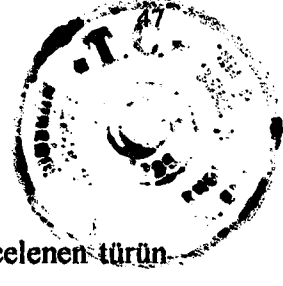
46

ligazlar ve restriksiyon endonükleazlarının aktivitelerini önleyebilirler ve DNA'nın çöktürme sonrasında tekrar süspanse edilmesini engelleyebilmektedirler. Bu problemin üstesinden gelmek için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan fenol-kloroform ekstraksiyonu sadece kısmi bir etki göstermektedir (Fang et al.,1992). Bir başka yöntem, yoğun tuz konsantrasyonları kullanarak DNA'nın çöktürülmesidir. Bir çalışmada Fang ve ark.,1992 göstermektedir ki, eğer DNA uygun tuz (NaCl) konsantrasyonlarında çöktürülür ise polisakkarit solüsyonda kalır ve etanol üst sıvısı ile birlikte atılır. NaCl konsantrasyonunun 2.5 M değerine kadar artırılmasıyla polisakkarit içeriğinde belirgin bir azalma gerçekleşmektedir. Yaptıkları deneylerde refraktometre değerlerine göre, 1-2.5 M NaCl ile çöktürmek yoluyla solüsyon içinde çözülmüş olan katı partiküllerin %90'nını DNA'dan ayırmayı başarmışlardır.

DNA'nın saflaştırılmasında bir başka yöntem de CsCl density gradient santrifüjasyonudur. İyi sonuç vermesine karşın CsCl gradient centrifugation pahalı bir metottur ve oldukça fazla zaman gerektirmektedir (Weising et al. 1991). Bu çalışmada ise Doyle ve Doyle (1990)'un protokolüne bağlı kalınarak polisakkaritlerin çıkarılması için 2.5 M amonyum asetat tuzu kullanılmıştır. Weising ve ark., 1991'nin yaptığı bir denemede amonyum asetat uygulaması sonucunda yüksek moleküler değerlerde DNA elde edilmiştir. Bununla birlikte, band fotoğraflarında kısmi bir DNA kırılmasına işaret eden biraz yayılma görüldüğünü de bildirmektedir.

Bitki DNA'sının özellikle küçük numunelerden izolasyonu için kullanılan tekniklerden en yaygın olanlardan biri, katyonik bir deterjan olan CTAB (cetyltrimethylammonium) kullanımına dayanmaktadır. CTAB bitki çeperlerini çözmek için kullanılır ve sonrasında DNA ile bir kompleks oluşturmaktadır. Bu metodun avantajlarından biri, yoğun bitki dokusu preparasyonunun gerekli olmaması ve yaprak, kök, tohum, embriyo, endosperm, polen, süspansiyon kültürler gibi birçok doku tipine uygulanabilmesidir. Ayrıca bu madde miligram değerinde herbaryum, mumya veya fosil dokulardan, gram değerinde taze toplanmış dokulara kadar çok geniş aralıkta doku miktarlarına uygulanabilmektedir (Rogers and Bendich, 1988).

5.2. Uygun Genetik Markır Sisteminin Seçimi



DNA markır sistemi, proje amaçlarına, populasyon yapısına, incelenen türün genomik farklılığına, markır sisteminin kullanılabilirliğine, analiz için gerekli zamana ve bilgi başına maliyete bağlı olarak seçilir (Gupta et al. 1994). Türler içerisindeki polimorfizm oranı da markır seçiminde önemli bir rol oynar. Örneğin, kendi kendine döllen türlerde bir gen havuzu içerisindeki polimorfizmi belirlemede RAPD markırları RFLP'lerden daha kullanışlıdır (Gupta et al., 1994). RFLP'ler markır yardımıyla seleksiyon ve evrim çalışmalarında kullanışlıdır. Fakat, zaman kaybının fazla olması, nispeten pahalı olması ve önemli oranda tekniksel deneyim gerektirmesi gibi dezavantajları vardır. RFLP markır sistemlerinin yüksek miktarda DNA gerektirmesi ve yavaş işleyen tarama işlemleri nedeniyle son zamanlarda PCR' a dayalı sistemler tercih edilmektedir (Gupta et al., 1994).

RAPD markırları, genetik haritaların oluşturulması, bitki ve hayvan yetiştirme uygulamalarında ve DNA parmak izi çalışmaları için uygundur (Williams et al., 1990). RAPD markırı analizi, küçük miktarlarda DNA (15-25 ng) gerektiren, birkaç saatlik sürede gerçekleştirilebilen ve basit bir deneysel kurulumu gerektiren radyoaktif olmayan bir tekniktir. RAPD teknolojisi araştırmacılara, çok sayıda lokusta DNA dizisine dayalı hızlı ve etkili bir polimorfizm tarama olanağı sağlamıştır (Rafalski and Tingey, 1993). RAPD kullanılacak uygun kısa primerler ticari olarak elde edilebilir veya kolaylıkla sentezlenebilirler. Bir termal döngü cihazı ve agaroz jel düzeneginden başka özel bir ekipman gerektirmemektedir.

RAPD teknolojisinin dezavantajlarından biri, $MgCl_2$, DNA gibi reaksiyon bileşenlerine ve döngü sıcaklıklarına hassas olmasıdır. Optimizasyon çalışmaları ve hassas aletlerin kullanılması ile bu dezavantajın üstesinden gelinebilmektedir.

Sonuç olarak, kendi kendine döllen bir bitki olan kültür mercimeği çeşitleri arasında polimorfizmin belirlenmesinde, bir tek primer ile gerçekleşmesi ve önceden dizisi bilinen bir hedef DNA dizisine gerek duymaması, maliyetinin daha düşük olması, daha az bir zamanda sonuca ulaşılması, polimorfizm ve parmak izi çalışmalarına uygun olması ve mercimek türü ile daha önceki çalışmalarda (Abo-

elwafa et al., 1995; Ahmad et al. 1996) başarılı sonuçlar elde edilmiş olması gibi nedenlerle RAPD teknolojisi kullanılmıştır.



5.3. RAPD Amplifikasyon Şartlarının Optimizasyonu

RAPD tekniği her bir yeni uygulamada optimizasyon gerektirecektir (Innis and Gelfand, 1990). Bu çalışmada da RAPD bileşenlerinin birçoğu için optimizasyona gerek duyulmuştur.

5.3.1. DNA Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Birçok DNA izolasyon metodunun bulunması ve her bitkide farklı oranlarda ikincil yapıların yer alması nedeniyle DNA izolasyonları sonunda farklı saflık derecelerinde olan DNA' lar elde edilmektedir. PCR'da kullanılacak DNA'ların saflık derecelerinin farklı olması PCR sonuçlarını değiştirecektir. McPherson ve ark. (1993) sadece DNA konsantrasyonlarını farklı uygulayarak RAPD analizleri yapmışlar ve farklı sonuçlara ulaşmışlardır. Bazı DNA konsantrasyonlarında hiç band görüntüsü elde edemezken, bazı DNA konsantrasyonlarında farklı band görüntüleri elde etmişlerdir. Bu sonuçları farklı DNA konsantrasyonlarının RAPD PCR analizlerinin sonucunu değiştireceğini doğrulamıştır.

Genomik DNA konsantrasyonunun aşırı olması jelde DNA'nın yayılmış ve temiz olmayan bir bant görüntüsü vermesine neden olacaktır (Williams et al., 1990). DNA konsantrasyonu az olduğunda ise sabit sonuçlar elde edilememektedir (McPherson, 1993). McPherson ve ark., 1993, yaptıkları çalışmada DNA konsantrasyonunun aşırıya kaçılmadan 10 ng'ın üzerinde olması gerektiğini bildirmektedirler.

Bu çalışmada, DNA konsantrasyonu 25, 50, 75 ng değerlerinde test edildi ve Ahmad ve ark., (1996)'nın da mercimek bitkisinde RAPD çalışmalarında kullandıkları değer olan 25 ng'lık konsantrasyonun en iyi sonuç verdiği belirlendi.

5.3.2. Primer Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Yapılan çalışmada primer konsantrasyonu 2 μ M'ın altında çeşitli değerlerde denendi, fakat sonuç elde edilemedi. Daha sonra Abo-elwafa ve ark. (1995)'in yine mercimek bitkisi ile yaptıkları RAPD PCR analizinde kullandıkları 2 μ M konsantrasyonda primer kullanıldı ve başarılı sonuçlar elde edildi.

5.3.3. dNTP konsantrasyonunun Optimizasyonu

Her nükleotid için 50-200 μ M arasındaki konsantrasyonlarda dNTP'ler genellikle olumlu sonuç verir (Hoelzel, 1998). Daha yüksek konsantrasyonlar polimerazın yanlış eşleşmeler meydana getirmesine sebep olabilir. 200 μ M'a kadar kullanılmasına rağmen 50 μ M değerinde bir konsantrasyon (yaklaşık 7 μ g DNA sentezleyebilir) yeterlidir. Bu çalışmada her bir dNTP'den 5mM kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

5.3.4. MgCl₂ Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Magnezyum konsantrasyonu, primerin kalıp DNA'ya bağlanmasını (annealing), kalıp DNA ipliklerinin ayrılma ısını, PCR ürününün özgünlüğünü, primer-dimer oluşumunu ve enzim aktivitesini etkileyebilir. Taq DNA polimeraz, kalıp DNA, primer ve dNTP'ler ile oluşturacağı bağın üzerinde serbest magnezyum iyonuna ihtiyaç duyar (Innis and Gelfand, 1990). Magnezyum konsantrasyonu PCR reaksiyonunu çok az ürün vermesi ve aşırı, spesifik olmayan amplifikasyon ürünü vermesi yönünde etkiler. 1.5 mM MgCl₂ optimum değerdir, fakat bu konsantrasyon 0.5-10 mM arasında reaksiyonun etkisini arttırabilir (Hoelzel and Green, 1998). Örneğin, Saiki, 1989 her biri insan β -globin geninden 1.8 kb çoğaltan iki primer seti kullanmıştır. Bir set 1mM MgCl₂ konsantrasyonunda en iyi sonucu verirken, diğeri 6 mM MgCl₂ konsantrasyonunda en iyi sonucu vermiştir.

Bu çalışmada en iyi amplifikasyon ürünlerini elde etmek için 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 mM'lık konsantrasyonlar her PCR reaksiyonunda kullanıldı. Farklı primerlerde

farklı değerlerde magnezyum konsantrasyonları başarılı sonuçlar verdi. En iyi sonuç verenler fotoğraf çekiminde kullanıldı.

5.3.5. Tampon Konsantrasyonu

PCR için tavsiye edilen tampon çözeltisi genellikle 20°C'de ölçüldüğünde 10-50 mM Tris-HCl (pH = 8.3-8.8 arasında)' dir. Konsantrasyonu 50 mM'a kadar olan KCl'ün reaksiyon karışımında yer alması primerin kalıp DNA'ya bağlanmasını kolaylaştırır (Innis and Gelfand, 1990) ve Taq DNA polimerazın sentezleme aktivitesini %50-60 oranında arttırabilir (Hoelzel and Green, 1998). Fakat 50 mM üzerinde konsantrasyonlarda KCl enzim için inhibitördür (Innis et al., 1988). İyonik olmayan deterjanlar da enzimin stabilizasyonu için tampon çözeltiye dahil edilir.

Bu çalışmada, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl ve deterjan olarak %0.08 Nonidet P40 içeren 1X PCR tamponu kullanıldı ve başarılı sonuçlar elde edildi.

5.3.6. Enzim Konsantrasyonu

DNA polimeraz, 1980'lerin başlarında birkaç termofilik bakteri formunda (örneğin *Bacillus stearothermophilus*'da) ve çok sayıda Archaeobacteria'da tespit edildi. Bu enzimlerden en çok tanımlananı, 70-75°C'de büyüeyebilen, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus* (Taq)'dan elde edilenidir. Saflaştırılmış protein 94 kilodaltondur ve 70-80°C'de optimum polimerizasyon ısısına sahiptir. 90°C'nin üzerinde aktivitesini kaybeder (denatüre olmaz) ve daha düşük sıcaklık derecelerine döndüğünde aktivitesini tekrar kazanır. Yarı ömrü 95°C'de 40 dakikadır. Saflaştırılmış Taq DNA polimeraz PCR için en yaygın kullanılan enzimdir. Innis ve Gelfand (1990) 0.5-5 ünite/100 µl arasında enzim konsantrasyonunu önermektedir. Genel olarak, 4 ünitenin üzerindeki Taq polimeraz konsantrasyonları spesifik olmayan ürünlerin sentezine sebep olurken, 1 ünitenin altındaki konsantrasyonlar yetersiz ürün sentezine sebep olur (Saiki, 1990).

Yapılan çalışmada, 2.5 ünite/ µl Taq DNA polimeraz kullanıldı. Enzimin yarı ömrünü uzatmak için enzim, 5 dakikalık ilk denatürasyon basamağından sonra PCR

reaksiyon karışımına eklendi. 1.5 ve 2.0 ünitelik enzim konsantrasyonlarında başarılı sonuç elde edilemedi. Fakat 2.5 ünite enzim konsantrasyonu başarılı sonuç verdi.

5.4. RAPD Koşullarının Optimizasyonu

RAPD tekniği üç farklı sıcaklık döngüsü (denatürasyon, primer bağlanması ve primer uzaması) uygulanarak gerçekleştir (Williams et al., 1990). Tipik olarak bir reaksiyonda 90-95°C'de DNA iplikleri denatüre olur. Sıcaklık 40-60°C'ye indirildiğinde primerler kalıp DNA'da kendilerine tamamlayıcı olan dizilere sahip bölgelere bağlanırlar. Ardından sıcaklık 70-75°C'e yükseltildiğinde bağlanan primerler Taq polimeraz ile uzarlar.

Yeterli olmayan denatürasyon PCR reaksiyonunun başarısızlığına yol açan yaygın bir problemdir. Genel olarak 94°C'de 30-45 saniyelik bir uygulama yeterlidir. Fakat bazı kalıplar özellikle GC içeriği zengin olanlar için 98°C'ye kadar çıkmak gerekebilir. Bununla birlikte denatürasyon sıcaklığının yüksek olması Taq polimerazın aktivitesini düşürecektir (Taq polimerazın 95°C'de yarı ömrü 40 dakikayken, 98°C'de 5 dakikadır). Bu yüzden denatürasyon süresini ve sıcaklığını mümkün olduğu kadar minimum değerlerde tutmak gereklidir.

Primerlerin bağlanma sıcaklığı, primerlerin uzunluğu, baz bileşimine ve kullanılan primer konsantrasyonuna bağlıdır. 40°C'nin üzerindeki primer bağlanma sıcaklık dereceleri, 10 bazdan oluşan primerlerle amplifikasyonu önlemektedir (Williams et al., 1990).

Primer uzaması için gerekli olan süre, çoğaltılacak dizinin uzunluğuna ve DNA konsantrasyonuna bağlıdır. Ayrıca uygulanacak sıcaklığa da bağlıdır.

Döngü öncesinde, genomik DNA'nın çoğaltılacağı zaman tek iplikli kalıp oranını arttırmak için, genellikle başlangıç niteliğinde 95°C'de 2-5 dakikalık bir denatürasyon basamağı eklenir. Döngü sonunda da kalıba bağlanmış tüm primerlerin tam olarak polimerizasyonunu arttırmak amacıyla 5-10 dakikalık ek bir uzama basamağı uygulanır.

Bu çalışmada, mercimek genomik DNA'sı ilk denatürasyon basamağı 94°C'de 5 dakika uygulandıktan sonra, 42 döngü boyunca 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 34°C'de (35 ve 36°C'de başarılı sonuç elde edilemedi) 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 2 dakika primer uzaması basamakları uygulandı. Döngü sonunda da 72°C'de 10 dakika son bir basamak uygulandı. Bu sıcaklık döngüleri ile başarılı sonuçlar elde edildi.

5.5. RAPD Markır Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın ana konusu *Lens culinaris ssp. culinaris* (kültür mercimeği) içerisinde yer alan 6 çeşit arasında varyasyonlar gösteren RAPD markırları elde etmektir. RAPD markırları, *Zea mays* L. (Heun and Helentjaris, 1993), *Brassica napus* L. (Mailer et al., 1993), *Brassica juncea* (L.) (Jain et al., 1994), *Lens culinaris* L. (Abo-elwafa et al., 1995 ve Ahmad et al., 1996), *Ixora* L. (Rajaseger et al., 1997), *Vicia benghalensis* L. (Galasso et al., 1997), *Cicer arietinum* L. (Simon and Muehlbauer, 1997) ve *Xanthosoma* (Schnell et al., 1999) gibi birçok bitkide türler ve alttürler içerisinde varyasyonu belirlemede kullanışlıdır.

Kullanılan 9 primer ile elde edilen RAPD markırları incelendiğinde en az varyasyonun Emre ve Erzurum çeşitleri arasında (%71.48) olduğu görüldü. En fazla varyasyon ise Pul ve Sultan çeşitleri arasında bulundu (%39.76). Emre 20 çeşidinin kırmızı, Erzurum 89, Sultan 1 ve Pul 11'in ise yeşil tohum rengine sahip olduğu dikkate alındığında bu çalışma morfolojik karakterlerin sistematikte çok güvenilir olmadığı (Ladizinsky et al. 1984) fikrini desteklemektedir.

Ayrıca tohum ağırlıklarının farklılığı ile orantılı bir varyasyon gözlenmemiştir. Örneğin, 1000 tane ağırlığı 60 gr olan Sazak 91 ve 1000 tane ağırlığı 35-40 gr olan Emre 20 yüksek bir benzerlik oranı (%57.87) göstermiştir. Tohum ağırlıkları birbiriyle hemen hemen aynı olan (1000 tane ağırlığı 60-65 gr) Kayı 91 ile Sultan 1 arasındaki genetik benzerlik oranı nispeten daha düşüktür (%55.22). Daha önceki bir çalışmada (Abo-elwafa et al., 1995) tohum ağırlıkları farklı olan kültür mercimekleri arasında morfolojik fark dışında genetik bir varyasyon olmadığı ortaya konmuştur. Bu fikir, eldeki çalışma ile desteklenmektedir.

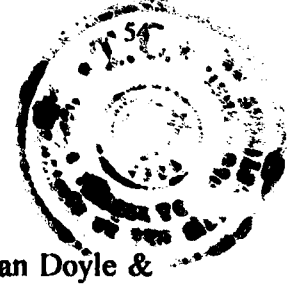


Çeşitler arasındaki benzerlik oranları incelendiğinde kültür mercimeğinin incelenen çeşitleri arasında polimorfizm genel olarak düşük bulunmuştur. Bu sonuç daha önceki çalışmalarla (Mayer and Soltis et al., 1994; Abo-elwafa et al., 1995; Ahmad et al., 1996) desteklenmektedir.

Kullanılan primerlerin RAPD bantları açısından verimliliği değerlendirilecek olursa, en az markır OS-03 primeri ile elde edilirken, en fazla markır ise CS-44 ve SA-R primerleri ile elde edildi. En az polimorfik bant SA-F primeri ile elde edildi. Diğer primerlerden kültür mercimeği çeşitleri arasında kayda değer RAPD bandları elde edildi.



6. SONUÇLAR



Kültür mercimeğine dahil 6 çeşite ait bireylerin genç yapraklarından Doyle & Doyle (1990) ve Murray & Thompson (1980)'in CTAB izolasyon metodları kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen izole genomik DNA'ların ek bir saflaştırma işlemine gerek duyulmadan 260 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılarak saflık dereceleri ve miktarları ölçüldü. Ölçümler sonunda uygulana izolasyon metodunun başarılı olduğu görüldü. Yeterli saflıkta ve miktarda bulunan genomik DNA'lar kullanılarak RAPD analizleri gerçekleştirildi. Bu çalışma, bahsi geçen Türkiye'ye has 6 kültür mercimeğinde yapılan ilk RAPD analizidir.

Bu 6 çeşide ait genomik DNA 'lar arasında polimorfizmi ortaya çıkarmak üzere uygulanan RAPD tekniğinde 9 adet 10 nükleotitten oluşan kısa primerler kullanıldı. Primerlerin hepsinden başarılı sonuçlar elde edildi. Uzunlukları 200-4000 bp arasında değişen toplam 102 adet markır tesbit edildi. Bu markırlar polimorfik veya homomorfik oluşlarına göre değerlendirilerek, çeşitler arasında polimorfizm oranlarının belirlenmesinde kullanıldı. Elde edilen veriler ışığında incelenen çeşitlerin bir dendogramda yerleşimi belirlendi.

Tüm değerlendirmeler sonunda incelenen çeşitler arasında yüksek benzerlik oranları tesbit edildi. Benzerlik oranları genelde yüksek olmasına rağmen çeşitler arasında kayda değer polimorfizm miktarları bulundu.

Çalışma ayrıca; morfolojik özelliklerin, bireylerin genetik özelliklerini belirlemede güvenilir kriterler olmadığını ortaya koymaktadır. Çeşitlerin bu çalışmada elde edilen benzerlik oranları, tohum rengi, tohum ağırlığı gibi morfolojik özellikleri ile uyum göstermemektedir. Bu sonuç, mercimek bitkisinin taksonomik sınıflandırmasında yoğun çalışmalar yapan Ladizinsky tarafından da bildirilmiştir (Ladizinsky, 1993).

Bu çalışma, kültür mercimeği ile yapılacak daha ayrıntılı zirai ve moleküler biyoloji çalışmalarında RAPD metodunun ve bu çalışmada kullanılan primerlerin

faydalı sonuçlar vereceğini göstermiştir. Elde edilen veriler ülkemizde ekonomik öneme sahip olan kültür mercimeğinin ıslah çalışmalarına katkılar sağlayacaktır.



İleride yapılacak ayrıntılı bir çalışmada RAPD ve DNA dizi analizi metodu kullanarak Türkiye'ye has bu çeşitlerde istenilen zirai özellikleri veren (yüksek protein konsantrasyonu, hastalıklara dirençli olma gibi) genlerin takibi yapılabilir.



7. KAYNAKLAR

1-ABBO S., LADIZINSKY G., and WEEDEN N.F. (1992). Genetic analysis and linkage study of seed weight in lentil. *Euphytica* 58: 259-266

2-ABO-ELWafa A., MURAI K. and SHIMADA T. (1995). Intra- and Inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet* 90: 335-340

3-AHMAD M., FAUTRIER A. G. and BURRITT D. J. (1995). Genetic diversity and relationships in *Lens* species and their interspecific hybrids as determined by SDS-PAGE. *Plant Breed* 114: 558-560

4-AHMAD M., McNEIL D. L., FAUTRIER A. G., ARMSTRONG K. F. and 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.

5-APPELS R. and LAGUDAH E. S. (1990). Notes for molecular cytogenetics/RFLP course. CSIRO, Australia.

6-BARULINA H. (1930). Lentils of the U.S.S.R. and other countries. *Bull. Appl. Bot. Plant Breeding Suppl.* 40: 1-319.

7-BECKMANN J. S. and SOLLER M. (1983). Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor Appl Genet* 67: 35-43

8-CASTIGLIONE S., WANG G., DAMIANI G., BANDI C., BISOFFI S. and SALA F. (1993). RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* ssp.) clones. *Theor Appl Genet* 87: 54-59

- 9-CHEN D. H. and RONALD P. C. (1999). A Rapid DNA Miniprep Method Suitable for AFLP and Other PCR Applications. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 53-57.
- 10-COHEN D., LADIZINSKY G. and MUEHLBAUER F. (1984). Rescue of interspecific *Lens* hybrids by means of embryo culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 3: 343-347.
- 11-DAVIS, P. H. and PLITMAN U. (1970). *Lens* Miller. Pages 325-328 in P. H. Davis, ed. *Flora of Turkey*. Vol. 3. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- 12-DELLAPORTA S. L., WOOD J. and HICKS J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 8: 8-12.
- 13-DO N. and ADAMS R. P. (1991). A Simple Technique for Removing Plant Polysaccharide Contaminants from DNA. *Biotechniques* Vol. 10, No. 2 p.162-166.
- 14-DOYLE D. G. and DOYLE J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Photochem Bull* 19: 11-15.
- 15-DUNHAM, V. L. and BRYANT, J. A. (1983). In isolation of membranes and organelles from plant cells (ed. J. L. Hall and A. L. Moore), p. 237. Academic Press, London.
- 16-EDWARDS K., JOHNSTONE C. and THOMPSON C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 6 1349.
- 17-ELLIS T.H.N., TURNER, L., HELLENS R.P., LEE D., HARKER C.L., ENARD C., DOMONEY C. and DAVIES D.R. (1992). Linkage Maps in Pea. *Genetics* 130: 649-663

18-FANG G., HAMMAR S. and GRUMET R. (1992). A Quick and Inexpensive Method for Removing Polysaccharides from Plant Genomic DNA. *BioTechnique* Vol. 13, No: 1 52-54.

19-FEINBERG A.P. and VOGELSTEIN B. (1983). A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Analytical Biochemistry* 132: 6-13.

20-FLAMAN J. -M., FREBOURG T., MOREAU V., CHARBONNIER F., MARTIN C., ISHIOKA C., FRIEND S.H. and IGGO R. (1994). A Rapid PCR Fidelity Assay. *Nucleic Acid Research*, Vol. 22, No. 15 3259-3260.

21-FUKUOKA S., HOSAKA K., and KAMIJIMA O. (1992). Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn J Genet* 67: 243-252.

22-GALASSO I., SONNANTE G., TOTA D.G. and PIGNONE D., (1997). Comparison of Molecular Cytogenetic and Genetic Analyses in Accessions of the Two Biotypes of *Vicia benghalensis* L. *Annals of Botany* 79: 311-317

23-GONZALEZ J.M. and FERRER E. (1993). Random Amplified Polymorphic DNA Analysis in *Hordeum* Species. *Genome* Vol.36 1029-1031.

24-GOSHEN D. G., LADIZINSKY G. and MUEHLBAUER F. J. (1982). Restoration of meiotic regularity and fertility among derivatives of *Lens culinaris* X *Lens nigricans* hybrids. *Euphytica* 31: 795-799.

25-GUPTA M., CHYI Y.-S., ROMERO-SEVERSON J. and OWEN J.L. (1994). Amplification of DNA Markers from Evolutionarily Diverse Genomes Using Single Primers of Simple-Sequence Repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998-1006.

26-HARRISON D., BALDWIN C. and PROCKOP D. J. (1993). Use of an Automated Workstation to Facilitate PCR Amplification, Loading Agarose Gels and Sequencing of DNA Templates. *BioTechniques* Vol. 14 No.1 88-97.

- 27-HAVEY M. J. and MUEHLBAUER F. J. (1989a). Variability for Restriction Fragment Lengths and Phylogenies in Lentil. *Theor Appl Genet* 77: 839-843.
- 28-HAVEY M. J. and MUEHLBAUER F. J. (1989b). Linkages between Restriction Fragment Length, Isozyme, and Morphological Markers in Lentil. *Theor Appl Genet* 77: 395-401.
- 29-HERRMANN, R. G., PALTA, H. K., and KOWALLIK, K. V. (1980). *Planta*, 148, p.319.
- 30-HEUN M. and HELENTJARIS T. (1993). Inheritance of RAPDs in F₁ Hybrids of Corn. *Theor Appl Genet* 85: 961-968.
- 31-HOFFMAN D. L., SOLTIS D. E., MUEHLBAUER F. J. and LADÍZINSKY G. (1986). Isozyme Polymorphism in *Lens* (Leguminosae). *Systematic Botany* 11(3): pp. 392-402.
- 32-HOELZEL A. R. and GREEN A. (1998). *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. Second edition. Oxford University Press Inc., New York.
- 33-INNIS M. A., MYAMBO D. H., GELFAND D. H., and BROW M. A. D. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9436-9440.
- 34-INNIS M. A. and GELFAND D. H. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press 525 B Street, San Diego, California.
- 35-JAIN A., BHATIA S., BANGA S.S., PRAKASH S. and LAKSHMIKUMARAN M. (1994). Potential Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique to Study the Genetic Diversity in Indian Mustard (*Brassica juncea*) and its Relationship to Heterosis. *Theor Appl Genet* 88: 116-122.

36-JONES, M. C. and BOOFEEY, S. A. (1984). FEBS Lett., 174,215.

37-KAMBOJ R. K., PANDEY M. P. and CAUBE H. S. (1990). Inheritance of Resistance to *Fusarium* wilt in Indian Lentil germplasm (*Lens culinaris* Medik.). Euphytica 50: 113-117.

38-KEATINGE J. D. H., QI A., KUSMENOGLU I., ELLIS R. H., SUMMERFIELD R. J., ERSKINE W. and BENIWAL S. P. S. Selecting Lentil Genotypes for Winter-Sowing in the Turkish Highlands. 2nd European Conference on Grain Legumes, 1995, Copenhagen.

39-KENNARD W. C., POETTER K., DIJKHUIZEN A., MEGLIC V., STAUB J. E. and HAVEY M. J. (1994). Linkages among RFLP, RAPD, Isozyme, Disease-resistance, and Morphological Markers in Narrow and Wide Crosses of Cucumber. Theor Appl Genet 89: 42-48.

40-KRESOVICH S., WILLIAMS J. G. K., McFERSON J. R., ROUTMAN E. J., and SCHAEEL B. A. (1992). Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. Theor Appl Genet 85: 190-196.

41-KUMAR U. and SINHA S.S.N. (1992). Karyotypic Analyses in Some Varieties of *Lens culinaris*. Cytologia 57: 295-301.

42-LADIZINSKY G. (1979a). The Genetics of Several Morphological Traits in the Lentil. J. Hered., 70: 135-137.

43-LADIZINSKY G. (1979b). The origin of lentil and its wild gene pool. Euphytica 28: 179-187.

44-LADIZINSKY G. and SAKAR, D. (1982) Morphological and cytogenetical characterization of *Vicia montbretii* Fisch and Mey. synonym: *Lens montbretii* (Fisch and Mey) Davis and Plitman. Bot. J. Lin. Soc., 85, 209.

45-LADIZINSKY G., BRAUN D., GOSHEN D. and MUEHLBAUER F. J. (1984).
The Biological Species of the Genus *Lens* L. Bot. Gaz. 145(2): 253-261.

46-LADIZINSKY G., COHEN D. and MUEHLBAUER F.J. (1985). Hybridization
in the genus *Lens* by means of embryo culture. Theor Appl Genet 70: 97-101.

47-LADIZINSKY G. (1993). Wild Lentils. Critical Reviews in Plant Sciences,
12(3): 169-184.

48-LANHAM P.G., FENNELL S., MOSS J.P. and POWELL W. (1992). Detection
of polymorphic loci in *Arachis* germplasm using random amplified polymorphic
DNAs. Genome, 35: 885-889.

49-LAVIN M., DOYLE J. J. and PALMER J. D. (1990). Evolutionary significance
of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the Leguminosae subfamily
Papilionidae. Evolution 44: 390-402.

50-LIN J.-J., KUO J., MA J., SAUNDERS J. A., BEARD H. S., MACDONALD M.
H., KENWORTHY W., UDE G. N. and MATTHEWS B. F. (1996). Identification of
Molecular Markers in Soybean Comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA Mapping
Techniques. Plant Molecular Biology Reporter 14 (2): 156-169.

51-McPHERSON J. M., ECKSTEIN P. E., SCOLES G. J. and GAJADHAR A. A.
(1993). Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal
cyclers, and effects of primer and DNA concentration. Molecular and Cellular Probes
7, 293-299.

52-MAILER R. J., SCARTH R. and FRISTENSKY B. (1994). Discrimination
among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms
amplified from arbitrary primers. Theor Appl Genet 87: 697-704.

53-MAYER M. S. and SOLTIS P. S. (1994). Chloroplast DNA phylogeny of *Lens*
(Leguminosae): origin and diversity of the cultivated lentil. Theor Appl Genet 87:
773- 781.

54-MUEHLBAUER F. J. and TULLU A. (1997). *Lens culinaris* Medik. New Crop FactSHEET



55-MUENCH D. G., SLINKARD A. E. and SCOLES G. J. (1991). Determination of genetic variation and taxonomy in lentil (*Lens* Miller) species by chloroplast DNA polymorphism. *Euphytica* 56: 213-218.

56-MULLIS K. and FALOONA F. A. (1987). Specific Synthesis of DNA *in Vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, Vol. 155 335-350.

57-MURRAY M. G. and THOMPSON W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.

58-NAGY, F., KAY, S. A. and CHUA, N.-H. (1988). In *Plant molecular biology manual* (ed. S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort), p. 1. Kluwer Academic, Dordrecht.

59- NIJS de M., LARSEN J. S., GAMS W., ROMBOUTS F. M., WERNARS K., THRANE U. and NOTERMANS S. H. W. (1997). Variations in random amplified polymorphic DNA patterns and secondary metabolite profiles within *Fusarium* species from cereals from various parts of The Netherlands. *Food Microbiology*, 14, 449-457.

60-PALMER J. D., JORGENSEN R. A. and THOMPSON W. F. (1985). Chloroplast DNA variation in *Pisum*: patterns of change and phylogenetic analysis. *Genetics* 109: 195-213.

61-PINKAS R., ZAMIR D. and LADIZINSKY G. (1985). Allozyme Divergence and Evolution in the Genus *Lens*. *Pl. Syst. Evol.* 151, 131-140.

62-PRICE, C. A. (1983). In *isolation of membranes and organelles from plant cells* (ed. J. L. Hall and A. L. Moore), p. 1. Academic Press, London.



63-RAGOT M. and HOISINGTON D. A. (1993). Molecular markers for plant breeding: comparisons of RFLP and RAPD genotyping costs. *Theor Appl Genet* 86: 975-984.

64-RAFALSKI J. A. and TINGEY S. V. (1993). Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Reviews* Vol. 9 No. 8, 275-279.

65-RAJASEGER G., TAN H. T. W., TURNER I. M. and KUMAR P. P. (1997). Analysis of Genetic Diversity among *Ixora* Cultivars (Rubiaceae) using Random Amplified Polymorphic DNA. *Annals of Botany* 80: 355-361.

66-RAJORA O. P. and MAHON J. D. (1994). Inheritance of mitochondrial DNA in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Theor Appl Genet* 89: 206-210.

67-RAJORA O. P. and MAHON J. D. (1995). Paternal plastid DNA can be inherited in lentil. *Theor Appl Genet* 90: 607-610.

68-RATNAPARKHE M. B., SANTRA D. K., TULLU A. and MUEHLBAUER F. J. (1998). Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea. *Theor Appl Genet* 96: 348-353.

69-REDDY V. R. K. and ANNADURAI M. (1992). Cytological Effects of Different Mutagens in Lentil (*Lens culinaris* Medik). *Cytologia* 57: 213-216.

70-RENFREW J. M. (1969). The archeological evidence for the domestication of plants: methods and problems. Pp. 149-158 in *The domestication and exploitation of plants and animals*, eds. P. J. Ucko and G. W. Dimbleby. London: Duckworth.

71-RHOLF, F. J. (1990). NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.8. Applied Biostatistics, New York, 1990.

72-ROGERS, S. O. and BENDICH, A. J. (1988). In *Plant molecular biology manual* (ed. S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort), p.1. Kluwer Academic, Dordrecht.



73-SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B. and ERLICH H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* Vol 239, p. 487-491.

74-SAIKI R. K. (1989). In *PCR Technology* (ed. H. A. Erlich), p. 7. Stockton Press, New York, NY.

75-SAIKI R. K. (1990). In *PCR protocols. A guide to methods and applications* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White), p. 13. Academic Press, San Diego, CA.

76-SCHNELL R. J., GOENAGA R. and OLANO C. T. (1999). Genetic similarities among cocoyam cultivars based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Scientia Horticulturae* 80: 267-276.

77-SIMON C. J. and MUEHLBAUER F. J. (1997). Construction of a Chickpea Linkage Map and Its Comparison With Maps of Pea and Lentil. *Journal Heredity* 88: 115-119.

78-SINHA S. S. N. and GODWARD M. B. E. (1972). Radiation studies in *Lens culinaris* meiosis: abnormalities induced due to gamma radiation and its consequences. *Cytologia* 37: 685-695.

79-SKIBINSKI D. O. F., RASOOL D. and ERSKINE W. (1984). Aspartate aminotransferase allozyme variation in a germplasm collection of the domesticated lentil (*Lens culinaris*). *Theor Appl Genet* 68, 441-448.

80-SOKAL, R. R. and SNEATH, P. N. A. (1963). *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.

81-SOLLER M. and BECKMANN J. S. (1983). Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor Appl Genet* 67: 25-33.



82-STAUD J. E. and SERQUEN F. C. (1996). Genetic Markers, Map Construction and Their Application in Plant Breeding. Hortscience, Vol. 31(5) p. 729-741.

83-STEWART C. N. and VIA L. E. (1993). A Rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful for RAPD Fingerprinting and Other PCR Applications. BioTechniques Vol. 14(5): 748-749.

84-SUTTER K. A., WENDEL J. F. and CASE J. S. (1983). LINKAGE 1: a PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. The Journal of Heredity 74: 203-204.

85-TEUTONICO R. A. and OSBORN T. C. (1994). Mapping of RFLP and qualitative trait loci in *Brassica rapa* and comparison to the linkage maps of *B. napus*, *B. oleracea*, and *Arabidopsis thaliana*. Theor Appl Genet 89: 885-894.

86-THORMANN C. E., FERREIRA M. E., CAMARGO L. E. A., TIVANG J. G. and OSBORN T. C. (1994). Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. Theor Appl Genet 88: 973-980.

87-VAILLANCOURT R. E. and SLINKART A. E. (1992). Inheritance of new genetic markers in lentil (*Lens Miller*). Euphytica 64: 227-236.

88-VAN STALLEN N., NOTEN V., DEMEULEMEESTER M. and DE PROFT M. (2000). Identification of commercial chicory cultivars for hydroponic forcing and their phenetic relationships revealed by random amplified polymorphic DNAs and amplified fragment length polymorphisms. Plant Breeding 119: 265-270.

89-WANG Z., WEBER J. L., ZHONG G. and TANKSLEY S. D. (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor Appl Genet 88: 1-6.

90-WEINING S. and LANGRIDGE P. (1991). Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. Theor Appl Genet 82: 209-216.

91-WEISING K., BEYERMANN B., RAMSER J. and KAHL G. (1991). Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis* 12: 159-169.

92-WEISING K., KAEMMER D., WEIGAND F., EPPLEN J. T. and KAHL G. (1992). Oligonucleotide fingerprinting reveals various probe-dependent levels of informativeness in chickpea (*Cicer arietinum*). *Genome*, 35: 436-442.

93-WELSH J. and McCLELLAND M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 24 p. 7213-7218.

94-WELSH J., HONEYCUTT R. J., McCLELLAND M. and SOBRAL B. W. S. (1991). Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor Appl Genet* 82: 473-476.

95-WELSH J. and McCLELLAND M. (1991). Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 19 5275-5279.

96-WILKIE S. E., ISAAC P. G., and SLATER R. J. (1993). Random polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor Appl Genet* 86: 497-504.

97-WILLIAMS J. T., SANCHEZ M. C. and JACKSON T. (1974). Studies on lentils and their variations. I. Taxonomy of the species. *Soc. Advance. Breeding Res. Asia Oceania J.* 6: 133-143.

98-WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. and TINGEY S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrarily primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22 6531-6535.

99-WILSON V. E., LAW A. G. and WARNER R. L. (1970). Inheritance of Cotyledon Color in *Lens culinaris* (Medic.). *Crop Science*, Vol. 10 287-288.

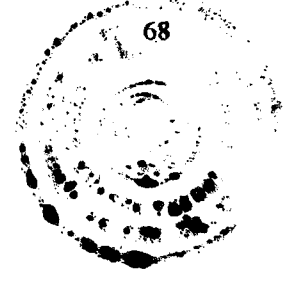
100-WILSON, V. H. and LAW A. G. (1972). Natural crossing in *Lens esculanta* Moench. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97: 142-143.

101-WU K.-S., JONES R., DANNEBERGER L. and SCOLNIK P. A. (1994). Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. Nucleic Acid Research, Vol. 22, No. 15 3257-3258.

102-ZAMIR D. and LADIZINSKY G. (1984). Genetics of Allzyme Variants and Linkage Groups in Lentil. Euphytica 33: 329-336.

103-ZAMIR D. and TADMOR Y. (1986). Unequal Segregation of Nuclear Genes in Plants. Bot. Gaz. 147(3): 355-358.

104-ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A. and LABUDA D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics 20, 176-183.



8. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Zonguldak-Ereğli’de Orhan Aksoy ve Fatma Aksoy çiftinin oğlu olarak dünyaya geldi. 1987 yılında Alaplı Atatürk İlkokulundan mezun oldu. Ortaokul eğitimini 1990 yılında, Lise eğitimini 1993 yılında Alaplı Atalay Lisesi’nde tamamladı. 1997 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalından mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek teknoloji Enstitüsü’nde Yüksek Lisans eğitimine başladı. 1999 yılında Yüksek Lisans Tez çalışmasına başladı. Yabancı dili İngilizcedir.





EK 1

CTAB İzolasyon Tamponunun Hazırlanışı

500 ml'lik tampon çözeltisi için

CTAB : 10 gr

NaCl : 40.90 gr

EDTA : 3.72 gr

Tris : 6.05 gr (pH: 8.0)

Distile su ile 500 ml' ye tamamlanır.

EK 2



TE Tamponunun Hazırlanması

100 ml'lik tampon için:

0.121 gr Tris pH = 8.0

0.037 gr EDTA

Distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.



T.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ