

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANADOLU’NUN FARKLI BÖLGELERİNE AİT
***CICER ARIETINUM* GENOTİPLERİNDE**
GENETİK FAKLILIĞIN *C. RETICULATUM* VE
***C. YAMASHITAE* YABANI TÜRLERİYLE**
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK RAPD-PCR
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Ertekin KOÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Konya, 2008

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANADOLU’NUN FARKLI BÖLGELERİNE AİT *CICER ARIETINUM*
GENOTİPLERİNDE GENETİK FAKLILIĞIN *C. RETICULATUM* VE *C.*
***YAMASHITAE* YABANİ TÜRLERİYLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK**
RAPD-PCR YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Ertekin KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 24/01/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd.Doç.Dr. Erdoğan Eşref HAKKI
(Danışman)

Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU
(Üye)

Prof. Dr. Mustafa ÖNDER
(Üye)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU’NUN FARKLI BÖLGELERİNE AİT *CICER ARIETINUM*
 GENOTİPLERİNDE GENETİK FAKLİLİĞİN *C. RETICULATUM* VE *C.*
YAMASHITAE YABANI TÜRLERİYLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK RAPD-
 PCR YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Ertekin KOÇ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

2008, 60 sayfa

Jüri : Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Prof. Dr. Mustafa ÖNDER

Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU

Gen merkezi Anadolu olan nohut bitkisinin farklı coğrafik bölgelere ait kültür formlarının genetik varyasyonlarının RAPD-PCR yöntemiyle incelenmesi, gen havuzu dar olan kültür nohutlarının biyoçeşitliliklerinden faydalanabilme durumunu belirlemek amacı ile bu tez çalışması yürütülmüştür.

RAPD markör tekniği, kültür nohutu *Cicer arietinum*’un 36 genotipi ile birlikte 2 tek yıllık yabani *Cicer* türü genotiplerine uygulanmıştır. Seçilen RAPD primerlerinden 28’i kullanılarak toplam 330 band skorlanmıştır. NTSYS-pc, 2.0 programı kullanılarak elde edilen dendogramlar sonucunda *Cicer* türlerinde genel olarak iki ana kol oluşmuştur. Birinci kolu *C. yamashitae* oluşturmuştur. İkinci kol ise iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan birinde *C. reticulatum* aksesyonu yer alırken diğer grupta kültür nohutu, *C. arietinum* aksesyonları bulunmuştur. *C. arietinum* aksesyonları genetik ilişkilerine göre alt gruplar meydana getirmişlerdir. Kültür nohutunun yabani atası olduğu kabul edilen *C. reticulatum*’un aynı coğrafik bölgeye ait kültür nohutu formları ile genetik yakınlık gösterdiği gözlenmiştir. Kültür çeşitlerinin ise genetik köken ve kısmi olarak coğrafik dağılımlarına göre gruplandıkları saptanmıştır. Uygulanan kümeleme analizlerinin (dendogramlar) temel koordinatlar analizleri (PCoA) ile de kuvvetli bir şekilde desteklendiği görülmüştür. Nohutun dar genetik havuzundan uygun kültür nohut aksesyonlarıyla yapılacak tür içi çaprazlamalarla mevcut durumdan daha fazla yararlanılabileceği görülmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: *Cicer*, kültür nohut, gen kaynağı, RAPD, polimorfizm,
genetik eşitlilik

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF GENETIC DIFFERENCES AMONG *CICER ARIETINUM*
GENOTYPES FROM DIFFERENT REGIONS OF ANATOLIA, COMPARED
WITH THE WILD SPECIES *C. RETICULATUM* AND *C. YAMASHITAE*, VIA
RAPD-PCR METHOD

Ertekin KOÇ

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Field Crops

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

2008, 60 pages

Jury: Asist. Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Prof. Dr. Mustafa ÖNDER

Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU

This thesis study was conducted to reveal the genetic diversity of chickpea accessions belonging to different regions of Anatolia via RAPD-PCR in order to be used in the improvement programs of the narrow genetic pool of the chickpea cultivars.

RAPDs were the molecular techniques employed to the 36 accessions of chickpea (*Cicer arietinum*) and the other 2 annual *Cicer* species. Selected 28 RAPD primers were utilised and 330 fragments were scored. NTSYS-pc version 2.0 was used to generate the dendograms that clearly classified the *Cicer* species into two major branches. *C. yamashita* was constituted the first branch while the second branch was divided into two main groups. While one of these groups contained *C. reticulatum*, all the *C. arietinum* accessions were accumulated in the other one where a number of subgroups were also generated. It was evidenced that the wild species that is considered to be the progenitor of the cultivars, namely *C. reticulatum*, was genetically more closely related to the cultivated accessions of the region where the wild species also belong to. Related to the cultivated genotypes, they were determined to be grouped based on their genetic background and partially on geographic distribution. The cluster analyses (dendograms) conducted were also well-supported by principle coordinate analyses (PCoA). It is believed that within-

species crosses with properly selected accessions would lead us benefit from the narrow genetic pool of chickpea in a better way.

KEY WORDS: *Cicer*, chickpea, genetic resources, RAPD, polymorphism, genetic diversity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesi ve çalışmalarımın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen, beni yönlendirip fikir ve tecrübelerini aktaran danışman hocam, Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI'ya teşekkürü bir borç bilirim. Nohut türlerine ait tohumların temin edilmesinde katkılarından dolayı Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Sera çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Sait GEZGİN'e teşekkürlerimi sunarım. Tez düzeltme aşamasındaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ahmet TAMKOÇ'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam süresince laboratuvar çalışmaları esnasında yardımlarını esirgemeyen başta biyolog Deniz SARAÇOĞLU ve biyolog Nuri KESEN olmak üzere, biyolog Zeynep ÖZBEK, Arş. Gör. Emine ATALAY, Ziraat Mühendisi Emine PINARKARA'ya ve laboratuvarlarda çalışan diğer arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

KONYA, 2008

Ertekin KOÇ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER	vii
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. <i>Cicer</i> Cinsinin Kökeni	4
2.2. <i>Cicer</i> Cinsinin Genel Botanığı	5
2.3. Moleküler markörler	7
2.3.1. DNA markörleri	7
2.3.1.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)’a dayalı markörler	8
2.3.1.1.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)	9
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1. Materyal	14
3.2. Metot	17
3.2.1. DNA izolasyonunda kullanılan bitki materyalinin temini	17
3.2.2. DNA izolasyonu	17
3.2.3. DNA miktarı ve kalitesinin spektral yöntemle tayini	18
3.2.4. PCR uygulamaları	19
3.2.4.1. RAPD-PCR amplifikasyon koşulları	19
3.2.4.2. PCR koşulları	20
3.2.4.3. Primer seçimi ve konsantrasyonu	20
3.2.4.4. Agaroz jel elektroforez	23
3.2.4.5. %2’lik agaroz jelin hazırlanması ve dökülmesi	23
3.2.4.6. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi	24
3.2.4.7. PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi	24
3.2.4.8. Görüntüleme ve RAPD bantlarının elde edilmesi	24
3.2.4.9. İstatistiksel analizler	25
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	26
4.1. DNA izolasyonu	26
4.2. PCR koşulları ve reaksiyonlar	29
4.3. RAPD analizleri	29
4.4. RAPD verilerinin kümeleme analizi	34
4.5. Temel koordinatlar analizi (<i>Principle Co-ordinate Analysis=PCoA</i>)	41
4.6. Mantel testi	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
6. KAYNAKLAR	51

SİMGELER

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism - Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
bç (bp)	Baz çifti
C	Sitozin
CTAB	Cetil three metil amonyum bromid
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozid tri fosfat
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetic acid
G	Guanin
ICARDA	International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi
OD	Optik Dansite
<i>PCoA</i>	<i>Principal Coordinate Analysis</i> - Temel Bileşen Analizi
PCR	Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	Pikomol
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA - Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism - Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi
rpm	Rotation per minute-Dakikada döngü sayısı
SSR	Simple Sequence Repeat - Basit Tekrar Dizileri
T	Timin

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris- EDTA
T _m	Melting Temperature-Erime Sıcaklığı
UV	Ultra viyole

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	Çalışmada kullanılan kültür nohutu tohumlarının alındığı illeri gösteren Türkiye haritası.....	16
Şekil 3.2.	Çalışmada kullanılan materyale ait örnekler.....	17
Şekil 4.1.	Çalışmada kullanılan örneklerin DNA jel görüntüleri.....	26
Şekil 4.2.	<i>CRAPD1</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	31
Şekil 4.3.	<i>CRAPD7</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	31
Şekil 4.4.	<i>CRAPD8</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	31
Şekil 4.5.	<i>CRAPD10</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	31
Şekil 4.6.	<i>CRAPD11</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	32
Şekil 4.7.	<i>CRAPD20</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	32
Şekil 4.8.	<i>RAPDL3</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar.....	32
Şekil 4.9.	<i>RAPDL4</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar.....	32
Şekil 4.10.	<i>RAPDB2</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	32
Şekil 4.11.	<i>RAPDB3</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	33
Şekil 4.12.	<i>RAPDB5</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	33
Şekil 4.13.	<i>RAPDB6</i> primerinin <i>Cicer</i> aksesyonlarında oluşturduğu bantlar	33
Şekil 4.14.	Kümeleme analizi sonucu oluşan dendogram (Jaccard).....	38
Şekil 4.15.	Genotip sayısı sınırlandırılmış kümeleme analizi sonucu oluşan dendogram (Jaccard).....	40
Şekil 4.16.	RAPD analizi sonucu oluşan Jaccard <i>PCoA</i>	42
Şekil 4.17.	Bölgelere göre aksesyonların dağılımı gösteren Jaccard <i>PCoA</i>	44
Şekil 4.18.	Sınırlandırılmış bölgesel <i>PCoA</i> analizi..	45
Şekil 4.19.	SM ve J katsayılarına göre mantel testi.....	47

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>Cicer</i> türleri, aksesyon numaraları ve kaynak yerleri	14
Çizelge 3.2. PCR karışımı bileşenleri ve miktarları	19
Çizelge 3.3. RAPD analizlerinde kullanılan primerler, baz dizilişleri, GC (%) oranları ve T _A ısıları (°C).....	22
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan bitkilerin türleri, aksesyon numaraları ve DNA saflık değerleri.....	28
Çizelge 4.2. RAPD amplifikasyonları sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları	30

1. GİRİŞ

Nohut (*Cicer arietinum* L.), kültür bitkileri arasında dünyadaki en önemli baklagil familyası üyelerinden biridir. Güney Asya, Batı Asya, Kuzey Afrika, Doğu Afrika, Güney Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Avusturalya gibi farklı bölgelere ait 33'den fazla ülkede nohut ziraatı yapılmaktadır (Singh, 1997). Dünya üzerinde 2006-2007 sezonunda üretilen 8.65 milyon ton nohutun önemli bir kısmı Asya kıtasında üretilmiştir (Anonim, 2006). En büyük nohut üreticisi ülkeler Hindistan, Türkiye, Pakistan ve İran'dır (Anonim, 2005). Tahıl tüketiminin baskın olduğu Güney, Batı ve Doğu Asya'da, ekonomik nedenlerle et ile beslenemeyenler ve vejeteryanlar için daneleri proteince çok zengin (%18-31) olan nohut, geniş kitlelerin protein ihtiyacını büyük ölçüde karşılamaktadır. Aynı zamanda nohut, hayvanlar için yem olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca, köklerinde simbiyotik olarak yaşayan bakteriler vasıtasıyla atmosferik azotu (N₂) bağlama, gelişmiş kök sistemiyle toprağın alt tabakalarında bulunan besin maddelerini toprak yüzeyine çıkarma ve verimliliklerini kaybeden toprakların verimliliklerini geri kazanmak için ekim nöbetinde kullanılma gibi tarımsal faaliyetlerde de önemli bir role sahiptir.

Günümüzde tarımı yapılan nohut çeşitlerinde biyotik ve abiyotik stres etmenlerinden dolayı zaman zaman çok önemli verim düşüşleri olmaktadır. Biyotik stresler; nohut antraknoz etmeni [*Ascohyta rabiei* (Pass) Lab.], kurşuni küf [*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr.], fuzaryum solgunluğu [*Fusarium oxysporum* Schech-tend. Emend W.C. Synder. ve H.N. Hans], fuzaryum kök çürüklüğü [*Fusarium solani* (Mart.) Sacc. F. Sp. Cumartii (C. Carpenter) W.C. Synder. ve H.N. Hans.], kuru kök çürüklüğü [*Rhizoctonia bataticola* (Taubenhaus) E.J. Butler], nematodlar [*Heterodera ciceri* Vovlos ve Greco ve *Di Vito* ve *Meloidogyne* spp.], dana burgusu [*Helicoverpa armigera* Hübner] ve yaprak sineği [*Liriomyza cicerina* Rondani] olarak sıralanabilir. Abiyotik stresler içinde ise; kuraklık, tuzluluk, yüksek ve düşük hava sıcaklığı gibi nohut verimliliğini kısıtlayan faktörler başta gelmektedir (Upadhaya ve ark., 2006).

Islah programlarında genotipik farklılıklardan faydalanarak tür içi ve türler arası melezlemelerle (yabani türlerle kültür formları arasında) verimli ve stres etmenlerine karşı dirençli bitkiler elde edilebilir. Genotipik yapısı farklı olan germplazm kullanımı ile geliştirilecek çeşitlerle, zararlılara ve hastalıklara karşı dirençlilik sağlanabilir (Duvick, 1984; Cox ve ark., 1986). Ebeveynler arasında genetik farklılıkların geniş olması; gerekli allel varyasyonuna uygun gen kombinasyonlarını meydana getirme olasılığını artırmaktadır. Günümüzde tarımı yapılan *C. arietinum*'un gen havuzunun oldukça dar olduğu da düşünüldüğünde (Berger ve ark., 2003), çeşit geliştirmede genotipik farklılıkların önemi daha da artmaktadır.

Bitki türlerinin tanımlanmasında ve genetik varyasyonun araştırılmasında moleküler markörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Son dönemde hızla gelişen moleküler markör teknolojileri; çeşitler arasındaki genetik farklılıklarının belirlenmesi, kromozom haritalarının çıkarılması, gen kaynaklarının karakterize edilmesi, evrimsel gelişim analizi ve transformasyonda başarı düzeyinin belirlenmesi gibi çalışmalarda önemli araçlar haline gelmiştir. Moleküler teknikler, çevre faktörlerinden etkilenmezler ve polimorfizm oranları da yüksektir. Bitki germplazmının genetik varyasyonuna dair bilgiler, spesifik bir germplazm kaynağındaki genetik ilişkilerin belirlenmesi ile populasyonların tanımlanması açısından önemli bir başvuru kaynağı olacaktır. Islah programının başlangıcında, genotipler arasındaki genetik ilişkiye dair bilgiler, fenotipik bilgiyi tamamlayıcı olarak ıslah populasyonlarının geliştirilmesinde kullanılabilmektedir (Santalla ve ark., 1998). Genotipler arasındaki genetik benzerlik ya da farklılıklar, yeni genetik kombinasyonlar oluşturulurken materyal olarak ıslahçının neyi kullanacağı konusunda karar vermesine yardımcı olabilir (Hallden ve ark., 1994).

Birçok moleküler metot, kültür formlarında genetik çeşitliliğin tanımlanması için uygundur. Yaygın kullanılan teknikler olarak önceleri, 'Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi' (RFLP), son yıllarda da, 'Rastgele Oligonükleotid Primerleri ile Çoğaltılmış Polimorfik DNA' (RAPD), mikrosatelitler olarak da bilinen 'Basit Sekans Tekrarları' (SSR), 'Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi' (AFLP) ve

primer olarak tekrar dizilerinin bizzat kullanıldığı mikrosatelit tabanlı ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) belirleyicileri gösterilebilir. Son dönemlerde yapılan birçok genetik çeşitlilik analizinde sadece DNA markörleri veya morfolojik analizlerle DNA markörleri birlikte kullanılmıştır (Kaga ve ark., 1996; Paul ve ark., 1997; Sharma ve ark., 1996; Waycott ve Fort, 1994). ‘Polimeraz Zincir Reaksiyonuna’ (PCR) dayalı rastgele primer kullanımıyla yapılan RAPD çalışmalarından son on yılda çok sayıda çalışmada yararlanılmıştır. Aralarında nohutun da yer aldığı birçok bitki türünde genetik çeşitliliğin belirlenmesi için kullanılan RAPD tekniği popüler hale gelmiştir (Sant ve ark., 1999; Collard ve ark., 2003). RAPD tekniği, kullanımının kolay, ekonomik, birçok çalışmada yeterli derecede polimorfizm sunması ve çabuk sonuç vermesiyle öne çıkmaktadır (Williams ve ark., 1990). RAPD markörlerinin taksonomik kimlikler, sistematik ilişkiler, populasyonun genetik yapısı, tür hibridizasyonu ve soy tanımlama çalışmalarında faydalı olduğu görülmüştür (Ahmad, 1999).

Bu tez çalışmasının amacı; gen merkezi Anadolu olan *Cicer arietinum*’un, sınırlı bir genetik varyasyona sahip olan genotipleri arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesidir. Materyal olarak Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerine ait kültür nohutu genotipleri kullanılarak bunlar arasındaki genetik çeşitlilik ve benzerliklerin RAPD markör tekniği ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Dış grup olarak da Güneydoğu Anadolu kökenli yakın akraba tür olarak *C. reticulatum* ve Afganistan’da endemik olan uzak akraba tür *C. yamashitae* kullanılmıştır. Genetik varyasyonu dar olan bu bitkide polimorfik markörlerin belirlenmesi, özellikle ülkemiz için önemli olan bu baklagilin genetik havuzunda hastalıklara karşı direnç, iklim ve çevre şartlarına adaptasyon yeteneği sağlayacak genlerin tespit edilmesi ve bunların ıslahta kullanılması sonucunda ürün miktarı ile besin kalitesinin artırılması mümkün olabilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 *Cicer* Cinsinin Kökeni

Kültür nohutu, *C. arietinum* L. eski dünyada ilk kültüre alınan baklagil familyası üyelerinden biridir (Van der Maesen, 1972). Nohutun günümüz Güneydoğu Türkiye'sinden ve komşusu Suriye topraklarından köken aldığı düşünülmektedir. Tohum proteini elektroforezi çalışmalarına göre Ladizinsky ve Adler (1976a), *Cicer reticulatum*'un kültür nohutunun yabani atası olduğunu ve Türkiye'nin Güneydoğu'sunun nohutun anavatanı olduğunu ifade etmişlerdir. Yabani nohutlar üzerinde yapılan melezleme (Singh ve Ocampo, 1993), karyotip analizi (Ocampo ve ark., 1992) ve izozim çalışmaları (Labdi ve ark., 1996) da nohutun anavatanı konusunda Ladizinsky ve Adler (1976a)'ın bulgularını desteklemiştir.

Cicer ile çalışma yapan ilk botanikçiler, nohutun birkaç farklı bölgeden köken aldığını kabul etmişlerdir. De Condolle (1883), nohutun kökeninin Kafkasya'nın güneyinde bir alanda ve Kuzey İran'da olduğunu belirtmiştir. Vavilov (1926), Güneybatı Asya ve Ortadoğu'yu birincil merkez, Etiyopya'yı da ikincil merkez olarak tanımlamıştır. Vavilov, doğuya doğru küçük taneli bitkilerin baskın olduğunu, Ortadoğu havzasında ise iri taneli nohutların bol olduğunu tespit etmiştir. İri taneli nohutların yaklaşık 200 yıl önce Afganistan'ın başkenti Kabil üzerinden Hindistan'a ulaştığına ve Hintçe'de *Kabuli* chana (chana=nohut) (Van der Maesen, 1972) ismini aldığını dair kanıtlar vardır. Küçük taneli, koyu renkli nohutlar yerel olarak *desi* diye adlandırılmaktadır. Bu isimlendirmeler genellikle iki kültür çeşidini ayırt etmek için kullanılmaktadır. *Kabuli* tipi geleneksel olarak Ortadoğu havzası ve Merkez Asya'da yetiştirilirken, *desi* tipi en çok Hindistan yarımadası, Doğu Afrika, Merkez Asya ve Ortadoğu havzasında sınırlı bir alanda üretilmektedir. İki ana tip birçok özellik açısından ayrılır. Bu iki tipte varyasyonu geliştirmek için *Desi x Kabuli* çaprazlaması yetiştiriciler tarafından gerçekleştirilmiş, ancak iki ana tip arasında gen transferi yeterli olmamıştır (Bahl, 1980; Hawting ve Singh, 1980; Maynez ve ark., 1993). Genel olarak *Kabuli* tipinin Ortadoğu havzasındaki *desi* tipinden köken aldığı kabul

edilmektedir (Moreno ve Cubero, 1987; Hawtin ve Singh, 1980; Salimath ve ark., 1984; Gil ve Cubero, 1993).

Cicer L. cinsi *Leguminosae* familyası, *Papilionaceae* alt familyası, *Cicereae* oymağına aittir ve 43 türden oluşur; 9 tek yıllık, 33 çok yıllık ve bir tanesi de tanımlanmamıştır (Van der Maesen, 1987). Tek yıllık 9 tür şunlardır; *C. arietinum* L., *C. bijugum* K.H. Rech., *C. chorassanicum* (Bge.) M. Pop., *C. cunaete* Hoechst ex. Rich., *C. echinospermum* P.H. Davis, *C. judaicum* Boiss., *C. pinnatifidum* Jaub&Spp., *C. reticulatum* Ladiz., ve *C. yamashitae* Kitanum. Kültür türü olan *C. arietinum* Ortadoğu bölgesinde, Myanmar, Avustralya, Etiyopya, Meksika, Şili, tropiklerin serin bölgeleri ve Kuzey Amerika'da yetişirken, tek yıllık *Cicer* türleri Türkiye'den Güney Asya'ya kadar olan geniş bir alanda, Etiyopya, Sudan ve Mısır'ın büyük bir bölümünde dağılım gösterir (Robertson ve ark., 1997).

2.2. Cicer Cinsinin Genel Botanığı

Nohutta plumulanın gelişmesiyle dik bir sürgün oluşur. İlk gerçek yaprak 2-3 çift yaprakçıga sahiptir. Yapraklar ayrı ayrı her bir boğumda karşılıklı olarak çıkmaktadır. Bir yaprak sapı üzerinde (25-75 mm uzunluğunda) genellikle 11-18 yaprakçık vardır (Sepetoğlu, 1996). Yaprak sapının dalla birleştiği yerde görülen kulakçıklar (*stipulalar*) genellikle 3-11 mm uzunluğunda, 1.6 mm genişliğinde olup bazı hallerde 14 mm'ye kadar uzayabilirler (Şehirali, 1988). Bitkinin tüm dış yüzeyi taç kısmı hariç grandüler (salgı kesesi olan) ve agrandüler (salgı kesesi olmayan) tüylerle kaplıdır. Bitkinin kök sistemi kazık kök ve yanal köklerden oluşmaktadır. Kökler 120 cm'den daha derine gidebilmektedirler (Sheldrake ve Saxena, 1979).

Nohutta, dal açılarına göre doğal 5 habitus şekli vardır. Bunlar; dik, yarı dik, yarı yatık, yatık ve tam yatıktır (Pundir ve ark., 1985). Genel olarak, bitkiler 20 ile 100 cm arasında boya ulaşırlar. Bununla birlikte kültür çeşitleri uygun koşullarda 130 cm'e kadar uzayabilirler (Reddy ve ark., 1985).

Çiçekler tipik olarak kelebek şeklindedir. Nohutta çiçek durumu, yaprak koltuklarından çıkan salkım şeklindedir. Genellikle bir salkımda bir çiçek bulunur, bazen ikiz çiçekler de olabilir. Taç yapraklar genellikle *desi* tipinde mor, *kabuli* tipinde beyaz veya nadiren mavidir (Singh, 1997).

Nohut, her bitkide sayıları birkaçtan 1000'e kadar değişen danelere sahiptir (Singh, 1997). Dane boyutu değişiklik gösterebilir. Dane dolumu hava durumuna bağlıdır. Bitkinin ışıktan faydalanma ve havanın nem miktarına bağlı olarak hava durumu dane dolumu üzerine etkilidir (Pundir ve ark., 1992). Bulutlu ve nemli günlerde az tozlanma olur ve boş baklalar oluşur (Purseglove, 1968). Genel olarak, birincil dallar %54, ikincil dallar %27 ve ana gövde %19 oranında dane verimi üzerine etki eder. Nohutta danelerin tanımlanan 3 şekli vardır; Bunlar; koçbaşı (angüler-köşeli ve gagalı), kuşbaşı ve bezelyemsi (yuvarlağa yakın) şekillerindedir. Dane kabuk yüzeyi buruşuk, düz veya amorf şeklinde olabilir. Yüz dane ağırlığı ortalama 8 gr ile 70 gram arasında değişebilmektedir (Singh ve ark., 1991). Dane rengi, nohut karakterlerini ayırt etmede önemlidir; 21 farklı renk ve tonları tanımlanmıştır (Pundir ve ark., 1988)

Çiçeklenme alttan üste doğru olur. Çiçekler genellikle iki gün açık kalır fakat geceleri kapalıdır. Bir bitkideki çiçeklenme bir aydan daha fazla devam eder. Tozlanma, çiçeğin tam olarak açılmasından 12-24 saat önce olur (Sepetoğlu, 1996). Nohutta çiçek tomurcuklarının gelişimiyle filamentler uzar ve başcık (anterler) yeterince büyüyünce dişi organa polenleri bırakır. Başcık ve dişi organ genellikle kayıkçık içerisinde kalır. Tozlanma, kleistogamik olan tomurcukların açılmasından önce gerçekleşir. Nohut, kendine döllenendir ve diploid ($2n=2x=16$)'tir (Van der Maesen, 1987; Ahmad, 2000; Banerjee ve ark., 2001). Yabancı döllenme de tespit edilmiştir. Fakat araştırmaların çoğu nohutun %100 kendine döllenene olduğunu göstermektedir (Auckland ve Van der Maesen, 1980; Singh ve İbrahim, 1990).

2.3. Moleküler Markörler

Protein ya da DNA'da bulunan polimorfizme dayanan "moleküler markörler" in geliştirilmesi; taksonomi, filogeni, ekoloji, genetik ve bitki ıslah araştırmalarını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır.

Genellikle bir moleküler markörde; yüksek derecede polimorfik davranış, kodominant kalıtım, genomda sıkça bulunma, genomda homojen dağılım, seçici nötr davranış (pleiotropik etkisi yok), kolay ulaşım (satın alma veya hızlı işlemler sonucunda), kolay ve hızlı değerlendirme (otomasyona uygun işlemler), yüksek tekrarlanabilirlik, laboratuvarlar arası kolay veri alışverişi özelliklerinin olması istenir.

Bu özelliklerin hepsi bir moleküler markörde bulunmamaktadır. Ancak çalışmanın amacına en uygun olanı seçerken yukarıdaki özelliklerden en azından bir kaçının bir arada bulunması istenir (Tanksley, 1993; Weising ve ark., 1995). En fazla istenen markörler, stres koşullarına dayanıklılık genleri ile bağlantısı bulunan, çok değişik genotiplerde ifade edilen ve fonksiyonel olanlardır (Kelly, 1995). Genetik markörler; morfolojik markörler, protein markörleri ve DNA markörleri olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Çalışmamızda DNA markörleri kullanılması sebebiyle aşağıda bu markör tipleri ile ilgili genel bilgi verilmiştir.

2.3.1. DNA markörleri

DNA markörleri farklı genotiplere ait DNA diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markörlerdir. Nükleik asit temeline dayalı genetik markörlerin genom analizlerinde kullanımı ıslahçılar için önemli avantajlar sağlar. Bu markörler kullanılarak genetik varyasyon araştırılabilir. Örneğin birbirine morfolojik olarak çok yakın olan kültür çeşitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir. Türlerin taksonomik tanımlaması yapılıp, filogenetik akrabalıkları bulunabilir (Lowe ve ark., 1996). Bu belirleyiciler, soyağacı analizleri, bağlantı haritalamaları ve seleksiyon

programlarında kullanılabilir. DNA düzeyindeki polimorfizm, klasik morfolojik veya biyokimyasal markörlere göre çok daha fazladır.

Genomun analiz edilebileceği DNA'yı elde etmek için az miktarda bitki dokusu yeterli olmaktadır. Bitkiden alınan herhangi bir kısım DNA izolasyonu için kullanılabilir (Botstein ve ark., 1980). DNA markörleri stabildirler ve ekolojik koşullardan etkilenmezler (Williams ve ark., 1990). Epistatik ve pleiotropik etkilere hassas olmayıp kodominant ya da dominant özellikte olabilirler. Kalıtları basit ilkelere dayanır.

DNA markörleri hibridizasyona dayalı DNA markörleri ve PCR'a dayalı DNA markörleri olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilirler. Şu ana kadar nohut çalışmalarında kullanılmış olan DNA markörleri; RFLP, RAPD, SSR, AFLP ve ISSR'dır (Udupa ve ark., 1993; Banerjee ve ark., 1999; Sudupak ve ark., 2002; Javadi ve Yamaguchi, 2004; Iruela ve ark., 2002; Sudupak ve ark., 2004; Nguyen ve ark., 2004; Shan ve ark., 2005; Sudupak, 2004; Sethy ve ark., 2006).

2.3.1.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı markörler

PCR, Kary Mullis (K. B. Mullis, U.S. patent 4 683 195, Temmuz, 1987) tarafından geliştirilmiş olup, moleküler biyolojinin hızlı bir şekilde gelişmesinde katalizör olmuştur (Steffan ve Atlas, 1991). PCR metodu; genetik yapısı değiştirilen bitki veya mikroorganizmaların tespiti, moleküler klonlama (DNA klonlaması), DNA baz dizilişlerinin belirlenmesi, genetik akrabalık tesbiti ve adli tıp vakalarının aydınlatılması gibi adli tıptan ekolojiye ve DNA diagnostik çalışmalarından temel araştırmalara kadar her alanda uygulanma fırsatı bulmuştur. Yöntem DNA'nın enzimatik *in vitro* çoğaltımına dayanmaktadır. Çok düşük (çoğunlukla nanogram-ng) miktardaki kalıp DNA ile başlanarak bir veya daha fazla sayıda belli DNA parçalarının milyonlarca kopyası elde edilir ve elektroforez işleminden sonra boyama veya otoradyografi aracılığıyla görünür hale getirilir. PCR çok hızlı, basit ve

duyarlıdır. Çok değişik organizmalara çok değişik amaçlarla uygulanması moleküler biyolojide yeni olanaklara imkan sağlamıştır (Weising ve ark., 1995).

Botstein ve ark. (1980)'na göre PCR tekniğinin kullanıma girmesi ile kısa sürede geniş uygulama alanları olan RAPD, SSR, AFLP gibi markör sistemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan PCR'a dayalı RAPD tekniği ile ilgili aşağıda detaylı bilgi verilmiştir.

2.3.1.1.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Altı ila 10 nükleotid uzunluğundaki sentetik başlatıcı (primer) DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Tek primer kullanılır. Ancak, bunlar her iki iplikçikte de 5'→3' yönünde çalışır. Dolayısıyla kullanılan primerin DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye (her bir komplementer iplikçiğe) yapışabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılır. PCR'ın keşfi ile DNA düzeyindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan yeni markör sistemleri geliştirilmiştir. Bu markörlerden biri olan RAPD belirleyicileri, Williams ve ark. (1990) ve Welsh ve McClelland (1990) tarafından geliştirilmiş basit, kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın tesadüfi olarak dağılmış segmentlerle amplifikasyonunu hedeflemektedir. Amplifikasyon ürünleri agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezde ayrılabilir ve etidyum bromid (UV) ya da gümüş nitrat boyaması ile görüntülenebilmektedir. RAPD belirleyicileri, uygulanmadaki kolaylık, sentetik oligonükleotidlerin çok fazla sayıda bulunması, RFLP'nin tersine düşük miktarda ve düşük kalitede DNA'ya gereksinim duyulması gibi nedenlerden ötürü tercih edilen markörlerdir. RAPD markörleri; genom haritalama ve gen etiketleme, genetik parmakizi belirleme ve çeşit tanımlama, populasyon farklılığı, klon tanımlama, taksonomik ve filogenetik çalışmalar, genetik introgresyon, pedigree ve ebeveyn analizi, bitki büyüme ve gelişmesi, taksonomik kimliğin belirlenmesi, akrabalık derecelerinin belirlenmesi ve karışık genom örneklerinin analizi, bitkinin farklı yaşam evrelerinin araştırılması, yabancı tozlaşma oranlarının tahmini, ve QTL (Quantitative

Trait Loci) analizi gibi çok değişik amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır (Lodhi, 1994).

Bu metot, Mg^{+2} konsantrasyonu ve primer/şablon DNA oranı gibi koşullar açısından çok duyarlıdır. Bu da laboratuvar içi ve dışı tekrarları zorlaştırmaktadır. Düşük duyarlılıkları nedeniyle karřılařtırılmalđ haritalama ve klonlama için çok ender kullanılırlar Dominant kalıtımı ve sınırlı allel sayısı da RAPD'in diğer dezavantajlarıdır. Bir markör, ışlah programında ancak değişik melezlemelerde açılım gösterirse faydalı olmaktadır. Bir RAPD lokusu genellikle bir bantın varlığı/yokluğu şeklinde ifade edilen iki allele sahiptir (Malyshev ve Kartel, 1997) ve haritalama denemelerinde bu durum göz önüne alınmalıdır. Diğer yönden RAPD teknolojisi, araştırıcıya çok geniş sayıdaki lokuslarda DNA dizi tabanlı polimorfizmleri etkin ve hızlı tarama olanağı sağlamıştır. RAPD çoğaltımına uygun kısa primer (genellikle 10-mer) setleri ticari olarak sentezletilebilmektedir. Bir PCR cihazı ve agaroz jel düzeneği dışında herhangi bir özel ekipman gerektirmez. Tekrarlanabilirlikle ilgili zorluklar DNA konsantrasyonundaki varyasyonu ortadan kaldırmak ve çoğaltma sırasında sabit reaksiyon koşulları ve sıcaklık profili kullanmak suretiyle aşılabilir (Rafalski ve Tingey, 1993).

Devos ve Gale (1992), diğer PCR esaslı teknikler gibi RAPD tekniğinin de karakterizasyon ve haritalama çalışmalarında daha az zamana, çalışmaya ve gidere gereksinim duyulması nedeniyle daha çok tercih edildiğini bildirmektedir. Özellikle RAPD yöntemi çok az miktarda DNA'ya gereksinim duymalarından ötürü birçok bitki türünde beklenen düzeyde sonuçlar vermiştir.

Kubota ve ark. (1993), RAPD analizinin *Papaver* cinsi *Oxytona* seksiyonu türleri ve F1 hibritlerini kolay teşhis etmede ve kanun dışı yetiştirilmiş *Papaver* türlerini tanımada kullanıldığını bildirmişlerdir.

Lavi ve ark. (1994), RAPD markörlerinin zaman ve maliyet yönünden olumlu olmasına rağmen, dominant markör olmaları nedeni ile yorumlanmasının zorluğu, kompleks olması ve düşük seviyede tekrarlanabilirliği, hatta bazı durumlarda

tekrarlanan büyük bantların kullanıldığı durumlarda bile varyasyonun genetik ya da değişik mikroorganizma kökenli kontaminasyon veya amplifikasyon sırasında meydana gelen bir sorundan mı kaynaklandığının tespit edilememesinin bu markörlerin olumsuz yönleri olduğunu bildirmişlerdir.

McDonald ve ark. (1994), mısır, pamuk, soya fasulyesi, buğday ve kırmızı üçgülün tanelerinden izole ettikleri DNA'lardan RAPD yöntemiyle DNA fragmanlarını elde ettiklerini ve bu yöntemin yetişmekte olan bitkinin dokusuna gereksinim duyulmadan yapılan, ucuz, basit ve hızlı bir yöntem olduğunu ve diğer türlere de uygulanabileceğini belirtmişlerdir.

Vos ve ark. (1995)'nin bildirdiğine göre RAPD-PCR prensiplerinden yararlanılarak AFLP, SSR gibi birçok moleküler metot ortaya konmuştur. Doldi ve ark. (1997), Orta Avrupa'da yetişen 18 soya genotipinde protein içeriği yüksek genotiplerin seçimi için genetik farklılığı RAPD ve mikrosatelit (SSR) teknikleri kullanarak araştırmışlar. Burada elde edilen sonuçta RAPD ve SSR'ın ikisi birlikte kullanılıncı çok güvenilir sonuçlar alındığını gözlemlemişlerdir.

Menkir ve ark. (1997), kültürü yapılan 190 *Sorghum bicolor* çeşidinde taksonomik ilişkiyi ve genetik farklılığı belirlemek için RAPD markörleri kullanmışlardır. Kültürü yapılan genotipler arasında yüksek oranda varyasyon belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 82 primerden 53 tanesi 220 RAPD bandı oluşturmuştur. Polimorfizm oranı %74 olarak bulunmuştur.

Nohutta genetik çeşitlilikle ilgili Sonnante ve ark. (1997) ve Sant ve ark. (1999) çalışmalar yapmışlardır. Her iki çalışmada da RAPD markörleri düşük genetik çeşitlilik göstermişlerdir. Ahmad (1999), 9 kültür nohutu ile 8 tek yıllık yabani türü ayırt etmek amacıyla 75 primer içerisinde rastgele seçilen 10 RAPD primerinden 8 tanesinin ürettiği 115 bandı kullanmıştır. Elde edilen dendogramda 4 grubun ortaya çıktığı gözlenmiştir. Birinci grupta *C. reticulatum*, *C. echinospermum* ve *C. arietinum*, ikincisinde *C. chorassanicum* ve *C. yamashitae*, üçüncüsünde *C. judaicum*, *C. bijugum* ve *C. pinnatifidum* ve dördüncü grupta da *C. cuneatum* yer

almıştır. Elde edilen sonuçlar, RAPD metoduyla *Cicer* cinsinin filogenetik ilişkilerinin belirlenebileceği ve bu yöntemi kullanarak nohutun geliştirilmesinde çalışılabileceğini göstermiştir.

Banerjee ve ark. (1999), 13 nohut genotipini kullanarak RFLP ve RAPD markörleri ile genetik çeşitlilik analizini etkili bir şekilde yapmışlardır. Banerjee ve ark. (2001), *C. arietinum* ve yabani türlerin (*C. reticulatum* ve *C. echinospermum*) çaprazlamasından elde edilen populasyonu kullanarak nohut genom haritasının hazırlamasında RAPD markörlerinin etkinliğinin gözlenmesini amaçlayan bir çalışma yapmışlardır. Bu yöntemle denenen türler arasındaki genetik mesafe ortaya çıkarılmıştır. Chowdhury ve ark. (2002) ise, kültür nohutu (*C. arietinum*) çeşitleri ve ıslah hatlarında genetik ilişkileri tespit etmek amacıyla 22 RAPD ve 22 ISSR markörünü kullanmışlardır.

Südüpak ve ark. (2002), Türkiye'deki *Cicer* cinsine ait türlerin filogenetik ilişkisini incelemek için 50 RAPD primerinden 7 tanesinin ürettiği 95 bantı kullanmışlardır. Bu bantların 92'si polimorfik sonuç vermiştir. Üretilen dendrogram iki ana kola ayrılmıştır. İlk kol, çok yıllık 4 *Cicer* türünden (*C. montbretii*, *C. insicum*, *C. isauricum*, *C. anatolicum*) ve diğer kol ise kendi içerisinde iki kümeden oluşmuştur. İlk kümede *C. judaicum*, *C. bijugum* ve *C. pinnatifidum*; ikinci kümede ise *C. reticulatum*, *C. echinospermum* ve *C. arietinum* türleri yer almıştır. RAPD tekniğinin *Cicer* cinsinin taksonomisinin oluşturulmasında ve türler arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde etkili olduğunu gözlemlemişlerdir.

Iruela ve ark. (2002), *Cicer* cinsinin 14 türüne ait 75 genotipte filogenetik ilişkilerin tespit edilmesi için moleküler markörler yardımıyla analiz yapmışlardır. Çalışmada *C. arietinum*'u da kapsayan tek yıllık sekiz tür ve çok yıllık altı türü kullanmışlardır. Yirmibir RAPD primeri kullanılarak 234 polimorfik bant elde edilmiştir. Araştırma sonucunda kullanılan türler arasındaki filogenetik ilişkiler ortaya konmuştur. *C. arietinum* içerisinde yabani türlerle karşılaştırınca düşük sevide genetik çeşitliliğin olduğu tespit edilmiştir.

Javadi ve Yamaguchi (2004), çok yıllık 6 tür ve kültür nohutunu kapsayan tek yıllık 5 türün moleküler varyasyonunu incelemek için 66 RAPD primerinden 8 tanesinin ürettiği 87 bandı kullanmışlardır. Üretilen dendogramda iki ana kol oluşmuştur. İlk kolda *Monocicer* bölümünde yer alan tek yıllık 4 *Cicer* türü (*C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. arietinum* ve *C. bijugum*), ikinci kolda ise *Chamaecicer*, *Polycicer* ve *Acanthocicer* bölümlerine ait tek yıllık ve çok yıllık türlerin olduğu görülmüştür. Çalışmayı yapan araştırmacılar, RAPD tekniğinin *Cicer* cinsinin taksonomisinin oluşturulmasında ve türler arasındaki genetik çeşitlilik ve akrabalığın belirlenmesinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *C. arietinum* içerisinde varyasyonun dar olduğunu belirtmişlerdir.

Rao ve ark. (2007) 19 kültür nohut genotipi ve onun yabani atası *C. reticulatum* L.'in 5 genotipi arasındaki genetik ilişkilerin ortaya çıkarılması amacıyla RAPD ve ISSR markörleriyle araştırmalar yapmışlardır. Toplam 29 RAPD ve 6 ISSR markörü kullanılmıştır. Ortalama olarak RAPD yöntemiyle yapılan analizlerde her primerde 6 bant, ISSR markörleriyle olanda ise 11 bant elde edilmiştir. RAPD'de yabani aksesyonlar kültür nohutlarıyla %77.8 oranında polimorfik bantları paylaşmışlardır. Elde edilen dendogramda yabani türler ve kültür formları ayrı gruplarda toplanmışlardır ve her iki grup alt gruplara ayrılmıştır. Yapılan çalışmada *C. arietinum* dar bir genetik varyasyona sahip çıkarken, *C. reticulatum* aksesyonlarının daha geniş varyasyona sahip olduğu, bunun da nohut çalışmalarında kullanılabileceği belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Cicer cinsine ait Türkiye'nin 7 bölgesindeki *Cicer arietinum* aksesyonlarından 36 genotip, Mardin yöresinde yetişen tek yıllık yabani tür olan *Cicer reticulatum* Ladiz. ve Afganistan'da yetişen tek yıllık yabani tür *Cicer yamashitae* Kitam. genotipleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Kültür nohut aksesyonlarının, Türkiye'nin bütün coğrafik bölgelerinden eşit alınmasına özen gösterilmiştir. Ancak Kuzeydoğu Anadolu ve Doğu Karadeniz'e ait örnekler mevcut olmadığından kullanılamamıştır (Şekil 3.1)

Tohumlar Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen-İzmir, Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Adana ve ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas), Halep-Suriye'den temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Cicer* türleri, aksesyon numaraları ve kaynak yerleri

Sıra No	Tür Adı	Aksesyon No	Kaynak Lokasyon
1	<i>Cicer arietinum</i>	TR47618	Amasya
2	<i>Cicer arietinum</i>	TR37097	Çorum
3	<i>Cicer arietinum</i>	TR51382	Kastamonu
4	<i>Cicer arietinum</i>	TR35142	Tokat
5	<i>Cicer arietinum</i>	TR38214	Edirne
6	<i>Cicer arietinum</i>	TR26691	Balıkesir
7	<i>Cicer arietinum</i>	TR43578	Sakarya
8	<i>Cicer arietinum</i>	TR37029	Kocaeli
9	<i>Cicer arietinum</i>	TR53755	Tekirdağ
10	<i>Cicer arietinum</i>	TR47687	Uşak
11	<i>Cicer arietinum</i>	TR47697	Kütahya
12	<i>Cicer arietinum</i>	TR34850	Aydın
13	<i>Cicer arietinum</i>	TR47668	Denizli

14	<i>Cicer arietinum</i>	TR26473	Manisa
15	<i>Cicer arietinum</i>	TR63984	Isparta
16	<i>Cicer arietinum</i>	TR49681	Burdur
17	<i>Cicer arietinum</i>	Bekdemirler-1	Osmaniye
18	<i>Cicer arietinum</i>	TR47390	Gaziantep
19	<i>Cicer arietinum</i>	TR49710	Antalya
20	<i>Cicer arietinum</i>	TR42156	Hatay-Belen
21	<i>Cicer arietinum</i>	İncirli-2	Hatay-Kırıkhan
22	<i>Cicer arietinum</i>	TR42321	Konya
23	<i>Cicer arietinum</i>	TR49863	Karaman
24	<i>Cicer arietinum</i>	TR47585	Ankara
25	<i>Cicer arietinum</i>	TR47598	Kırşehir
26	<i>Cicer arietinum</i>	TR42285	Nevşehir
27	<i>Cicer arietinum</i>	TR47628	Çankırı
28	<i>Cicer arietinum</i>	TR34870	Eskişehir
29	<i>Cicer arietinum</i>	TR42274	Elazığ
30	<i>Cicer arietinum</i>	TR42204	Malatya
31	<i>Cicer arietinum</i>	TR40259	Muş
32	<i>Cicer arietinum</i>	TR35314	Hakkâri
33	<i>Cicer arietinum</i>	TR47462	Adıyaman
34	<i>Cicer arietinum</i>	TR40242	Diyarbakır
35	<i>Cicer arietinum</i>	TR37527	Siirt
36	<i>Cicer arietinum</i>	TR58081	Mardin
37	<i>Cicer reticulatum</i>	TR39221	Mardin
38	<i>Cicer yamashitae</i>	ILWC3	Afganistan

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan kültür nohutu tohumlarının alındığı illeri gösteren Türkiye haritası



3.2. Metot

3.2.1. DNA izolasyonunda kullanılan bitki materyalinin temini

Nohut tohumları Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne ait tam kontrollü serada saksılarda çimlendirilmiştir. Bitkiler belirli bir boya ulaştıktan sonra (15-20 cm) DNA izolasyonu için her bir nohut genotipinden 200 mg bitki numunesi genç yapraklardan alınmıştır (Şekil 3.2). Alınan numuneler sıvı azot ile muamele edilerek muhafaza edilmek üzere -80 °C derin dondurucuya konulmuştur. Burada bekletilen bitki yapraklarından 2XCTAB yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan materyale ait örnekler

3.2.2. DNA izolasyonu

Bitki materyalinden genomik DNA, 2XCTAB-DNA izolasyon metodunun modifiye edilmesiyle ekstrakte edilmiştir. Her bir DNA izolasyonu için 0.20 gr taze nohut yaprağı kullanılmıştır. Önceden sıvı N₂ ile dondurulup -80 °C'de bekletilen nohut yaprakları steril havan içerisine yerleştirilmiştir. Üzerine sıvı N₂ eklenerek bir müddet beklendikten sonra yapraklar hızlı ve etkin bir şekilde steril topuz ile ezilerek öğütülmüştür. Öğütme sonucunda un haline getirilen bitki örnekleri steril 1.5 ml'lik

eppendorf tüpler içine alınmıştır. Üzerlerine 750 µl 2XCTAB / β-mercaptoethanol çözeltisinden ilave edilmiştir. Blok ısıtıcıda, 65 °C'de her birkaç dakikada bir karıştırılarak, 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra örneklerin üzerine 750 µl kloroform: izoamiloalkol (24:1) ilave edilmiştir. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 7000 devir/dakika (rpm) olarak 5 dk süreyle santrifüje tabii tutulmuştur. Santrifüjden sonra mikro-pipet yardımıyla dikkatlice üst faz çekilerek temiz bir eppendorf tüpe aktarılmıştır. İlk tüplere 300 µl kloroform:izoamiloalkol (24:1) ilave edilerek 15000 devir/dakika'da 5 dk süreyle tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra tüplerin üst kısmında oluşan sıvı faz daha önceden alınan sıvı faza eklenmiştir. Yeni santrifüj tüplerindeki örneklerin üzerlerine alınan üst fazın yaklaşık 3/5'i katı miktarda izoamilalkol ilave edilmiştir (Genellikle 600 µl için 360 µl izoamiloalkol ilave edilir). Örnekler sarsılmadan dikkatlice her iki faz birbirine karıştırılmıştır. Bu aşamada tel tel iplikçik halinde ve beyaz renkli bir kütle toplanması gözlenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 15000 devir/dakika'da 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerin üst kısmındaki sıvı faz pellet düşürülmeden dikkatlice dökülmüştür. Diplerinde DNA pelletleri bulunan tüplere 1 ml %70'lik etanol ilave edilmiştir. Etanol ilave edilen örnekler 5 dk süreyle 15000 devir/dakika'da santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından etanol ile yıkanmış peletlerin düşmemesine dikkat edilerek tüp içindeki etanol tamamen dökülmüştür. Kurumaya bırakılan peletlerin üzerine daha sonra 100 µl TE (Tris- EDTA Buffer, pH 8.0) ilave edilmiş ve DNA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen DNA örnekleri RAPD-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.3. DNA miktarı ve kalitesinin spektral yöntemle tayini

DNA örnekleri 5 ml kuvarz küvetler kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarında Eppendorf marka (Biophotometer) spektrofotometrede çift tekrarlı okunmuştur. DNA miktarları;

DNA ($\mu\text{g/ml}$) = 260 nm'deki OD (Absorbans değeri) x sulandırma oranı x 50 formülüne göre hesaplanmıştır. DNA saflığı A_{260}/A_{280} oranı hesaplanarak tespit edilmiştir.

Çalışmada 100 μl steril TE tampon çözeltisinde çözülen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometre ile 260 ve 280 nm dalga boylarında (OD_{260}/OD_{280}) okunmuş ve konsantrasyonları steril saf su ile 20 ng/ μl olacak şekilde eşitlenmiştir. Bu örneklerden eşit miktarlarda %1'lik agaroz jelinde (1XTBE tamponunda) yürütülerek konsantrasyonlarının eşitliği gözle de gözlenmiş ve DNA'ların parçalanmamış olduğu belirlenmiştir.

3.2.4. PCR uygulamaları

3.2.4.1. RAPD-PCR amplifikasyon koşulları

Çalışılan standart PCR karışımı 25 μl olacak şekilde hazırlanmıştır. (Çizelge 3.2.)

Çizelge 3.2. PCR karışımı bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon karışımı	25 μl Reaksiyon Ortamında Bulunan Miktar
DNA miktarı (20 ng/ μl)	5.0 μl
10x <i>Taq DNA polimeraz</i> tampon çözeltisi (Bioron)	2.5 μl
25 mM MgCl_2 (Bioron)	2.7 μl
Her birinden 25 mM olacak şekilde dNTPler (Lavron)	0.4 μl
Primer (50 pmol/ μl)	0.5 μl
5 ünite/ μl <i>Taq DNA polimeraz</i> (Bioron)	0.3 μl
ddH ₂ O (PCR hassasiyetinde su)	13.6 μl

3.2.4.2. PCR koşulları

PCR döngüsü ve süresinin optimize edilmesi amacı ile Södüpak ve ark. (2002)'nin kullandığı aşağıdaki döngü parametreleri değiştirilerek kullanılmıştır;

- 94 °C ----5 dk ön ısıtma
 - 94 °C ----1 dk
 - 32 °C ----1 dk
 - 72 °C -----2 dk
- x 46 döngü
- 72 °C ----10 dk
 - 4 °C ----bekleme sıcaklığı

Buna göre ön ısıtma esnasında PCR bloğuna yerleştirilen örneklerde; 94 °C --- 1 dk, 32 °C ---1 dk ve 72 °C ---2 dk şeklinde 46 döngüyle işlem tamamlanmıştır. Kırkaltı döngü sonunda 72 °C ---10 dk bekletilerek amplifikasyon ürünlerinin sentezini tamamlaması sağlanmıştır. Cihazdaki işlemin bitiminden sonra bekleme sıcaklığı olarak da 4 °C alınmıştır. Denenen bu parametreler sonucunda uygun amplifikasyon ürünleri elde edilmiş olup, daha sonraki çalışmalarda bu koşullar kullanılmıştır.

3.2.4.3. Primer seçimi ve konsantrasyonu

Oligonükleotidler, primer sentezi yapan ticari kuruluşlardan temin edilebilmektedir. Tasarım yapılırken oligo dizinindeki GC oranının belli bir seviyenin altına düşmemesine dikkat edilir. Sonucu olumsuz etkileyici, istenmeyen oluşumları en aza indirmek için önem verilmesi gereken bazı noktalar vardır. Bunlar; primerlerin polipürin, polipirimidin ya da tekrarlı bölgeler içermemesi, primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine yada primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olmamasıdır.

Bu çalışmada hedeflenen PCR amplifikasyon bölgeleri RAPD'ler için genomda yerleri bilinmeyen rastgele dizilerden oluşmaktadır. Çalışmamızda denenen

çok sayıda primerden olumlu sonuç veren 28 adet RAPD primeri (Çizelge 3.3) kullanılmıştır. Bu primerlerden her bir reaksiyonda toplam 50 pmol/μl kullanılmıştır.

Primerlerin T_A (*Annealing temperature*=yapışma sıcaklığı) sıcaklıklarının optimizasyonu Eppendorf Mastercycle Gradient marka PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Burada T_m sıcaklığının -5 ve +5 °C aralıkları denenerek en ideal yapışma sıcaklıkları tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. RAPD analizlerinde kullanılan primerler, baz dizilişleri, GC (%) oranları ve T_A ısıları (°C)

	Primer İsmi	Primer Dizini (5'→3')	%GC Oranları	T_A (°C)
1	CRAPD1	5'-GAAACGGGTG -3'	60	32
2	CRAPD2	5'-GTGACGTAGG -3'	60	32
3	CRAPD4	5'-CAAACGTGGG -3'	60	31
4	CRAPD6	5'-CCGACAAACC -3'	60	31
5	CRAPD7	5'-GTGCGAGCAA -3'	60	32
6	CRAPD8	5'-GGGAACGTGT -3'	60	32
7	CRAPD9	5'-CCTGGGTTC -3'	70	33
8	CRAPD10	5'-CCTGGGCCA -3'	70	33
9	CRAPD11	5'-CCCGCCTTCA -3'	70	34
10	CRAPD12	5'-CCGGCCTTAG -3'	70	34
11	CRAPD14	5'-CCGGGGAAAA -3'	60	32
12	CRAPD15	5'-TTACCCCGGC -3'	70	33
13	CRAPD16	5'-AAGCCTCGTC -3'	60	31
14	CRAPD17	5'-GAAACGGGTG -3'	60	31
15	CRAPD18	5'-CAGGCCCTTC -3'	70	33
16	CRAPD20	5'-TTCCGAACCC -3'	60	31
17	RAPDL2	5'-GTTTCGCTCC -3'	60	31
18	RAPDL3	5'-GTAGACCCGT -3'	60	31
19	RAPDL4	5'-AAGAGCCCGT -3'	60	32
20	RAPDL5	5'-AACGCGCAAC -3'	60	33
21	RAPDB2	5'-TGCGCCCTTC -3'	70	34
22	RAPDB3	5'-GATGACCGCC -3'	70	34
23	RAPDB4	5'-CTCACCGTCC -3'	70	34
24	RAPDB5	5'-GACGGATCAG -3'	60	32
25	RAPDB6	5'-CCGATATCCC -3'	60	32
26	RAPDB7	5'-TTGGTACCCC -3'	60	32
27	RAPDB8	5'-ACGGTACCCC -3'	60	32
28	RAPDB18	5'-GAGTCAGCAG -3'	60	32

3.2.4.4. Agaroz jel elektroforez

DNA ekstraksiyonu sonucu izole edilen genomik DNA'lar için %1 ve RAPD bantlarını ayırmak içinse %2'lik agaroz jeller hazırlanmıştır. Genomik DNA yada RAPD-PCR amplifikasyonu sonrasında elde edilen DNA parçaları, agaroz jel elektroforezde 3-5 saat süre ile 60 V'da yürütülmüştür. Çalışmada yürütücü tampon çözeltisi olarak ise TBE tamponu kullanılmıştır.

3.2.4.5. %2'lik agaroz jelin hazırlanması ve dökülmesi

PCR işlemlerinin bitmesinden sonra RAPD yöntemleriyle çoğaltılan DNA örneklerinin elektroforetik ayırımı için agaroz jel (Serva Inc.) kullanılmıştır. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Jel hazırlanırken agaroz, erlende 1X yoğunluktaki TBE tampon çözeltisi içinde yüksek sıcaklıkta (300–350 °C) bir mikrodalga fırın içinde 2–3 dk kaynatılarak eritilmiştir. Kaynama esnasında yaklaşık 10–20 sn'de bir çözeltiyi hafifçe sallamak suretiyle şeffaf bir görünüm kazanıncaya kadar karıştırılmıştır

Soğumaya bırakılan jel beklenirken, jelin döküleceği tepsiye DNA örneklerinin yükleneceği yuvaların oluşması için çok dişli (40 dişli) bir tarak yerleştirilmiştir. Daha sonra soğumakta olan jelin içine oluşan bantların görüntüleme cihazında UV ışığında görüntülenebilmeleri için DNA'ya bağlanma özelliğine sahip olan etidyum bromitten yaklaşık 10 µg/ml olacak şekilde jele ilave edilmiştir. Soğutulan eriyik jel, kalıbında ve tarakların bulunduğu bölgelerde hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek tepsiye dökülmüştür. Jelin donmasının ardından taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldıktan sonra jel kaseti, jel ile birlikte elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Daha sonra hazırlanan 1XTBE elektrolit çözeltisinden jelin üst kısmını kapatacak kadar elektroforez tankına dökülmüştür.

3.2.4.6. PCR ürünlerinin jelle yüklenmesi

PCR cihazı ile çoğaltılan DNA örneklerinin jelle yürütülebilmesi, takibi ve elektrolit çözeltisi ile karışmasının önlenmesi amacıyla yükleme boyası (*Loading Dye*) adı verilen yükleme çözeltisi hazırlanmıştır. Yükleme çözeltisi hazırlamada %25'lik Bromofenol mavisi, %25'lik Ksilen siyanol ve %30'luk gliserol kullanılmıştır. Elektroforez uygulanacak olan içinde 25 µl amplifikasyon ürünü bulunan her bir PCR tüpüne 4µl 6X yükleme boyası çözeltisi konularak mikro pipet ucu yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra, her tüpten 15 µl karışım alınarak jelle hazır bulunan kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme yapılırken, her bir tüpteki PCR ürününün birbirine karışmamasına dikkat edilmiştir.

3.2.4.7. PCR ürünlerinin jelle yürütülmesi

Jel kuyucuklarına yüklenen PCR ürünleri elektrik akımı olan ortamda birbirlerinden ayrılması için yatay elektroforez cihazında 60 voltta 3-5 saat ara sıra kontrol edilip görüntüleri alınarak yürütülmüştür. Kontrolün sebebi jelin bitiş noktasına kadar PCR ürünlerinin yürümesini engellemektir.

3.2.4.8. Görüntüleme ve RAPD bantlarının elde edilmesi

Elektroforez düzeneğinde PCR ürünlerinin elektrik akımı ile agaroz jel üzerinde yürütülmesiyle oluşan RAPD bantlarına ilişkin fotoğraflar, Vilbert-Lourmat marka jel dokümantasyon sisteminde transilüminatör yardımı ile 254 nm dalga boyundaki UV ışığı altında elde edilmiştir ve veriler elektronik ortamda saklanmıştır.

3.2.4.9. İstatistiksel analizler

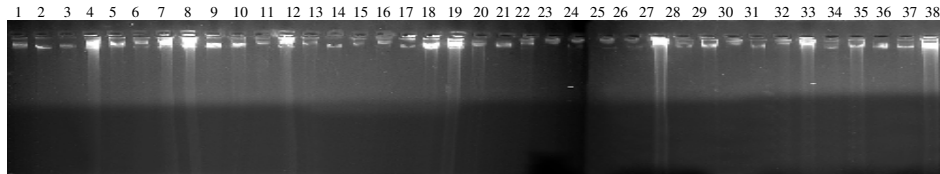
RAPD uygulamalarından tekrarlı olarak elde edilen bantlar her bir jelde, 1 ve 0 olarak kayıt edilmiş olup, '1' bantın varlığını '0' ise bantın yokluğunu göstermektedir. Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) olan NTSYS-pc 2.0 genetik analiz programında bireyler arasındaki genotipik yakınlığı gösteren dendogram ve Temel Koordinatlar Analizi olarak da bilinen '*Principal Coordinate Analysis*' (PCoA) sonuçları elde edilmiştir. Ayrıca aynı program yardımıyla farklı katsayıların kullanılması ile (Jaccard katsayısına karşı Simple Matching katsayısı) elde edilen genetik ilişkiler arasında farklılık olup olmadığı da Mantel testi ile belirlenmiştir (Rohlf, 2002).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. DNA izolasyonu

Çalışmada kullanılan bitki materyalinin taze ve genç yapraklarından alınan örneklerden 2XCTAB yöntemi kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Laboratuvarımızda daha önce yabani ve kültür nohutları ile yapılan çalışmada (Saraçoğlu, 2007) 2XCTAB yönteminin nohutların DNA izolasyonunda başarılı sonuç verdiği bildirilmiştir.

C. arietinum'un Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerine ait 36 genotipi ve kültür nohutunun en yakın akrabası olan *C. reticulatum* ile dış grup görevi gören *C. yamashitae* yabani türlerinin 2 aksesyonuna ait, toplamda 38 bireyden başarılı olarak DNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek DNA'nın hassas yöntem olan RAPD için uygun olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.1'de çalışmamızda kullandığımız örneklerin DNA görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan örneklerin DNA jel görüntüleri

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda azami absorpsiyon özelliği göstermelerinden dolayı 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A_{260}) oldukça saf elde edilen nükleik asitlerin miktar tayininde kullanılmıştır.

A_{260} 'daki değerler DNA ve RNA'yı birbirinden ayırt etmeye yetmez. Ancak izolasyon aşamasında RNaz uygulanarak toplam nükleik asitler içinde yer alan

RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. Örneklerle karışan protein miktarının ise belli sınırlarda tutulması, örneklerin saflaştırma sonrasında kullanılacakları hassas uygulamalarda (örneğin; restriksiyon enzim kesimlerinde) sorun yaşanmamasını sağlamaktadır. Bu nedenle 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. A_{280} değeri ortamda bulunan protein moleküllerinin yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir. Saflaştırılmış DNA'da A_{260}/A_{280} oranı ideal olarak 1.8-2.0 civarında olmalıdır. Bununla birlikte saflaştırılan DNA'nın A_{260}/A_{280} oranı 1.2 seviyesine düşene kadar çeşitli uygulamalarda sorunsuzca kullanılabilir.

Çalışmamızda Eppendorf marka biyofotometre ile elde edilen A_{260} , A_{280} ve A_{260}/A_{280} ve DNA konsantrasyon değerleri çizelge 4.1'de verilmiştir. Buna göre, TR42274 aksesyon numarasına sahip *Cicer arietinum* aksesyonu 1.82'lik değerle en yüksek A_{260}/A_{280} oranına sahip olmuştur. Örneklerden sadece 1 tanesi 1.80 değerinin üzerinde, 1.50 ve 1.80 arasında 15 örnek, 1.50 değerinin altında 22 örnek tespit edilmiştir. TR43578 ve TR35314 aksesyon numaralı *C. arietinum* örnekleri 1.25'lik değerlerle en düşük orana sahip olmuştur. Tüm örneklerin kullanıldığı PCR uygulamalarında DNA saflığı veya konsantrasyonu ile ilgili herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan bitkilerin türleri, aksesyon numaraları ve DNA saflık değerleri

Sıra No	Tür Adı	Aksesyon No	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	DNA Kons.
1	<i>Cicer arietinum</i>	TR42274	0.180	0.102	1.75	350.4
2	<i>Cicer arietinum</i>	TR37097	0.185	0.118	1.57	462.8
3	<i>Cicer arietinum</i>	TR51382	0.457	0.312	1.47	1143.6
4	<i>Cicer arietinum</i>	TR35142	0.283	0.194	1.46	706.3
5	<i>Cicer arietinum</i>	TR38214	0.440	0.331	1.33	1101.3
6	<i>Cicer arietinum</i>	TR26691	0.551	0.438	1.32	1378.1
7	<i>Cicer arietinum</i>	TR43578	0.444	0.291	1.25	1110.6
8	<i>Cicer arietinum</i>	TR37029	1.033	0.658	1.57	2583.1
9	<i>Cicer arietinum</i>	TR53755	0.338	0.210	1.61	845.5
10	<i>Cicer arietinum</i>	TR47687	0.285	0.190	1.50	712.1
11	<i>Cicer arietinum</i>	TR47697	0.625	0.505	1.31	1562.3
12	<i>Cicer arietinum</i>	TR34850	0.288	0.182	1.58	719.7
13	<i>Cicer arietinum</i>	TR47668	0.352	0.196	1.29	630.7
14	<i>Cicer arietinum</i>	TR26473	0.675	0.415	1.63	1688
15	<i>Cicer arietinum</i>	TR63984	1.348	1.058	1.32	3270.8
16	<i>Cicer arietinum</i>	TR49681	0.491	0.394	1.34	1228.5
17	<i>Cicer arietinum</i>	TR-287	0.714	0.476	1.50	1785.6
18	<i>Cicer arietinum</i>	TR47390	0.090	0.054	1.65	392.7
19	<i>Cicer arietinum</i>	TR49710	0.286	0.206	1.39	716.2
20	<i>Cicer arietinum</i>	TR42156	0.529	0.402	1.34	1323.4
21	<i>Cicer arietinum</i>	TR42156	0.605	0.396	1.53	1511.4
22	<i>Cicer arietinum</i>	TR42321	0.899	0.770	1.17	2246.5
23	<i>Cicer arietinum</i>	TR49863	0.299	0.229	1.30	747.6
24	<i>Cicer arietinum</i>	TR47585	0.447	0.320	1.40	1118
25	<i>Cicer arietinum</i>	TR47598	0.219	0.157	1.37	532.2
26	<i>Cicer arietinum</i>	TR42285	0.944	0.678	1.39	2359
27	<i>Cicer arietinum</i>	TR47628	1.177	0.670	1.76	2942.1
28	<i>Cicer arietinum</i>	TR34870	0.352	0.239	1.47	879.1
29	<i>Cicer arietinum</i>	TR42274	0.250	0.138	1.82	410.2
30	<i>Cicer arietinum</i>	TR42204	0.930	0.802	1.36	2326.2
31	<i>Cicer arietinum</i>	TR40259	0.241	0.153	1.58	603.9
32	<i>Cicer arietinum</i>	TR35314	0.244	0.160	1.25	609.4
33	<i>Cicer arietinum</i>	TR47462	0.437	0.339	1.35	1093.1
34	<i>Cicer arietinum</i>	TR40242	0.155	0.086	1.80	256
35	<i>Cicer arietinum</i>	TR37527	0.334	0.210	1.59	835.5
36	<i>Cicer arietinum</i>	TR58081	1.427	0.837	1.70	3568.2
37	<i>Cicer reticulatum</i>	TR39221	0.330	0.214	1.54	857
38	<i>Cicer yamashitae</i>	ILWC3	0.67	0.52	1.31	590

4.2. PCR koşulları ve reaksiyonlar

Uygulanan PCR Rao ve ark., (2007)'nın bildirdiği koşullara göre değiştirilerek optimize edilmiştir. İnce çeperli 0.2 ml'lik PCR tüplerine DNA izolasyonu sonucunda elde edilen her biri 20 ng/μl olacak şekilde seyreltilen DNA örneklerinden 5 μl ilave edilmiştir. PCR reaksiyonunda kullanılan moleküler hassasiyette kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir. RAPD uygulamalarının hassas yöntemler olmaları ve özellikle RAPD'in kullanılan kimyasal, DNA ve enzim ile primer içeriklerinden son derece etkilenen bir markör olması dolayısıyla tüm PCR uygulamaları aynı kimyasalların eşit oranlarda kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Uygulamalarda her zaman aynı PCR cihazı kullanılmıştır. Sadece amplifikasyon sıcaklık ve süreleri kullanılan primerlerin baz içeriğine bağlı olarak her PCR için ayrı ayrı optimize edilmiştir.

4.3. RAPD analizleri

Çalışmada denenen 10 merli 40 RAPD primerinden 28 adedi *Cicer* genotiplerinde skorlanabilir tutarlı bant üretmiştir. Çalışmada kullanılan 28 RAPD primeri 38 örnekte toplam 330 bant üretimini gerçekleştirmiştir (Çizelge 4.2). Üretilen bantların polimorfizm oranları yüksek olup, yaklaşık %93.3'tür. *CRAPD1* primeri 24 bantla en fazla bant üreten primer olurken, *CRAPD14* primeri 1 bantla en az bant üreten primer olmuştur. *RAPDB2* primeri ise 7 adet ile en fazla monomorfik bant üretmiştir.

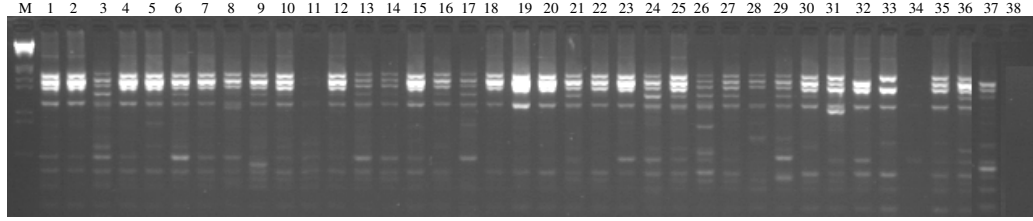
Çizelge 4.2. RAPD amplifikasyonları sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları.

	Primer İsmi	Toplam Bant Sayısı	Tüm Aksezyonlar		<i>C. yamashitae</i> Hariç		<i>C. yamashitae</i> ve <i>C. reticulatum</i> Hariç	
			Polimorfik B.S.*	P. O. § (%)	Polimorfik B.S.*	P. O. § (%)	Polimorfik B.S.*	P. O. § (%)
1	<i>CRAPD1</i>	24	24	100	19	79.1	18	75
2	<i>CRAPD2</i>	10	10	100	7	70	7	70
3	<i>CRAPD4</i>	17	15	88.2	13	76.4	11	64.7
4	<i>CRAPD6</i>	12	12	100	12	100	12	100
5	<i>CRAPD7</i>	12	8	75	5	41.6	4	33.3
6	<i>CRAPD8</i>	7	7	100	3	42.8	3	42.8
7	<i>CRAPD9</i>	20	20	100	18	90	17	85
8	<i>CRAPD10</i>	10	10	100	10	100	10	100
9	<i>CRAPD11</i>	18	18	100	17	94.4	17	94.4
10	<i>CRAPD12</i>	5	5	100	4	80	4	80
11	<i>CRAPD14</i>	1	1	100	0	0	0	0
12	<i>CRAPD15</i>	2	1	50	1	50	1	50
13	<i>CRAPD16</i>	5	5	100	5	100	5	100
14	<i>CRAPD17</i>	8	8	100	7	87.5	6	75
15	<i>CRAPD18</i>	10	5	50	4	40	4	40
16	<i>CRAPD20</i>	7	7	100	4	57.1	4	57.1
17	<i>RAPDL2</i>	6	6	100	6	100	6	100
18	<i>RAPDL3</i>	6	5	83.3	5	83.3	5	83.3
19	<i>RAPDL4</i>	12	11	91.6	7	58.3	5	41.6
20	<i>RAPDL5</i>	13	13	100	13	100	12	92.3
21	<i>RAPDB2</i>	14	7	50	5	35.7	5	35.7
22	<i>RAPDB3</i>	11	11	100	6	54.5	6	54.5
23	<i>RAPDB4</i>	14	12	85.7	7	50	6	42.8
24	<i>RAPDB5</i>	20	19	95	19	95	19	95
25	<i>RAPDB6</i>	17	16	94.1	11	64.7	10	58.8
26	<i>RAPDB7</i>	14	14	100	14	100	12	85.7
27	<i>RAPDB8</i>	17	17	100	17	100	16	94.1
28	<i>RAPDB18</i>	18	18	100	18	100	14	77.7
	<i>Toplam</i>	330	308	93.3	257	77.8	239	74.2

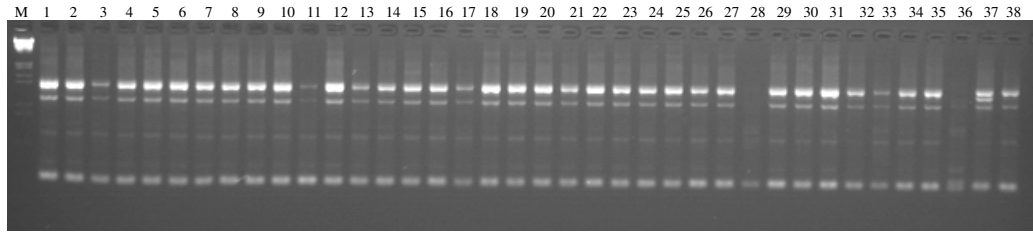
*: Polimorfik Bant Sayısı

§: Polimorfizm Oranı

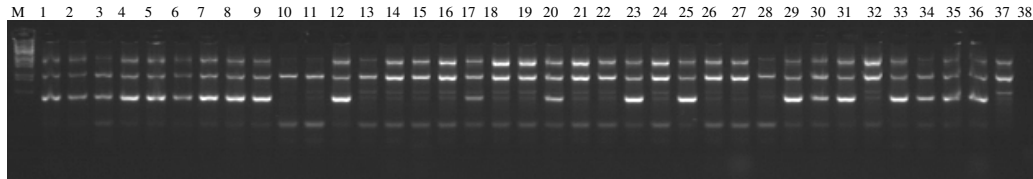
Aşağıda, çalışmada kullanılan RAPD primerlerinden elde edilen bant görüntüleriyle ilgili bazı örnekler verilmiştir.



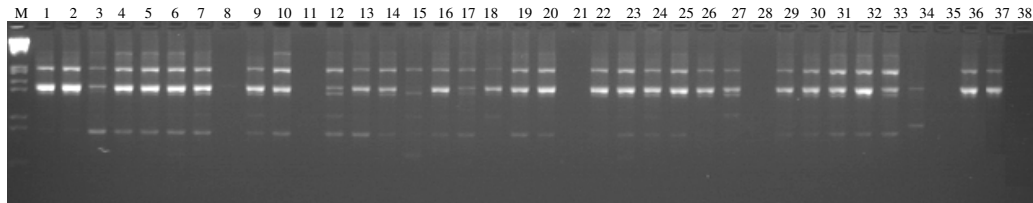
Şekil 4.2. *CRAPD1* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



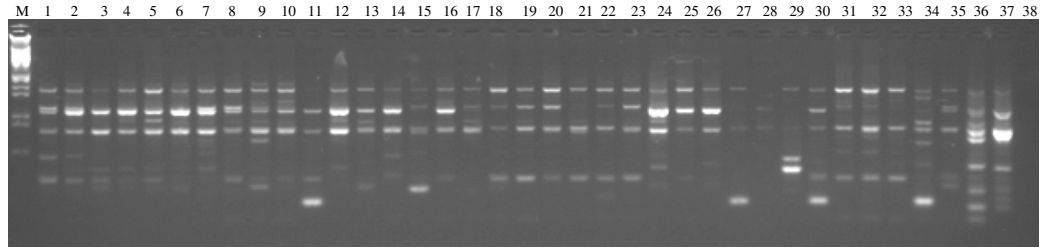
Şekil 4.3. *CRAPD7* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



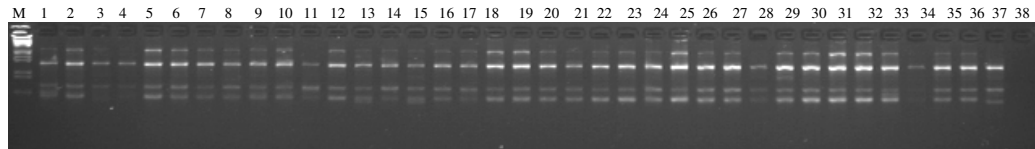
Şekil 4.4. *CRAPD8* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



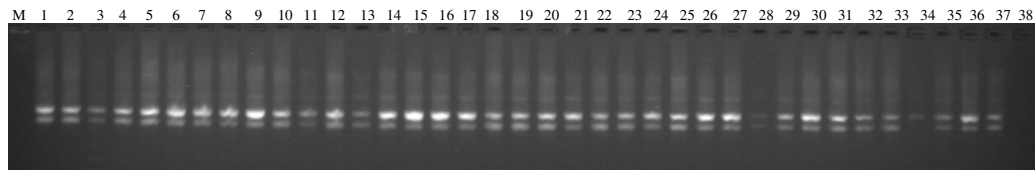
Şekil 4.5. *CRAPD10* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



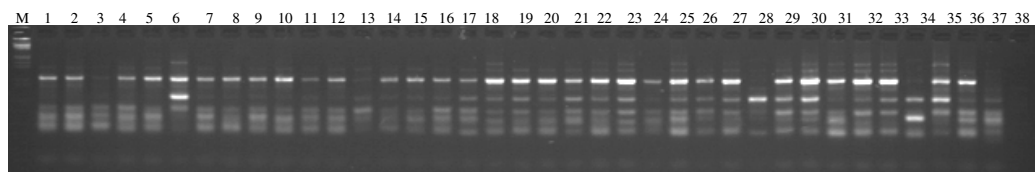
Şekil 4.6. *CRAPD11* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



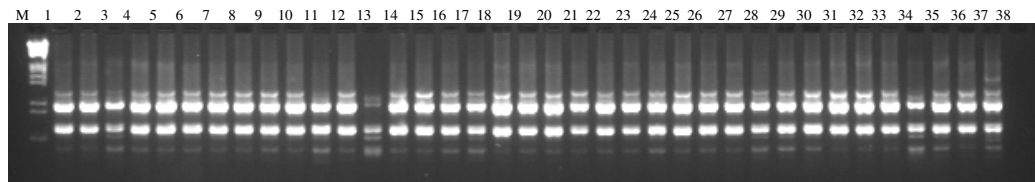
Şekil 4.7. *CRAPD20* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



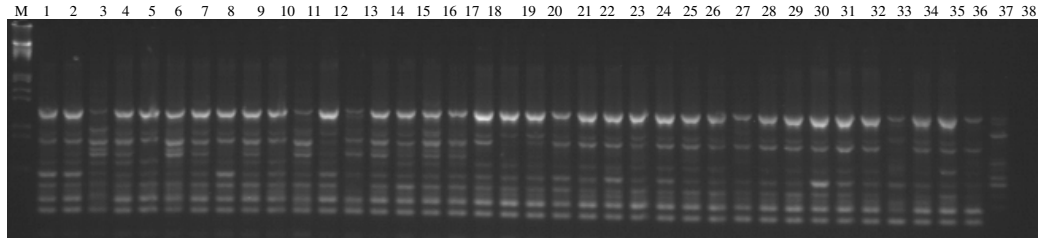
Şekil 4.8. *RAPDL3* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



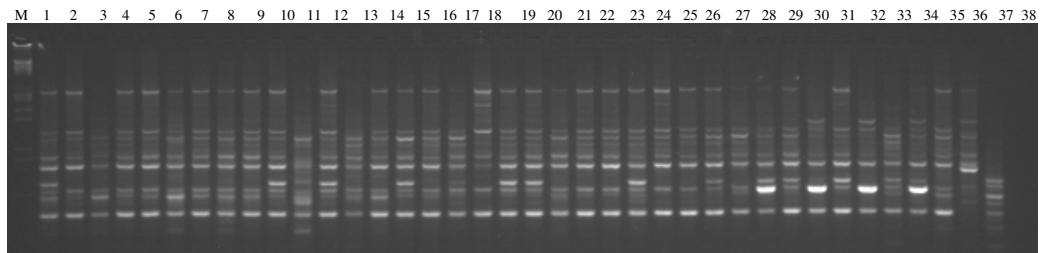
Şekil 4.9. *RAPDL4* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



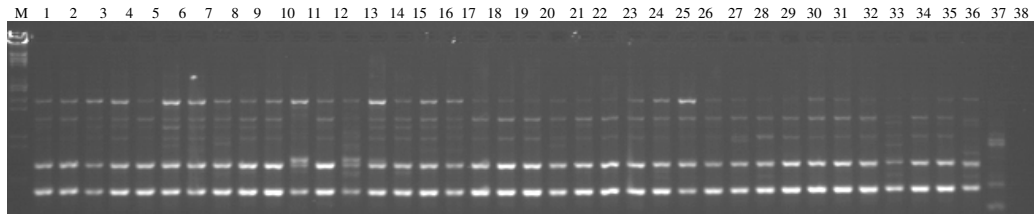
Şekil 4.10. *RAPDB2* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



Şekil 4.11. *RAPDB3* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



Şekil 4.12. *RAPDB5* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar



Şekil 4.13. *RAPDB6* primerinin *Cicer* aksesyonlarında oluşturduğu bantlar

4.4. RAPD verilerinin kümeleme analizi

Skorlanan bantlardan NTYSC-pc 2.0 istatistik programı ile genetik benzerlik ve uzaklık matrisi oluşturularak kümeleme analizi ile genetik ilişki dendogramı elde edilmiştir (Şekil 4.14). Jaccard benzerlik katsayısı ile oluşturulan dendograma göre *C. arietinum* aksesyonlarının kendi aralarında ve diğer iki yabancı tür arasında benzerlik 0.37 ile 0.93 arasında değişmiştir. Dendograma göre *Cicer* türlerinde genel olarak iki ana kol oluşmuştur. Bunlardan ilki tek bir genotiple temsil edilen ve çalışmada dış grup olarak kullanılan *C. yamashitae* örneğinin oluşturmuş olduğu koldur. Beklendiği üzere *C. yamashitae* kümeleme analizinde diğer tüm örneklerle uzak bir akrabalık sergilemiştir. Bu örneğin benzerlik katsayısı 0.37 olmuştur. Bu beklenen sonuç, *C. yamashitae* aksesyonunun *C. reticulatum* ve diğer tüm *C. arietinum* örneklerinden uzakta yer alması, gerek daha önce grubumuzca gerçekleştirilmiş *Cicer* cinsine ait filogenetik çalışmalarla (Saracoğlu, 2007), gerekse literatürdeki benzer moleküler markör teknikleriyle yapılmış olan çalışmalarla (Shan ve ark. 2005; Sethy ve ark., 2006) uyumludur. İkinci kol ise iki ana dala ayrılmıştır. Bu gruplardan birinde *C. reticulatum* yer alırken diğer grupta kültür nohutu, *C. arietinum* aksesyonları bulunmuştur. Çalışmada yine dış grup olarak kullanılmış olan, yakın akraba tür, *C. reticulatum* örneği *C. arietinum* genotiplerine olan yaklaşık 0.58 benzerlik katsayısı ile (Şekil 4.14) beklediği üzere kültür formlarının tamamının dışında, ancak *C. yamashitae* örneğine kıyasla çok daha yakın bir genetik mesafede yer almıştır. Bu haliyle literatürdeki benzer çalışmalar ile tamamen uyum içindedir (Saracoğlu, 2007; Sethy ve ark., 2006; Shan ve ark., 2005; Sudupak ve ark., 2004; Sudupak, 2004; Sudupak ve ark., 2002).

Çalışmamızda Türkiye’de yetiştirilen *C. arietinum*’un 36 aksesyonu, *C. reticulatum* ve *C. yamashitae*’nin birer aksesyonlarının RAPD analizi yapılarak elde edilen dendogram sonucu, daha önce *Cicer* cinsi filogenetiği üzerine yapılan çaprazlama ve izozim (Ladizinsky ve Adler, 1976a; Ahmad ve ark., 1992; Tayyar ve Waines, 1996; Sudupak ve Kence, 2004), RAPD (Sudupak ve ark., 2002; Javadi ve Yamaguchi, 2004; Iruela ve ark., 2002), AFLP (Sudupak ve ark., 2004; Nguyen ve ark., 2004; Shan ve ark., 2005) ve ISSR (Sudupak, 2004) tabanlı çalışmalarla

uyumlu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda *C. reticulatum*, *C. yamashitae*'ye göre kültür nohutu *C. arietinum*'a belirgin bir şekilde (benzerlik katsayısı yaklaşık 0.58) yakın tür olduğu görülmüştür. Ayrıca Sethy ve ark. (2006)'nın mikrosatelitlerle yaptıkları çalışma da *C. reticulatum*'un *C. arietinum*'a en yakın tür olduğunu desteklemiştir.

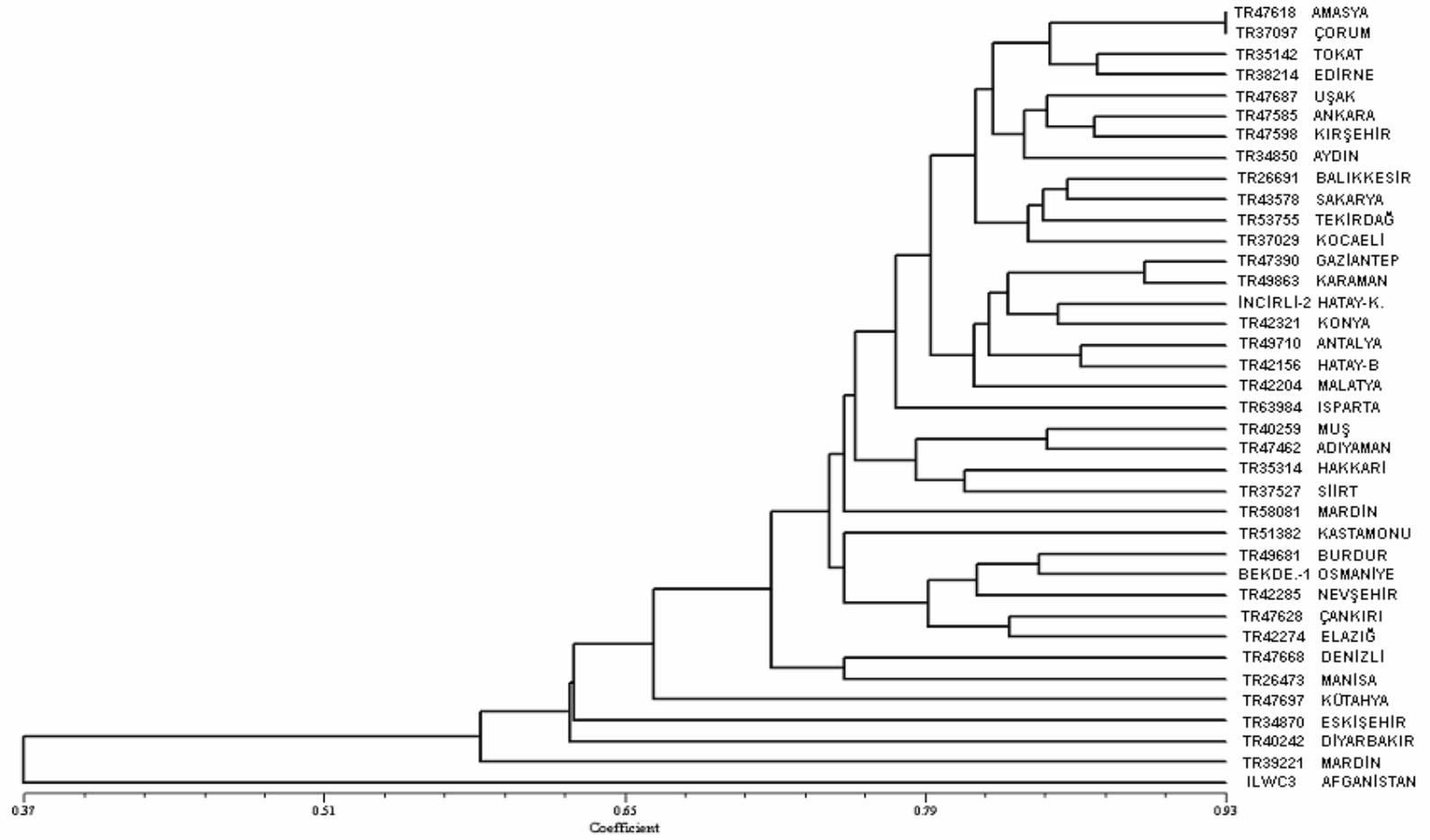
C. yamashitae türü Ahmad (1999)'in çalışması haricinde daha sonra *Cicer* cinsi ile yapılan çalışmaların tümünde çalışmamızdaki sonuca benzer niteliktedir. Bu tür dış grupta yer alarak tüm tür ve aksesyonlardan uzak bir akrabalık sergilemiştir. Bu da bu tür ile kültür nohutunun ıslah programlarında beraber kullanılabilme olanağını zayıflatmaktadır. Zaten *C. reticulatum* ve *C. echinospermum* dışındaki türlerin kültür nohutları ile doğrudan melezlenmeleri yapılamamaktadır (Ladizinsky ve Adler 1976a, b; Singh ve Ocampo 1993, 1997).

RAPD analizi sonucunda elde edilen dendogram sonuçları Anadolu orijinli kültür nohutları arasında, (genetik havuzu birçok nedenlerden dolayı daralmış olan bu bitkinin) belli sınırlar içinde bir genetik varyasyonu barındırdığı görülmüştür. *C. arietinum* örneklerinin kendi içinde yaklaşık 0.62 ile 0.93 arasında benzerlik katsayıları ile birbirlerinden ayrıldıkları görülmüştür (Şekil 4.14). Bu aksesyonlar genetik yakınlıklarına göre alt gruplar meydana getirmişlerdir. Südüpak ve ark. (2002)'nin, RAPD tekniğini kullanarak yaptıkları çalışmada Anadolu kökenli *C. arietinum* örneklerini analize tabii tuttuğunda Aydın92, Diyar95 ve Eser87 aksesyonlarının birbirinden ayıramadığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılmış olan toplam 36 genotipten benzer bir sonuç sadece TR47618 aksesyon numaralı Amasya örneği ile TR37097 aksesyon numaralı Çorum örneği arasında görülmüş ve diğer aksesyonların ürettikleri RAPD bantları ile birbirlerinden tamamen ayrıldıkları görülmüştür. Bu çalışmada Anadolu'nun farklı şehir ve bölgelerinden toplanan numuneler arasında genetik varyasyona dayalı olarak gen kaynağı niteliğinde kullanılabilecek *C. arietinum* aksesyonlarının varlığı gösterilmiştir.

Cicer cinsine ait yapılan çalışmalarda tek yıllık *C. reticulatum* türünün, kültürü yapılan *C. arietinum* türünün yabani atası olduğu savı bu çalışmamızda da desteklemiştir. Son yapılan bir çalışmada Rao ve ark. (2007), RAPD ve ISSR markör tekniklerini kullanarak Hindistan'a ait kültür nohut aksesyonları ile *C. reticulatum* türleri arasında yakın bir genetik ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Buradan da bu iki tür arasında uygun genotip seçimleri ile *C. reticulatum*'un çaprazlama için en uygun aday olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmada kullandığımız tek *C. reticulatum* aksesyonu, Diyarbakır kökenli TR40242 numaralı *C. arietinum*'a genetik olarak en yakın çıkmıştır. Bu da nohutun anavatanının Türkiye'nin güneydoğusu olduğu görüşünü desteklemektedir. Çünkü kullanılan Anadolu orijinli farklı bölgelere ait aksesyonlardan Güneydoğu'ya ait bir aksesyonun *C. reticulatum*'a en yakın olması dikkat çekicidir. Fakültemizde daha önce yapılan benzer bir çalışmada da, Saraçoğlu (2007), bizim de çalışmamızda kullandığımız TR40242 nolu *C. arietinum* aksesyonunun *C. reticulatum* türüne en yakın aksesyon olduğunu bildirmiştir. Kullanılan kültür nohutu aksesyonları ağırlıklı olarak 0.8 civarında Jaccard benzerlik katsayısına sahip çıkarken bazı genotiplerde bu oranın 0.65'in altına düşmüş olması, bitkinin kışlık-yazlık dönüşümü gibi ciddi darboğazlardan geçerek kültür formlarındaki varyasyon daralmasına karşı, tür içi varyasyondan hala belli ölçülerde yararlanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Tabii esas gen kaynağı yabani formlarda bulunmaktadır. Ne var ki yabani formlarla melezlemelerde yaşanan sıkıntılar dolayısıyla bu türlerin tamamından yararlanmanın çok kolay olmadığı anlaşılmaktadır. Bu da kültür formlarının tüm potansiyelinin kullanımını önemli hale getirmektedir.

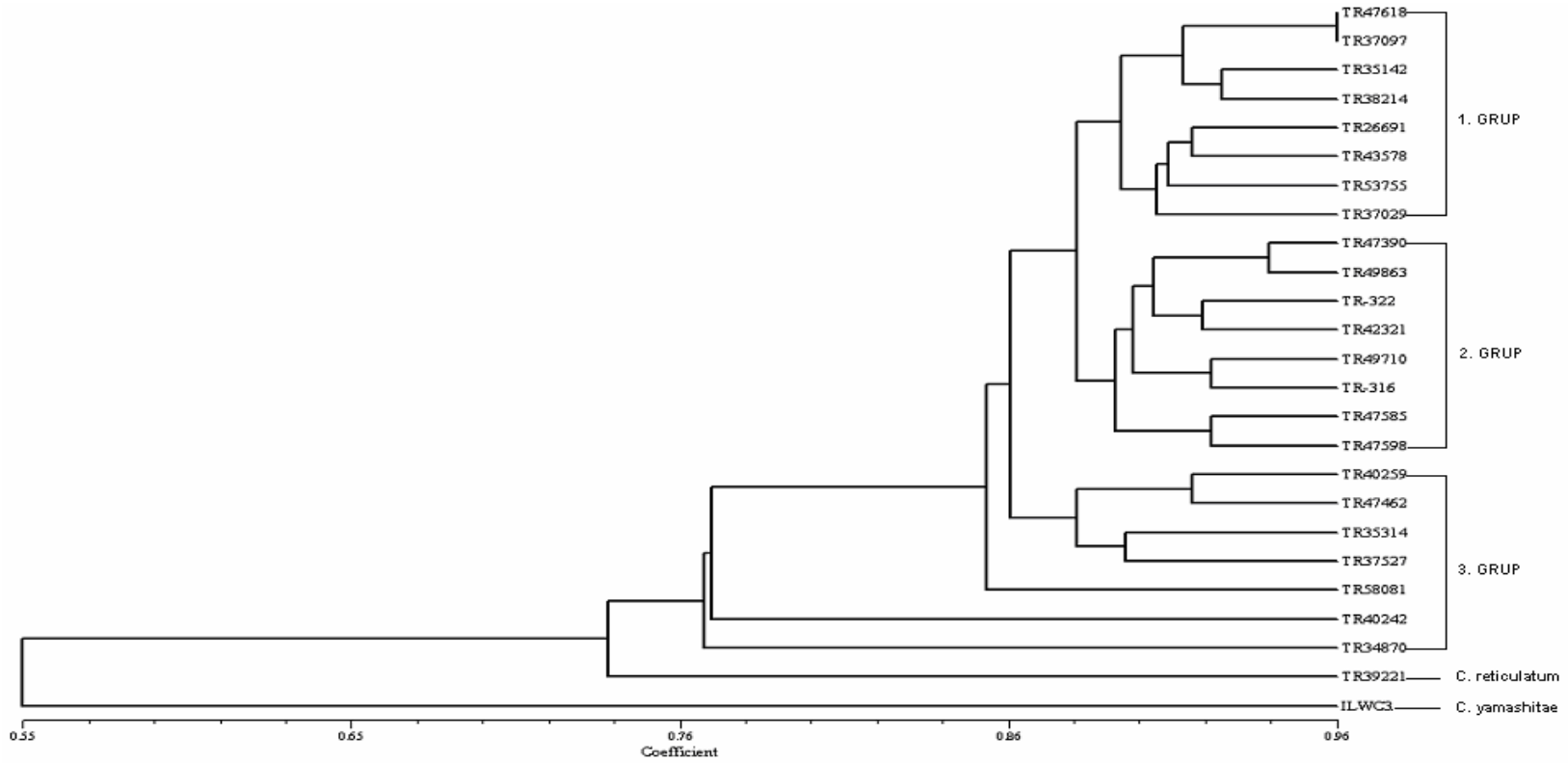
Bu çalışmada, mümkün olduğu ölçüde Anadolu'nun farklı bölgelerine ait aksesyonlara yer verilmiştir. Aksesyonların coğrafik dağılımları dikkate alınarak dendrogram incelendiğinde aynı bölgeye ait birçok aksesyonun kümeleşme göstermesiyle beraber kimi aksesyonların bu kurala uymadığı görülmüştür. Bunun sebebi, çalışmada kullanılan birçok genotipin zaten genetik havuzu dar olan bu bitkinin ortak veya benzer ebeveynlerden köken alması olabilir. Bu durumda bölgeler her ne kadar coğrafik olarak iklim ve tabiat özellikleri açısından farklılıklara sahip olsa da genetik materyal değişiminin kesintiye uğramadığını göstermektedir. Bu

durum, yani coğrafik bölgeler bazında net bir kümelemenin bulunmaması, Iruela ve ark. (2002)'nın çok daha geniş bir ölçekte ele aldıkları analizlerinde de benzer bulunmuştur. *Cicer* cinsinin filogenetik analizi ve kültür nohutlarının RAPD ve ISSR analizleri sonucu türler arasında varyasyonları ortaya çıkarmışlardır. Coğrafik köken ilişkileri yönünden türler arası varyasyon dağılımları gösterilmiş ve *C. reticulatum* ile *C. arietinum*'un en yakın türler olduklarını belirtmişlerdir. Kültür nohutu için grup analizinde *Desi* ve *Kabuli* tiplerinin ayrıldığı tespit edilmiş ancak gruplar ve aksesyonların coğrafik kökenleri ile ilgili açık bir ilişki ortaya çıkarılamamıştır. *C. arietinum*'da, yabani türler ile karşılaştırılınca, düşük seviyede tür içi genetik çeşitliliğin olduğu ortaya konmuştur. Iruela ve ark. (2002)'nin çalışmasında, Türkiye'den Orta Asya'ya, Hindistan'dan İran'a, Macaristan'dan İspanya'ya, Afganistan'dan Meksika'ya kadar uzanan coğrafyadan temin ettikleri kültür formu aksesyonları arasında da coğrafik izolasyonun sınırlı kaldığını göstermişlerdir. Bu yönüyle, global ölçekteki *C. arietinum* gen havuzu yapısının, tez çalışmamızda kullanılan aksesyonlarla, mikro ölçekte Anadolu gen havuzunda tekrarlandığı görülmektedir. Bu anlamlıdır, çünkü sadece çok farklı coğrafik yapıyı barındırmasıyla değil, Anadolu aynı zamanda nohutun en yakın yabani formlarını da çok dar bir aralıkta (Mardin civarları) bulundurmasıyla, nohutun kültüre alındığı ve dünyaya dağıldığı bir merkez niteliğindedir.



Şekil 4.14. Kümeleme analizi sonucu oluşan dendrogram (Jaccard)

Coğrafi olarak farklı bölgelere ait olmakla birlikte birarada yer alan aksesyonları sınırlı bir elemeden geçirdiğimiz takdirde (Şekil.4.15) temelde bir coğrafi farklılığın bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu bağlamda, TR40242 numaralı Diyarbakır aksesyonunun *C. reticulatum*'a en yakın genotip olması bu hipotezi destekler niteliktedir. Dendogramda Karadeniz ve Marmara Bölgesi'ne ait olan kültür formlarının ortak bir grupta toplandığı (1. Grup), Akdeniz ve İç Anadolu Bölgesi'nin ise 2. Grubu oluşturduğu görülmektedir. Kümeleme analizindeki son dallanmada yer alan örnekler ise Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi örnekleridir (3. Grup). Sırasıyla Akdeniz ve Orta Anadolu için geçit bölgesi olan Eskişehir aksesyonunun bu grup içinde yer almaları anlamlı bulunmuştur. Nohutla ilgili önemli bir merkez olan Eskişehir bölgesine ait TR34870 numaralı aksesyonun Diyarbakır örneği ile genetik açıdan hemen hemen aynı olması da bu aksesyonun Güneydoğu bölgesinden temin edildiği ve Şekil. 4.14 'de açıkça görüldüğü gibi tüm diğer kültür nohutu aksesyonlarının bu kaynaktan geldiği anlaşılmaktadır. Bu birincil gen kaynağının nispeten heterojen olduğu, ancak TR58081 numaralı aksesyondan kaynaklanan ikinci bir genetik kaynak kullanımı ile birlikte diğer tüm aksesyonlardaki genetik homojenite belirgin bir şekilde artmış ve Jaccard benzerlik katsayısı 0.75'ler seviyesine yükselmiştir (Şekil.4.14). Tüm bunlar nohutun tek merkezden yayıldığını destekler nitelikte bulgulardır.



Şekil 4.15. Genotip sayısı sınırlandırılmış kümeleme analizi sonucu oluşan dendrogram (Jaccard). Karadeniz ve Marmara Bölgesi (1. Grup), Akdeniz ve İç Anadolu Bölgesi (2. Grup), Doğu Anadolu ve G. Doğu Anadolu Bölgesi (3. Grup).

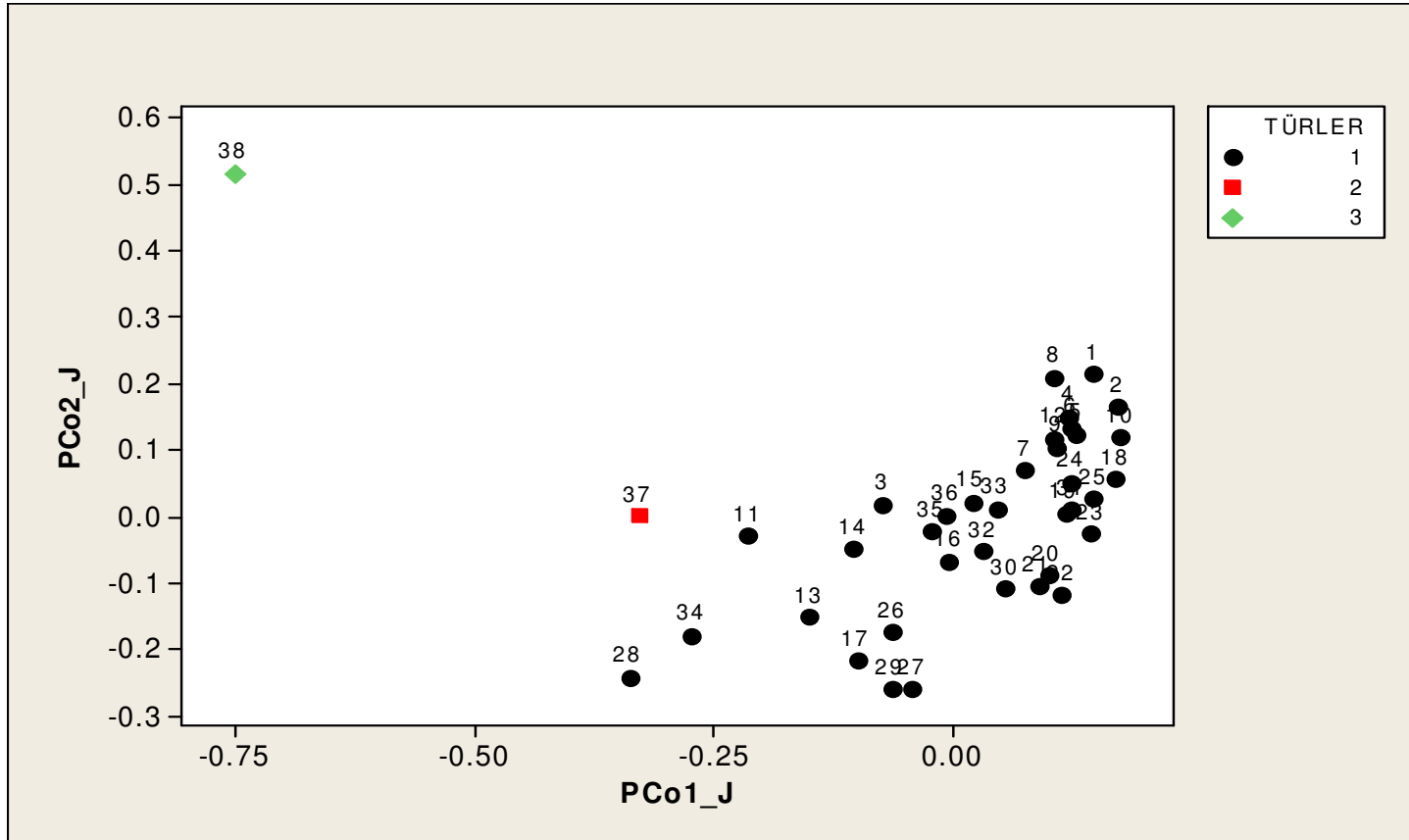
Yapılan çalışmalarda kültür nohutunun moleküler markörlerde olduğu gibi tohum protein elektroforezi (Ladizinsky ve Adler, 1975), izozim (Gaur ve Slinkard 1990; Kazan ve Muehlbauer 1991; Labdi ve ark. 1996; Tayyar ve Wainess, 1996) ve RFLP (Udupa ve ark., 1993) analizlerinde de polimorfizminin düşük olduğu anlaşılmıştır

Tez çalışmasında önceki çalışmalardan farklı olarak (Sudupak ve ark., 2002; Iruela ve ark., 2002; Javadi ve Yamaguchi, 2004), araştırmanın güvenilirliğinin artırılması için skorlanan polimorfik fragmanlarının sayısının yüksek tutulmasına özen gösterilmiştir. Böylece metottan kaynaklanabilecek muhtemel hataların indirgenmesi amaçlanmıştır.

4.5. Temel koordinatlar analizi (*Principle Co-ordinate Analysis* = PCoA)

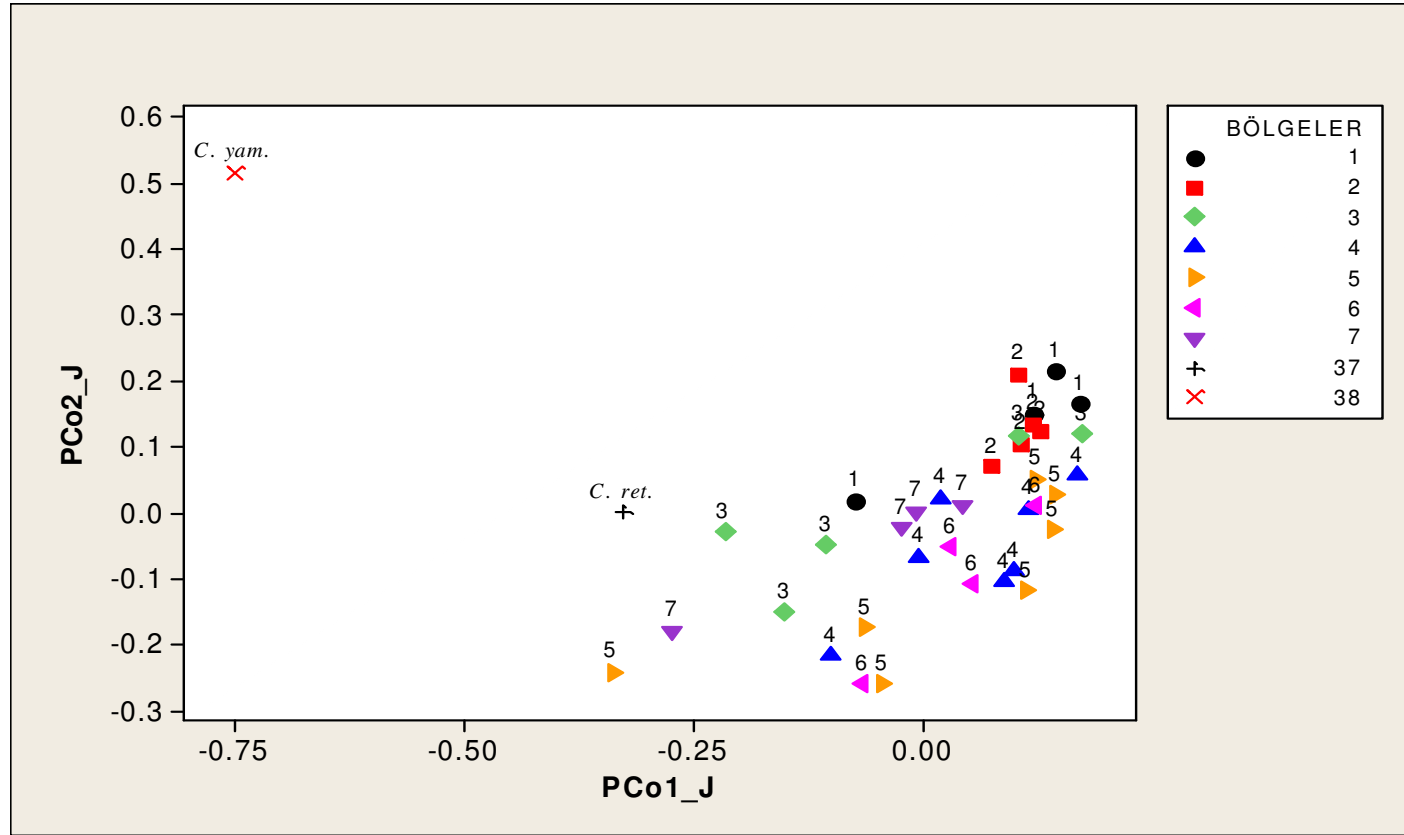
RAPD analizi sonucu kümeleme analizi ile üretilen dendogramda aksasyonlar arasındaki genetik akrabalığın görünümü *Principle Co-ordinate Analysis* (PCoA) yöntemiyle de tutarlı sonuç vermiştir (Şekil. 4.16). PCoA analizi ile özellikle türler arasındaki genetik mesafe net olarak görülmektedir. *C. arietinum* ve *C. reticulatum* açık bir şekilde *C. yamashitae*'den uzakta kendi aralarında bir akrabalık ilişkisi sergilemişlerdir. Ayrıca kültür nohutunun dar bir alanda yayılış göstermesi oldukça sınırlı bir genetik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir. PCo1'e göre bakıldığında daha geniş bir alana yayılarak çeşitlilik gösteren *C. arietinum* aksasyonları PCo2'ye göre daha dar bir alanda yayılış göstermişlerdir. PCoA'deki ilk iki temel koordinat verilerine göre de dendogram sonuçları ile uyumlu olarak Diyarbakır kökenli TR40242 aksasyonu (Şekil 4.16'te 34 numaralı aksasyon) *C. reticulatum* türüne en yakın aksasyon olarak görülmektedir.

C. yamashitae türü hem *C. arietinum* hem de *C. reticulatum*'a PCo1 ve PCo2'ye göre çok uzakta yer alarak genetik açıdan ne kadar farklı bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

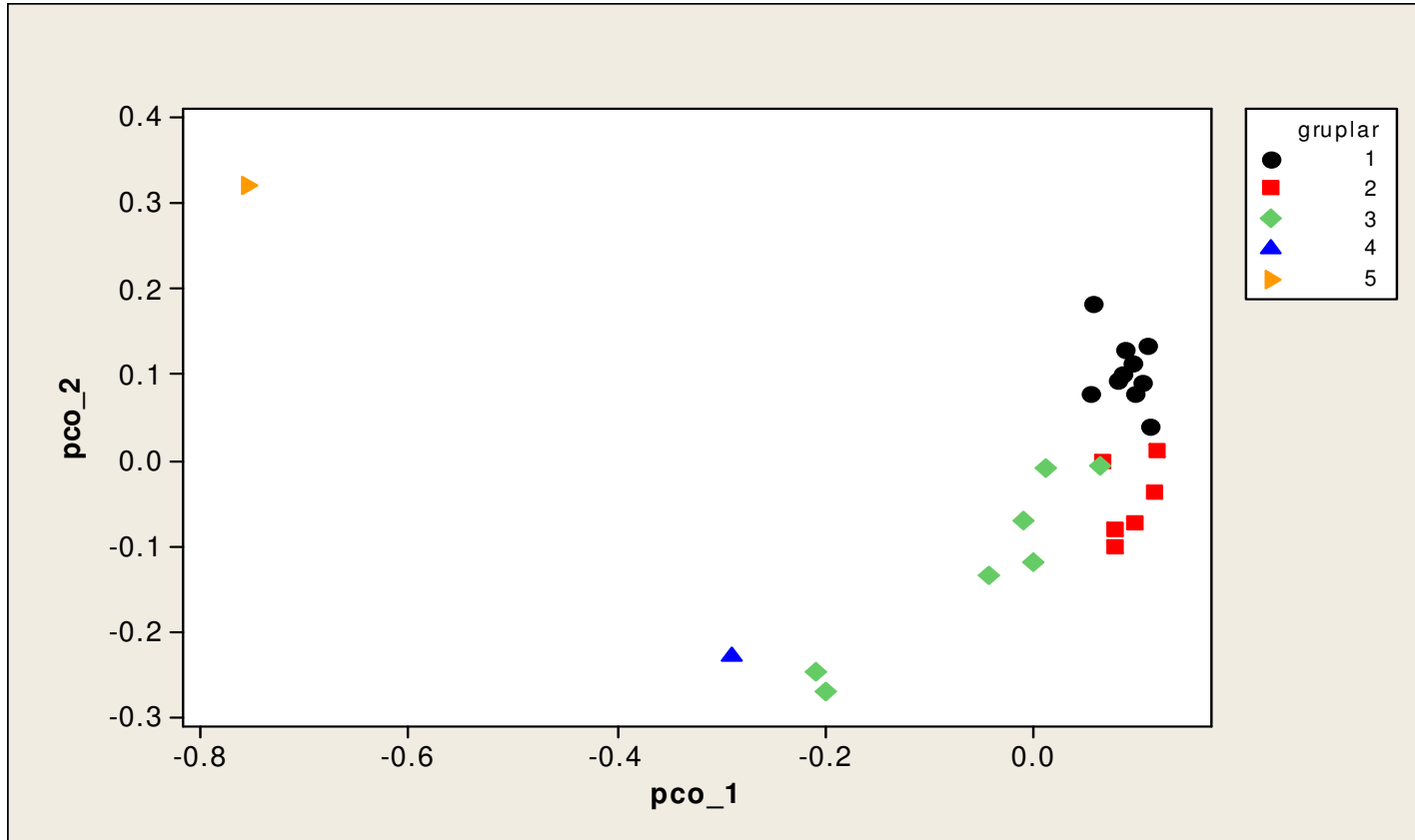


Şekil 4.16. RAPD analizi sonucu oluşan Jaccard PCoA. *C. arietinum* (1), *C. reticulatum* (2), *C. yamashitae* (3)

Ülkemizin coğrafik bölgeleri dikkate alınarak oluşturulan temel koordinatlar analizinde bölgeler arasında net bir ayrım söz konusu olamamaktadır (Şekil. 4.17). Kümeleme analizinde olduğu gibi sınırlı bir elemeye tabii tutulan örnekler incelendiğinde bölgeler bazında yığılma burada da belirgin hale gelmektedir (Şekil 4.18). Bu analizde *C. yamashitae* kullanılan ilk temel koordinat ile (PCo1) net bir şekilde ayrılırken ikinci temel koordinat (PCo2) hem *C. reticulatum*'u diğer tüm kültür aksesyonlarından ayırmakta hem de tüm kültür aksesyonlarını coğrafik bölgeler bazında net bir şekilde göstermektedir.

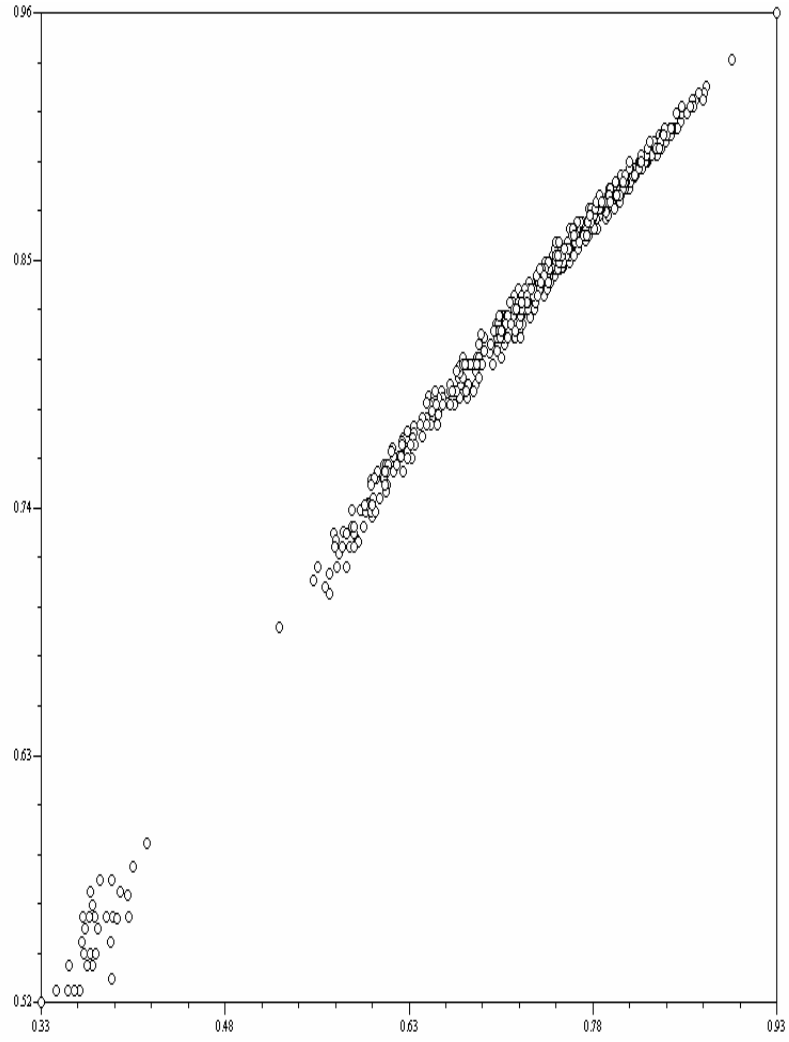


Şekil 4.17. Bölgelere göre aksesyonların dağılımını gösteren Jaccard *PCoA*. Karadeniz Bölgesi (1), Marmara Bölgesi (2), Ege Bölgesi (3), Akdeniz Bölgesi (4), İç Anadolu Bölgesi (5), Doğu Anadolu Bölgesi (6), G. Doğu anadolu Bölgesi (7)



4.6. Mantel testi

Kümeleme ve Temel koordinatlar analizlerinde Jaccard (J) katsayısı esas alınmıştır. Literatürde de en fazla J katsayısının tercih edildiği görülmektedir. Bazı çalışmalarda ise Simple Matching (SM) katsayısı kullanılabilmektedir. (Kayış ve ark., 2007). Bu iki katsayı arasındaki fark, dominant nitelikteki RAPD markör verilerinde mukayese edilen bireylerin her ikisinde de var olmayan bir karakterin de SM katsayısında bir değerinin olmasıdır. J katsayısında ise sadece var olan karakterler esas alınır. Bu farklılığın önemli olup olmadığı Mantel testi ile belirlenmiştir. RAPD-PCR verilerinden faydalanılarak hesaplanan SM ve J katsayıları ile belirlenen benzerlik/farklılık matrisleri arasındaki birlikteliği test etmek amacıyla yapılan Mantel testi sonucu elde edilen grafik Şekil 4.19'da verilmiştir. İki matris arasında istatistiki olarak önemli bir birliktelik tespit edilmiş ve iki matris arasında kuvvetli bir korelasyon ($r = 0.99482$) bulunmuştur. Bu sonuç, RAPD-PCR verilerinin SM ya da J katsayısı kullanılarak elde edilen benzerlik/farklılık matrislerinin PCoA ve kümeleme analizlerinde benzer sonuçlar vermesini kuvvetli bir şekilde desteklemektedir.



Şekil 4.19. SM ve J katsayılarına göre mantel testi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nohut dünya üzerinde büyük bir kitle için besin değeri bakımından önemli bir gıda maddesidir. Gelişmekte olan ülkelerde çok önemli bir protein kaynağını oluşturmaktadır. Bu öneminden dolayı her geçen yıl nohut üretimi artış kaydetmektedir. Gerek besin kaynağı olarak gerekse de toprağın azot miktarının arttırılmasında rol oynadığı için, ayrıca münavebedeki önemi dolayısıyla da nohut, agronomik açıdan çok önemli bir yemeklik tane baklagil bitkisidir.

Türkiye, nohut üretimi ve ihracatı açısından dünya ülkeleri arasında önemli bir yere sahiptir. Türkiye’de başta kurak alanlarda olmak üzere yaklaşık 650.000 ha alanda yetiştirilen önemli bir kültür bitkisidir. Ülke içinde ise, tez çalışmasının gerçekleştirildiği Konya ili 55.000 ha’lık ekim alanı ile nohut tarımında büyük bir paya sahiptir (Anonim, 2005).

Nohutlarla ilgili daha önce yapılan çalışmalarda Türkiye’nin nohutun anavatanı olduğu ve özellikle Türkiye’nin güneydoğusunun kültür nohutunun evrimleşme sürecinin başladığı yer olduğu belirtilmiştir. Bu da Türkiye topraklarında yetişen yabani nohut türlerinin var olan zengin gen havuzundan yararlanmayı ve özellikle çalışmamızın konusu olan kültür nohutu içerisindeki genetik çeşitlikten faydalanma fikrini gündeme getirmektedir.

Çalışmamızın amacı da buna paralel olarak öncelikle Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerinde yetişen kültür nohut genotiplerinin genetik ilişkilerini ortaya çıkarmaktır. Nohut aksesyonları arasındaki coğrafik ve genetik ilişkiyi belirlemek amacıyla 28 RAPD primeri kullanılmıştır. Kullandığımız primerler yüksek oranda polimorfizm göstererek *Cicer arietinum* genotiplerinin iki yabani tür eşliğinde birbirlerinden ayrılmasını sağlamıştır.

RAPD analizleri sonucu oluşan 308 polimorfik bant ile yapılan analize göre oluşturulan dendogramlar ve PCoA’larda, *C. arietinum*’un beklendiği üzere *C. reticulatum* ile aynı grupta yer aldığı görülmüştür. *C. reticulatum* türü kültürü

yapılan *C. arietinum*'a en yakın yabancı türdür. Dış grupta yer alan *C. yamashitae* bu iki türe uzak bir genetik ilişki sergilemiştir. *C. arietinum* genotiplerinin coğrafik dağılımlarına göre aynı bölgeye ait birçok aksesyonun kümeleşme göstermesiyle beraber kimi genotiplerin bu kurala uymadığı görülmüştür. Tüm genotipleri kümeleme ve genotip sayısı sınırlandırılmış kümeleme analizleri ile PCoA analizlerinin sonuçlarına göre iki gen kaynağının bulunduğu; birincil gen kaynağının heterojen, ikincil gen kaynağının kısmen homojen coğrafik dağılımlar gösterdiği görülmüştür. Analiz sonuçları, her iki kaynağın Güneydoğu'dan temin edilen aksesyonlardan köken aldığını ve nohutun tek merkezden yayıldığını destekler niteliktedir.

Tez çalışmasında, homojen bir şekilde Anadolu'nun bütün coğrafik bölgelerinden elde edilen kültür nohutu aksesyonlarının eşit olarak kullanılmasına özen gösterilmiştir (Şekil 3.1). Bu kapsamda (çalışmada kullanılan tüm coğrafik bölgelerimizden farklı lokasyonlara ait 36 kültür nohut aksesyonundan 28 RAPD primeri ile elde edilen 330 DNA bandının değerlendirilmesi) bir çalışma bilgimiz dahilinde ilk defa ele alınmıştır. Türkiye'de ekimi yapılan nohut formlarının genetik akrabalık ilişkileri ve aksesyonların muhtemel kökenlerine dair bilgiler ortaya konmuştur.

Evrimleşme sürecinde nohut, biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı birçok genetik özelliğini yitirmiştir. Bu nedenle kültür nohutunun genetik havuzunun genişletilmesinde stres koşullarına dayanıklılık özelliklerini koruyan nohut formlarından faydalanılması büyük bir önem kazanmıştır. Özellikle geniş bir genetik çeşitliliğe sahip ve stres etmenlerine karşı dirençli olan yabancı türlerle (*C. reticulatum* ve *C. echinospermum* hariç) genetik yapı farklılıkları dolayısıyla başarılı melezlemelerin halihazırda yapılamadığı bilinmektedir. Ancak uzun süreçte genetik açıdan, kültür nohutuyla uzak akrabalığı olan türlerden başlayarak yakın türlere doğru yapılacak merdiven şeklindeki çaprazlamalarla istenen bir takım özelliklerin kültür formlarına aktarılma imkânı doğabilir. Bu şekilde *C. Arietinum*'un zaman içinde geçtiği darboğazlarda kaybetmiş olduğu bazı önemli agronomik karakterleri geri kazanma imkanı olabilir. Yabancı türlerden faydalanmanın zorluğu göz önüne

alındığında, kültür nohutlarındaki varyasyon daralmasına rağmen tür içi farklılıklardan hâlihazırda yararlanılabilir. Nohutun genetik potansiyelinin geliştirilebilmesi için uygun kültür aksesyonları içerisinde var olan genetik çeşitliliğin kapsamlı bir şekilde anlaşılması gerekmektedir. Genetik akrabalık ilişkilerine dayanılarak gerek çaprazlama gerekse uzun vadede gen transferi çalışmalarıyla uygun genlerin kültür nohutu aksesyonlarına aktarılması nohutun üretiminde ülkemizi söz sahibi duruma getirecektir.

Yaptığımız bu çalışmayla kültür nohutu aksesyonlarının genetik ilişkileri ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar, ülkemizdeki kültür nohut aksesyonlarının genetik potansiyellerinin geliştirilmesi ve verimlerinin artırılmasına yönelik çalışmalarda önemli bir kaynak olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Ahmad, F., 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis reveals genetic relationships among the annual *Cicer* species. *Theor Appl Genet* 98: 657–663.
- Ahmad, F., 2000. A comparative study of chromosome morphology among the annual *Cicer* species. *Cytobios* 101:37–53.
- Ahmad, F., Gaur, P.M. and Slinkard, A.E., 1992. Isozyme polymorphism and phylogenetic interpretations in the genus *Cicer* L. *Theor Appl Genet* 83: 620–627.
- Anonim, 2005. FAO Statistics, Internet; <http://www.fao.org>
- Anomim, 2006. Bi-weekly Bulletin, Agriculture and Agri- Food Canada.
- Auckland, A.K. and Van der Maesen, L.J.G., 1980. Chickpea. In: eds. W.R. Fehr and H.H. Hadley, *Hybridization of Crop Plants*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, WI, USA, pp 249-259.
- Bahl, P.N., 1980. Kabuli-Desi introgression and the genesis of a new plant type of chickpea. In: Green JM, Nene YL, Smithson JB (eds) *Proc Int Workshop on Chickpea Improvement*, ICRISAT, Hyderabad, India, pp 75–80.
- Banerjee, H., Pai, R.A., Moss, J.P. and Sharma, R.P., 2001. Use of random amplified polymorphic DNA markers for mapping the chickpea genom. *Biologia Plantarum* 44 (2): 195-202.
- Banerjee, H., Pal, R.A. and Sharma, R.P., 1999. Restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of chickpea accessions. *Biologia Plantarum* 42(2): 197–208.

- Berger, J., Abbo, S. and Turner, N.C., 2003. Ecogeography of Annual Wild *Cicer* Species: The poor State of the World Collection. *Crop Sci* 43: 1076-1090.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Of Human Genet* 32: 314-331.
- Chowdhury, M.A., Vandenberg, B. and Warkentin, T., 2002. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 127: 317–325.
- Collard, B.C.Y., Pang, E.C.K., and Taylor, P.W.J., 2003. Selection of wild *Cicer* accessions for the generation of mapping populations segregating for resistance to ascochyta blight. *Euphytica* 130: 1–9.
- Cox, T.S., Murphy, J.P. and Rodgers, D.M., 1986. Changes of genetic diversity in red and winter wheat regions of the United States. *Proc Natl Acad Sci* 83: 5583-5586.
- De Candolle, A., 1883. *Origine des Plantes Cultivees*, Paris, pp. 208-260.
- Devos, K. M. and Gale, M. D., 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet* 84: 567-572.
- Doldi, M.L., Volmann, J. and Lelley, T., 1997. Genetic Diversity in Soybean as Determined by RAPD and Microsatellite Analysis. *Plant Breed*, 116: 331-335.
- Duvick, D., 1984. Genetic diversity in major farm crops on the farm and in reserve. *Econ Bot* 38: 161-178.
- Gaur, P.M. and Slinkard, A.E., 1990. Inheritance and linkage of isozyme coding genes in chickpea. *J Hered* 81: 455–461.

- Gil, J. and Cubero, J.I., 1993. Inheritance of seed coat thickness in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its evolutionary implications. *Plant Breed* 111: 257–260.
- Hallden, C., Nilsson, N.O., Rading, I.M. and Säll, T., 1994. Evaluation of RFLP and RAPD Markers in a Comparison of Brassica napus Breeding Lines. *Theor Appl Genet* 88: 123-128.
- Hawtin, G.C. and Singh, K.B., 1980. Kabuli-Desi introgression: problems and prospects. In: Green JM, Nene YL, Smithson JB (eds) *Proc Int Workshop on Chickpea Improvement*, ICRISAT, Hyderabad, India, pp 51–60.
- Iruela, M., Rubio, J., Cubero, J.I., Gil, J. and Millán, T., 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theor Appl Genet* 104: 643–651.
- Javadi, F. and Yamaguchi, H., 2004. Interspecific relationships of the genus *Cicer* L. (Fabaceae) based on trnT-F sequences. *Theor Appl Genet* 109: 317–322.
- Kaga, A., Ohnishi, M., Ishii, T. and Kamijima, O., 1996. A genetic linkage map of azuki bean constructed with molecular and morphological markers using an interspecific population (*Vigna angularis* X *V. nakashimae*). *Theor Appl Genet* 93: 658–663.
- Kazan, K. and Muehlbauer, F.J., 1991. Allozyme variation and phylogeny in annual species of *Cicer* (Leguminosae). *Plant Syst Evol* 175: 11–21.
- Kayıs, S. A., Hakkı, E. E., Pınarkara, E., ve Sag, A., 2007. Dominant Genetik Markörlerin İstatistiki Analizleri. XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi Biyoteknoloji 2007 Bildiri Kitabı. Sayfa 86-90.
- Kelly, J.D., 1995. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. *Hortscience*, 30(3): 461-465.

- Kubota, M., Arai, K. and Yorimitu, A., 1993. Studies of *Papaver* section *Oxytona* growing as garden plants on *Papaver bracteatum* Lindl. *Yakugaku Zasshi* 113. p 810-817.
- Labdi, M., Robertson, L.D., Singh, K.B. and Charrier, A., 1996. Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphisms. *Euphytica* 88: 181–188.
- Ladizinsky, G. and Adler, A., 1975. The origin of chickpea as indicated by seed protein electrophoresis. *Israel J. Bot.* 24: 183–189.
- Ladizinsky G. and Adler, A., 1976a. Genetic relationships among the annual species of *Cicer* L. *Theor Appl Genet* 48: 197–203.
- Ladizinsky G. and Adler, A., 1976b. The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 88:181–188 Lassner MW, Peterson P, Yoder II (1989).
- Lavi, U., Cregan, P., Schap, T. and Millel, J., 1994. Amplification and breeding of perennial fruit crops. In: Janick, J. (ed) *Plant Breeding Reviews*. John Wiley Sons, Inc: NY Vol: 397-401.
- Lodhi, M.A., 1994. Genetic mapping and genome analysis of grape (*Vitis* sp.). Ph.D. Thesis, Cornell University, 233 p., New York.
- Lowe, A. J., Hanotte, O. and Guarino, L., 1996. Standardization of Molecular Genetic Techniques for the Characterization of Germplasm Collections: The Case of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*. 107: 50-54.
- Malyshev, S.V. and Kartel, N.A., 1997. Molecular markers in mapping plant genomes. *Molecular Biology*, 31(2): 163-171.

- Maynez, M., Moreno, M.T. and Gil, J., 1993. Desi/Kabuli introgression for yield improvement in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J Genet Breed* 47: 61–64.
- McDonald, M.B., Elliot, L.J. and Sweeney, P.M., 1994. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seed Science and Technology* 22 (1): 171-176.
- Menkir, A., Goldsbrough, P. and Ejeta, G. 1997. RAPD assesment of genetic diversity in cultivated races of Sorghum. *Crop Science* 37: 564-569.
- Moreno, M.T. and Cubero, J.I., 1978. Variation in *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 27: 465–468.
- Nguyen, T.T., Taylor, P.W.J., Redden, R.J. and Ford, R., 2004. Genetic diversity estimates in *Cicer* using AFLP analysis. *Plant Breed* 123: 173–179.
- Ocampo, B., Venora, G., Errico, A., Singh, K.B. and Saccardo, F., 1992. Karyotype analysis in the genus *Cicer*. *J Genet Breed* 46: 229– 240.
- Paul, S., Wachira, F.N., Powell, W. and Waugh, R., 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor Appl Genet* 94: 255–263.
- Pundir, R.P.S., Rao, N.K. and van der Maesen, L.J.G., 1985. Distribution of qualitative traits in the world germplasm of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica* 34: 697-703.
- Pundir, R.P.S., Reddy, K.N. and Mengesha, M.H., 1988. ICRISAT Chickpea Germplasm Catalog: Evaluation and Analysis. ICRISAT, Patancheru, A.P. 502 324, India.
- Pundir, R.P.S., Reddy, K.N. and Mengesha, M.H., 1992. Pod volume and pod filling as useful traits of chickpea. *International Chickpea Newsletter*, 17: 18-20.

- Purseglove, J.M., 1968. Tropical crops, Dicotyledons 1. Logmans, Green and Co. Ltd. London and Harlow. P. 332.
- Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1993. Genetic diagnostics in plant breeding, RAPDs, microsatellites and machines. TIG, 9(8): 275-280.
- Rao, L.S., Rani, P.U., Deshmukh, P.S., Kuma, P.A. and Panguluri, S.K., 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genetic Resource and Crop Evolution, 54(6): 1235–1244.
- Reddy, M.V., Singh, K.B., Saxena, M.C., Malhotra, R.S. and Hanounik, S., 1985. Tallest chickpea. International chickpea Newsletter, 12: 7-8.
- Robertson, L.D., Ocampo, B. and Singh, K.B., 1997. Morphological variation in wild annual *Cicer* species in comparison to the cultigen. Euphytica 95: 309-319.
- Rohl, F.J., 2002. NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY.
- Salimath, P.M., Bahl, P.N. and Mehra, R.B., 1984. Genetic diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) Z Pflanzenzüchtg 92: 52–60.
- Santalla, M., Power, J.B. and Davey, M.R., 1998. Genetic Diversity in Mung Bean Germplasm Revealed by RAPD Markers. Plant Breed 117: 473-478.
- Sant, V.J., Patankar, A.G., Sarode, N.D., Mhase, L.B., Sainani, M.N., Deshmukh, R.B., Ranjekar, P.K. and Gupta, V.S., 1999. Potential of DNA markers in detecting divergence and in analysing heterosis in Indian elite chickpea cultivars. Theor Appl Genet 98: 1217–1225.

- Saraçoğlu, D., 2007. Yabani ve Kültür Nohutlarının Moleküler Genetik Yöntemlerle Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Konya.
- Sepetoğlu, H., 1996. Yemeklik Dane Baklagiller. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notları: 24/3. Sayfa 157-198.
- Sethy, N.K., Choudhary, S., Shokeen, B. and Bhatia, S., 2006. Identification of microsatellite markers from *Cicer reticulatum*: molecular variation and phylogenetic analysis. *Theor Appl Genet* 112: 347–357.
- Shan, F., Clarke, H.J., Yan, G., Plummer, J.A. and Siddique, K.H.M., 2005. Geographical patterns of genetic variation in the world collections of wild annual *Cicer* characterized by amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 110: 381–391.
- Sharma, S.K., Knox, M.R. and Ellis, T.H.N., 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theor Appl Genet* 93: 751–758.
- Sheldrake, A.R. and Saxena, N.P., 1979. The growth and development of chickpea under progressive moisture stress. In: eds. H.
- Singh, K.B., 1997. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research* 53: 161-170.
- Singh, K.B. and Ibrahim, H., 1990. Hybridization Techniques in Chickpea. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Singh, K.B., Holly, L. and Bejiga, G., 1991. A Catalog of Kabuli Chickpea Germplasm: An Evaluation Report of Winter Sown Kabuli Chickpea, Land Races, Breeding Lines and Wild *Cicer* Species. International Center for Agricultural Research in the Dry Area (ICARDA), P.O. Box 5466, Aleppo, Syria, pp. 398.

- Singh, K.B. and Ocampo, B., 1993. Interspecific hybridization in annual Cicer species. *J Genet Breed* 47: 199–204.
- Singh, K.B. and Ocampo, B., 1997. Exploitation of wild Cicer species for yield improvement in chickpea. *Theor Appl Genet* 95: 418–423.
- Sonnante, G., Marangi, A., Venora, G. and Pignone, D., 1997. Using RAPD markers to investigate genetic variation in chickpea. *J Genet Breed* 51: 303–307.
- Steffan, R.J. and Atlas, R. M., 1991. Polymerase Chain reaction: Applications in Environmental Microbiology. *Annu Rev Microbiol* 15: 137-161.
- Sudupak, M.A., 2004. Inter and intra-species inter simple sequences repeat (ISSR) variations in the genus Cicer. *Euphytica* 135: 229– 238.
- Sudupak, M. A. and Kence, A., 2004. Analysis of genetic relationships among perennial and annual Cicer species growing in Turkey using allozyme polymorphisms. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 241-249.
- Sudupak, M.A., Akkaya, M.S. and Kence, A., 2004. Genetic relationships among perennial and annual Cicer species growing in Turkey assessed by AFLP fingerprinting. *Theor Appl Genet* 108: 937–944.
- Sudupak, M.A., Akkaya, M.S. and Kence, A., 2002. Analysis of genetic relationships among perennial and annual Cicer species growing in Turkey using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 105: 1220–1228.
- Şehirali, S., 1988. Yemeklik Dane Baklagiller. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1089, Ders Kitabı: 314. Sayfa 337-381.
- Tanksley, S.D., 1993. Mapping Polygenes. *Annu Rev Gent* 27: 205-233.

- Tayyar, R.I. and Waines, J.G., 1996. Genetic relationships among annual species of *Cicer* (Fabaceae) using isozyme variation. *Theor Appl Genet* 92: 245–254.
- Upudhyaya, H.D., Furman, B.J., Dwivedi, S.L., Udupa, S.M., Gowda, C.L.L., Baum, M., Crouch, J.H., Buhyariwalla, H.K. and Singh, S., 2006. Development of a composite collection for mining germplasm possessing allelic variation for beneficial traits in chickpea. *Plant Genet Resour* 4: 13-19.
- Udupa, S.M., Sharma, A., Sharma, R.P. and Pai, R.A., 1993. Narrow genetic variability in *Cicer arietinum* L. as revealed by RFLP analysis. *J Plant Biochem Biotech* 2: 83–86.
- Van der Maesen, L.J.G., 1972. *Cicer* L. A monograph on the genus with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation. Thesis, Agricultural University Wageningen. Meded Landbouwhogeschool, Wageningen 72–10.
- Van der Maesen, L.J.G., 1987. Origin, history and taxonomy of chickpea. In: M.C. Saxena & K.B. Singh (Eds.), *The Chickpea*, pp. 11–34. CAB Int Publ, UK.
- Vavilov, N.I., 1926. *Studies on the Origin of Cultivated Plants*. Leningrad, pp. 129-238.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuper, M. and Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407-4414.
- Waycott, W. and Fort, S.B., 1994. Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphologic analyses. *Genome* 37: 577–583.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W., 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Pres, Inc. 322 p.

Welsh, J. and Clelland, M.C., M., 1990. Fingerprinting Genomes using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531-6535.