

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**MERCİMEK GENOMUNUN AFLP, RAPD, ISSR
VE BAZI MORFOLOJİK MARKÖRLER
KULLANARAK HARİTALANMASI**

Şehnaz ÖZATAY

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.0207

Sunuş Tarihi: 11.04.07

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Bahattin TANYOLAÇ

Bornova-İzmir

III

Şehnaz ÖZATAY tarafından **DOKTORA TEZİ** tezi olarak sunulan “**Mercimek Genomunun AFLP, RAPD, ISSR ve Bazı Morfolojik Markörler Kullanarak Haritalanması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve/...../2007 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

Raportör Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ÖZET**MERCİMEK GENOMUNUN AFLP, RAPD, ISSR VE BAZI
MORFOLOJİK MARKÖRLER KULLANARAK
HARİTALANMASI****ÖZATAY, Şehnaz**

Doktora tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç.Dr. Bahattin TANYOLAÇ

Bu çalışmada, *Lens culinaris Medic.* (mercimek) bitkisinin genomuna ait bağlantı genom haritasının elde edilmesi amaçlanmıştır. Genom haritasında AFLP, RAPD, ISSR ve morfolojik markörler kullanılmıştır. Çalışmada WA8649041 ve Precoz ebeveynlerin çaprazlanmasıyla elde edilmiş 93 adet rekombinant hat (Rekombinant Inbred Lines, RILs) kullanılmıştır. 178 adet AFLP markörü tespit edilmiştir. 178 AFLP, 192 RAPD, 18 ISSR ve 3 morfolojik marker olmak üzere toplam 391 adet DNA marköründen 166 adeti ile bağlantı genom haritası yapılmıştır.

Sonuçta, toplam 11 tane bağlantı (linkaj) grubu elde edilmiştir. Elde edilen haritanın toplam büyüklüğü 2091.5 cM olarak saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Mercimek, genetik markörler, AFLP, haritalama

ABSTRACT

**MAPPING OF LENTIL GENOME BY USING AFLP, RAPD,
ISSR AND SOME MORPHOLOGICAL MARKERS**

ÖZATAY, Şehnaz

Ph.D. Thesis, Institute of Natural and Applied Sciences

Supervisor: Doç.Dr. Bahattin TANYOLAÇ

In this study, a linkage genome map of *Lens culinaris Medic.* (lentil) was aimed to construct using AFLP, RAPD, ISSR and morphological markers. Genetic material, consisted of 93 Recombinant Lines (Recombinant Inbred Lines, RILs), was developed from WA8649041 and Precoz crosses. A total of 178 AFLP, 192 RAPD, 18 ISSR and 3 morphological markers were detected. Out of these, 166 DNA markers were able to be mapped in the lentil genome.

As a result total of 11 linkage groups was constructed with spanning 2091.5 cM of the genome.

Key Words: *Lens culinaris Medic.*, genetic markers, AFLP, mapping

IX

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında destek ve yardımlarından dolayı bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Bahattin TANYOÇ'a, bilgi ve desteklerinden dolayı Sayın Yrd.Doç.Dr. Abdullah KAHRAMAN'a, tez çalışmalarım sırasında laboratuvarındaki imkanlardan yararlanmamı sağlayan ve bilgilerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Hikmet BUDAK'a ve Sabancı Üniversitesi'ne, desteklerinden dolayı Egert Doğal Ürünler Ltd. Şti. sahibi Sayın Rüştü TOK'a, manevi desteklerinden ve yardımlarından dolayı arkadaşlarım Yeşim TOK, Filiz ALTAN ve Mert SUDAĞIDAN'a, Biyomühendislik Bölümü, Moleküler Genetik laboratuvarı yüksek lisans öğrencileri Betül KAYA, Seçkin SOYA ve Cengiz AKKALE'ye, hayatları boyunca desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	6
2.1. Mercimek Bitkisi (<i>Lens culinaris Medic.</i>)	6
2.2. Moleküler Markör Teknikleri	7
2.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism).....	10
2.4. Mercimek Bitkisi ile Yapılan Haritalama Çalışmaları.....	13
2.5. Diğer Baklagiller ile Yapılan Haritalama Çalışmaları	18
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal	21
3.2. Metot	21
3.2.1 Rekombinant Mercimek Hatlarına Ait Tohumların Yetiştirilmesi.....	21
3.2.2 DNA İzolasyonu	21
3.2.3 DNA Saflık Analizi	22
3.2.4 Spektrofotometrik DNA Miktarı ve DNA/RNA Miktarının Belirlenmesi	23
3.2.5 AFLP Markör Analizi	24
3.2.6 Poliakrilamid Jel Elektroforezi	29

4. BULGULAR.....	32
4.1. AFLP Markör Analizi Bulguları.....	32
4.2. Genom Haritalama Bulguları.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
EK 1 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	48
KAYNAKLAR DİZİNİ	54
ÖZGEÇMİŞ	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1 Moleküler Markör Teknikleri	9
2.2 En Fazla Kullanılan Moleküler Markörlerinin Karşılaştırılması	10
4.1 Çalışmada kullanılan primer kombinasyonları ve elde edilen polimorfik bant sayıları	32
4.2 Elde Edilen Yüksek Çözünürlükte Genom Haritasının Özellikleri ..	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa No</u>
3.1 LI-COR/Biosciences, NEN [®] Model 4300, DNA Analyzer	30
4.1 M-CAC-E-ACA (700) primer kombinasyonu denemesi sonucu elde edilen poliakrilamid jel görüntüsü (Markör, P1, P2 ve ilk 47 örnek görülmektedir)	33
4.2 M-CAC-E-AGC (800) primer kombinasyonu denemesi sonucu elde edilen poliakrilamid jel görüntüsü (Markör, P1, P2 ve ilk 47 örnek görülmektedir)	34

1. GİRİŞ

Ülkemizde ticari olarak üretimi yapılan baklagillerin başında mercimek, nohut, kuru fasulye ve bakla gelmektedir (Uysal,2007). 1980’li yıllarda dünya genelinde Türkiye, mercimek üretimi bakımından dış ülkelere satışta ilk sıralarda yer almış ve üretim artışı göstermiştir. 1990’lı yılların sonlarına doğru üretimde azalmanın meydana gelmiş ve buna bağlı olarak ihracatta düşüş hatta ithal etme durumu söz konusu olmaya başlamıştır (Aydoğan, 2003).

Mercimek bitkisi kendine döllenebilen, yıllık, diploid ($2n=2x=14$), özellikle Orta Doğu, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika ve Avusturalya’da yetişebilen önemli bir üründür. Mercimek, özellikle insan beslenmesinde ve hayvan yemlerinde zengin bir protein kaynağı olması nedeniyle önem teşkil eden bir üründür (Rubenna, et al., 2003; Hamwieh, et al. 2005). Çeşitlere ait önem teşkil eden özelliklerle ilgili markörlerle oluşturulmuş detaylı bir genom haritası, ıslah çalışmalarında verimliliğin artırılması bakımından önemli bir kaynaktır. Günümüzde, tarımsal öneme sahip ve birçok ürüne ait genetik haritalar oluşturulmuş durumdadır. Mercimek genomuna ait ilk haritalama çalışmaları izoenzimler, morfolojik ve sitolojik markörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki haritalama çalışmalarında DNA markör tekniklerinden yararlanılmıştır. DNA markörlerinin morfolojik ve izoenzim markörlerine göre avantajı yüksek miktarda polimorfizm elde edilebilmesidir. Örneğin, PCR’a dayalı RAPD markör tekniği birçok baklagil türünün genomik haritasının oluşturulmasında kullanılmıştır

(Eujayl, et al. 1997; Rubenna, et al., 2003). Havey and Muehlbauer (1989) mercimekle yaptıkları ilk çalışmada az markör yoğunluğuna sahip bir harita elde etmişlerdir. Daha sonra, Eujayl, et al. (1997) ilk gelişmiş mercimek haritasını oluşturmuşlardır.

Son yıllarda DNA markörlerinin kullanılması ile çeşitli ürünlere ait ıslah çalışmalarında verim ve efektiflik sağlanabilmiştir (Baum et al., 2000). Elde edilen moleküler haritalardan markörlere dayalı seleksiyon ve klonlamada yararlanılabilmektedir. Mercimeke ait ilk genetik haritalar oluşturulurken izoenzim, RFLP ve bazı morfolojik markörler gibi genomun küçük bir kısmını kavrayan markörler kullanılmıştır (Havey and Muehlbauer, 1989). Eujayl et al. (1998) 86 rekombinant kendilenmiş hat ile 86 RAPD, 79 AFLP ile çoğunluğu RFLP marköründen oluşan 6 kodominant markör ile mercimek genom haritası oluşturulmuşlardır. Rubeena et al. (2003) F₂ populasyonu ile 100 RAPD, 11 ISSR ve 3 RGA markörü ile haritalamayı gerçekleştirmişlerdir. Duran et al. (2004) oluşturdukları haritada 62 RAPD, 29 ISSR, 65 AFLP, 4 morfolojik ve 1 mikrosatellit markörü kullanmışlardır.

Araştırması yapılan bir özellikle bağlantılı markörlerin yer aldığı detaylı bir genetik haritanın geliştirilmesi ıslah veriminin arttırılmasında önemli bir araçtır. Tarımsal öneme sahip bir çok ürünün genom haritası oluşturulmuştur (O'Brien, 1993). Mercimeke ait harita oluşturulurken polimorfizimin arttırılabilmesi için öncelikle interspesifik haritalama populasyonları kullanılmıştır (Havey and Muehlbauer, 1989).

Üzerinde çalışılan bitkiye ait DNA markörlerinin tanımlanması ve o bitkiye ait genomik haritaların oluşturulması, yeni çeşitlerin kısa sürede geliştirilmesini kolaylaştırarak ve ıslah süresini kısaltarak zamandan kazanç sağlanmasına ve seleksiyonda güvenilirlik ve kolaylık elde edilmesine yardımcı olmuştur. Bu amaçla, bir çok moleküler markör tekniği geliştirilerek bunlardan yararlanılmaya başlanmıştır (Michelmore et al., 2006). Son yıllarda, moleküler markör teknikleri ile iki veya daha fazla birey arasındaki spesifik sekans farklılıkları dahil tespit edilebilmektedir. İlk olarak kullanılan DNA bazlı moleküler markör tekniği RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemidir (Lörz, and Wenzel, 2004).

Bu markör tekniklerinden yararlanabilmek için öncelikli olarak hücre içerisindeki kromozomal olayların iyi bilinmesi gerekmektedir. Birçok kromozom çok sayıda genden meydana gelmektedir. Aynı kromozomda bulunan genler bağlantılı (link) genlerdir ve genetik çaprazlarda bağlantı (linkaj) gösterirler. Mayoz sırasında, aktarım birimi genler değil de kromozomlar olduğu için bağlantılı genler, bağımsız açılım konusunda özgür değildir. Teoride, bir kromozomun bütün bölgelerinde bulunan alleller, gamet oluşumu sırasında bir birim olarak aktarılmalıdır. Ama birçok durumda bu böyle olmaz. Birinci mayotik profaz sırasında homologlar eşleştiğinde (ya da sinapsis durumunda iken), kromozom segmentlerinin (bölümlerinin) karşılıklı (resiprokal) değiş-tokuşu gerçekleşebilir. Krossover adı verilen bu olay, allellerin homologlar arasında yeniden karılması ya da rekombinasyonu ile sonuçlanır. Krossover, günümüzde mayoz sırasında oluşan gerçek bir

fiziksel kırılma ve tekrar bir araya gelme olayı şeklinde düşünülmektedir. Kromozom segmentlerindeki bu değiş tokuş herhangi bir birey tarafından oluşturulan gametlerde, genetik çeşitlilik için aşırı derecede fazla potansiyel sağlar. Bu tip varyasyon, bağımsız açılım sonucu oluşan ile birlikte, bütün yavru bireylerin, anne ve babadan gelen allellerin çeşitli karışımlarını içermelerini sağlar. Bir kromozom üzerindeki herhangi iki bölge arasındaki krossover derecesi, aralarındaki uzaklık ile orantılı olup bölgeler arası uzaklık (inter-lokus distance) olarak adlandırılır. Dolayısıyla, hangi bölgenin göz önüne alındığına bağlı olarak rekombinant gametlerin yüzdesi değişir. Bu korelasyon, genlerin kromozom üzerindeki göreceli yerleşimlerini belirten kromozom haritalarının oluşturulmasında bir temel oluşturur (ner, 2003).

Genetik varyasyonlar 2 şekilde tahminlenebilir: (1) Fenotipik, (2) Genotipik. Genetik markörler bireyin genotipik ve fenotipik karakteristiklerini tanımlar. Genetik markör tipleri morfolojik, protein (biyokimyasal) ve DNA (moleküler) markörleridir. Bu alışmada Türkiye için önem teşkil eden bitkilerden olan mercimek bitkisi (*Lens culinaris*) nin genomu DNA markörleri ile haritalanmaya çalışılmıştır. Bu projede amaçlanan yeni DNA markörlerini mercimek bitkisine ait bağlantı genom haritasına eklemektir.

Çalışmada, rekombinant kendilenmiş hatlar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan 93 bireylik rekombinant hat, F2 bireylerinin 6 kere kendilenerek ve tek tohum nesil (single seed descent) yöntemi ile üretilmiştir. Bu hatlar, F2 poplasyonlarına nazaran homolog başına iki

kat daha fazla rekombinasyona ait bilgi içermektedir. Ayrıca bu hatların bir diğer avantajı çok sayıda birey elde ederek tekrarlamalı çalışmalara izin vermesidir..

Bu çalışmada, daha önceden aynı hat ile yapılmış olan genetik haritada kullanılan markörlere ilave olarak AFLP markörlerinin kullanılması ve haritalanamamış bölgelere ait bilgilerin bulunması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mercimek Bitkisi (*Lens culinaris Medic.*)

Mercimek, Fabaceae familyasındandır. Fabaceae çiçekli bitkilerin üçüncü en büyük ailesidir. Örneğin, soya fasülyesi, yer fıstığı, nohut ve mercimek bu familyada yer almaktadır (Paterson et al., 2000). Mercimek bitkisi ($2n=2x=14$) kendine döllenebilen diploid bir bitkidir. Haploid genom boyutu 4063 Mbp büyüklüğündedir (Arumuganathan and Earle, 1991).

Yaygın olarak Hindistan'ın belli bölgeleri, Orta Doğu, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika ve Avusturalya'da yetişmektedir. Yüksek oranda protein içermesinden dolayı genellikle insan beslenmesi olarak kullanılmaktadır. Genellikle diğer hububatlarla dönüşüm halinde yetiştirilmektedir. Bunun amacı, hububat hastalık döngüsünü kırmak ve atmosferik azotu fiske etmektir. Bu şekilde azotlu gübre kullanım ihtiyacı azaltılabilmektedir. Dünyadaki toplam mercimek ekim alanı (yaklaşık 48 ülkede) 3,8 milyon hektardır (yıllık verim 850 kg/ha). Bu miktarın % 58'i Asya ülkelerinde yetiştirilirken, % 37'si batı Asya ve kuzey Afrika ülkelerinde yetiştirilmektedir (Rubenna et al., 2003; Galasso et al., 2001, Muehlbauer, 2006; Furman and Baum, 2006). Mercimek, Orta Asya ülkelerinde fazla miktarda yetiştirilmektedir ve yıllık üretim 2.5 ton/ha oranındadır (Malhotra, 2006).

Lens grubunda, kültür edilmiş *L.culinaris medik.ssp. culinaris*, yabani *L.culinaris ssp. orientalis* bulunmaktadır. Ayrıca, 5 tane ilave tür daha tanımlanmıştır. Yabani türler genellikle Akdeniz çevresinde dağılım gösterirken, *L.culinaris ssp. orientalis* doğuda Asya'nın ortalarına kadar uzanmaktadır. Lens taksonomik olarak *L.culinaris ssp. orientalis*, *L.odemensis*, *L.ervoides* ve *L.nigricans* olarak 4 gruba ayrılmaktadır (Ferguson et al., 1998, Ferguson and Erskine, 2001). Ladizinsky, (1997), Türkiye'de, *L.culinaris medik.ssp. culinaris*, *L.culinaris ssp. orientalis*, *L.odemensis*, *L.nigricans*, *L.ervoides* ve *L.tomentosus* türlerinin bulunduğunu belirtmiştir.

2.2.Moleküler Markör Teknikleri

Moleküler seviyede ilk incelenen markörler izoenzimlerdir. İzoenzimler proteinlerin izo formlarıdır ve aminoasit kompozisyonlarına ve yüklerine göre değişim göstermektedirler. Bu farklılıklarından yararlanılarak elektroforez ile ayrımlanabilmektedirler (Meksem and Kahl, 2005). Bu ilk kullanılan tekniğin arkasından daha verimli sonuçlar alınabilen ve DNA bazlı moleküler markör teknikleri geliştirilmiştir.

Moleküler markör teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalarda F2, geriye melez (back-cross) populasyonları, yakın isogenik hatlar (near-isogenik lines), doubled haploidler ve rekombinant kendilenmiş hatlar (recombinant inbred lines, RILs) kullanılmaktadır. Bunlardan RIL populasyonları ile yapılan çalışmalardan iyi sonuçlar elde edilmektedir (Mohan et al. 1997).

Rekombinant kendilenmiş hatlar kendileme yoluyla elde edilmektedirler. Bu hatlar ayrıca tek tohuma dayalı hatlar olarak da adlandırılmaktadırlar. Yaklaşık 6 generasyon sonunda tamamen homozigot hatlara ulaşılmaktadır. RIL populasyonları, F_2 populasyonlarına göre daha iyi çözünürlük göstermektedirler, bu nedenle çalışmalarda kullanımları daha fazladır. Bitkilerin birçok çeşidine ait RIL hatlarının elde edilmesi mümkün olmaktadır. Örneğin, *Arabidopsis thaliana* ile yapılan genom haritama çalışmasında 300 adet RIL populasyonu kullanılmıştır (Meksem and Kahl, 2005).

Bir harita birimi, 100 mayoz ürününden 1 tanesinin recombinant olmasıdır. Bu ifade ünlü genetikçi Thomas Morgan'a atfen centMorgan birimi olarak ifade edilmektedir. Polimorfizimin belirlenmesinde moleküler markör tekniklerinden yararlanılabilmektedir. Moleküler markör teknikleri; AFLP, ALP, AP-PCR, AS-PCR, CAPS, DAF, ISSR, RAPD, RFLP, SAP, SCAR, SSCP, SLP, SSR ve STS teknikleridir. Aşağıdaki tabloda bu tekniklerin açık isimleri yer almaktadır (Mohan et al. 1997).

Çizelge 2.1 Moleküler Markör Teknikleri

Teknikler	Açık Adı
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ALP	Amplicon Length Polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
AS-PCR	Allele-specific PCR
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
DAF	DNA Amplification Fingerprinting
ISSR	Inter-SSR Amplification
RAPD	Random-Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAP	Specific Amplicon Polymorphism
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SSCP	Single-strand Conformation Polymorphism
SSLP	Micro and Minisatellite Simple Sequence Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STS	Sequence Tagged Sites

(Mohan et al. 1997)

Markör teknikleri kendi aralarında PCR (Polimerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli olmaları, polimorfizm gösterme kaliteleri, dominant veya ko-dominant markörlerin tespitine izin vermeleri, verimlilik, otomasyon ve maliyet açısından farklılıklar göstermektedirler. En sık kullanılan markör tekniklerinin bu özellikleri aşağıdaki Çizelge 2.2 de verilmiştir (Meksem and Kahl, 2005).

Çizelge 2.2 En Fazla Kullanılan Moleküler Markörlerinin Karşılaştırılması

Markör Tekniği	PCR Temelli Olması	Polimorfizim	Dominantlık	Verimlilik	Otomasyon	Maliyet
RFLP	Hayır	Düşük/Orta	Kodominant	Yüksek	Düşük	Yüksek
RAPD	Evet	Orta/Yüksek	Dominant	Düşük	Orta	Düşük
SCARS	Evet	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta	Orta
AFLP	Evet	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Orta
SSR	Evet	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
ISSR	Evet	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
STS	Evet	Yüksek	Kodominant Dominat	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük

(Meksem and Kahl, 2005)

Genetik haritalar bu moleküler veya morfolojik markörlerin linear olarak sıralanmak suretiyle bağlantı gruplarını oluşturmalarıyla elde edilmektedirler. Bu gruplama krossover veya rekombinasyon frekanslarına bağlı olarak değişmektedir (Meksem and Kahl, 2005).

2.3.AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism)

AFLP tekniği, toplam kesim yapılmış genomik DNA'dan elde edilen restriksiyon fragmentlerinin selektif PCR amplifikasyonu ile çoğaltılması prensibine dayanmaktadır.

AFLP tekniğini özetle açıklayacak olursak:

- (1) DNA'nın kesilmesi (Genomik DNA EcoRI (6 bp'lık tanıma bölgesi) ve MseI (4 bp'lık tanıma bölgesi) restriksiyon enzimleri ile kesilir. EcoRI her 2-2.5 kb'de bir kesim yaparken MseI 300-400 bp'de bir kesim yapar. Sonuçta çok sayıda fragment ortaya çıkar) ve oligonükleotid adaptörlerinin ligasyonu (spesifik ds oligonükleotid adaptörleri (25-30 bp) bu kesilen DNA fragmentlerine bağlanır).
- (2) Restriksiyon fragment setlerinin amplifikasyonu.
- (3) Amplifiye fragmentlerin jel analizi.

Selektif amplifikasyon, restriksiyon fragmentlerine bağlanarak uzayabilen ve sadece bu fragmentleri amplifiye edebilen primerlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Yöntem, çok sayıda fragmentin spesifik amplifikasyonu için vermektedir. Tipik olarak 50-100 restriksiyon fragmentinin amplifikasyonu ve denatüre poliaktilamid jelde deteksiyonu sağlanabilmektedir (Vos et al., 1995, Liscum and Oeller, 1995, Mohan et al., 1997).

Adaptörler genellikle kısa segmentli, restriksiyon bölgesine komplementer yapışkan uçlu çift iplikli DNA'lardır. Farklı restriksiyon enzimleri için ayrı adaptörlere ihtiyaç vardır. Farklı fragmentlere bağlanabilecek farklı primerlere ihtiyaç vardır. Primerler adaptör sekanslarına spesifiktirler (Liu, 1999).

AFLP markör tekniğinde PCR ürünleri floresan boyalarla veya radyoaktif maddeler ile işaretlenerek tespit edilebilmektedir. Floresan

boyalarla tespit radyoaktivite ile tespiti göre daha hassas olduğu için DNA'nın daha fazla seyreltilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Meksem and Kahl, 2005; L rz, and Wenzel, 2004). PCR  r nleri denatüre poliakrilamid jelde ayrımlanırlar (Liu, 1999).

AFLP yöntemi avantajları olan bir metottur. Bu metot ile çok sayıda polimorfizm elde edilebilmektedir. Örneğin; 1999 yılında Barker et al.in akasya bitkisi ile yaptıkları çalışmada 20 adet RAPD primeri ile 170 polimorfizm bulunurken, 4 adet AFLP primeri ile 645 polimorfik bant elde edilmiştir. Başka bir avantajı ise herhangi bir sekans bilgisine ihtiyaç duyulmamasıdır (Robinson and Haris, 1999).

AFLP metodu ile yüksek çözünürlükte haritalama kalitesi elde edilebilmektedir. AFLP tekniğinde zaman ve maliyet verimi, tekrarlanabilirlik, çözünürlük diğer markörlere (allozimler, RAPD, RFLP, mikrosatellit) göre daha iyi veya eşit seviyededir. Ancak kodominant markörler elde edilemez, elde edilen markörler dominanttır. Geniş uygulama alanıyla; sistematik, populasyon genetiği, DNA parmakizi analizi ve QTL çalışmalarında yararlanılmaktadır (Robinson and Haris, 1999; Ulrich et al., 1999).

Bu markör tekniklerinden yüksek çözünürlükte harita elde edilmesinde yararlanılmaktadır. Örneğin, Harushima et al. (1998) yaptıkları çalışmada 2275 markör ile  eltik bitkisine (*Oryza sativa L.*) ait yüksek çözünürlükte genetik bağlantı haritası elde etmişlerdir. Sonuçta 1521.6 cM lık bir harita elde edilmiştir (Harushima et al., 1998).

2.4.Mercimek Bitkisi ile Yapılan Haritalama Çalışmaları

Detaylı bir genetik bağlantı haritası ve araştırılan bazı özelliklerin lokasyonlarının aydınlatılması ürün geliştirme çalışmalarında oldukça önem taşımaktadır. Haritalama çalışmalarında iyi bir bağlantı haritasının oluşturulmasında rekombinant hatlar çok iyi bir kaynaktır. Bu haritalama popülasyonları, tarla testlerinde ve kantitatif karakterlerin lokalizasyonu için yeterli tohumu sağlamaktadır (Eujayl et al., 1998).

Weeden et al. (1992), yabani mercimek (*Lens ervoides* x *L. culinaris*) melez bireyleri ile yapmış oldukları haritalama çalışmasında toplam 64 (morfolojik, izoenzim ve DNA markörü) markör kullanmışlar ve 560 cM'lık bağlantı haritası elde etmişlerdir. DNA markörü olarak RFLP tekniğinden yararlanmışlardır. Çalışmalarındaki esas amaç, mercimek ve bezelyeye ait genetik bağlantı haritalarının karşılaştırılması olmuştur. Mercimek bitkisine ait elde ettikleri bağlantı haritasını, daha önceden bağlantı haritası oluşturulmuş *Pisum sativum* ile karşılaştırdıklarında, bu iki türde sekiz bölgenin korunmuş olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçta, mercimek ve bezelye genomunun belli kısımlarının ko-linear olduklarını tespit etmişlerdir.

Eujayl et al. (1997) *Lens culinaris* Medik. ile yaptıkları haritalama çalışmasında morfolojik, izoenzim, RFLP, oligonükleotid ve RAPD markör tekniklerinden yararlanmışlardır. Toplam 390 adet primerin kullanıldığı çalışmada 116 primerden 196 adet polimorfik bant elde

edilmiştir. Haritalama çalışmasında MAPMAKER (version 1.9) kullanılmış ve LOD skoru 3 olarak belirlenmiştir. Sonuçta 28 adet RAPD, 1 adet RFLP, 1 adet morfolojik ve 3 adet oligonükleotid markörü ile 9 adet bağlantı grubu elde edilmiştir. Bu çalışma ile DNA markörlerini kullanarak mercimek bitkisine ait bir bağlantı haritasının elde edilmesi amaçlanmıştır.

Eujayl et al. (1998), 86 adet rekombinant kendilenmiş hattın oluşan mercimek bitkisine ait genetik bağlantı haritasını oluştururken 177 markör (89 RAPD, 79 AFLP, 6 RFLP ve 3 Morfolojik markör) kullanmışlardır. Sonuçta, 79 adet polimorfik AFLP fragmenti tespit edilmiş, toplam 79 AFLP markörü içerisinde 21 tanesi bağlantı gurubu oluşturmamıştır. BU markörlerden 21 tanesi %5'den fazla eksik detaya sahip olduğu için kullanılmamıştır. Harita mercimek genomunun 1073 cM'lık kısmını içermiştir. Morfolojik markör olarak, kabuk açılması, tohum kabuk paterni ve çiçek rengi bölgeleri haritalanmıştır. Çalışmada, AFLP markörlerinin RAPD markörlerine göre daha fazla segregation distortion (Mendel açılımına uymayan sapmalar) gösterdiği gözlenmiştir. Mapmaker/Exp 3.0 kullanılarak bağlantı analizi yapılmıştır. Markörler gruplandırılırken LOD skoru 4.0 kullanılmıştır. Bu çalışmada, daha önceden yapmış oldukları genom haritasında kullanılan markörlere ilave markörler kullanarak mercimek bitkisine ait genom haritasını geliştirmeyi amaçlamışlardır. Önceki çalışmalarından farklı olarak bu çalışmada AFLP markörlerinden yararlanmışlardır.

Emami and Sharma (1999) mercimek bitkisi ile yaptıkları çalışmada 25 çaprazda 13 monogenik morfolojik markör incelemişler ve bunlardan 3 tanesinin bağlantı kurduğunu tespit etmişlerdir. Bu markörler, Ert (yayılma ve büyüme yeteneğini tetikler), Gs (kahverengi ve yeşil gövde) ve B1 (kahverengi-yeşil yaprak) olarak belirlenmiştir. B1 ve Gs arasındaki rekombinasyon frekansının %14, B1 ve Ert arasında % 34, Gs ve Ert arasında ise % 38 rekombinasyon frekansı bulunduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçta, B1 geninin Ert ve Gs arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada sadece morfolojik markörlerden yararlanılmıştır. Çalışmada morfolojik markörler yardımı ile mercimek bitkisine ait genom haritasını oluşturulması amaçlanmıştır. Sonuçta, morfolojik markörlerin kullanılmasıyla oluşturulmuş ilk mercimek bağlantı haritasını elde etmeyi başarmışlardır.

Eujayl et al. (1999), mercimek bitkisi ile yapmış oldukları başka bir çalışmada, donmaya karşı dayanıklı RIL (ILL5588 ve L692-16-1) mercimek popülasyonu kullanarak, 254 DNA markörü (RFLP, RAPD, ve AFLP) ile genetik bağlantı haritasını oluşturmuşlardır. Haritalama için MAPMAKER/EXP. ver. 3.0'den yararlanmışlardır. Sonuçta, OPS-16 primerinin donmaya karşı dayanıklı çeşite ait lokus üzerinde 9.1 cM lık aralıkla bağlandığını tespit etmişlerdir. Çalışmada amaçlanan, donmaya karşı dayanıklı mercimek türlerinin kalıtımı ile ilgili bölgeler hakkında bilgi elde edilmesi olmuştur. Sonuçta, bu çalışma ile soğuğa dayanıklı mercimek türleri ile ilgili ileride yapılacak markörlere dayalı çalışmalar için bir başlangıç noktası oluşturulmuştur.

Ford et al. (1999), ILL5588 *Ascochyta lentis*'e dayanıklı bireylerde bulk segregant analizi ile RAPD markörlerinden yararlanarak oluşturdukları haritada toplam 261 adet dekanükleotid primer kullanmışlar ve bunlardan 7 tanesinin dirençli lokus içerisinde dağılım gösteren polimorfik markörler oluşturduklarını tespit etmişlerdir. 7 tane RAPD marköründen 5 tanesi dirençlilik özelliğini taşıyan lokusun 30 cM'lık kısmında olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma ile ileriye yönelik klonlama çalışmalarına yardımcı olabilecek sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmanın diğer haritalama çalışmalarına göre farklılığı Bulk Segregant Analizi'nden yararlanılmış olmasıdır. Bağlantı haritası oluşturulurken MAPMAKER/QTL version 1.1 kullanılmıştır. Three point analizi yapılmış ve LOD skoru 3 seçilmiştir. Sonuçta elde edilen verilerin, mercimek bitkisinde dirençli genlerin klonlanmasına yönelik yapılacak çalışmalara bir temel teşkil edeceği ortaya konmuştur. Bu çalışmada araştırması yapılan bölge, *Ascochyta lentis* 'e karşı dayanıklılığı sağlayan ve major bir bölgede yer alan *AbR₁* dominant geni olmuştur.

Mercimek bitkisine ait ilk intraspesifik bağlantı haritası, *ascochyta* yanıklığına dirençli olma durumlarına göre değişiklik gösteren ILL5588 ile ILL7537 melezlenmesinden elde edilen F2 populasyonunun kullanılması ile 114 moleküler markör (100 RAPD, 11 ISSR, 3 RGA) ile gerçekleştirilmiştir. Bağlantı analizinde LOD skoru 4 olarak belirlenmiş. Intraspesifik haritanın toplam uzunluğu 784.1 cM olarak belirlenmiştir (Rubenna et al., 2003). Çalışmanın devamında *ascochyta* yanıklığına dirençli bölgelerin belirlenmesine yönelik QTL haritaları oluşturulmuş ve

hastalıkla ilgili bölgeler belirlenmiştir. Çalışmada, 72 adet markör (38 RAPD, 30 AFLP, 3 ISSR and stem pigmentasyonu) kullanılmıştır. 11 adet bağlantı haritası tespit edilmiştir. Toplam 23 markör hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Çalışmada, F2 populasyonu kullanılmış ve sonuçta ilk intraspesifik mercimek haritasını oluşturulması amaçlanmıştır. Ayrıca, Eujayl et al. (1998)'na ait çalışma ile yaptıkları karşılaştırmada, o çalışmaya ait verilerin ilave edilmesi sonucunda kendi araştırmalarında elde ettikleri harita boyutunun 1217 cM değerine ulaşacağını belirtmişler ve bu durumda oluşturdukları haritanın %13 daha uzun olacağını belirtmişlerdir (Rubenna et al., 2006).

Duran et al. (2004) yaptıkları çalışmada, *Lens culinaris ssp. culinaris* _ *L.c. ssp. orientalis* hibritine ait 113 F2 bitkisi ile bağlantı haritası oluşturmuşlardır. Toplam 200 markör (71 RAPD, 39 ISSR, 83 AFLP, 2 SSR ve 5 morfolojik) kullanmışlardır. Sonuçta, en fazla polimorfizimi AFLP markörleri ile elde etmişlerdir. LOD skorunun 3 olarak seçildiği çalışmada, toplam 161 markör, 2172.4 cM büyüklüğüne sahip haritada 10 adet bağlantı grubu altında toplanmıştır. İki markör arasındaki ortalama uzaklık ise 15.87 cM olarak tespit edilmiştir. Haritalama için Mapmaker/exp version 3.0 kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda, AFLP tekniğinin bağlantı haritasındaki önemi ortaya çıkarılmıştır.

Hamwieh et al. (2005) ILL 5588 (*fusarium solgunluğuna* dirençli) ve ILL 692-16-1(s) çaprazlamasından elde edilen 86 birey kullanmışlar ve 41 adet mikrosatellit ve 45 adet AFLP markörü ile bağlantı haritasını

oluşturulmuşlardır. Daha önceden elde edilen RAPD markörleri ile birlikte toplam 283 markör haritalanmış ve sonuçta 751 cM uzunluğundaki harita elde edilmiştir. Çalışmalarında, özellikle mikrosatellitleri kullanarak genom haritasını geliştirmeyi amaçlamışlardır.

2.5.Diğer Baklagiller ile Yapılan Haritalama Çalışmaları

Mercimek bitkisinin yanı sıra fasülye, soya fasülyesi, *Medicago truncatula* ve nohut gibi baklagillerin genomunun aydınlatılmasına yönelik genetik çalışmalarda gerçekleştirilmektedir. Örneğin, *Medicago truncatula* ile yapılan bir çalışmada, 124 birey ile çalışılmış ve RAPD, AFLP ve morfolojik markörlerden oluşan toplam 289 markör kullanılarak 8 bağlantı grubundan oluşan 1225 cM'lık bir harita elde edilmiştir (Thoquet et al., 2002).

Song et al., (2004) soya fasülyesi ile yaptıkları çalışmada, SSR, RFLP, RAPD, AFLP, morfolojik ve izoenzim markörlerini kullanmışlardır. Sonuçta, 1849 polimorfik bant (1015 SSR, 709 RFLP, 73 RAPD, 24 morfolojik, 6 AFLP ve 10 izoenzim) elde etmişlerdir. Toplam 20 bağlantı grubu elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan genomik DNA kütüphanesinden dizayn edilmiş SSR markörlerinden bir kısmı Gen bankasında bulunan genlerden, diğer kısmı ise bakteriyel yapay kromozomlarından elde edilmiştir. Çalışmada amaçlanan, bu geliştirilen SSR markörlerini kullanarak beş farklı soya fasülyesine ait haritalama çalışmalarının yapılması ve elde edilen bu beş haritanın kombine

edilmesi olmuştur. Sonuçta, soya fasulyesi genomunda bazı bölgelerin yüksek miktarda sekans homolojisine sahip oldukları ortaya konmuş ve bu durumun duplike olmuş bölgelerin lokusa spesifik geliştirilen markörler ile tespitinin zorlaşabileceği belirtilmiştir.

Blair et al. (2003), $2n=2X=22$ kromozom sayısına sahip olan fasülye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisi ile yaptıkları çalışmada 150 adet mikrosatellit markör kullanmışlardır. Mikrosatellit bölgeleri fasülye bitkisinin 11 kromozomu üzerinde yerlerini bulmuşlardır. Toplam harita uzunluğu 1720 cM ve iki mikrosatellit arası ortalama uzaklık 19.5 cM olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma ile Gen bankası veri tabanındaki sekanslardan yararlanarak geliştirilen yeni mikrosatellit markörleri yardımıyla elde edilen bu genetik harita ile fasulyede QTL analizine ve markörlere dayalı seleksiyon çalışmalarına temel oluşturulmuştur.

Flandez-Galvez et al., (2003), $2n=2X=16$ kromozoma sahip olan nohut bitkisine ait F2 popülasyonunda yaptıkları haritalama çalışmasında toplam 54 adet STMS, 3 adet ISSR ve 12 adet RGA markörü kullanmışlardır. LOD-skoru 2.0 olarak belirlemiş ve sonuçta maksimum rekombinasyon uzaklığı 20 cM olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bağlantı grup sayısı 8 olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile nohutta ascochyta yanıklığına karşı dirençlilik sağlayan bölgeye ait bilgi veren sonuçlar elde edilmiştir.

Tekeoğlu vd., (2002), nohut bitkisi ile yaptıkları çalışmada 146 adet RIL (*C. arietinum* X *Cicer reticulatum*) bireyinde 1 adet morfolojik, 9

adet izoenzim, 17 adet ISSR ve 90 RAPD markörü kullanarak 981.6 cM büyüklüğünde, markörler arası uzaklık 8.4 cM olan bağlantı haritasını elde etmişlerdir. Elde edilen bağlantı grup sayısı 9 olmuştur.

Taran et al., (2002) fasülye bitkisi ile yaptıkları çalışmada 49 AFLP, 43 RFLP, 11 SSR, 9 RAPD, 1 morfolojik markör kullanarak oluşturdukları haritada 12 bağlantı gruplu 1717 cM lık bir harita elde etmişlerdir. Tüm bağlantı grupları ele alındığında markörler arası ortalama uzaklık 15 cM olarak tespit edilmiştir. Maksimum uzaklık 48.6 cM bulunurken, minimum uzaklık 2.2 cM olarak tespit edilmiştir. Mapmaker/Exp 3.0 kullanılarak LOD skoru 3 olarak seçilmiştir.

Santra et al., (2000), nohut bitkisi ile yaptıkları çalışma of *C. arietinum* (FLIP84-92C, resistant parent) ve *C. reticulatum* Lad. (PI 599072 susceptible parent) 800 RAPD ve 100 ISSR primeri kullanmışlardır. Sonuçta 116 adet markör içeren 981.6 cM lık 9 bağlantı grubundan oluşan bir harita elde etmişlerdir. Markörler arası ortalama uzaklık 8.4 cM olarak belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada, Amerika Birleşik Devletleri, Washington State Üniversitesi'nden temin edilmiş WA8649041 (P1) ve Prekoz (P2) ebeveynlerin çaprazlanması ile elde edilmiş rekombinant hattın seçilmiş 93 adet birey kullanılmıştır. Bu hatlar, 6 generasyon boyunca kendileme yapılarak elde edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1 Rekombinant Mercimek Hatlarına Ait Tohumların Yetiştirilmesi

Her bir birey için 5 adet tohum torf:perlite (3:1) karışımının bulunduğu viyollere ekilmiştir. Biyomühendislik Bölümü deneme serasında yeterli ışık ve sıcaklıkta, gerçek yapraklar çıkana kadar yetiştirilmiştir. Yetişen genç yapraklar DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.2 DNA İzolasyonu

Tinnemore'da (1999) yer alan makro-prep DNA izolasyon yöntemi mikro-prep yöntemine göre modifiye edilerek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örnek miktarı doğrultusunda izolasyonda kullanılan

çözeltilerin miktarları hesaplanarak makro-prep olan yöntem mikro-prep izolasyon yöntemine dönüştürülmüştür.

DNA izolasyonunda kullanılan çözeltilerin içerikleri Ek1 de verilmiştir.

3.2.3 DNA Saflık Analizi

Tris-EDTA içinde çözünmüş halde bulunan DNA örneklerinden 2 µl alınarak 96 lık plaka içine tek tek konulmuş ve üzerlerine 8 µl ultra saf su ve 2 µl brom fenol mavisi ilave edilmiştir. Elde edilen DNA, ultra saf su ve boya karışımı daha önceden hazırlanmış ve 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) içerisinde yaklaşık 15 dk bekletilmiş %1 lik agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiştir.

3.2.3.1 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA saflık analizi için gerekli olan % 1 lik agaroz jel hazırlayacak kadar gerekli agaroz 1X TAE çözeltisi ile karıştırılarak 100 °C de kaynatılarak homojen hale getirilmiştir. 45 °C ye kadar soğuması beklendikten sonra elektroforez kasalarına dökülerek örnek miktarına uygun taraklar takılmış ve yükleme işleminin yapılacağı kuyucukların açılması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra kasa elektroforez tankının içine konulmuştur. Tanklara jelin üzerini 2-3 cm geçecek kadar 1X TAE çözeltisi ilave edilmiş ve jel yaklaşık 15 dk 1X TAE içerisinde bekletilmiştir.

Yukarıdaki bölümde açıklandığı şekilde hazırlanan örnekler jelde açılan kuyucuklara mikro pipet yardımıyla yüklenmişlerdir. Örneklerin yüklendiği kuyucuğun önündeki kuyucuğa 2 µl moleküler ağırlık markörü yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez kasaları güç kaynağına bağlanmış ve 60 voltta 120 dk boyunca yürütülmüşlerdir.

3.2.3.2 Jellerin Boyanması ve Görüntülenmesi

Örneklerin 2 saatlik yürüme işlemi tamamlandıktan sonra jeller saf su içine alınarak 5 µl/100 ml etidyum bromid boya ile 30 dk boyunca boyanmışlardır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra fazla boyanın uzaklaştırılabilmesi için jeller saf su ile 5 dk yıkanmıştır. Boyanan jellerin ultraviyole jel görüntüleyici ile fotoğrafları görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi ve boyamada kullanılan çözeltilerin içerikleri Ek1 de verilmiştir.

3.2.4 Spektrofotometrik DNA Miktarı ve DNA/RNA Miktarının Belirlenmesi

300 kat seyreltilen DNA örneklerinin spektrofotometre ile 260/280 nm dalga boylarında ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, ng/µl olarak miktarları ve DNA/RNA miktarları belirlenmiştir.

3.2.5 AFLP Markör Analizi

Çalışmada Li-Cor firmasının IRDye™ Fluorescent AFLP® kullanılmıştır. AFLP markör analizinde kullanılan çözeltilerin içerikleri Ek1 de verilmiştir.

3.2.5.1 DNA Örneklerinin Seyreltilmesi

AFLP markör analizi çalışmasında reaksiyon ortamına konulacak DNA örnek miktarının 9 µl içerisinde maksimum 100 ng veya 100 ng dan daha az miktarda olması gerektiği için 3.2.4 de belirtildiği şekilde ng/µl olarak miktarları belirlenen örnekler reaksiyon için gerekli olan oranda seyreltilmişlerdir.

3.2.5.2 Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Digest Edilmesi

	Hacim (toplam 12,5 µl)
5X Reaksiyon Tamponu	2.5 µl
DNA	9 µl
EcoR1/Mse1 Enzim Karışımı	1 µl

Yukarıda belirtilen şekilde reaksiyon tüpleri içerisine hazırlanan karışım 37 °C de 2 sa, 70 °C 15 dak reaksiyona tabi tutulmuştur.

3.2.5.3 Adaptörlerin Ligasyonu

Digest edilmiş genomik DNA	12.5 µl
Adaptör karışımı	12 ml
T4 DNA Ligaz	0.5 µl
	25 µl

20 °C de 2 saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonunda bu örneklerden 10 µl alınarak üzerlerine 90 µl TE tamponu ilave edilerek 1:10 oranında seyreltilmişlerdir.

3.2.5.4 Pre-amplifikasyon

1:10 seyreltme	2.5 µl
AFLP 1:10 preamplifikasyon karışımı	20 µl
PCR reaksiyon tamponu	2.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 unit/ µl)	0.5 µl
	25.5 µl

Yukarıda belirtilen tüpler içine alınmış reaktanlar karıştırıldıktan sonra kısa santrifüj (short spin) yapılmıştır.

Elde edilen karışım aşağıda belirtilen şekilde programlanmış thermal cyler cihazında reaksiyona tabi tutulmuştur.

26

94 °C 30 sn

56 °C 1 dk

72 °C 1 dk

4 °C ∞

20 döngü

3.2.5.5 PCR Reaksiyon Tamponu ve Taq DNA Polimeraz

Enzim Denemesi

Çalışmada farklı markalarda enzimler ve bu enzimlere ait tamponlarla deneme yapılmış ve sonuçta Supertherm marka enzim ve tamponunun en uygun sonucu verdiği tespit edilmiştir.

3.2.5.6 Pre-amplifikasyon Sonrası Seyreltme Denemesi

Seyreltme (Dilüsyon) faktörü: Ürünün çeşidine göre seyreltme faktörü değiştiği için bireylere denemeden önce ebeveynlerde 1:10, 1:20, 1:40 seyreltmeleri denenerek uygun seyreltme oranı belirlenerek bireylere uygulanmıştır. Sonuçta 1:40 seyreltme oranının en iyi sonucu vermesiyle tüm çalışmada bu oran kullanılmıştır.

3.2.5.7 Selektif AFLP Amplifikasyonu

Selektif amplifikasyon aşamasında 1:40 oranında dilue edilmiş pre-amplifiye DNA ile primerler reaksiyona girmişlerdir. Primerlerden

EcoR1 primerleri IRDye 700 ve IRDye 800 floresan boya ile işaretlenmiştir. Reaksiyon aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir:

Taq DNA polimeraz çalışma karışımı	6 µl
Dilue edilmiş pre-amp DNA	2 µl
MseI	2 µl
IRDye 700	0.5 µl
800	0.5 µl
11 µl	

Yukarıdaki oranlar örnek miktarına göre hesaplanarak hazırlanmıştır.

Kullanılan Primerler

E-AAC	M-CAA
E-AAG	M-CAC
E-ACA	M-CAG
E-ACC	M-CAT
E-ACG	M-CTA
E-ACT	M-CTC
E-AGC	M-CTG
E-AGG	M-CTT

Yukarıdaki EcoR1 (E) ve Mse1 (M) primerleri 64 adetlik primer kombinasyonu şeklinde önce ebeveynlere daha sonra bunlardan polimorfizm gösteren 20 adedi bireylerde denenmiştir.

Selektif amplifikasyon aşamasında PCR için thermal cycler cihazı aşağıdaki gibi programlanarak amplifikasyon yapılmıştır.

- | | |
|----------|-------|
| 1. 94 °C | 30 sn |
| 2. 65 °C | 30 sn |
| 3. 72 °C | 1 dk |
| 4. 94 °C | 30 sn |
| 5. 65 °C | 30 sn |
| 6. 72 °C | 1 dk |
| 7. 94 °C | 30 sn |

65 °C lik primerlerin bağlanma sıcaklığı 56 °C ye düşene kadar her döngüde 0.7 °C düşülerek döngüler devam ettirilmiştir. Bu tekrarda döngü sayısı 42'ye ulaşmıştır.

43. 40 numaralı döngüye dönülerek 23 defa tekrar edilmiştir.

44. 4 °C ∞

PCR tamamlandıktan sonra cihazdan alınan örneklerin üzerine 5 µl Blue Stop Çözeltisi ilave edilerek 94 °C de 3 dk denatürasyon işlemi ile reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Denatürasyon sonrasında örneklerin bulunduğu tüpler buz içerisinde tutularak soğumaları sağlanmıştır.

Yukarıdaki bütün basamaklar tamamlandıktan sonra örnekler denatüre poliakrilamid jel elektroforezine hazır hale gelmiştir. Floresan boya ile işaretli örneklerin ışıkla zarar görmemeleri için yüklenene kadar karanlıkta ve buzda bekletilmişlerdir.

3.2.6 Poliakrilamid Jel Elektroforezi

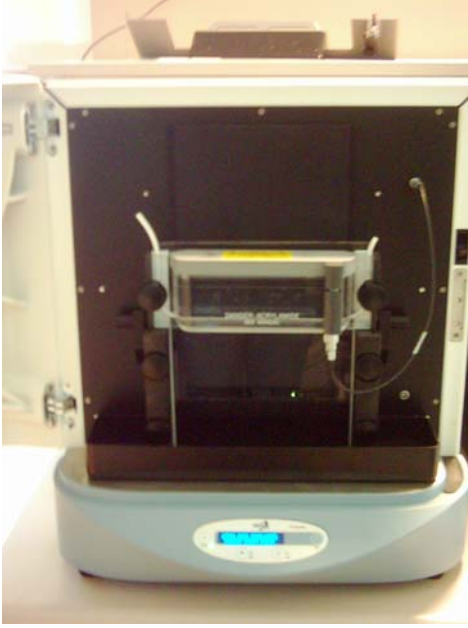
Poliakrilamid Jel Elektroforezi için Sabancı Üniversitesi, Doğa ve Mühendislik Bilimleri, Genom laboratuvarında bulunan LI-COR/Biosciences, NEN® Model 4300, DNA Analyzer kullanılmıştır. Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltilerin içerikleri Ek1 de verilmiştir.

3.2.6.1 Cihazın Hazırlanması

Cihazın bağlı olduğu bilgisayarda Saga Software programı ve internet bağlantıları açılmıştır. Programa yüklenecek örnekler ve markör ile ilgili bilgiler girilerek yeni bir dosya açılmıştır (bu işlem her denemede tekrarlanmıştır).

3.2.6.2 Donmuş Poliakrilamid Jelin Bulunduğu Cam Aparatın Cihaza Yerleştirilmesi

Düzenegın yerleştirileceğı tanklar 1X TBE ile doldurulmuş ve düzenek yerleştirilmiştir. Elektrik akımını sağlayacak ilgili bağlantılar yapılmıştır. Ön yürütme işlemi için komut verilmiştir.



Şekil 3.1 LI-COR/Biosciences, NEN® Model 4300, DNA Analyzer

3.2.6.3 Örneklerin Yüklmesi ve Yürütme İşlemi (Run)

Ön yürütme (pre-run) işlemi tamamlanan jel yükleme için hazır hale gelmiştir. Yükleme için özel yükleme uçları ile yükleme işlemine geçilmiştir. Örneklerin yüklmesi işlemi tamamlandıktan sonra yürütme (run) işlemi için bilgisayardan komut verilmiştir.

Şekil 3.5 de Yürütme işlemi sırasında bantların cihazın bağlı olduğu bilgisayar ekranındaki görüntüleri verilmiştir. Yürütme işlemi süresince bantların çıkışı ekranda takip edilmiştir.

3.2.6.4 AFLP Markör Analizi Sonuçlarının Skorlanması

Kullanılan primerlerin gösterdikleri polimorfizmlerde, P1(WA41)(anne)'ye benzeyen bireyler A, P2 (Prekoz)(baba)'ya benzeyen bireyler B olarak skorlanmıştır. Okunması yapılamayan bantlar ise (-) olarak bırakılmıştır.

Skorlama sonuçları Microsoft Office Excel programında girilmiş ve daha sonra QGENE de incelenebilmek için Text dosyasına dönüştürülmüştür.

3.2.6.5 Haritanın Oluşturulması

Bu çalışmada, tespit edilen 178 AFLP markörü dışındaki 192 RAPD, 18 ISSR ve 3 morfolojik markör tez danışmanı Sayın Doç.Dr. Bahattin Tanyolaç'ın izniyle Nurdan Güldiken'in "Kantitatif Trait Locus Analizi ile Çiçeklenme Zamanını Kontrol Eden Genlerin Haritalanması" konulu yüksek lisans tezinden alınmıştır.

Qgene haritalama programı kullanılmıştır. Herhangi iki markör arasındaki bağlantı belirlenirken LOD skoru 4 olarak belirlenmiştir. Haritalamada markör uzaklıkları için Kosambi fonksiyonu seçilmiştir. Sonuçta, bağlantı grupları ve bu gruplar üzerinde markörlerin kapladıkları alan ve birbirlerine olan uzaklıkları tespit edilmiştir. Bu alan ve uzaklık centimorgan (cM) olarak ifade edilmiştir (Meksem and Kahl, 2005, Van Ooijen, 1999).

4. BULGULAR

4.1. AFLP Markör Analizi Bulguları

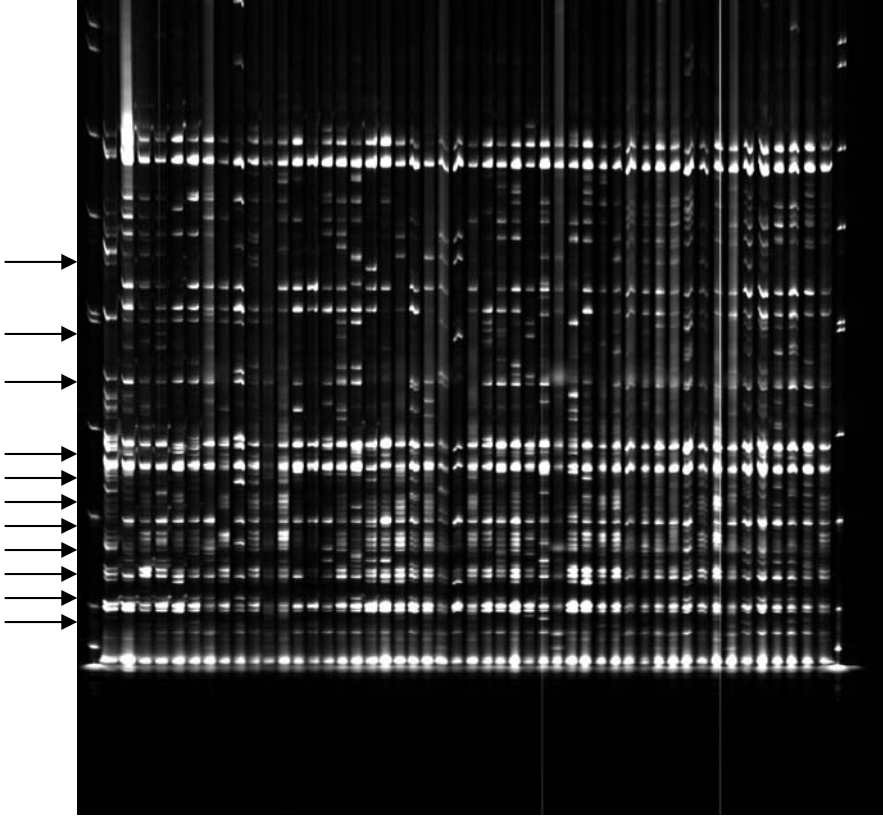
Çalışmada, aşağıdaki Çizelge 4.1 de belirtilen 64 adet primer kombinasyonu ebeveynlere denenmiştir. Polimorfizm elde edilen kombinasyonların vermiş olduğu polimorfik bant sayıları da Çizelge 4.1 de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan primer kombinasyonları ve elde edilen polimorfik bant sayıları

Primerler	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	-	5	-	9	-	-	8	-
E-AAG	-	-	-	-	11	-	14	-
E-ACA	-	11	-	10	-	-	12	-
E-ACC	-	-	12	-	-	-		2
E-ACG	-	-	-	-	-	-	12	-
E-ACT	-	11	-	3	7	-	11	-
E-AGC	-	9	-	7	-	-	11	-
E-AGG	-	-	10	-	-	-		3

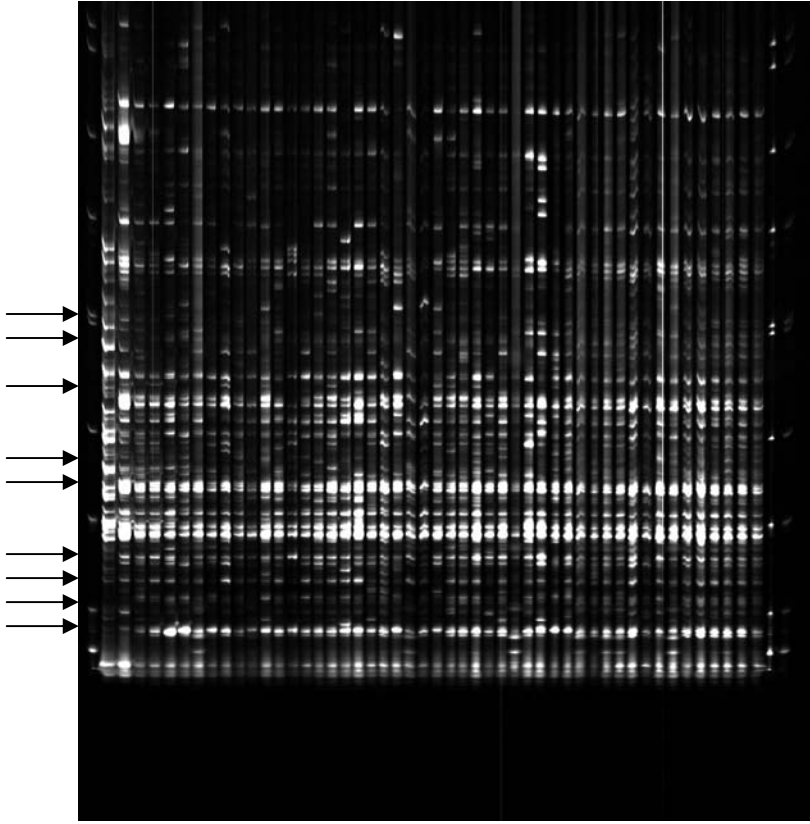
Yukarıda çizelgede belirtildiği gibi 20 primer kombinasyonundan toplam 178 adet polimorfik bant elde edilerek skorlanmıştır. Primer başına ortalama 9 bant elde edilmiştir.

Aşağıda elde edilen poliakrilamid jel görüntülerine ait örnekler verilmiştir.



M P1P2

Şekil 4.1 M-CAC-E-ACA (700) primer kombinasyonu denemesi sonucu elde edilen poliakrilamid jel görüntüsü (Markör, P1, P2 ve ilk 47 örnek görülmektedir)



MP1P2

Şekil 4.2 M-CAC-E-AGC (800) primer kombinasyonu denemesi sonucu elde edilen poliakrilamid jel görüntüsü (Markör, P1, P2 ve ilk 47 örnek görülmektedir)

4.2. Genom Haritalama Bulguları

Mercimek RIL populasyonunda 178 AFLP, 192 RAPD, 18 ISSR ve 3 morfolojik olmak üzere toplam 391 polimorfik markör elde edilmiş, bunlardan markörlerden 166 tanesi haritalanabilmiştir (%42.5). Geriye kalan 225 polimorfik DNA markörü hiç bir bağlantı grubuna dahil

olmamıştır. Sonuçta, toplam 11 tane bağlantı (linkaj) grubu elde edilmiştir. Haritanın toplam büyüklüğü 2091.5 cM olarak saptanmıştır.

Bağlantı grubu 1 (LG1) 595.8 cM uzunluğunda olup bu bağlantı gurubu üzerinde 41 markör (36 AFLP, 4 RAPD ve 1 morfolojik markör) haritalanmış ve genomun % 28.48'ini oluşturmuştur. Bu grupta iki markör arasındaki ortalama mesafe 14.53 cM dır olarak hesaplanmıştır. Bu grupta yer alan markörler MCTGEAAG_1, MCTGEAAG_4, MCTGEAAG_5, MCTGEAAG_7, D01a, MCATEAAG_5, AB07c, MCTGEAGC_9, MCATEAGC_4, MCTGEACA_10, MCACEACT_1, MCACEACA_10, MCATEAAG_6, D01b, MCTGEAGC_8, MCTTEAGG_2, MCACEAAC_4, MCACEAGC_5, MCTGEAAG_2, MCATEAAG_9, MCATEAAG_7, spotting, MCTAEACT_2, MCTAEAAAG_7, Q10c, MCAGEAGG_5, MCTGEAGC_11, MCTGEACT_3, MCATEAGC_2, MCATEAAG_8, MCTGEAAC_8, MCTGEAAG_8, MCTGEACG_12, MCTGEAAC_7, MCTGEAAG_3, MCTGEACG_11, MCTGEAAG_10, MCTGEAAG_6, MCTGEAAG_13, MCTGEAAG_14 ve MCTGEACG_10'dir.

LG 2, bu grup 160.3 cM uzunluğunda olup 24 markör (6 ISSR ve 18 RAPD) haritalanmış ve genomun % 7.66'sını oluşturmuştur. Bu gruptaki iki markör arasındaki ortalama mesafe 6.68 cM dır. Bu grupta yer alan markörler UBC8401, UBC79a, O17b, b19, D20b, AB14a, UBC721, I08c, UBC79b, CS543, AB14b, U5022, AB12b, CS311, D07, AB08, U7151, D20e, N19a, D06, UBC98, UBC318a, Q02a, U7712' dir.

LG 3, bu grup 407.5 cM uzunluğunda olup 19 markör (15 AFLP ve 4 RAPD) haritalanmış ve genomun % 19.48'ini oluşturmuştur. Bu gruptaki iki markör arasındaki ortalama mesafe 21.45 cM dir. Bu grupta yer alan markörler MCATEAGC_1, MCTGEACT_9, MCTAEAAG_2, MCTGEAGC_5, MCAGEACC_2, MCTAEAAG_9, MCTTEAGG_1, MCTGEAGC_3, MCTGEACA_9, MCACEACA_9, I04, MCAGEAGG_2, M18d, N11, MCACEACA_11, MCAGEACC_10, MCTGEACA_11, R16b ve MCATEAGC_3' dir.

LG 4, bu grup 177.4 cM uzunluğunda olup 19 markör (4 ISSR ve 15 RAPD) haritalanmış ve genomun % 8.48'ini oluşturmuştur. Bu gruptaki iki markör arasındaki ortalama mesafe 9.34 cM dir. Bu grupta yer alan markörler UBC807_11, D16, A08b, F19, UBC807_3, U7711, P10, H11a, U715_2, UBC807_12, UBC840_3, A19, E18, E19, AB19c, O02, M18a, B01a ve AB18a'dir.

LG 5, bu grup 117.1 cM uzunluğunda olup 12 markör (11 RAPD ve 1 ISSR) haritalanmış ve genomun % 5.59'unu oluşturmuştur. Bu grupta iki markör arasındaki ortalama mesafe 9.76 cM dir. Bu grupta yer alan markörler B02, I12, Q20, AB18, B14, C07, AB18b, AC17, UBC8072, U7154, B06b ve C06'dir.

LG 6, bu grup 161.1 cM uzunluğunda olup 11 markör (4 ISSR ve 7 RAPD) haritalanmış ve genomun % 7.7'sini oluşturmuştur. Bu grupta iki markör arasındaki ortalama mesafe 14.64 cM dir. Bu grupta yer alan

markörler B08a, AD11a, AD11b, M09, B11, M09a, UBC440, UBC220, UBC318b, UBC8074 ve B01'dir.

LG 7, bu grup 90.8 cM uzunluğunda olup 9 markör (5 ISSR ve 4 RAPD) haritalanmış ve genomun % 4.34'ünü oluşturmuştur. Bu grupta iki markör arasındaki ortalama mesafe 10.08 cM dir. Bu grupta yer alan markörler UBC80713, B10b, UBC8082, AD01a, UBC8075, AB14c, B19a, UBC8076 ve UBC8078'dir.

LG 8, bu grup 98 cM uzunluğunda olup 9 markör (8 RAPD ve 1 ISSR) haritalanmış ve genomun % 4.68'ini oluşturmuştur. Bu grupta iki markör arasındaki ortalama mesafe 10.89 cM dir. Bu grupta yer alan markörler G09, CS542, F18, CS541, CS312, N19, I11, UBC90 ve U7631'dir.

LG 9, bu grup 165.4 cM uzunluğunda olup 9 markör (9 AFLP) haritalanmış ve genomun % 7.9'unu oluşturmuştur. Bu grupta iki markör arasındaki ortalama mesafe 18.38 cM dir. Bu grupta yer alan markörler MCAGEAGG_6, MCACEAAC_2, MCTTEACC_1, MCAGEAGG_7, MCTAEAAG_8, MCTAEAAG_4, MCAGEAGG_10, MCTGEAAC_6 ve MCAGEAGG_4'dir.

LG 10, bu grup 54 cM uzunluğunda olup 7 markör (2 ISSR ve 5 RAPD) haritalanmış ve genomun % 2.58'ini oluşturmuştur. Bu grupta iki markör arasındaki ortalama mesafe 7.71 cM dir. Bu grupta yer alan

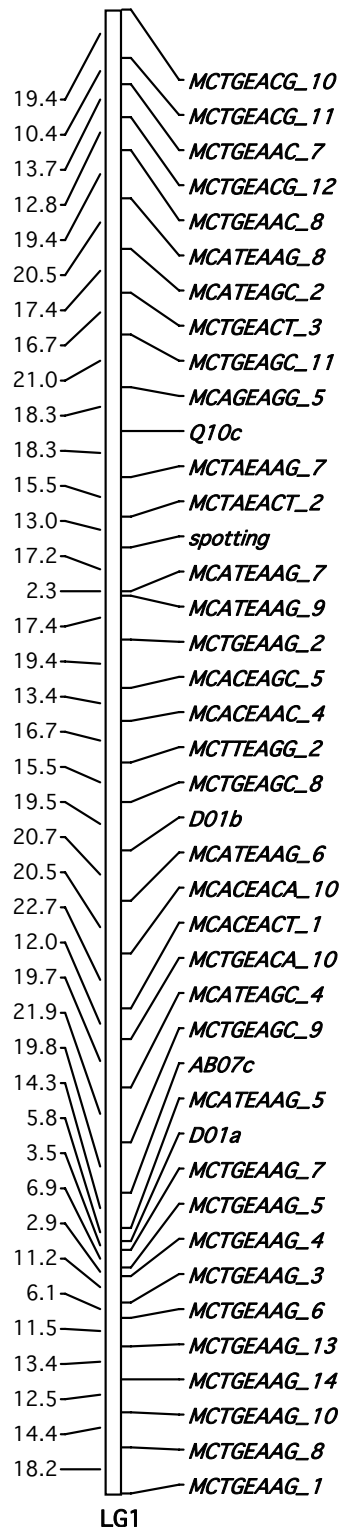
markörler U7153, D05, AB13b, G11, UBC8081, UBC8402 ve U5021'dir.

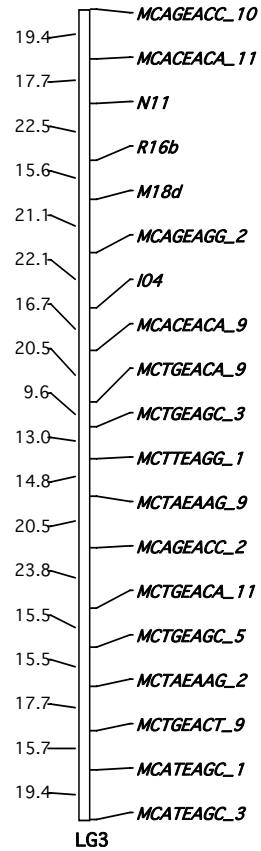
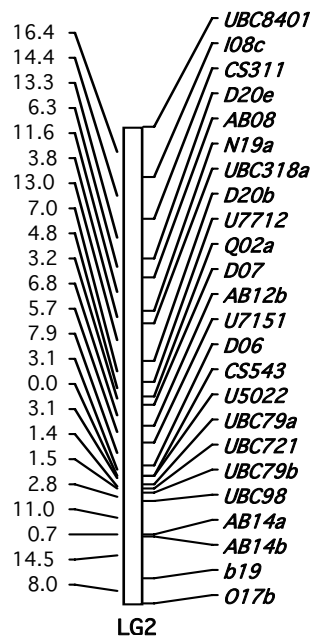
LG 11, bu grup 64,1 cM uzunluğunda olup 6 markör (5 RAPD ve 1 morfolojik markör) haritalanmış ve genomun % 3.06'sını oluşturmuştur. Bu grupta iki markör arasındaki ortalama mesafe 10.68 cM'dir. Bu grupta yer alan markörler B10a, cotcolor, P02, Q10a, N17 ve N15'dir.

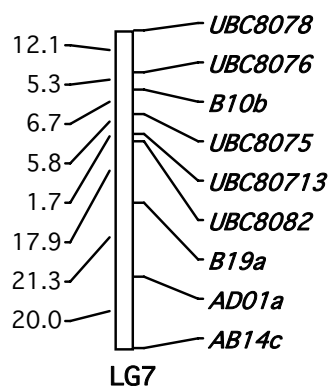
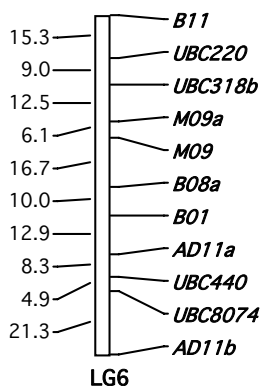
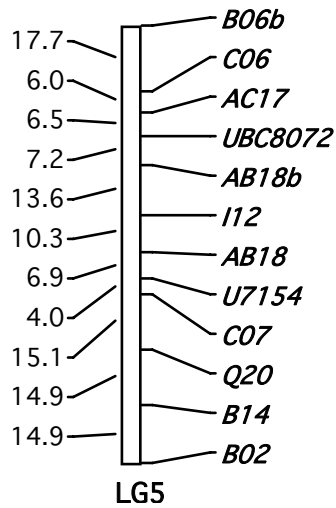
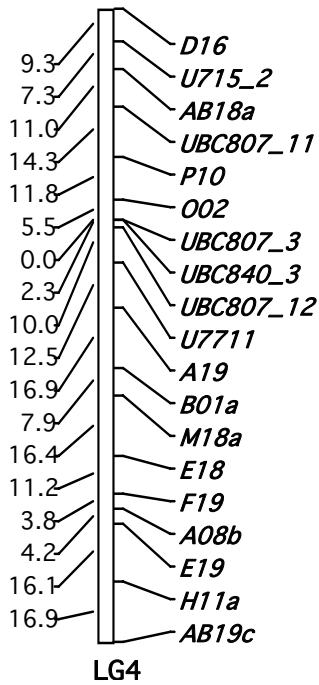
Çizelge 4.2 Elde Edilen Bağlantı Genom Haritasının Özellikleri

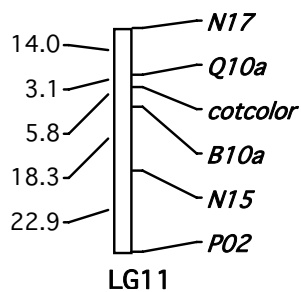
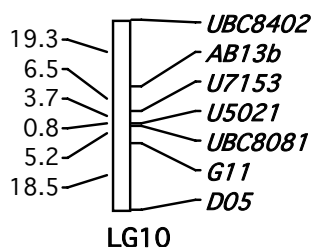
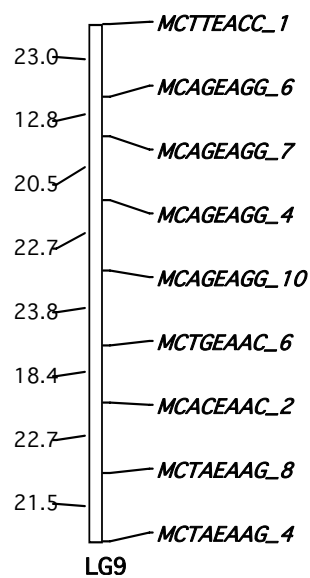
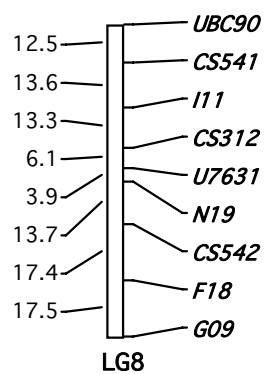
Bağlantı Grup	Uzunluk (cM)	Markör Sayısı	İki Markör Arasındaki Ortalama Uzaklık
LG 1	595.8	41(%28.48)	14.53
LG 2	160.3	24 (%7.66)	6.68
LG 3	407.5	19 (%19.48)	21.45
LG 4	177.4	19(%8.48)	9.34
LG 5	117.1	12(%5.59)	9.76
LG 6	161.1	11(%7.7)	14.64
LG 7	90.8	9 (%4.34)	10.08
LG 8	98	9 (%4.68)	10.89
LG 9	165.4	9 (%7.9)	18.38
LG 10	54	7 (%2.58)	7.71
LG 11	64.1	6 (%3.06)	10.68

DNA markörlerinin oluşturduğu bağlantı grupları aşağıda sırasıyla verilmiştir.









Yaptığımız analiz sonucunda haritada yer alan toplam 166 markörden 96 tanesi (% 57.83) mendel açılımına uymayan sapmalar göstermiştir. Aşağıdaki tabloda mendel açılımından sapma gösteren markörlerin isimleri verilmiştir.

Çizelge 4.3 Mendel Açılımından Sapma Gösteren (Segregation Distortion) Markörler

MCTGEAAG_1	UBC8401	B08a
MCTGEAAG_4	UBC79a	AD11a
MCTGEAAG_5	O17b	AD11b
MCTGEAAG_7	b19	M09
D01a	D20b	B11
MCATEAAG_5	MCATEAGC_1	M09a
AB07c	MCTGEACT_9	UBC440
MCTGEAGC_9	MCTAEAAG_2	UBC80713
MCATEAGC_4	MCTGEAGC_5	G09
MCTGEACA_10	MCAGEACC_2	CS542
MCACEACT_1	MCTAEAAG_9	MCAGEAGG_6
MCACEACA_10	MCTTEAGG_1	MCACEAAC_2
MCATEAAG_6	MCTGEAGC_3	MCTTEACC_1
D01b	MCTGEACA_9	MCAGEAGG_7
MCTGEAGC_8	MCACEACA_9	MCTAEAAG_8
MCTTEAGG_2	I04	MCTAEAAG_4
MCACEAAC_4	MCAGEAGG_2	U7153
MCACEAGC_5	M18d	D05
MCTGEAAG_2	N11	UBC8072
MCATEAAG_9	MCACEACA_11	MCTGEACG_12
MCATEAAG_7	MCAGEACC_10	MCTGEAAC_7
Spotting	MCTGEACA_11	MCTGEAAG_3
MCTAEACT_2	R16b	MCTGEACG_11
MCTAEAAG_7	UBC807_11	MCTGEAAG_10
Q10c	D16	MCTGEAAG_6
MCAGEAGG_5	A08b	B10a
MCTGEAGC_11	F19	Q20
MCTGEACT_3	UBC807_3	AB18
MCATEAGC_2	U7711	B14
MCATEAAG_8	P10	C07
MCTGEAAC_8	B02	AB18b
MCTGEAAG_8	I12	AC17

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda, DNA markörlerinin kullanılmasıyla çeşitli ürünlerde hastalıklara dirençlilik konusunda yapılan ıslah çalışmalarında verimliliğin arttırılması sağlanmıştır (Baum et al., 2000). Elde edilen haritalar, markörlere dayalı seleksiyona (MAS, markör assisted selection) ve direnç genlerinin klonlanmasına yardımcı olmaktadır (Hamwieh et al., 2005).

Çalışmamızda, *Lens sp.* ye ait genetik bağlantı haritasında 166 markör (60 AFLP, 81 RAPD, 23 ISSR, 2 morfolojik) yer almış ve genomun 2091.5 cM lık kısmını kavramıştır. Daha önceki çalışmalarda elde edilen haritalarda (Havey and Muehlbauer 1989; Weeden et al., 1992) sırasıyla genomun 330 ve 560 cM lık kısmı kavranmış ve markörler arası ortalama mesafe sırasıyla 12.8 cM ve 8.75 cM olarak elde edilmiştir. Eujayl et al. (1998) ise bu değeri 6 cM a kadar düşürmüş ve genomun 1073 cM lık kısmını kavramışlardır. Elde etmiş olduğumuz haritada markörler arası ortalama mesafe 12.5 cM olarak tespit edilmiştir. Yukarıda belirtilen çalışmalarda mercimek genomunu daha fazla sıklıkta DNA markörü ile haritalamışlardır. RIL populasyonunun kullanılması ile RAPD ve AFLP gibi dominant markörlerin yaratmış olduğu dezavantajlarda ortadan kaldırılabilmiştir. Hamwieh et al. (2005) mercimek bitkisine ait oluşturdukları haritada 14 adet bağlantı grubu elde etmişlerdir. Bunlardan 9 tanesi majör grup olmuştur. Toplam harita boyutunu ise 751 cM olarak tespit etmişlerdir.

Bir çok ürün için gerçekleştirilen haritalama çalışmalarında AFLP tekniği güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik özelliğine sahiptir. Ayrıca tek bir analiz ile çok sayıda bölgeye ait bilgi elde edilebilmektedir (Powell et al., 1997). Çalışmamızda tespit edilen 178 AFLP marköründen 60 tanesi genomik bağlantı haritasında yer almış ve bunlardan büyük çoğunluğu 1. bağlantı grubunda toplanmıştır. Eujayl et al. (1998) yaptıkları çalışmada çoğunlukla AFLP markörlerinin 2. bağlantı grubunda toplandığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen markörler mercimek bitki ıslahı ile ilgili yapılan genomik çalışmalara yardımcı veriler sağlayacaktır. Bu çalışma sonunda elde edilen markörlere ilave markörler bulundukça bağlantı kuramamış gruplara bağlanarak yeni bağlantı gruplarının elde edilmesi mümkün olabilecektir. Bu şekilde iki markör arasındaki mesafe de küçültülebilecektir. Elde edilen bu kapsamlı haritalar ile mercimek bitkisinin agronomik yönden özelliklerinin daha ileriye götürülebilmesi sağlanabilecektir.

Çalışmada temel amacımız genom haritalama olmasına rağmen yaptığımız markör istatistiksel analizi sonucunda segregation distortion gösteren markörler de saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada 70 tane markör 1:1 açılma gösterirken 96 tanesi (% 57.83) mendel açılımına uymayan sapmalar göstermiştir. Beklenen değerlerdeki genotipik frekanslardan sapma ve açılım kurallarının bozulması durumuna segregation distortion (mendel açılımına uymayan sapmalar) adı verilmektedir. Evrimsel açıdan üzerinde durulması gereken bu sapmalar heterozigot allel veya

heteromorfik kromozomlardaki populasyon frekansının yükselmesine neden olmaktadır. Bu sapmalar genetik haritalarda sıklıkla görülen bir durumdur. Bitkilerde türlere, açılım populasyonuna ve moleküler markörlere göre değişim göstermektedir. İlk olarak, bu sapmalar mısır bitkisine (Lu et al.,2002; Sibov et al., 2003) ait bağlantı genom haritasında tespit edildikten sonra çeltik (Harushima et al., 1996), arpa (Konishi et al., 1992), çavdar (Pawlowshi, et al., 1998) gibi bitkilere ait haritalarda da saptanmıştır. Kodominant markörler kullanılarak oluşturulan haritalara göre dominant markörlerin kullanıldığı haritalarda bu sapmanın daha fazla olduğu saptanmıştır. Yine katlanmış haploid ve rekombinant kendilenmiş hatların daha fazla miktarda açılmadan sapma gösterdikleri tespit edilmiştir. Mendel açılımına uymayan sapmalar çok sayıda faktörün sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir. Populasyonlara ait genomik analizlerde genotiplerindeki ve istatistiksel analizlerdeki hatalar beklenen açılım oranlarında meydana gelen sistematik sapmalara neden olmaktadırlar. Örneğin, DNA markörlerinin bağlantı bölgelerinde oluşan mutasyonlar bu sapmaların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Mendel açılımına uymayan sapmalar birçok ürüne ait genetik haritaların oluşturulmasını etkileyen önemli bir faktördür. Markörler arası genetik uzaklık ve bağlantı grupları üzerindeki markörlerin sırası bu sapmalardan etkilenebilmektedir (Taylor and Ingvarsson, 2003, Liang-Xian et al., 2006).

Çalışmada bağlantı kuramayan markörler bize bu markörlerin bağlantı kurmalarını sağlayacak çok sayıda marköre ihtiyaç bulunduğunu

göstermiştir. Bu durum mercimek genomunun diğer baklagillere nazaran oldukça büyük bir genoma sahip olmasından kaynaklanmaktadır (≈ 4 GB). Bundan sonra yapılacak çalışmalarda kullanılacak markör sayısının artırılması ile markörler arası mesafenin kısılması sağlanabilecektir.

Sonuç olarak, bu çalışmada bağlantı genom haritasının bazı bölümlerini RAPD, AFLP, ISSR ve morfolojik markörler kullanarak kavramaya çalışılmıştır. RAPD ve AFLP markörlerinin bağlantı genom haritası oluşturulurken kullanışlı markörler oldukları anlaşılmıştır. Çalışmada kullanılan rekombinant kendilenmiş hatlar, AFLP ve RAPD gibi dominant markörlerin oluşturmuş oldukları bir takım dezavantajların elimine edilmesine yardımcı olmuştur. Yapmış olduğumuz bu harita ileride daha fazla sayıda DNA markörü ilave edilerek yüksek çözünürlükte mercimek genom haritasının oluşturulmasında kullanılabilir. Ayrıca, RIL popülasyonunda farklılık gösteren kantitatif özellikler belirlenerek QTL analizleri yapılabilecektir.

EK 1 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

DNA İzolasyon Çözeltileri

1. DNA Ekstraksiyon Tamponu

Tris	12.10 g
Sorbitol	63.77 g
EDTA	1.68 g
Na bisülfıt	3.802 g/l
H ₂ O(ultra saf)	1 l
pH	7.5

2. Nüklei Liziz Tamponu

1 M Tris-HCl, pH 8	200ml
0.5 M EDTA, pH 8	100 ml
5 M NaCl	400 ml
CTAB	20 g
H ₂ O(ultrasaf)	300 ml
pH	7.5

3. Sarkozil Çözeltisi (%5)

Sarkozil(N-Lauryl Sarcosine)	50 g
H ₂ O(ultrasaf)	9.51 l

4. Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol(25:24:1) (500 ml)

Izoamil alkol	10 ml
Kloroform	240 ml
Fenol	250 ml

5. Tris-EDTA Tamponu (TE Tamponu)

1 M Tris	10 ml
0.5 M EDTA	2 ml
H ₂ O(ultrasaf)	1l (tamamlanır)
pH	7.6

Elektroforez Çözeltileri**1. 50X TAE (Tris Asetat EDTA)**

Tris	242 g
Asetik Asit(glasial)	57.1 g

EDTA	37.2 g
------	--------

Ultra saf su ile 1 l ye tamamlanır.

2. 1X TAE (Tris Asetat EDTA)

50X lik TAE çözeltisinin 50 kat seyreltilmesi ile elde edilir.

3. Brom Fenol Mavisi (Bromphenol Blue Dye)

Gliserol	7 ml
50X TAE	200 µl
% 20 SDS	100 µl
0.5 M EDTA	400 µl
Ultra saf su	2.3 ml

4. Etidyum Bromid Çözeltisi (0.5 µg/ml)

Etidyum Bromid (10 mg/ml)	25 µl
Distile H ₂ O	500 ml

5. Moleküler Ağırlık Markörü (Lambda DNA/*Eco*R1 ve *Hind*III)

Markör	1 µl
6X loading dye	1 µl
Ultra saf su	4 µl

AFLP Markör Analizi için Gerekli Olan Çözeltiler**1. EcoR1/Mse1 Enzim Karışımı (1.25 unit/μl)**

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

50 mM NaCl

0.1 M EDTA

1mM DTT

200 μg/ml BSA

%50 gliserol

%0.15 TritonX-100

2. 5X Reaksiyon Tamponu

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

50 mM Mg-asetat

250 mM K-asetat

3. T4 DNA Ligaz (5 unit/μl)

0.1 mM EDTA

1mM DDT

50 mM KCl

200 μg/ml BSA

%50 gliserol

4. Adaptör Karışımı (EcoR1/Mse1 adaptörleri)

0.4 mM ATP

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 mM Mg-asetat

50 mM K-asetat

Poliakrilamid Jel Analizi için Gerekli Çözeltiler**1. Stok Bind Silane**

Bind Silane 50 µl

Etanol 10 ml

Karıştırılır

Elde edilen stok 4 °C de, bulunduğu tüp aliminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunacak şekilde saklanır.

2. Bind Silane Çözeltisi

25 µl stok bind silane ile 25 µl %10 luk asetik asidin ependorf tüp içerisinde karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Her denemede taze hazırlanmıştır.

3. 1X Yürütme Tamponu (Running Buffer)

10X TBE tamponunun distile H₂O ile 10 kat seyreltilmesi ile elde edilmiştir. 50 °C de pH 8.3-8.7 olmalıdır.

4. % 10 APS (Amonyum persülfat)

0.1 g APS nin 1 ml ddH₂O içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Her denemede kullanılacak kadar ependorflara bölüştürülerek -20°C de saklanmışlardır.

5. % 8 Akrilamid Jel Matrisi

	Toplam Hacim (100 ml)
Urea	42 g
5X TBE	20 ml
%50 Akrilamid	26.7 ml

distile H₂O ile 112,5 g'a tamamlanır.

6. AFLP Moleküler Markörleri

IRDye 700 50-700 bp

IRDye 800 50-700 bp

-20 °C de saklanmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Arumuganathan, K. and Earle, E.D., 1991, Nuclear DNA content of some important plant species, *Plant Mol Boil.*, 9: 208-218.

Aydoğın, A., 2003, Ülkemizde Mercimek Üretimi, Tarla Bitkileri, Merkez Araştırma Enstitüsü.

Baum M., Weeden N.F., Muehlbauer F., Kahl G., Udupa S.M., Eujayl I., Weigand F., Harrabi M., Bouznad Z., 2000, Markör technology for plant breeding. In: Knight R (ed) *Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st century*. Kluwer, Dordrecht, pp 421–427.

Blair, M. W., Pedraza, F. Buendia, H. F., Gaitan-Solis, E. S., Bebee, E., Gepts, P. and Tohme, J., 2003, Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Theor Appl Genet.*, 107:1362–1374.

Duran, Y., Fratini, R., Garcia, P., and Vega, M.P., 2004, An intersubspecific genetic map of Lens, *Theor. Appl. Genet.*, 108: 1265-1273.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Emami, M.K. and Sharma, B.,** 1999, Linkage between three morphological markers in lentil, *Plant Breeding*, 118: 579-581.
- Eujayl, I., Baum, M., Erskine, W., Pehu, E., and Muehlbauer, F. J.,** 1997, The use of RAPD markers for lentil genetic mapping and the evaluation of distorted F2 segregation, *Euphytica*, 96: 405-412.
- Eujayl, I., Baum, M., Powell, W., Erskine, W., and Pehu, E.,** 1998, A genetic linkage map of lentil (*Lens sp.*) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines, *Theor. Appl. Genet.*, 97: 83-89.
- Eujayl, I., Erksine, W., Baum, M., and Pehu, E.,** 1999, Inheritance and Linkage Analysis of Frost Injury in Lentil, *Crop Science*, 39: 639-642.
- Ferguson, M.E., Ford-Loyd, B.V., Robertson, L.D., Maxted, N. and Newbury, H. J.,** 1998, Mapping the geographical distribution of genetic variation in the genus *Lens* for the enhanced conservation of plant genetic diversity, *Molecular Ecology*, 7: 1743-1755.
- Ferguson, M. and Erskine, W.,** 2001. Lentils (*Lens L.*). In Maxted, N. and S.J. Bennett, eds. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Flandez-Galvez, H., Ford, R., Pang, E. C. K. and Taylor, P. W. J. ,**
An intraspecific linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.)
genome based on sequence tagged microsatellite site and resistance
gene analog markers, *Theor Appl Genet.*, 106:1447–1456.
- Ford, R., Pang, E. C. K., and Taylor, P. W. J.,** 1999, Genetics of
resistance to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) of lentil and
identification of closely linked RAPD markers, *Theor. Appl.*
Genet., 108: 1265-1273.
- Furman, B.J., and Baum, M.,** 2006, Genotyping a composite
germplasm set of lentil, ICARDA activities under the generation
Challenge Programme, (www.icarda.org), Syria.
- Galasso, I., Schmidt, T., Pignane, D.,** 2001, Identification of *Lens*
culinaris ssp. *culinaris* chromosomes by Physical mapping of
repetitive DNA sequences, *Chromosome Research*, 9:199-209.
- Hamwieh, A., Udupa, S.M., Choumane, W., Sarker, A., Dreyer, F.,
Jung, C. and Baum, M.,** 2005, A genetic linkage map of *Lens* sp.
based on microsatellite and AFLP markers and the localization of
fusarium vascular wilt resistance, *Theor. Appl. Genet.*, 110: 669-
677.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harushima, Y., Kurata, N. and Yano, M., 1996,** Detection of segregation distortions in an *indica-japonica* rice cross using a high-resolution molecular map, Theor. Appl. Genet.,
- Havey, M.H., Muehlbauer, F.J., 1989,** Linkages between restriction fragment length, isozyme and morphological markers in lentil, Theor Appl Genet 77:395–401.
- Konishi, T., Yano, Y. and Abe, K., 1992,** Geographic distribution of alleles at the Ga2 locus for segregation distortion in barley. Theor. Appl. Genet., 85: 419-422.
- Ladizinsky, G., 1997,** A new species of lens from South-East Turkey, Botanical Journal of the Linnean Society, 123: 257-260.
- Liang-Xian, S., Zhen-Xue, S. and Zhen-Tian, Z., 2006,** Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants, China Agricultural University, 3(3): 163-169.
- Liscum, M., and Oeller, P., 1995,** AFLP: not only fingerprinting, but for positional cloning, Department of Plant Biology, Carnegie Institution of Washington, Standford, CA, 94305.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, B.H.,** 1999, Introduction to Genomics, Statistical Genomics (Linkage, Mapping and QTL Analysis), CRC Press, USA, 611 p.
- Lörz, H., and Wenzel, G.,** 2004, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement, Springer, Germany, 476 p.
- Lu, H., Romero-Severson, J., Bernardo, R.,** 2002, Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize, Theoretical Applied genetics, 105:622-628.
- Malhotra, R.,** 2006, Progress in Chickpea and Lentil Cultivation in Central Asia and Caucasus, ICARDA News, (www.icarda.org), Syria.
- Meksem, K., and Kahl, G.,** 2005, The Handbook of Plant Genome Mapping, Genetic and Physical Mapping, Wiley-VCH, Weinheim, 380 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Michelmore, R.W., Paran, I., and Keselli, R.V.,** 2006, Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid metod to detect markers in spesific genomic regions by using segregating populations, PNAS, p.6.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R., and Sasaki, T.,** 1997, Genome mapping molecular marker and marker-assisted selection in crop plants, Molecular Breeding, 3: 87-103.
- Muehlbauer, F.J., Cho, S., Sarker, A., McPhee, K.E., Coyne, C.J., Rajesh, P. N., and Ford, R.,** 2006, Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress, Euphytica, 147: 149-165.
- O'Brien, S.J.,** 1993, Genetic maps: locus maps of complex genomes, 6th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Öner, C.,** 2003, Ökaryotlarda gen bağlantısı (Linkaj), Krossover ve Haritalama, Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, Ankara, 816 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Burow, M.D., Draye, X., Elsik, C.G., Jiang, C. X., Katsar, C.S., Lan, T.H., Lin, Y.R., Ming, R., and Wright, R.J.,** 2000, Comparative genomics of plant chromosomes, *The Plant Cell*, Vol. 12, 1523-1539.
- Powell, W., Thomas, W.T.B., Baird, E., Lawrence, P., Booth, A., Harrower, B., McNicol, J.W., Waugh, R.,** 1997, Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. *Heredity*, 79: 48-59.
- Pawlowshi, W.P., Torbert, K.A., Rines, H.W. and Somers, D.A.,** 1998, Irregular patterns of transgene silencing in allohexaploid oat, *Plant Molecular Biology*, 38:597-607.
- Robinson, J. P. and Harris, S.A.,** 1999, Amplified fragment length polymorphisms and microsatellites: A phylogenetic perspective, *Molecular Tools for Biodiversity*, ([http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/which marker/index.htm](http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/which_index.htm))
- Rubenna, R., Ford, P., Taylor, W.J.,** 2003, Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris ssp. culinaris*), *Theor. Appl. Genet.*, 107: 910-916.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rubenna, R., Taylor, W.J., Ford, P., Ades, P.K.,** 2006, QTL mapping of resistance in lentil (*Lens culinaris ssp. culinaris*) to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*), Plant Breeding 125, 506—512.
- Santra, D. K., Tekeoglu, M., Ratnaparkhe, M., Kaiser, W. J. and Muehlbauer, F. J.,** 2000, Identification and Mapping of QTLs Conferring Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea, Crop Sci. 40:1606–1612.
- Sibov, S.T., Souza, C.L. and Garcia, A.A.F.,** 2003, Molecular mapping in tropical maize using microsatellite markers, Hereditas, 139:96-106.
- Song, Q. J., Marek, L. F., Shoemaker, R. C., Lark, K. G., Concibido, V. C., Delannay, X., Specht, J. E. and Cregan, P. B.,** 2004, A new integrated genetic linkage map of the soybean, Theor Appl Genet., 109:122–128.
- Taran, B., Michaels, T. E. and Pauls, K. P.,** 2002, Genetic Mapping of Agronomic Traits in Common Bean, Crop Sci. 42:544–556.
- Taylor, D.R. and Ingvarsson, P.K.,** 2003, Common features of segregation distortion in plants and animals, Genetica, 117: 27-35.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tekeoglu, M., Rajesh, P. N., and Muehlbauer, F. J., 2002,** Integration of sequence tagged microsatellite sites to the chickpea genetic map, *Theor Appl Genet.*, 105:847–854.
- Tinnemore, D., 1999,** USDA-ARS, Procedures and recipes for DNA Isolation, RAPD, RFLP, AFLP, STMS and ISSR Methods, F.J. Muehlbauer Lab., Grain Legume Genetics and Physiology Research Unit, Pulman, W.A., 46 p.
- Thoquet, P., Ghenardi, M., Journet, E.P., Kereszt, A., Ane, J.M., Prosperi, J.M., and Huguet, T., 2002,** The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes, *BMC Plant Biology*, 2:1, 1-13.
- Ulrich, G., Mueller, and Wolfenbarger, L.L., 1999,** AFLP genotyping and fingerprinting, *Tree*, Vol. 14, 389-394.
- Uysal, Ş., 2007,** Manisa Tarım İl Müdürlüğü, www.manisatarim.gov.tr.
- Van Ooijen, J.W., 1999,** LOD Significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species, *Heredity*, 83:613-624.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reljans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acid Research, Vol.23, No: 21, 4407-4414.

Weeden, N.F., Muehlbauer, F.J., and Ladizinsky, G., 1992, Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil, Genetic Maps, Journal of Heredity, 83: 123-129.

ÖZGEÇMİŞ

Şehnaz Özatay, 1976 yılında İzmir’de doğdu. İlk, Orta ve Lise eğitimlerini İzmir’de tamamladı. 1993 yılında Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü’nü kazandı. 1998 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Biyoteknoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. Yüksek lisansını “Fitaz Enzimi Üretimi ve Optimizasyonu” konulu tezini vererek 2001 yılında tamamladı. 1998-2001 yılları arasında aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. Doktora çalışmalarına Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü’nde başladı. 2003 yılında Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı’na yatay geçiş yaptı. 2003 yılında TÜBİTAK BAYG’dan yurt içi doktora bursu kazandı. Halen Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Merkezi ve EGERT Doğal Ürünler firmasının ortak projelerinden sonuçlanan Spirulina Üretim Tesisi-EGERT Doğal Ürünler Ltd. Şti. de Gıda Mühendisi olarak çalışmaktadır.